

# シアノバクテリアのヘキサデセン酸からオレイン酸への伸長機構とその低温感受性に関する研究

小林 明日香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

シアノバクテリアを含む酸素発生型の光合成生物にとって光合成を行う場であり、かつ生物自身と外界を隔てつつ物質輸送を行う場でもある生体膜は生育にとって重要である。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は鞘脂質に炭素数 18 と炭素数 16 の脂肪酸 (C18 と C16) を持ち、C18 にのみ複数の脂肪酸不飽和化酵素によって不飽和結合が規則的に導入される。

最近、マミエラ藻綱 *Ostreococcus tauri* の葉緑体局在性の不飽和化酵素遺伝子 (*Ot17.2*) を *Synechocystis* に発現し、本来 *Synechocystis* が持たない C16 の Δ7 位に不飽和結合 (図中②➡) を導入した脂肪酸を膜脂質にもつ *Ot17.2* 株が作製された。不飽和脂肪酸は低温や強光ストレスへの適応に有効と考えられるが、*Synechocystis* が本来合成することのない C16 不飽和脂肪酸を合成することが生体機能に及ぼす影響については明らかではない。そこで C18 の不飽和化の最初の反応を触媒する Δ9 不飽和化酵素 *desC* を *Ot17.2* 株で欠損させ全脂肪酸のうちの C18 不飽和脂肪酸の割合を減らすことで、C16 脂肪酸を不飽和化することの意義の解明を目指した。

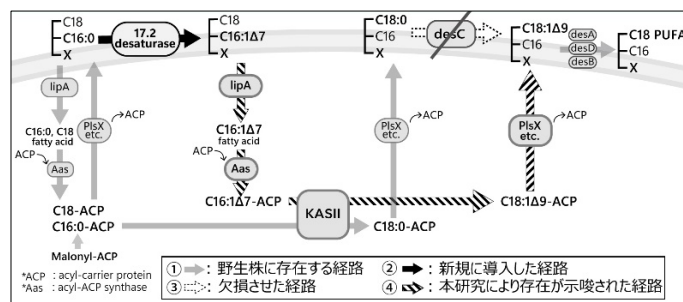


図 本研究から考えられる *Ot17.2+desC* の脂肪酸合成経路

## 【材料・方法】

### 1. *desC* 変異株の作出

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 で二重相同組換えを行わせることで *desC* 変異株を作出した。目的遺伝子 *desC* のコード領域とその上流及び下流各 1 kbp を含む約 3 kbp の DNA 断片を PCR によって増幅し、得られた DNA 断片を pMD19 vector に TA cloning した。得られたプラスミドの *desC* のコード領域以外の部分を増幅し、かつその末端にカナマイシン耐性遺伝子と相同な領域を持つプライマーペアで PCR 反応を行いベクター領域を増幅させた。この DNA 断片と PCR で増幅させたカナマイシン耐性遺伝子を In-Fusion 反応 (Takara Bio) により結合し、大腸菌へ形質転換してプラスミド DNA を得た。このプラスミド DNA を用いて *Ot17.2* 株への形質転換を行い、*Ot17.2+desC* 変異株を得た。

また得られた変異株から脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフィーによって変異株の脂肪酸組成を調べた。

### 2. 生育速度の測定

野生株、*Ot17.2* 株及び作出した変異株 *Ot17.2+desC* について、最適温度の 34°C と低温である 24°C で培養を行った。それぞれの条件について植菌から 24 時間ごと 7 日間、サンプルの回収を行い、細胞濁度を測定した。さらに培養 6 日目のサンプルを用いて脂肪酸組成についても調べた。

また、低温による生育速度への影響をより詳細に観察するため、*Ot17.2* 株及び *Ot17.2+desC* 株で 34°C・30°C・28°C・26°C・24°C での生育の測定・脂肪酸組成の分析を行い、対数増殖期の生育速度・脂肪酸組成の比較を行った。

## 【結果と考察】

### 1. 形質転換株の作出及び株の性質

得られた *Ot17.2+desC* 株の *desC* 遺伝子領域の構造を確認したところ、*desC* 遺伝子は完全にカナマイシン耐性遺伝子に置き換えられていた。しかし、*Ot17.2+desC* 株の脂肪酸組成は親株の *Ot17.2* 株とほとんど同じで、一連の C18 不飽和脂肪酸が確認された。そこで C16:1 Δ9 を合成する *desC2* 遺伝子を導入した *desC2+* 株でも *desC* の欠損を試みたが、この株では野生株と同様 *desC* を完全に欠損させることができなかった。これらの結果から、*Synechocystis* には C16:1 Δ7 を C18:1 Δ9 に伸長する経路 (図中④➡) が存在することが示唆された。

### 2. 形質転換株の低温感受性

最適温度の 34°C での培養では各株の生育に大きな差は見られなかった。24°C では野生株や *Ot17.2* 株は 34°C の半分くらいの分裂速度で生育したが、*Ot17.2+desC* は全く生育できなかった。この細胞の脂肪酸組成を測定したところ、*Ot17.2+desC* では C16:0、C16:1、C18:0 は検出されたが、C18 の不飽和脂肪酸が全く合成されていないことが明らかになった。つまり低温条件ではリパーゼによる脂肪酸の切りだし、アシル ACP 合成酵素 (aas)・ケトアシル ACP 合成酵素 (KAS II) による C16:1 Δ7 の C18:1 Δ9 への伸長が著しく制限されることを示唆している。

また *Ot17.2* 株では 26°C から 24°C にかけて生育速度が低下したのに対し、*Ot17.2+desC* では 30°C から 26°C にかけて生育速度が低下し C18 不飽和脂肪酸の合成が見られなくなった。このことから、*Ot17.2* 株と *Ot17.2+desC* 株の低温環境での生育速度の律速要因は異なっており、*Ot17.2+desC* では C18 不飽和脂肪酸の合成の不全が原因となって生育が抑制されていると考えられた。

### 【今後の展望】

低温条件ではチラコイド膜の減少が起こるのでリパーゼ活性はむしろ昂進していると考えられる。また C16:0 から C18:0 への伸長も起こっているため、脂肪酸の伸長反応の途中で低温感受性であるのはアシル ACP 合成酵素の活性であるという仮説に基づき、本酵素の活性を温度を変えて測定するつもりである。