

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06683

研究課題名(和文) チラコイド膜間pH差維持機構におけるガラクト脂質の役割

研究課題名(英文) Roles of galactolipids on maintenance of delta-pH across thylakoid membranes

研究代表者

栗井 光一郎 (Awai, Koichiro)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：80431732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学ポテンシャル差(プロトン濃度差：pH)に起因するチラコイド膜のプロトン駆動とチラコイド膜に特徴的な膜脂質組成の関係を明らかにするため、シロイヌナズナの野生株およびチラコイド膜脂質合成酵素遺伝子変異体を用いてプロトン駆動力測定を行ったところ、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)合成酵素変異株であるdgd1株でpHの特異的な低下が見られた。他のチラコイド膜脂質合成酵素遺伝子に変異のある株では、ほとんど変化がないか、もしくは電気ポテンシャル差()とpHの両方に減少がみられたことから、DGDGがチラコイド膜のpHの維持に重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素発生型光合成をおこなうチラコイド膜は、ガラクト脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)やDGDGが例外なく主要脂質として存在するが、なぜこれらのガラクト脂質がチラコイド膜の8割をも占めて用いられているのかは不明であった。本研究により、ガラクト脂質がチラコイド膜のpH維持に寄与している可能性が示された。今後、光合成による光エネルギーから化学エネルギーへの変換システムの一端が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify the relationship between the proton motive force of thylakoid membranes caused by chemical gradient (proton gradient: pH) and the characteristic membrane lipid composition of thylakoid membranes, we measured proton motive force of the wild-type and mutants of the thylakoid membrane lipid synthase genes in *Arabidopsis thaliana*. A specific decrease in pH was observed in the dgd1 mutant, a digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase mutant. Other mutants of the genes for the thylakoid membrane lipid synthesis did not show specific decrease in pH, indicating that DGDG may have important roles in maintenance of pH in thylakoid membranes.

研究分野：植物脂質生理学

キーワード：ガラクト脂質 チラコイド膜 シアノバクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チラコイド膜は膜タンパク質と膜脂質で構成され、その比率はおおよそ 5:5 と考えられている。膜脂質のうち 8 割はジアシルグリセロールに 1 分子もしくは 2 分子のガラクトースが付加したガラクト脂質モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) であり、それぞれチラコイド膜脂質の 5 割と 3 割を占める。残りの 2 割は酸性糖脂質のスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) と唯一のリン脂質ホスファチジルグリセロール (PG) である。上記の脂質組成はチラコイド膜を持つ酸素発生型光合成生物に保存されているが、その理由は明らかではない。

チラコイド膜の ATP 合成は化学ポテンシャル差 (プロトン濃度勾配、pH) による影響が大きく、電気ポテンシャル差 () の影響は比較的少ないことが知られている。これは、水の酸化や Q サイクルによってチラコイド内腔にプロトンが蓄積することで生まれる電気ポテンシャル差が、カリウムなどのカウンターイオンがストロマへ輸送されることで解消されてしまうためと考えられている。一方、ミトコンドリアでは pH はそれほど大きくなく、主に によってプロトン駆動力が得られている。実際、ミトコンドリア内膜の pH は 0.5 程度で、チラコイド膜を介した pH (3 程度: チラコイド内腔 pH=5, ストロマ pH=8) に比べるとはるかに小さい。このことは、チラコイド膜は大きな pH に耐えるだけの機能を有していることを示しており、それがチラコイド膜でのプロトン駆動力を保障しているといえる。以上のことから、ガラクト脂質がチラコイド膜の大きな pH の維持に寄与しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、ガラクト脂質を欠失している、もしくは他の脂質と置き換わっているチラコイド膜を用いて pH の維持機構を調べ、化学ポテンシャル差維持に対するガラクト脂質の役割を明らかにする。人工的に作製した膜小胞 (リポソーム) を用いた実験から、ガラクト脂質を含む小胞の方がリン脂質のみの小胞と比べてプロトンが透過しにくいことがわかっており、少なくとも脂質組成によって pH への耐性が異なることがわかっている。

2. 研究の目的

本研究は、チラコイド膜の pH 維持機構における膜脂質、特にガラクト脂質の役割を明らかにするものである。これまで、チラコイド膜の pH 維持機構を説明する研究はみられず、またそこに膜脂質がどのように寄与しているかは全く分かっていないため、他に類を見ない研究である。

3. 研究の方法

モデル植物であるシロイヌナズナでは、チラコイド膜脂質合成酵素遺伝子の欠失や機能低下がみられる様々な変異株が存在する。それらの変異株を用いて、pH の変化を測定し、チラコイド膜脂質のうち、どの脂質が pH の維持に寄与しているのかを明らかにする。また、シアノバクテリアのチラコイド膜脂質欠損株を用いた pH 測定方法の確立を目指す。シアノバクテリアでは、主要な膜脂質の完全欠損株が単離されていることから、それらを利用することで各膜脂質の pH 維持における機能をより明確に示す。また、添加実験により、どのように回復するかを調べる。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナを用いた解析

モデル植物であるシロイヌナズナではプロトン駆動力の測定方法は確立しており、またチラコイド膜脂質の合成・蓄積変異株も多く存在することから、シロイヌナズナを用いた実験をおこなった。チラコイド膜には、主に 4 種の膜脂質が存在し、そのうちの 2 種はガラクト脂質 MGDG と DGDG である。前者はジアシルグリセロールに 1 分子のガラクトースが、後者は 2 分子のガラクトースが付加している。残りの 2 種は酸性脂質で、酸性糖をもつ SQDG とリン脂質 PG である。これらの膜脂質合成が阻害された株を用いてプロトン駆動力の測定を行った。

mgd1-1 株はチラコイド膜に最も多く存在する MGDG の含量がおおよそ半減している。この株を用いたプロトン駆動力の測定を行ったところ、 と pH 双方での減少がみられた。一方、dgd1-1 株では DGDG の合成が阻害されており、その含量が 1 割以下に減少している。この dgd1 変異株でプロトン駆動力の測定を行ったところ、 pH で顕著な減少がみられみられた。このことから、DGDG が pH の維持に重要である可能性が出てきた。これまで、チラコイド膜脂質と pH の維持の関係を示した報告はなく、新しい発見である。

酸性脂質である SQDG と PG の変異株についても解析を行った。SQDG が欠失している変異株である sqd1 株および sqd2-1 株でプロトン駆動力の測定を行ったところ、特に の減少が見られた。一方、PG 合成変異株である pgg1-1 および pgg1-1/pgg1-2 二重変異株では、 と pH 双方での顕著な減少が見られた。この結果は、SQDG もしくは酸性脂質が の維持に寄与している可能性を示している。

(2) シアノバクテリアを用いた解析

プロトン駆動力(Δp と pH)を測定するための測定ユニット(P515/535 emitter-detector)を既存の Dual-PAM (Walz 社)に繋ぎ、測定系の確立を行った。材料としては、Synechocystis sp. PCC 6803 株および Synechococcus elongatus PCC 7942 株を用いた。当初、パラメーターの設定に手間取り、不明な点も多かったため、メーカー (Walz) に問い合わせを何度も行って検証した結果、ノイズがかなり高いものの、ある程度の測定ができるようにはなった。具体的には、グラフの波形自体は文献とは異なるものの、シアノバクテリアの野生株と、膜脂質欠損株では明らかな違いが確認できた。しかし、植物での測定でみられるようなはっきりとした結果を得ることはできなかった。

過去の文献では、シアノバクテリアでのプロトン駆動力測定も報告されている。しかし、シアノバクテリアが LHCP ではなくフィコビリソームを集光装置に利用していることから、測定の精度をこれ以上改善することは難しいと考えられた。これは、プロトン駆動力測定の際、LHCP 内のカロテノイドの電場による吸光度変化を用いて Δp と pH を測定するためである。そこで、蛍光 pH 指示薬を取り込ませたシアノバクテリアの生細胞での測定を試みたが、試した試薬では過去の報告と同様の測定をすることが出来なかった。

(3) 今後の展開

今後、脂質組成の異なる人工リポソームに蛍光 pH 指示薬を取り込ませ、pH 維持におけるチラコイド膜脂質の役割、特に DGDG の役割を明らかにしたい。また、シアノバクテリアでチラコイド膜脂質を欠く遺伝子破壊株やチラコイド膜に存在しない脂質をもつ株からチラコイド膜を単離し、蛍光 pH 指示薬を取り込ませたりポソームを作成して、光合成タンパク質複合体の機能との相関も明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kondo K, Yoshimi R, Apdila ET, Wakabayashi K, Awai K and Hisabori T	4. 巻 13
2. 論文標題 Changes in intracellular energetic and metabolite states due to increased galactolipid levels in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26760-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Effendi DB, Sakamoto T, Ohtani S, Awai K and Kanesaki Y	4. 巻 135
2. 論文標題 Possible involvement of extracellular polymeric substrates of Antarctic cyanobacterium <i>Nostoc</i> sp. strain S0-36 in adaptation to harsh environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 771-784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01411-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Brotosudarmo THP, Setiyono E, Awai K and Pringgenies D	4. 巻 26
2. 論文標題 Marine bacterium <i>Seonamhaeicola algicola</i> strain CC1 as a potential source for the antioxidant carotenoid, zeaxanthin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences	6. 最初と最後の頁 215-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14710/ik.ijms.26.4.215--224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jouhet J, Shimojima M, Awai K and Marechal E	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Lipids in Cyanobacteria, Algae, and Plants-From Biology to Biotechnology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 834384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.834384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 粟井光一郎	4. 巻 99
2. 論文標題 シアノバクテリアの脂質代謝	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 404-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.8_404	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwai M, Shibata S, Ohta H and Awai K	4. 巻 2295
2. 論文標題 Methods of Lipid Analyses for Microalgae: Charophytes, Eustigmatophytes, and Euglenophytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 81-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1362-7_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto T and Awai K	4. 巻 528
2. 論文標題 Adaptations in chloroplast membrane lipid synthesis from synthesis in ancestral cyanobacterial endosymbionts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 473-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Munawaroh HSH, Apdila ET and Awai K	4. 巻 11
2. 論文標題 hetN and patS mutations enhance accumulation of fatty alcohols in the hglT mutants of Anabaena sp. PCC 7120.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Apdila ET, Inoue S, Shimojima M and Awai K	4. 巻 61
2. 論文標題 Complete replacement of the galactolipid biosynthesis pathway with plant-type pathway in the cyanobacterium <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1661-1668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inada T, Machida S, Awai K and Suzuki I	4. 巻 53
2. 論文標題 Production of hydroxy fatty acids and its effects on photosynthesis in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Res.	6. 最初と最後の頁 102155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2020.102155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 近藤久益子、吉見里奈、Egi Tritya Apdila、若林憲一、粟井光一郎、久堀徹
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 のチラコイド膜脂質合成系の改変による細胞内の変化
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Sato, Eri Ikemura, Koichiro Awai
2. 発表標題 Lack of fatty acid synthesis in the cyanelle of <i>Cyanophora paradoxa</i>
3. 学会等名 24th International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Shirotori, Kimie Atsuzawa, Egi Tritya Apdila, Yasuko Kaneko, Koichiro Awai, Shigeki Ehira
2. 発表標題 Functional analysis of an essential gene in cyanobacteria that is conserved among oxygen-evolving photosynthetic organisms
3. 学会等名 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Devi Bentia Effendi and Koichiro Awai
2. 発表標題 Desaturation of fatty acids in both sn-1 and sn-2 positions is essential in filamentous cyanobacteria
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arif Agung Wibowo, Koichiro Awai
2. 発表標題 Cyanobacterial alkanes are important for resistance to high salinity stress in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤直樹, 池村英里, 粟井光一郎
2. 発表標題 灰色藻 <i>Cyanophora paradoxa</i> の脂質合成では葉緑体の役割は限定的である
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤直樹, 池村英里, 粟井光一郎
2. 発表標題 灰色藻 <i>Cyanophora paradoxa</i> における脂質代謝の研究
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山萌, 加賀本剛, 中澤昌美, 蘆田弘樹, 粟井光一郎, 柏山祐一郎
2. 発表標題 <i>Rapaza viridis</i> の盗葉緑体獲得過程におけるピレノイドの再構成メカニズム
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 粟井光一郎
2. 発表標題 脂肪酸は光合成による過剰なエネルギーや還元力の除去を担うか
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Devi Bentia Effendi and Koichiro Awai
2. 発表標題 9 desaturation at both sn-positions of fatty acids in membrane lipids is essential in filamentous cyanobacteria
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arif Agung Wibowo, Koichiro Awai
2. 発表標題 Cyanobacterial alkanes are important for resistance to high salinity stress in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Shirotori, Kimie Tsuji, Egi Tritya Apdila, Yasuko Kaneko, Koichiro Awai, Shigeki Ehira
2. 発表標題 Functional analysis of an essential gene in cyanobacteria that is conserved among oxygen-evolving photosynthetic organisms
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 粟井光一郎
2. 発表標題 なぜ光合成膜の主要膜脂質は糖脂質なのか
3. 学会等名 脂質駆動学術産業創生研究部会第2回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------