九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ラビリンチュラ類のDHA含有グリセロ脂質生合成機構に関する研究

奴田原，枝利

https://hdl.handle.net/2324/2236313

出版情報：九州大学，2018，博士（農学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名　：　奴田原　枝利

論文題名　：　ラビリンチュラ類の DHA 含有グリセロ脂質生合成機構に関する研究

区　　分　：　甲

論　文　内　容　の　要　旨

ドコサヘキサエン酸（DHA, C22:6n-3)をはじめとする n-3 高度不飽和脂肪酸（n-3 PUFA)は、神経系の発達や機能維持、血中中性脂肪低減、心血管疾患リスクの低下などの生理機能が認められる有用脂肪酸である。本研究対象であるラビリンチュラ類は、DHA を多量に生合成し、トリアシルグリセロール（TG)やホスファチジルコリン（PC)などのグリセロ脂質の脂肪酸アシル基として保有する。他生物と比較して脂質蓄積能が格段に高いことや大量培養が可能であることから、魚油を代替する n-3 PUFA 新規供給源として有望である。ラビリンチュラ類を有用脂質生産源として分子育種するためには、ゲノムデータベースの整備や形質転換系の開発とともに、脂質生合成経路を統合的に理解することが不可欠である。本研究では、ラビリンチュラ類の DHA 含有グリセロ脂質の生合成機構を解明することを目的とした。

Aurantiochytrium limacinum のドラフトゲノム解析により複数のグリセロ脂質生合成関連酵素候補を選別した。それらの基質特異性を解析した結果、PLAT2 はグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT)、PLAT3 と PALT6 はリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT)であることが分かった。また、*A. limacinum* F26-b の候補酵素の mRNA 発現を解析した結果、PLAT6 が最も強く発現しており、続いて PLAT2 の発現が高かった。しかし、PLAT3 はほとんど発現していなかった。そこで、本研究では PLAT6 と PLAT2 に着目し、研究を進めた。

はじめに、PLAT6 遺伝子破壊（KO）株と過剰発現株（OE）株を作製し、酵素活性を国定したところ、KO 株では LPAAT 活性が減少し、OE 株では上昇していた。続いて、ジアシルグリセロール(DG)、PC、TG 等のグリセロ脂質を LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、KO 株では DHA 含有 DG (DG 38:6、DG44:12)が減少しており、OE 株ではそれらが増加していた。一方、飽和脂肪酸含有 DG（DG 32:0)には変化が見られなかった。DG を共通基質として生合成される PC、TG の組成にも変化が認められた。KO 株では DHA 含有 PC (PC 38:6、PC 44:12)が減少し、OE 株では増加した。DHA を 2 分子以上含む TG (TG 60:12、TG 66:18)は KO 株で減少し、OE 株で増加した。これまでの知見と今回の結果から、PLAT6 は LPA の *sn-2* 位に主に DHA を転移する LPAAT であることが分かった。また、OE 株は野生株と比較して対数増殖期の細胞増殖とグルコース消費が有意に抑制され、細胞の小型化が認められた。これらの増殖や形態の変化は、PLAT6 過剰発現によって LPA と PA の量比や DHA 含有グリセロ脂質量が変化したためと推測される。

次に、PLAT2 遺伝子破壊株と過剰発現株を作製し、GPAT 活性を測定したところ、KO 株では減少し、OE 株では上昇した。KO 株では DHA 含有 LPA (LPA 22:6)が減少し、OE 株では増加した。また、DG、PC、TG の脂質組成を解析したところ、KO 株では DG 38:6、DG 44:12 が減少しており、OE 株では増加していた。一方、DG 32:0 は変化しなかった。さらに、KO 株では PC 38:6、PC 44:12 が減少し、OE 株では増加した。TG 54:6、TG 60:12、TG 66:18 は KO 株で減少し、OE 株で増加した。これまでの知見と今回の結果は、PLAT2 が *sn-1* 位に主に DHA を転移する GPAT であることを示している。また、KO 株では細胞増殖が顕著に抑制され、OE 株では最終的なバイオマスが有意に増加した。このことから、PLAT2 はグリセロ脂質生合成系全体の律速酵素として機

能していると考えられる。さらに、PLAT6 OE 株と同様に、PLAT2 OE 株においても細胞の小型化が認められた。この形態変化も、PLAT6 OE 株と同様に、LPA の増加や DHA 含有グリセロ脂質の増加に原因があるものと推測される。

最後に、*A. limacinum* F26-b において、PA の脱リン酸化によって DG を生成する PA 脱リン酸化酵素（PAP)の同定を試みた。出芽酵母の Pah1p と相同性の高い 2 つの PAP 候補遺伝子（alPAP1、alPAP2）を *A. limacinum* F26-b のゲノム DNA よりクローニングし、大腸菌で発現させて PAP 活性を測定した。その結果、alPAP1 のみが PAP 活性を示すことが明らかになった。

以上のように、本研究ではラビリンチュラ類 *A. limacinum* F26-b の DHA 含有グリセロ脂質 *de novo* 合成系を構築する主要な 3 酵素を同定した。つまり、下図に示すように、*A. limacinum* F26-b では PLAT2 により G3P から DHA-LPA が生合成され、続いて、主に PLAT6 によって DHA-LPA が DHA-PA に変換される。生成した DHA-PA は alPAP1 によって脱リン酸化され DHA-DG となり、この DHA-DG が DHA 含有 TG および PC の前駆体となる。ラビリンチュラ類では、DHA を 2 分子以上持つ PC や TG などの DHA-rich なグリセロ脂質量が多いことが他の生物との大きな違いである。このような DHA-rich なグリセロ脂質は、de novo 合成系において PLAT2 と PLAT6 の両方が DHA-CoA を基質とした時に生成されると考えられる。

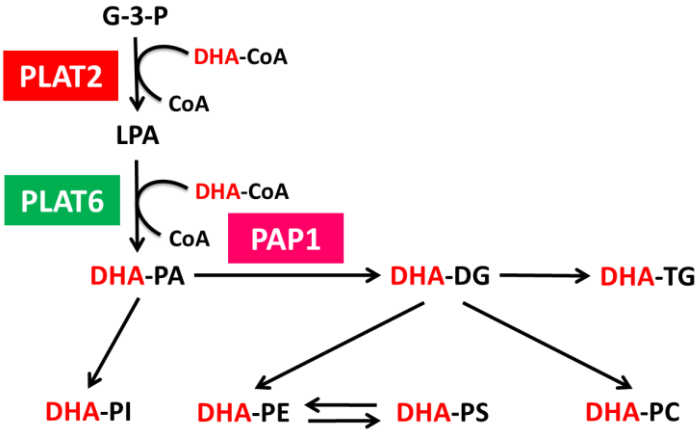

図　ラビリンチュラ類のグリセロ脂質生合成経路