学位論文題名

Molecular Biological and Biochemical Studies on
Bacterial Genes Responsible for the Biosynthesis of
n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty acids

（細菌の *n*-3 長鎖多価不飽和脂肪酸合成遺伝子の
分子生物学，生化学的研究）

学位論文内容の要旨

エイコサペンタエン酸（EPA）は炭素数 20、二重結合数 5、ドコサヘキサエン酸（DHA）は炭素数 22、二重結合数 6 の長鎖多価不飽和脂肪酸（LC-PUFA）であり、メチル基末端より 3 位の炭素に二重結合が入っているので *n*-3 LC-PUFA と呼ばれる。これらの多価不飽和脂肪酸は多くの種子植物を除くほぼ全ての真核生物に、生体膜脂質成分や貯蔵脂質成分として存在する。一方、かつて細菌は多価不飽和脂肪酸そのものをもたないとされていたが、1980 年代に深海の海水や沈殿物から単離された細菌に、EPA と DHA が見出されて以来、*n*-3 LC-PUFA 産生細菌が多数、主に深海、極域の海水、海産生物の消化管などから、単離されている。

真核生物において、*n*-3 LC-PUFA は炭素数 18 の脂肪酸の酸素依存的な不飽和化と炭素鎖の伸長の組み合わせにより合成されるが、細菌においても同様な合成機構の関与が予想されていた。しかし、1996 年 Yazawa によって海産魚の腸内細菌 (*Shewanella pneumatophori* SCRC-2738) から 5 つ遺伝子 (*pfaA-E*) よりなる EPA 合成酵素遺伝子群 (*pfa*) が単離され、その遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列には、脂肪酸不飽和化酵素に保存されているモチーフは全くなく、脂肪酸合成酵素やポリケチド合成酵素と高い類似性が認められた。これらの結果をもとに、細菌において *n*-3 LC-PUFA はポリケチドの合成様式により合成されると考えられている。一方、1999 年 Tanaka らは DHA 合成細菌 *Moritella marina* MP-1 から *pfa* 遺伝子群を含むコスミドクローン (p3D5) 単離し、それが *pfaA-D* により構成されていることを見出した。しかし、この遺伝子群には、EPA 合成に必要なホスホパンテレン転移酵素 (PPTase) をコードする *pfaE* に相当する遺伝子が含まれていないために、DHA の組み換え生産はできないとされてきた。

EPA、DHA とも、その特有の生理活性から薬剤、健康食品として広く利用されている物質である。これまで細菌の *pfa* 遺伝子を用いて EPA や DHA の合成機構及び生理機能の解明とともに、組み換え生産が試みられてきている。EPA 合成に関与する *pfa* 遺伝子も、DHA 合成に関与すると予想される *pfa* 遺伝子も、遺伝子群の構成と個々の遺伝子のドメイン構造はよく似ているにも関わらず、EPA 産生菌は EPA、DHA 産生菌は DHA だけを合成する特徴をもつ。このことから、それぞれの *pfa* 遺伝子の中に、最終産物 (EPA か DHA) 決定

する要因があると考えられるが、それについては全く不明であった。本研究は、大腸菌の形質転換系を用いることによって、細菌で合成される *n*-3 LC-PUFA 分子種の決定の機構を明らかにすることを最終目標に行われた。

DHA の組み換え合成系を確立するために、先ず、DHA 合成に関わる *pfaE* 遺伝子のクローニングと、この *pfaE* と残りの *pfaA-D* との大腸菌における共発現系の構築を試みた。*pfaE* は、*M. marina* MP-1 のゲノム DNA を鋳型に、既知の PPTase の塩基配列をもとに作成した縮重プライマーを用いて PCR によって増幅した。縮重プライマーの設計に当たっては、非常に大きな遺伝子ファミリーである PPTase 遺伝子の中で、特に LC-PUFA 合成に関わると予想されるものの配列情報だけを参考にした。PCR によって得られた DNA 断片は EPA 合成に関わる *pfaE* と部分的に相同であり、PPTase 遺伝子の一部分であることが予想された。*pfaE* 遺伝子の全長配列は、既に Tanaka ら (1999) により構築されている *M. marina* MP-1 のゲノム DNA ライブラリをスクリーニングすることにより得られたポジティブクローンからクローニングした。新たに得られた DHA 産生菌の *pfaE* は 861 bp からなり、タンパク質の分子量は約 33000 と予想された。この *pfaE* 遺伝子と、*pfaE* 遺伝子を欠く EPA 合成酵素遺伝子 (*pfaA-D*) を大腸菌で共発現することにより EPA の合成が確認された。

大腸菌における DHA の組み換え合成を目的に、*M. marina* MP-1 ゲノムの p3D5 コスミドクローン及び p3D5 より調製した *pfaA-D* を含むプラスミドベクターである pDHA2 と DHA 産生菌由来の *pfaE* との共発現を行ったが、DHA の合成は認められなかった。その原因が、p3D5 及び pDHA2 中の *pfaA* 遺伝子に 1 箇所の塩基置換があったためであることから、この塩基置換を校正した pDHA3 を作成した。pDHA3 と DHA 産生菌由来の *pfaE* の大腸菌での共発現によって、DHA の合成が確認された。

EPA 合成及び DHA 合成に関わる各 *pfa* 遺伝子の互換性 (compatibility) を明らかにするため、EPA 合成に関わる遺伝子として *S. pneumatophori* SCRC-2738 由来の *pfaA-E* 遺伝子群、単離された個々の *pfa* 遺伝子、及び *pfaA-E* のうち 1 つを欠損したクローン ((財) 相模中央化学研究所より提供) と *M. marina* MP-1 に由来する pDHA3 及び *pfaE* を適宜組み合わせで大腸菌で発現させた。また、*pfaA* に変異があるために、*pfaA-D* としては機能しない pDHA2 (*pfaA*-D* と表記) も用いた。

二種類の *pfaE* 遺伝子は、それぞれ DHA 合成及び EPA 合成に関わる *pfaA-D* 遺伝子を補完したことから、*pfaE* (PPTase 遺伝子) は、互換性があり、*n*-3 LC-PUFA 合成における分子種決定に預かっていないと結論した。次に、*pfaA-D* のうち 1 つを欠損した EPA 合成に関わるクローンと pDHA2 の共発現を行った。*pfaA* を欠くクローン (*pfaB-E* をもつ) と pDHA2 の組み合わせでは、EPA、DHA の何れも合成されなかったが、それ以外の組み合わせでは EPA と DHA の両方が検出された。この結果は、EPA 合成に関わる *pfaA* は pDHA2 の *pfaA** を補完して、DHA 合成をもたらすこと、EPA 合成に関わる *pfaB*、*pfaC*、*pfaD* は pDHA2 の *pfaB*、*pfaC*、*pfaD* にそれぞれ補完され、EPA 合成をもたらすことを示唆している。従って、EPA 及び DHA 合成に関わる *pfa* 遺伝子は、全て互換性があり、EPA または DHA の何れを合成するかは、それぞれの *pfa* 遺伝子群を構成する単一の *pfa* 遺伝子により決められているのではなく、*pfaE* 以外の複数の *pfa* 遺伝子が関与しているものと予想される。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 奥 山 英 登 志
副 査 教 授 森 川 正 章
副 査 教 授 福 井 学
副 査 助 教 授 山 崎 健 一
副 査 主 任 研 員 森 田 直 樹

((独) 産業技術総合研究所)

学位論文題名

Molecular Biological and Biochemical Studies on Bacterial Genes Responsible for the Biosynthesis of *n*-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty acids

(細菌の *n*-3 長鎖多価不飽和脂肪酸生合成遺伝子の
分子生物学, 生化学的研究)

細菌はエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの*n*-3長鎖多価不飽和脂肪酸(*n*-3 LC-PUFA)を合成する。1996年に海産魚の腸内細菌、*Shewanella pneumatophori* SCRC-2738株からEPA合成酵素遺伝子群(*pfaA, B, C, D, E*)が単離され、これを大腸菌に発現させることによってEPA合成が可能となった。また、1999年にDHA合成海洋細菌、*Moritella marina* MP-1株からDHA合成酵素遺伝子群(*pfaA, B, C, D*)が単離された。細菌は、酸素依存的な脂肪酸の不飽和化によって*n*-3 LC-PUFAを好氣的に合成する動物、藻類、菌類などとは異なり、嫌気経路によりEPAやDHAを合成すると考えられているが、その見解は主として*pfa*遺伝子のアミノ酸配列情報から予想されているにすぎない。また、EPAおよびDHA合成に関わる*pfa*遺伝子は互いによく似た構造を持つが、生成物はEPAまたはDHAのいずれか一方であり、最終生成物の決定機構は明らかにされていない。申請者は本研究の目標を、1) EPAの中間体の存在を証明することによって嫌氣的合成経路が機能していることを確認すること。2) *n*-3 LC-PUFAの嫌氣的合成過程における最終産物(EPAかDHA)を決定する要因を特定することに設定し、研究を行った。

申請者は、先ずEPA合成酵素遺伝子群を大腸菌に導入した形質転換株を用い、その総脂肪酸中に含まれる、EPA合成の中間体と予想される多価不飽和脂肪酸の検索をガスクロマトグラフィ-質量分析により行った。その結果、親株には見られない二重結合が $\Delta 4,7,10,13$ にある炭素数16の脂肪酸を検出した。このヘキサデカテトラエン酸は既にEPAの嫌氣的合成における中間体であることが推定された。申請者はこの推定が裏付けられ、細菌においてEPAは嫌氣的合成経路で合成されると結論づけている。

次に申請者は、EPA、DHAの最終産物決定機構の解明には、EPAだけではなく、DHA

の異種生物(大腸菌)での遺伝子組換え合成系の確立が必要と考え、まだクローニングされていなかった *M. marina* MP-1のホスホパンテテン転移酵素をコードする *pfaE*の単離を行った。次いで、*M. marina* MP-1から既に取得済みであった *pfaA-D*遺伝子群(pDHA2)の *pfaA*遺伝子中に1箇所の塩基置換変異が存在し、*pfa*遺伝子として機能しない原因となっていることを見出したため、その補正を試み、新たにpDHA3を作製した。このようにして調製した *pfaE*とpDHA3を組み合わせて発現させることにより大腸菌でのDHA合成を確認した。申請者は、EPAおよびDHA合成酵素遺伝子群を大腸菌で組み合わせて発現させることにより、各 *pfa*遺伝子のEPAまたはDHA合成における役割を検討した。その際、DHA合成酵素遺伝子群については申請者自らが作製したものを用い、EPA合成酵素遺伝子群については、(財)相模中央研究所によって作製されていたものを用いている。その結果、*pfaA*と*pfaE*についてはその由来にかかわらず、ともにDHA及びEPAの合成をもたらすことが確認された。*pfaB*, *pfaC*, *pfaD*についても、DHA合成酵素遺伝子群の *pfaB*, *pfaC*, *pfaD*は、EPA合成酵素遺伝子群のそれぞれに相当する *pfa*遺伝子を相補した。一方、EPA合成酵素遺伝子群の *pfaB*, *pfaC*, *pfaD*もそのドメイン構造の高い類似性から、DHA合成酵素遺伝子と同様の互換性があると推測された。以上の結果から、細菌における *n-3* LC-PUFA合成系における最終産物の分子種は、単一遺伝子によるのではなく、複数の遺伝子産物の相互関係により決定されると結論づけている。

申請者は本研究を次のようにまとめている。1) EPA合成酵素遺伝子群を導入した大腸菌形質転換株より検出された炭素数16、二重結合の数が4の脂肪酸は、EPA合成過程の中間体であり、この脂肪酸の存在は、*n-3* LC-PUFAの嫌氣的合成経路が機能していることを示している。2) DHAおよびEPA合成酵素遺伝子群の各 *pfa*遺伝子は互換性を持っており、最終産物の決定は複数の *pfa*遺伝子間の相互作用によると考えられる。本研究の最大目標であった *pfa*遺伝子による最終産物決定要因の特定には到らなかったが、今後、DHA合成酵素遺伝子群から個別の遺伝子をクローニングすると同時に、個々の遺伝子の欠失遺伝子を構築し、これをEPA合成酵素遺伝子群と共発現するなど遺伝子間の相互作用の詳細な検討が必要であると考察している。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。