

論文の要旨

氏名 渡邊 研志

論文題目 Studies on the structure and function of fatty acid desaturase

(脂肪酸不飽和化酵素の構造と機能に関する研究)

本論文は、多様な反応特異性を示す不飽和化酵素ファミリーについて、その特異性を規定する分子メカニズムの解明を試みた研究についてまとめている。

脂肪酸は長鎖の直鎖アルキル基を持つカルボン酸であり、非常にシンプルな構造の物質であるが、その炭化水素鎖に不飽和化、水酸化、アセチレン化、エポキシ化、共役化などの修飾を受けることで、多様な機能を発揮する。このような修飾脂肪酸の生産を司るのは不飽和化酵素ファミリーと呼ばれる脂肪酸修飾酵素群であり、その多くは共通して2つの大きな疎水性領域に隔てられた3つの親水性領域を持つ膜結合型酵素である。本酵素群は多様な基質及び修飾位置の選択性を示すことが知られており、このような特異性を規定する分子機構が解明できれば、酵素の機能改変により新規構造の脂肪酸をはじめとする高付加価値脂肪酸のデザインへの応用が期待される。

本研究では、一次構造が高い相同性を示し、分子進化的にはパラログであると考えられるが、互いに排他的な基質特異性を持つ $\Delta 6$ 及び $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素(D6d及びD5d)を研究モデルとして、不飽和化酵素ファミリーの多様な反応特異性を規定する分子メカニズムの解明を試みた。本研究で得られた成果は、不飽和化酵素ファミリーの構造機能相関に関する理解を深め、本酵素群の効率的な機能改変技術への応用に寄与することが期待される。

第1章 (序論)

生体内で多種多様な生理活性を発揮する修飾脂肪酸群の生合成を司る、不飽和化酵素ファミリーの高付加価値脂肪酸生産への応用の可能性、そのために必要な研究とその現状について概説し、本研究の目的及び概要について述べている。

第2章

D6dとD5dは一次構造が高い相同性を示すにも関わらず、異なる基質特異性を示し、その違いを規定する分子機構に興味を持たれた。本章では両酵素の基質特異性を規定するアミノ酸残基の同定について述べている。

D6d-D5d間で異なるアミノ酸について、D6d中の当該残基をD5d型に置換した変異型D6dを作成し、その基質特異性を解析した結果、D6d活性がD5d活性に変化する8つの変異点(Ser209, Asn211, Arg216, Ser235, Leu236, Trp244,

Gln245, Val344) を特定した。加えて、ゼブラフィッシュ由来 $\Delta 5/6$ 二機能性不飽和化酵素 (zD5/6d) との比較の下、zD5/6d 中で、D6d とは異なり D5d 型であるアミノ酸について、D6d 中の当該残基を D5d 型に置換した変異酵素の活性解析の結果、二機能性の発現に重要な変異点 Leu323 (D6d) を見出した。また、ヒト由来 $\Delta 9$ 不飽和化酵素とのホモロジーモデリングの結果、基質結合ポケットの入り口付近に位置する Arg216、Trp244 及び底部に位置する Leu323 の置換で生じるポケットの構造変化によって、基質脂肪酸がポケットのより深くに挿入され、 $\Delta 5$ 位の炭素-炭素結合が活性中心に近づくことで D5d 活性が発現することを示した。

第 3 章

D6d と D5d を含む高等動物の脂肪酸不飽和化酵素はアシル CoA を基質として利用する。これらの酵素の活性測定には組織から調製したミクロソーム画分と放射性標識した基質を用いた *in vitro* 反応系や、異種宿主で酵素遺伝子を発現させて生成物を測定する *in vivo* 反応系が従来用いられてきたが、定量性の低さのために酵素機能の厳密な測定や比較は困難である。そこで本章では非標識アシル CoA の検出法を改善することで、定量性及び実験操作の簡便性を向上させた *in vitro* 不飽和化反応系の構築を試みた。

in vitro 反応は D6d 発現酵母から調製した細胞破碎液、D6d 基質のリノレオイル CoA 及び電子伝達因子の NADH を用いて行った。反応後に CoA チオエステルを特異的にブチルアミド誘導体化してガスクロマトグラフィーで分析することで、放射性標識基質を用いずとも、アシル CoA を基質とする不飽和化酵素の活性の特異的な検出が可能であることを示した。

第 4 章

D6d や D5d を含む一部の不飽和化酵素は、分子内に不飽和化反応に必要な電子の伝達を行うシトクロム b_5 様領域を有している。D6d の本領域はその最大活性の発現に関与するが、本酵素群の立体構造に関する情報の不足により不飽和化酵素本体とシトクロム b_5 様領域の相互作用の分子機構は不明である。そこで、D6d 及び D5d の結晶構造解析を見据え、両酵素の精製を試みた。

本章ではメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて活性型酵素の大量生産系を構築し、種々の界面活性剤による酵素の膜からの可溶化条件及び精製条件について検討した結果、本酵素の均一な精製を可能とした。

第 5 章 (総括)

本研究によって得られた成果についてまとめており、本研究成果の不飽和化酵素ファミリーの構造機能相関に関する研究の発展への寄与について述べている。