

博士学位論文

光合成微生物における

トリアシルグリセロール関連化合物合成能と生理学的意義

東京薬科大学大学院生命学科生命科学専攻

平井一帆

2017 年 3 月

目次

序論	1
----	---

材料と方法	8
-------	---

第一章

緑藻*Chlorella kessleri*における、
高浸透圧あるいは栄養欠乏とその複合ストレスによるTG蓄積

緒言	23
結果	25
考察	29

第二章

シアノバクテリアにおけるTGの検討と合成酵素

緒言	44
結果	45
考察	53

参考文献	88
------	----

Triacylglycerol(TG; Fig. 0-1e)は全ての真核生物と一部の原核生物で産生されると言われている(Athenstaedt and Daum, 2006; Alvarez and Steinbuchel, 2002)。真核生物において、TG 合成に関与する酵素はいくつか知られており、acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT)として DGAT1 および DGAT2 や、phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT)が挙げられる。DGAT は、acyl-CoA の acyl 基を DG に転移する活性を示す(Fig. 0-2a; Liu *et al.*, 2012; Shi and Cheng, 2009)。主要なものとして、膜結合 O-acyltransferase のスーパーファミリーに属する DGAT1 と、monoacylglycerol acyltransferase や wax alcohol acyltransferase と近縁な DGAT2 の異なる型のものがあり、両者は各々独自に獲得されたと結論づけられている(Holmes, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011)。TG 合成に acyl-CoA を用いない酵素として PDAT が知られている。PDAT はリン脂質からのアシル基を DG に転移する酵素として報告された(Fig. 0-2b; Dahlqvist *et al.*, 2000)。*Chlamydomonas reinhardtii* においては、PDAT がガラクト脂質をアシルドナーとして、または2分子の DG から TG を合成し、更に TG、リン脂質、糖脂質およびコレステロールエステルを基質としてアシル基加水分解活性を示すことが報告されている(Yoon *et al.*, 2012)。原核生物において報告された TG 合成酵素の型は1つのみで、2機能性の酵素である wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase(WS/DGAT)によって触媒される(Fig. 0-2c; Stöveken *et al.*, 2005; Wältermann *et al.*, 2005; Röttig and Steinbüchel, 2013)。

TG は β 酸化の基質となる脂肪酸を含み、従来、炭素やエネルギーの貯蔵物質と捉えられてきた。植物における TG 蓄積の律速酵素は DGAT であり、*Arabidopsis* における DGAT の過剰発現は種子の TG 含有量を増加させたと報告された (Ichihara *et al.*, 1988; Perry and Harwood, 1993; Jako *et al.*, 2001)。種子植物の種に蓄積された TG からは、発芽の際に構成脂肪酸が β 酸化によるエネルギー源、あるいは糖新生のための炭素源として動員される(Quettier and Eastmond, 2009; Murphy, 2005)。藻類においては、窒素源または硫黄源の欠乏等の環境ストレス条件下、細胞質に脂肪滴として蓄積することが広く知られている(Boyle *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2012; Cakmak *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009)。藻類は TG 合成によりストレスを軽減するため、あるいはストレスからの解放後の生育に備えて、貯蔵化合物として TG を生産する。TG は単なる貯蔵物質として生産されるだけでなく、その合成過程にも生理学的意義を見出させる。藻類における TG の蓄積は、余剰なエネルギーや還元力を脂肪酸の合成により消費することで、細胞のレドックスバランスを適度に保つ、ひいては活性酸素の発生を抑制する役目も担う(Mock and Kroon, 2002)。monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)から脂肪酸を遊離する酵素 galactoglycerolipid lipase を欠損した *C. reinhardtii* の変異株では、窒素欠乏時の TG 合成量が低下し、消費しきれない還元力により活性酸素が過剰に産生

されるため、窒素欠乏条件の感受性が強くなったと報告されている(Li *et al.*, 2012)。

TG は細胞膜構造の恒常性の維持において役割を果たすともされている。Arabidopsis の葉緑体において、極性脂質のうち、非二重層脂質である MGDG は、耐凍性獲得の際、膜構造維持のために分解される。その際生成する DG もまた膜構造を乱し得るので、TG 合成系に入り膜から隔離される(Moellering *et al.*, 2010)。また、紅藻 *Porphyridium cruentum* や緑藻 *Parietochloris incisa* では窒素欠乏下、多価不飽和脂肪酸を含む TG を蓄積し、窒素源を得た際には脂肪滴の消失と葉緑体膜脂質の再生が行われる。TG に含まれる多価不飽和脂肪酸は低温環境で速やかに膜脂質の不飽和度を高めるため役立つと言う(Cohen *et al.*, 2000; Khozin-Goldberg *et al.*, 2005)。珪藻 *Thalassiosira pseudonana* の DGAT2 は、多価不飽和脂肪酸に高い基質特異性を持つことが知られている(Xu *et al.*, 2013)。脂質は細胞にとって毒ともなりえる。特に、多価不飽和脂肪酸は膜の流動性を高めるが、飽和脂肪酸に比べて活性酸素種の影響を受けやすい。脂質過酸化反応は連鎖的に起こり、膜へ重大なダメージを及ぼす(Porter, 1986)。外因性の不飽和脂肪酸が過酸化脂質蓄積の増加を引き起こすことはシアノバクテリアや酵母で示されており(Sakamoto *et al.*, 1998; Do *et al.*, 1996)、酵母の TG 合成系欠損変異株は野生株に比べて不飽和脂肪酸への感受性が高く、TG 合成系が脂肪酸による毒性の緩衝剤としての役割を担っていると報告された(Petschnigg *et al.*, 2009)。極性脂質の代謝を支える中間代謝産物としての TG の役割も見出だされており、酵母では TG 代謝がリン脂質代謝に貢献することが知られている(Rajakumari *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2012)。また哺乳類の表皮においては、アシルセラミドの合成に TG の加水分解に由来する脂肪酸が特異的に用いられる(Radner and Fischer, 2013)。TG の利用の様々な生理学的意義は解明の途上にあり、また生物による TG 生産の工業的利用の拡大も検討されている。特に光合成生物においてエネルギー代謝、炭素代謝、脂質の恒常性を理解する上で、TG に関わる生理的機構の知見を深めることは重要である。

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う真正細菌の一群である。ペプチドグリカンと脂質を含む外膜を有するグラム陰性細菌であるが、分子系統解析により、放線菌などのグラム陽性菌、あるいは *Deinococcus-Thermus* や *Chloroflexales* と共にテッラバクテリアという大きな系統群を形成するとも言われる(Battistuzzi and Hedges, 2009; Rinke *et al.*, 2013)。シアノバクテリアは淡水や海洋に生息するものが多いが、様々な環境に適応し、土壌、温泉、岩などへの付着、動植物や地衣類との共生など、地球上に幅広く分布する。光合成能により環境中の一次生産に大きく寄与し、中には窒素固定を行う種もあり、生態系において重要な地位を占めている。シアノバクテリアの分布や、環境中どのように適応し生息しているかを調べる意義は大きい。

光合成生物の研究において、シアノバクテリアは葉緑体のモデル生物として用いられる。特に単細胞性で窒素固定能を持たないシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803(以下、PCC 6803)は全ゲノムの塩基配列が決定されており、遺伝子改変も容易であることから頻用される。16S rRNA 配列に基づく系統解析などから、葉緑体の起源は細胞内共生をしたシアノバクテリアであるとされ(Turner *et al.*, 1999)、光合成に関する生化学反応や複合体、膜構造などに共通性が見られる。シアノバクテリアの極性脂質は主に、3 種のグリセロ糖脂質、即ち MGDG、digalactosyl diacylglycerol (DGDG)、sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)と唯一のリン脂質 phosphatidylglycerol (PG)から構成される(Fig. 0-1a-d; Stanier and Cohen-Bazire, 1977; Sato and Wada, 2009)。SQDG を欠き、チラコイド膜を持たない *Gloeobacter* を唯一の例外として(Selstam and Campbell, 1996)、これら 4 種のグリセロ脂質は全ての酸素発生型光合成生物に共通しており、チラコイド膜を構築し、光合成の場としてその機能の発現に貢献している(Gounaris *et al.*, 1986)。チラコイド膜には光合成を担う膜タンパク質が多く存在し、膜の恒常性の維持は重要である。例えば、PCC 6803 において、SQDG は光化学系 II が十分な活性を示す上で必要であり、PG は光化学系 I 複合体の構築やその高次構造の維持のためには欠かせない(Sato, 2004; Sato *et al.*, 2000)。シアノバクテリアにおいて、極性脂質の合成経路や関与する遺伝子も調べられている。

一方、シアノバクテリアの中性脂質としては、極性脂質合成の中間代謝産物あるいは分解産物である free fatty acid(FFA), monoacylglycerol(MG), diacylglycerol(DG)の他に、種によってはエネルギーや炭素の貯蔵物質として alkane や polyhydroxybutyrate(PHB; Fig. 0-1f) の存在が知られ、また TG の検出の報告もある(Taranto *et al.*, 1993; Ramadan *et al.*, 2008; Peramuna and Summers, 2014)。alkane, PHB, TG 等の中性脂質は、高度に疎水性のため浸透圧に影響せず、高エネルギー化合物として貯蔵に適する。

alkane は、*Synechococcus* sp. PCC 7002(以下、PCC 7002)では産生されないが、*Gloeobacter*, *Prochlorococcus*, *Synechocystis* など系統上の所属するクレード(第二章 Fig. II-14 の 16s rRNA 系統樹参照)によらず多くのシアノバクテリアで貯蔵される。alkane 合成系として、acyl-ACP を NADPH によってアルデヒドに還元する acyl-ACP reductase (PCC 6803 における遺伝子は *sll0209*)および、得られたアルデヒドを脱カルボニル化し alkane を生成する aldehyde decarbonylase (同 *sll0208*)がゲノム解析によって見出だされている(Schirmer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013)。

バイオプラスチックの原料としても注目されている PHB は β -hydroxybutyrate のポリエステルであり、数種のシアノバクテリアで蓄積が確認されている(Hauf *et al.*, 2013; Ariño *et al.*, 1995; Panda *et al.*, 2005)。PCC 6803 では、窒素やリン酸の欠乏、酢酸の添加、あるいは強い光の下で、PHB を含む脂肪滴様の顆粒が蓄積される(Wu *et al.*, 2001)。PHB は acetyl-CoA を出発物質として 3 段階の反応を経て合成される。PCC 6803 において、PHB 合成に関わる酵素(遺伝子)として、 β -ketothiolase; PhaA (*slr1993*), acetoacetyl-

CoA reductase; PhaB (*slr1994*), および PhaE (*slr1829*)と PhaC (*slr1830*)のヘテロ二量体により構成される PHB synthase が知られている。PhaA は 2 分子の acetyl-CoA から acetoacetyl-CoA を合成し、次いで PhaB が NADPH を用いて acetoacetyl-CoA を hydroxybutyryl-CoA に還元する。最後に PhaE と PhaC によって hydroxybutyryl-CoA が PHB に重合される。蓄積された PHB は、ストレスから解放されたとき PHB depolymerase によって分解され、生育の為に炭素源やエネルギー源として利用されることが考えられる。窒素欠乏時、PCC 6803 では、エネルギーと炭素の貯蔵物質としてグリコーゲンを蓄積すると同時に、解糖系遺伝子群が活性化し、ピルビン酸、アセチル CoA を経て、PHB を蓄積する。また、同じくアセチル CoA を入り口とする TCA サイクルにより産生される有機酸の量も大きく増加する(Osanai *et al.*, 2014)。このように複数の炭素化合物を合成することで、ストレス下での炭素源やエネルギーの制御を柔軟に行っていると考えられる。また PHB は炭素やエネルギーの貯蔵物質として合成されるとともに、細胞内のレドックスバランスの変化も PHB 合成の要因となると考えられる。窒素欠乏下、同時に光化学系 II の阻害剤である DCMU を添加すると NADPH/NADP⁺比の減少とともに PHB 合成活性が低下し、ATP 合成を抑制する CCCP や DCCD を添加した場合には逆に NADPH/NADP⁺比の増加とともに PHB 合成活性は高くなる(Hauf *et al.*, 2013)。

申請者は、光合成生物における TG や PHB などの中性脂質代謝に関心を置き、その蓄積機構や生理的役割の更なる追求を目的として研究を行ってきた。第一章では緑藻 *Chlorella kessleri* における TG 蓄積、第二章ではシアノバクテリアにおける中性脂質の検討と、その代謝系遺伝子および生理的意義の解明を目的とした研究の成果を報告する。

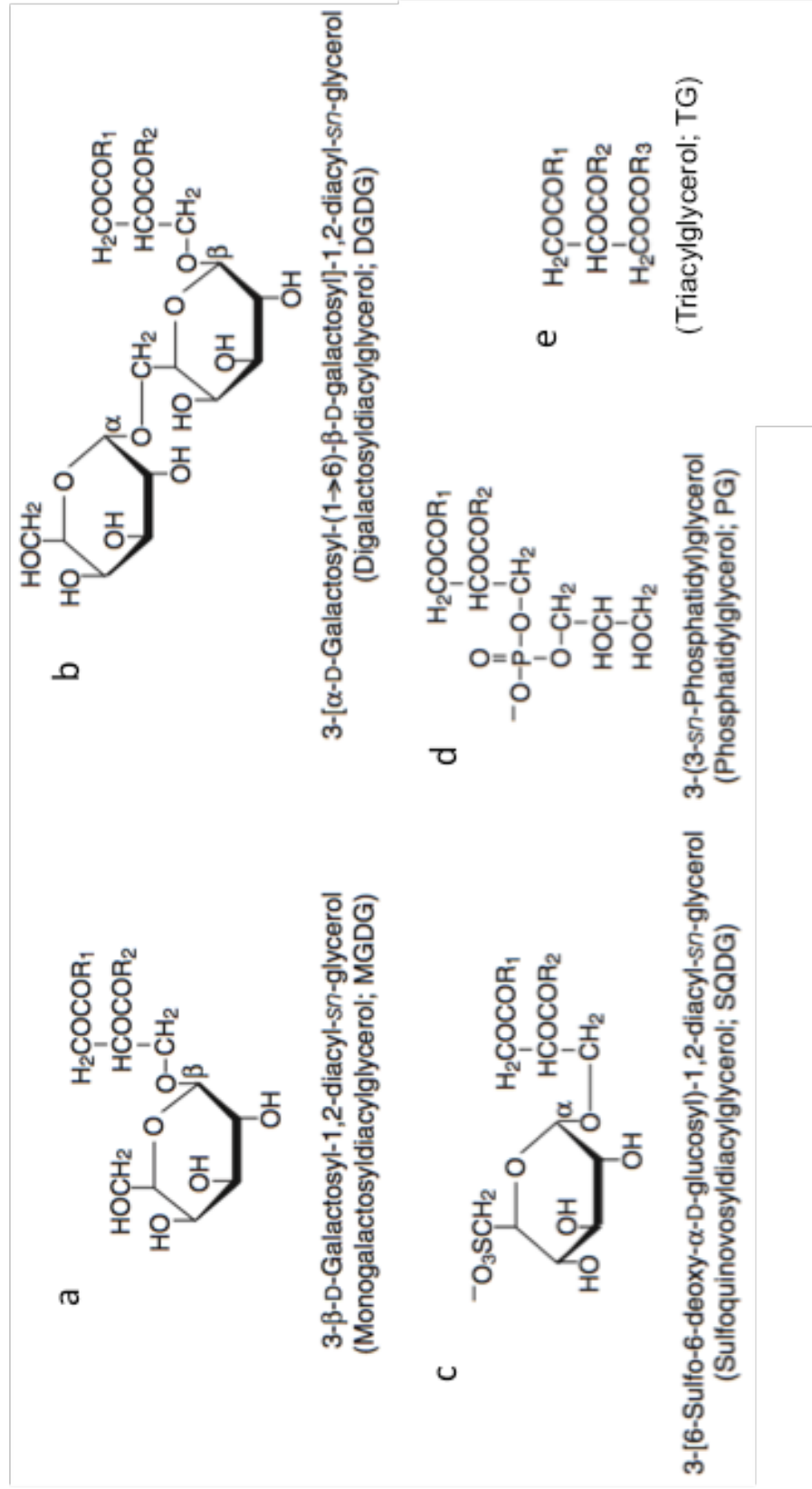


Fig. 0-1 脂質の構造

a, MGDG; b, DGDG; c, SQDG; d, PG; e, TG; f, PHB

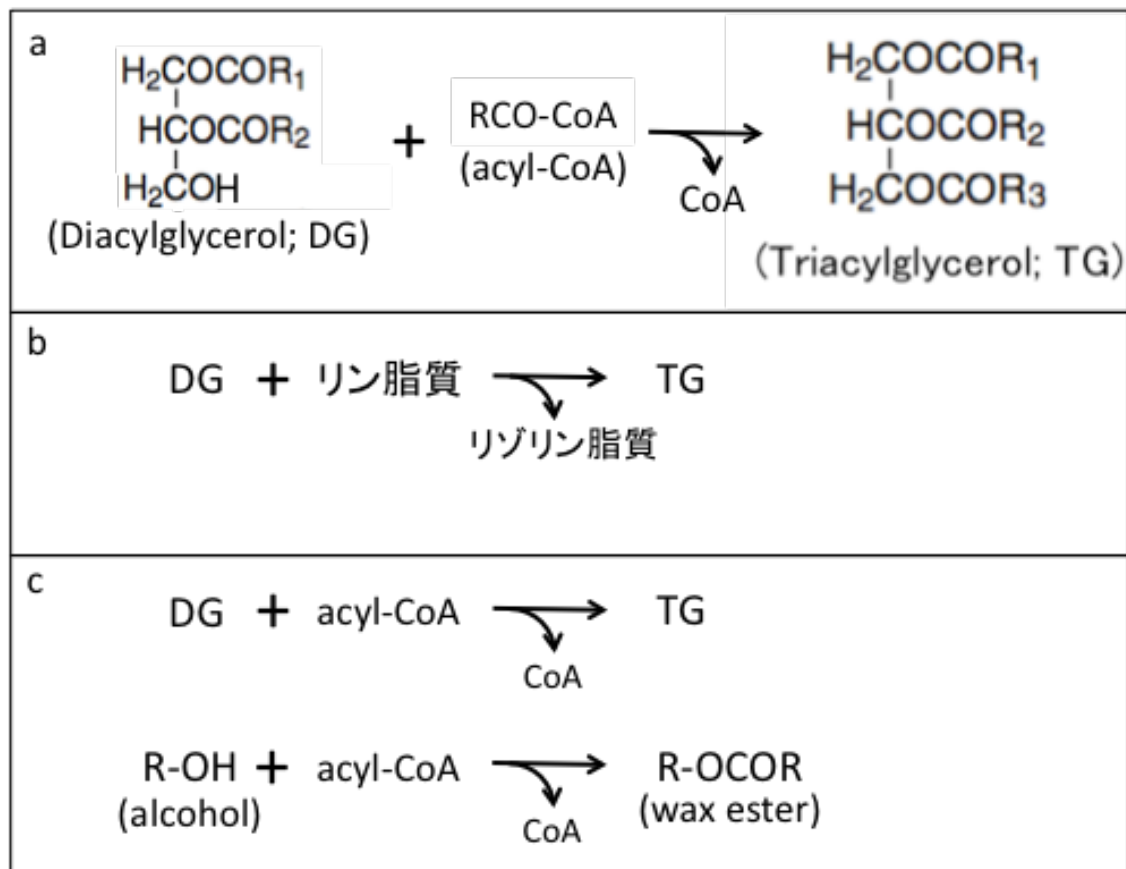


Fig. 0-2 TG 合成系酵素の既知の活性. a, DGAT; b, PDAT; c, WS/DGAT

【生物材料】

本研究に用いた株を Table M1 に記す。

Table M1 生物材料一覧					
生物および遺伝子変異株の名称	改変	遺伝子	選択に用いた薬剤	基本培地	使用項目
<i>Chlorella kessleri</i> 11h	野生型			1/4 ガンボーク B5	第一章
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cc125	野生型			3/10 HSM	第一章
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	野生型			BG11	第二章
PCC 6803 empty	薬剤耐性のみ		スペクチノマイシン	BG11	第二章
$\Delta phaAB$	破壊	<i>phaAB</i>	クロラムフェニコール	BG11	第二章
$\Delta argD$	破壊	<i>argD</i>	クロラムフェニコール	BG11+シトルリン	第二章 考察
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	野生型			BG11+ビタミンB12	第二章
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	野生型			BG11	第二章
PCC 7942 empty	薬剤耐性のみ			BG11	第二章
D2-6	過剰発現		スペクチノマイシン	BG11	第二章
D2-7	過剰発現		スペクチノマイシン	BG11	第二章

・ Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803(PCC 6803)

本研究第二章で主に用いた PCC 6803 は、C.P.Wolk が American Type Culture Collection から得た PCC 6803 を元に、John G.K.Williams らが自然突然変異により単離したグルコース耐性株(所謂 GT 株)で、1996 年に全ゲノムの塩基配列が決定された(Hirose *et al.*, 2009)。この株は、当研究室の岡田克彦氏が理化学研究所より譲り受け、継代培養していたものである。

【実験操作】

培養

フィルターを通して滅菌した Air で通気し、光強度 約 $50 \mu \text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 30℃で、培地には炭素源となる酢酸やグルコース等を含まない無機培地で、光独立栄養的培養で各実験を行った。光源には白色蛍光灯（東芝）を使用した。

C. kessleri の培地は市販のガンボーク B5(和光, 399-00621 ; Gamborg *et al.*, 1968)を規定の 4 倍に希釈。

C. reinhardtii には 3/10 HSM を用いた。

シアノバクテリアの培地は BG11 液体培地 (Allen, 1968)に緩衝剤として 10 mM TES-KOH(pH 8.2)を加えた(Good *et al.*, 1966)ものを用いた。変異株 $\Delta argD$ には 1 mM シトルリン添加, *Synechococcus* sp. PCC 7002 系統には $4 \mu \text{g/L}$ のビタミン B₁₂ を添加したものを基本培地とした。

以上を通常条件とした。

ストレス条件培養として、基本培地の希釈、NaCl や Sorbitol の添加、希釈した海水または人工海水、あるいは特定の栄養元素を抜いて作製した培地を用いた培養を行った。

株の保存

1.2 % 寒天培地上で弱光, 30℃で保存し、約 1 ヶ月ごとに継代培養することにより維持した。

シアノバクテリアを冷凍保存する場合は 5 % DMSO を含む基本培地に細胞を懸濁し、液体窒素で冷凍し、-85℃のディープフリーザーで保存した。

改変 DNA コンストラクトの作製

方法 1-3 は遺伝子の破壊を目的とした。破壊される遺伝子の両端に 500 bp 以上の相同組換え可能な領域を設けるようにプライマーの位置を設定した。

方法 4 はシアノバクテリア中での遺伝子の過剰発現を目的とした。過剰発現用ベクターには、スペクチノマイシン耐性遺伝子、大腸菌 ConII プロモーターとその下流に遺伝子挿入部位(SmaI サイト)が設けられ、それらの両末端にシアノバクテリアゲノムへの相同組換え領域が設けられているものを用いた。

使用したプライマーは Table M2 を参照。

方法 1

- ① primer set で目的遺伝子を Ex Taq (TaKaRa)を用いた PCR にて増やした。
- ② Ligation high Ver.2 (TOYOBO)を用い、PCR 産物と pGEM-T (Easy) Vector (promega)をライゲーションし、大腸菌(JM109)に導入、プラスミドを抽出した。
- ③ 目的遺伝子中の適用な部位を制限酵素で切断した。
- ④ 薬剤耐性遺伝子とライゲーションし、大腸菌に導入、プラスミドを抽出した。
- ⑤ 制限酵素や PCR で適当なものを確認し、シアノバクテリアに形質転換した。

方法 2

- ① オペロンを構成する下流と上流の遺伝子に対し、primer set A および B を用いてそれぞれ PCR した。(set A の R primer および set B の F primer にはそれぞれ、5' 末端側に NheI サイトを付加した。)
- ② 両 PCR 産物を NheI で処理した後、ライゲーションした。
- ③ これを pGEM-T (Easy) Vector にライゲーションし、大腸菌(JM109)に導入、プラスミドを抽出した。
- ④ NheI で切断した。
- ⑤ 以下、方法 1 の④以降と同様。

方法 3

- ① primer set A で目的遺伝子を PCR にて増やした。
- ② PCR 産物と pGEM-T (Easy) Vector をライゲーションし、大腸菌(JM109)に導入、プラスミドを抽出した。
- ③ primer set B で目的遺伝子の内側を末端として、ベクター全長を KOD -Plus-(TOYOBO)による PCR で増幅した(iPCR 法)。
- ④ 以下、方法 1 の④以降と同様。

方法 4

- ① primer set で目的遺伝子を KOD -Plus-を用いた PCR にて増やした。
 - ② PCR 産物と SmaI で切断した過剰発現用ベクターをライゲーションし、大腸菌(JM109)に導入、プラスミドを抽出した。
 - ③ 制限酵素処理や PCR で挿入方向を確認し、シアノバクテリアに形質転換した。
- * 過剰発現株の対照として用いる株(PCC 6803 empty)は、目的遺伝子を挿入していない過剰発現用ベクターを形質転換して作製した。

シアノバクテリアの形質転換

- ① 作製した形質転換用 DNA コンストラクトと液体培養した細胞($OD_{730}=1.0$ 前後)を混合し、PCC 6803 ではそのまま、PCC 7002 では暗所に一晩置いた上で、寒天プレート上に乗せたニトロセルロース膜上に広げた。
- ② 弱光で 1-3 日間培養後、選択薬剤を塗布したプレート上にニトロセルロース膜ごと移動した。
- ③ 殆どの細胞が死滅し、しばらくすると形質転換体のコロニーが生えてきたのでそれを拾い、選択薬剤添加の液体培養にて継代培養した(Iwai *et al.*, 2009)。
- ④ 目的遺伝子を PCR で増幅し、セグリゲーションの完了を確認した後プレートに撒き、単離したコロニーより実験に用いた。

【試薬】

特記しないかぎり、和光純薬工業製の試薬を使用した。

EDTA	同仁化学
Na ₂ CO ₃	関東化学
エタノール	関東化学
メタノール	関東化学
クロロホルム	関東化学
n-ヘキサン	関東化学
プリムリン	東京化成工業
ジメチルスルフォキシド(DMSO)	関東化学
NaCl	関東化学
Tris	同仁化学
Bacto Agar	日本ベクトンディッキンソン
酵母 extract	三光純薬
スペクチノマイシン	Sigma
クロラムフェニコール	Sigma
カナマイシン	Sigma
アンピシリン	Sigma
5 % 塩酸メタノール	Sigma
N ₂ ガス	巴商会

TAE

2 M Tris-acetate pH 8.0

0.05 M EDTA

TE

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA

培地(*C. kessleri*)

1/4 GB 5 培地

Compound	
ガンボーグ B5 培地用混合塩類(和光コード・399-00621)	1 袋
Up to 4 L D.W.	

オートクレーブ滅菌した。

培地(*C. reinhardtii*)

3/10 HSM 培地

Compound	
stock I	1 mL
stock II	1 mL
stock III	1 mL
stock IV	10 mL
Trace element	1 mL
Fe solution	1 mL
Up to 1 L D.W.	

上記のように混ぜ、オートクレーブ滅菌した。

○stock I

Compound	
NH ₄ Cl	8 g
Up to 100 mL D.W.	

○stock II

Compound	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
Up to 100 mL D.W.	

○stock III

Compound

Ca₂Cl·2 H₂O

1 g

Up to 100 mL D.W.

○stock IV

Compound

K₂HPO₄

47 g

KH₂PO₄

23.5 g

Up to 500 mL D.W.

○Trace element

Compound

H₃BO₃

2.86 g

ZnSO₄·7H₂O

0.22 g

MnCl₂·4H₂O

1.80 g

Na₂MoO₄

0.039 g

CuSO₄·5H₂O

0.079 g

H₂SO₄

0.05 g

Up to 1 L D.W.

○Fe solution

Compound

FeSO₄·7H₂O

0.69 g

Na₂EDTA

0.93 g

Up to 500 mL D.W.

培地(シアノバクテリア)

BG11 培地（通常培地）

Compound	
stock I	2 mL
stock II	50 mL
stock III	2 mL
stock IV	1 mL
A6	1 mL
1M TES-KOH(pH 8.2)	20 mL

Up to 1 L D.W.

stock I 以外を上記のように混ぜ、オートクレーブ滅菌した後、stock I を加えた。

○stock I

Compound	
Citric acid	0.3 g
Ferric ammonium citrate	0.3 g
Na ₂ EDTA	0.05 g

Up to 100 mL D.W.

上記のように混ぜ、フィルター滅菌した。

○stock II

Compound	
NaNO ₃	30 g
K ₂ HPO ₄	0.78 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g

Up to 1 L D.W.

上記のように混ぜ、オートクレーブはしない。

○stockⅢ

Compound	
CaCl ₂ · H ₂ O	1.9 g
Up to 100 mL D.W.	

オートクレーブ滅菌した。

○stockⅣ

Compound	
Na ₂ CO ₃	2 g
Up to 100 mL D.W.	

オートクレーブ滅菌した。

○A6

Compound	
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g
Na ₂ MoO ₄	0.021 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049 g
conc. H ₂ SO ₄	1 滴
Up to 1 L D.W.	

上記のように混ぜ、オートクレーブ滅菌した。

寒天培地

上記培地に植物培地用 Agar を 1.2 % (w/v) となるように加え、オートクレーブにて滅菌後、50℃程度まで冷まし、プラスチックシャーレに撒いた。固化後、パラフィルムを巻いて常温保存した。生育を促進したい場合は終濃度 1 mM となるように NaHCO₃ を添加した。

BG11 培地（栄養欠乏培養実験用）

Compound	
stock I	2 mL
stock II *	50 mL
stock III	2 mL
stock IV	1 mL
A6 * *	1 mL

Up to 1 L D.W.

stock I 以外を上記のように混ぜ、HCl を用いて pH 8.2 に調製し、オートクレーブ滅菌した後、stock I を加えた。

* stock II は欠乏させたい栄養に合わせ、通常培地の stock II より NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ いずれかを抜いたものを用いた。対照用の栄養十分培地は、通常培地の stock II を用いて上記のように調製した。

* * A6 は、硫黄欠乏培地に関しては以下を用いた。

○A6(-S)

Compound	
H_3BO_3	2.86 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g
ZnCl_2	0.11 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.043 g
Na_2MoO_4	0.021 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.049 g
NaCl	適量

Up to 1 L D.W.

上記のように混ぜ、オートクレーブ滅菌した。

全脂質抽出

Bligh & Dyer の方法で行った(Bligh and Dyer, 1959; Sheng *et al.*, 2011)。

- ①任意の濁度になるまで生育させた細胞培養液を 50 mL ネジ蓋付きガラス遠心管 (IWAKI) に移し、4℃、3000 rpm で 15 分間遠心し、沈殿させた。
- ②上清をデカンテーションより取り除いた後、沈殿にメタノール 10 mL を加え、ボルテックスミキサーにより 1 分間攪拌した。この混合液にクロロホルム 10 mL を加え、ボルテックスミキサーにより 1 分間攪拌した。さらに、精製水 5 mL を加えて、ボルテックスミキサーにより 1 分間攪拌した。
- ③この混合液を 4℃、3000 rpm で 10 分間遠心し、下層を 200 mL ナス型フラスコへ回収した。
- ④この抽出液を、エバポレーターを用いて減圧濃縮した。
- ⑤もう一度クロロホルム 10 mL を加え、ボルテックスミキサーにより 1 分間攪拌し、4℃、3000 rpm で 10 分間遠心し、下層を先のナス型フラスコに回収した後、再びエバポレーターを用いて、減圧濃縮を行った。
- ⑥クロロホルム:メタノール (2:1, v/v) に溶解し、すりガラス付き試験管 (IWAKI) に移した (すぐに使用しない場合は密封し-20℃で保存)。

薄層クロマトグラフィ (TLC) による脂質の分離

- ①抽出した全脂質を、エバポレーターを用いて減圧濃縮し、これを約 100 μ L のクロロホルム:メタノール(2:1, v/v)に溶解した。
- ②120℃で 30 分間乾熱し、活性化させたシリカゲル TLC プレート(5721 Silicagel 60, Merck, Darmstadt, Germany)に①のサンプルを横 数 cm, 縦 1 cm の幅をもたせてスポットした。横幅は細胞量により適宜変更した。総脂質の展開であれば 730 nm における濁度 1 \times 50 mL 相当の細胞量で 1.5 cm 程度が適当。
- ③風乾後、必要に応じた各混合有機溶媒を展開溶媒として展開させ、ドライヤーを用いて乾燥させた後、プリムリン法を用いて脂質を検出した。

プリムリン法による TLC 板上の脂質の可視化 (Wright, 1971; Leray *et al.*, 1987)

アセトン/水(4:1, v/v)に 0.01 %となるようにプリムリンを溶解し、TLC 板に噴霧後 365 nm の蛍光下で検出した。

脂質の単離

脂質のバンドを、スパーテルを用いて TLC より掻き取り、その後の実験に用いた。保存の際は少量のクロロホルム：メタノール(2:1)に溶かし、密閉して冷凍庫に置いた。

ガスクロマトグラフィ (GC) による脂質の分析

この GC では、脂肪酸をメチルエステル化したものを分子種毎に定量した。

①脂質サンプルをネジ蓋付き試験管に入れ、有機溶媒は除去した。TLC プレートより削ったシリカゲル粉は入っていてもよい。1 mg/mL アラキジン(20:0)を 50 μ L と、5 % 塩酸メタノール 約 2 mL を加え、しっかり蓋を閉めた。これを一定時間置きにボルテックスミキサーで攪拌しながら 95℃で 3 時間加熱した (HF-41、ヤマト科学、Tokyo)。

②冷却後、n-ヘキサン 約 2 mL を加え、ボルテックスミキサーにより 30 秒間攪拌した後、静置した。

③2 層に分離したら、パスツールピペットで上層をすりガラス付きガラス試験管に移し、エバポレーターを用いて、減圧濃縮を行った。

④さらに n-ヘキサン 約 1 mL を加え、ボルテックスミキサーにより 30 秒間攪拌した後、静置した。

⑤2 層に分離したら、パスツールピペットで上層を先程のすりガラス付きガラス試験管に移し、エバポレーターを用いて減圧濃縮を行い、乾固したものを 150 μ L 程度の n-ヘキサンに溶解した。

⑥そのうち 2 μ L 程度をガスクロマトグラフ装置 (GC-14B, 島津製作所, Kyoto) を用いて分析した。この時のサンプル量はサンプルの濃度により適宜変更した。定量にはデータ処理装置 (C-R7A plus, 島津製作所, Kyoto) を使用し、得られた各成分のピーク面積から重量比を算出した。また、標準物質として添加した 20:0 との比から脂肪酸の量を計算した。

* ガスクロマト装置について

カラムは ULBON HR-Thermon-3000B キャピラリーカラムを用いた。

カラムの温度は 180℃、インジェクターとディテクターの温度は 250℃とし、キャリアガス圧力は 100 kPa とした。

TG lipase による脂質の分解

- ①TLC 板より単離した中性脂質サンプルから有機溶媒を除去し、DMSO と水を各 50 μ L 加え、加温しつつ超音波を当てた。
- ②水 790 mL, lipase from *Aspergillus niger* (Sigma) (Hennen *et al.*, 1988) 20 mg, 1 M CaCl_2 10 μ L をそれぞれ加え、ボルテックスミキサーにより攪拌した。
- ②0.5 M リン酸緩衝液(pH 8.0)を 200 μ L 加え、37°Cで攪拌しつつ 2 時間反応を行った。
- ③反応液にクロロホルムを加え、ボルテックス, 静置し、下層をすりガラス付き試験管に移し減圧濃縮した。この操作を 3 回行った。
- ④乾固したサンプルを少量のクロロホルム：メタノール(2:1)に溶かし、TLC 板に供した。
- ⑤ヘキサン：ジメチルエーテル：酢酸(70:30:1)で展開し、プリムリン法で観察を行った。

塩酸メタノールによる脂質の分解

- ①TLC 板より単離した中性脂質サンプルに塩酸メタノール 約 2 mL を加え、蓋を閉め、これを一定時間置きにボルテックスミキサーで攪拌しながら 95°Cで 3 時間加熱した。
- ②冷ました後クロロホルムを適量加え、減圧乾固した後、少量のアセトンで試験管壁面をすすぎ、底に集め、更に減圧乾燥した。
- ③サンプルを先ず極少量のクロロホルム：メタノール(2:1)に溶かし、TLC 板に 5 mm 幅でスポットした。次に極少量のメタノールで同様に、同じ場所に置いた。最後にアセトンで溶かして同じ場所に重ねた。
- ④ヘキサン：ジメチルエーテル：酢酸(70:30:1)で展開し、プリムリン法で中性脂質を観察した。
- ⑤その TLC 板をよく乾燥させ、ブタノール：水(9:1)の展開溶媒でグリセロールを展開した。
- ⑥TLC 板を、過マンガン酸カリウム液(0.5 % KMnO_4 , 1 M NaOH)に浸し、グリセロールを観察した(Bansal *et al.*, 2008)。

PCC 6803 の中性脂質(Syn-NLs)の GC による分析

PCC 6803 の Syn-NLs は TLC で観察する限り極僅かで、50 mL 培養では GC の検出限界に満たない量であった。

- ①PCC 6803 を中瓶 2 本各 500 mL 強で培養し、培養液の OD_{730} が 1.0 になったところで細胞を回収した。
- ②全脂質を抽出し、そのうち 1/10 を全脂質サンプルとしてネジ蓋付き試験管に移し、TLC 展開した残り 9/10 のサンプルから Syn-NLs を単離し、これもネジ蓋付き試験管に入れた。
- ③両サンプルをメチルエステル化し、GC で分析した。

生育の度合いが異なる PCC 6803 培養細胞の脂質分析

前培養した対数増殖期の細胞を、初期濁度が $OD_{730} = 0.3$ から培養し、対数増殖期の約 0.6 から定常期の 3.6 まで生育したものを回収し、脂質を分析した。

細胞量は $OD_{730} = 1.0$ の培養液 1000 mL を目安とした。例えば OD_{730} が 0.6 であれば 1666 mL 以上を用いた。

栄養制限条件培地などへの培地移行

- ①前培養した対数増殖期の細胞を用意し、遠心し上清を捨てた。
- ②水または培地に近い緩衝液で細胞を懸濁し、遠心して上清を捨てた。これを 2 回繰り返した。
- ③各本培養用培地に懸濁し、培養した。

シアノバクテリアの静置条件培養

48 well マイクロプレートの 1 well あたり、細胞懸濁培養液を 1 mL 入れ、蓋をし、上から光を当てて静置培養した。

クロロフィル(Chl)の測定

- ① 1 mL のサンプルに 1 μ L の 10 % tween20 を加えボルテックスにかけた。
- ② 20,000 \times g で 5 分間遠心した後上清を捨てた。
- ③ 沈殿物にメタノール 1 mL を加えボルテックスにかけた後、20,000 \times g で 5 分間遠心した。
- ④ 分光光度計で OD₆₆₅,あるいは OD₆₅₀ においてメタノールをブランクとし、遠心したサンプルの上清を 1 mL とり、測定した。本研究のシアノバクテリアは Chl a, 緑藻では Chl a+b を測定した。

$$\text{クロロフィル a (}\mu\text{ g/mL)} = \text{OD}_{665} \times 13.42$$

$$\text{クロロフィル a+b (}\mu\text{ g/mL)} = \text{OD}_{665} \times 6.1 + \text{OD}_{650} \times 20.04$$

(Mackinney, 1941)

フィコビリソーム量の測定

- ① 小試験管にサンプルを 1 mL ずつ入れた。
- ② 100℃で 1 分間熱した後、室温まで冷ました。
- ③ 分光光度計で、加熱前の OD₆₂₀ と OD₇₅₀、加熱後の OD₆₂₀ と OD₇₅₀ を測定した。

フィコビリソーム量(相対値)

$$= \{(\text{OD}_{620}(\text{前}) - \text{OD}_{750}(\text{前})) - (\text{OD}_{620}(\text{後}) - \text{OD}_{750}(\text{後}))\} \times 1000$$

※ 前：加熱前、後：加熱後 とした(Collier and Grossman, 1992)。

遺伝子の検索

CyanoBase(Hirosawa *et al.*, 1995; Fujisawa *et al.*, 2016)等のデータベースを用いてシアノバクテリアのゲノム上の遺伝子を検索した。また、CyanoBase で得られた ORF のコードするアミノ酸配列から、NCBI(National Center for Biotechnology Information)の BLAST(McGinnis and Madden, 2004)を用いてさらにホモログを検索した。

水溶性タンパク質、膜タンパク質の判別

アミノ酸配列から、膜タンパク質を予測するツール SOSUI(Hirokawa *et al.*, 1998)または TMHMM(Krogh *et al.*, 2001)により予測した。

アライメントの作製とアミノ酸配列比較

各アミノ酸配列を、Clustal W(Larkin *et al.*, 2007)および Seaview(Galtier *et al.*, 1996)用いてアライメントおよび比較した。

系統樹の作成

アライメント後ギャップを削除した配列等を元に、Clustal X(Larkin *et al.*, 2007)により NJ 系統樹(Saitou and Nei, 1987; Felsenstein, 1985)を作成し、NJplot(Perrière and Gouy, 1996)で表示した。

タンパク質の二次構造および三次構造の予測

アミノ酸配列から、構造が既知のタンパク質を参照し、構造を予測するサービスである Phyre2(Kelley and Sternberg, 2009; Jefferys *et al.*, 2010)を活用し、全体あるいは部分的な構造の参考に役立てた。

Phyre2 が作製した立体構造モデル(PDB ファイル)をダウンロードし、PyMOL(Sayle and Milner-White, 1995)で詳しい立体構造を調べた。その際にはアライメントされたアミノ酸配列と Phyre2 により作製された二次構造予測も参照した。また構造の近い既知のタンパク質の PDB ファイルを Protein Data Bank(Bernstein *et al.*, 1977)よりダウンロードし、同じく PyMOL で編集して比較材料とした。

第一章 緑藻 *Chlorella kessleri* における、高浸透圧あるいは栄養欠乏と その複合ストレスによる TG 蓄積

緒言

藻類は、種によって差異があるが、様々なストレス条件で脂質を蓄積する(Kalpesh *et al.*, 2012)。その高い増殖速度やバイオマスあたりの脂質蓄積量により、単位土地面積あたりの脂質生産量は植物を大きく上回るとされる(Chisti, 2007)。なお、脂質蓄積の尺度は研究によって、非水溶性有機溶媒可溶性物質の総体重量で表される場合、脂肪滴の体積などで表される場合、または TG 等の個々の物質が定量的に表される場合など、様々な表現されることに留意すべきである。また藻類により産生される脂質は、TG, ワックスエステル(Tucci *et al.*, 2011), 長鎖不飽和ケトン(Tsuji *et al.*, 2009), パラフィン系炭化水素あるいはテルペン系炭化水素(Eroglu *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2011)など、種により様々である。更に研究により培養条件に違いがあり、例えば初期細胞量, 温度, 光強度, グルコース(Kaya *et al.*, 2011)や酢酸(Fan *et al.*, 2012; Ota *et al.*, 2016)といった炭素源の有無などにより、脂質生産量の数値的結果には大きな差が生じる。したがって、異なる研究の間で脂質の生産性の比較を行う際には注意が必要である。産業としての油脂生産を期待できる程度の脂質を蓄積する藻類は油性藻類(oleaginous algae)と呼ばれ、藻体乾重量あたり 20-50 %程の油脂を産生するとされる(Yoshida *et al.*, 2012)。藻類による、食用油、さらに化石燃料の代替物質としての油脂生産は 20 年以上に渡り検討されてきた(Ratledge, 1993; Ratledge and Wynn, 2002; Chisti, 2007; Yoshida *et al.*, 2012)。

そのような動きも加わり、近年、脂質蓄積を誘導する様々な生理条件が見出だされている。窒素欠乏が効果的に TG 蓄積を誘導することは広範囲の藻類で知られている。窒素欠乏の他に、*Chlorella pyrenoidosa*, *Parachlorella kessleri* や *Chlamydomonas reinhardtii* などの緑藻でリンや硫黄, 鉄の欠乏においても TG 蓄積が誘導される(Fan *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2014; Ota *et al.*, 2016; Boyle *et al.*, 2012; Urzica *et al.*, 2013)。珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では、ケイ素欠乏条件によって TG 含量が増加する(Eizadora *et al.*, 2009)。栄養欠乏以外では、高 pH 条件で *Chlorella* の孢子からの細胞遊離が阻害された際(Guckert and Cooksey, 1990)や、高い光強度に曝された時(Li *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2008)などに TG を蓄積する。海洋性緑藻 *Dunaliella salina* は、元々高い NaCl 濃度(0.5 M)の基本培地で対数増殖期の終わり(硝酸塩がかなり消費されている)まで培養した際 TG が蓄積されているが、ここに更に NaCl を添加(+0.5 M あるいは+1.0 M)すると、TG 蓄積量が増えたという(Takagi *et al.*, 2006)。また、*C. reinhardtii* では酢酸の含まれる培地に生理食塩水濃度以下の NaCl を添加(0-100 mM)することで、添加量の増加と共に TG の蓄積が認められている(Siaut *et al.*, 2011)。これらの TG 蓄積条件は一般に、デンプンの蓄積と、強光や炭素源の添加を除いては細胞増殖の阻害を伴う。

これまでに当研究室では、ガラス繊維フィルター状での緩やかな風乾により、*Chlorella kessleri* (*Parachlorella kessleri* と同義; Krienitz *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2005) の TG 蓄積が誘導されることを報告している(Shiratake *et al.*, 2013)。この条件では、液体培養した培養液をガラス繊維フィルターで濾過した後、フィルター上に固定した細胞を 98 %の湿度と穏やかな光条件($15 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)の下培養しており、ガラス繊維フィルター上の水分は徐々に失われ 4 日目には初期のレベルの約半分まで減少している。すなわち細胞にとって当条件は、周囲の水分の蒸発に伴う細胞の脱水条件かつ培地を除去したことによる全栄養制限条件という、複合ストレスであると考えられた。ここで見られる TG 蓄積の誘導に関わる根本的な環境因子を解明する為に、申請者は、*C. kessleri* または *C. reinhardtii* を液体培養中で高浸透圧(≒脱水)条件および全栄養制限条件、もしくは両者の複合ストレス条件下で培養し、脂質を分析した。また、TG の産業的生産への可能性を探るため、この複合ストレス条件を安価かつ豊富に存在する海水を用いて再現した。本研究成果は 2016 年の Scientific Reports | 6:25825 に掲載された(Hirai *et al.*, 2016)。

結果

高浸透圧ストレスが *C. kessleri* の TG 含量に及ぼす効果

当研究室では緩やかな空気乾燥が *C. kessleri* による TG 蓄積を誘発することを報告している。乾燥に伴う細胞の脱水が TG 蓄積を刺激することが示唆された。そこで、申請者は、*C. kessleri* 細胞の脱水の影響を、液体培養にて高浸透圧環境に曝すことによって評価した。前培養した細胞を、基本培地(無機培地 1/4 GB 5 による通常培養)あるいは高浸透圧培地として低強度(0.3 M Sorbitol または 0.15 M NaCl), 中強度(0.6 M Sorbitol または 0.3 M NaCl), 高強度(0.9 M Sorbitol または 0.45 M NaCl)に調製した培地で、それぞれ同じ濁度($OD_{730}=0.3$)で培養を開始し、2 日間培養の後分析を行った。

細胞の生育の目安とする培養液濁度は通常培養では 2 日間で 7.3 倍になった(Fig. I-1a, I-2a の 0.0 M)。Sorbitol を加えた培地での濁度は、0.3 M, 0.6 M, 0.9 M でそれぞれ 6.6 倍, 3.4 倍, 1.3 倍まで増え、高浸透圧の強度が高くなる程強く生育が抑制された(Fig. I-1a)。チラコイド膜上に存在する光合成の明反応を担うタンパク質複合体である光化学系 I 複合体(PSI)および光化学系 II 複合体(PSII)に結合する光受容色素であるクロロフィル(Chl)の培養液中存在量も、生育の抑制に伴い、より高い高浸透圧強度ではより少なくなった(Fig. I-1a)が、濁度に対する Chl 量の比としては初期細胞、通常培養と各 Sorbitol 添加条件で大きな差は無く、維持された。培養液量あたりの脂肪酸(FA)ベースでの総脂質含量は、細胞の生育に反して、各高浸透圧条件下で通常培養における値を上回った(Fig. I-1b の黒い棒および白い棒の和)。例えば 0.6 M Sorbitol 添加培地では、通常培養の 3.4 倍高い総脂質量を示した。細胞内の TG に含まれる FA 量は、通常条件では培養液量当たり僅か $2.9 \mu\text{mol/L}$ であったのに対し、0.3, 0.6 および 0.9 M Sorbitol 添加でそれぞれ 56, 266 および $140 \mu\text{mol/L}$ にまで達した(Fig. I-1b の黒い棒)。培養液量あたりの TG 生産量は 0.6 M Sorbitol で最大となったが、総脂質あたりの TG 含量は、0.3, 0.6 および 0.9 M でそれぞれ 12.3, 40.4, 48.5 mol% となり、0.9 M で最大であった(Fig. I-1b, I-5a)。高強度の高浸透圧ストレス下では、強い生育抑制が課されると同時に、より積極的な細胞内脂質合成バランスの改変を要するのだろう。また、高浸透圧ストレス下での培養液あたりの総脂質の増加は、TG の蓄積のみに寄らなかった。面白いことに、いずれの強度の高浸透圧ストレス下でも通常条件に比べて濁度と Chl 量の増加が抑制されたのに対し、培養液あたりの極性脂質(総脂質から TG を除いたものは殆どが膜を構成する極性脂質である)の含量は 0.3 および 0.6 M Sorbitol 添加において通常培養より高かった(Fig. I-1a, Fig. I-1b の白い棒部分)。これは高浸透圧条件下での、濁度あたりの極性脂質量の増加を示し、細胞あたりの脂質膜量の増加と捉えられた。

一方、計算上、各 Sorbitol 濃度と同等の浸透圧になる NaCl を培地に加えた場合も、Sorbitol 添加時と同様の傾向が見られた。NaCl 濃度が高くなるに従い、濁度および Chl 量の増加が滞り、低および中強度の高浸透圧では、同等の Sorbitol 添加よりも顕著な生

育障害を示した(Fig.I-2a)。液量あたりの総脂質量あるいは TG 量の増加傾向も、Sorbitol 添加と同様であった(Fig.I-2b)。NaCl による中強度の高浸透圧下において液量あたりの TG 量は $327 \mu\text{mol/L}$ に達し、Sorbitol あるいは NaCl 添加による低、中および高強度の浸透圧条件のうちで最も高い値で TG を産生した(Fig.I-1b, I-2b)。総脂質あたりの TG の割合は、より強い高浸透圧ストレスであるほど高くなることは Sorbitol と同様であったが(Fig. I-2b, I-5b)、低、中および高強度の NaCl 添加によれば、対応する各強度の Sorbitol 添加の場合よりそれぞれ高い値であり、 0.45 M NaCl では 75.3 mol\% に達した(Fig. I-5ab)。培地量あたりの極性脂質含量は、 0.15 M NaCl で通常条件のそれより高く、 0.3 M NaCl では通常条件と同等であった(Fig. I-2b の白い棒部分)。NaCl による低および中強度の高浸透圧条件下、濁度の増加は抑制されているため、濁度あたりの極性脂質含量は通常条件よりも高かった。

以上の結果より、高浸透圧は *C. kessleri* において、TG を誘導する環境ストレス因子であることを新しく示した。また空気乾燥条件でも、脱水あるいはそれに伴う細胞内浸透圧の上昇が TG 蓄積を誘導する要因であることが示唆された。

全栄養欠乏ストレスが *C. kessleri* の TG 含量に及ぼす効果

先に述べた空気乾燥条件は、ガラス繊維フィルター上での濾過による培養液の除去から始まる。細胞の利用できる栄養素はガラス繊維フィルター上に残った僅かな培養液に含まれる分しか無く、生育の上で必要な栄養が総じて不足していると考えられる。申請者は、基本培地(1/4 GB 5)を 100 倍希釈することにより全栄養制限培地(1/400 GB 5)とした。GB 5 の公開されている組成より、欠乏により TG 蓄積を促進する、またはその可能性のある N, S, Fe および P 源の 1/400 GB 5 における含量はそれぞれ 67, 5.5, 0.25, および $2.7 \mu\text{M}$ とされた(Table I-1)。1/400 GB 5 による 2 日間の培養により、培養液濁度は初期の 4.0 倍、通常の生育に対して 0.54 倍まで増えた(Fig. I-3a, I-4a の 0.0 M, Fig. I-1a, I-2a に対して)。Chl 含量は培地量あたりで $4.4 \mu\text{g/mL}$ となり(図中未記載)、初期の $8.2 \mu\text{g/mL}$ (Fig. I-1a, I-2a の Initial)の約半分にまで減少した。Chl の分解は、窒素欠乏条件では一般に観察される現象である。総脂質含量は、通常培養より 1.5 倍高くなった(Fig. I-1b の 0.0 M および I-3b の 0.0 M)。膜脂質量は通常条件より若干少なく(Fig. I-1b の 0.0 M および I-3b の 0.0 M における白い棒)、 $117 \mu\text{mol FA/L}$ 産生された TG により、通常条件より高い総脂質量となった。総脂質に対する TG の割合は、FA ベースで 41.4 mol\% であった(Fig. I-5ab の 0.0 M in 1/400 GB)。予想されたように、全栄養制限は、栄養欠乏ストレスを引き起こし、TG 蓄積を誘導した。空気乾燥条件にもこれと同じ誘導が含まれると考えられた。

高浸透圧と全栄養欠乏による混合ストレスが *C. kessleri* の TG 含量に及ぼす効果

次に、高浸透圧(Sorbitol または NaCl)と全栄養制限(1/400 GB 5)を、混合ストレスとして同時に課した。細胞の生育は、0.3 M Sorbitol を除く各混合ストレスで、全栄養欠乏ストレス単独よりも更に強い抑制を受けた(Fig. I-3a, I-4a)。0.3 M Sorbitol かつ全栄養制限では全栄養欠乏単独より生育が伸びたが、もしかすると 1/400 GB 5 は低浸透圧ストレスを含み、それが低強度の高浸透圧によって相補されたかも知れないと考えるが、実際のところは不明である。栄養欠乏ストレス単独での液量あたりの総脂質量は 295 $\mu\text{mol FA/L}$ であったが、ここに 0.3 または 0.6 M Sorbitol, または 0.15 M NaCl を添加した混合ストレス条件での総脂質量は 500 $\mu\text{mol FA/L}$ 以上となった(Fig. I-3b, I-4b)。液量あたりの TG 蓄積量に混合ストレスの効果は現れ、特に全栄養制限と低強度の高浸透圧条件では、0.3 M Sorbitol および 0.15 M NaCl でそれぞれ 368 および 369 $\mu\text{mol FA/L}$ にまで増え(Fig. I-3b, I-4b)、単一のストレス下での最高値(0.3 M NaCl による 327 $\mu\text{mol/L}$, Fig. I-2b)を上回った。総脂質あたりの TG 量を見ても、全栄養制限と低強度の高浸透圧条件の混合ストレスでは、その各々の単独ストレスに比べて大幅に高い TG 含量を得られた(Fig. I-5a, I-5b)。更に、全栄養欠乏を伴う 0.3 M Sorbitol あるいは 0.15 M NaCl による低強度の高浸透圧条件で得られた TG 産生量は、全栄養欠乏ストレス単独での TG 産生と低強度の高浸透圧ストレス単独での TG 産生を足し合わせた値よりも高かった(Fig. I-6ab)。また、全栄養欠乏かつ 0.3 M Sorbitol の混合条件での TG 産生量は、0.6 M Sorbitol での高浸透圧単独(すなわち低強度の高浸透圧に対し、低強度の高浸透圧を更に加えたことに相当)に対しても高かった(Fig. I-6a)。これにより、異なる種類の混合ストレスの TG 産生への相乗的效果を示した。

高浸透圧あるいは全栄養制限条件が *C. reinhardtii* の生育と TG 含量に及ぼす効果

C. reinhardtii 細胞を、基本培地(無機培地 3/10 HSM による通常培養), あるいは *C. kessleri* と同様の溶質を添加した 6 通りの高浸透圧培地, または全栄養制限培地(3/1000 HSM)により培養した。低強度の高浸透圧条件(0.3 M Sorbitol または 0.15 M NaCl)では、通常培養(Control)に比べ、激しく生育が阻害された(Fig. I-7b)。また、Sorbitol と NaCl 添加の双方において、中強度の高浸透圧培地では細胞の漂白を伴い完全に生育を停止あるいは死滅した(Fig. I-7a)。*C. reinhardtii* は高浸透圧ストレスに対しての感受性が *C. kessleri* より高いと受け止められた。*C. kessleri* は通常培養においても総脂質あたり 16.4 mol% の TG を保有していたが、0.3 M Sorbitol では同 17.4 %, 0.15 M NaCl では同 9.9 %と、この浸透圧強度での TG 蓄積効果は認められなかった(Fig. I-7c)。全栄養制限条件においては、強い生育抑制と Chl の分解(Fig. I-7b)、総脂質あたり 46.0 mol% の TG を蓄積した(Fig. I-7c)。

C. kessleri に対する混合ストレス培養への海水の利用

混合ストレスの容易な再現として、組成が公開されている人工海水(MASF; MARINE ART SF-1)と鎌倉海岸で採取した海水(SW; Seawater)を用いて実験を行った。MASF は、高強度の高浸透圧ストレスと同等の、0.45M Na⁺と 0.51M Cl⁻を含み、全栄養欠乏培地とした 1/400 GB 5 に比べても N、P、Fe、Mn および Zn 源に乏しく、S に関しては 1/4 GB 5 よりも豊富に含まれる(Table 1)。この MASF の無希釈を高強度、3 倍希釈したもの(1/3 MASF)を低強度の高浸透圧かつ栄養欠乏の混合ストレス培地として *C. kessleri* を培養した。また、実際の海水を 3 倍希釈(1/3 SW)して用いた。この海水は組成未知であるが、平成 26 年版 理科年表 第 87 冊(丸善, 東京)にある太平洋表層水の含有元素濃度を参照し、Table 1 に付載した。

1/3 MASF, MASF, 1/3 SW とともに、1 日目から脂肪滴が観察された(Fig. I-11)。

1/3 MASF で培養した細胞の生育は、濁度(OD₇₃₀)と細胞乾重量(DCW; dry cells weight)のどちらの指標で見ても、最初の 1 日の増加の後、停滞傾向に入った(Fig. I-8ab)。しかし培養液量あたりの TG は 1 日を過ぎても増え続け、3 日目で 294 μ mol/L まで増加した(Fig. I-9a)。総脂質も同様に増加し続けた(Fig. I-9b)。総脂質あたりの TG 含量はわずか 1 日で 64 mol%にまで急増し、その後の 2 日間は同水準を維持した(Fig. I-10a)。1 日目以降、TG 極性脂質はほぼ同じ割合で増加していると読み取れた(Fig. I-9a,10a)。一方、乾燥重量あたりの TG 含量は 1 日で 15.0 重量%、後の 2 日間でその倍近い 26.6 重量%にまで割合を増やし続けた(Fig. I-10b)。

MASF では、総脂質あたりの TG 含量は 1/3 MASF と同等だった(Fig. I-10a)が、生育(Fig. I-8ab)、培養液あたりの脂質量(Fig. I-9ab)および乾重量あたりの TG 量(Fig. I-10b)については傾向として 1/3 MASF より低水準であった。この結果は、1/400 GB 5 に NaCl を添加した時の結果と合致した(Fig. I-4ab, 5b)。

1/3 SW での 3 日目の生育は、1/3 MASF を有意に上回った(Fig. I-8ab)。生育の高さに従い、培養液量あたりの TG または総脂質量も、有意傾向または有意に 1/3 MASF を離して蓄積した(Fig. I-9ab)。3 日目での総脂質における TG の割合および細胞乾重量に対する TG の割合は、1/3 MASF や MASF と同程度であった(Fig. I-10ab)。実際の SW の組成が不明であるため、1/3 MASF 以上の生育となった要因はわからないが、栄養欠乏と高浸透圧による混合ストレスの TG 蓄積への効果は人工あるいは天然のいずれの海水を用いても認められた。

考察

本研究は、空気乾燥時の *C. kessleri* 細胞で TG 蓄積を誘導した因子の解明を目的として行った。得られた結論として、まず、高浸透圧が *C. kessleri* の TG 蓄積を導く新規の環境因子であった。これは Sorbitol と NaCl の 2 種類の溶質を用いて示された。各溶質による高浸透圧ストレスは、それぞれ TG 蓄積を誘導したが、同じ浸透圧の培地では、NaCl の TG 蓄積誘導効果は Sorbitol のそれより顕著であった。例えば、総脂質あたりの TG 蓄積量が最も顕著だった 0.45 M NaCl での TG 蓄積は、脂肪酸ベースで 75.3 mol % にのぼった。一方、0.9 M Sorbitol では、48.5 %にとどまった。NaCl は、Na⁺および Cl⁻イオンに解離し、これが細胞内へ流入することにより、細胞内のイオン恒常性を乱す。Sorbitol による、培地の単純な浸透圧の上昇は、脱水による一時的な細胞内イオン濃度の上昇を伴うだろうが、これは非イオン性の適合溶質の生産によってある程度解消され、と考えられ、イオンストレスの影響は限定的であろう。*C. reinhardtii* で、0.02-0.1 M の低濃度 NaCl が TG 蓄積を誘導することは知られているが、高浸透圧の強度としては弱く、イオンストレスに対する応答と考えられている(Siaut *et al.*, 2011)。高塩濃度の NaCl による TG 蓄積の増強は、いくつかの研究で報告されてきたが、これは高浸透圧とイオンストレスの複合的なストレスが与えられるため、NaCl ストレスにおける TG 蓄積の因子を特定できていなかった。

興味深くは、Sorbitol あるいは NaCl による高浸透圧ストレスが、膜脂質合成を促すことが示唆された。これは TG 蓄積を誘導する窒素や硫黄などの栄養欠乏ストレスでは見られない挙動であった。例えば、0.3 あるいは 0.6 M Sorbitol では、細胞濁度増加の抑制が見られるにも関わらず、培養液あたりにおける極性脂質の量は通常培養より明らかに増えていた。膜脂質の増加により、0.6 M Sorbitol における総脂質あたりの TG 含量は 40.4 %にとどまったが、TG と極性脂質を含む総脂肪酸の生産量は最も高い値を示した。*Cladophora vagabunda* を含むいくつかの藻類や種子植物 *Catharanthus roseus* の懸濁細胞において、NaCl による膜脂質増加が報告されている(Elenkov *et al.*, 1996; Elkahoui *et al.*, 2004)。今後、*C. kessleri* が高浸透圧条件下で膜系を調節する機構と理由を調べたい。種子植物では、凍結ストレスに曝されたとき、MGDG はオリゴガラクト脂質と DG に代謝され、この DG は TG に合成されることで膜から隔離される。非二重層脂質である MGDG と DG は、脱水を伴う凍結条件で膜の安定性を乱す可能性があるため、脂質の再構成による環境ストレスへの適応機構と考えられている。高浸透圧環境下において、*C. kessleri* の脂質の再構成が TG 蓄積機構に関与するかは今後調べるべき課題である。また、蓄積された TG の意義として、申請者は再水和時の細胞の傷害を緩和する可能性を考えている。顕微鏡下の観察でもわかるように、TG を貯蔵する脂肪滴は、多い時では細胞内のかなりの体積を占める。条件が異なるが、*C. kessleri* を硫黄欠乏で培養したとき、脂肪滴の体積は細胞内の 51 %にも達する(Ota *et al.*, 2016)。乾燥や高浸透圧下、細

胞は適合溶質を産生し、細胞内の水面分を高張に保つことで水の流出を防ぐ。このような状態の細胞が乾燥や高浸透圧から解放されたとき、言い換えれば細胞内浸透圧より低張な水環境に曝されたとき、高張となった細胞内には大量の水が流入しようとする。これは細胞内構造の破壊や細胞破裂を招く重大な問題である。細胞内の高張液の量が多い程、過酷な再水和により圧力が上昇するであろう。疎水性画分である脂肪滴の細胞内における体積割合の増加は、相対的に水面分の体積を減らし、その分流入する水の圧力を軽減することに繋がるのではないだろうか。膜の増加も、再水和時の適応になにか意味を持つかも知れない。

全ての栄養素を通常条件の 1/100 の培地で生育させたとき、*C. kessleri* および *C. reinhardtii* の双方で TG が蓄積された。*C. kessleri* 細胞の生育は抑制され、初期値の 4 倍にとどまり、完全な硫黄制限と同等で窒素制限(データ非公開)よりは生育した。膜を構成する極性脂質は細胞の増殖に従う程度に増加した。TG 含量は、総脂質あたり 40 mol FA%であった。複数の栄養を僅かにのみ与えたことにより及ぼされる細胞増殖あるいは TG 蓄積への影響は、その抑制あるいは応答の原因となる元素を等しくするとは限らない。例えば、生育の上限は僅かな窒素の存在量に依存し、TG 蓄積誘導は窒素や硫黄あるいは鉄の、低い培地中濃度を感知することによる複数の栄養欠乏応答系が同時に働くかも知れない。栄養制限の組み合わせの有効性は、今後詳しく再評価する必要がある。

更に申請者は、TG 蓄積を誘導する別個の 2 つのストレッサー、すなわち低強度の高浸透圧と栄養制限を複合して課すことで、個々のストレス以上、更に双方によって産生された TG 量の和以上の TG を蓄積することを示し、複数種類の応答が効果的に協力して TG を合成することを示唆した。0.3 M Sorbitol あるいは 0.15 M NaCl と全栄養制限条件の組み合わせは、全栄養制限条件単独程度の生育を維持したまま、総脂質あたりの TG の割合は中程度の NaCl ストレス単独に並び、60 mol FA%を越えた。強すぎないストレスの組み合わせで、ある程度の生育を保ちながら強いストレスに匹敵する割合の TG 誘導は、結果的に培養液量あたりの TG 生産量を、どの単独あるいは他の強度の複合ストレスよりも高かった。

優秀な TG 生産性を示した複合ストレス条件の再現は、安価で枯渇の心配の無い資源である海水を希釈したものを培地とするだけで達成された。これまでに TG 蓄積誘導法としてよく検討されてきた栄養欠乏条件は、細胞が栄養を枯渇させるまで時間とエネルギーを使って育てるか、あるいは培地の交換という手間の掛かる方法であった。しかし、本研究で示された、高浸透圧ストレス、あるいはそれに栄養制限を加えることによる TG 蓄積誘導は、ある程度まで育てた培養液に塩か海水を混ぜるだけという非常に簡易で安価な方法で TG 蓄積条件に移行できることを提案した。

空気乾燥条件による TG 蓄積誘導は、脱水と全栄養制限という 2 つの生理的ストレスの複合によって引き起こされたと考えられた。ガラス繊維フィルター上の *C. kessleri* 細胞は、細胞を含むフィルターの水分含量が半分に低下する間、徐々に脱水された。ガラ

ス繊維フィルター上の水分の減少は細胞の脱水より早いと考えられ、細胞内の水分は初期の 50 % 以上保持されていた可能性が高い。*C. kessleri* の通常培養下での細胞内浸透圧が、*Chlorella emersonii*(Munns *et al.*, 1982) と同等(0.24 osm/L) と仮定すると、空気乾燥細胞の細胞内浸透圧は 0.48 M Sorbitol または 0.24 M NaCl に相当する。しかし、TG の生産性は最終的には液体培地による複合ストレスのほうが優れていた。これはおそらく、光強度の寄与が大きい(強光は液体培養中、TG 蓄積を促進するが、空気乾燥細胞では強すぎる光が毒となる為、弱光により行った)。

C. kessleri も他の藻類と同じく、TG 合成に直接関わる遺伝子をゲノム中にいくつか持ち、その遺伝子やあるいはその他の脂質代謝系遺伝子の発現も様々な調節および複数通りの経路の内にあると思われる(Wang *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2014)。いまのところ、*C. kessleri* の全ゲノム情報は一般には公開されていないが、準備が整い次第、様々な環境条件での詳しい代謝系や発現制御機構を調べたい。条件毎の TG 合成の律速段階が解明されれば、条件の組み合わせによる高効率の TG 生産技術にも期待が持てる。

結論として、高浸透圧ストレスは TG 蓄積の新規なストレスとなることを実証した。さらに、栄養欠乏との複合ストレスは TG 蓄積を更に効果的に誘導し、このときの高浸透圧は低強度で十分に強い蓄積誘導が得られた。また、空気乾燥により TG 蓄積を刺激する因子は複合的に作用したと判明した。また、希釈海水を用いることで、複合ストレスによる高度な TG 産生誘導を藻類細胞に与えられることを立証した。

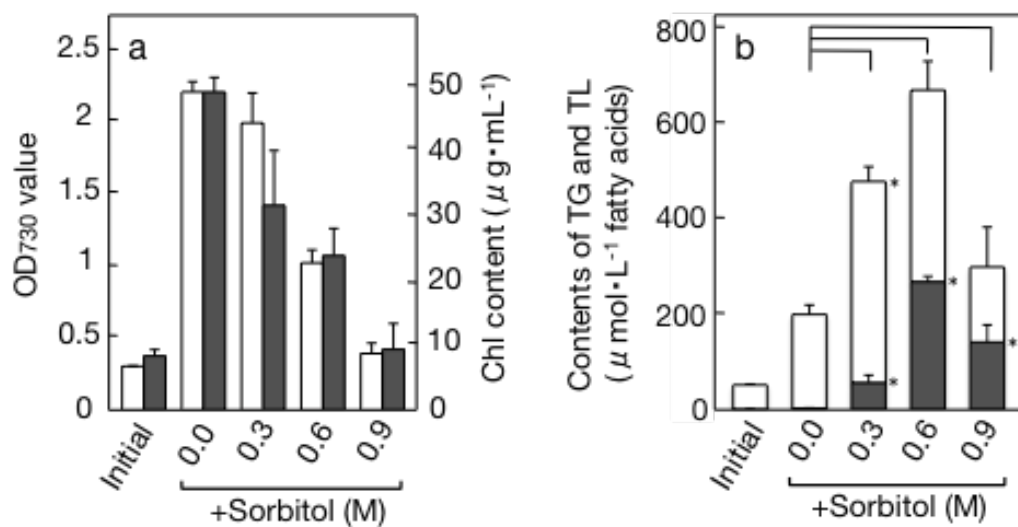


Fig. I-1 Sorbitol 添加による *C. kessleri* の生育および培養液あたりの脂質含量への影響. a, OD₇₃₀ 値(白棒)またはクロロフィル含量(黒棒); b, 脂肪酸ベースでの脂質含量. TG(黒棒), TL(総脂質; 白棒の頂点の値を参照)および極性脂質(白棒). a および b は初期値 (Initial)を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, $P < 0.05$

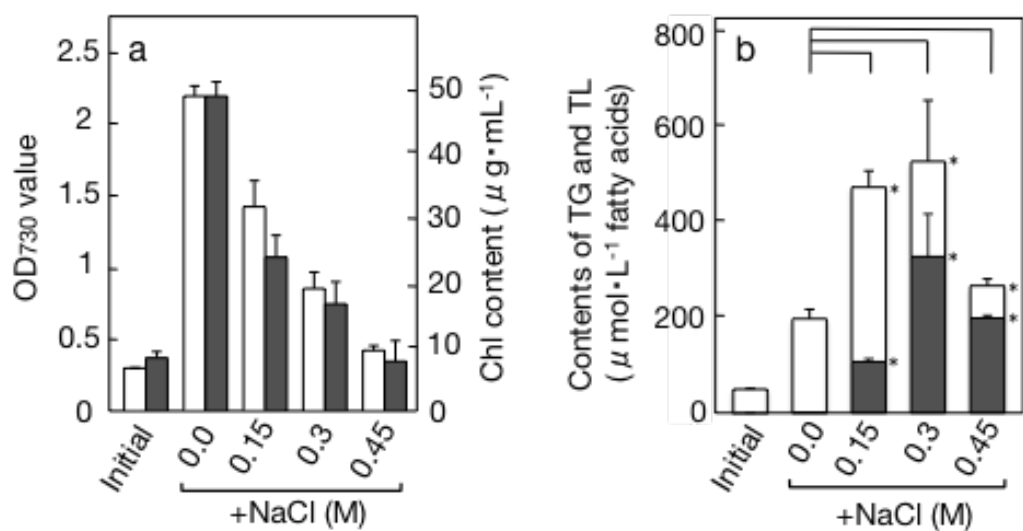


Fig. I-2 NaCl 添加による *C. kessleri* の生育および培養液あたりの脂質含量への影響. a, OD₇₃₀ 値(白棒)またはクロロフィル含量(黒棒); b, 脂肪酸ベースでの脂質含量. TG(黒棒), TL(総脂質; 白棒の頂点の値を参照)および極性脂質(白棒). a および b は初期値(Initial)を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, P < 0.05

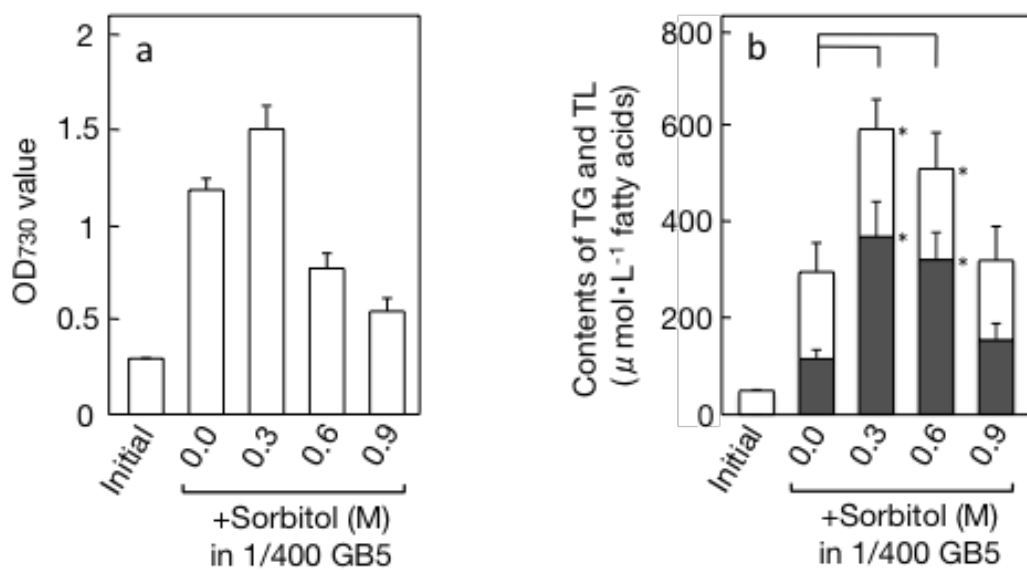


Fig. I-3 全栄養制限または、かつ Sorbitol 添加による *C. kessleri* の生育および培養液あたりの脂質含量への影響. a, OD₇₃₀ 値; b, 脂肪酸ベースでの脂質含量. TG(黒棒), TL(総脂質; 白棒の頂点の値を参照)および極性脂質(白棒). a および b は初期値(Initial)を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, P < 0.05

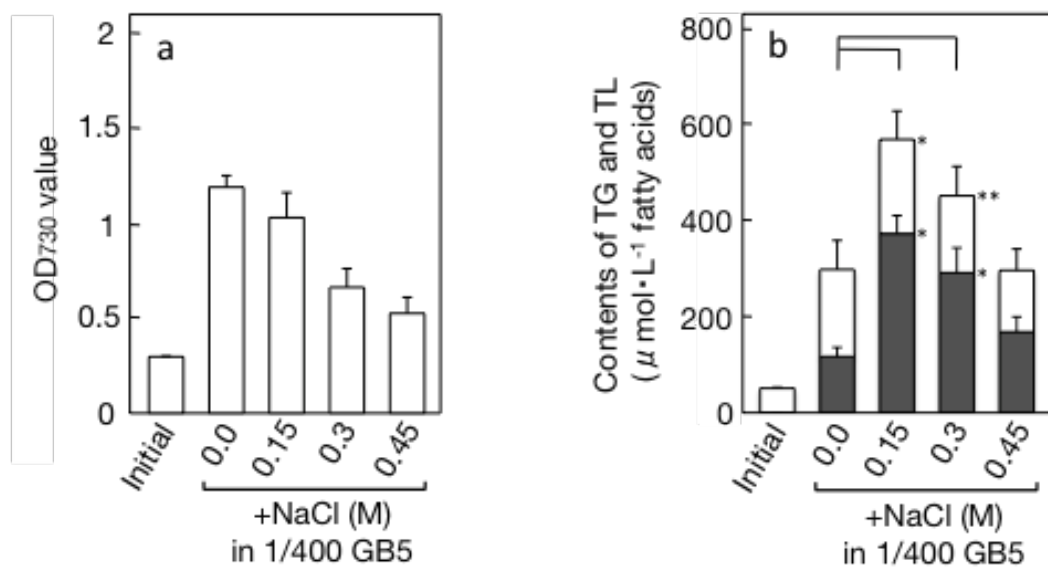


Fig. I-4 全栄養制限または、かつ NaCl 添加による *C. kessleri* の生育および培養液あたりの脂質含量への影響. a, OD₇₃₀ 値; b, 脂肪酸ベースでの脂質含量. TG(黒棒), TL(総脂質; 白棒の頂点の値を参照)および極性脂質(白棒). a および b は初期値(Initial)を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, P < 0.05; **, P < 0.1

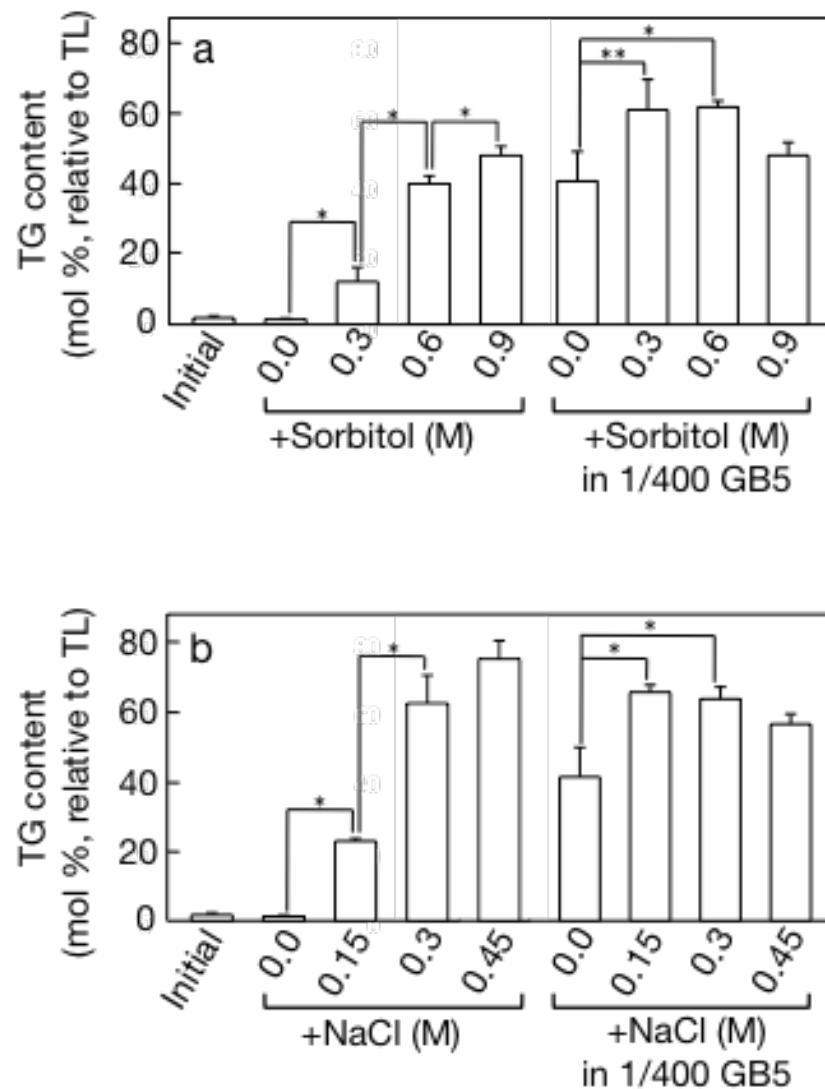


Fig. I-5 全栄養制限または、かつ Sorbitol あるいは NaCl 添加による *C. kessleri* の総脂質あたりの TG 含量(脂肪酸ベース)への影響. a, 初期値(Initial), Sorbitol 添加(+Sorbitol), 全栄養制限かつ Sorbitol 添加(+Sorbitol in 1/400 GB 5); b, 初期値(Initial), NaCl 添加(+NaCl), 全栄養制限かつ NaCl 添加(+NaCl in 1/400 GB 5). 初期値を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

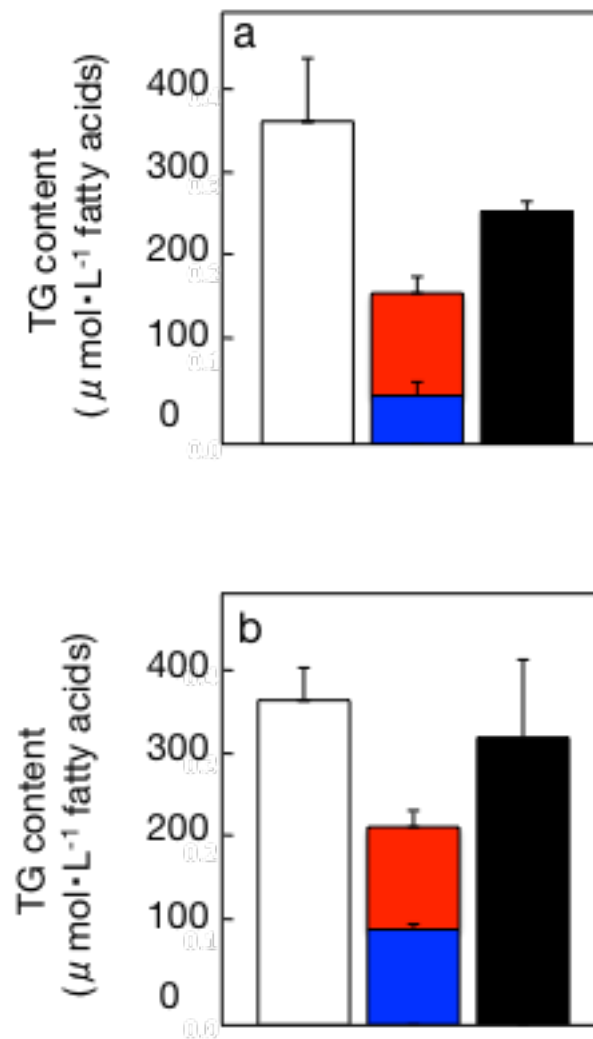


Fig. I-6 ストレスの複合による培養液量あたりの TG 蓄積量の比較. a, 全栄養制限かつ 0.3 M Sorbitol 添加(白), 全栄養制限(青), 0.3 M Sorbitol 添加(赤)および 0.6 M Sorbitol 添加(黒); b, 全栄養制限かつ 0.15 M NaCl 添加(白), 全栄養制限(青), 0.15 M NaCl 添加(赤)および 0.3 M NaCl 添加(黒). 誤差線は標準誤差.

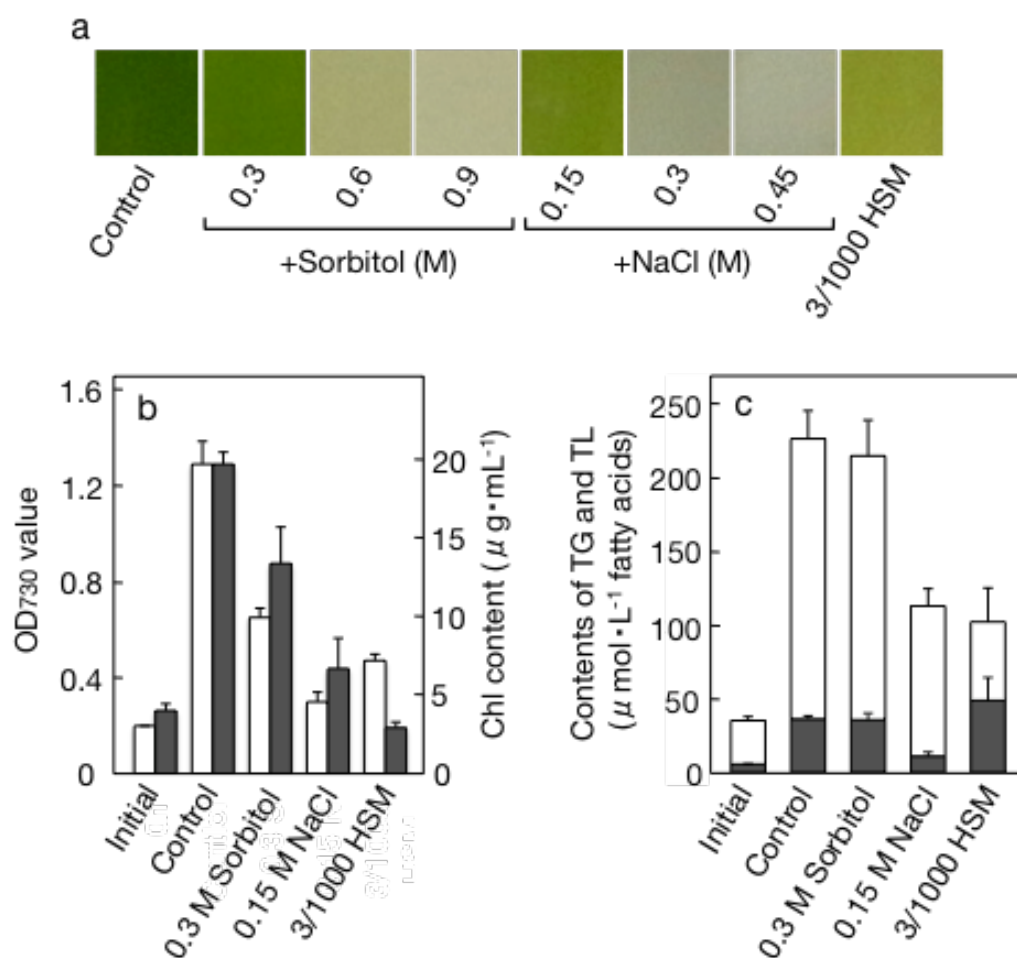


Fig. I-7 各条件での *C. reinhardtii* の生育および培養液あたりの脂質含量への影響. 基本培地(Control; 3/10 HSM), 高浸透圧条件(Sorbitol あるいは NaCl 添加による)および全栄養制限(3/1000 HSM). a, 細胞培養液の色; b, OD₇₃₀ 値(白棒)またはクロロフィル含量(黒棒); c, 脂肪酸ベースでの脂質含量. TG(黒棒), TL(総脂質; 白棒の頂点の値を参照)および極性脂質(白棒). a, b および c は初期値(Initial)を除き各条件で 2 日間培養の結果. 誤差線は標準誤差.

Table 1 複合ストレス条件に用いたそれぞれの培地の組成. MASF は製造元(大阪薬研, 大阪)の公開による. SW は理科年表(丸善, 東京)のデータに基づく推定. 単位は mM.

	1/400 GB +0.15M NaCl	1/3 MASF	1/3 SW
NO_3^- or NH_4^+	6.7×10^{-2}	2.9×10^{-5}	1.7×10^{-6}
HPO_4^{2-}	2.7×10^{-3}	1.7×10^{-5}	1.7×10^{-5}
SO_4^{2-}	5.5×10^{-3}	9.2	9.3
Na^+	1.5×10^2	1.5×10^2	1.6×10^2
Cl^-	1.5×10^2	1.7×10^2	1.8×10^2
K^+	6.2×10^{-2}	3.0	3.3
Ca^{2+}	2.6×10^{-3}	3.4	3.3
Mg^{2+}	2.5×10^{-3}	1.6×10	1.8×10
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	2.5×10^{-4}	6.2×10^{-6}	6.7×10^{-8}
Mn^{2+}	1.7×10^{-4}	1.0×10^{-6}	6.7×10^{-7}
$\text{B}(\text{OH})_3$	1.2×10^{-4}		1.4×10^{-1}
Zn^{2+}	1.7×10^{-5}		2.7×10^{-7}
IO_3^-	1.1×10^{-5}	1.6×10^{-4}	1.2×10^{-4}
MoO_4^{2-}	2.6×10^{-6}	4.9×10^{-6}	3.5×10^{-5}
Co^{2+}	2.6×10^{-7}	2.8×10^{-6}	4.0×10^{-8}
Cu^{2+}	2.5×10^{-7}		4.3×10^{-7}
HCO_3^-		7.5×10^{-1}	6.7×10^{-1}
Br^-		2.7×10^{-1}	2.8×10^{-1}
Sr^{2+}		2.7×10^{-2}	3.0×10^{-2}
F^+		2.4×10^{-2}	2.3×10^{-2}
$\text{Al}(\text{OH})_3$		1.1×10^{-5}	1.7×10^{-6}
Li^+		7.9×10^{-6}	8.7×10^{-3}
WO_4^{2-}		2.0×10^{-6}	1.7×10^{-8}
Total solutes	3.0×10^2	3.5×10^2	3.7×10^2

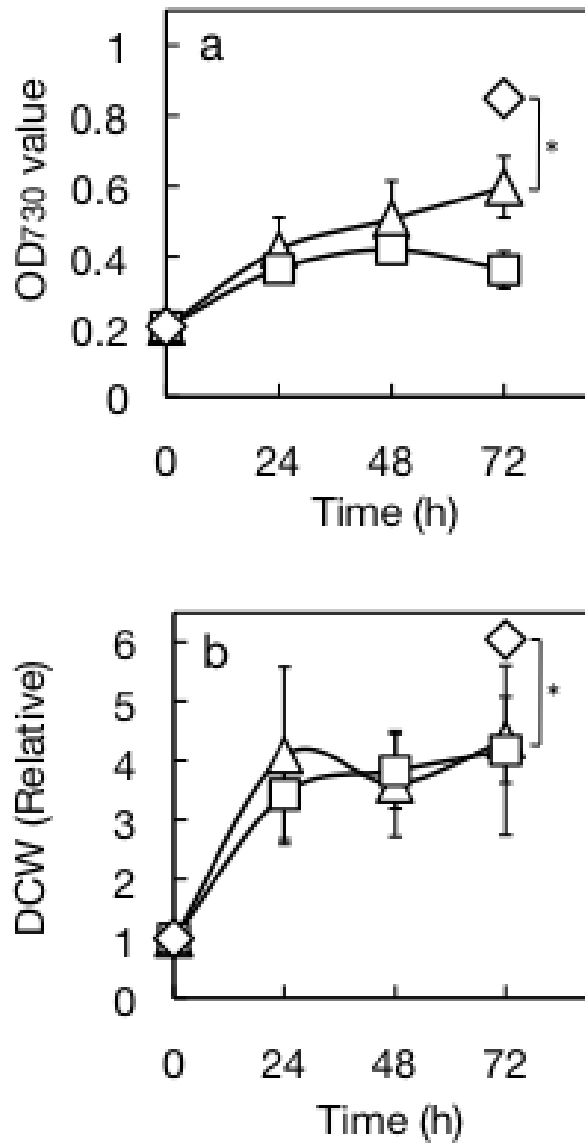


Fig. I-8 海水を用いた高浸透圧かつ栄養制限条件下での *C. kessleri* の、3 日間の生育. a, OD₇₃₀ 値; b, 初期に対する細胞乾重量. △, 1/3 MASF; □, MASF; ◇, 1/3 SW. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, P < 0.05

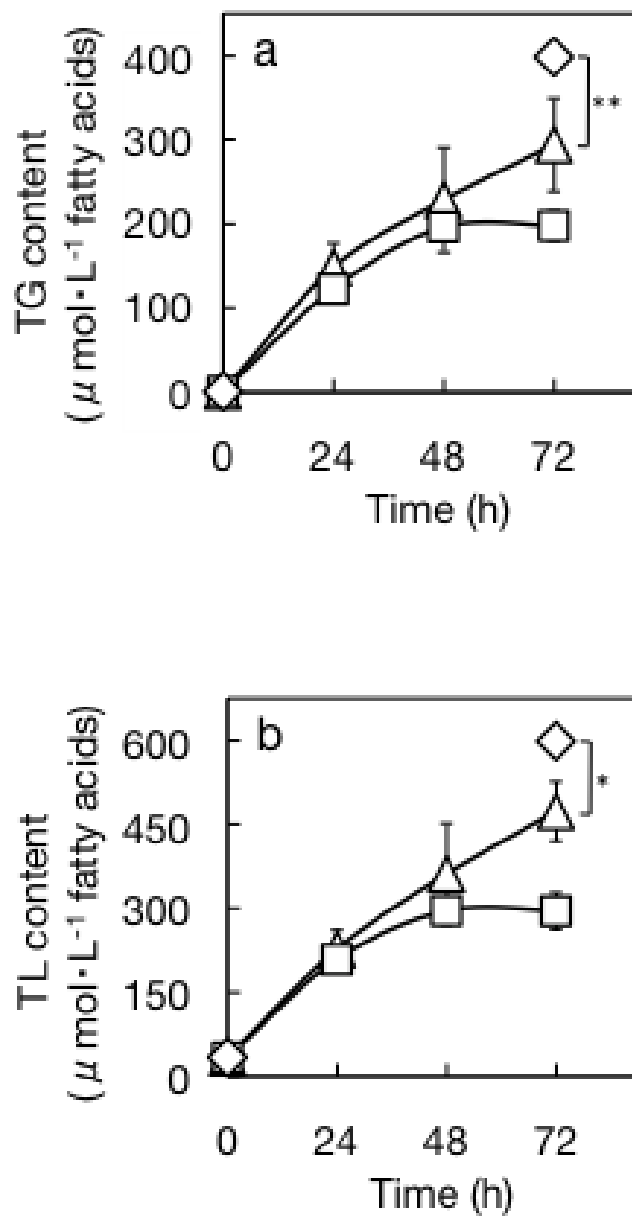


Fig. I-9 海水を用いた高浸透圧かつ栄養制限条件下での *C. kessleri* の、液量あたりの脂質含量. a, TG に含まれる脂肪酸量; b, 総脂質に含まれる脂肪酸量. Δ , 1/3 MASF; \square , MASF; \diamond , 1/3 SW. 誤差線は標準誤差. 差の有意性は t 検定による. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.1$

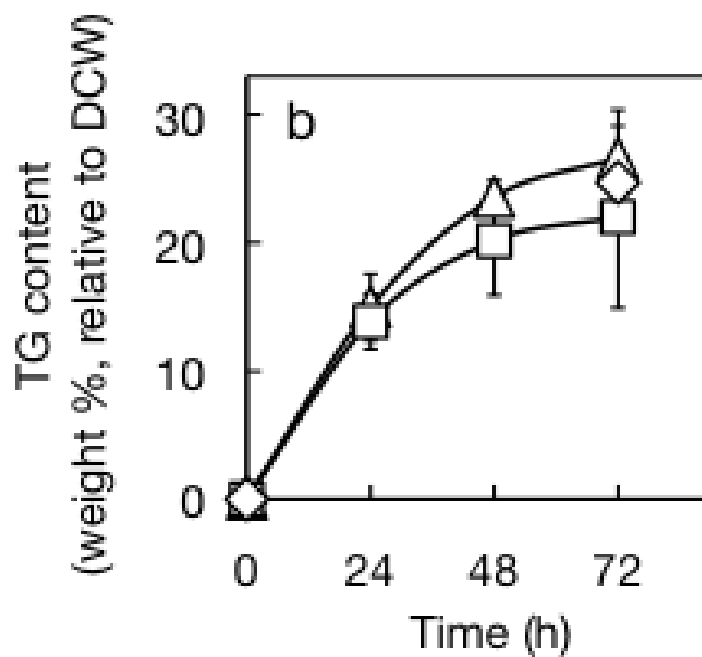
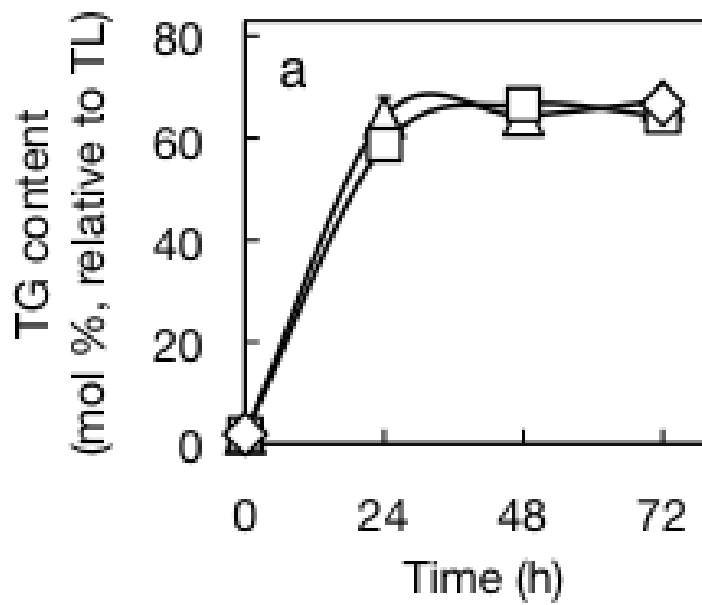


Fig. I-10 海水を用いた高浸透圧かつ栄養制限条件下での *C. kessleri* の、総脂質あるいは細胞乾重量あたりの TG 含量. a, 総脂質あたり(脂肪酸ベース); b, 細胞乾重量あたりの TG 重量(TG 中の脂肪酸の含量および組成より、TG の重量を算出). \triangle , 1/3 MASF; \square , MASF; \diamond , 1/3 SW. 誤差線は標準誤差.

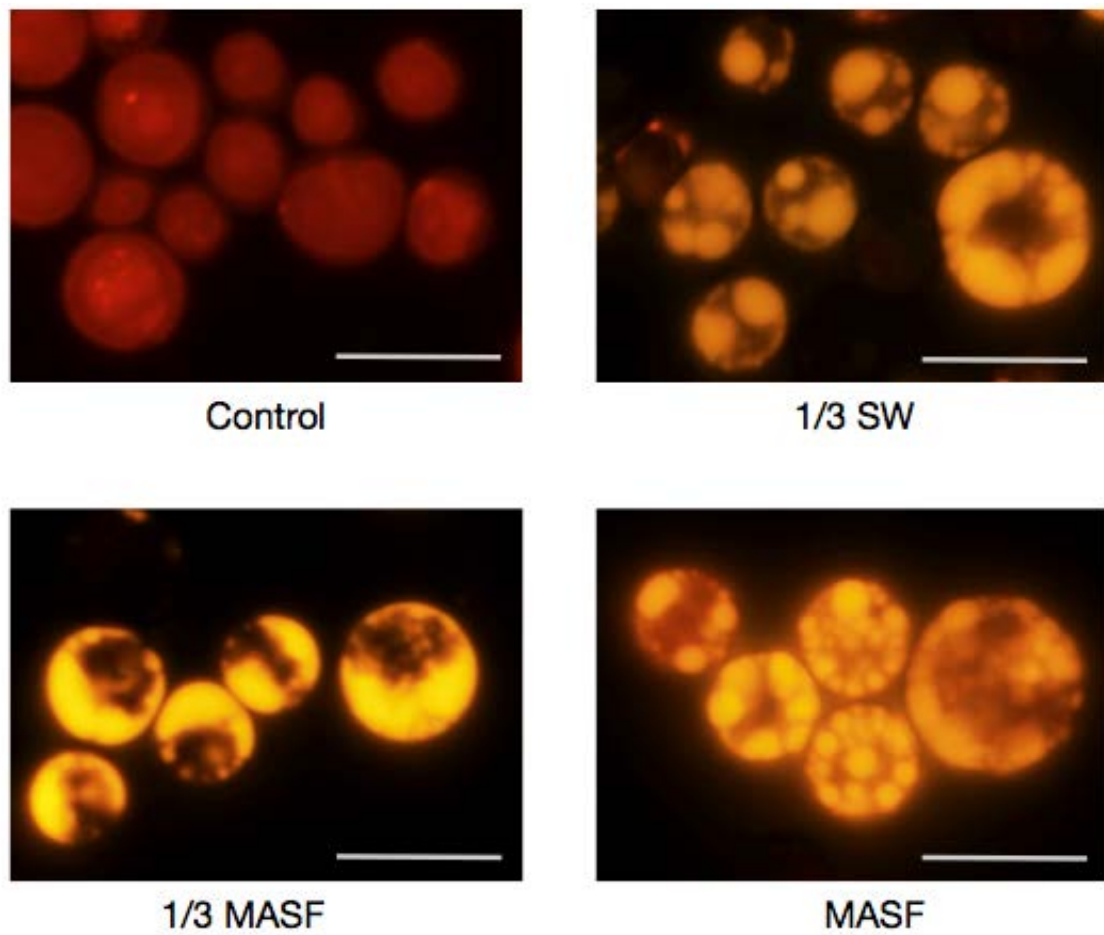


Fig. I-11 基本培地(1/4 GB 5)あるいは複合ストレス培地(1/3 SW, 1/3 MASF または MASF)で生育した *C. kessleri* の、Nile Red 染色による脂肪滴の観察. 白いスケールバーは 10 μ m.

第二章 シアノバクテリアにおける TG の検討と合成酵素

緒言

Nostoc commun や *Spirulina platensis* が TG を含んだという報告があるが(Taranto *et al.*, 1993; Ramadan *et al.*, 2008)、それはコンタミによるものの可能性がある。*Nostoc punctiforme* の脂肪滴から TG を抽出したという報告もあるが、TLC の Rf 値にのみ基づいた同定であり、それが TG であるという明確な証拠とは言えない(Peramuna and Summers, 2014)。いまのところ、シアノバクテリアが TG を持つかどうかは定かではない。例え TG があったとしても合成酵素や生理学的意義は未知である。緑藻の TG は、貯蔵物質としてや過剰な還元力の解消に関与するが、そういった役割は例えば PCC 6803 では PHB が担うことが示唆されている。また、シアノバクテリアでは β 酸化系の報告が無く、TG をエネルギーや炭素源として有効に利用できるのか疑問である。

考察

緑藻の TG のような役目は、PCC 6803 では主に PHB が担うのではないだろうか。*C. reinhardtii* はタンパク質合成抑制時に TG を蓄積するが(Sato *et al.*, 2014)、PCC 6803 においても、クロラムフェニコールの添加あるいはアルギニン合成系の遺伝子破壊によってタンパク質合成を抑制した際、PHB 顆粒を蓄積することを申請者は観察しており(Fig. S-1 下段左右)、これも緑藻における TG と PCC 6803 における PHB の役割の生理学的相似性を支持した。

申請者は修士課程までに、Syn-NLs の分解に関わる代謝系酵素の候補遺伝子として、PCC 6803 ゲノム中に TG lipase のホモログをコードする 2 つの ORF、すなわち *sll1969* および *sll0482* を見出だしている。アミノ酸配列で、*Sll1969* は *Bacillus subtilis* の分泌性 lipase である lipase class2(Pouderoyen *et al.*, 2001)と 32 % の相同性(Fig. S-4a)を示し、phyre2 で予測された 3D 構造も *Bacillus subtilis* のものと良く似ており、しかし *Candida antarctica* の lipase(Uppenberg *et al.*, 1994)に見られる様な *Bacillus subtilis* lipase には無い lid(蓋)構造や *Pseudomonas aeruginosa* の lipase にある酸性多糖に結合すると示唆される残基(Dimitrijevic *et al.*, 2011; Tielen *et al.*, 2013)が見受けられた(平井修士論文)。*Sll0482* は *Thermomyces lanuginosus* の lipase class3(Fernandez-Lafuente, 2010)と 32 % の相同性(Fig. S-4b)を示していた。*sll1969* と *sll0482* の双方ともに、lipase に特徴的な GXSXG のモチーフと、lipase 活性に重要である触媒三残基を構成する H, S, D およびセリン側にオキシアニオンホールと見られる構造が認められた(Fig.S-5ab, 6ab)。また、*sll1969* ホモログはシアノバクテリアの 16s rRNA の分子系統樹中、*DGAT2* ホモログより広範囲の種に見られた(データ非公開)。分泌性の lipase class2 は、環境中から脂質を取り込む(Kaczmarzyk and Fulda, 2010)ことに利用されると考えられたため、シアノバクテリアに広く存在することは理にかなっていた。*sll0482* ホモログは *DGAT2* ホモログを持つシアノバクテリアのうちのより狭い範囲に存在した(データ非公開)。lipase class3 は TG の分解の他、アシル転移活性やアシル交換活性も報告されている型の lipase であり、シアノバクテリア中での分布から、その獲得が Syn-NLs の利用をより効果的にする可能性も考えられた。また、Syn-NL-1 あるいは Syn-NL-2 の片方が Slr2103 の非特異性により副産される不要な物質である可能性もあり、その場合、副産物の分解に TG lipase が機能するかもしれない。*sll1969* と *sll0482* 遺伝子破壊による生理的機能の検討も行ったが、これによって Syn-NLs 代謝や含量に対する影響を積極的に支持する結果は未だ得られていない(データ非公開)。

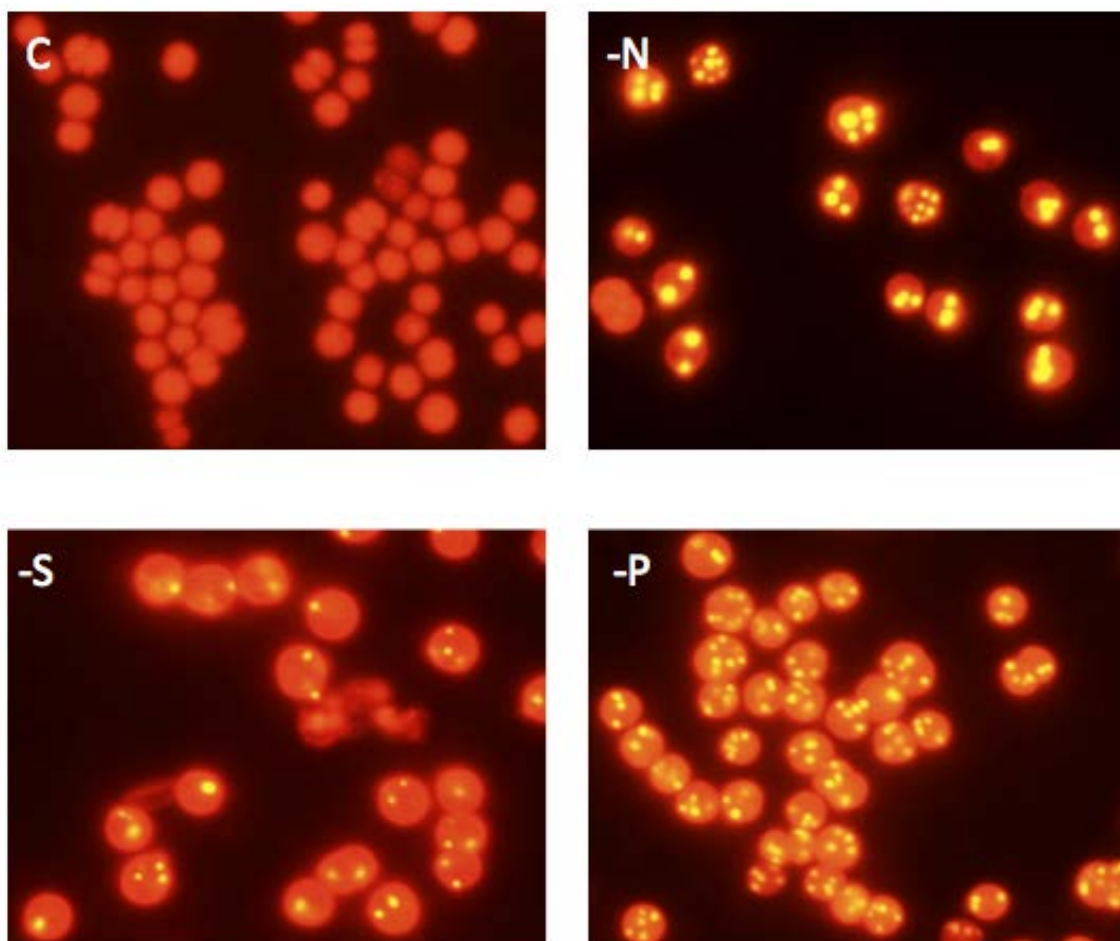


Fig. II-10 PCC 6803 を基本培地および各栄養欠乏培地で3日間培養した後の Nile Red 染色による観察. C, 基本培地(コントロール); -N, 窒素欠乏; -S, 硫黄欠乏; -P, リン欠乏

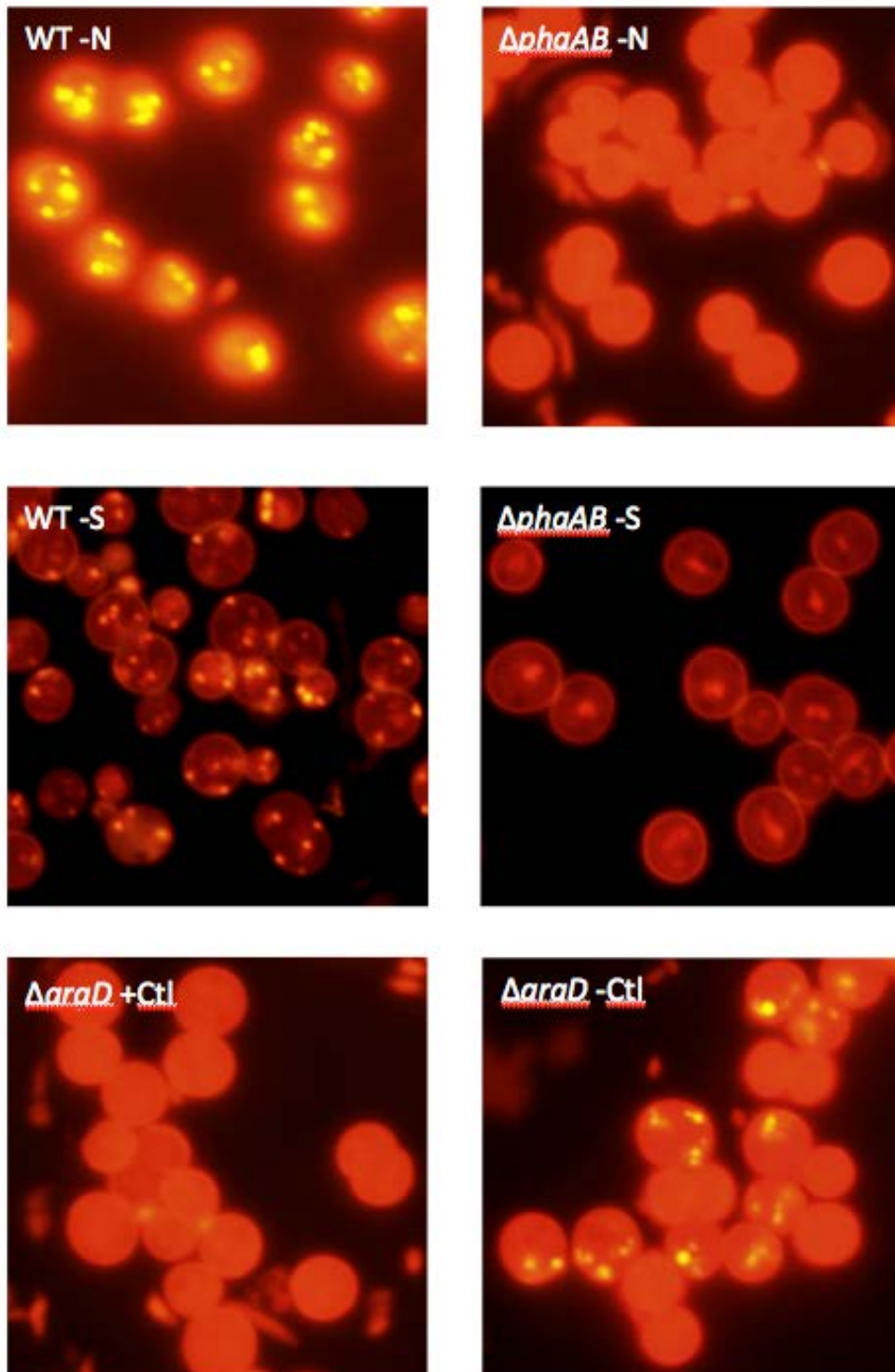


Fig. S-1 Nile Red 染色による脂肪滴あるいは PHB 顆粒の観察. PCC 6803 野生株(WT)または PHB 合成系破壊株($\Delta phaAB$, $phaA(slrl993)$ - $phaB(slrl994)$ オペロンの破壊)に対する窒素欠乏(-N)あるいは硫黄欠乏(-S)、およびアルギニン合成系破壊株($\Delta argD$, クエン酸回路から尿素回路に入る間で働く遺伝子 $argD$ の破壊, シトルリン(Ctl)の添加により尿素回路が成立ちアルギニンを合成できる)によるタンパク質合成抑制の効果.

a 上段 SII1969

下段 lipase from *Bacillus subtilis*

```

MVAEFPDRHPVVLVHGIYDTRAKFATMVDFLTGKGWS---VHCLDLVPNDGS--TSLALL
-----EHNPPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQGSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVL

AEQVKQYIDQKFAPQQFVDLIGHSMSGGLVTRYLQFLGGGERVRRYITISAPNQGTLLGY
SRFVQKVLDETCAKK--VDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANR-LTTGK

SLPHQGVREMAWQSDFLRDLNRDCCQLLAGLQVTMIWTPFDLMILPPSSSHLEIGQEIIL
ALPGT-----DFN-----QKILYTSIYSSADMIVMN-YLSRLDGARNVQI

PVLVHAWMVSDARCLAEVASALAKPLP--
HGVCHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNT

```

b 上段 SII0482

下段 lipase from *Thermomyces lanuginosus*

```

MGIFNRRRLLLGGVALGGAFTIGREERHRQEIRELQALAKAQAANTDRTS
-----MRSSLVL

MLNAAFEADAEEKIYRGEEIINSVRLTPPILPYDRQISQLLIRCSKIATQQ
FFVSAWTAALASPIRR-----EVSQDLFNQFNLFQYSAAA

YLTGKTIPSYDGNIRQLPAYSSDLDEYKQIASFRGREAHISESVAVQIFL
YCGKNNDAPAGTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGD-VTGFLAL

DNTGDPLDKTWDQAEDSLGETIRQVVKVTQEIPVYLGFISSPRNLIIVF
DNTN-----KLIVLSE

RGTQTMEWVNNLRAQQIPFTERRSGDYFGKIHQGFLENYLRIVSPIPRE
RGSRSIENWIGNLNFDLKEINDICSG---CRCHDGFSSWRSVADTLRQK

IAQQL--DPAVPCYVTGHSLGASLAVLAIDLAVNLPNLRSQIDLYSYAC
VEDAVREHPDYRVVFTGHSLGALATVAEADLRGNF----YDIDVFSYGA

PRVGDVTFQQLHSRQVP-NSYRIVNLADVIPLLPPTTGIGTYVHVHGQSW
PRVGNRAFAEFLTVQFGGTLYRITHTNDIVPRLPPRE-FG-YSHSSPEYW

FLS-----QGGDILPNHVVDIYQGAVDREVETDQSRDYPAAV----
IKSFTLPVTRNDIVKIEGIDATCGNNQPNIPDIPAH LWYFGLIGTCL

```

Fig. S-4 アミノ酸配列相同性の比較. a, SII1969 と lipase from *Bacillus subtilis* のアミノ酸配列のシーケンスアライメント. b, SII0482 と lipase from *Thermomyces lanuginosus* のアミノ酸配列のアライメント. 緑枠, GXSXG モチーフ; 赤枠, 触媒三残基 H, S, D

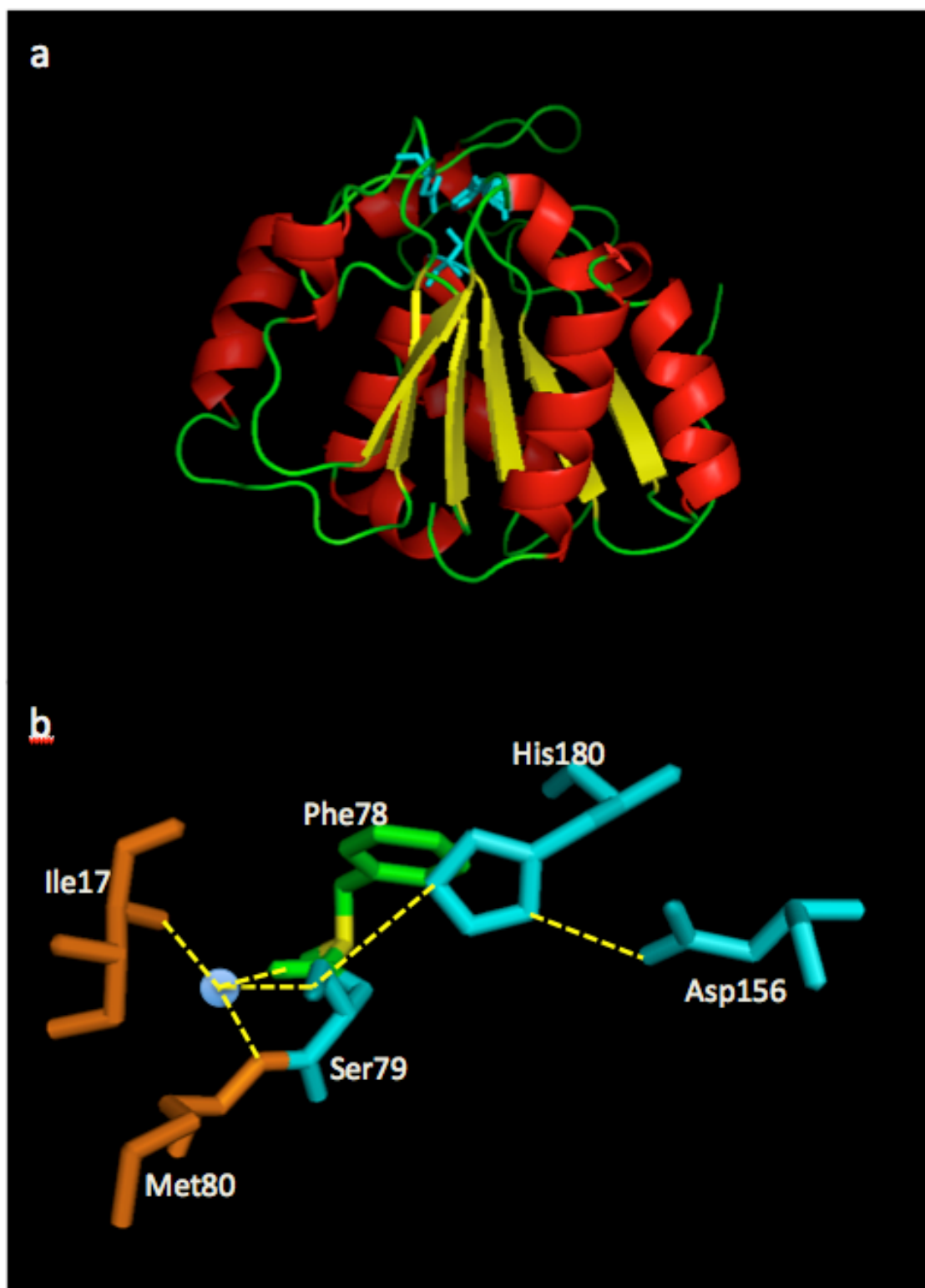


Fig. S-5 Phyre2 により予測された SII1969 の三次構造を PyMOL で表示した. a, SII1969 の全体の構造. 赤, α ヘリックス; 黄, β ストランド; 緑, ループ; シアン, 触媒三残基 b, 触媒三残基とオキシアニオンホール. 青球, 配位されると仮定される水分子; 黄破線, 予想される水素結合.

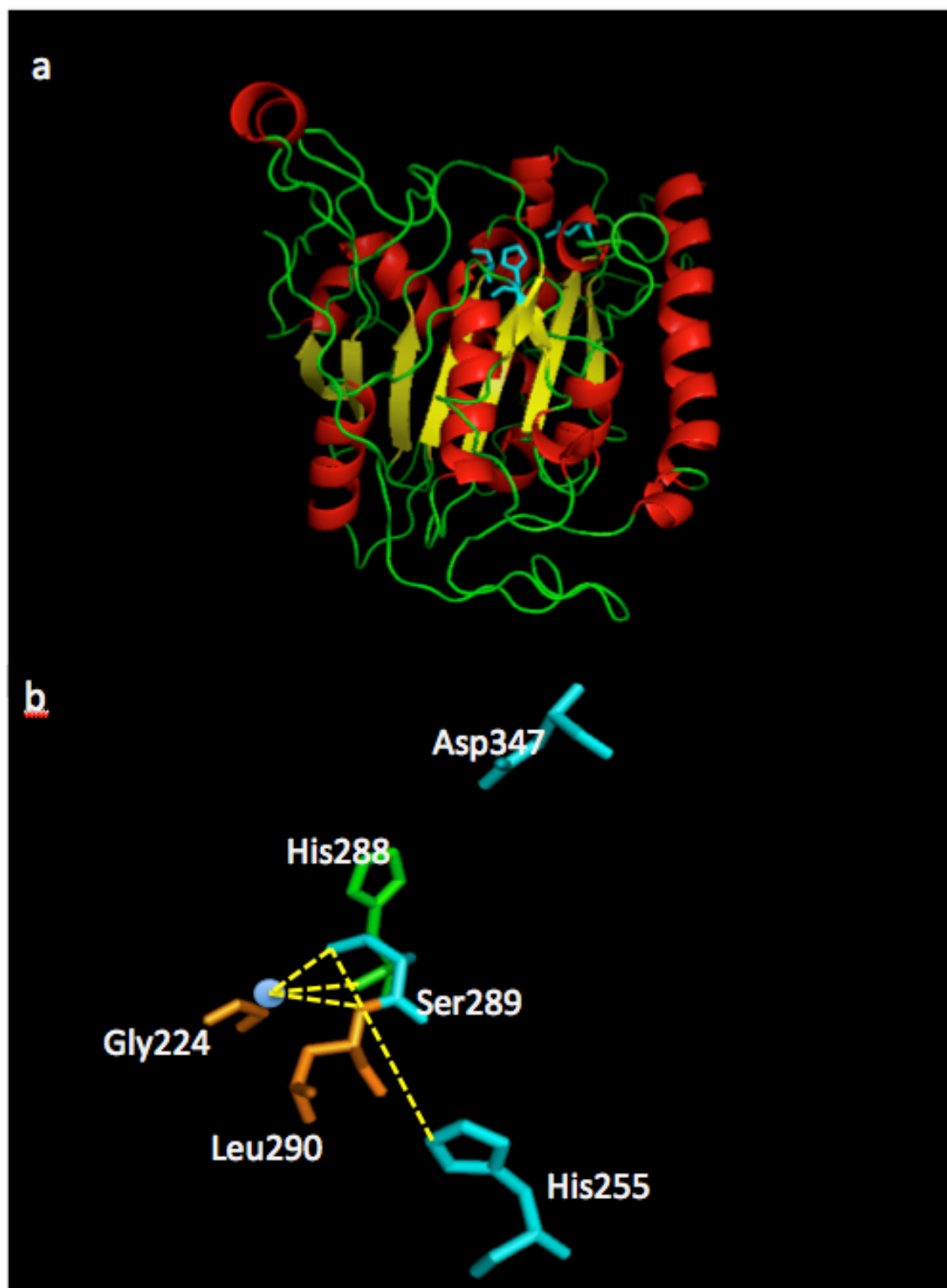


Fig. S-6 Phyre2 により予測された SII0482 の三次構造を PyMOL で表示した. a, SII0482 の全体の構造. 赤, α ヘリックス; 黄, β ストランド; 緑, ループ; シアン, 触媒三残基 b, 触媒三残基とオキシアニオンホール. 青球, 配位されると仮定される水分子; 黄破線, 予想される水素結合

参考文献

Allen, M. M. (1968)

Simple condition for growth of unicellular blue-green algae on plates.

J. Phycol. 4, 1-4

Alvarez, H. M. and Steinbuchel, A. (2002)

Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 367-376

Ariño, X., Ortega-Calvo, J. J., Hernandez-Marine, M. and Saiz-Jimenez, C. (1995)

Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeothecesp.* PCC 6909.

Arch. Microbiol. 163, 447-453

Athenstaedt, K. and Daum, G. (2006)

The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation.

Cell. Mol. Life Sci. 63, 1355-1369

Bansal, K., McCrady, J., Hansen, A. and Bhalerao, K. (2008)

Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel.

Fuel 87, 3369-3372

Battistuzzi, F. U. and Hedges, S. B. (2009)

A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land.

Mol. Biol. Evol. 26, 335-343

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers JR, Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977)

The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures.

J. Mol. Biol. 112, 535-542

Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959)

A rapid method for total lipid extraction and purification.

Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917

Boyle, N. R., Page, M. D., Liu, B., Blaby, I. K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S. J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S. J., Gallaher, S. D., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Grossman, A. and Merchant, S. S. (2012)

Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*.

J. Biol. Chem. 287, 15811-15825

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. and Wijffels, R. H. (2012)

The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains.

Bioresour. Technol. 124, 217-226

Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., Elibol, Z. and Tekinay, T. (2012)

Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*.

Biotechnol. Bioeng. 109, 1947-1957

Cao, H. (2011)

Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms.

BMC Res. Notes. 4, 249

Chisti, Y. (2007)

Biodiesel from microalgae.

Biotechnol. Adv. 25, 294-306

Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D. and Bigogno, C. (2000)

The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae.

Biochem. Soc. Trans. 28, 740-743

Collier, J. L. and Grossman, A. R. (1992)

Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same.

J. Bacteriol. 174, 4718-4717

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. and Stymne, S. (2000)
Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent
formation of triacylglycerol in yeast and plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6487-6492

Dimitrijevic, A., Velickovic, D., Rikalovic, M., Avramovic, N., Milosavic, N., Jankov, R. and Karadzic,
I. (2011)
Simultaneous production of exopolysaccharide and lipase from extremophylic *Pseudomonas aeruginosa*
san-ai strain: A novel approach for lipase immobilization and purification.
Carbohydrate Polymers 83, 1397-1401

Do, T. Q., Schultz, J.R. and Clarke, C. F. (1996)
Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of
autoxidized polyunsaturated fatty acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7534-7539

Dorne, A. J., Joyard, J. and Douce, R. (1990)
Do thylakoids really contain phosphatidylcholine?
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 71-74

Dvořák, P., Casamatta, D. A., Pouličková, A., Hašler, P., Ondřej, V. and Sanges, R. (2014)
Synechococcus: 3 billion years of global dominance.
Mol. Ecol. 23, 5538-5551

Eizadora, T. Y., Frank, J. Z., Pamela, D. L., Sara, G., Blake, A. S. and Todd, W. L. (2009)
Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and
Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) during starvation.
J. Appl. Phycol. 21, 669-681

Elenkov, I., Stefanov, K., Dimitrova-Konaklieva, S. and Popov, S. (1996)
Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*.
Phytochemistry 42, 39-44

Elkahoui, S., Smaoui, A., Zarrouk, M., Ghrir, R. and Limam, F. (2004)
Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions.
Phytochemistry 65, 1911-1917

Eroglu, E., Okada, S. and Melis, A. (2011)

Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification.

J. Appl. Phycol. 23, 763-775

Fan, J., Andre, C. and Xu, C. (2011)

A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*.

FEBS Lett. 585, 1985-1991

Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J. and Xu, C. (2012)

Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Plant Cell Physiol. 53, 1380-1390

Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W. and Li, Y. (2014)

Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors.

Biotechnol. Biofuels. 7, 17

Felsenstein, J. (1985)

Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.

Evolution 39, 783-791

Fernandez-Lafuente, R. (2010)

Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst.

J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 62, 197-212

Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010)

The biofilm matrix.

Nat. Rev. Microbiol. 8, 623-633

Fujisawa, T., Narikawa, R., Maeda, S., Watanabe, S., Kanesaki, Y., Kobayashi, K., Nomata, J., Hanaoka, M., Watanabe, M., Ehira, S., Suzuki, E., Awai, K. and Nakamura, Y. (2016)

CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary.

Nucleic Acids Res., gkw1131

Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996)

SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny.
Comput. Appl. Biosci. 12, 543-548

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968)

Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.
Experimental Cell Research 50, 151-158

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. and Singh, R. M. M. (1966)

Hydrogen ion buffers for biological research.
Biochemistry 5, 467-477

Gounaris, K., Barber, J. and Harwood, L. (1986)

The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts.
Biochem. J. 237, 313-326

Guckert, J. B. and Cooksey, K. E. (1990)

Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition.
J. Phycol. 26, 72-79

Hauf, W., Schlebusch, M., Huge, J., Kopka, J., Hagemann, M. and Forchhammer, K. (2013)

Metabolic changes in *Synechocystis* PCC 6803 upon nitrogen-starvation: excess NADPH sustains polyhydroxybutyrate accumulation.
Metabolites 3, 101-118

Haverkamp, T. H., Schouten, D., Doeleman, M., Wollenzien, U., Huisman, J. and Stal, L. J. (2008)

Colorful microdiversity of *Synechococcus* strains (picocyanobacteria) isolated from the Baltic Sea.
ISME J. 3, 397-408

Hennen, W. J., Sweers, H. M., Wang, Y. F. and Wong, C. H. (1988)

Enzymes in carbohydrate synthesis: lipase-catalyzed selective acylation and deacylation of furanose and pyranose derivatives
J. Org. Chem. 53, 4939-4945

- Hirai, K., Hayashi, T., Hasegawa, Y., Sato, A., Tsuzuki, M. and Sato N. (2016)
Hyperosmosis and its combination with nutrient-limitation are novel environmental stressors for induction of triacylglycerol accumulation in cells of *Chlorella kessleri*.
Sci. Rep. 6, 25825
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998)
SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins.
Bioinformatics 14, 378-379
- Hirosawa, M., Kaneko, T. and Tabata, S. (1995)
Cyanobase : visual presentation of information on genome of cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 through WWW.
Proceedings of Genome Informatics Workshop 1995, 102-103
- Hirose, Y., Sato, M. and Ikeuchi, M. (2009)
Cyanobacterium.
Inst. Low Temp. Sci. 67, 9-15
- Holmes, R. S. (2010)
Comparative genomics and proteomics of vertebrate diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acyl CoA wax alcohol acyltransferase (AWAT) and monoacylglycerol acyltransferase (MGAT).
Comp. Biochem. Physiol. Part. D Genomics Proteomics 5, 45-54
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008)
Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.
Plant J. 54, 621-639
- Ichihara, K., Takahashi, T. and Fujii, S. (1988)
Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 958, 125-129
- Iwai, M., Hirose, Y. and Ikeuchi, M. (2009)
Transformation of cyanobacteria.
Inst. Low Temp. Sci. 67, 575-582

- Jako, C., Kumar, A., Wei, Y., Zou, J., Barton, D. L., Giblin, E. M., Covello, P.S. and Taylor, D. C. (2001)
Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight.
Plant Physiol. 126, 861-874
- Jefferys, B. R., Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. (2010)
Protein folding requires crowd control in a simulated cell.
J. Mol. Biol. 397, 1329-1338
- Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F. (2013)
Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC 6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses.
PLoS One 8, e55564
- Kaczmarzyk, D. and Fulda, M.(2010)
Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling.
Plant Physiol. 152, 1598-1610
- Kalpesh, K. S., Holger, S. and Peer, M. S. (2012)
High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production.
Energies 5, 1532-1553
- Kaya, K., Nakazawa, A., Matsuura, H., Honda, D., Inouye, I. and Watanabe, M. M. (2011)
Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 2246-2248
- Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. (2009)
Protein structure prediction on the Web: a case study using the phyre server.
Nat. Protoc. 4, 363-371
- Khozin-Goldberg, I., Shrestha, P. and Cohen, Z. (2005)
Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*.
Biochem. Biophys. Acta 1738, 63-71

- Krienitz¹, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T. and Wolf, M. (2004)
Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).
Phycologia. 43, 529-542
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. (2001)
Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete
genomes.
J. Mol. Biol. 305, 567-580
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin,
F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007)
Clustal W and Clustal X version 2.0.
Bioinformatics 23, 2947-2948
- Leray, C., Pelletier, X., Hemmendinger, S. and Cazenave, J. P. (1987)
Thin-layer chromatography of human platelet phospholipids with fatty acid analysis.
J. Chromat. 420, 411-416
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., Kuo, M. H. and Benning, C.
(2012)
A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen
deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Plant Cell 24, 4670-4686
- Li, X., Přibyl, P., Bišová, K., Kawano, S., Cepák, V., Zachleder, V., Čížková, M., Brányiková, I. and
Vítová, M. (2013)
The microalga *Parachlorella kessleri* - a novel highly efficient lipid producer.
Biotechnol. Bioeng. 110, 97-107
- Liu, Q., Siloto, R. M., Lehner, R., Stone, S. J. and Weselake, R. J. (2012)
Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology.
Prog. Lipid Res. 51, 350-377
- Mackinney, G. (1941)
Absorption of light by chlorophyll solutions.
J. Biol. Chem. 140, 315-322

McGinnis, S. and Madden, T. L. (2004)

BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools.

Nucleic Acids Res. 32, W20-25

Mock, T. and Kroon, B. M. (2002)

Photosynthetic energy conversion under extreme conditions - I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms.

Phytochemistry 61, 41-51

Moellering, E. R., Muthan, B. and Benning, C. (2010)

Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane.

Science 330, 226-228

Mora, G., Scharnewski, M. and Fulda, M. (2012)

Neutral lipid metabolism influences phospholipid synthesis and deacylation in *Saccharomyces cerevisiae*.

PLoS One 7, e49269

Munns, R., Greenway, H., Setter, T. L. and Kuo, J. (1982)

Turgor pressure, volumetric elastic modulus, osmotic volume and ultrastructure of *Chlorella emersonii* grown at high and low external NaCl.

Journal of Experimental Botany 34, 144-155

Murphy, D. J. (2005)

Plant lipids : biology, utilisation and manipulation.

Oxford: Blackwell Pub.

Nakamichi, Y., Yoshioka, A., Kawai, S. and Murata, K. (2013)

Conferring the ability to utilize inorganic polyphosphate on ATP-specific NAD kinase.

Sci. Rep. 3, 2632

Osanai, T., Oikawa, A., Shirai, T., Kuwahara, A., Iijima, H., Tanaka, K., Ikeuchi, M., Kondo, A., Saito, K. and Hirai, M. Y. (2014)

Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Environ. Microbiol. 16, 512-524

- Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Yoshihara, M., Takeda, K., Takeshita, T., Hirata, A., Bišová, K., Zachleder, V., Hattori, M. and Kawano, S. (2016)
Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure.
Biotechnol. Biofuels 9, 13
- Pacheco, S. A., Hsu, F. F., Powers, K. M. and Purdy, G. E. (2013)
MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*.
J. Biol. Chem. 288, 24213-24222
- Panda, B., Sharma, L. and Mallick, N. (2005)
Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation.
J. Plant Physiol. 162, 1376-1379
- Peramuna, A. and Summers, M. L. (2014)
Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*.
Arch. Microbiol. 196, 881-890
- Perrière, G. and Gouy, M. (1996)
WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks.
Biochimie. 78, 364-369
- Perry, H. J. and Harwood, J. L. (1993)
Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus*.
Phytochemistry 32, 1411-1415
- Petschnigg, J., Wolinski, H., Kolb, D., Zellnig, G., Kurat, C. F., Natter, K. and Kohlwein, S. D. (2009)
Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast.
J. Biol. Chem. 284, 30981-30993

- Piorreck, M., Baasch, K. H. and Pohl, P. (1984)
Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes.
Phytochemistry 23, 207-216
- Porter, N. A. (1986)
Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids.
Acc. Chem. Res. 19, 262-268
- Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. E. and Dijkstra¹, B.W. (2001)
The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal a/b hydrolase fold enzyme.
J. Mol. Biol. 309, 215-226
- Pouilly, N. and Mitchell, C. G. (1994)
The enzymes of beta-oxidation in *Rhodococcus ruber*.
Biochem. Soc. Trans. 22, 223S
- Quettier, A. L. and Eastmond, P. J. (2009)
Storage oil hydrolysis during early seedling growth.
Plant Physiol. Biochem. 47, 485-490
- Radner, F. P. and Fischer, J. (2013)
The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function.
Biochim. Biophys. Acta 1841, 409-415
- Rajakumari, S., Rajasekharan, R. and Daum, G. (2010)
Triacylglycerol lipolysis is linked to sphingolipid and phospholipid metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem. Biophys. Acta 1801, 1314-1322
- Ramadan, M. F., Asker, M. M. S. and Ibrahim, Z. K. (2008)
Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids
Czech J. Food Sci. 26, 211-222

Ratledge, C. (1993)

Single cell oils - have they a biotechnological future?

Trends Biotechnol. 11, 278-284

Ratledge, C. and Wynn, J. P. (2002)

The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms.

Adv. Appl. Microbiol. 51, 1-51

Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W. T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Rubin, E. M., Hugenholtz, P. and Woyke, T. (2013)

Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter.

Nature 499, 431-437

Röttig, A. and Steinbüchel, A. (2013)

Acyltransferases in bacteria.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 277-321

Saitou, N. and Nei, M. (1987)

The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.

Mol. Biol. Evol. 4, 406-425

Sakamoto, T., Delgaizo, V. B. and Bryant, D. A. (1998)

Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002.

Appl. Environ. Microbiol. 64, 2361-2366

Sato, N. (2004)

Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution.

J. Plant Res. 117, 495-505

Sato, N. and Wada, H. (2009)

Lipid biosynthesis and its regulation in cyanobacteria.

Lipids in Photosynthesis 30, 157-177

- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. and Tsuzuki, M. (2000)
Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes.
Proc. Natl. Sci. U. S. A. 97, 10655-10660
- Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, H., Tsuzuki, M. and Sato, N. (2014)
Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Front. Plant Sci. 5, 444
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995)
RASMOL: biomolecular graphics for all.
Trends Biochem. Sci. 20, 374
- Schirmer, A., Rude, M. A., Li, X., Popova, E. and del Cardayre, S. B. (2010)
Microbial biosynthesis of alkanes.
Science 329, 559-562
- Selstam, E. and Campbell, D. (1996)
Membrane lipid composition of the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* sp. PCC 7421, which lacks sulfoquinovosyl diacylglycerol.
Archives of Microbiology 166, 132-135
- Sheng, J., Vannela, R. and Rittmann, B. E. (2011)
Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803.
Bioresour. Technol. 102, 1697-1703
- Shi, Y. and Cheng, D. (2009)
Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297, E10-E18
- Shiratake, T., Sato, A., Minoda, A., Tsuzuki, M. and Sato, N. (2013)
Air-drying of cells, the novel conditions for stimulated synthesis of triacylglycerol in a green alga, *Chlorella kessleri*.
PLoS One 8, e79630

- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G. (2011)
Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves.
BMC Biotechnol. 11, 7
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G. (1977)
Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria.
Annu. Rev. Microbiol. 31, 225-274.
- Stone, S. J., Levin, M. C. and Farese, R. V. Jr. (2006)
Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2.
J. Biol. Chem. 281, 40273-40282
- Stöveken, T., Kalscheuer, R., Malkus, U., Reichelt, R. and Steinbüchel, A. (2005)
The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase.
J. Bacteriol. 187, 1369-1376
- Takagi, M., Karseno and Yoshida, T. (2006)
Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells.
J. Biosci. Bioeng. 101, 223-226
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T. and Sakamoto, T. (2005)
Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.
Appl. Environ. Microbiol. 71, 7327-7333
- Taranto, P. A., Keenan, T. W. and Potts, M. (1993)
Rehydration induces rapid onset of lipid biosynthesis in desiccated *Nostoc commune* (cyanobacteria).
Biochem. Biophys. Acta 1168, 228-237

Tsuji, Y., Suzuki, I. and Shiraiwa, Y. (2009)

Photosynthetic carbon assimilation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Haptophyta): Evidence for the predominant operation of the c3 cycle and the contribution of β -carboxylases to the active anaplerotic reaction.

Plant Cell Physiol. 50, 318-329

Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksch, P. and Martin, W. (2011)

Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet.

J. Eukaryot. Microbiol. 57, 63-69

Turchetto-Zolet, A. C., Maraschin, F. S., de Moraes, G. L., Cagliari, A., Andrade, C. M., Margis-Pinheiro, M. and Margis, R. (2011)

Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis.

BMC Evol. Biol. 11, 263

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. and Palmer, J. D. (1999)

Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis.

J. Eukaryot. Microbiol. 46, 327-338

Tielen, P., Kuhn, H., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Flemming, H. C. and Wingender, J. (2013)

Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*.

BMC Microbiol. 13, 159

Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. and Jones, T. A. (1994)

The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*.

Curr. Biol. 15, 293-308

Urzica, E. I., Vieler, A., Hong-Hermesdorf, A., Page, M. D., Casero, D., Gallaher, S. D., Kropat, J., Pellegrini, M., Benning, C. and Merchant, S. S. (2013)

Remodeling of membrane lipids in iron-starved *Chlamydomonas*.

J. Biol. Chem. 288, 30246-30258

Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H. J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., von Landenberg, P. and Steinbüchel, A. (2005)

Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up.

Mol. Microbiol. 55, 750-763

Wang, Z. T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S. and Goodenough, U. (2009)

Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*.

Eukaryot. Cell 8, 1856-1868

Wang, W., Liu, X. and Lu, X. (2013)

Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes.

Biotechnol. Biofuels 6, 69

Wang, D., Ning, K., Li, J., Hu, J., Han, D., Wang, H., Zeng, X., Jing, X., Zhou, Q., Su, X., Chang, X., Wang, A., Wang, W., Jia, J., Wei, L., Xin, Y., Qiao, Y., Huang, R., Chen, J., Han, B., Yoon, K., Hill, R. T., Zohar, Y., Chen, F., Hu, Q. and Xu, J. (2014)

Nannochloropsis genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits.

PLoS Genet. 10, e1004094

Williams, K. J., Boshoff, H. I., Krishnan, N., Gonzales, J., Schnappinger, D. and Robertson, B. D. (2011)

The *Mycobacterium tuberculosis* β -oxidation genes *echA5* and *fadB3* are dispensable for growth *in vitro* and *in vivo*.

Tuberculosis (Edinb.) 91, 549-555

Wright, R. S. (1971)

A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatograms.

J. Chromatogr. 59, 220-221

Wu, G. F., Wu, Q. Y. and Shen, Z. Y. (2001)

Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Bioresour. Technol. 76, 85-90

Xu, J., Kazachkov, M., Jia, Y., Zheng, Z. and Zou, J. (2013)

Expression of a type 2 diacylglycerol acyltransferase from *Thalassiosira pseudonana* in yeast leads to incorporation of docosahexaenoic acid β -oxidation intermediates into triacylglycerol.

FEBS J. 280, 6162-6272

Yamamoto, M., Kurihara, I. and Kawano, S. (2005)

Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).

Planta 221, 766-775

Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2012)

Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga

Chlamydomonas reinhardtii.

Plant Cell 24, 3708-3724

Yoshida, M., Tanabe, Y., Yonezawa, N. and Watanabe, M. M. (2012)

Energy innovation potential of oleaginous microalgae.

Biofuels 3, 761-781

Yuan, Y., Leeds, J. A. and Meredith, T. C. (2012)

Pseudomonas aeruginosa directly shunts β -oxidation degradation intermediates into *de novo* fatty acid biosynthesis.

J. Bacteriol. 194, 5185-5196

謝辞

本論文は申請者が東京薬科大学大学院生命科学研究科生命科学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。本研究の遂行にあたり、多くの方々、とりわけ以下の方々に、多大なご指導、ご協力を頂いたことに、深い感謝の意を表する。

東京薬科大学生命科学部応用生命科学科教授 都筑幹夫 先生
東京薬科大学生命科学部応用生命科学科教授 渡邊一哉 先生
東京薬科大学生命科学部応用生命科学科准教授 玉腰雅忠 先生
東京薬科大学生命科学部応用生命科学科准教授 藤原祥子 先生
東京薬科大学生命科学部応用生命科学科講師 佐藤典裕 先生

相模拓 氏
林泰平 氏
長谷川柚里 氏
江並一成 氏
佐藤淳史 氏
能城美紀 氏