総 説

不飽和脂肪酸脂質に関する
遺伝子の改変

稲葉 昌美・村田 紀夫

基礎生物学研究所 (〒444 愛知県岡崎市明大寺字西郷中 38)

The Genetic Manipulation of Fatty Acid Desaturation in Cyanobacteria

Masami INABA and Norio MURATA

Department of Regulation Biology, National Institute for Basic Biology
(Myodaiji, Okazaki-shi, Aichi-ken, 〒444)

Unsaturation of fatty acids of glycerolipids in biological membranes can be altered by changing the growth temperature of the organism. Such temperature-induced changes in unsaturation of fatty acids are explained in terms of the regulation of membrane fluidity that is necessary for the proper functioning of biological membranes. Desaturases are responsible for the regulation of levels of the fatty acid unsaturation by introducing double bonds (unsaturation bonds) into fatty acids.

In this review, we describe recent research on acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimation to cold of cyanobacteria. We include a discussion of the basic characteristics of fatty acid desaturation, the characterization of acyl-lipid desaturases, the genetic manipulation of desaturases in relation to modification of cold tolerance, and the temperature-regulated expression of genes for desaturases.

1 はじめに

シアノバクテリア細胞は、膜構造とグリセロ脂質の組成において、真核植物の葉緑体に類似している¹⁾。シアノバクテリア細胞の膜には、細胞質膜、外膜、チラコイド膜の3種類の生体膜があり、チラコイド膜は閉じた膜系で、しかも細胞質膜とは分離している^{1), 2)}。この膜構造は、葉緑体の内膜、外膜、チラコイド膜に対応している。シアノバクテリアの細胞膜とチラコイド膜は、主

要なグリセロ脂質として MGDG, DGDG, SQDG, PG を含むが²⁾、真核植物の葉緑体の内膜とチラコイド膜も同様のグリセロ脂質を含む^{3), 4)}。シアノバクテリアでは、MGDG が全グリセロ脂質のおよそ半分を占めている^{5), 6)}。

これらのグリセロ膜脂質は二重層を形成し、膜タンパク質の機能発現に必要な舞台を提供している⁷⁾。グリセロ膜脂質の物理的性質は、グリセリン骨格部分にエステルを形成している脂肪酸の不飽和度に依存する^{8)~10)}。従って、膜脂質の脂肪酸の不飽和度が変わると、膜結合タンパクの様々な機能（チラコイド膜の光化学反応や電子輸送反応、代謝物質やタンパク質の細胞質膜を通しての輸送など）にその影響が及ぶ。

生体膜の流動性は、正常な膜機能発現にとって重要であると推察されている¹¹⁾。一般に変温動物が低温にさらされると、生体膜中のグリセロ脂質の脂肪酸は不飽和化されるが、このような不飽和度の変化は生体膜の流動性の調節現象として説明されている。しかし、このような低温への適応においては、生体膜脂質の不飽和化とともに、他の多くの代謝系の変化も引き起こされる^{12)~14)}。

略記:

ACP, アシル基運搬タンパク質

MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセリン

DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセリン

SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセリン

PG, ホスファチジルグリセリン

PC, ホスファチジルコリン

PE, ホスファチジルエタノールアミン

Km^r, カナマイシン耐性遺伝子

脂肪酸は X:Y または X:Y (Z₁, Z₂, ...) と表記する。X は炭素原子数, Y は二重結合数, Z₁, Z₂, ... はシス型二重結合のカルボキシル末端からの位置。

連絡者: 村田紀夫

従って、膜脂質の脂肪酸の不飽和化と低温耐性能との関連については、明快な解答を得ることができていなかった。その点を明らかにするためには、遺伝子操作を用いてグリセロ脂質の脂肪酸の不飽和度だけを変化させ、他の代謝過程への影響を最小にする系を確立する必要がある。

生体膜の脂質の脂肪酸に二重結合（不飽和結合）を導入する酵素がデサチュラーゼであるが、これには3つのタイプがある (Fig.-1)。

アシル-CoA デサチュラーゼは動物、酵母、菌類の細胞の E.R. に存在し¹⁵⁾、CoA に結合している脂肪酸を不飽和化する。アシル-ACP デサチュラーゼは植物のプラスチドのストロマ中に存在し¹⁶⁾、ACP に結合している脂肪酸を不飽和化する。アシル脂質デサチュラーゼは、真核植物の E.R. や葉緑体膜¹⁷⁾、およびシアノバクテリア細胞の膜¹⁸⁾に存在し、グリセロ脂質にエステル結合した脂肪酸に二重結合を導入する^{17)~19)}。この最後のタイプが、温度変化に対する対応において、最も効果的に不飽和度を調節することができる。

アシル脂質デサチュラーゼは、電子供給体の種類によって、さらに2つのグループに分類される。植物の E.R. に存在し、シトクロム b_5 を電子供給体とするグループ^{20),21)}と、葉緑体やシアノバクテリア細胞に存在し、フェレドキシンを電子供給体とするグループである^{18),22),23)}。これらのデサチュラーゼの特徴は、脂肪

酸の長い炭素鎖の中の特定の位置を正確に認識し、二重結合を導入することである。

この総説では、アシル脂質デサチュラーゼに関する最近の研究を紹介し、シアノバクテリアの低温耐性、および低温適応における、これらの酵素の重要性について記述する。また脂肪酸の不飽和化の性質、アシル脂質デサチュラーゼの特徴、および低温耐性の改変におけるデサチュラーゼの遺伝子操作についても言及する。

2 シアノバクテリアと高等植物における脂肪酸の不飽和化

シアノバクテリアは、膜脂質の脂肪酸の不飽和化の様式によって4つのグループに分類される (Fig.-2⁵⁾)。グループ1のシアノバクテリアは、飽和脂肪酸とモノ不飽和脂肪酸だけを持っている株である。グループ2,3,4に属するシアノバクテリアは、これらに加えて、多価不飽和脂肪酸を持ち、しかも C_{18} 脂肪酸と C_{16} 脂肪酸は、それぞれグリセリン骨格の $sn-1$ 位と $sn-2$ 位に結合している。グループ1に属する株 (*Synechococcus* PCC 7942 株 (*Anacystis nidulans* R2), *Mastigocladus laminosus* 等) では、不飽和結合は $\Delta 9$ 位だけ導入される^{5),24)}。グループ2の株 (*Synechococcus* PCC 7002 株, *Anabaena variabilis*, *Plectonema boryanum*, *Nostoc muscorum* 等) では、 $sn-1$ 位に結合している C_{18} の $\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$ ($\omega 3$) 位と、 $sn-2$ 位に

Acyl-CoA desaturase

Acyl-ACP desaturase

Acyl-lipid desaturase

In plants

In cyanobacteria

X represents a polar head group.

Fig.-1 The three types of fatty acid desaturase, with typical examples of desaturation reactions.

Black arrows, desaturation occurring in MGDG, SQDG and PG ; Shaded arrows, desaturation occurring only in MGDG. Numbers in parentheses indicate the position at which a double bond is introduced.

Fig.-2 The acyl-lipid desaturation of fatty acids in the four groups of cyanobacterial strains.

結合している C_{16} の $\Delta 9, \Delta 12$ 位に二重結合が導入される^{24), 25)}。グループ 3 に属する株 (*Synechocystis* PCC 6714 株, *Spirulina platensis* 等) でも, $sn-1$ 位の C_{18} に二重結合を 3 つ導入することができるが, その導入部位は $\Delta 6, \Delta 9, \Delta 12$ 位である⁵⁾。グループ 4 の株 (*Synechocystis* PCC 6803 株, *Tolypothrix tenuis* 等) では, $sn-1$ 位の C_{18} に二重結合を 4 つ [$\Delta 6, \Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$ ($\omega 3$) 位] 導入することができる^{5), 26)}。しか

し, グループ 1 と 2 において $sn-2$ 位で起こるモノ不飽和化と, グループ 3 と 4 において $sn-1$ 位で起こる $\Delta 6$ の不飽和化は, MGDG に限られており, SQDG と PG では起こらない。DGDG に結合した脂肪酸では不飽和化は起こらず, DGDG の分子種は MGDG の分子種のガラクトシル化によって合成されると推定されている²⁵⁾。これらの中でグループ 2 の不飽和化の様式が, 植物の葉緑体のものと最も類似している。

アシル脂質デサチュラーゼの二重結合導入部位に関する特異性については、さらに研究が行われた²⁷⁾。ここでは、シアノバクテリアが本来合成できない炭素数が奇数の脂肪酸 ($C_6H_{11}OOH$) を *Synechocystis* PCC 6803 株の培地に与えたところ、細胞内に取り込まれて、 C_{17} と C_{19} にまで鎖延長した。これらの膜脂質の脂肪酸は、 $17:4(6, 9, 12, 14)$, $19:4(6, 9, 12, 16)$ にまで不飽和化されていた。これらの結果は、二重結合の導入が炭素鎖の長さに関係なく、カルボキシ末端から数えて 6, 9, 12 番目の位置と、メチル末端から数えて 3 番目の位置で起こることを示唆している。これらの結果はまた、*Synechocystis* PCC 6803 株には $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ および $\omega 3$ の位置に特異的な種類のアシル脂質デサチュラーゼが存在することを示唆している。

真核植物細胞では、脂肪酸はプラスチドで生合成される^{28), 29)}。生合成の産物は $16:0$ -ACP であるが、その一部は $18:0$ -ACP に延長され、さらに $18:1(9)$ -ACP に不飽和化される^{17), 29)}。この $18:0$ の不飽和化はプラスチド内に存在する $\Delta 9$ アシル-ACP デサチュラーゼによって ACP 結合型で起こるが、それ以外の不飽和化反応はすべて、アシル脂質デサチュラーゼによって引き起こされる^{17), 30)}。PC と PE の $sn-1$, $sn-2$ 位に結合した $18:1(9)$ は、E.R. 上で $\Delta 12$, および $\omega 3$ デサチュラーゼによって $18:2(9, 12)$ に、次いで $18:3(9, 12, 15)$ に不飽和化される³¹⁾。PG の $sn-2$ 位に結合した $16:0$ は、プラスチド内で Δ^3 -トランス-ヘキサデカン酸になるが、この反応の性質はあまり研究されていない。MGDG の $sn-2$ 位に結合した $16:0$ は、プラスチド内で $16:1(7)$ から $16:2(7, 10)$ に、次いで $16:3(7, 10, 13)$ に不飽和化される³¹⁾。

3 アシル脂質デサチュラーゼのクローニング

3.1 シアノバクテリアのデサチュラーゼ

シアノバクテリアのデサチュラーゼはすべて、膜結合型のアシル脂質デサチュラーゼである。この酵素は従来の生化学的方法による精製が困難であったが、分子生物学的手法により、その性質を明らかにすることができた。すなわち、*Synechocystis* PCC 6803 株の野生型の細胞をエチルメタンスルホン酸 (EMS) で処理して突然変異を起こさせ、 $\Delta 12$ 位の不飽和化活性を欠損した突然変異体 (Fad12) を単離した²⁶⁾。この突然変異体細胞の増殖速度は、野生型と比較して 22°C ではかなり低いが、 34°C ではほとんど同じだった。

$\Delta 12$ デサチュラーゼの遺伝子 (*desA*) のクローニングは、Fad12 突然変異株の低温での増殖と脂肪酸の $\Delta 12$ 位の不飽和化に対する相補能力を指標として行った³²⁾。単離した *desA* 遺伝子は、351 個のアミノ酸残基をコードする 1053 bp のオープンリーディングフレー

ムを持っていた。さらに、*Synechocystis* PCC 6803 株の *desA* 遺伝子由来のプロンプを用いたヘテロハイブリッド法により、*Synechococcus* PCC 7002 株、*Synechocystis* PCC 6714 株および *Anabaena variabilis* から、類似の *desA* 遺伝子を分離した³³⁾。*Synechocystis* PCC 6803 株の *desA* 遺伝子のヌクレオチド配列から推定したアミノ酸配列は、*Synechocystis* PCC 6714 株のアミノ酸配列と類似しており、相同性は 96 % であった。しかし *Synechocystis* PCC 6803 株と、*Synechococcus* PCC 7002 株、*A. variabilis* との間では、それぞれ 57 %, 59 % しか保存されていなかった³³⁾。

アミノ酸配列の比較から、シアノバクテリアの $\Delta 12$ デサチュラーゼの場合、4 つの保存領域が存在し、特定の残基、特にヒスチジン残基がよく保存されていることが分かった。すべての $\Delta 12$ デサチュラーゼにおいて、15 個のヒスチジン残基が 4 つの保存領域内で見いだされた。高等植物からも $\Delta 12$ アシル脂質デサチュラーゼの cDNA と遺伝子が単離されているが^{34), 35)}、ここでもヒスチジン残基はよく保存されていることが確認されている。

$\Delta 9$ アシル脂質デサチュラーゼの遺伝子 (*desC*) は、*A. variabilis* の染色体中の *desA* 遺伝子の 5' 側上流の領域で見いだされた³⁶⁾。この遺伝子由来のプロンプで遺伝子ライブラリをスクリーニングして、*Synechocystis* PCC 6803 株の *desC* もクローニングした。*Synechocystis* PCC 6803 株と、*A. variabilis* の $\Delta 9$ アシル脂質デサチュラーゼのアミノ酸配列は、ラット³⁷⁾、マウス^{38), 39)}、および酵母菌⁴⁰⁾ の $\Delta 9$ アシル-CoA デサチュラーゼと、約 25 % の相同性を持っていることがわかった。

最近われわれは、*Synechocystis* PCC 6803 株の *desA* 由来のプロンプで同株の遺伝子ライブラリをスクリーニングすることにより、 $\omega 3$ アシル脂質デサチュラーゼの遺伝子 (*desB*) をクローニングした⁴¹⁾。この *desB* 遺伝子のヌクレオチド配列から推定された $\omega 3$ デサチュラーゼのアミノ酸配列⁴¹⁾は、高等植物の $\omega 3$ デサチュラーゼと類似しており^{42)~45)}、45~50 % の相同性を持つことがわかった。Reddy ら⁴⁶⁾は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼを欠く *Anabaena* PCC 7120 株を用いて、gain-of-function 法により、*Synechocystis* PCC 6803 株の $\Delta 6$ デサチュラーゼの遺伝子 (*desD*) をクローニングした。Table-1 に、これまでにシアノバクテリアからクローニングされたデサチュラーゼを示す。

Synechocystis PCC 6803 株からクローニングされたデサチュラーゼの中で、アミノ酸配列の保存度は $\Delta 12$, $\omega 3$ デサチュラーゼ間で最も高く (28 %), その他は 15 % 以下である。これら 4 つのデサチュラーゼのアミノ

Table-1 Cloned genes for cyanobacterial desaturases.

$\Delta 12$ Desaturase (<i>desA</i>)	Aminoacids	References
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	351	Wada <i>et al.</i> [32]
<i>Synechocystis</i> PCC 6714	349	Sakamoto <i>et al.</i> [33]
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	347	Sakamoto <i>et al.</i> [33]
<i>Anabaena variabilis</i>	350	Sakamoto <i>et al.</i> [33]
<i>Spirulina platensis</i>	351	Tasaka <i>et al.</i> [unpublished]
$\omega 3$ Desaturase (<i>desB</i>)		
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	359	Sakamoto <i>et al.</i> [41]
$\Delta 9$ Desaturase (<i>desC</i>)		
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	319	Sakamoto <i>et al.</i> [36]
<i>Anabaena variabilis</i>	272	Sakamoto <i>et al.</i> [36]
$\Delta 6$ Desaturase (<i>desD</i>)		
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	359	Reddy <i>et al.</i> [46]
<i>Spirulina platensis</i>	368	Tasaka <i>et al.</i> [unpublished]

酸配列のハイドロパシープロット (Fig.-3) は、これらのデサチュラーゼに膜貫通型領域と推定される2つの疎水性領域が存在することを示している。アミノ酸配列にはよく保存されている領域がいくつかあるが、特に3つのヒスチジンクラスター部分の保存度が高い。ヒスチジン残基は、デサチュラーゼの触媒中心と推測されている⁴⁷⁾鉄原子のリガンドである可能性が高い。

Synechocystis PCC 6803 株の $\Delta 12$ デサチュラーゼの性質をさらに詳しく調べるため、*desA* 遺伝子を発現ベクター pET-3a に挿入し、バクテリオファージ T7 の RNA ポリメラーゼのプロモーターの制御下で、大腸菌で過剰発現させた⁴⁸⁾。この形質転換株に培地から 18 : 1 (9) を供給すると、グリセロ脂質中に取り込まれ、18 : 2 (9, 12) に不飽和化された。この不飽和化反応は、*in vivo* での $\Delta 12$ のデサチュラーゼの活性とみなされる。また *desA* 遺伝子を過剰発現させた大腸菌細胞をフレンチプレスで処理して得たホモジネートでは、還元型フェレドキシンの存在下において 18 : 1 (9) から 18 : 2 (9, 12) への不飽和化反応が起こった。これは *in vitro* における $\Delta 12$ デサチュラーゼの活性の測定例である。

Site-directed mutagenesis (部位特異的突然変異) により、*Synechocystis* PCC 6803 株の $\Delta 12$ デサチュラーゼの保存ヒスチジン残基の重要性を調べる研究を行った⁴⁹⁾。5 個のヒスチジン残基、His90, His109, His129, His287 および His290 を、順次アルギニンで置き換えた。これらの突然変異は、発現タンパク質のレベルには影響を及ぼさなかったが、His109, His129, His287, および His290 の変異は、*in vivo* 条件下および *in vitro* 条件下において、デサチュラーゼを完全に不活性化化した。一方、His90 の変異によっては、*in vitro* における活性は完全に失われたが、*in vivo* での活性は完全には阻害されなかった。これらの結果は、His109, His129, His287 および His290 が、 $\Delta 12$ デサチュラー

ゼの活動にとって必須であることを示唆している。

Synechocystis PCC 6803 株と *A. variabilis* の *desC* 遺伝子を pET-3a に挿入し、T7 RNA ポリメラーゼのプロモーターの制御下で、大腸菌で過剰発現させた³⁶⁾。この形質転換株に、通常条件下では大腸菌にはわずかしかな存在しない 18 : 0 を与えた。外部から供給された 18 : 0 は、PG と PE のグリセリンの *sn*-1, *sn*-2 位両方に結合した。過剰発現させた $\Delta 9$ アシル脂質デサチュラーゼは、*sn*-1 位では 18 : 0 から 18 : 1 (9) への変換を行ったが、*sn*-2 位では 18 : 0 を不飽和化しなかった。また、この酵素は *sn*-1 位でも *sn*-2 位でも、16 : 0 を不飽和化しなかった。これらの結果は、*Synechocystis* PCC 6803 株と *A. variabilis* の $\Delta 9$ のアシル脂質デサチュラーゼが、18 : 0 と *sn*-1 位に対しては特異的であるが、頭部には非特異的であることを示唆している。

3.2 高等植物のアシル脂質デサチュラーゼ

高等植物のアシル脂質デサチュラーゼは、様々な植物からクローニングされている。Heinz ら⁵⁰⁾は、 $\Delta 12$ アシル脂質デサチュラーゼを葉緑体膜から可溶化し、イオン交換クロマトグラフィーおよびフェレドキシン親和性クロマトグラフィーによって精製した。この $\Delta 12$ デサチュラーゼのアミノ末端配列を決定し、これを用いて $\Delta 12$ デサチュラーゼの cDNA をホウレンソウ葉から単離した⁵¹⁾。ヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列は、*Synechocystis* PCC 6803 株の $\Delta 12$ デサチュラーゼのアミノ酸配列と類似していた。 $\Delta 12$ デサチュラーゼのリーダー配列は、65 個のアミノ酸を含み、セリンとセレオニン残基レベルが高いという、葉緑体トランジットペプチドの特徴を持っていた。

アシル脂質デサチュラーゼの遺伝子あるいは cDNA の単離の分子遺伝学的研究は、E.R. やプラスチドに存在する $\omega 3$ デサチュラーゼにおいても成功している。Someville のグループ⁴²⁾は、シロイヌナズナの E.R.

The window size for the calculations of hydropathy indices was 12 amino acid residues. (A) $\Delta 9$ desaturase, (B) $\Delta 12$ desaturase, (C) $\omega 3$ desaturase (D) $\Delta 6$ desaturase. Histidine residues in conserved clusters are indicated by H and shaded circle.

Fig.-3 Hydropathy profiles and conserved histidine clusters of the acyl-lipid desaturases of *Synechocystis* sp. PCC 6803.

上の $\omega 3$ デサチュラーゼの遺伝子を含むYACクローンを、染色体歩行によって単離した。このクローン由来のプロンプを用いて、ナタネのcDNAライブラリをスクリーニングし、ナタネのE.R.の $\omega 3$ デサチュラーゼのcDNAを単離した。E.R.上での脂肪酸の $\omega 3$ 位の不飽和化に欠陥を持つシロイヌナズナの突然変異体は、この単離cDNAの導入によって、通常の変現型を回復し

た⁴²⁾。

Yamamoto ら⁵²⁾は、ヤエナリにおいて数種類のオーキシシンで誘導される遺伝子のcDNAを単離し、そのうちの1つが、E.R.上の $\omega 3$ デサチュラーゼのcDNAであることを発見した。Yadav ら⁴⁴⁾は、T-DNAタギング法⁵³⁾により、シロイヌナズナのE.R.の $\omega 3$ デサチュラーゼの遺伝子を単離した。彼らはシロイヌナズ

ナ、ダイズおよびナタネの E.R. とプラスチドに存在する $\omega 3$ デサチュラーゼのホモログの cDNA も単離している。Iba ら⁴³⁾は、シロイヌナズナのプラスチド内の $\omega 3$ デサチュラーゼの遺伝子を単離した。さらに、E.R. での $\Delta 12$ デサチュラーゼをコード化する cDNA もシロイヌナズナから単離されている³⁵⁾。プラスチド内の $\Delta 12$ デサチュラーゼの cDNA も、シロイヌナズナ、ダイズおよびナタネから単離されている³⁴⁾。シロイヌナズナの cDNA を用いてシアノバクテリア *Synechococcus* PCC 7942 株を形質転換すると、脂肪酸の $\Delta 12$ 位に二重結合を導入できるようになった³⁴⁾。高等植物からは、様々なアシル脂質デサチュラーゼの遺伝子と cDNA が単離されているが、PG の *sn-2* 位に結合する 16:0 の $\Delta 3$ 位にトランス型で二重結合を導入するデサチュラーゼと、MGDG の *sn-2* 位に結合する 16:0 の $\Delta 7$ ($\omega 9$) 位にシス型の二重結合を導入するデサチュラーゼについては、遺伝子も cDNA もまだ単離されていない。

3.3 その他のデサチュラーゼ

$\Delta 9$ アシル ACP-デサチュラーゼは、高等植物細胞のプラスチドのストロマ中に存在する。ペニバナの成熟種子から精製されたこの酵素は、68 kDa のホモダイマーであることが明らかにされている¹⁶⁾。アボガド⁵⁴⁾とペニバナ種子の発育中のはい(胚)⁵⁵⁾からは、完全に精製されている。ステアロイル-ACP デサチュラーゼをコードする cDNA は、ヒマ^{54), 56)}、ペニバナ種子⁵⁵⁾、キュウリ⁵⁷⁾、ホウレンソウ⁵⁸⁾、ダイコン⁵⁹⁾およびナタネ⁶⁰⁾から単離された。ペトロセリン酸の生合成に必要な 16:0-ACP デサチュラーゼをコードする cDNA は、コリアンダーから単離されている^{61), 62)}。このデサチュラーゼは ACP に結合した 16:0 の $\Delta 4$ 位に二重結合を導入する⁶²⁾。Fox ら⁶³⁾は、ヒマのステアロイル-ACP デサチュラーゼの cDNA を大腸菌で過剰発現させ、この活性ホモダイマー酵素が 4 個の鉄原子を含むことを明らかにした。

$\Delta 9$ アシル-CoA デサチュラーゼ (18:0-CoA デサチュラーゼ) は、動物や酵母細胞の E.R. に存在する。ラットの肝臓のミクロソームから精製された酵素は、41.4 kDa の単一ポリペプチドで、非ヘム鉄 1 原子を含む^{37), 47)}。ラットを飢餓状態にさせた後、無脂肪の餌で飼育すると、18:0-CoA デサチュラーゼの mRNA のレベルが 50 倍に増加することが観察されている⁶⁴⁾。Thiede と Strittmatter⁶⁴⁾は、この無脂肪飼育の前後での肝臓細胞から抽出した mRNA でディファレンシャルハイブリダイゼーションを行って、この酵素の cDNA を単離した。ステアロイル-CoA デサチュラーゼの遺伝子と cDNA も、ラット⁶⁵⁾、マウス^{38), 39)}、牛⁶⁶⁾、および酵母⁴⁰⁾から単離された。 $\Delta 5$, $\Delta 6$ アシル

-CoA デサチュラーゼの活性は、動物細胞で測定されているが、その遺伝子も cDNA もまだ単離されていない。

4 デサチュラーゼの遺伝子操作と低温耐性の制御

4.1 デサチュラーゼ遺伝子の破壊

desA 遺伝子と *desB* 遺伝子を挿入破壊⁶⁷⁾することにより、*Synechocystis* PCC 6803 株の脂質の不飽和結合数を人工的に調節することが可能になった^{32), 41), 68)}。Fig.-4 A に、*Synechocystis* PCC 6803 株の *Fad6* 突然変異体 (*desD* が欠損) と、これに Km^r カートリッジを挿入してさらに *desA* 遺伝子を破壊した形質転換体 (*Fad6/desA* :: Km^r) おける、脂質の分子種成分の変化を示した。この結果は、膜脂質の脂肪酸の不飽和結合数を、デサチュラーゼの遺伝子を操作することによって段階的に減少させることができることを示唆している。

遺伝子操作された *Synechocystis* PCC 6803 株を用いて、膜脂質の脂肪酸の不飽和化の、成長や低温耐性などの生理学的性質に対する影響を調べた^{68), 69)~71)}。34 °C では、野生型、*Fad6* 突然変異体、*Fad6/desA* :: Km^r 形質転換体の間で、増殖速度に顕著な差異はなかった。しかし 22 °C では、*Fad6/desA* :: Km^r 細胞の増殖速度は、野生型細胞と *Fad6* 細胞に比較して非常に低かった。この結果は、脂肪酸の $\Delta 12$ 位の不飽和化の欠損が、低温での *Synechocystis* PCC 6803 株の増殖に有害な影響を与えることを示唆している。

同じ温度で生育された *Fad6/desA* :: Km^r と野生型とを比較することにより、低温耐性における脂肪酸の不飽和化の影響について研究した。低温で細胞を強光照射すると、光合成は顕著に阻害された^{68), 70), 71)}。*Fad6/desA* :: Km^r 細胞は、飽和またはモノ不飽和脂質だけを含んでおり、光合成の低温での強光阻害に対して最も感受性が高かった。それに対して、*Fad6* と野生型の細胞は、強光阻害に対して耐性であった。これらの結果は、脂肪酸の $\Delta 12$ 位の二重結合が、低温での強光阻害に対する保護効果を持っていることを示唆している。室温での強光阻害も、低温ほどではないが、脂肪酸の不飽和化によって抑制される^{70), 71)}。これとは異なり、光合成の電子伝達は、どの温度でも膜脂質の不飽和度の影響を受けなかった⁷⁰⁾。これらの結果は、低温での増殖と光合成の強光阻害に対する耐性において、脂肪酸の第 2 番目の二重結合が重要であることを示唆している。

生体内における光合成の強光阻害の程度は、光誘起の不活性化過程と不活性化状態からの回復過程とのバランスによって決まる。そこで、それぞれの過程への膜脂質の不飽和化の影響を調べた⁷¹⁾。単離されたチラコイド膜、およびクロラムフェニコール (タンパク質合成の

阻害剤)を与えた細胞では、回復過程はブロックされ、不飽和化過程だけを調べることができる。このような条件下では、膜脂質の不飽和化は不活性化過程に影響を及ぼさなかった。一方、回復過程が不活性化過程から分離されている実験条件下では、膜脂質の不飽和化は顕著に回復を促進した。したがって、*in vivo*における光合成の強光阻害が見かけ上低温で増加するのは、回復速度が低温で顕著に低下することによって考えられる⁷¹⁾。現在の仮説^{72),73)}によれば、強光阻害は D1 タンパク(光化学反応中心のタンパク質の一種⁷⁴⁾)の損傷によって引き起こされ、それに続いて、不活性化した D1 タンパクが分解、除去される。次に、D1 タンパクの前駆体が新たに合成されて、光化学系 2 複合体(PS II)に組み込まれ、プロセッシングを受けて活性 D1 タンパクになる。その結果、PS II の活性も回復する。D1 タンパクの光誘起損傷は、強光阻害における不活性化過程と見なされるので、おそらく膜脂質の不飽和化には影響されな

い。したがって、これに続く過程の 1 つが、膜脂質の不飽和化によって加速されと考えられる。

低温耐性の変化が膜脂質の不飽和化の程度によって決まるのに対して、光合成の高温耐性は、膜脂質の不飽和化の影響はほとんど受けない^{75),76)}。高温安定性と膜脂質の飽和化は共に、生育温度が高いほど増加するので、以前は膜脂質の不飽和化が高温耐性を低下させると考えられていた^{77),78)}。われわれのデサチュラーゼ遺伝子の操作による研究により、そのような相関はないことが明らかになった。最近われわれは、生育温度による高温耐性の変化がタンパク質因子によって引き起こされることを見いだした^{79),80)}。

4・2 デサチュラーゼ遺伝子の導入

グリセロ膜脂質の不飽和化を遺伝子操作によって改変するもう一つの方法として、デサチュラーゼ遺伝子の導入法がある。ここでは、 $\Delta 9$ デサチュラーゼを持つが、 $\Delta 6, \Delta 12$ および $\omega 3$ 位の不飽和化を全く欠損した *Syne-*

(A) *Synechocystis* sp. PCC 6803

(B) *Synechococcus* sp. PCC 7942

(A) Mutagen-induced and insertional mutations in genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. WT, Wild type; Fad6, the mutant with a mutation in the *desD* gene; Fad6/*desA* :: Km^r, the double mutant in which the *desA* gene was disrupted by a Km^r cartridge in the Fad6 mutant. Cells were grown at 34°C. Based on results of Wada *et al.*⁶⁸⁾. (B) Introduction of the *desA* gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803 into *Synechococcus* sp. PCC 7942. WT, Wild type; T-*desA*, the transformant produced by introduction of the *desA* gene on the shuttle vector pUC303. Cells were grown at 22°C. Based on results of Wada *et al.*⁷⁶⁾.

Fig.-4 Changes in molecular species composition after manipulation of genes for desaturase in cyanobacteria.

chococcus PCC 7942 株 (グループ 1 に属するシアノバクテリア⁵⁾) を用いる。このシアノバクテリアの細胞に *desA* 遺伝子を導入した形質転換株は、 $\Delta 12$ 位の不飽和化能を獲得していた (Fig.-4 B^{32),33),41)})。この $\Delta 12$ 位への二重結合の導入の低温耐性への影響を調べるために、*Synechococcus* PCC 7942 株の野生型細胞と形質転換細胞とを比較した^{32),76)}とて、野生型細胞 (およびベクタープラスミドだけで形質転換された細胞) を 5℃ に 60 min さらした場合、光合成活性は 50 % 以下に低下した。一方、*desA* 遺伝子で形質転換した細胞の光合成活性は、同じ条件下でほとんど低下しなかった³²⁾。以上の結果は、*Synechococcus* PCC 7942 株の低温耐性が、 $\Delta 12$ 位の第 2 番目の不飽和結合を導入することによって著しく向上したことを示している。

われわれは、野生型と形質転換された細胞における、高温耐性と光合成活性を比較したが、膜脂質の不飽和化は、これらに何の変化ももたらさないことがわかった。形質転換による *Synechococcus* 7942 株の膜脂質の不飽和化の増加によって得られた結果は、遺伝子の挿入破壊による *Synechocystis* 6803 株の膜脂質の不飽和化の減少によって得られた結果を補完するものであった。

5 結論と展望

1) 脂肪酸の $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\omega 3$ 位に二重結合を導入するアシル脂質デサチュラーゼのすべての遺伝子を、シアノバクテリアからクローニングした。これらの遺伝子を、*Synechosystis* PCC 6803 株において破壊したり、*Synechococcus* PCC 7942 株へ導入したりすることによって、膜脂質の脂肪酸の二重結合を人工的に操作できるようになった。

2) 膜脂質の不飽和化は、低温耐性において重要な役割を担っていることが明らかになった。シアノバクテリアの低温耐性能は、膜脂質の脂肪酸の不飽和化を遺伝子操作によって改変することになり、変化させることができるようになった。

3) 脂肪酸の不飽和化の生化学的および生物物理学的過程をより深く理解するためには、X線解析とタンパク質工学によってデサチュラーゼの構造を研究することが必要である。

4) この総説で述べたデサチュラーゼ遺伝子の不活性化と導入の方法は、将来の膜構造の生物物理学的研究においても有効であると思われる。

(平成 7 年 (1995 年) 5 月 15 日受理)

文 献

- 1) R.Y. Stanier, G. Cohen-Bazire, *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 225 (1977)
- 2) T. Omata, N. Murata, *Plant Cell Physiol.*, **24**,

- 1101 (1983)
- 3) M.A. Block, A.-J. Dorne, J. Joyard, R. Douce, *J. Biol. Chem.*, **258**, 13281 (1983)
- 4) J. Joyard, M.A. Block, R. Douce, *Eur. J. Biochem.*, **199**, 489 (1991)
- 5) N. Murata, H. Wada, Z. Gombos, *Plant Cell Physiol.*, **33**, 933 (1992)
- 6) N. Murata, I. Nishida, "the Biochemistry of Plants", Academic Press, Orlando FL, vol. 9, (1987) p. 315
- 7) M.F. Doyle, C.-A. Yu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 700 (1985)
- 8) D. Chapman, *Quart. Rev. Biophys.*, **8**, 185 (1975)
- 9) P.J. Quinn, F. Joo, L. Vigh, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **53**, 71 (1989)
- 10) J.R. Silvius, "Lipid Protein Interactions", Wiley, vol. 2, New York NY, (1982) p. 239
- 11) A.R. Cossins, "Temperature Adaptation of Biological Membranes", Portland Press, London, Proceedings, (1994) p. 63
- 12) P. Cooper, D.R. Ort, *Plant Physiol.*, **88**, 454 (1988)
- 13) C.L. Guy, K.J. Niemi, R. Brambl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3673 (1985)
- 14) S.S. Mohapatra, R.J. Poole, R.S. Dhindsa, *Plant Physiol.*, **84**, 1172 (1987)
- 15) P.W. Holloway, "The Enzymes", vol. XVI, Academic Press, Orlando FL, (1983) p. 63
- 16) T.A. McKeon, P.K. Stumpf, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12141 (1982)
- 17) J.G. Jaworski, "the Biochemistry of Plants", Academic Press, Orlando FL, vol. 9, (1987) p. 159
- 18) H. Wada, H. Schmidt, E. Heinz, N. Murata, *J. Bacteriol.*, **175**, 544 (1993)
- 19) N. Sato, Y. Seyama, N. Murata, *Plant Cell Physiology*, **27**, 819 (1986)
- 20) E.V. Kearns, S. Hugly, C.R. Somerville, *Arch. Biochem. Biophys.*, **284**, 431 (1991)
- 21) M.A. Smith, A.R. Cross, O.T.G. Jones, W.T. Griffiths, S. Stymne, K. Stobart, *Biochem. J.*, **272**, 23 (1991)
- 22) H. Schmidt, E. Heinz, *Plant Physiol.*, **94**, 214 (1990)
- 23) H. Schmidt, E. Heinz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9477 (1990)
- 24) N. Sato, N. Murata, Y. Miura, N. Ueta, *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 19 (1979)
- 25) N. Sato, N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta*, **710**, 279 (1982)
- 26) H. Wada, N. Murata, *Plant Cell Physiol.*, **30**, 971 (1989)
- 27) S. Higashi, N. Murata, *Plant Physiol.*, **102**, 1275 (1993)
- 28) P.K. Stumpf, "the Biochemistry of Plants", Academic Press, New York NY, vol. 4, (1980) p. 177
- 29) P.K. Stumpf, "the Biochemistry of Plants", Academic Press, Orlando FL, vol. 9, (1987) p. 121
- 30) J.L. Harwood, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 101 (1988)
- 31) C. Somerville, J. Browse, *Science*, **252**, 80 (1991)
- 32) H. Wada, Z. Gombos, N. Murata, *Nature*, **347**, 200

- (1991)
- 33) T. Sakamoto, H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori, N. Murata, *Plant Mol. Biol.*, **24**, 643 (1994)
 - 34) W.D. Hitz, T.J. Carlson, J.R. Booth Jr., A.J. Kinney, K.L. Stecca, N.S. Yadav, *Plant Physiol.*, **105**, 635 (1994)
 - 35) J. Okuley, J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark, J. Browse, *Plant Cell*, **6**, 147 (1994)
 - 36) T. Sakamoto, H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori, N. Murata, *J. Biol. Chem.*, **269**, 25576 (1994)
 - 37) M.A. Thiede, J. Ozols, P. Strittmatter, *J. Boil. Chem.*, **261**, 13230 (1986)
 - 38) K. Kaestner, J.M. Ntambi, T.J. Kelly Jr., M. D. Lane, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14755 (1989)
 - 39) J.M. Ntambi, S.A. Buhrow, K.H. Kaestner, R.J. Christy, E. Sibley, T. J. Kelly Jr., M.D. Lane, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17291 (1988)
 - 40) J.E. Stuke, V.M. McDonough, C.E. Martin, *J. Biol. Chem.*, **265**, 20144 (1990)
 - 41) T. Sakamoto, D.A. Los, S. Higashi, H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori, N. Murata, *Plant Mol. Biol.*, **26**, 249 (1994)
 - 42) V. Arondel, B. Lemieux, I. Hwang, S. Gibson, H. M. Goodman, C. R. Somerville, *Science*, **258**, 1353 (1992)
 - 43) K. Iba, S. Gibson, T. Nishiuchi, T. Fuse, M. Nishimura, V. Arondel, S. Hugley, C. Somerville, *J. Biol. Chem.*, **268**, 24099 (1993)
 - 44) N.S. Yadav, A. Wierzbicki, M. Aegerter, C. S. Caster, L. Perez-Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz, R. Booth Jr., B. Schweiger, K.L. Stecca, S. M. Allen, M. Blackwell, R.S. Reiter, T.J. Carlson, S. H. Russell, K.A. Feldmann, J. Pierce, J. Browse, *Plant Physiol.*, **103**, 467 (1993)
 - 45) K.T. Yamamoto, *Planta*, **192**, 359 (1994)
 - 46) A.S. Reddy, M.L. Nuccio, L.M. Gross, T.L. Thomas, *Plant Mol. Biol.*, **27**, 293 (1993)
 - 47) P. Strittmatter, L. Spatz, D. Corcoran, M.J. Rogers, B. Setlow, R. Redline, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4565 (1974)
 - 48) H. Wada, M.-H. Macherel, N. Murata, *J. Bacteriol.*, **175**, 6056 (1993)
 - 49) M.-H. Macherel, D. Macherel, H. Wada, N. Murata, *FEBS Lett.*, **361**, 111 (1995)
 - 50) H. Schmidt, E. Heinz, *Biochem. J.*, **289**, 777 (1993)
 - 51) H. Schmidt, P. Sperling, E. Heinz, "Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants", American Society for Plant Physiologists, Rockville MD, (1993) p. 40
 - 52) K.T. Yamamoto, H. Mori, H. Imaseki, *Plant Cell Physiol.*, **33**, 13 (1992)
 - 53) K.A. Feldmann, *Plant J.*, **1**, 71 (1991)
 - 54) J. Shanklin, C. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 2510 (1991)
 - 55) G.A. Thompson, D.E. Scherer, S.F.-V. Aken, J. W. Kenny, H.L. Young, D.K. Shintani, J.C. Kridl, V.C. Knauf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 2578 (1991)
 - 56) D.S. Knutzon, D.E. Scherer, W.E. Schreckengost, *Plant Physiol.*, **96**, 344 (1991)
 - 57) J. Shanklin, C. Mullins, C. Somerville, *Plant Physiol.*, **97**, 467 (1991)
 - 58) I. Nishida, T. Beppu, T. Matsuo, N. Murata, *Plant Mol. Biol.*, **19**, 711 (1992)
 - 59) D.S. Knutzon, G.A. Thompson, S.E. Radke, W. B. Johnson, V.C. Knauf, J.C. Kridl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2624 (1992)
 - 60) S.P. Slocumbe, I. Cummins, R.P. Jarvis, D.J. Murphy, *Plant Mol. Biol.*, **20**, 151 (1992)
 - 61) E.B. Cahoon, J. Shanklin, J.B. Ohlrogge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11184 (1992)
 - 62) E.B. Cahoon, J.B. Ohlrogge, *Plant Physiol.*, **104**, 827 (1994)
 - 63) B.G. Fox, J. Shanklin, C. Somerville, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2486 (1993)
 - 64) M.A. Thiede, P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14459 (1985)
 - 65) K. Mihara, *J. Biochem.*, **108**, 1022 (1990)
 - 66) A. Cooney, D.R. Headon, *Biochem. Soc., Trans.*, **17**, 382 (1989)
 - 67) J.G.K. Williams, *Meth. Enzymol.*, **167**, 766 (1988)
 - 68) H. Wada, Z. Gombos, T. Sakamoto, N. Murata, *Plant Cell Physiol.*, **33**, 535 (1992)
 - 69) Z. Gombos, H. Wada, N. Murata, *Plant Cell Physiol.*, **32**, 205 (1991)
 - 70) Z. Gombos, H. Wada, N. Murata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9959 (1992)
 - 71) Z. Gombos, H. Wada, N. Murata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8787 (1994)
 - 72) E.-M. Aro, T. Hundal, I. Carlberg, B. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**, 269 (1990)
 - 73) E.-M. Aro, I. Virgin, B. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 113 (1993)
 - 74) O. Nanba, K. Satoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 109 (1987)
 - 75) Z. Gombos, H. Wada, E. Hideg, N. Murata, *Plant Physiol.*, **104**, 563 (1994)
 - 76) H. Wada, Z. Gombos, N. Murata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 4273 (1994)
 - 77) R.W. Pearcy, *Plant Physiol.*, **61**, 484 (1978)
 - 78) J.K. Raison, J.K.M. Roberts, J.A. Berry, *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 218 (1982)
 - 79) Y. Nishiyama, E. Kovács, C.B. Lee, H. Hayashi, T. Watanabe, N. Murata, *Plant Cell Physiol.*, **34**, 337 (1993)
 - 80) Y. Nishiyama, H. Hayashi, T. Watanabe, N. Murata, *Plant Physiol.*, **105**, 1313 (1994)