

論文の内容の要旨

論文題目 単細胞紅藻シアニジオシゾンにおける グリセロ脂質代謝に関する研究

氏名 毛利 奈津美

背景

陸上植物や藻類では、脂肪酸や葉緑体脂質（糖脂質やホスファチジルグリセロール）の合成は葉緑体で、リン脂質や中性脂質の合成は小胞体で行われている。近年、微細藻類を用いたバイオエネルギーの生産が注目されており、緑藻クラミドモナスなどを中心に研究が行われている。先行研究によって、紅藻シアニジオシゾン（*Cyanidioschyzon merolae*）は、陸上植物や緑藻とは異なる脂質代謝系をもつことが示唆されたが、紅藻における脂質代謝についての知見は少ない。本研究では、紅藻の脂質代謝についての特徴を明らかにすることを目的とし、シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素の探索とそれらの網羅的な細胞内局在解析、単離葉緑体を用いた代謝フロー解析を行った。

1. 脂質代謝関連酵素の比較ゲノム解析と細胞内局在解析

陸上植物や藻類の脂質代謝にはさまざまなオルガネラが関わっていることから、脂質代謝に関わる酵素の細胞内局在は、その酵素を特徴づける重要な要素の一つである。したがって、比較ゲノム解析によって特定した 124 個の脂質代謝関連酵素のうち、核ゲノムにコードされている 116 個の酵素について、GFP を用いた細胞内局在解析を行った。

その結果、脂肪酸や葉緑体脂質の合成に関わる酵素は主に葉緑体局在を、リン脂質や中性脂質の合成に関わる酵素は主に小胞体局在を示した。以上の結果から、シアニジオシゾンの脂質代謝におけるオルガネラの役割は、陸上植物のものとはほぼ同じであることが示唆された。しかし、シアニジオシゾンの脂質代謝は陸上植物と比べて、必要最小限の酵素によって構成されたシンプルな経路からなることがわかった。酵素の細胞内局在を調べる簡便な方法として、局在予測ソフトウェアを使用する方法があるが、このような解析ソフトウェアは陸上植物に特化したものが多い。本研究での局在解析の結果と、3種の局在予測ソフトウェアによる結果を比較することで、これらの解析ソフトウェアが紅藻にも応用可能であるかを検討した。その結果、これらの解析ソフトウェアの予測一致率は30~40%と低く、紅藻のタンパク質配列を使用した局在予測には適していないことがわかった。

2. 比較ゲノム解析によるシアニジオシゾンとその他の紅藻との脂質代謝系の比較

スサビノリなどの海洋性紅藻では、アラキドン酸 (20:4) やエイコサペンタエン酸 (20:5) などの多価不飽和脂肪酸を多くもつが、一方、シアニジオシゾンの主な不飽和脂肪酸はオレイン酸 (18:1) やリノール酸 (18:2) などであり、二重結合が3個以上の不飽和脂肪酸をもたない。このことから、シアニジオシゾンと海洋性紅藻では脂質代謝系が異なることが考えられた。そのため、シアニジオシゾンおよびその近縁種であるガルデリアと、海洋性紅藻であるスサビノリ、ヤハズツノマタ、チノリモの計5種のゲノム配列が解読されている紅藻について、脂質代謝系についての違いを明らかにすることを目的として、比較ゲノム解析により脂質代謝関連酵素を検索し、それぞれの紅藻の脂質代謝の特徴をまとめた。その結果、シアニジオシゾンとその他の紅藻とで、脂質代謝についていくつか共通した特徴が見出された。具体的には、葉緑体脂肪酸合成系の縮合酵素である3-ケトアシル-ACP合成酵素が3種類揃っていない点や、ホスファチジルコリンの合成経路が1種のみである点である。相違点としては、不飽和脂肪酸の合成系が異なる点や、ジガラクトシルジアシルグリセロール合成酵素の遺伝子が異なる点が挙げられる。しかし、海洋性紅藻ではシアニジオシゾンに比べて不飽和脂肪酸の合成が複雑であるが、シアニジオシゾンと同様に、不飽和脂肪酸合成の場が主に小胞体であることが示唆された。以上のことから、シアニジオシゾンは紅藻の中でも比較的単純な脂質代謝をもつが、その脂質代謝には海洋性紅藻にも見られる特徴を有することが判明し、シアニジオシゾンは紅藻の脂質代謝の解析に適したモデル生物であることがわかった。

3. 単離葉緑体における放射性ラベルを用いた代謝フロー解析

3-1. [2-¹⁴C]酢酸ナトリウムを用いた解析

脂質代謝関連酵素の網羅的な局在解析によって、シアニジオシゾンの脂質合成は、陸上植物と同様に小胞体と葉緑体が関わっていることが示唆された。シアニジオシゾンは葉緑体の単離が可能であることから、次に単離葉緑体を用いた代謝フロー解析を行った。シアニジオシゾンの単離葉緑体に[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムを、脂肪酸合成系により取り込ませ、脂肪酸や葉緑体脂質へのラベルの取り込みを確認した。[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムを単離葉緑体に与えると、パルミチン酸 (16:0) やステアリン酸 (18:0) などの飽和脂肪酸のみがラベルされた。コントロールとして行ったハウレンソウの単離葉緑体を用いた解析では、これらの飽和脂肪酸に加えて、不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (18:1) へのラベルの取り込みが確認された。以上の解析から、シアニジオシゾンは、陸上植物とは異なり、葉緑体にステアロイル-ACP 不飽和化酵素の活性がないことを実験的に確かめることができた。

3-2. [¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを用いた解析

次に単離葉緑体における[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを用いた代謝フロー解析を行った。単離葉緑体に[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを光合成により取り込ませ、葉緑体脂質へのラベルの取り込みを確認した。ハウレンソウの単離葉緑体では、[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムのラベルは脂質にほとんど取り込まれないことが分かっている。しかし、シアニジオシゾンでは葉緑体脂質がラベルされ、特にモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) に最も多くラベルが取り込まれていた。さらに MGDG を詳細に解析した結果、これらのラベルは脂肪酸部分ではなく、ガラクトースやグリセロールなどの極性基部分に取り込まれていることが明らかとなった。このことから、シアニジオシゾンは、陸上植物とは異なり、サイトゾルだけでなく葉緑体でも UDP-ガラクトースの合成が行われていることが示唆された。しかし、UDP-ガラクトースの合成に関わる遺伝子について比較ゲノム解析を行ったところ、紅藻のゲノムには葉緑体局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼをコードする *UGP3* 遺伝子のホモログが存在しないことがわかった。単離葉緑体を用いた代謝フロー解析において、ラベルされた MGDG のガラクトースは葉緑体内で合成された UDP-ガラクトースに由来すると考えられることから、シアニジオシゾンの葉緑体には *UGP3* 以外の新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼが存在することが示唆された。その新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼについて比較ゲノム解析および細胞内局在解析によって検索したところ、UDP-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼのホモログをコードする *CMT085C* が見出された。しかし、ガルデリアな

どの、その他の紅藻には CMT085C のホモログがないことから、この酵素はシアニジオシゾン特有のものであることが考えられた。今後は、組換えタンパク質を用いた活性測定により、この酵素の基質特異性などを解析したいと考えている。

結論

本研究で行った脂質代謝関連酵素における比較ゲノム解析と細胞内局在解析によって、陸上植物にはみられないシアニジオシゾンの脂質代謝における特徴を明らかにすることができた。その特徴の一つである、葉緑体では飽和脂肪酸のみが合成される点については、単離葉緑体を用いた代謝フロー解析によって実験的に実証することができた。それに加えて、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いた代謝フロー解析では、紅藻の葉緑体に、陸上植物ではみられない新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼが存在する可能性が示唆され、その候補遺伝子として UDP-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼをコードする CMT085C が見つかった。この酵素の基質特異性などについては今後詳しく解析したいと考えている。さらに、シアニジオシゾンと他の紅藻における脂質代謝関連酵素の比較ゲノム解析により、シアニジオシゾンは単純な脂質代謝系をもつが、海洋性紅藻の脂質代謝系にもみられる特徴を有していることがわかり、シアニジオシゾンは紅藻の脂質代謝についての解析に適したモデル生物であることがわかった。以上のことから、本研究のようなシアニジオシゾンを用いた解析は、紅藻全般における脂質代謝の解明につながると期待される。