

機関番号：13801  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770033  
 研究課題名（和文） 光合成膜ガラクト脂質の生理機能解析  
 研究課題名（英文） Physiological functions of galactolipids in the photosynthetic membranes  
 研究代表者  
 粟井 光一郎（AWAI KOICHIRO）  
 静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教  
 研究者番号：80431732

## 研究成果の概要（和文）：

光合成膜に多量に存在するガラクト脂質の生理機能を明らかにするため、ガラクト脂質を他の糖脂質やリン脂質と置換した。その結果、ジガラクトシルジアシルグリセロールはホスファチジルコリンと置換することができなかったが、グルコシルガラクトシルジアシルグリセロールとは置換することができた。このことは、現在光合成膜に使われている糖脂質の少なくとも一部は、リン脂質で置換することはできないが、構造の近い他の糖脂質であれば機能相補できることを示している。

## 研究成果の概要（英文）：

To understand physiological function of the galactolipids, dominant membrane lipids in the photosynthetic membranes, we tried to substitute those lipids to other glyco- and phospho-lipids. Digalactosyldiacylglycerol could be substituted by glucosylgalactosyldiacylglycerol, but not by phosphatidylcholine. These results suggest that at least a part of glycolipids in the current photosynthetic membrane systems can be physiologically complemented by structurally similar glycolipids.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 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、葉緑体、ガラクト脂質、光化学系 II 複合体、シアノバクテリア、比較ゲノム解析、光合成

## 1. 研究開始当初の背景

光合成の場であるチラコイド膜は主に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)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) そしてホスフ

ァチジルグリセロール (PG) で占められている。近年、これら膜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になってきている。特に SQDG と PG はシアノバクテリア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 (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、唯一のリン脂質である PG の含量が減少すると共に、DGDG 含量および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 もその合成酵素遺伝子が植物で単離され、逆遺伝学的解析から各脂質の生理学的機能が明らかとなってきた (Benning and Ohta 2005)、光合成膜における具体的な機能に関する研究は少ない。

植物チラコイド膜の各脂質の生理学的役割を明らかにするためには、より単純な系であるシアノバクテリア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、シアノバクテリアを用いた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、シアノバクテリアのガラクト脂質合成を担う糖転移酵素遺伝子はこれまで同定されていなかった。これは、植物葉緑体とシアノバクテリアが非常によく似た脂質組成を持っているにも関わらず、そ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シアノバクテリア類で、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、申請者は 2 種のシアノバクテリアを用いた比較ゲノム学的手法により、シアノバクテリアの 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) 合成酵素遺伝子および DGDG 合成酵素遺伝子を同定した (Awai et al 2006, 2007)。破壊株を用いた解析から MGlcDG 合成酵素遺伝子はシアノバクテリアの生育に必須であることが推定された。一方、DGDG 合成酵素遺伝子破壊株は、通常の培養条件では野生株と生育に大きな差は見られなかったが、リン酸欠乏条件で生育が阻害されることがわかった。これは、リン酸欠乏条件で DGDG 含量が増加する現象と一致している。

これらシアノバクテリアの糖脂質合成酵素遺伝子が明らかとなったことで、破壊株を用いた光合成膜ガラクト脂質の機能解析が初めて可能となった。そこで、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ために、以下に示すような研究を計画した。

## 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討する。

### 課題 1 ガラクトースであることの意義

光合成膜が何故ガラクト脂質で構成されているのかはわかっていない。そこで、シアノバクテリアに特有の糖脂質合成経路である MGlcDG エピメラーゼの遺伝子同定、破壊株作成を行い、MGDG の代わりに MGlcDG を蓄積させ、光合成器官にどのような変化が起こるかを解析する。

### 課題 2 光合成膜における糖脂質の機能

これまで、光合成膜の糖脂質は、リン脂質の代替物質として機能していると考えられてきた。しかし、それを実験的に証明した結果はない。そこで、シアノバクテリアの糖脂質合成酵素遺伝子破壊株でリン脂質を合成させ、機能代替するかを調べる。

### 課題 3 光合成装置における糖脂質の役割

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株で DGDG 合成酵素遺伝子を破壊することは出来たが (Awai et al 2007, Sakurai et al 2007)、別の単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 株では破壊することが出来なかった。これは、同じ単細胞性シアノバクテリアでも、種によって脂質要求性が異なることを示している。実際、両シアノバクテリアで他の糖脂質 SQDG の要求性も異なる (Aoki et al 2004)。そこで、2 種のシアノバクテリアの脂質要求性の違いを、特に光合成装置における役割に焦点をあてて解析することにより、各糖脂質の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 課題 1 ガラクトースであることの意義

本研究における目的を達成するためには、MGlcDG エピメラーゼ遺伝子を同定することが重要である。これまで、MGlcDG 合成酵素、DGDG 合成酵素遺伝子を同定する際に用いた比較ゲノム解析で候補遺伝子を探索したが、エピメラーゼには様々なタイプが存在し、絞り込むことが難しかった。そこで、これまでに公開されている 13 種全てのシアノバクテリアゲノムで保存されている遺伝子のうち、他の原核生物などに保存されている遺伝子を除いた、シアノバクテリア特異的な遺伝子 (85 遺伝子) を抽出した。この中には、シアノバクテリア特有の糖脂質合成酵素である、MGlcDG 合成酵素も含まれおり、その次の反応を担う MGlcDG エピメラーゼ遺伝子も含まれていると期待される。この候補遺伝子群の中から、エピメラーゼ活性を持つと考えられるものを、MGlcDG を蓄積する大腸菌で発現させ、MGDG 合成活性を検出する。また、遺伝子破壊株を作成し、MGlcDG 蓄積の有無を調べる。仮に目的遺伝子が必須遺伝

子であった場合、培地に反応生成物である MGDG を添加し相補することにより、破壊株を単離する。現在の候補の中に目的遺伝子が見出せなかった場合は、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型か、膜貫通型かを調べる）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、質量分析装置等を用いたアミノ酸配列解析からの単離を試みる。もし DGDG および MGDG を欠損し、MGlcDG を蓄積した株が得られれば、生育や光合成活性にどのような影響があるか、詳細に調べる。ただし、DGDG 合成酵素が MGlcDG を基質とする可能性も考えられるので、場合によっては DGDG 合成酵素遺伝子との二重破壊株を作成する。破壊株が致死であった場合は、MGDG や他の脂質を培地に加えることによって機能相補するかを調べる。

#### 課題 2 光合成膜における糖脂質の機能

光合成膜糖脂質はリン脂質の代替物質として利用されていると考えられているが直接的な証拠はない。そこで、シアノバクテリアの糖脂質をリン脂質と置き換え、機能相補するかを調べる。DGDG と物理化学的性質の似ているホスファチジルコリンを合成する遺伝子を導入したシアノバクテリアを用いて DGDG 合成酵素遺伝子の破壊を試みる。この変異株を解析することにより、DGDG が膜の構成脂質として重要なのか、脂質分子自体に特異的な機能があるのかを明らかにする。DGDG がリン脂質によって置き換えられた場合、次に MGDG をリン脂質で置き換えることが出来るかを調べる。MGDG はリン脂質ホスファチジルエタノールアミンと物理化学的性質が似ていることから、その合成酵素を導入した株を作成し、光合成膜のガラクト脂質を全てリン脂質に置き換える。

#### 課題 3 光合成装置における糖脂質の役割

シアノバクテリア種間での脂質要求性の違いを明らかにすることにより、各脂質の生理学的機能を明らかにする。*Synechocystis* sp. PCC 6803 株で DGDG 合成酵素遺伝子を破壊すると、生育に大きな違いは見られないが、光化学系 II 複合体の酸素発生複合体が解離しやすくなることがわかっている。そこでまず、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株および *Synechococcus* sp. PCC 7942 株から光化学系 II 複合体を単離し、結合している脂質の組成を調べる。His-tag 付き CP47 タンパク質を持つ *Synechocystis* sp. PCC 6803 株および *Synechococcus* sp. PCC 7942 株を大量培養し、光化学系複合体を単離・解析し、両種間での違いを調べる。違いが明らかとなった場合は、どのタンパク質との結合に違いがあるか、質量分析装置等を用いて調べる。また、

課題 2 で作成した、リン脂質を蓄積するシアノバクテリアから光化学系複合体を単離し、リン脂質がどの程度蓄積するのかを調べる。リン脂質と糖脂質を完全に置き換えた株が作成できなかった場合、リン脂質蓄積シアノバクテリアの光合成装置でどの程度脂質の置換が起こっているのかをしらべ、光合成装置にとって必須な脂質を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### 課題 1 ガラクトースであることの意義

比較ゲノム学的解析より選び出した MGlcDG エピメラーゼ候補遺伝子は、全ゲノムコピーで破壊することができないことから、必須遺伝子であることがわかった。そこで、この遺伝子を相補するため、培地に MGDG を加えて培養を行ったところ、相補された株は得られなかった。これは、MGDG が他の脂質と比べシアノバクテリアに取り込まれにくいことが原因と考えられた。次に、MGDG 合成のバイパス経路を作ることで、シアノバクテリア独自の合成経路を相補することを計画した。そのため、まず植物型の MGDG 合成酵素遺伝子を導入した株を作成した。この株では、シアノバクテリア型の MGDG 合成経路の初発酵素である MGlcDG 合成酵素遺伝子を破壊することができた。このことは、シアノバクテリア型の MGDG 合成経路がシアノバクテリアの生育に必須ではないことを示している。この株では MGlcDG エピメラーゼ遺伝子の破壊が可能なので、この株を用いて候補遺伝子の破壊していく。

上記と並行し、候補遺伝子産物が *in vitro* でエピメラーゼ活性を持つかを調べるため、大腸菌で発現させ、大腸菌膜でのエピメラーゼ活性を調べた。実際には大腸菌膜には基質となる MGlcDG が存在しないことから、MGlcDG 合成酵素を発現するベクターとの共発現により、エピメラーゼ活性の検出を試みた。しかし、MGlcDG 合成酵素の活性が非常に低いため、検出できる量の MGlcDG が蓄積する株が得にくい。様々な条件を検討したところ、大腸菌 BL21 (DE3) 株で pET 系ベクターを用いることで、最も MGlcDG が蓄積することがわかった。この株を用いて候補遺伝子を共発現させ活性測定を行う。

##### 課題 2 光合成膜における糖脂質の機能

光合成膜に存在しないリン脂質である PC と DGDG を置きかえることを試みた結果、これらの脂質が物理化学的性質が似ているにも関わらず置き換えることができなかった。このことは、光合成膜糖脂質に特異的な機能が存在することを示している。そこで、DGDG のどの構造が重要であるかを明らかにするため、DGDG と構造が似ているが少しずつ異なる糖脂質を合成する株を作製した。

具体的には、緑色非硫黄細菌由来のグルコシルガラクトシルジアシルグリセロール合成酵素遺伝子 ( $\beta$ -GlcT)、枯草菌由来のジグルコシルジアシルグリセロール合成酵素遺伝子 (ypfP) を用いた。これらの遺伝子を導入した株で目的の糖脂質の蓄積が確認できたので、DGDG 合成酵素遺伝子を破壊し、他の糖脂質で DGDG の機能を代替できるかを検証した。その結果、少なくともグルコシルガラクトシルジアシルグリセロールを蓄積する株で DGDG 合成酵素遺伝子を破壊することができた。今後、この株での脂質組成や光合成活性の変化、ストレス耐性などの生理機能の変化を調べていくと共に、ypfP 発現株についても、解析を進めていく。

### 課題 3 光合成装置における糖脂質の役割

課題 2 で作製した、PC を蓄積する株での基礎的データ収集を行った。PC 蓄積株では 10%程度 PC の蓄積が見られた。PC の合成は、光合成膜唯一のリン脂質である PG と経路を共有するため、PG 含量の減少が予測された。しかし、PG 含量には野生株と比べて大きな差は見られず、合成経路の異なる MGDG や DGDG の割合が減少していた。PC と DGDG は脂質分子としての物理化学的性質が似ており、一部 DGDG と PC が置き換わったのではないかと期待される。PC 蓄積株での生育やクロロフィル量は野生株と比べて有意差は見られなかった。しかし、強光条件において光合成活性がやや低下しており、強光阻害が起りやすくなっている可能性が考えられた。DGDG は光合成タンパク質複合体の 1 つである光化学系 II (PSII) 複合体における強光阻害に関与していることが報告されており、これは DGDG と PC の置き換わりによる影響かもしれない。

現在、PSII 複合体を単離し、この複合体と相互作用する脂質がどの程度 PC と置き換わっているかを調べている。複合体の単離方法の検討は出来ており、解析に十分量の試料を培養しているところである。また、脂質要求性が異なるシアノバクテリアでも PC 蓄積株を作成しており、同様の影響が見られるかを解析する。

### 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 4 件)

- ① 成川礼、藤澤貴智、岡本忍、得平茂樹、吉村英尚、鈴木石根、増田建、持丸真里、高市真一、栗井光一郎、関根光雄、矢代勲、小俣せい、宝田裕美、片野葉子、小杉大樹、谷河聡、大森和子、佐藤直樹、池内昌

彦、藤田信之、大森正之 (2010) 産業的に重要なシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39 (通称スピルリナ) のゲノムの多様な特徴: 基礎から応用まで、個々の遺伝子から比較ゲノムまで 光合成研究 20: 150-160. 査読有

- ② Fujisawa T., Narikawa R., Okamoto, S., Ehira S., Yoshimura H., Suzuki I., Masuda T., Mochimaru M., Takaichi S., Awai K., Sekine M., Horikawa H., Yashiro I., Omata S., Takarada H., Katano Y., Kosugi H., Tanikawa S., Ohmori K., Sato N., Ikeuchi M., Fujita N. and Ohmori M. (2010) Genomic Structure of an Economically Important Cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39 DNA Res. 17: 85-103. 査読有

- ③ Awai K., Lechno-Yossef S. and Wolk C.P. (2009) Heterocyst envelope glycolipids, In Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions (Wada, H. and Murata, N. eds), pp 179-202, Springer. 査読有

- ④ 栗井光一郎 (2009) 光合成膜ガラクト脂質合成経路の多様性 光合成研究 19: 9-12. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 馬淵剛志、栗井光一郎 大量培養した *Anabaena* sp. PCC 7120 を用いた有機化合物の解析 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡県立大学 静岡 (2011 年 3 月 4 日)

- ② 久保田みう、栗井光一郎 非光合成膜リン脂質の蓄積が光化学系タンパク質複合体に与える影響 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡県立大学 静岡 (2011 年 3 月 4 日)

- ③ 田中裕二、栗井光一郎 *Anabaena* sp. PCC 7120 の窒素欠乏応答におけるゲノム DNA のメチル化 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡県立大学 静岡 (2011 年 3 月 4 日)

- ④ 舞田江里、栗井光一郎 光合成膜機能に必要な糖脂質構造の解析 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡県立大学 静岡 (2011 年 3 月 4 日)

- ⑤ 山崎堯嗣、粟井光一郎 光合成膜主要糖脂質合成酵素遺伝子 MGD1 の組織化学的発現解析 第12回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡県立大学 静岡 (2011年3月4日)
- ⑥ 粟井光一郎、松岡亮介、塩井祐三 褐虫藻の脂質および脂肪酸組成 第13回日本サンゴ礁学会 つくばカピオ 茨城 (2010年12月2日-5日)
- ⑦ 松岡亮介、中野義勝、粟井光一郎、鈴木款、塩井祐三 3種類の単離褐虫藻の生化学的組成と性質 第13回日本サンゴ礁学会 つくばカピオ 茨城 (2010年12月2日-5日)
- ⑧ 服部裕也、粟井光一郎 シアノバクテリアにおける貯蔵脂質合成 第23回日本植物脂質シンポジウム 京都大学宇治キャンパス 京都 (2010年11月26日-27日)
- ⑨ 池谷彩、粟井光一郎、塩井祐三 エノキタケカスパーゼ様プロテアーゼ(メタカスパーゼ)の精製と性質決定 中部大学春日井キャンパス 愛知 (2010年9月9日-11日)
- ⑩ Awai K., Makino, K., Kubota M and Nishida I Accumulation of phosphatidylcholine in the thylakoid membranes of cyanobacteria. 19th International Symposium on Plant Lipids, Cairns Convention Centre, Cairns Australia, July 11-16, 2010
- ⑪ 成川礼、藤澤貴智、岡本忍、得平茂樹、吉村英尚、鈴木石根、増田建、持丸真里、高市真一、粟井光一郎、関根光雄、矢代勲、小俣せいはい、宝田裕美、片野葉子、小杉大樹、谷河聡、大森和子、佐藤直樹、池内昌彦、藤田信之、大森正之 有用シアノバクテリア *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39 のゲノム解析 第1回日本光合成学会 公開シンポジウム 東京大学駒場キャンパス 東京 (2010年6月4日-5日)
- ⑫ Awai K., Makino K., Hattori Y. and Nishida I. Effects of phosphatidylcholine accumulation in the thylakoid membranes of cyanobacteria. 3rd Asian Symposium on Plant Lipids, Yokohama Media and Communications Center, Yokohama Japan, November 27-29, 2009
- ⑬ 粟井光一郎、牧野溪史、服部裕也、西田生郎 リン脂質の蓄積が光合成膜に与える影響 第73回日本植物学会年会 山形大学小白川キャンパス 山形 (2009年9月18日-20日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

粟井 光一郎 (AWAI KOICHIRO)  
 静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教  
 研究者番号：80431732