

光合成膜ガラクト脂質合成経路の多様性

静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点
粟井 光一郎

1. はじめに

酸素発生型光合成を行う生物のチラコイド膜は、例外なく多量のガラクト脂質、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) を含んでいる (図1)。MGDGとDGDGは、それぞれチラコイド膜の約50%、30%を占め、両ガラクト脂質を合わせると約80%に達する。これは、細胞膜や葉緑体以外のオルガネラ膜、光合成を行わない生物全般の生体膜が主にリン脂質で構成されていることと大きく異なっている。我々哺乳類も含め、身近な生物全般がリン脂質を主要な膜構成脂質とすることから、ガラクト脂質はマイナーな脂質と思われがちだが、植物や藻類、ラン藻など、光合成生物のバイオマスを考えると、実は地球上で最も豊富に存在する「メジャー」な脂質である。チラコイド膜には他に、酸性糖脂質であるスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、

そして唯一のリン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG) が存在する。この脂質組成は、植物や藻類の葉緑体からラン藻まで保存されており、光合成装置の類似性や、葉緑体ゲノムの存在などと合わせ、細胞内共生説の1つの根拠となっている¹⁾。なぜこのような脂質組成が保存されているのかは明らかとなっていないが、複雑な膜系であるチラコイド膜の構築に、光合成産物である糖を利用することにより、貴重な資源であるリンを浪費しないための植物の戦略だとする説が有力である。

近年、光合成タンパク質複合体の結晶構造解析が進んだ結果、複合体内部に多数の脂質分子が取り込まれていることがわかってきた²⁾。光化学系I複合体のモノマーには4分子の脂質 (1分子のMGDGと3分子のPG)、光化学系II複合体のモノマーには25分子の脂質³⁾ (11分子のMGDG、7分子のDGDG、5分子のSQDG、2分子のPG)、LHCIIのモノマーあたり1分子

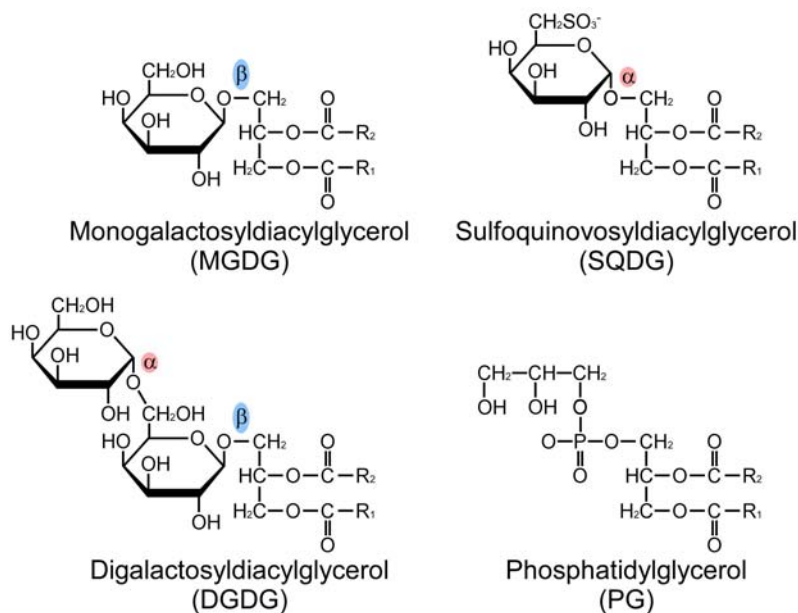


図1 チラコイド膜脂質

α、βは糖の配位する方向を示している。

* 連絡先 E-mail: dkawai@ipc.shizuoka.ac.jp

のDGDGと1分子のPG、 b_6f 複合体には2分子のMGDGが結合していると予測されている。これらの結果から、ガラクト脂質はチラコイド膜の構築だけでなく、光合成タンパク質複合体の機能発現を通して、光合成機能に深く関わっていると考えられている。

植物のMGDGおよびDGDG合成酵素遺伝子は既に単離され、それらを用いた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りつつある⁴⁾。しかし、植物のガラクト脂質は、葉緑体外にも局在することが分かってきており、他のオルガネラの機能とも関係している。チラコイド膜でのガラクト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ラン藻で合成酵素遺伝子を同定し、その破壊株を用いた解析を行う必要があった。

酸素発生型光合成生物で共通に保存されているガラクト脂質だが、その合成経路はラン藻と植物では異なることが知られている(図2)。植物では、ジアシルグリセロールとUDP-ガラクトースを基質とし、MGDGが合成される。一方ラン藻では、ジアシルグリセロールとUDP-グルコースを基質とし、モノグルコシルジアシルグリセロール(MGlcDG)が合成された後、異性化酵素によってMGDGへと変換される⁵⁾。実際、植物のMGDG合成酵素遺伝子と有意な相同性をもつ遺伝子は、ラン藻のゲノム上には存在しない。これに対して、DGDGはラン藻、植物共にMGDGとUDP-ガラクトースを基質として合成されると考えられている⁵⁾。しかし、植物のDGDG合成酵素遺伝子と有意な相同性を持つ遺伝子もラン藻ゲノム上に存在しないことから、ラン藻と植物では、同じ構造の脂質を異なる酵素で合成していると予測されていた。

我々のグループでは、全ゲノム配列の明らかとなっていた2種のラン藻、*Synechocystis* sp. PCC 6803および*Anabaena* sp. PCC 7120を用いて比較ゲノム学的解析を行い、ラン藻のガラクト脂質合成を担う糖転移酵素遺伝子を明らかにしてきた^{6,7)}。本稿では、これら

の遺伝子を同定した際に用いた、簡単な「比較ゲノム学的」解析法を紹介し、破壊株を用いた解析からわかった、光合成膜におけるガラクト脂質の機能について論じる。

2. ラン藻ガラクト脂質合成酵素遺伝子の同定

これまで、ラン藻が植物と異なる経路でMGDGを合成していることが、生化学的解析により明らかにされていた^{5,8)}。そこで、全ゲノム配列の明らかとなっていた単細胞性ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803と糸状性ラン藻*Anabaena* sp. PCC 7120を用いて、MGlcDG合成活性を調べたところ、確かに両ラン藻で保存されており、同様の糖脂質合成経路が存在することがわかった。ラン藻のSQDGおよびPG合成酵素遺伝子群はすでに明らかとなっており、両ラン藻間で相同性が高いことがわかってきた。つまり、ラン藻のMGlcDG合成酵素遺伝子やDGDG合成酵素遺伝子もラン藻間で高い相同性で保存されていることが期待された。そこで、①糖転移酵素モチーフを持つこと、②ラン藻間で保存されていること、③機能未知であること、の3条件に当てはまる遺伝子を、ゲノムサイズの比較的小さい*Synechocystis* sp. PCC 6803のアノテーションデータから抽出したところ、候補を4遺伝子まで絞り込むことができた。これらを大腸菌で発現させ、活性測定を行った結果、そのうちの1つからMGlcDG合成酵素活性を検出することができた⁶⁾。また、残りの3遺伝子のうちの1つがDGDG合成酵素遺伝子であることもわかった⁷⁾。

この解析方法は、ゲノム配列の明らかとなっている数種の生物間で、酵素活性(機能)が保存されていれば、どのような生物にも応用可能である。解析のポイントは、モチーフ検索でどの程度絞り込めるかであろう。実際の解析は、ダウンロードしたアノテーションデータから目的の機能をもつと考えられる候補遺伝子を見つけ出すことから始まる。我々の場合、*Synechocystis* sp. PCC 6803から糖転移酵素モチーフをもつ遺伝子を選んだが、解析の当初、相同性の指標であるE Valueが10以下のモチーフ全てを調べたため、*Synechocystis* sp. PCC 6803の全遺伝子に与えられたアノテーション数は33,000以上になってしまった。これら全てを丸2日かけてチェックし、候補を270遺伝子まで絞り込んだ。ファイル検索機能を使って候補遺伝子を見つけ出すことも可能であったが、

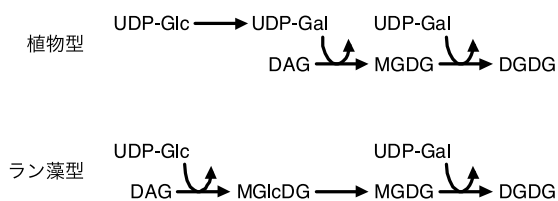


図2 植物とラン藻のガラクト脂質合成経路

見落としの恐れを考え、検索機能でピックアップされなかった遺伝子に関しては、「人力」検索を行った。この候補遺伝子に対してBlast検索を行い、ラン藻で保存されている遺伝子を抽出した。このような作業は骨が折れるが、最近では同様の検索を行うことが出来る便利なサーバも存在するので⁹⁾、それらを積極的に活用すると、労力を節約できるだろう。

3. ガラクト脂質合成経路の進化

同定されたラン藻のガラクト脂質合成酵素遺伝子のうち、MGlcDG合成酵素遺伝子は、その合成経路がラン藻でしか見つかっていないこともあり、他の生物で有意な相同性のある遺伝子は見つからなかった。一方DGDG合成酵素遺伝子は、ラン藻間で保存されていたのに加え、原始紅藻の葉緑体ゲノムにも相同性の高い遺伝子が保存されていることがわかった。全ゲノム配列の明らかとなっている原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* では、植物型のDGDG合成酵素遺伝子のオルソログは見つかっておらず、恐らくこの葉緑体ゲノム上に存在する、ラン藻型のDGDG合成酵素がガラクト脂質合成を担っていると考えられる。興味深いことに、*C. merolae* の核ゲノムには植物型のMGDG合成酵素遺伝子がコードされており^{7,10)}、*C. merolae* は植物型とラン藻型両方のガラクト脂質合成酵素を使う中間タイプであるといえる。高等植物や苔類、緑藻では、植物型のガラクト脂質合成酵素遺伝子が保存されていることから、ラン藻から葉緑体へと転換される過程で、ガラクト脂質合成経路も変化していったのであろう。現在のところ、なぜそのような変化が起こったのか、論理的な説明は出来ていない。

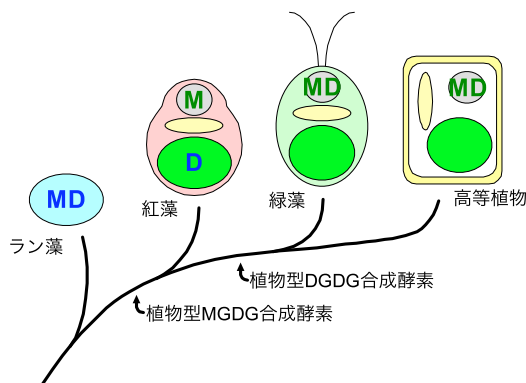


図3 ガラクト脂質合成経路の分布
 M : MGDG合成酵素遺伝子
 D : DGDG合成酵素遺伝子
 緑字が植物型、青字がラン藻型を示す。

4. チラコイド膜におけるガラクト脂質の生理的役割

ラン藻のガラクト脂質合成酵素遺伝子を同定できたことから、破壊株を用いた解析が可能となった。MGDG合成の初発反応を触媒する、MGlcDG合成酵素遺伝子を *Synechocystis* sp. PCC 6803 で破壊することを試みたが、残念ながら、全ゲノムコピーが完全に破壊された株を単離することは出来なかった。植物でも、主要なMGDG合成を担う *MGDI* 遺伝子を破壊すると、seedling lethal になることが報告されている¹¹⁾。MGDGはチラコイド膜の約半分を占め、DGDG合成の基質にもなることから、光合成膜には欠くことが出来ないと思われる。

DGDG合成酵素遺伝子 (*dgdA*) は、我々と同時期に東京大学の佐藤直樹教授のグループでも同定され、*Synechocystis* sp. PCC 6803 で破壊株が単離されている^{7,12)}。*dgdA*変異株は通常の生育条件では、野生株と比べ生育に変化は見られず、DGDGは通常の培養条件では必須の脂質ではないことがわかった。しかし、強光条件やリン酸欠乏条件では生育が阻害されることから^{7,13)}、ストレス条件下で必要な機能を担っているのかもしれない。通常、ラン藻が生育する環境は、実験室の培養条件に比べてリン酸濃度が低いことから（およそ100分の1）、リン酸の少ない環境でチラコイド膜を構築するために、DGDGは重要なであろう。*dgdA*変異株の光化学系II複合体ではDGDGは検出されず、酸素発生複合体を形成する膜表タンパク質が解離している¹²⁾。また、*dgdA*変異株では光阻害からの回復にも影響が見られることから、DGDGの欠乏によってマンガクラーが解離しやすくなった結果、光阻害を受けやすくなり、強光条件での生育が阻害されていると予測されている¹³⁾。

5. おわりに

最近、他のラン藻種で *dgdA* 遺伝子の破壊を試みたところ、全ゲノムコピーを完全に破壊することが出来なかった（牧野、渡辺ら、未発表）。このことは、ラン藻でも種によってはDGDGを必須脂質とすることを示している。実際、ラン藻種によって脂質要求性が異なることが報告されており¹⁴⁾、それぞれの種によって、光合成タンパク質複体内で、脂質が必須の機能を担う場所が異なるのかもしれない。この脂質要求性と光合成機能の関係を明らかにするため、現在、

各ラン藻種から光合成タンパク質複合体を精製し、結合する脂質の組成を調べている。

参考文献

1. Joyard, J., Maréchal, E., Miège, C., Block, M. A., Dorne, A. J., and Douce, R. (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts, in *Lipids in photosynthesis: Structure, function and genetics* (Siegenthaler, P. A., and Murata, N., eds) pp 21-52, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
2. Jones, M. (2007) Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes, *Prog. Lipid Res.* **46**, 56-87.
3. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 334-342.
4. Ohta, H., and Benning, C. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants, *J. Biol. Chem.* **280**, 2397-2400.
5. Sato, N., and Murata, N. (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. I. Lipid classes, *Biochim. Biophys. Acta* **710**, 271-278.
6. Awai, K., Kakimoto, T., Awai, C., Kaneko, T., Nakamura, Y., Takamiya, K., Wada, H., and Ohta, H. (2006) Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria, *Plant Physiol.* **141**, 1120-1127.
7. Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation, *Plant Cell Physiol.* **48**, 1517-1523.
8. Sato, N., and Murata, N. (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga (Cyanobacterium), *Anabaena variabilis* III. UDP glucose:diacylglycerol glucosyltransferase activity in vitro, *Plant Cell Physiol.* **23**, 1115-1120.
9. Sato, N. (2009) Gclust: trans-kingdom classification of proteins using automatic individual threshold setting, *Bioinformatics* **25**, 599-605.
10. Sato, N., and Moriyama, T. (2007) Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis, *Eukaryot. Cell* **6**, 1006-1017.
11. Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17216-17221.
12. Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., and Sato, N. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Plant Physiol.* **145**, 1361-1370.
13. Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato, N., and Wada H. (2009) Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress, *FEBS Lett.* **538**, 718-722.
14. Aoki, M., Sato, N., Meguro, A., and Tsuzuki, M. (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria, *Eur J Biochem.* **271**, 685-693.