

エイコサペンタエン酸の生理機能発現の分子基盤解析

京都大学 化学研究所 栗原達夫

【緒言】

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸は、生体膜を構成するリン脂質のアシル鎖として、細菌から高等生物に至る多様な生物種に存在する。抗炎症作用や抗腫瘍作用などの生理活性をもつことが知られており、その生理機能発現機構の解析が精力的に進められている。我々は、EPA 生産性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を用いて EPA の生理機能解析を進め、EPA が本菌の正常な細胞分裂に要求されることや、膜タンパク質のフォールディングを促進する機能をもつことを明らかにしてきた。本助成研究においては、EPA によって共有結合性の修飾を受けるタンパク質を探索し、EPA がタンパク質の修飾を介して生理機能を発現する可能性を探った。

【方法・結果・考察】

先行研究において我々は EPA の ω 末端メチル基をエチニル基 ($-C\equiv CH$) で置換した EPA アナログ (eEPA) を化学合成した (図 1)。エチニル基をもつ化合物はクリックケミストリーの手法で特異的にアジド化合物と結合させることができるため、蛍光アジド化合物による可視化や、アジドビオチンを用いたアフィニティー精製などが可能である。また、エチニル基は蛍光発色団などと比べて嵩が低いため、被標識物の機能に対する影響が比較的小さいことが期待される。実際、*S. livingstonensis* Ac10 の EPA 欠損株 (Δ EPA) の生育不全が、EPA の外部添加と同様、eEPA の外部添加によっても抑制できることが示され、eEPA が EPA と同様の生理機能を有するものと考えられた。そこで、eEPA を用いて、EPA 修飾タンパク質を探索することとした。

eEPA 存在下で培養した Δ EPA の不溶性画分をアジドビオチンで化学標識し、ストレプトアビジンビーズを用いたアフィニティー精製に供した。得られたタンパク質群をペプチドマスフィンガープリンティング法で解析した結果、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ (Dcp)、エンドペプチダーゼ (PepO)、異物排出ポンプを構成する膜融合タンパク質 (AcrA)、外膜ポーリンタンパク質 (Omp74)、ペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (FkpA) の 5 種のタンパク質ホモログが同定された。これらのうち 3 種 (Dcp、PepO、AcrA) には、リポタンパク質に高度に保存されているリポボックス配列が見いだされた。リポボックス配列を持つタンパク質の N 末端は *N*-アシル-*S*-ジアシルグリセリルシステイン残基となることが知られている。本菌の Dcp、PepO、AcrA では、この部分に EPA が導入されることが推定される。一方、Omp74 と FkpA については既知のリポボックス配列は保存されておら

ず、未知の脂質修飾様式により EPA が付加していると推定された。そこで Omp74 の EPA 修飾について、さらに詳細な解析を進めた。Omp74 の修飾における脂肪酸の特異性を調べるため、eEPAに加えて、本菌の主要な脂肪酸であるパルミトレイン酸の ω 末端メチル基をエチニル基で置換した ePAL を化学合成し、eEPA と ePAL による Omp74 の修飾を比較した。eEPA または ePAL の存在下で培養した菌体から、上記と同様の方法で eEPA または ePAL で修飾されたタンパク質を調製した。その結果、eEPA 修飾型 Omp74 の Omp74 全体に占める割合は、ePAL 修飾型 Omp74 のそれよりも高いことが示された。以上の結果から、EPA を優先的に Omp74 に導入する仕組みが存在することが示唆された。本研究結果は、EPA などの多価不飽和脂肪酸が、生体膜リン脂質のアシル鎖として生理機能を発揮するばかりでなく、タンパク質の修飾を介して生理機能を発揮する可能性があることを示すものと言える。

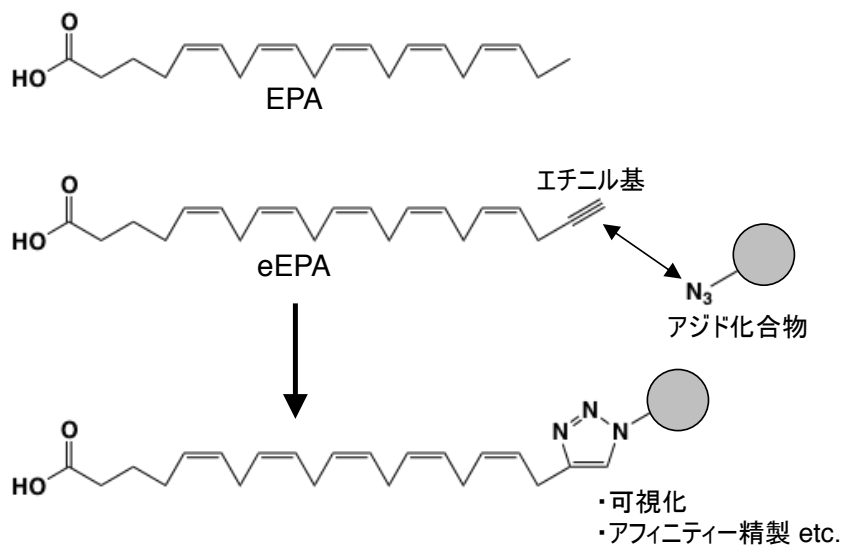


図 1. ω -エチニル型 EPA アナログ (eEPA) の構造と特徴

【口頭発表】

1. 米田雄紀、徳永智久、川本純、小川拓哉、栗原達夫「長鎖多価不飽和脂肪酸によるタンパク質翻訳後修飾の解析」第 19 回極限環境生物学会年会（2018 年 12 月 8 日 島根県松江市）
2. 米田雄紀、徳永智久、川本純、小川拓哉、栗原達夫「低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索」日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 27 日 東京都世田谷区）