

論文内容の要旨

論文題目 Molecular biological studies of lysophosphatidic acid acyltransferases and the significance of *sn*-2 fatty acids of glycerolipids in *Synechocystis* sp. PCC6803

(ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼとグリセロ脂質 *sn*-2 位脂肪酸の役割に関する分子生物学的研究)

氏名 岡崎 久美子

序論

生体膜の主成分であるグリセロ脂質の脂肪酸の *sn*-位置特異性は生物に特異的に厳密に制御されている。ホスファチジン酸 (PA) はすべてのグリセロ脂質の前駆体であり、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT, EC 2.3.1.15) は *sn*-1 位に、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT, EC 2.3.1.51) は *sn*-2 位に脂肪酸を転移することにより PA の *sn*-位置特異性を決定する。現生のほとんどのラン藻では、グリセロ脂質の *sn*-2 位は炭素数 16 (C16) の脂肪酸で占められており、これはラン藻の LPAAT が C16 脂肪酸に特異性を有するためと考えられている。また、葉緑体で合成される PA も *sn*-2 位は C16 脂肪酸を結合しており、ラン藻と起源を同じくする LPAAT が存在すると考えられている。しかし、ラン藻の LPAAT 遺伝子を単離しその生化学的性質を調べた研究は今までになかった。そこで、ラン藻の LPAAT 遺伝子を単離し、上述の膜脂質脂肪酸の *sn*-位置特異性が広くラン藻類で保存されている意義を明らかにする研究を行った。

ラン藻ゲノムデータベースの解析から *Synechocystis* sp. PCC6803 は 3 つのアシルトランスフェラーゼ様遺伝子 *sl11848*, *sl11752*, *slr2060* を持つことがわかっている。また、研究の途中で Weier (2005) らは *sl11848* が C16 脂肪酸特異的で必須の LPAAT であることを報告した。しかし、本研究では、*sl11848* は遺伝子破壊が可能であり、その破壊によって膜脂質の *sn*-2 位の C16 脂肪酸の割合の減少と C18 脂肪酸の割合の増加がおこることを見出した。また二重破壊株 ($\Delta 11848 \Delta 2060$ 株) では C18 脂肪酸を基質とする LPAAT である *sl11752* 遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。 $\Delta 11848 \Delta 2060$ 株では野生株と比べて低細胞密度条件下および低温での増殖速度の減少が見られ、これは光障害の増大が一因であると考えられた。また、複数のタンパク質の量にも変化が見られた。以上のことからラン藻にとって *sl11848* 遺伝子を主要な LPAAT として *sn*-2 位に C16 脂肪酸を取り込むことは光合成環境における生育にとって重要であると考えられる。

結果

1. ラン藻アシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離と解析

Synechocystis sp. PCC6803 の 3 つのアシルトランスフェラーゼ様遺伝子 *sl11848*, *sl11752*, *slr2060* をゲノムから PCR で増幅し、マルトース結合タンパク質 (MBP) と融合させたキメラタンパク質 MBP-1848, -1752, -2060 を調製した。アミロースアフィニティカラムで精製した画分を用いて LPAAT 活性を測定し (表 1), MBP-1848 が C16 特異的な LPAAT であることを確認した。一方、MBP-1752 は 16:0-CoA に対してコントロール変異タンパク質 (MBP-1752D66G) より高い LPAAT 活性を示さなかったが、18:0, 18:1-CoA に対しては有為な活性が検出された。また、MBP-1752 は大腸菌 LPAAT 遺伝子変異株 SM2-1 の温度感受性を相補した (図 1)。以上の結果は *sl11752* が C18 特異性を有する第二の LPAAT であることを示している。

2. ラン藻のアシルトランスフェラーゼ遺伝子破壊株の作成: *sll1848* 遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化

Synechocystis sp. PCC6803の遺伝子破壊株 $\Delta 1848$, $\Delta 1752$, $\Delta 2060$ および二重破壊株 $\Delta 1848 \Delta 2060$, $\Delta 1752 \Delta 2060$ を作出した。一方, $\Delta 1848 \Delta 1752$ は繰り返し試みたが完全な破壊株は得られなかったことから, *sll1848*と*sll1752*はこのラン藻の主なLPAATであると考えられる。破壊株の脂質分析を行ったところ, いずれの破壊株でも膜脂質の組成に大きな変化はなかった(図2A)。しかし, 脂肪酸組成は $\Delta 1848$ 株および $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株で16:0が大きく減少し, 18:0, 18:1が増加した(図2B)。これらの変化は*sn*-2位の脂肪酸の割合の変化を反映していたが, *sn*-1位の脂肪酸の不飽和度の減少もみられた(表2)。このことは*sll1848*が*sn*-2位に16:0を持つ主要なグリセロ脂質の合成に関与するLPAATであるという主張を裏付けるとともに, *sll1752*が18:0および18:1に特異性を持つLPAATであるという上の結果と一致する。また, *sn*-2位の脂肪酸組成の変化が*sn*-1位の脂肪酸変化を引き起こしたと考えられる。

$\Delta 1848 \Delta 2060$ 株では*sll1752*遺伝子の転写産物量が野生株に比べて増加していた(図3)。また, 膜画分の16:0-CoAに対するLPAAT活性は $\Delta 1848$ 株および $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株で野生株や他の破壊株に比べ大幅に減少したが, 18:0-CoAに対するLPAAT活性は逆に増加した(図4)。以上の結果は*sll1752*がC18脂肪酸を基質とするLPAATであることを支持し, また $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株では*sll1752*の発現量を増大させることによりLPAAT活性の低下を相補していることを示している。

3. LPAAT遺伝子破壊が*Synechocystis* sp. PCC6803の光合成依存増殖にもたらす影響

野生株と $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株をOD=0.02で植え継ぎ30°Cで培養したところ, $\Delta 1848$ 株と $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株ではOD<0.3までで増殖の遅延が見られた。一方, OD=0.1で植え継ぐと, 野生株と $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株で生育にほとんど差が見られなかった(図5)。以上の結果は $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株では低細胞密度での増殖速度が低下することを示している。次に20°Cで培養すると, $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株では野生株に比べ増殖速度が顕著に減少した。低温や低細胞密度条件下での生育遅延は光強度に依存した光阻害が起きていることを示唆している。そこで, 通常の光条件からより強い光条件に細胞を移したときのPSII活性を測定した。PSII活性の低下は30°C, 20°Cともに野生株に比べ, $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株で大きくなっており(図6), 光阻害をより受けやすくなることが示された。

$\Delta 1848 \Delta 2060$ 株が光阻害を受けやすくなっている理由を明らかにするために $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株と野生株の光合成特性を比べた。 $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株では野生株に比べてクロロフィル量, 最大光合成活性の減少が見られた(図7, 8)。また, 野生株と $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株のタンパク質をSDS-PAGEによって解析したところ, 複数のタンパク質の量に変化が生じていることがわかった(図9)。このうち $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株の膜画分ではおよそ95kDaのフィコビリソームコアメンブレンタンパク質(ApcE)が減少していた。また, 可溶性画分では43kDa前後のタンパク質バンドの減少も見られた。しかし, 生細胞のフィコビリソームに由来する吸光は野生株に比べほとんど減少していないことから(図10), $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株ではこのタンパク質が精製中に膜から外れやすくなっている可能性が考えられた。細胞の蛍光発光スペクトルを測定したところ, 植え継ぎ後24時間目の細胞では $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株は野生株に比べてApcEとPSII反応中心に由来する蛍光の増大が見られた(図11)。また, フィコビリソーム, PSIIに由来する蛍光のピークにも変化が見られた。一方, 植え継ぎ96時間目の細胞ではApcEとPSII反応中心に由来する蛍光のピークは減少していたことから24時間から96時間の間に光阻害の影響が軽減したことが示唆される。しかし, 96時間目の細胞では24時間目と同様に野生株に比べてフィコビリソームに由来する蛍光のピークの形の変化とPSIIに由来するピークのシフトがみられた。以上から光化学系タンパク質複合体の構造に変化が生じている可能性が考えられる。

まとめ

本研究で私はラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803には16:0を基質とする主要なLPAATである*sll1848*のほかに, 18:0, 18:1を基質とするLPAATである*sll1752*が存在することを明らかにした。また, *sll1848*の破壊によって*sn*-2位の16:0の多くがC18脂肪酸に置き換わることを示し, この破壊株では種々の光合成条件下での生育特性(増殖速度, クロロフィル量, 最大光合成活性, 低温, 光阻害に対する感受性)が野生株に比べて低下することを示した。したがって*sn*-2位にC16の脂肪酸をもつことは, このラン藻にとって光合成環境下のより最適な生育に重要であると考えられる。他のラン藻類においても*sn*-2位のC16の脂肪酸が同様の動きをしている可能性が考えられる。今後は高等植物葉緑体でも同じことが起こっているかを検証することが重要であり, そのためには*sll1752*遺伝子は重要なツールと考えられる。

表1. MBP融合タンパク質のLPAAT活性

Proteins	LPAAT specific activity	
	16:0-CoA	18:0-CoA
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein	
MBP	0.13 (0.039)	0.10 (0.044)
MBP-2060	1.9 (0.98)	1.9 (0.30)
MBP-2060D76G	3.2 (1.1)	3.8 (0.74)
MBP-1752	4.5 (0.55)	7.0 (0.80)
MBP-1752D66G	4.3 (0.66)	2.6 (0.22)
MBP-1848	640 (160)	5.2 (0.50)
MBP-1848D69G	3.1 (1.2)	1.9 (0.76)
MBP-PlsC	638 (68)	348 (120)
MBP-PlsCD77G	2.4 (0.40)	1.8 (0.38)

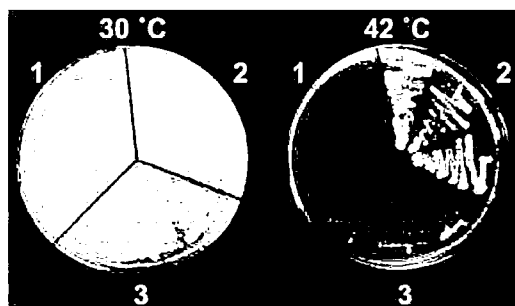


図1. 大腸菌LPAAT遺伝子*PlsC*変異大腸菌SM2-1の相補
1, MBP; 2, MBP-*PlsC*; 3, MBP-1752

sll1848, *sll1752*, *str2060*, *PlsC*とMBPの融合タンパク質を大腸菌で発現させ, アミロースアフィニティカラムで精製しLPAAT活性を測定した。それぞれのタンパク質のアシルトランスフェラーゼモチーフのD残基をGに置換した変異タンパク質も同様に調整し, 活性測定した。

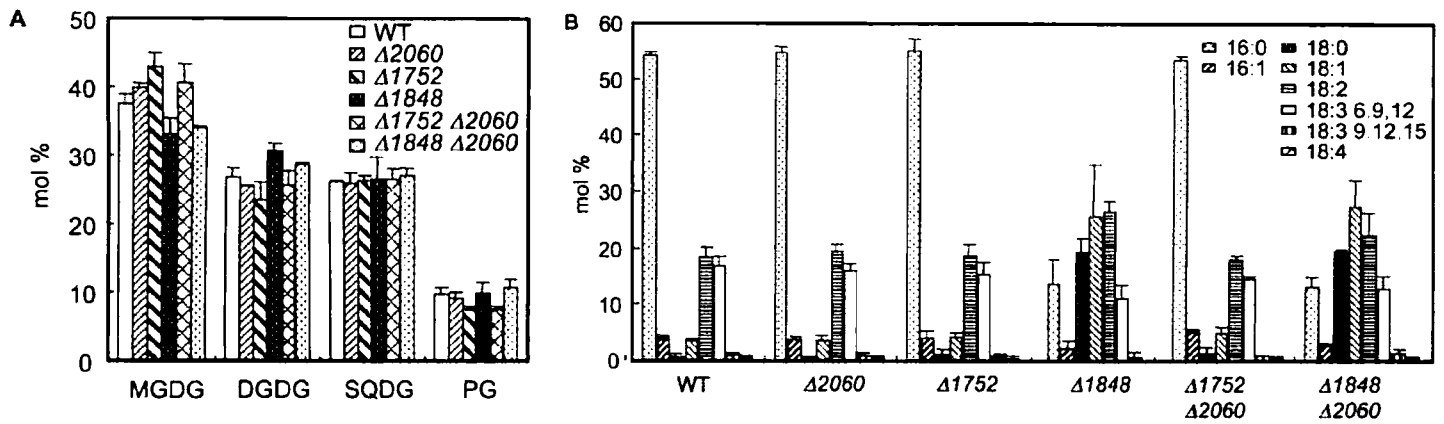


図2. 野生株と遺伝子破壊株のグリセロ脂質の脂質組成, 脂肪酸組成
 A. 野生株と遺伝子破壊株の脂質組成 B. 野生株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成

表2. 野生株と $\Delta1848\Delta2060$ 株のグリセロ脂質のsn-1,2位の脂肪酸組成

Lipid	Cell type	sn	Fatty acid								C16/ C18	Double bond index
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (6,9,12)	18:3 (9,12,15)	18:4		
mol%												
MGDG	Wild type	sn-1	6.8 (1.4)	6.1 (0.32)	0.0 (0.46)	3.6 (1.2)	33 (0.32)	49 (0.13)	0.25 (0.13)	1.5 (0.17)	13/87	2.3
		sn-2	98 (1.4)	0.0 (0.32)	0.27 (0.46)	1.4 (1.2)	0.37 (0.32)	0.75 (0.13)	0.0 (0.0)	0.0 (0.17)	98/2	0.044
	$\Delta1848\Delta2060$	sn-1	11 (3.9)	3.1 (0.19)	0.0 (0.59)	17 (3.5)	33 (7.9)	39 (0.16)	1.3 (0.18)	1.2 (0.31)	14/86	2.1
		sn-2	16 (3.9)	0.11 (0.19)	24 (0.59)	46 (3.5)	13 (7.9)	0.18 (0.16)	0.0 (0.18)	0.0 (0.31)	16/84	0.91
DGDG	Wild type	sn-1	7.9 (1.4)	6.4 (2.2)	0.26 (0.51)	0.0 (2.1)	26 (0.24)	57 (0.24)	0.75 (0.21)	3.1 (0.16)	14/86	2.4
		sn-2	95 (1.4)	1.2 (2.2)	1.5 (0.51)	2.3 (2.1)	0.27 (0.24)	0.14 (0.24)	0.0 (0.21)	0.0 (0.16)	96/4	0.045
	$\Delta1848\Delta2060$	sn-1	8.8 (4.1)	2.5 (0.57)	3.6 (4.2)	11 (6.8)	29 (2.8)	42 (0.38)	1.2 (0.16)	1.9 (0.26)	11/89	2.1
		sn-2	14 (4.1)	0.33 (0.57)	9.8 (4.2)	54 (6.8)	21 (2.8)	0.55 (0.38)	0.46 (0.16)	0.0 (0.26)	14/86	0.99
SQDG	Wild type	sn-1	29 (3.0)	14 (0.21)	0.0	13 (2.4)	42 (1.4)	1.3 (0.314)	1.8 (0.12)	0.0 (0.0)	43/57	1.2
		sn-2	94 (3.0)	0.21 (0.21)	2.7 (1.3)	2.8 (2.4)	0.0 (1.4)	0.0 (0.314)	0.0 (0.12)	0.0 (0.0)	94/6	0.030
	$\Delta1848\Delta2060$	sn-1	23 (1.8)	10 (0.16)	11 (3.3)	22 (2.3)	30 (0.43)	0.8 (0.068)	2.0 (0.13)	0.0 (0.0)	33/67	1.0
		sn-2	9.5 (1.8)	0.090 (0.16)	72 (3.3)	14 (2.3)	5.1 (0.43)	0.0 (0.068)	0.074 (0.13)	0.0 (0.0)	10/90	0.25
PG	Wild type	sn-1	10 (2.5)	1.4 (0.43)	0.0 (3.4)	5.7 (1.8)	68 (0.083)	0.0 (0.0)	17 (0.27)	0.0 (0.0)	11/89	1.9
		sn-2	95 (2.5)	0.39 (0.43)	3.6 (3.4)	1.0 (1.8)	0.048 (0.083)	0.0 (0.0)	0.0 (0.27)	0.0 (0.0)	95/5	0.015
	$\Delta1848\Delta2060$	sn-1	8.1 (3.3)	1.5 (1.9)	6.1 (6.6)	17 (0.76)	56 (0.37)	0.0 (1.7)	12 (2.2)	0.0 (0.0)	10/90	1.7
		sn-2	11 (3.3)	1.9 (1.9)	53 (6.6)	29 (0.76)	3.6 (0.37)	1.0 (1.7)	0.0 (2.2)	0.0 (0.0)	13/87	0.41

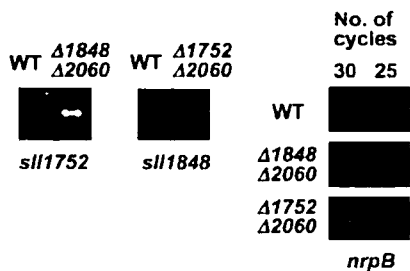


図3. 野生株と遺伝子破壊株でのsll1848, sll1752の発現量の比較

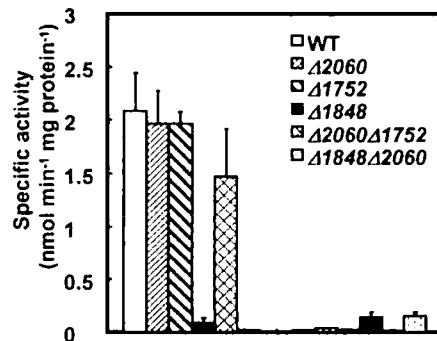


図4. ラン葉膜画分のLIPAAAT活性

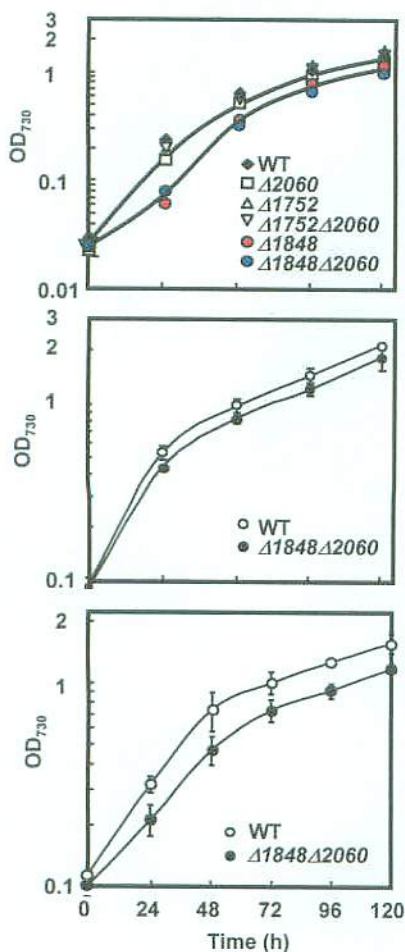


図5. 野生株と遺伝子破壊株の増殖速度の違い

上段, 植え継ぎ $OD_{730}=0.02$, 培養 30°C ;
中段, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 30°C ;
下段, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 20°C

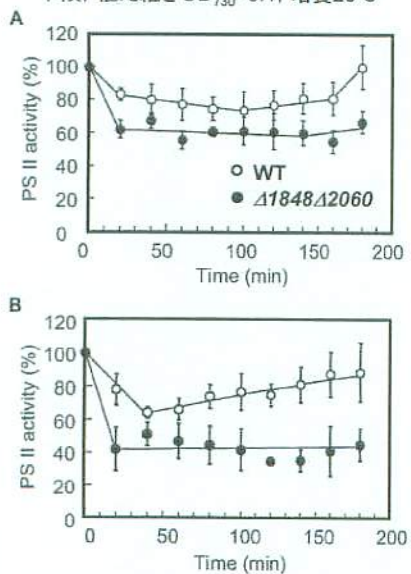


図6. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株の強光下のPSII活性の変化
細胞を 30°C (A)および 20°C (B), $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で2日間培養した後, $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に移してPSII活性の変化を調べた。

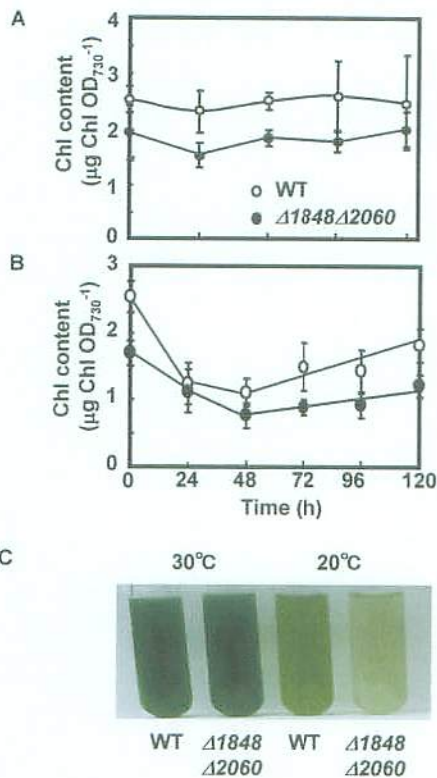


図7. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株のChl a量の違い

A, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 30°C
B, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 20°C
C, 120 hでの培養液の様子

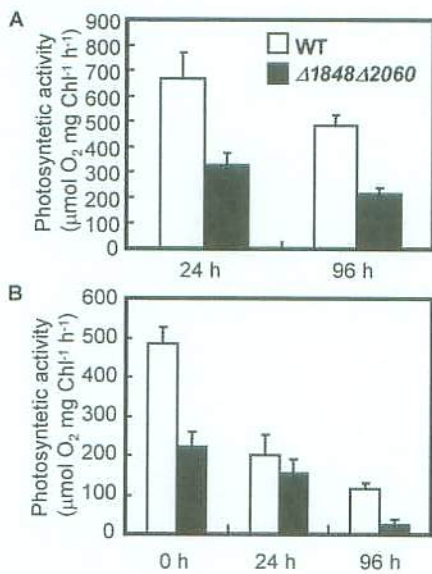


図8. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株の最大光合成活性の違い

A, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 30°C
B, 植え継ぎ $OD_{730}=0.1$, 培養 20°C

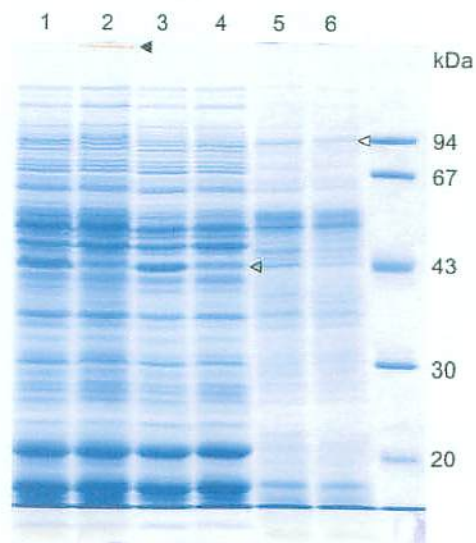


図9. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株のタンパク質のプロファイル

野生株と $\Delta 1848 \Delta 2060$ 株の細胞破砕液(1.野生株; 2. $\Delta 1848 \Delta 2060$), 可溶性画分(3. 野生株; 4. $\Delta 1848 \Delta 2060$), 膜画分(5. 野生株; 6. $\Delta 1848 \Delta 2060$)のSDS-PAGEによる解析。

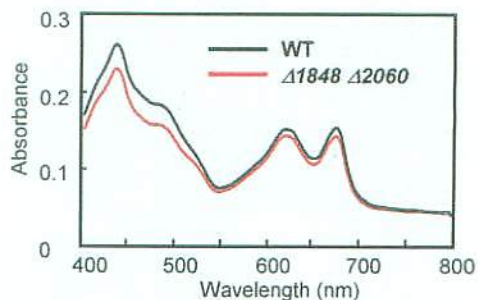


図10. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株の生細胞の吸収スペクトル

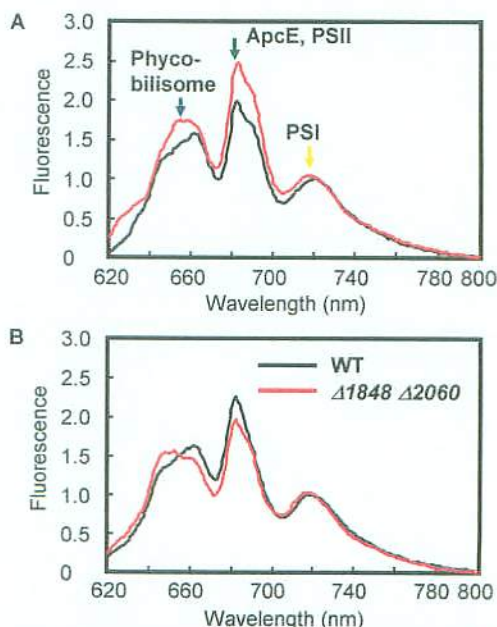


図11. 野生株と $\Delta 1848\Delta 2060$ 株の77Kでの生細胞の蛍光発光スペクトル

A, 植え継ぎ後24時間目
B, 植え継ぎ後96時間目
縦軸は721 nmを1としたときの相対値。