

〈一般研究課題〉 光合成生物の環境適応機構におけるリパーゼの
機能解明とバイオエネルギー生産への応用
助成研究者 中部大学 愛知 真木子



光合成生物の環境適応機構におけるリパーゼの 機能解明とバイオエネルギー生産への応用

愛知 真木子
(中部大学)

Analysis of the function of lipases in the mechanism of environmental adaptation
of photosynthetic organisms and its application to bioenergy production.

Makiko AICHI
(Chubu University)

Abstract :

Acyl-acyl carrier protein synthetase (Aas), which is responsible for recycling of free fatty acids (FFAs), is necessary for the growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*S. 6803*) under high-light conditions ($400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), but not under low-light conditions ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Even under the low-light conditions, growth defects of the *aas*-deficient mutant became evident when the growth temperature was lowered from 30°C to 22°C . At 22°C , the mutant cells accumulated large amounts of C_{18} FFAs and the C_{16} -containing lysolipids derived from the four major glycerolipids constituting the cytoplasmic and thylakoid membranes. Since the membrane lipids of *S. 6803* contain C_{18} and C_{16} fatty acyl moieties esterified to the *sn*-1 and *sn*-2 positions, respectively, it was deduced that an *sn*-1-specific lipase(s) was induced at low temperatures and deacylated the membrane lipids. Inactivation of LipA, which had been reported as an *sn*-1-specific lipase in *S. 6803*, did not affect the cold-induced accumulation of FFAs and lysolipids. These results indicate the presence of an unidentified cold-inducible lipase(s) in *S. 6803*.

1. はじめに

シアノバクテリアをはじめとする光合成生物は強光や低温のような常に変動する環境に適応して生命を維持している。我々は最近、2種のシアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC7942 と

Synechocystis sp. PCC6803)において、アシルACP合成酵素をコードする遺伝子を欠損させ、遊離脂肪酸 (FFA) の再利用を阻害した株を用いることにより、強光ストレス応答時に、膜脂質の脱アシル化が促進されFFAとリゾ脂質を細胞内に蓄積することを発見した[1, 2]。FFAをバイオエネルギーに利用する研究はLiu et al.(2011)[3]やKaczmarzyk and Fulda(2010)[4]、Berlepsch et al.(2012) [5]らも行っているが、リパーゼとリパーゼによる脱アシル化およびAasによる再アシル化の生理的機能やこれらの光合成における光阻害とその修復過程との関連は明らかになっていない。この脱アシル化が環境ストレス応答にどのように機能しているか、なぜ膜脂質の脱アシル化と再アシル化が必要なのかを明らかにすることは光合成生物の環境適応機構に新たな知見と研究領域をもたらすと考えられる。*Synechocystis* sp. PCC6803の膜脂質は、sn-1位には主に炭素数18(C18)の脂肪酸が、sn-2位には炭素数16(C16)の脂肪酸のみが結合している(図5a)。したがってFFAの鎖長からそれらが結合していた膜脂質のsn部位を推定することが可能であり、リパーゼの性質を解析するうえで有益である。

また応用面として、我々はシアノバクテリアによるバイオエネルギー生産にも取り組んでいる。藻類バイオ燃料は生産コスト高が実用化を阻んできたが、FFAは細胞外へ排出できる物質であり、生産物の回収にエネルギーを要さないため生産コスト削減を可能にする。リパーゼの同定と機能解明は、FFA生産による藻類バイオ燃料実現のために必須の知見であり、本研究では、低温誘導性sn-1特異的リパーゼの存在を示唆するとともに、これまで明らかにされているLipAが低温誘導性リパーゼである可能性について検討した。

2. 試料および実験方法

Synechocystis sp. PCC 6803 (S. 6803) GT株を野生株(WT)とし、アシルACP合成酵素遺伝子 (*aas*) にカナマイシン耐性遺伝子を導入したアシルACP合成酵素遺伝子欠損株 (dAS13) を用いた(図1、[6])。窒素栄養として硝酸イオンを含むBG11培地を用い、50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}$

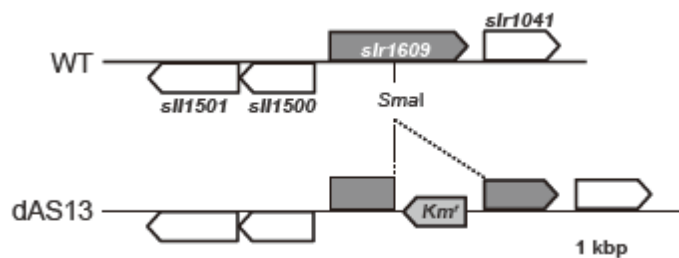


図1. *aas* 破壊株 (dAS13) の構造

s^{-1} の連続光を照射、空気に二酸化炭素を2% 添加して通気した。生育は分光光度計を用いた濁度 (OD730nm) により測定した。細胞内のFFAsおよびリゾ脂質、膜脂質の分析は Folch 法 [7], [8] と LC-MSを用いた [2, 8]。

3. 実験結果

3.1 低温条件下での 遺伝子欠損の生育への影響

野生株と dAS13 を 30℃ と 22℃ で生育させたときの増殖速度を図 2 に示す。30℃ での生育速度を 100% としたとき、22℃ で野生株は 52.7% に低下したが、dAS13 は 30.9% に大きく低下した。このことから、*aas* は低温環境での生育に必要であることが明らかとなった。

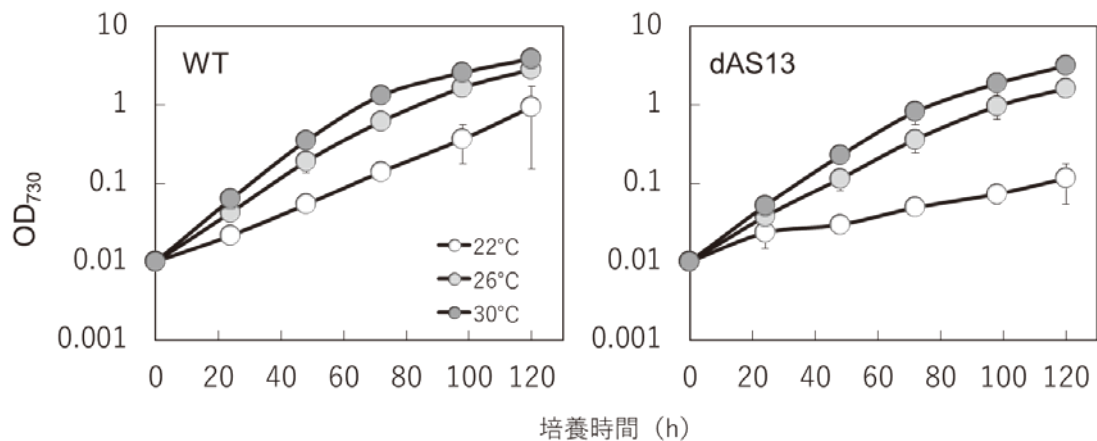


図2. *Synechocystis* sp. PCC6803 野生株 (WT) と dAS13 の生育
Synechocystis sp. PCC6803 野生株 と dAS13 を 22、26、30°C で生育させたときの濁度変化

3.2 低温条件下での *aas* 欠損の膜脂質、遊離脂肪酸およびリゾ脂質組成への影響

S. 6803 株は低温適応のために膜脂質を不飽和化して膜の流動性を保つ機構を有している [9-11]。dAS13 における生育速度低下の原因解明のために膜脂質の組成を調べたところ、野生株と dAS13 の間で有意な差は見られなかった (Data not shown)。このことから、Aas は低温環境への適応機構の内、膜脂質の不飽和化に関与している可能性はないと判断した。

次に、FFA とリゾ脂質の組成を解析したところ、図3に示すように、

30°C (網掛け) と比較して 22°C (斜線) で培養した dAS13 の細胞内には、およそ5倍の FFA が蓄積していた。一方、野生株は 30°C (黒塗) では FFA の蓄積はほとんど見られなかったが、22°C (水玉) では 2.1 $\mu\text{g}/1 \times 10^8$ cells の FFA が観察された。このことは、野生株においても低温では膜脂質の脱アシル化が誘導されており、Aas による FFA の再利用速度よりも、リパーゼによる脱アシル化速度の方が速いことを示している。また、ラン藻細胞における膜脂質の主要成分であるグリセロ脂質の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)、スルフォキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、フォスファチジルグリセロール (PG) の4種すべてが脱アシル化され、それぞれ、モノガラクトシルモノアシルグリセロール (MGMG)、ジガラクトシルモノアシルグリセロール (DGMG)、スルフォキノボシルモノアシルグリセロール (SQMG)、リゾフォスファチジルグリセロール (LPG) が生成されることが明らかとなった (図4)。脱アシル化されて生じた FFA は炭素数が 18 (C18) であり、同時に測定したリゾ脂質に結合している炭素鎖は 16 (C16) であったことから、膜脂質の *sn*-1 から脱アシル化されることも分かった (図4、図5)。

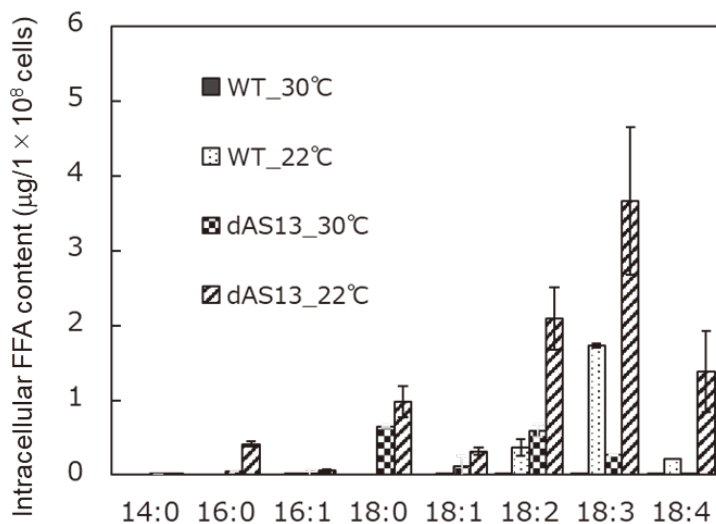


図3. WT と dAS13 の低温下における細胞内 FFA 組成と量

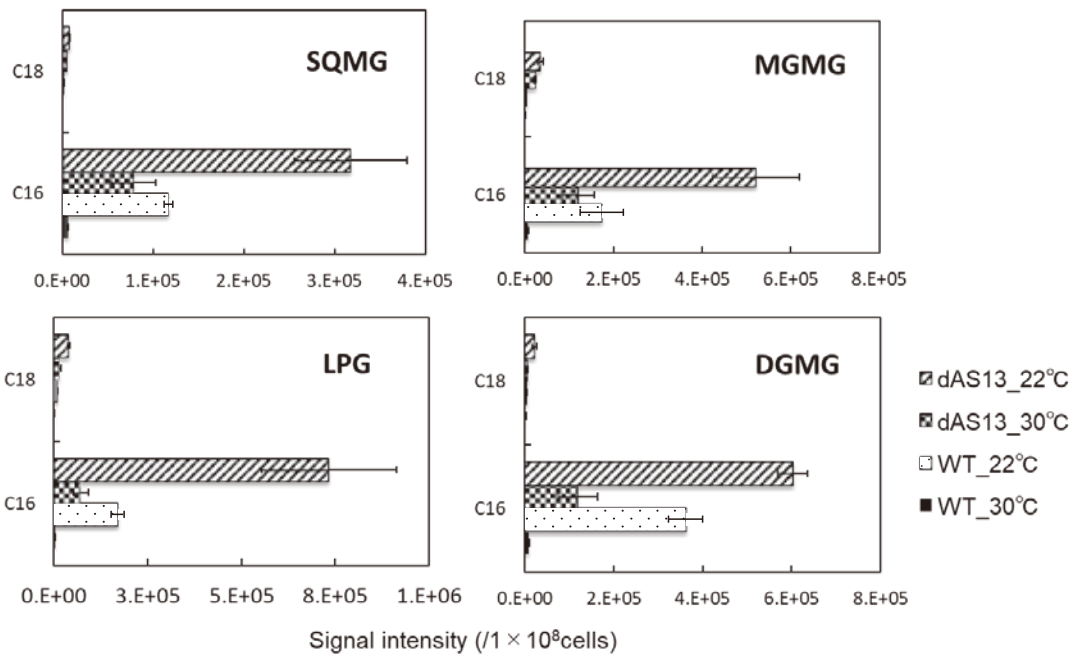


図4 WTとdAS13の低温下におけるリゾ脂質の組成と細胞数あたりの相対量

3.3低温誘導性リパーゼの探索

今回発見した低温における膜脂質の脱アシル化に關与するリパーゼはsn-1特異的リパーゼである。一方、Jimbo & Wada (2023)[12]は強光により損傷したD1タンパク質のチラコイド膜からの円滑な取り外しにリパーゼ LipA が關与し、sn-1特異的リパーゼであるとして報告している。今回発見した低温誘導性リパーゼとしてLipAの關与を檢討するため、その破壊株 (*aas*/*lipA*) を作製して22°Cでの細胞内FFFAの組成を解析した。その結果、*aas*破壊株dAS13と*aas*/*lipA*株の間に有意な差は見られなかった(data not shown)。この結果から、LipAは低温における膜脂質の脱アシル化には關与しないか、大きな影響を与えないと判断した。

今後は、低温誘導性のsn-1特異的リパーゼを同定することにより、低温適応へのリパーゼの生理的機能を解明するとともに、脱アシル化の生理的意義を明らかにしていく必要がある。

参考文献

- [1] K. Kojima, U. Matsumoto, S. Keta, K. Nakahigashi, K. Ikeda, N. Takatani, T. Omata, M. Aichi, High-Light-Induced Stress Activates Lipid Deacylation at the sn- 2 Position in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol* 63(1) (2022) 82-91.
- [2] N. Takatani, K. Use, A. Kato, K. Ikeda, K. Kojima, M. Aichi, S. Maeda, T. Omata, Essential Role of Acyl-ACP Synthetase in Acclimation of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*

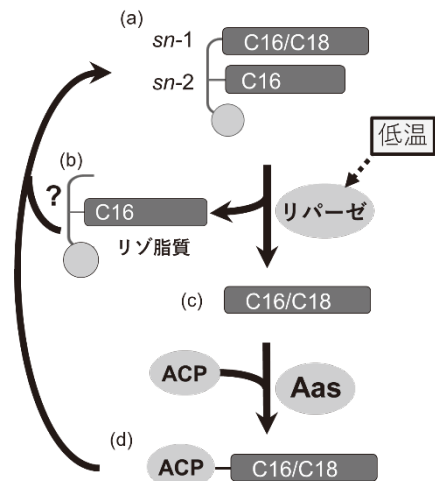


図5 低温誘導性リパーゼによる膜脂質の脱アシル化とFFFA 再利用モデル (a)グリセロ糖脂質、(b)リゾ脂質、(c) FFA、(d)アシルACP

- strain PCC 7942 to High-Light Conditions, *Plant Cell Physiol* 56(8) (2015) 1608-15.
- [3] X. Liu, S. Fallon, J. Sheng, R. Curtiss, CO₂-limitation-inducible Green Recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17) (2011) 6905-8.
- [4] D. Kaczmarzyk, M. Fulda, Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling, *Plant Physiol* 152(3) (2010) 1598-610.
- [5] S. von Berlepsch, H.H. Kunz, S. Brodesser, P. Fink, K. Marin, U.I. Flügge, M. Gierth, The Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 Mediates Fatty Acid Import, *Plant Physiology* 159(2) (2012) 606-617.
- [6] H. Jimbo, K. Yuasa, K. Takagi, T. Hirashima, S. Keta, M. Aichi, H. Wada, Specific Incorporation of Polyunsaturated Fatty Acids into the the *sn*-2 Position of Phosphatidylglycerol Accelerates Photodamage to Photosystem II under Strong Light, *Int J Mol Sci* 22(19) (2021).
- [7] J. Folch, Lees, M. and Stanley, G., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1957, pp. 497-509.
- [8] K. Ikeda, Mass-spectrometric analysis of phospholipids by target discovery approach. In *Bioactive Lipid Mediators*, Springer Japan, In *Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols.* , 2015.
- [9] N. Murata, D.A. Los, Membrane Fluidity and Temperature Perception, *Plant Physiol* 115(3) (1997) 875-879.
- [10] S. Shivaji, J.S. Prakash, How do bacteria sense and respond to low temperature?, *Arch Microbiol* 192(2) (2010) 85-95.
- [11] D.A. Los, K.S. Mironov, S.I. Allakhverdiev, Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions, *Photosynth Res* 116(2-3) (2013) 489-509.
- [12] H. Jimbo, H. Wada, Deacylation of galactolipids decomposes photosystem II dimers to enhance degradation of damaged D1 protein, *Plant Physiol* 191(1) (2023) 87-95.