

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770025

研究課題名（和文） 光合成膜には何故多量のガラクト脂質が存在するか

研究課題名（英文） Why galactolipids are the major lipids in the photosynthetic membranes?

研究代表者

粟井 光一郎 (AWAI KOICHIRO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：80431732

研究成果の概要：

酸素発生型光合成生物では、光合成反応の場であるチラコイド膜が、主にガラクト脂質で構成されていることが知られている。しかし、何故チラコイド膜に多量のガラクト脂質が存在するのかわかっていない。本研究では主要ガラクト脂質の1つ、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) 合成酵素遺伝子を、光合成研究のモデル生物であるラン藻で同定し、遺伝子破壊株を用いた研究から、DGDG がリン酸欠乏条件の光合成膜維持に必須であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：チラコイド膜、ガラクト脂質、リン酸欠乏、光合成、糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

光合成の場であるチラコイド膜には4種の脂質、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、ホスファチジルグリセロール (PG) そしてスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) が存在する。近年、これら脂質の合成酵素遺伝子が次々と単離され、その分子生物学・分子遺伝学的解析から各脂質の生理的役割が明らかとなってきて

いる。特に PG と SQDG はラン藻での研究が進んでおり、PG が PSI 反応中心タンパク質と結合していることや (Jordan et al 2001)、PSII の D1D2 複合体の二量体化に関わっていること (Sakurai et al 2003) が示されている。またリン酸欠乏条件では、PG 含量の減少と共に同じ酸性脂質である SQDG 含量が増加し、PG の代替物質として機能していることも報告されている (Essigmann et al 1998)。一方、ガラクト脂質 MGDG と DGDG はその合成酵素遺伝子が植物では単離されているが

(Benning and Ohta 2005)、各々の生理的役割はまだよく分かっていない。

植物チラコイド膜の各脂質の生理的役割を明らかにするためには、より単純な系であるラン藻でその合成酵素遺伝子を単離し、破壊株を解析することが重要である。実際4種のチラコイド膜脂質のうち、PGとSQDGはラン藻における遺伝子破壊株解析から、各脂質の様々な性質が明らかとなった (Frentzen 2004)。一方、ラン藻のガラクト脂質合成を担う糖転移酵素の遺伝子は同定されていなかった。これは、植物葉緑体とラン藻が非常に似た脂質組成を持っているにも関わらず、MGDGの合成経路が異なるためである (Sato and Murata 1982)。実際、全ゲノム解析が終了したラン藻類で、植物のMGDGおよびDGDG合成酵素の相同遺伝子は見つかっていない。そこで、我々は2種のラン藻を用いた比較ゲノム学的手法により、ラン藻のMGDG合成経路の中間体であるモノグルコシルジアシルグリセロール (MGlcDG) 合成酵素遺伝子を同定した (Awai et al 2006)。破壊株を用いた解析から MGlcDG 合成酵素遺伝子はラン藻の生育に必須であることがわかった。また、同様のバイオインフォマティクス解析から、ラン藻のDGDG合成酵素遺伝子を見出した。しかし、その破壊株ではDGDG含量が検出限界以下になっているにも関わらず、野生株と比べて通常の培養条件で生育に大きな変化が見られないことがわかった。これは、少なくとも実験室の培養条件では、DGDGはラン藻の生育に必須ではないことを示していた。

これまで、ドイツ・マックスプランク研究所のPeter Dörmann (現ボン大学教授)らが植物のDGDG合成研究を先導しているが (Kelly and Dörmann 2004)、彼らが用いているシロイヌナズナでは、植物型のDGDG合成酵素遺伝子を破壊しても、まだ明らかではない別のDGDG合成酵素により微量のDGDGが合成されるため、DGDGが全く合成されない実験系を作ることができていない。本研究では、より単純な系であるラン藻を用いることにより、各脂質のより根源的な機能を明らかに出来ると期待される。

そこで、上記の結果をもとに、ラン藻を用いたDGDGの機能解析を計画した。さらに、我々が考案した比較ゲノム学的解析を適用することで、MGlcDGからMGDGを合成するエピメラーゼの単離を試みる。これらを統合した解析から、光合成膜に必須の脂質を検証し、何故チラコイド膜にはガラクト脂質が多量に存在するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では以下に述べる3つの課題に焦点を絞り、チラコイド膜脂質の機能を解析し、チラコイド膜がなぜ多くの糖脂質、しかもガラクト脂質で構成されているのかを検証する。

(1) チラコイド膜におけるDGDGの役割
Synechocystis sp. PCC 6803でDGDG合成酵素遺伝子を破壊すると、DGDG含量が検出限界以下まで減少するが、通常の培養条件で野生株と比べて生育に顕著な差が見られない。このことから、DGDGは必須脂質ではないと考えられる。しかし、ラン藻がDGDGを持ち続けているということは、この脂質が何かしらの代えがたい機能を持っていると推定される。そこで、DGDG合成酵素遺伝子破壊株を様々な条件で生育し、DGDG要求性を調べることにより、DGDGの機能を明らかにする。

(2) チラコイド膜必須脂質の同定
SQDGは単細胞性ラン藻 Synechocystis sp. PCC 6803では必須であるが、別の単細胞性ラン藻 Synechococcus sp. PCC 7942では通常の培養条件では必須ではないことが分かっている。そこで、SQDG合成酵素遺伝子とDGDG合成酵素遺伝子の二重破壊株を Synechococcus sp. PCC 7942で作成し、どのチラコイド脂質が通常の培養条件で必須であるかを明らかにする。

(3) ガラクトースであることの意義
MGlcDG合成酵素遺伝子を破壊すると、ガラクト脂質合成経路が完全に遮断されてしまうため、どの脂質が必須であるのか検証するのが難しかった。しかし、通常の培養条件ではDGDGが必須でないことがわかったので、MGlcDGエピメラーゼ遺伝子破壊株を解析すれば、MGDGが必須なのか、MGlcDGでも代替できるのかを調べるのが可能である。そこで、MGlcDGエピメラーゼ遺伝子を単離し、その破壊株を作成・解析することにより、チラコイド糖脂質が極性頭部にガラクトースを持つ意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) チラコイド膜におけるDGDGの役割
上記のとおり、ラン藻DGDGはリン酸欠乏条件下でのチラコイド膜構築に大きな役割を担っている可能性が高い。そこで、まずは野生株ですでに報告されているとおりに、リン酸欠乏に反応してDGDG含量が上昇するかを確認する。その上でDGDG合成酵素遺伝子破壊株が同条件下でどのように生育するかを調べる。

(2) チラコイド膜必須脂質の同定

Synechococcus sp. PCC 7942 株では SQDG は必須ではないが、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株では光合成の電子伝達に關与する必須脂質であることが報告されている。そこで、まず SQDG が必須脂質ではない *Synechococcus* sp. PCC 7942 株で DGDG 合成酵素遺伝子破壊株を作成し、*Synechocystis* と同様の培養条件で DGDG が必須であるかを調べる。その上で、SQDG 合成酵素遺伝子との二重破壊株を作成し、残りの2つの脂質、PG および MGDG のみでラン藻が生育可能か試験する。もし、生育した場合はどのような条件では生育阻害が起こるかを調べる。二重破壊株が致死だった場合、どのような脂質で機能相補できるかを調べることにより、SQDG・DGDG の機能を明らかにする。

(3) ガラクトースであることの意義

これまでの報告や申請者の成果 (Awai et al 2006) により、ラン藻におけるほとんどの膜脂質合成酵素遺伝子が単離されたが、MGlcDG から MGDG への変換を行うエピメラーゼ遺伝子はまだ同定されていない。そこで、MGlcDG 合成酵素および DGDG 合成酵素遺伝子を単離したときと同様の比較ゲノム学的手法を用い、MGlcDG エピメラーゼ遺伝子の同定を試みる。そのための遺伝子解析ソフトウェア、およびコンピュータを初年度予算として申請する。これまでの申請者による解析から、実験室での培養条件では DGDG は必須脂質でないことがわかっているが、その前駆体でもある MGDG が必須脂質であるかはわかっていない。MGlcDG エピメラーゼ遺伝子を単離し、その破壊株を解析することにより、MGDG がチラコイド膜に必須の脂質であるか、さらには極性頭部がガラクトースであることがチラコイド膜に必須であるかを調べることができる。*in silico* 解析で MGlcDG エピメラーゼ遺伝子を同定できなかった場合は、生化学的な解析から (たとえば可溶性か、膜局在か。膜局在であれば膜表在か、膜貫通かを調べる) 目的タンパク質の性質を調べ、その情報を元に候補遺伝子を絞り込んでいく。場合によっては、タンパク質の部分精製を行い、アミノ酸配列解析からの単離を試みる。

4. 研究成果

(1) チラコイド膜における DGDG の役割
ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株をリン酸欠乏条件にさらすと、DGDG、SQDG の割合が増加し、MGDG の割合が減少していたが、唯一のリン脂質である PG の割合には、変化が見られなかった。この結果は、一見リン酸欠乏とリン脂質含量に相関がないように思

える。しかし、脂質の絶対量で比べると、PG 含量はリン酸欠乏条件にさらすことによって5分の1程度に減少していることがわかった。つまり、リン酸欠乏によって減少したリン脂質量に合わせて、他の糖脂質の絶対量も減少し、チラコイド膜自体が減少していると推定された。膜脂質含量の減少とともに、なぜ糖脂質組成が変化したのかは明らかではない。今後、内部構造解析を含め、詳細に検証していく必要がある。

次に、DGDG 合成酵素遺伝子破壊株をリン酸欠乏条件で生育したところ、野生株と比べ、顕著な生育阻害が確認された。また、この変異株は強光条件での光合成活性が阻害されることもわかった。これらの結果は、DGDG 合成酵素遺伝子破壊株では、このようなストレスに対して感受性が高まっていることを示している。最近、この感受性の変化は、DGDG の欠乏によって PSII 複合体のマンガククラスターが解離しやすくなった結果であると報告されている (Mizusawa et al 2009)。今後、どのような PSII、とくに酸素発生複合体近傍における DGDG の結合領域を明らかにすることにより、DGDG 合成酵素遺伝子破壊株のストレス感受性のメカニズム、ひいては DGDG の生理機能が明らかにできると考えている。

(2) チラコイド膜必須脂質の同定

Synechococcus sp. PCC 7942 株で DGDG 合成酵素遺伝子の破壊を行うため、まず DGDG 合成酵素遺伝子の同定を行った。*Synechocystis* sp. PCC 6803 の DGDG 合成酵素遺伝子をプローブとして、*Synechococcus* sp. PCC 7942 のゲノム配列を検索したところ、1つの候補遺伝子が得られた。これを、キュウリ MGDG 合成酵素と大腸菌内で共発現させたところ、大腸菌膜に DGDG の蓄積が確認された。この結果から、この候補遺伝子を *Synechococcus* sp. PCC 7942 の DGDG 合成酵素遺伝子とした。この遺伝子の破壊株を作成を試みたところ、全ゲノムコピーが置き換わった株を単離することができなかった。このことは、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株とは異なり、*Synechococcus* sp. PCC 7942 株では、DGDG が必須脂質であることを示している。また、糸状性ラン藻である、*Anabaena* sp. PCC 7120 株でも DGDG 合成酵素遺伝子を破壊することができなかったことから、ラン藻種によって、DGDG 要求性が異なることが明らかとなった。これらの DGDG 要求性株で DGDG 合成酵素遺伝子を破壊するために、培地に DGDG を加えて生育を試みたが、全ゲノムコピーが置き換わった株を単離することはできなかった。*Synechocystis* sp. PCC 6803 株では、DGDG を含む膜脂質を培地に加えると、それらが細胞に取り込まれ、各脂質の合成酵素遺

伝子破戒株を相補することが知られている。今回の結果から、この脂質取り込み活性も、ラン藻種によって異なっていることが考えられた。

(3) ガラクトースであることの意義
ラン藻特有の糖脂質合成経路を担う、MGlcDG から MGDG への変換を行うエピメラーゼ酵素遺伝子の同定を行うため、これまでに用いてきた比較ゲノム学的解析を適用し、候補遺伝子の抽出を試みた。その結果、糖転移酵素とは異なり、エピメラーゼには様々なタイプが存在することから、有力な候補遺伝子を絞り込むことができなかった。次に、生化学的な活性検出を行うため、アイソトープラベルした基質を用いた解析を行った。しかし、これまで MGlcDG エピメラーゼ活性が *in vitro* での活性検出が報告されていないのと同様、我々も検出することはできなかった。そこで、再度比較ゲノム学的解析に立ち返った。この糖脂質合成経路はラン藻特異的であり、他の生物では見られないことから、ラン藻特異的な遺伝子に着目することにした。東京大学医科学研究所の川島秀一博士、かずさ DNA 研究所の岡本忍博士の協力のもと、ラン藻特異的に保存されている 85 遺伝子を抽出することができた。現在、この中から MGlcDG エピメラーゼ遺伝子の候補となるものを選び、解析を進めている。

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 3 件)

査読有論文

- ① Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T. and Ohta, H. (2009) Type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J.* 57: 322-331.
- ② Lu, B., Xu, C., Awai, K., Jones, A.D. and Benning C. (2007) A small ATPase protein of Arabidopsis, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J. Biol. Chem.* 282: 35945-35953.
- ③ Awai, K., Watanabe, H., Benning, C. and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* 48: 1517-1523.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 渡辺英男、粟井光一郎、吉田充、西田生郎
糸状性シアノバクテリアにみられる糖脂質の構造解析 日本植物生理学会年会 愛知 (2009年3月21日)
- ② 牧野溪史、粟井光一郎、小島幸治、西山佳孝、西田生郎 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Synechococcus* sp. PCC 7942 の脂質要求性の違い 日本ゲノム微生物学会年会 東京 (2009年3月6日)
- ③ Awai, K., Watanabe, H., Yoshida, M., and Nishida, I. Biochemical analysis of a novel glycolipid from filamentous cyanobacteria. Gordon Research Conference, Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function. 米国 (2009年2月2日)
- ④ Awai, K., Ohta H., Benning C. and Nishida I. Molecular identification of genes for galactolipid synthesis in cyanobacteria by comparative genomic analysis. 18th International Symposium on Plant Lipids. 仏国 (2008年7月21日)
- ⑤ 渡辺英男、粟井光一郎、Christoph Benning、西田生郎 リン酸欠乏条件下におけるチラコイド膜糖脂質の役割 日本植物生理学会年会 北海道 (2008年3月21日)
- ⑥ 粟井光一郎 *Synechocystis* sp. PCC 6803 で DGDG はリン酸欠乏条件での生育に必須である ラン藻の分子生物学 2007 千葉 (2007年12月4日)
- ⑦ Awai, K., Watanabe, H., Benning, C. and Nishida, I. Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under phosphate limitation. The 2nd Asian Symposium on Plant Lipids 東京 (2007年12月2日).
- ⑧ Awai, K. and Wolk, C.P. Identification of the glycosyltransferase involved in biosynthesis of the glycolipid specific to filamentous cyanobacteria. National Plant Lipid Cooperative. 米国 (2007年6月8日).

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟井 光一郎 (AWAI KOICHIRO)
埼玉大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：80431732

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし