

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550065

研究課題名(和文) 緑色細菌のグリセロ脂質ライブラリー：脂質の微細構造から見た光合成調節機構の解明

研究課題名(英文) A variety of glycolipids in green photosynthetic bacteria: cyclopropane-ring formation in the acyl groups of glycolipids is crucial for acid and thermal resistance of antenna systems

研究代表者

溝口 正 (Mizoguchi, Tadashi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：90343665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑色光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* 株(至適温度45℃)の構成脂質を分子レベルで解析した。光合成の教科書に記載されている既知のMGDGに加え、ラムノールが転移したRGDGが主たる糖脂質であることと、脂肪酸部の不飽和構造としてシクロプロパン環を持つことが明らかとなった。阻害剤を用いたシクロプロパン環形成の抑制にも成功した。シクロプロパン環形成を阻害した場合、細菌の酸耐性の低下が確認された。30℃、45℃、55℃を至適温度とする緑色細菌の糖脂質組成を網羅的に解析した結果、至適温度と脂肪酸の炭素鎖長に見事な相関が確認された。

研究成果の概要(英文)：Green photosynthetic bacteria have unique antenna systems called chlorosomes. A thermophilic bacterium *Chlorobaculum tepidum* strain biosynthesized MGDG and RGDG possessing a methylene-bridged palmitoleyl group characterized by a cis-substituted cyclopropane ring. The formation of the cyclopropane ring was chemically inhibited. The ring-formation represented direct and post-synthetic modifications of chlorosome membrane properties and was tolerant of acidic environments. The glycolipids in various green bacteria were investigated. Dependence of the molecular structures including the chain-length of their acyl groups upon bacterial cultivation temperatures was clearly observed. The organisms with their optimal temperatures of 30, 45, and 55℃ dominantly accumulated glycolipids with the acyl chains in the range of C15-C16, C16-C17, and C18-C20, respectively. Based on the detailed of glycolipids, a survival strategy of green bacteria grown in the wide range of temperatures is proposed.

研究分野：光合成機能性分子の精密計測

キーワード：糖脂質 脂肪酸 光合成 クロロフィル 精密計測 光合成細菌

1. 研究開始当初の背景

光合成色素蛋白質複合体は、様々な環境に適應する自然の戦略(光合成調節機構と定義)を具現化した器官である。ここでは、クロロフィルやカロテノイドの光合成色素類が膜貫通疎水性蛋白質を反応場とする見事な光捕集アンテナ部と反応中心部を構築し、現存する系で最高の光電変換効率を実現している。これらの光合成器官は、一部の例外を除き脂質二重層膜より成る光合成膜(生体膜)中に存在する。太陽光の捕集による超高速かつ高効率なエネルギー・電子伝達と、それに後続する高エネルギー物質(ATP など)の生産反応に関する研究は、一部のモデル生物を用いたものが先行してきた。これは X 線結晶構造解析により種々の光合成器官の構造が原子レベルで解かれたことに起因する[例えば Y. Umena et al., *Nature* **473**, 55-60, 2011]。しかしながら、一連の光合成諸反応を担保する「生体膜中における光合成器官の形成と疎水性相互作用に基づく構造安定化、高機能発現に必須の種々の複合体の相互配列制御」は、もっとも基本的な概念の一つであるにも関わらず、その解答を見出すとする機運すら存在しないのが実状であった。

近年の顕微鏡観察技術の進展と普及に伴い、生体膜中の光合成器官の直接的な配列観察 [P. Qian et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 23678-23685, 2003] や、フォスファチジルコリンなどの脂質を用いた擬似光合成膜の作成とその機能発現 [R. Fujii et al., *Photosynth. Res.* **95**, 327-337, 2008] が活発に研究されている。擬似光合成膜を用いた光電変換 [T. Dewa et al., *J. Nanosci. Nanotech.* **9**, 97-107, 2009] や水素発生 [L.M. Utschig et al., *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16334-16337, 2011] も報告されてきている。更に一部の光合成生物では、脂質合成を司る遺伝子群の同定とその欠損株の作成から、光合成器官の形成・構造安定化・配列制御・機能発現に重要な役割を担う脂質分子の存在が示されている [S.B. Krumova et al., *Photosynth. Res.* **105**, 229-242, 2010; S. Masuda et al., *Plant Cell* **23**, 2644-2658, 2011]。

2. 研究の目的

脂質分子の(微細)構造の変化は、生体膜の特性(相転移温度の調節による膜流動性の維持や糖と蛋白質の分子認識能の調節による配列制御など)を直接的に改変する駆動力となり得る。その結果として、生体膜中の光合成器官の構造安定化・配列制御・機能発現を制御し、鋭敏に外部環境の変化へ対応する自然戦略(光合成調節機構)の一つと考えられる。そこで、生体膜の特性を直接的に制御する脂質分子の微細構造を詳細に検討することを目的とした。(1)蒸発光散乱検出器(=ELSD)をオンライン接続した高分解能 HPLC に基づき、光合成細菌を対象としたインタクトな分子種としてのグリセロ脂質(=糖脂質とリン脂質)ライブラリーを構築する。

(2)見えない脂質分子の微細構造が誘起する生体膜特性への影響を、見えるクロロフィル色素をプローブとして評価する。

3. 研究の方法

(1)緑色光合成細菌を中心としたグリセロ脂質ライブラリーの構築: ELSD-LCMS を用いた種々の緑色細菌を中心とした分子としてのグリセロ脂質解析を行う。様々な環境下で生育する(させた)細菌の脂質組成を網羅的に解析し、発現される光合成器官との相関性を検証する。

(2)積極的な生育環境変化が誘起する脂質構造・組成変化: 光合成器官の形成・構造安定化・配列制御・機能発現に必須の脂質分子の構造部位の同定を、以下の 4 項目の試験より行う。耐熱性細菌を用いた温度依存性; 耐熱性細菌を種々の温度で培養することでグリセロ脂質の構造・組成変化を精査し、耐熱性獲得(器官の熱安定性)に関する知見を得る。

時間依存性; 細菌の増殖過程(特に増殖初期)における脂質の構造・組成変化を追跡し、脂質の生合成に関する知見を得る。脂質合成阻害剤の利用; 脂質合成阻害剤を利用した部分的な脂質合成の抑制を行う。脂質合成を司る遺伝子群の探索とその変異株作成; 全ゲノム解析が終了している緑色細菌 (*Chlorobaculum (Cba.) tepidum* 株) をモデル生物 [J.A. Eisen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9509-9514, 2002] としての遺伝子群の探索と、その変異株作成を行う。

(3)クロロフィル色素をプローブとした生体膜特性の評価: 脂質構造・組成の変化が生体膜特性(膜流動性、プロトン・物質透過能)に与える影響を、クロロフィル色素をプローブとした以下の 2 項目の試験より評価する。

光合成器官の熱安定性; 単離・精製した光合成器官(緑色光合成細菌のアンテナ系クロロゾーム)に対する温度可変電子吸収スペクトル、動的散乱測定を行う(昇温に伴う水溶液の濁度変化を測定)。生体膜へのプロトン・物質透過能; クロロゾーム外皮膜への物質透過能を、内包クロロフィル自己会合体の吸収・発光特性よりプローブする。酸によるクロロフィル自己会合体の崩壊プロセスよりプロトン透過能を評価する。

4. 研究成果

(1)緑色光合成細菌の糖脂質ライブラリーの構築: ELSD-LCMS を構造解析ツールとして、緑色光合成細菌が合成する糖脂質を網羅的に解析した。*Cba. tepidum* 株(至適温度 45) では、既知の MGDG に加えて、ラムノースが転移した RGDG が主たる糖脂質であることと、これらの脂肪酸の不飽和構造としてシクロプロパン環を持つことが新たに判明した。緑色細菌の至適温度と糖脂質の脂肪酸の炭素鎖長に見事な相関性を見出すことができ、生物が行う巧みな環境適応戦略に関する知見を得ることに成功した。

(2)積極的な生育環境変化が誘起する脂質構造・組成変化：耐熱性細菌(*Cba. tepidum* 株)を用いた温度依存性；耐熱性細菌を種々の温度で培養することで糖脂質の可逆的な構造変換を見出し、耐熱性獲得に関する知見を得ることに成功した(低温下では脂肪酸の不飽和構造として C=C 結合を持つ MGDG、高温下ではシクロプロパン環を持つ RGDG)。時間依存性；細菌の増殖過程における糖脂質の構造・組成変化を詳細に追跡した。その結果、緑色光合成細菌の糖脂質の生合成に関する知見を得ることに成功した：C=C 結合を持つ MGDG シクロプロパン環を持つ MGDG シクロプロパン環を持つ RGDG の順に生合成。脂質合成阻害剤の利用；耐熱性細菌で確認された特異な糖脂質(シクロプロパン環を持つ RGDG)をターゲットとし、ケミカルインヒビターを用いたシクロプロパン環形成の阻害に成功した。シクロプロパン環の形成が阻害された細菌では、顕著な耐熱性および耐酸性の低下が確認された。脂質合成を司る遺伝子群の探索とその変異株作成；全ゲノム解析が終了している緑色細菌(*Cba. tepidum* 株)で、シクロプロパン環合成酵素と注釈付けられた遺伝子が見つかったため(CT1969)、この遺伝子の破壊株を作成したが、変異株はシクロプロパン環合成を続けており、この特殊な脂肪酸の合成経路は未だ不明である。

(3)クロロフィル色素をプローブとした生体膜特性の評価：光合成器官の熱安定性；単離・精製した光合成器官(緑色光合成細菌のアンテナ系クロロゾーム)に対する温度可変電子吸収スペクトル、動的散乱測定の結果、シクロプロパン環構造を脂肪酸に持つ RGDG が熱安定性に寄与していることが確認された。生体膜へのプロトン・物質透過能；クロロゾーム膜への物質透過能を、内包クロロフィル自己会合体の吸収・発光特性よりプローブすることに成功した。酸によるクロロフィル自己会合体の崩壊プロセスを追跡することで、プロトン透過性を評価することができ、熱安定性と同様にシクロプロパン環構造を脂肪酸に持つ RGDG が酸耐性の獲得に重要な働きを担うことが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 28 件)

Tadashi Mizoguchi, Megumi Isaji, Jiro Harada, Yusuke Tsukatani and Hitoshi Tamiaki, The 17-propionate esterifying variants of bacteriochlorophyll-*a* and bacteriopheophytin-*a* in purple photosynthetic bacteria, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 142, 244-249, 2015, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.12.013 (査読有)
Yusuke Tsukatani, Jiro Harada, Jiro Nomata, Haruki Yamamoto, Yuichi Fujita, Tadashi

Mizoguchi and Hitoshi Tamiaki, *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways, Sci. Rep., 5, 9741, 2015, DOI: 10.1038/srep09741 (査読有)

Tadashi Mizoguchi, Jiro Harada, Yusuke Tsukatani and Hitoshi Tamiaki, Isolation and characterization of a new bacteriochlorophyll-*c* bearing a neopentyl substituent at the 8-position from the *bciD*-deletion mutant of the brown-colored green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*, Photosynth. Res., 121, 3-12, 2014, DOI 10.1007/s11120-014-9977-8 (査読有)

Jiro Harada, Tadashi Mizoguchi, Yusuke Tsukatani, Makiko Yokono, Ayumi Tanaka and Hitoshi Tamiaki, Chlorophyllide *a* oxidoreductase works as one of the divinyl reductases specifically involved in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis, J. Biol. Chem., 289, 12716-12726, 2014, DOI: 10.1074/jbc.M113.546739 (査読有)

Tadashi Mizoguchi, Jiro Harada, Taichi Yoshitomi and Hitoshi Tamiaki, A variety of glycolipids in green photosynthetic bacteria, Photosynth. Res., 114, 179-188, 2013, DOI: 10.1007/s11120-013-9802-9 (査読有)

Tadashi Mizoguchi, Yusuke Tsukatani, Jiro Harada, Shin Takasaki, Taichi Yoshitomi and Hitoshi Tamiaki, Cyclopropane-ring formation in the acyl groups of chlorosome glycolipids is crucial for acid resistance of green bacterial antenna systems, Bioorg. Med. Chem., 21, 3689-3694, 2013, 10.1016/j.bmc.2013.04.030 (査読有)

Jiro Harada, Tadashi Mizoguchi, Yusuke Tsukatani, Masato Noguchi and Hitoshi Tamiaki, A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna, Sci. Rep., 2, 671, 2012, DOI: 10.1038/srep00671 (査読有)

Tadashi Mizoguchi, Jiro Harada and Hitoshi Tamiaki, Characterization of chlorophyll pigments in the mutant lacking 8-vinyl reductase of green photosynthetic bacterium *Chlorobaculum tepidum*, Bioorg. Med. Chem., 20, 6803-6810, 2012, 10.1016/j.bmc.2012.09.054 (査読有)

[学会発表](計 102 件)

溝口 正, 伊佐治恵, 安居嘉秀, 正津大介, 軍司昌秀, 原田二郎, 塚谷祐介, 民秋 均, 超高感度クロロフィル計測システムの開発と緑色光合成細菌の単一細胞測定への応用, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日, 東京農業大学(東京都・世田谷区)

溝口 正, 光合成を駆動する機能性分子の精密計測, KGU 震災 20 年シンポジウム, 2015 年 1 月 24 日, 関西学院大学(兵庫県・三田市)

Kota Nomura, Tadashi Mizoguchi, Masahiro Kasahara and Hitoshi Tamiaki, Structural determination of isoprenoid-type ester groups of chlorophyll-*a* found in greening process, 22nd Conference on Isoprenoids, 2014 年 9 月 9 日, プラハ(チェコ)

Yusuke Tsukatani, Tadashi Mizoguchi, Jennifer Thweatt, Marcus Tank, Donald A. Bryant and Hitoshi Tamiaki, Lipid analyses in envelope protein mutants of chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum*, The 16th International Congress on Photosynthesis, 2013 年 8 月 13 日, セントルイス(アメリカ)

塚谷祐介, 溝口 正, 原田二郎, 民秋 均, 緑色硫黄細菌の光捕集体クロロソームの脂質分析: 阻害剤添加および変異体による解析, 第 4 回光合成学会シンポジウム, 2013 年 6 月 1 日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

溝口 正, 原田二郎, 吉富太一, 民秋 均, 種々の緑色硫黄細菌の網羅的糖脂質解析, 第 20 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー, 2012 年 6 月 30 日, 大阪大学(大阪府・吹田市)

Tadashi Mizoguchi, Jiro Harada, Taichi Yoshitomi and Hitoshi Tamiaki, The structure and function of glycolipids in photosynthesis, Eighth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, 2012 年 6 月 23 日, 立命館大学(滋賀県・草津市)

[図書](計 1 件)

溝口 正, 民秋 均, 反応中心色素の構造解析: HPLC を用いた精密計測, 光合成研究と産業応用最前線, 446(33-42), 2014 年, エヌ・ティー・エス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 正 (Mizoguchi Tadashi)
立命館大学・総合科学技術研究機構・教授
研究者番号: 9 0 3 4 3 6 6 5