

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 工 学 )	氏名	渡 邊 研 志
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
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)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	秋 庸 裕	
審査委員	教 授	田 中 伸 和	
審査委員	教 授	河 本 正 次	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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、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合成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を持つ膜結合型酵素である。本酵素群が示す多様な基質及び修飾位置の選択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質のデザインへの応用が期待される。本論文では、高い相同性を示すが、互いに排他的な基質特異性を持つ哺乳類の<math>\Delta 6</math>及び<math>\Delta 5</math>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。</p> <p>第1章では、不飽和化酵素ファミリーとその高付加価値脂肪酸生産への応用の可能性と、そのために必要な研究とその現状を概説し、本研究の目的及び概要について述べている。</p> <p>第2章では、D6dとD5dの異なる基質特異性を規定する分子機構について述べている。D6d-D5d間で異なるアミノ酸をそれぞれD5d型に置換した変異型D6dを作成し、その基質特異性を酵母発現系で解析することにより、D5d型の特異性をもたらす8つの変異点(Ser209, Asn211, Arg216, Ser235, Leu236, Trp244, Gln245, Val344)を特定した。また、ゼブラフィッシュ由来<math>\Delta 5/6</math>二機能性不飽和化酵素との比較の下、D5d型であるがD6dとは異なるアミノ酸をそれぞれD5d型に置換した変異型D6dを作成して活性解析した結果、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<math>\Delta 9</math>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とTrp244及び底部に位置するLeu323のD5d型アミノ酸への置換で生じるポケットの構造変化によって、基質脂肪酸がより深くに挿入され、<math>\Delta 5</math>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明らかにした。</p>			

第3章では、アシル CoA を基質として利用する高等動物の脂肪酸不飽和化酵素の新たな活性測定法の開発について述べている。従来は、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* 反応系が用いられてきたが、酵素活性の厳密な測定や比較は困難であった。そこで、両者の利点に加えて非標識アシル 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不飽和化反応系の構築を試みた。D6d 発現酵母から調製した細胞破砕液、基質リノレオイル CoA 及び電子伝達因子 NADH による反応後に脂肪酸 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により、放射性標識基質を用いることなく不飽和化酵素活性の特異的検出が可能であることを示した。

第4章では、電子伝達に関わるシトクロム *b<sub>5</sub>* 様領域を有する膜結合型不飽和化酵素の結晶構造解析をめざして、D6d 及び D5d の精製法について述べている。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膜画分からの溶離条件及びクロマトグラフィーによる精製条件について検討した結果、本酵素の精製が可能であることを示した。

第5章では、一連の研究によって得られた成果について総括し、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。

以上のように、脂肪酸不飽和化酵素の構造と機能の相関について、タンパク質工学及び生化学的手法を駆使して新たな知見を与え、高付加価値脂質の分子設計技術の確立に向けて多大な寄与を果たしたことは、工学的及び学術的に意義が大きい。したがって、本論文の著者は、博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認められた。