

氏名（本籍）	古田島 知則 （ 新潟県 ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 7158 号		
学位授与年月日	平成26年11月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Distribution and Synthetic Pathway of Octadecapentaenoic Acid, a Characteristic Polyunsaturated Fatty Acid, in Microalgae (藻類に特徴的な多価不飽和脂肪酸 18:5 の分布と合成経路に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士(農学)	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	理学博士	白岩 善博
副査	筑波大学教授	博士(理学)	石田 健一郎
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治

## 論 文 の 要 旨

一部の真核微細藻は、炭素数18、不飽和度5の多価不飽和脂肪酸（オクタデカペンタエン酸：18:5 Δ<sup>3,6,9,12,15</sup>、以下18:5と表記）を合成する。モデル植物、例えばシロイヌナズナでは18:3まで、ある種のシアノバクテリアが18:4までしか合成できないことを考えると、18:5脂肪酸の合成はごく一部の真核藻類に限られた形質である。これまでの研究から18:5の存在は、紅藻由来二次植物であるハプト藻、渦鞭毛藻と不等毛藻、また緑藻植物門に属するプラシノ藻類で報告されている。同じく藻類由来の多価不飽和脂肪酸として知られる、20:5（エイコサペンタエン酸：EPA）や22:6（ドコサヘキサエン酸：DHA）の合成に関しては、藻類系統間での分布やその合成経路、ひいては産業利用に至るまで多くの研究がなされ、知見が蓄積されているものの、18:5についてはその機能や合成に関する知見は非常に乏しい。18:5を合成する微細藻類は、形質転換系が開発されていない非モデル生物のため、18:5合成能を欠損した株を用いた解析ができないことがひとつの原因である。本研究では、18:5を合成する微細藻類の系統的關係を解明し、またその合成経路を明らかにするため、合成に関与するアシル脂質不飽和化酵素を同定することを目的とした。

18:5は紅藻系統二次植物に広く検出されるが、一次植物のプラシノ藻類にも見出される。プラシノ藻は緑藻植物門の中で原始的な一群であると考えられており、多様な細胞や鞭毛形態、分裂様式などから単系統群としてまとめられていない。これまでの研究から、プラシノ藻のうち *Micromonas*、*Pycnococcus*、*Pyramimonas* で18:5が検出されている。一方、クラミドモナスやクロレラを含むコア緑藻からは、未だ1種も18:5を持つ種は見つかっていない。そこで、緑藻植物門において、なぜ一部のプラシノ藻類だけが18:5合成能をもつのかを明らかにするために、国立環境研究所の藻類リソースの保有された様々なプラシノ藻株の脂肪酸組成を調べた。

脂肪酸解析の結果、プラシノ藻 *Ostreococcus tauri*、*Micromonas pusilla*、*Prasinoderma coloniale* で18:5が検出された。前述したように *Ostreococcus* と *Micromonas* は既知の報告にも18:5の蓄積が報告されているが、*Prasinoderma* からは初の報告である。プラシノ藻は単系統群ではなく系統關係を議論するのは未だ難しいものの、これまでの知見をまとめると、*Prasinoderma* は緑藻系統の中でより早期に分岐したグループの一つであると考えられることから、18:5合成能は緑色植物門の起源にもともと備わっていた形質であり、コア緑藻への進化の過程で欠失したものであると考えられた。紅藻系統二次植物の18:5合成の起源はわかっていないが、一次紅藻

では18:5が検出されていないことから、二次植物それぞれの分類群に独立してから獲得された形質だと考えられた。

ハプト藻*Emiliania huxleyi*は、18:5生産藻の中でも比較的生理学的な知見が多く蓄積しており、またゲノム配列も解読されている。18:5は*E. huxleyi*の葉緑体チラコイド膜の構成グリセロ脂質、特にMGDGとDGDGに多量に蓄積していることがわかっている。そこで*E. huxleyi*において、18:5合成を促進させる培養条件を検討し、その条件下での遺伝子発現解析を行った。またゲノム情報をもとに18:5合成に関わる遺伝子の同定を試みた。

一般に膜脂質脂肪酸の不飽和化は、低温条件で促進されることから、*E. huxleyi*を最適培養温度の25℃から低温条件の15℃に移して培養した。経時的に細胞の脂肪酸を分析し、その組成の変化を観察したところ、15℃に移して2日後に、全脂肪酸に占める18:5の割合はおよそ1.5倍に増加した。それに対して、18:4( $\Delta 6, 9, 12, 15$ )の割合はおよそ6割まで減少した。この2種の脂肪酸のほかに組成の変化が見られたのは、18:1( $\Delta 9$ )と18:3( $\Delta 9, 12, 15$ )でいずれもおよそ1.3倍増加した。また、14:0はおよそ8割まで減少した。以上の結果から、低温条件で $\Delta 9, \Delta 15, \Delta 3$ の不飽和化酵素の発現が上昇する可能性が示唆された。また、18:5は、葉緑体チラコイド膜に含まれているグリセロ脂質に主に存在していることから、当該不飽和化酵素も葉緑体に局在すると考えられた。

脂肪酸不飽和化酵素は、葉緑体に局在しフェレドキシンから電子を受け取るものと、小胞体膜に局在しシトクロムから電子を受け取るものの2種類に大別される。*E. huxleyi*のゲノム情報から、脂肪酸不飽和化酵素をコードしていると考えられる29個の遺伝子を見出し、これらのうちから、移行シグナルを持ち葉緑体に局在すると考えられるものを18個選抜した。そのうち一つの不飽和化酵素遺伝子 (Genbank accession number: EOD40666) に着目した。EOD40666は、 $\Delta 6$  desaturase domainに相同性を持ち、またそのオルソログ遺伝子が18:5を持つ*Ostreococcus*と*Micromonas*のゲノムにも保存されていた。さらに、*E. huxleyi*を25℃から15℃に移したとき、EOD40666のmRNA蓄積量が約2.5倍に増加したことから、この遺伝子が低温条件での脂肪酸の不飽和化に関わっている可能性が考えられた。

EOD40666の機能を解析するため、ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803を用い異種発現を試みた。*Synechocystis*は相同組換えによる形質転換が容易であり、また、植物・藻類のチラコイド膜と同じ脂質組成をもつこと、18:5前駆体である18:4を合成することなどから、異種発現のホストとして相応しいと判断した。EOD40666を発現する株を34℃で培養し、脂肪酸解析を行った結果、18:2  $\Delta 9, 12$ と18:3  $\Delta 6, 9, 12$ の割合が減少し、一方、18:3  $\Delta 9, 12, 15$ と18:4  $\Delta 6, 9, 12, 15$ の割合が顕著に増加していた。以上の結果から、EOD40666は新規な $\Delta 15$ 不飽和化酵素であることが示唆された。しかしながら、18:5にあたるピークは検出されなかった。EOD40666のアミノ酸配列は既知の $\Delta 15$  不飽和化酵素のものとは大きく異なっており、触媒ドメインのHis boxの配列にも相同性が見られなかった。これらのことから、EOD40666は、18:5を合成するハプト藻とプラシノ藻に保存された、新規な $\Delta 15$ 不飽和化酵素であることが示された。

## 審 査 の 要 旨

微細藻類が合成するユニークな脂肪酸オクタデカペンタエン酸 (18:5) に着目し、その分布と合成経路の解明を目指した。8種のプラシノ藻の脂肪酸解析から、新たに18:5を蓄積するプラシノ藻を同定し、18:5合成の起源を考察した。さらに円石藻の脂肪酸不飽和化酵素の機能解析を行い、これまで知られていなかった新規な構造をもつ $\Delta 15$ 脂肪酸不飽和化酵素を同定した。これによって脂肪酸不飽和化酵素の構造と機能に新たな知見をもたらすとともに、脂肪酸やアシル基の修飾に関わる酵素が、これまで知られている以上に多様な起源を持ち、構造からその機能を推定することの難しさと、機能を実際に確認することの重要性を示した点で、当該分野の発展に大きく貢献したと評価できる。

平成26年10月6日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。