

# 研究終了報告書

## 「ケミカルバイオロジーを用いた光合成の活性制御機構の解明」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：神保 晴彦

### 1. 研究のねらい

光は光合成の駆動力となるが、過剰な光は光合成活性を阻害してしまう(光阻害)。光阻害は、光化学系 II(PSII)が損傷する速度が、修復する速度を上回ると顕在化し、光合成生物の生育や物質生産を阻害する。また、光阻害が抑制され、光合成生物の活動が過剰となれば、赤潮やアオコなどのブルーム形成につながり、人間社会の経済活動に大きな影響を与えかねない。

遊離脂肪酸(FFA)は、バイオディーゼルの原料となるため、世界中でその生産技術の開発が活発である。特に光合成生物を用いた FFA 生産は、現在の経済活動を維持した上での低炭素社会実現のための切り札であり、その技術開発は急務である。ところが、生成した FFA が光合成の活性を阻害してしまうことから、FFA 生産研究の大きな障壁となっていた。研究代表者は、FFA による光合成活性阻害の影響を明らかにするため、FFA 分子種を細分化し、シアノバクテリアに添加して、強光下における光阻害の様子を解析した。その結果、FFA の分子構造(鎖長・不飽和度)によって、光阻害に多様な影響を及ぼすことが明らかとなった(Jimbo et al. 2020 *IJMS*)。そこで本研究では、FFA を多様な化合物ライブラリーとして捉え、これを用いたケミカルバイオロジ的な解析によって、光阻害への影響をモデル化し、光合成を効率的に制御できるような新規の FFA 分子をデザインすることを目的とした。また、FFA による光阻害への影響を、膜の流動性やタンパク質の脂質修飾といった観点から解析することで、その分子機構の解明も目指した。

本研究で、FFA によって、光合成活性を効率的に正に制御できれば、光合成生物を用いた物質生産を一段と飛躍させることが可能となる。また、逆に光合成活性を負に制御できれば、光合成生物によるブルーム(赤潮やアオコなど)に対して、有効な防除薬となることが期待される。これまでの光合成活性制御に関しては、遺伝子改変を基にした技術がほとんどであったが、外部から FFA を添加することで、光合成活性を正負に制御する技術が開発されれば、遺伝子改変ができない生物に対しても有効な手段となることが期待できる。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

光は光合成の駆動に必須であるが、過剰な光は光合成を損傷してしまう(光阻害)。光阻害の分子メカニズムの解明は、光合成生物を用いた物質生産技術の開発に必須である。本研究課題では、まず、遊離脂肪酸(FFA)の多様性を活用したケミカルバイオロジーによって、光阻害における FFA の影響を分子レベルで解明することを目指した。さらに得られたデータを基に、遊離脂肪酸の分子多様性による光合成活性制御の予測モデルを構築し、新規脂肪酸分子を開発した。

長鎖飽和脂肪酸は、光阻害を緩和したのに対し、短鎖飽和脂肪酸は、光阻害を促進した(図 1、

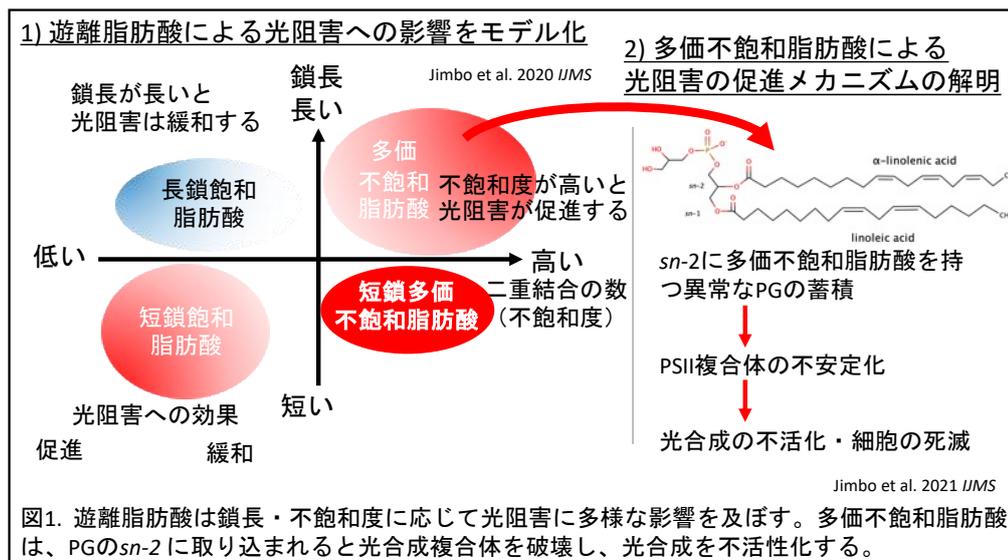


図1. 遊離脂肪酸は鎖長・不飽和度に応じて光阻害に多様な影響を及ぼす。多価不飽和脂肪酸は、PGのsn-2に取り込まれると光合成複合体を破壊し、光合成を不活性化する。

Jimbo et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020)。また、二重結合を2つ以上持つ多価不飽和脂肪酸は、PSIIの損傷を加速させた(図1、Jimbo et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021)。これらの結果から、脂肪酸の分子種による光合成への影響をモデル化し、短鎖多価不飽和脂肪酸が最も光合成に対して阻害効果をもたらすことが予測された(図1)。脂肪酸による光合成活性の制御は、新規の藻類・赤潮の防除薬として期待される(JST共同プレスリリース、Chem-Station: スポットライトリサーチ)。

また、これまでの研究業績に加えて、これらの研究成果が高く評価され、2021年度植物学会若手奨励賞を受賞するに至った。

### (2) 詳細

光は光合成の駆動に必須であるが、過剰な光は光合成を損傷してしまう(光阻害)。損傷した光化学系II(PSII)は、細胞内のタンパク質合成に依存して即座に修復されるが、損傷のスピードが修復のスピードを上回ると、光阻害が顕在化する。光阻害の分子メカニズムの解明は、光合成生物を用いた物質生産技術の開発に必須である。これまでの研究結果から、FFAはその分子構造の違いによって損傷・修復のどちらにも影響を与えることが示唆された(Jimbo et al. 2020 *Int. J. Mol. Sci.*)。そこで、FFAによって修復や損傷の速度を変化させることで光合成活性を自在に制御できるのではないかと考えた。本研究では、以下の2つの研究テーマによって、FFAが光阻害に与える影響をモデル化し、その分子メカニズムを解明することで、光合成をより効率的に制御できる新規脂肪酸分子のデザインを目指した。

## 研究テーマ1. 遊離脂肪酸による光阻害への効果をモデル化する

遊離脂肪酸 (FFA) は、鎖長・二重結合の数や位置・二重結合のシス/トランスによって多種多様な分子が存在し、その分子多様性は、生理学的・物理化学的な多様性を含む。本研究においては、多様な FFA 分子をケミカルライブラリーとして活用し、光阻害への影響を網羅的に解析した。これまでに、18 種類の FFA 分子について光阻害と光損傷の解析を行なった。その結果、鎖長(炭素数)が 16 より長い FFA は、損傷した PSII の修復を促進し、それが 14 よりも短い時には、PSII 修復が阻害された。炭素数 15 の脂肪酸は、光阻害に影響を与えなかったことから、炭素数 15 を境に、光阻害を緩和あるいは促進することが明らかとなった(図 2)。

次に二重結合の数や位置・シス/トランスに着目して解析を行った。二重結合を持たない飽和脂肪酸は、鎖長に応じた影響を示した。二重結合を 1 つ持つ不飽和脂肪酸は、光阻害に影響を与えなかった。この時、二重結合の位置やシス/トランスも、光阻害に影響を与えなかった。ところが、二重結合を

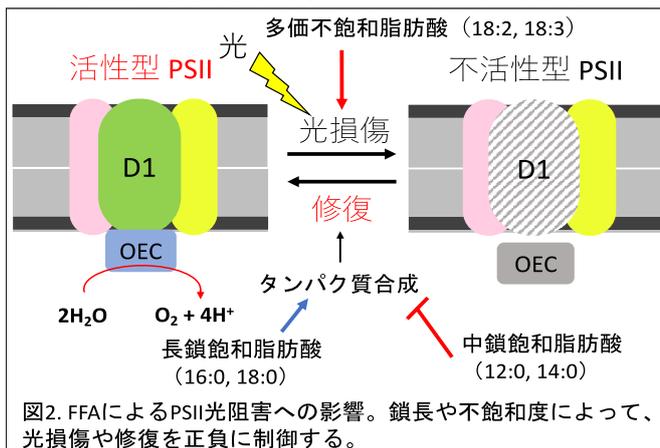


図2. FFAによるPSII光阻害への影響。鎖長や不飽和度によって、光損傷や修復を正負に制御する。

2 つ以上含む FFA は、PSII の損傷速度を加速させた。2 つの脂肪酸の位置の違いは、損傷速度の促進に影響を与えなかった。さらに、二重結合が 2 つよりも 3 つの方がより損傷の速度を促進させたことから、二重結合は位置やシス/トランスに関係なく、1 つの二重結合の数を境に、光阻害を緩和あるいは促進することが明らかとなった(図 2)。

以上の結果を基に、FFA による光阻害への影響をモデル化し、光阻害を効率的に促進する可能性を持つ新規 FFA 分子の発案・合成を行った。新規脂肪酸による光合成活性の制御は、新規の藻類・赤潮の防除薬として期待される(JST 共同プレスリリース、Chem-Station: スポットライトリサーチ)。

さらに、チャレンジ枠・増額を受けて、本研究の計画にはなかった修飾 FFA についても着目して、光阻害の解析を行った。修飾 FFA は、購入可能な 7 種類について解析を行った。その結果、12-ヒドロキシステアリン酸やフィタン酸は、光阻害を緩和した。どちらの分子も C12 か C11 の位置に修飾基が付与されているため、同様の機構で光阻害を緩和していることが示唆された。また、シクロプロパン脂肪酸であるステルクリン酸も光阻害を緩和した。ステルクリン酸は、18:0 から 18:1 へ変換する  $\Delta 9$ -デサチユラーゼ酵素を阻害することから、18:0 の増加によって PSII 修復が促進されたことが示唆された。これらの結果は、長鎖飽和脂肪酸に修飾基を付与することで、より効率的に光阻害を緩和する可能性のある新規 FFA 分子の開発に大きく寄与することが期待される。

## 研究テーマ2. 遊離脂肪酸による光阻害への影響の分子メカニズムを解明する

研究テーマ1の結果から、飽和脂肪酸は PSII 修復を阻害あるいは促進することが明らかとなった。PSII 修復は、修復に必要なタンパク質の新規合成に依存することから、35S でラベルされたメ

チオニン/システインを用いて、細胞内で、新規合成されたタンパク質をラベルすることで、飽和脂肪酸を添加した細胞におけるタンパク質新規合成速度の解析を行った。その結果、鎖長が短いほど、タンパク質の新規合成速度は遅くなり、鎖長が長いほど、タンパク質新規合成速度は速くなった。この時、多価不飽和脂肪酸は大きな影響を与えなかった。したがって、FFA の鎖長は、タンパク質の新規合成速度に影響することで、PSII 修復を制御することが示唆された。

遊離脂肪酸(FFA)は、細胞内に流入したのち、アシル ACP シンターゼによって、アシル ACP となり、膜脂質へ取り込まれると考えられる。そこで、通常のシアノバクテリアではほとんど蓄積が見られない  $\alpha$ -リノレン酸 (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) を取り込ませた細胞から、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)によって分離したのちに、各脂質分子における 18:3 含量をガスクロマトグラフィー(GC)によって定量した。その結果、18:3 はチラコイド膜に含まれる主要なリン脂質であるホスファチジルグリセロール(PG)の *sn*-2 へ特異的に取り込まれることが明らかとなった。PG の *sn*-2 位脂肪酸は、強光下において高速で代謝回転しており、その代謝回転に 18:3 が取り込まれたことで、*sn*-2 位に 18:3 を含む異常な構造を持った PG が蓄積したことが示唆された。さらに、18:3 取り込みによる PSII 活性への影響を詳細に解析したところ、酸素発生を行うマンガクスターが特に損傷していることが明らかとなった。さらに、18:3 を添加した細胞では、PSII 二量体が単量体化していることが明らかとなった。したがって、18:3 などの多価不飽和脂肪酸は、PG の *sn*-2 位に特異的に取り込まれることで、PSII 複合体の構造を変化させ、酸素発生複合体を損傷することで、PSII 損傷を加速させることが明らかとなった。さらに、FFA が PG に取り込まれた事による膜の物理学的特性を明らかにするため、蛍光試薬 LipiORDER を用いて、膜の流動性を解析した。また、PG が脂質修飾タンパク質の基質となることから、リポタンパク質へ脂肪酸を転移する酵素の欠損株においても、脂肪酸への影響を解析した。

### 3. 今後の展開

光合成生物の活動は、環境だけでなく、社会に対しても大きな影響を及ぼしている。ACT-X 研究課題においては、遊離脂肪酸を活用したケミカルバイオロジーによって光阻害を制御することを目指し、**光合成の効率を制御することができると考えられる新規化合物を発案・開発した。**

今後の展開としては、新規化合物を有機合成し、環境サンプルおよび培養されたシアノバクテリアや藻類における光合成活性への影響を明らかにする。また、シアノバクテリアだけでなく、他の光合成生物に対しても、PUFA や短鎖脂肪酸が光阻害および生育阻害を引き起こすことを明らかにしており、**18:3 が光合成生物に共通して作用することが示唆されている。**また、脂肪酸は、環境中において微生物による働きで酵素的に分解されると考えられるため、**環境負荷がかからない化合物として期待できる。**

### 4. 自己評価

#### 【研究目的の達成状況】

本研究の最終目標である、光阻害への FFA の影響を網羅的に解析してモデル化し、新規 FFA 分子のデザインを達成することができた。モデルから発明された化合物は、これまでに全く報告のない、新規化合物であった。そこで、ACT-X の研究者ネットワークを活用して、共同研究を行うことで、新規化合物の有機合成経路を開発・合成を行うことができた。本研究で



は、化合物のデザインを目標としていたが、実際にデザインした化合物を有機合成することで、更なる発展の可能性を見出すことができたことから、期待以上の成果が得られたと考えられる。また、チャレンジ枠・増額を受けて、本研究の計画にはなかった修飾 FFA についても着目して、光阻害の解析を行うことによって、予想外に、光阻害を大きく緩和するような化合物を発見することができた。発見された本化合物は、FFA を利用した光合成活性制御における、今後の研究展開の突破口となることが期待されることから、増額支援の効果を十分に発揮できたと考えられる。

#### 【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

研究実施体制は、主に研究代表者が主体となって、十分に遂行することができた。2020 年度には、研究補助員を雇用することで、光阻害の解析を加速することができた。その成果もあり、研究を開始して、早々に成果を論文として、発表することができた。本成果は、ACT-X「環境とバイオテクノロジー」におけるプレスリリース第一号となり、研究に参画していた研究補助員や学生の大きなモチベーションの向上に繋げることができた。残念ながら 2020 年度に雇用していた研究補助員は、正規の職を得たことで退職してしまったが、その後、「出産・子育て・介護」支援の援助によって、新たに研究補助員を雇用することができた。

研究費の多くは、本研究課題の根幹となる FFA 分子の購入に費やされた。また、前述の研究補助員の人件費に費やされた。研究費の執行は適切に行われており、大幅な執行計画の変更はなかった。

#### 【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究で得られた成果は、国際学術雑誌 International Journal of Molecular Science にオープンアクセス論文として発表し、JST と共同でプレスリリースを行なった。また、本論文の内容は、JST news にも取り上げられた。さらに、JST 以外の媒体 (Chem-Station) にも研究内容が報告された。これまでの研究業績に加えて、これらの研究成果が認められ、2021 年度における植物学会若手奨励賞を受賞するに至った。

## 5. 主な研究成果リスト

研究期間累積件数:4件 (その内、研究代表が責任著者である論文は2本)

\*研究代表者が責任著者の論文

1. \***Jimbo H.** and Wada H. Deacylation of galactolipids decomposes photosystem II dimers to enhance degradation of damaged D1 protein, *Plant Physiol.*, 2022, *in press*

本論文は、膜脂質を分解して遊離脂肪酸を生産するリパーゼが、PSII が修復される際に PSII 複合体を解体して、損傷した PSII の修復を促進することを明らかにした。

2. \***Jimbo H.**, Yuasa K., Takagi K., Hirashima T., Keta S., Aichi M., Wada H., Specific Incorporation of polyunsaturated fatty acids into the *sn*-2 position of phosphatidylglycerol accelerates photodamage to photosystem II under strong light. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10432-10446



本論文は、二重結合に着目して PSII 光阻害への影響を網羅的に解析した。その結果、二重結合を 2 つ以上持つ多価不飽和脂肪酸が、光損傷を促進することを明らかとした。この時、二重結合のシス/トランスや位置は、影響がなかった。さらに、取り込まれた脂肪酸分子を追跡したところ、PG の sn-2 位に特異的に取り込まれることで、PSII の酸素発生複合体が不安定化し、PSII 光阻害を促進することを明らかにした。

3. Kaichiro E., Abe M., Kawanishi N., **Jimbo H.**, Kobayashi K., Suzuki T., Nagata N., Miyoshi H., \*Wada H., Crucial importance of length of fatty-acyl chains bound to the sn-2 position of phosphatidylglycerol for growth and photosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **BBA Mol. Cell. Biol. Lipids**, 2021, 1867, 159158-159165

本論文は、異なる長さの脂肪酸を持つ PG 分子をシアノバクテリアに取り込ませて解析を行い、PG の sn-2 位の脂肪酸鎖長が生育や光合成活性に重要な働きを持つことが明らかとなった。

(1)特許出願

該当なし

(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)

2021年9月 JST 共同プレスリリース「光合成を人為的に制御できるか？脂肪酸によって光合成活性が変化する仕組みを解明」

2021年9月 植物学会若手奨励賞 受賞

2021年10月 Chem-Station スポットライトリサーチ「多価不飽和脂肪酸による光合成の不活性化メカニズムの解明：脂肪酸を活用した光合成活性の制御技術開発の可能性」

2021年12月 JST News 「脂肪酸による光合成の阻害を解明 バイオ燃料の増産や農薬開発に道」

2022年10月 東京大学プレスリリース「光合成タンパク質複合体の修復メカニズムの一端を解明—リパーゼによる光化学系 II 複合体の解体がその後の修復を促進する—」