

## 研究報告書

### 「ラン藻ポリケチド合成酵素を用いた脂質生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 栗井 光一郎

#### 1. 研究のねらい

ポリケチド合成酵素は脂肪酸合成酵素と似た構造を持ち、超長鎖脂肪酸 (DHA や EPA) や抗生物質など様々な代謝産物の合成に関与することが知られている。本さきがけ研究では、光合成と窒素固定の両方を行うことのできる糸状性ラン藻で、窒素固定に関わる細胞であるヘテロシストを利用し、窒素欠乏条件で蓄積する糖脂質の前駆体であり、ポリケチド合成酵素によって合成される脂肪アルコールの高効率生産を目指した。

ヘテロシストでは窒素固定反応が行われるが、その反応を担う酵素 (ニトロゲナーゼ) が酸素感受性であるため、細胞内を低酸素状態に保つ必要がある。そこで、ヘテロシストでは細胞外から酸素が流入しないようにバリア層を形成していることが知られている。このバリアは、超長鎖脂肪アルコールに1分子の糖が結合した糖脂質により作られる。代表的糸状性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 では炭素数 26 の脂肪アルコールにグルコースが結合した糖脂質が利用されている。本研究では、この糖を付加する酵素の遺伝子を破壊し、その株で前駆体である脂肪アルコールを蓄積させ、さらにそれを高効率で生産させるシステムの構築を目指した。

一方、膜脂質合成に関する研究も進めた。これは、脂肪アルコールの生産量を上げるためには、材料の競合する膜脂質について理解する必要があったためである。光合成生物では光合成を行うチラコイド膜が何層にも重なった複雑な構造を形成している。この膜は糖の一種であるガラクトースを持つ膜脂質 (ガラクト脂質) がおよそ 8 割を占めている。このことから、ガラクト脂質は光合成に必須であると考えられてきた。植物のガラクト脂質を合成する酵素の遺伝子はすでに同定されていたが、ラン藻では合成経路が植物と異なることが 30 年以上前にわかっていたものの、その合成を担う酵素の遺伝子はわかっていなかった。そこで、ラン藻のガラクト脂質合成にかかわる遺伝子を同定し、ガラクト脂質の役割を明らかにすることを計画した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

酸素発生型光合成をおこなうバクテリアであるラン藻は、植物葉緑体と同様、チラコイド膜を用いた光合成を行っている。ラン藻には様々な形態の種が存在し、中には糸状性の形態をもち、そのうちのいくつかの細胞を窒素欠乏条件で異化細胞 (ヘテロシスト) へと分化させ、窒素固定を行う種が存在する。その代表種である *Anabaena* sp. PCC 7120 のヘテロシストに特異的に存在する糖脂質 (hgl) を合成する糖異性化酵素 *hglT* 遺伝子変異株を単離した。*hglT* 遺伝子破壊株では、hgl が合成されず、その前駆体である脂肪アルコールが蓄積することがわかった。また、hgl が合成されないにも関わらず、窒素固定活性を維持していることも明らか

となった。つまり、この変異株では、光合成と窒素固定活性を維持したまま脂肪アルコールを蓄積していた。さらに、ヘテロシスト形成制御因子との多重変異株を作出し、ヘテロシスト出現頻度を上げることで脂肪アルコールの収量を上げることを試みたが、大きな効果は得られなかった。一方、空気をバブリングして培養することで脂肪アルコールの収量が上がるのがわかった。これは、酸素もしくは二酸化炭素(炭素源)の影響であると考えられた。

チラコイド膜はそのおよそ 8 割をガラクト脂質が占めている。この脂質組成はラン藻から葉緑体まで保存されていることから、ガラクト脂質はチラコイド膜に必須であると考えられてきた。一方、ガラクト脂質自体は共通しているものの、その合成経路はラン藻と葉緑体で異なることが知られていた。本研究では、ラン藻のガラクト脂質合成のカギ酵素となる糖脂質異性化酵素の遺伝子を明らかにし、その遺伝子破壊株を単離した。遺伝子破壊株ではガラクト脂質が消失し、その前駆体であるグルコースを持つ脂質(グルコ脂質)が蓄積していた。この株では、光合成活性、チラコイド膜構造が維持されていたことから、ガラクト脂質は光合成やチラコイド膜構築に必須ではなく、少なくともグルコ脂質で代替できることが明らかとなった。

チラコイド膜における膜脂質の要求性はラン藻種によって異なることが知られている。そこで、単細胞性ラン藻の *Synechococcus elongates* PCC 7942 でガラクト脂質要求性を調べたところ、これまで知られている単細胞性ラン藻とは異なり、2 分子のガラクトースを持つガラクト脂質が必須であることが明らかとなった。

## (2) 詳細

### (1) ヘテロシストでの脂肪アルコール蓄積

窒素固定を行うヘテロシストは、酸素感受性のニトロゲナーゼを守るため、糖脂質のバリア層を形成する。その糖脂質の前駆体である脂肪アルコールを蓄積する株を作出するため、最終反応を担う糖転移酵素 (HglT) の遺伝子破壊株を作出した。まず遺伝子破壊株が単離できたことから、*hglT* 遺伝子は必須遺伝子ではないことがわかった。この株を窒素欠乏条件にさらしたところ、糖脂質の代わりに脂肪アルコールが蓄積し、しかも野生株と比べ低いながらも窒素固定活性を維持していた。このことは、前駆体の脂肪アルコールでもバリア層が形成でき、その機能を担うことができることを示している。つまり、この株は光合成・窒素固定活性の双方を維持し、目的の脂肪アルコールを蓄積することがわかった。(論文1)

### (2) 脂肪アルコール生産の高効率化

脂肪アルコールを蓄積する株を単離できたことから、より効率よく目的化合物を取得する方法を検討した。ヘテロシストはおよそ 10~15 の栄養細胞あたり 1 細胞形成されることが知られている。そこで、ヘテロシスト形成を制御する因子 (PatS, HetN) の遺伝子を破壊することで、ヘテロシストの出現頻度が増す株の単離を試みた。しかし、これらの制御因子の遺伝子を破壊しても数%程度しか出現頻度が上昇せず、あまり効果が見られなかった。そこで、他の制御因子である *patN* 遺伝子を破壊した株の単離を試みたところ、全ゲノムコピーで遺伝子が破壊された株を単離することができなかった。このことは、*patN* 遺伝子が必須であることを示している。しかし、近縁の *Nostoc punctiforme* では破壊株の単離が報告されていることから、培養条件によっては単離で

きると考え、培地に含まれる窒素源を変更したスクリーニングを試みている。

次に、培養条件を変えることで脂肪アルコール蓄積量を増やすことを試みた。ヘテロシストのバリア層は培地中の酸素濃度が増すことによって厚みが増す（量が増える）ことが知られている。実際、空気をバブリングすることで脂肪アルコールの収量が増えることが観察された。しかし、空気中のどの成分が収量増加に有効であったかはわかっていない。今後、バブリングした空気に含まれる気体のうち、どの成分が有効か（例えば窒素、酸素、二酸化炭素）を明らかにすることによって、脂肪アルコールが蓄積する最適条件を明らかにしたい。

### （3）光合成膜脂質の機能解析

脂肪アルコールの効率的生産を行うためには、基質が競合する膜脂質の性質を理解しておくことが重要である。ラン藻を含む光合成生物が光合成反応を行うチラコイド膜は、そのほとんどが糖脂質で構成され、ガラクトースを含むガラクト脂質がその5割以上を占めている。この脂質組成はラン藻から陸上植物まで保存されていることから、ガラクト脂質は光合成に必須であると考えられてきた。しかし、ラン藻と陸上植物では、その合成経路が異なることが知られている。これまで、ラン藻のガラクト脂質合成に関わる酵素のうち、2つの糖転移酵素の遺伝子を明らかにしていた。しかし、ラン藻に特徴的である糖脂質異性化酵素の遺伝子は不明であった。そこで、比較ゲノム解析を行った結果、目的の遺伝子を同定することに成功した。この遺伝子がコードする糖脂質異性化酵素は脂質分子中のグルコースをガラクトースに変換することで、ガラクト脂質を合成する。つまり、この遺伝子を破壊すれば、ガラクト脂質が消失し、前駆体であるグルコースの付加したグルコ脂質が蓄積するはずである。もし、ガラクト脂質が光合成に必須であればそのような株の単離はできない。ところが、糖脂質異性化酵素遺伝子破壊株の単離に成功し、その遺伝子破壊株を用いた解析から、ガラクト脂質は必須ではなく、グルコ脂質でも代替できることが明らかとなった。これは、これまでの光合成膜脂質の常識を覆す成果となった。（論文2、プレスリリース）

一方、ラン藻には多様な種が存在し、光合成膜脂質の要求性が異なることが知られている。例えば、同じ単細胞性のラン藻でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803では必須の酸性糖脂質が*Synechococcus elongates* PCC 7942では欠失可能であり、ガラクトースを2分子もつジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）が*Synechocystis* sp. PCC 6803では必須ではないことが分かっている。そこで、*Synechococcus elongates* PCC 7942でDGDG要求性を調べたところ、必須であることが明らかとなった。また、このDGDG要求性は合成経路に寄らず、ラン藻のDGDG合成酵素とは全く異なる他の生物（植物）由来のDGDG合成酵素でも相補できることを示した。（論文3）

### 3. 今後の展開

本研究では、糸状性ラン藻のヘテロシストという特殊な細胞に存在する脂質を利用することで、エネルギー化合物を生産することを試みた。また、光合成膜に必須と考えられていたガラクト脂質が必須ではないことを証明した。これらの脂質は、アセチル CoA を共通の原料としており、細胞内で競合している。光合成膜を維持しなければ光合成活性が下がり、結果としてバイオマスが減少するため、目的化合物生産の最適化に向け本研究で得られた知見をもとに脂質代謝を総

合的に理解する必要がある。

本研究で明らかとなったラン藻の糖脂質代謝情報や、培養条件の検討を元に、単離した脂肪アルコール蓄積株での効率的生産条件を明らかにしたい。さらに、この合成系を利用して他の有用化合物、例えば DHA や EPA の生産につなげたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、主に4つの研究テーマを軸に進められた。1 つ目のヘテロシストでの脂肪アルコール生産は、上記研究成果にあるとおり、概ね目標が達成されたと考えられる。今後、蓄積した脂肪アルコールの生産に必要な条件を詳細に検討することで、より効率的生産につながる事が期待できる。一方、当初計画にあった栄養細胞での脂肪アルコール生産、その細胞外への排出に関する研究は、ほとんど進展が見られなかった。これは、栄養細胞で脂肪アルコール合成遺伝子クラスターを発現させるよう作成した遺伝子導入株で、脂肪アルコールの蓄積が見られなかったためである。そのため、栄養細胞で蓄積した脂肪アルコールを細胞外に排出する計画を進めることができなかった。しかし、研究計画当初は、合成した有用物質を細胞外に排出させることが肝要であると考えられてきたが、本領域での研究の進展により、排出の有無よりも蓄積量が重要であることが明らかとなってきた。さらに、上記脂肪アルコール蓄積株では、当初予想していなかった窒素固定活性が維持されており、この株を用いることで光合成と窒素固定活性を維持しつつ、目的の脂肪アルコール生産が実現したため、他のテーマに注力した。4 つ目の研究テーマである光合成膜脂質の機能解析に関しては、これまでの常識を覆す成果が得られ、プレスリリースを行うこともできた。今後は、この成果を有用物質生産へと繋げる責任があると感じている。

本領域では、さきがけ、CREST 共に油脂・脂肪酸などを生産する株の開発が進められてきたが、脂質解析を不得手とする研究者が多かったことから、脂質解析に関する領域内共同研究を多く進めることが出来た。このことは、さきがけ研究者としての貢献だけでなく、領域全体への貢献もできたと考えている。

##### (2) 研究総括評価

本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。

本さきがけ研究では、ラン藻での脂肪アルコールの合成、膜脂質の機能解析を行った。研究の当初は、20 kb 近くの遺伝子クラスターの導入に苦心するなど、思うような成果が出ていなかったが、最終的には脂肪アルコール生産株の作出に成功し、膜脂質の機能解析ではこれまでの常識を覆す成果を上げたことで、領域の進展に大きく貢献したと考えている。また、本人の得意分野である脂質解析で力を発揮することで、領域内での共同研究を積極的に進めたことも評価できる。今後は、本領域内での連携を進めることで、領域のさらなる進展に寄与すると期待している。

研究期間に発表した論文は、インパクトファクターの高い雑誌に掲載され、分野における重要性も高いことから評価できる。しかし、学会等での発表件数からすると論文数が少なく、質だ



けでなく量を増やす努力をすることが必要であろう。

研究者としては、本さがけ研究が評価され所属機関でのプロモーション(特任助教から准教授)に繋がった。また、所属機関での付置研や博士課程大学院への兼任も任命されており、高く評価されていることがうかがえる。その評価は学内だけではなく学外でも高まっており、新学術領域への計画班として参画やCREST申請での中心的役割を担うことに繋がった。さらに、さがけ研究期間中に国内シンポジウムを2件開催し、国際シンポジウムも1件開催している。招待講演は国内6件、国際2件、また、ラン藻研究コミュニティーでのプロジェクト責任者も担当するなど、研究者としての飛躍につながった。今後、この分野のトップランナーとして、研究をけん引し続けていくことを期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Halimatul HSM, Ehira S and Awai K\*. Fatty alcohols can complement functions of heterocyst specific glycolipids in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014) 450:178–83.
2. Awai K\*, Ohta H and Sato N. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111:13571–13575.
3. Maida E and Awai K\*. Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway *Biochim Biophys Acta.* (2016) in press

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### <学会発表>

国際会議 10件(うち招待講演2件), 国内会議 23件(うち招待講演2件)

#### <著作物>

1. Awai K\* (2016) Thylakoid development and galactolipid synthesis in cyanobacteria. In *Lipids in Plant and Algae Development*. Nakamura Y and Li-Beisson Y eds, Springer, in press.
2. Sato N\*, Awai K (2016) Diversity in biosynthetic pathways of galactolipids in the light of endosymbiotic origin of chloroplasts. *Front. Plant Sci.* 7:117.
3. 粟井光一郎 (2015) 光合成生物におけるガラクト脂質合成経路の分布と進化. *光合成研究* 25(2) 143–150.

#### <プレスリリース>

1. 「光合成反応の場を作る膜脂質の機能を解明」(2014年9月2日)  
<http://www.shizuoka.ac.jp/news/detail.html?CN=1995>

2. 「葉緑体の脂質なくても光合成可能」(2014年9月2日)静岡新聞
3. 「光合成研究で発見 脂質置き換えでも可能」(2014年9月18日)中日新聞
4. 「光合成反応の場作る膜脂質の機能を解明」(2014年9月19日)科学新聞