T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	車軸藻植物門 Klebsormidium flaccidum が持つ原始的な細胞外脂質に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	近藤智
Author(English)	Satosi Kondo
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10364号, 授与年月日:2016年10月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:太田 啓之,久堀 徹,田中 寛,増田 真二,下嶋 美恵,粟井 光一郎
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10364号, Conferred date:2016/10/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

車軸藻植物門 *Klebsormidium flaccidum* が持つ

原始的な細胞外脂質に関する研究

2016 年度博士論文

近藤　智

東京工業大学大学院生命理工学研究科

生体システム専攻

目次

研究概要 1

１．序言 4

２．*Klebsormidium flaccidum* のゲノム配列から推定される細胞外脂質生合成関連タンパク質の探索

緒言 10

方法 11

結果 12

考察 15

３．*K. flaccidum* および *C. reinhardtii* の細胞外脂質の分析

緒言 50

方法 53

結果 62

考察 70

４．総合考察 97

参考文献 101

謝辞 112

研究概要

現存する陸上植物は、車軸藻植物門の祖先から分枝したと考えられている。クレブソルミディウム藻綱は多系統群からなる車軸藻植物門の中でも初期に分岐した綱であり、多細胞性で枝分かれのない糸状性の体制を持つ。クレブソルミディウムは気生藻類と呼ばれる相当程度陸上環境に適応した藻類の一種でありその分布は広く、北緯 78 度 55 分という高緯度に位置するニーオーレスンの土壌表層や、南アフリカの biological soil crust、標高 2,350m のヨーロッパアルプスの土壌表層、日本などのコンクリート表面など、世界中で穏やかな環境から厳しい環境ストレス条件下にまで生息している。

このように陸上環境に適応したクレブソルミディウムは陸上植物に類似したクチクラ構造をもつのではないかと推測し、植物の陸上環境への適応機構の起源を探るため、ゲノム解析が完了しており、代表的な種である *Klebsormidium flaccidum* の細胞外脂質とクチンの存在を調べた。まず陸上植物の細胞外脂質の主要成分であるワックスエステルとアルカンの合成経路について *K. flaccidum* のゲノム情報を解析した結果、極長鎖脂肪酸合成に必要な縮合酵素と二つの還元酵素、脱水酵素、およびワックスエステル合成に必要なワックスシンターゼのカウンターパートが見つかったものの、1 級アルコールを合成するレダクターゼのカウンターパートが見つからないためワックスエステルを合成できないと推測された。一方、アルカンの合成経路についてはアルカン、2 級アルコール、ケトン合成に関与するタンパク質群のカウンターパートがみつからなかったため、それらも合成できないと考えられた。クチンモノマー合成については、オレイン酸あるいはパルミチン酸を前駆体とした ω-ヒドロキシ脂肪酸と ω-オキソ脂肪酸は合成が可能でクチンのポリマー化も可能と考えられたため、クチンポリマーが存在すると推測された。よって *K. flaccidum* のクチクラ構造は陸上植物とは異なる成分で構成されることが予想された。そこで、寒天培地上で培養した *K. flaccidum* をクロロホルムに短時間浸漬し細胞外脂質を抽出・分析した。その結果、

アルカン、ステロールエステル、フィチルエステル、トリアシルグリセロール（TAG)、遊離ステロールが検出され、*Arabidopsis thaliana* で検出された成分とは大きく異なることがわかった。また *K. flaccidum* の細胞外脂質の量は *A. thaliana* の約 2 倍と多かった。しかし、細胞の表層構造が未知なため、短時間クロロホルム抽出では細胞膜の損傷などによる細胞内部の中性脂質の漏出が懸念された。そこでニトロセルロース膜上で培養した *K. flaccidum* の細胞外脂質をシリカゲル TLC プレートに直接転写し、脂質を抽出する方法を考案し、細胞外脂質の分析を行った。その結果、本法ではアルカンと TAG のみが検出された。アルカンについてはクロロホルム抽出と同様、ドコサンが検出されたが、TAG については、クロロホルム抽出で得られた TAG の脂肪酸組成とは異なり飽和脂肪酸が多かった。シリカゲル TLC プレートに転写し抽出された脂質の回収量はクロロホルム抽出の場合と比較して非常に少なく 1/100 程度だった。*K. flaccidum* にクチンに相当する構造があるのかを探るため、*A. thaliana* のクチンモノマー調製法に準じ脱脂した *K. flaccidum* の細胞壁画分から強塩基処理により溶出する脂質を調べた。溶出画分の分析の結果、*K. flaccidum* の細胞壁画分に多量の脂肪酸が結合していることがわかった。一方 *A. thaliana* の場合と異なり、ヒドロキシ脂肪酸や２級アルコール類が見つからなかったため脂肪酸がクチン状にエステル結合しているとは考えにくかった。そこで ATR-FTIR により、脱脂した *K. flaccidum* の細胞壁画分を *A. thaliana* や *Chlamydomonas reinhardtii* から同様に調製した画分と比較すると、*K. flaccidum* には、*C. reinhardtii* と同様なアミド結合の存在が示唆された。この結果から、*K. flaccidum* の細胞壁画分から得られた多量の脂肪酸は、細胞壁を構成するタンパク質とアミド結合により直接結合していると考えられた。カルコフロールホワイト染色により *K. nitens* には多糖で構成された細胞壁が存在すると推定されているため、*K. flaccidum* にも細胞壁に多糖が存在すると予想される。また *K. flaccidum* はドリセラーゼやセルラーゼによる消化を受けないことが報告されている。これらの報告と本実験結果から、*K. flaccidum* の細胞壁には多糖

からなる層の上に糖タンパク質でできた骨組みがあり、その骨組みに脂肪酸がアミド結合し、細胞表層に疎水的な環境を提供していると考えられた。細胞壁に結合した脂肪酸近傍には疎水性相互作用により細胞外脂質成分が蓄積し、アルカンと TAG の一部が最表層に存在すると考えられた。このように *K. flaccidum* は陸上植物とは異なる原始的なクチクラ構造を持つと考えられ、この層の存在により *K. flaccidum* の細胞が環境ストレスから保護され、乾燥や強光など過酷な陸上条件でも生育できるのではないかと考えられた。

１．序言

地球が誕生して約 46 億年が経過した現在、地球上には約 30 万種の植物が存在すると推定されている（Mora ら、2011）。27 億 5 千万年前に酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアが誕生（Brocks ら、1999）して以来、大気中の酸素濃度が緩やかに増加し、その後 9〜6 億年前の間に急激に酸素濃度が上昇して 5 億年前には現在とほぼ同等の酸素濃度になったと考えられている（Holland、2007）。非光合成真核細胞がシアノバクテリア様原核細胞を貪食し真核藻類が誕生したのがおよそ 16 億年前と推定されており（Yoon ら、2004）、その後約 10 億年の共進化によって非常に多様な一次生産者が生まれた（Gould ら、2008）。そして酸素濃度が現在と同定度になったのとほぼ同じ時期、約 4 億 8 千万年前にこれまで水中で生存していた光合成生物が上陸したと推定されている（Wickett ら、2014）。現存する陸上植物は車軸藻植物門から分岐したと考えられており（Lewis & McCourt、2004；Leliaert ら、2012）、その車軸藻植物門は、アオサ藻綱と緑藻綱、トレボウクシア藻綱等を含む緑藻植物門に属するプラシノ藻綱から分岐したと考えられている。この門は分子系統学的に 5 綱を含めた多系統であり、クロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱、コレオケーテ藻綱、シャジク藻綱、接合藻綱が含まれる（図 1-1）（堀 & 太田、2016）。中でも陸上植物に近い綱はコレオケーテ藻綱、シャジク藻綱、接合藻綱の 3 綱とされ、現在では接合藻綱を陸上植物の姉妹群とする説が有力である（Timme ら、2012；Wickett ら、2014）。

車軸藻植物門の形態的な特徴は以下のとおりである。クロロキブス藻綱は同型配偶子の単細胞藻類であり非運動性栄養相を持つ。クレブソルミディウム藻綱では配偶体における多細胞性と C/N ペルオキシソームの存在が認められる。細胞分化や有性生殖は報告されておらず、遊走子による無性生殖が認められている。コレオケーテ藻綱ではプラズモデスマータ、3 次元の細胞分裂、頂端生長、卵接合が認められる。シャジク藻綱では遊走子の消失、

仮根原糸体と卵の被覆、ねじれたひも状の精子が認められる。そして接合藻綱では藻体の分岐や細胞分裂時のフラグモプラスト形成、セルロース合成ロゼット、有性生殖、乾燥耐性接合胞子が認められる（Lewis & McCourt、2004；Timme ら、2012）。これに対し、陸上植物はクチクラやフラボノイドの合成、胚形成、造精器・造卵器形成などの特徴を備える。また、生活環と体制から車軸藻植物門の特徴をみると、配偶体の方が接合体よりも生活環に占める時間が長く、体制も大きい場合が多い。配偶体が作った卵と精子から接合子ができるが、接合子は発芽すると体細胞分裂をせず減数分裂して配偶体になり、胞子体は作らない。進化的に維管束植物に近づくにつれて 1 倍体よりも 2 倍体の方が大きくなる。上陸に際して、多細胞の配偶体だけの生活環を持つシャジク藻綱、コレオケーテ藻綱が接合体において減数分裂の開始を遅らせ、減数分裂の前に体細胞分裂を行って多細胞の 2 倍体世代（胞子体）を形成したのであろうという新生説が提案されている（坂山、2010）。

車軸藻植物門で初期に分岐したクロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱はいずれも、淡水中および厳しい環境ストレスに晒される多湿土壌表層などに生育している。クロロキブスが単細胞であるのに対しクレブソルミディウムは単純な体制ではあるが多細胞性である。またクレブソルミディウムは標高 2,350 m のヨーロッパアルプスの土壌表層（Karsten ら、2010）や乾燥する南アフリカの biological soil crust（Karsten ら、2015）、北緯 78 度 55 分に位置する寒冷なニーオーレスン（Kaštovská、2005）の土壌表層にも生育しており、日本国内でも居住地の土壌やコンクリート表面など、厳しい環境から穏やかな環境まで、世界のあらゆる場所で生育している。実際、クレブソルミディウム藻綱は乾燥ストレス（Herburger ら、2015；Karsten ら、2015）、低温ストレス（Nagao ら、2008）、浸透圧ストレス（Kaplan ら、2012）に対する耐性が高いことが実験的に確認されている。植物の陸上化に関するメカニズムを解明するため、こうしたクレブソルミディウム藻綱の特徴に注目し、Hori らは *Klebsormidium flaccidum* のゲノムを解読した（Hori ら、2014）。Hori らの報告では、

K. flaccidum のゲノムにコードされている約 16,000 の遺伝子の内、1238 遺伝子（約８％）が陸上植物に共通する遺伝子であり、植物ホルモンの合成遺伝子や光合成の環境適応に関わる遺伝子などがそれにあたる。Hori らはまた、陸上植物の総遺伝子数はクレブソルミディウムよりも多いが遺伝子ファミリー数は大きくは変わらないこと、陸上植物とクレブソルミディウムではタンパク質のドメイン数、およびドメインの組合せ数も大きくは変わらないことを明らかにし、陸上植物に共通のタンパク質の機能を作る上でクレブソルミディウムが既に基本的要素の多くを獲得していると考察している。

陸上植物は水中よりも強い日射や豊富な酸素を効率良く利用できるが、同時に乾燥に耐え、紫外線を遮蔽し、昆虫や菌による攻撃を回避する必要がある。そうした防御において、植物表層に存在するワックス層を含めた疎水性の高いクチクラが有利に働くと考えられている（Barnes ら、1998；Riederer & Schreiber、2001；Müller & Riederer、2005；Serrano ら、2014）。クチクラは、細胞壁外側のクチクラ層、その外側のクチクラプロパーと、最外層のエピクチクラワックスの３層から構成される（Jetter ら、2006；Pollard ら、2008）。クチクラの構造と構成成分の合成経路模式図を図 1-2 に示した。クチクラ層は（ポリ）ヒドロキシ脂肪酸やエポキシ脂肪酸、ジカルボン酸などの脂肪酸誘導体であるクチンモノマーが重合したクチンポリマー（Li & Beisson、2009）と、アルカン、ケトン、1 級・2 級アルコールなどの脂肪酸誘導体であるワックス（Kunst & Samuels、2009）、細胞壁から伸長した多糖成分（Bargel ら、2006）から成る。クチクラプロパーはクチンポリマーとワックスから成り、エピクチクラワックスはワックスのみから成る（Jetter ら、2006）。ワックスはパルミチン酸とステアリン酸を前駆体として２つの経路から合成される（Samuels ら、2008）。１級アルコール経路において、ステアリン酸は極長鎖脂肪酸（VLCFA）伸長酵素複合体によって炭素数 20 以上の脂肪酸へと伸長されてから、Fatty alcohol reductase1（FAR1）によりカルボン酸が還元され 1 級アルコールが合成される。この極長鎖 1 級アルコールは Wax

synhtase/Diacylglycerol acyltransferase（WSD1）によりパルミチン酸と縮合しワックスエステルが合成される。一方、アルカン経路において、Eceriferum3（CER3）および Eceriferum7（CER7）により脂肪酸がアルデヒドに還元された後、Eceriferum1（CER1）により脱カルボニル化されアルカンが合成される（Bernard ら、2012；Lam ら、2012；Sakuradani ら、2013）。アルカンは Mid-chain alkane hydroxylase1（MAH1）により中央の炭素がヒドロキシ化され 2 級アルコールが、さらに MAH1 により酸化されケトンが合成される（Greer ら、2007）。このように合成されたワックス成分は細胞膜に存在するハーフトランスポーター ATP-binding cassette G12/ECERIFERUM5（ABCG12/CER5）と、ATP-binding cassette G11/DESPERADO（ABCG11/DSO）のヘテロダイマーによって細胞内からクチクラへ輸送される（McFarlane ら, 2010）。クチンモノマー合成経路ではパルミチン酸あるいはステアリン酸、オレイン酸を前駆体とし、シトクローム P450 によって（ポリ）ヒドロキシ脂肪酸やエポキシ脂肪酸が合成される（Wellesen ら、2001；Nelson ら、2004；Kandel ら、2007）。ω-ヒドロキシ脂肪酸は更に FAD 含有オキシドレダクターゼファミリータンパク質である HOTHEAD（HTH）と未知タンパク質の働きによって α,ω-ジカルボン酸へ変換される（Krolikowski ら、2003）。これらモノマーは ABCG11/DSO のホモダイマー（McFarlane ら、2010）やフルトランスポーターATP-binding casette G 32（ABCG32）（Bessire ら、2011）によってクチクラへ輸送され、そこで Cutin deficient1（CD1）によってクチンポリマーが合成される（Yeats ら、2012；Yeats ら、2014）。こうして陸上植物の表面はクチンポリマーネットワークの隙間に脂質が充填された疎水性の高い構造で覆われ、水分消失回避や環境との相互作用が行われる。極長鎖脂肪酸誘導体であるワックス成分は陸上植物の生育する 30℃程度以下では固体であり、ワックス成分を細胞外へ輸送できない *cer5* 変異体では細胞内に直線状の異物が蓄積してしまう（Pighin ら、2005）。このように、陸上植物は細胞内では利用できない疎水性物質を合成・分泌し、細胞外に防御層を形成する。

ゲノム解析において *K. flaccidum* は陸上植物に共通するタンパク質の機能を構成する基本的な要素を既に持っていると考えられている（Hori ら、2014）。そのため、私は陸上で繁栄する *K. flaccidum* が陸上での生育に有利な機能を果たすクチクラ様の構造を有しているであろうと仮定したが、これまで陸上で生育する Klebsormidium 属がいかなる表面構造を持っているのかについて、化学的な報告はない。そこでまず、Hori らによって解読された *K. flaccidum* のゲノム情報（Hori ら、2014）から、シロイヌナズナのワックスおよびクチン成分の合成に関与するタンパク質群、および脂質トランスポーターをコードする遺伝子のカウンターパートを探索した。そして乾燥条件に晒される寒天培地で培養した *K. flaccidum* から抽出した細胞外脂質画分について GC-MS を用いて、クチンモノマー相当画分については GC-MS および ATR-FTIR を用いてそれぞれ成分分析し、*Chlamydomonas reinhardtii* および *Arabidopsis thaliana* と比較した。車軸藻植物門で初期に分岐した *K. flaccidum* の細胞外脂質やクチクラに相当する構造の生化学的特徴が判明すれば、植物の陸上化におけるメカニズム解明への手がかりが得られる。本論文ではそれらの結果を示すとともに、得られた結果から想定される *K. flaccidum* のクチクラ構造についてのモデルを提案し、植物の陸上化に対し *K. flaccidum* の位置付けを考察した。

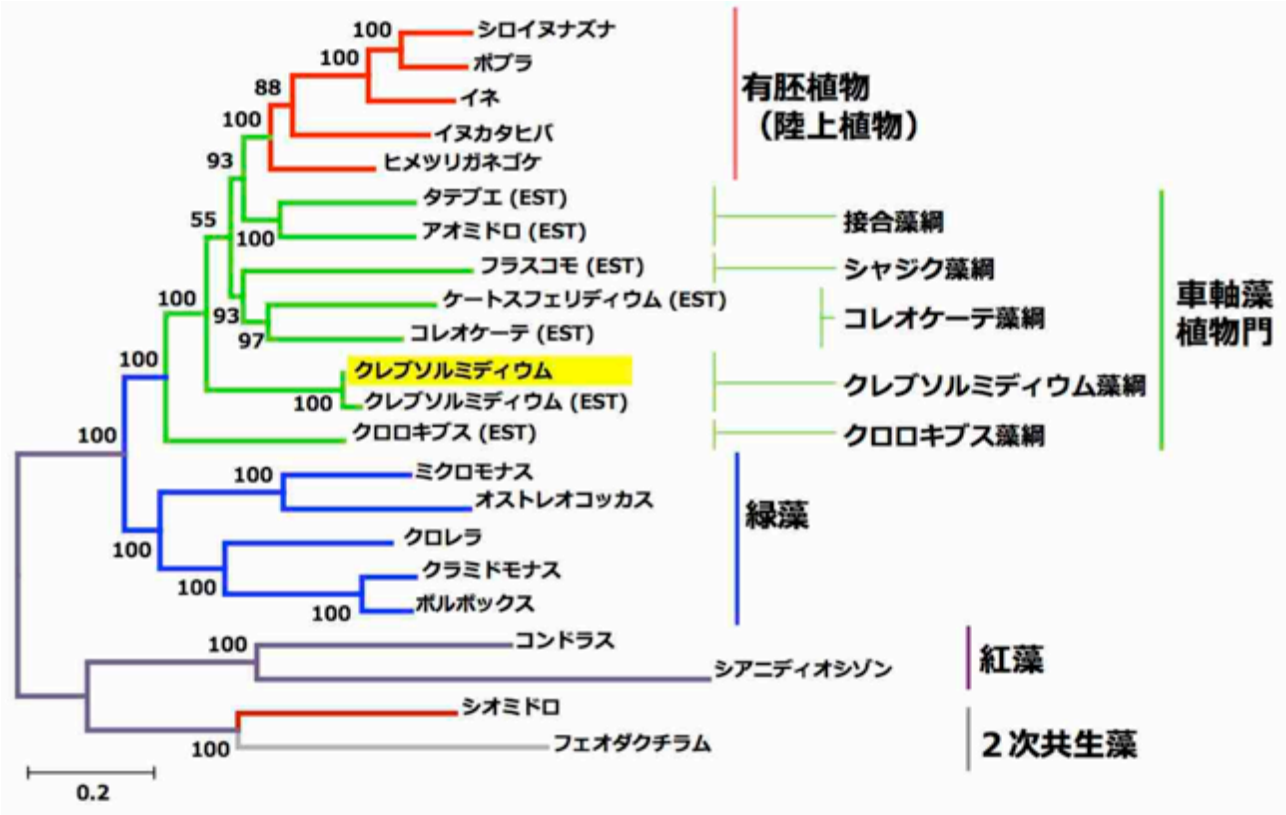


図 1-1．DNA 配列の解析により決定された、真核藻類および陸上植物の系統樹
21 生物種に共通して保存された核コードのタンパク質配列（一部 EST 配列から推定）を基に作成された最尤系統樹 (Hori ら 2014. Fig. 2 を改変)

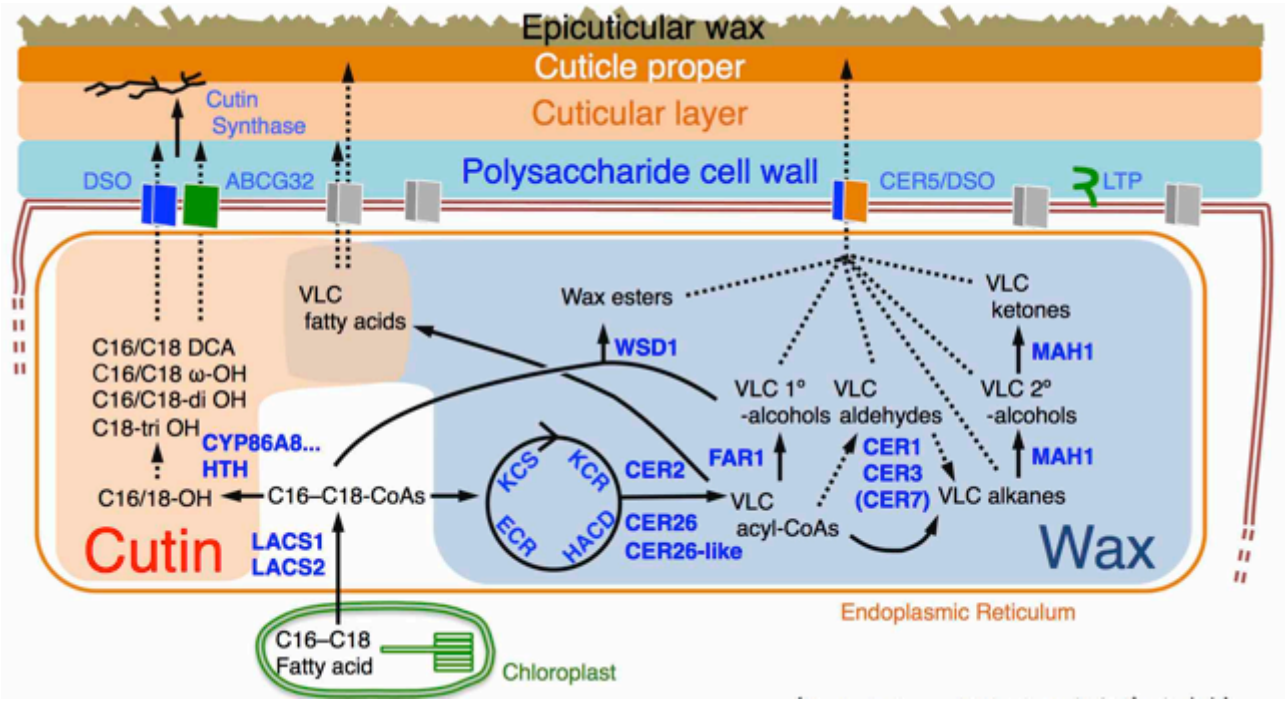


図 1-2．シロイヌナズナにおけるクチクラ構造と、ワックスおよびクチン合成経路の模式図 (Yeats & Rose、2013. Fig. 2 を改変)

２．*Klebsormidium flaccidum* のゲノム配列から推定される細胞外脂質生合成関連タンパク質の探索

緒言

K. flaccidum のゲノム配列解読（Hori ら、2014）から、*K. flaccidum* の核ゲノムサイズは約 117 Mbp、葉緑体ゲノムが 181 kbp、ミトコンドリアゲノムが 106 kbp と推定された。核ゲノムに 16,063 遺伝子、葉緑体に 117 遺伝子、ミトコンドリアに 35 遺伝子の存在が予測され、合わせて 16,215 遺伝子についての機能予測が行われ、公開されている。全タンパク質を 5 種の陸上植物および 9 種の藻類と比較した結果、*K. flaccidum* の 1,238 個（8%）が藻類にみられず陸上植物に保存されていることがわかった（Hori ら 2014；堀 & 太田、2016）。さらにタンパク質のドメイン構造を種間比較した結果、陸上植物に共通に存在するドメインのうち 90.7%が、ドメインの組み合わせのうち 84.3%が *K. flaccidum* に既に存在することが分かった（堀 & 太田、2016）。こうした陸上植物と共通のドメイン数は、ゲノム配列が報告された他の藻類と比較した場合 *K. flaccidum* で最も多いため、本藻類が他藻類よりも陸上植物特異的な特性を多く獲得していると考えられる。本章では、Hori らによって解読された *K. flaccidum* のゲノム情報をもとに、*A. thaliana* のワックス・クチン合成タンパク質および輸送関連タンパク質に対する *K. flaccidum* のカウンターパートを探索した。また、緑藻植物門クラミドモナスでは陸上植物では見いだされていない動物のシグナル伝達経路に関与するクラス III アデニル酸／グアニル酸シクラーゼ遺伝子ファミリーの存在が報告されるなど（福澤ら、2008）、植物よりもむしろ動物に近い特性を持つ遺伝子が存在することも知られている。動物も細胞外に脂質を分泌しており、ヒトの皮脂や魚類の粘液には Triacylglycerol（TAG）や Diacylglycerol（DAG）、Monoacylglycerol（MAG）、遊離脂肪酸、ステロールエステル、ワックスエステル等が含まれている（Lewis ら、1970；Smith & Thiboutot、2008）。したがって、これら動物で見いだされている細胞外脂質についても考慮

し、*A. thaliana* における TAG や DAG、ステロールエステル等の生合成関連タンパク質を基に *K. flaccidum* のカウンターパートを探索した。車軸藻植物門が誕生する以前に分岐した緑藻植物門に属する *Chlamydomonas reinhardtii* についても同様に細胞外脂質合成関連タンパク質を探索し、ワックスあるいはクチン合成関連タンパク質群の系統的な相違を明らかにすることを目的として研究を行った。

方法

K. flaccidum のゲノム配列は以下のホームページからダウンロードしタンパク質検索に利用した（http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/index.html）。９種の藻類すなわち *Chondrus crispus*、 *Ectocarpus siliculosus*、 *Phaeodactylum tricounutum*、*Cyanidioschyzon merolae*、 *Micromonas* strain RCC299、 *Ostreococcus tauri*、 *Chlorella variabilis* NC64A、 *Volvox carteri* f. *nagariensis*、 *C. reinhardtii* と、５種の陸上植物すなわち *Physcomitrella patens* subsp. *patens*、 *Selaginella moellendorffii*、 *Oryza sativa* subsp. *japonica*、 *Populus trichodarpa*、 *A. thaliana* を *K. flaccidum* のタンパク質配列と比較した。*A. thaliana* のトリアシルグリセロール（TAG）合成経路、ワックス合成経路、ステロールエステル合成経路、フィチルエステル合成経路、クチン合成経路の関連タンパク質群、および脂質輸送タンパク質である ATP binding cassette G（ABCG）タンパク質の配列をもとに、これらと相同な配列を BLAST プログラムを用いて上記 14 種のゲノムデータセットから探索した。得られたタンパク質配列のうち、短い配列や質の低い配列、広大な欠損領域を持つ配列を系統樹解析から除外した。分析に使う配列は MUSCLE プログラム（Edgar、2004）を使ってアラインメントし、G-Blocks プログラム（Talavera & Castresana、2007）を用いて編集し、最も保存された領域を抽出した。MEGA6.0（Tamura ら、2013）を用い、ブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹解析を行った。なお各々の解析に先立

ってタンパク質ごとに最適なアミノ酸置換モデルを選択した（Le & Gascuel、2008）。これら解析と並行して、*K. flaccidum* のタンパク質配列について InterPro（https://www.ebi.ac.uk/interpro/）によりドメイン解析を行い、タンパク質としての機能を予測した。

結果

シロイヌナズナの極長鎖脂肪酸（VLCFA）から 1 級アルコールとワックスエステルを合成する 1 級アルコール経路に関連するタンパク質、また VLCFA からアルデヒド、アルカン、2 級アルコール、ケトンを合成するアルカン経路に関連するタンパク質に対する *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のカウンターパートを探索した（図 2-1、表 2-1）。VLCFA 合成に関与する *A. thaliana* の Ketoacyl-CoA synhtase（KCS）、Ketoacyl-CoA reductase（KCR）、Hydroxyacyl-CoA dehydrase（HACD）、Enoyl-CoA reductase（ECR）（Kunst & Samuels、2009）に対するカウンターパートは *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* とも見つかった。*A. thaliana* は KCR を２個、HACD を 2 個、ECR を 1 個持っている（Bach & Faure、2010）のに対し、*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* はどちらもそれぞれのカウンターパートを 1 個ずつ持っていた。*A. thaliana* は機能未確認のタンパク質も含めて KCS を 21 個持っている（Haslam & Kunst, 2013）のに対し、*K. flaccidum* で 2 個、*C. reinhardtii* で 1 個のカウンターパートしか見つからなかった。また、C24:0 よりも長い極長鎖脂肪酸を合成するために必要とされる ECERIFERUM6（CER6）（Miller ら、1998）および ECERIFERUM2（CER2）（Pascal ら、2013；Haslam ら、2015）のカウンターパートは *K. flaccidum*、*C. reinhardtii* ともに見つからなかった。1 級アルコール合成経路における *A. thaliana* の Fatty acid reductase（FAR）（Vishwanath ら、2013）に対する *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のカウンターパートは見つからなかったが、Wax synthase（WS）（Li ら、2008）のカウンターパートは *K. flaccidum* で 1 つ見つかった。

アルカン合成経路では *K. flaccidum* で ECERIFERUM3（CER3）と ECERIFERUM7（CER7）（Rowland ら、2007；Lam ら、2012）のカウンターパートが 1 つずつ見つかったが、*C. reinhardtii* では CER7 のカウンターパート 1 つしか見つからなかった。またアルカン合成に関与する ECERIFERUM1（CER1）（Aarts ら、1995；Bernard ら、2012）のカウンターパートはどちらの種においても見つからなかった。生合成されたアルカンから 2 級アルコールを生成し、さらに 2 級アルコールからケトンを生成する 2 段階をともに触媒する Mid-chain alkane hydroxylase1（MAH1）（Greer ら、2007）のカウンターパートは両種とも見つからなかった。

TAG や DAG、MAG の合成経路関連タンパク質の *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のカウンターパートを探索した（図 2-2、表 2-1）。*A. thaliana* と比べて数は少ないものの、*K. flaccidum* においてはすべてのタンパク質に対するカウンターパートが見つかった。*C. reinhardtii* についてもほとんどのカウンターパートが見つかったが、小胞体局在の Lysophosphatidylglycerol acyltransferase（LPAT）と Phosphatidate phosphatase（PAP）のカウンターパートは見つからなかった。

A. thaliana のステロールエステル合成経路には、アシル-CoA をアシル供与体とする Acyl-CoA sterol acyltransferase（ASAT）（Bouvier-Navé ら、2010）と、リン脂質をアシル供与体とする Phospholipid sterol acyltransferase（PSAT）（Bouvier-Navé ら、2010）および Lecithin:cholesterol acyltransferase（LCAT）（Chen ら、2012）の 3 つが知られている。このうち、*K. flaccidum* には ASAT のカウンターパートが見つからず、PSAT と LCAT のカウンターパートが見つかった（図 2-3、表 2-1）。一方 *C. reinhardtii* は ASAT のカウンターパートが見つかったが PSAT と LCAT のカウンターパートは見つからなかった。

A. thaliana は、クロロフィルの分解により遊離するフィトールをアシル-CoA 由来の脂肪酸とエステル化することでフィチルエステルを生成し、プラストグロビュールに貯蔵する

（Lippold ら、2012）。*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のどちらにもクロロフィル b の C7 位のアルデヒド基をメチル基に変換してクロロフィル a を生成する Non-yellow coloring（NYC）（Jia ら、2015）と、フェオフィチン a からフィトール側鎖を切り離してフェオフォルバイド a を生成する Pheophytinase（PPH）（Schelbert ら、2009）のカウンターパートが見つかった（図 2-3、表 2-1）。また、遊離したフィトールをアシル-CoA あるいはアシル-ACP とエステル化する Phytyl ester synthase（PES）（Lippold ら、2012）のカウンターパートも 1 つずつ見つかった。

エピクチクラワックス成分やクチンを構成するモノマーは細胞内で作られ、２量体化した ABCG ハーフトランスポーター、或いは ABCG フルトランスポーターにより細胞外へ輸送されると考えられている（Pighin ら、2005；Panikashvili ら、2007；Panikashvili ら、2010）。The Arabidopsis Information Resource（TAIR）を検索した結果、*A. thaliana* には 43 の ABCG トランスポーターが報告されているのに対し、*K. flaccidum* で 9 個、*C. reinhardtii* で 2 個と、少ないながらもそれぞれに ABCG タンパク質のカウンターパートが見つかった（図 2-3、表 2-1）。

A. thaliana においてクチンモノマーはオレイン酸かパルミチン酸を前駆体とし、順次シトクロム P450 等により酸素付加され、あるいは FAD 含有オキシドレダクターゼである HOTHEAD（HTH）（Bessire ら、2007）により酸化される。クチンモノマーの合成経路自体まだ不明な点が多いが、オレイン酸、パルミチン酸の両方を基質とするのは CYP86 クランの CYP86A8（Wellesen ら、2001）、CYP94C1、CYP704B1 であり、このうち CYP94C1 と CYP704B1 は 9,10-エポキシステアリン酸も基質とし、ω 位をヒドロキシ化する（Kandel ら、2007；Dobrista ら、2009）。オレイン酸のみを基質とするのが同じく CYP86A2（Molina ら、2008）と CYP86A4（Li-Beisson ら、2009）である。また、CYP71 クランの CYP77A6 は 16-ヒドロキシパルミチン酸の内部をヒドロキシ化し 10,16-ジヒドロキシパルミチン酸を合成

する（Sauveplane ら、2009）。なおオレイン酸内部の炭素をヒドロキシ化するタンパク質はわかっていない。ジカルボン酸の合成に関わっている HTH は ω-ヒドロキシ酸を ω-オキソ酸へ酸化する（Krolikowski ら、2003；Kurdyukov ら、2006）。ただし ω-オキソ酸をジカルボン酸へと酸化するタンパク質はわかっていない。*K. flaccidum* ではこのうち CYP86A8 のみカウンターパートが見つかったが、*C. reinhardtii* ではカウンターパートが見つからなかった（図 2-4、表 2-1）。また HTH は両種ともカウンターパートが 1 つずつ見つかった。

考察

ワックス合成関連タンパク質

K. flaccidum は *A. thaliana* が持つ VLCFA 伸長酵素複合体の全ての構成タンパク質のカウンターパートを持っているが、炭素数 26 以上の VLCFA を合成する CER6 と CER2 のカウンターパートを持たないため、炭素数 24 までの VLCFA しか合成できないと考えられる。しかし、*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* の KCS カウンターパートはいずれも KCS4 のホモログである。シロイヌナズナ KCS4 は VLCFA を欠損した酵母の変異体Δ*elo2*Δ*elo3* を相補できないことがわかっており、その機能が確認できていない（Paul ら、2006）ため、両種の KCS のカウンターパートが正常に機能するかはタンパク質発現系の構築などによるタンパク質機能の確認が必要である。

ワックスエステル合成関連タンパク質については、両種とも 1 級アルコールを合成する FAR のカウンターパートを持っていなかったが、*K. flaccidum* はワックス合成酵素(WS)のカウンターパートを 1 つ持っていた。11 ある WS のうち機能が実験的に確認された Wax-ester synthase/diacylglycerol o-acyltransferase（WSD1）は２機能性のタンパク質であり、優先的に脂肪酸とアルコールからワックスエステルを作るが、アシル-CoA と DAG から TAG を合成することもできる（Li ら、2008）。*K. flaccidum* は 1 級アルコールを持たないと

予想されるため、*K. flaccidum* の WSD1 のカウンターパートはワックスエステルではなくこの TAG 合成に関わっている可能性もあり、または全く異なるアルコールと脂肪酸のエステルを合成する可能性もある。このカウンターパートについてもタンパク質発現系などを用いて基質と産物を確認する必要があるが、今回の探索の結果から *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のどちらも長鎖 1 級アルコールと、それをもとに合成されるワックスエステルは合成できないと考えられた。

シロイヌナズナのアルカン合成経路では VLCFA-CoA から末端のカルボキシル基を還元してアルデヒドを形成し、さらに脱カルボニル化されて奇数アルカンが生成する。これらのステップには CER1、CER3、CER7 が関与すると考えられている。その後炭素鎖の中心部の炭素がヒドロキシ化されて 2 級アルコールが生成し、さらに酸化されてケトンが生成する。アルデヒドの生成についてはまだ詳細が分かっていないが、CER3、CER7 が合成に関与すると考えられている（Hooker ら、2007；Bourdenx ら、2011；Bernard ら、2012）。*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* はどちらもシロイヌナズナでアルカン合成に必須な CER1 を持たず、アルカンを合成できないと考えられ、したがってその先の２級アルコール、ケトンも合成できないと考えられた。

TAG 合成経路関連タンパク質

K. flaccidum は *A. thaliana* の TAG 合成関連タンパク質のカウンターパートを全て持っていると予想されたため、*A. thaliana* と同じように TAG 合成を行うと考えられた。*C. reinhardtii* は一部小胞体の LCAT と PAP のカウンターパートを持っていない。最近、ストレス条件下における *C. reinhardtii* の TAG 蓄積の場合、脂肪酸の新規合成から DAG 合成までは葉緑体でも行われる可能性が示唆されている（Fan ら、2011）が、*C. reinhardtii* でこれらの反応に関わる遺伝子にはまだ不明な点も多い。

セイヨウヤマモモの果実表層に多量に蓄積される TAG は、表層へと分泌された MAG をアシル供与体として細胞外で合成されることがわかってきた（Simpson & Ohlrogge、2016）。細胞外 TAG 合成には、*sn*-2 GPAT（Li ら、2007a；Li ら、2007b；Yang ら、2010）、DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES（DCR）（Panikashvili ら、2009、シロイヌナズナ）、CUTIN DEFICIENT1（CD1）（Yeats ら、2012、トマト）が関与すると考えられている。*K. flaccidum* では *sn*-2 GPAT と DCR のカウンターパートが見つからなかったが、トマト CD1 のシロイヌナズナホモログである Cutin synthase-like protein（AtCUS1/LTL1）（Yeates ら、2014）のカウンターパートが見つかった。したがって *K. flaccidum* の細胞表層にある TAG 合成において、セイヨウヤマモモのように LTL1/AtCUS1 が関与する可能性が考えられるが、実際に細胞外で MAG から TAG が合成されるのかは不明である。

ステロールエステル、フィチルエステル合成経路関連タンパク質

ステロールエステル合成経路について、PSAT と LCAT のカウンターパートを持つ *K. flaccidum* はリン脂質をアシル供与体とする経路が存在し、一方 ASAT のカウンターパートを持つ *C. reinahrdtii* はアシル-CoA をアシル供与体とする経路が存在すると考えられた（図 2-3）。*A. thaliana* の種子では主に PSAT が機能しており、ロゼット葉では PSAT と ASAT が冗長的に機能していると考えられている（Bouvier-Navé ら、2010）。しかしこれらタンパク質の細胞内局在はまだ分かっておらず、両藻類においてタンパク質の違いがどのようにステロールエステル合成に影響するのかは今のところ不明である。

フィトールや脂肪酸の両親媒性には細胞毒性があり（Rani ら、2010；Lippold ら、2012）、安全のためにこれら化合物の持つ官能基をマスクする必要がある。クロロフィルから生じるフィトールは葉緑体を持つ全ての生物に生じ得るので、脂肪酸とのフィト―ルの両親媒性をマスクするためにフィチルエステル合成経路を持っている藻類は多いと予想される。

フィチルエステル合成経路については、*K. flaccidum*、*C. reinhardtii* ともクロロフィル a からフィトール側鎖を切断するまでの反応を触媒する酵素が見つかっており、フィトールと脂肪酸をエステル結合する PES も見つかっているため（図 2-3)、どちらの種もフィチルエステルを合成すると考えられる。

ABCG トランスポーター

A. thaliana において ABCG トランスポーターはクチンモノマーやワックスのみならず、アブシジン酸やインドール-3-ブチル酸、ストリゴラクトン、トランス-ゼアチンなどの植物ホルモンを細胞外へ輸送することが報告されている（Yeats & Rose、 2013；Yadav ら、2014)。そのため *A. thaliana* は ABCG トランスポーターを 43 個持つのに対し *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のカウンターパートは少なく、それぞれ 9 個と 2 個が見つかった（図 2-3)。しかしいずれの藻類ともその中にワックス成分の輸送に重要な ABCG11 のホモログを持っていた。脂質の輸送に関与することが報告されている ABCG トランスポーターのうち、ABCG11 は ABCG12 や ABCG13 など、ダイマーを形成する相手に対する特異性が低く（Panikashvili ら、2011)、またホモダイマー形成も可能である（McFarlane ら、2010)。また ABCG11 は基質特異性も相対的に低く、ABCG12 とのヘテロダイマーではワックスを、ABCG13 とのヘテロダイマーやホモダイマーではクチンモノマーを輸送する（McFarlane ら、2010；Panikashvili ら、2011)。一方、ABCG12 は ABCG11 とヘテロダイマーを形成するのみで、基質もワックスのみである（Pighin ら、2005；McFalane ら、2010)。これらの知見から、*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* の ABCG11 カウンターパートは細胞外への脂質輸送に関与していると推測された。

クチン合成タンパク質

A. thaliana のクチンモノマー合成経路については、ワックス合成経路と比較すると現状ではまだ十分なデータが集まっておらず反応を触媒するタンパク質が不明な点もあるが、http://pmn.plantcyc.orgで公開されているクチンモノマー合成経路を参考に図2-4を作成した。*K. flaccidum* はCYP86A8のカウンターパートしか持たず、*C. reinhardtii* はいずれのタンパク質のカウンターパートも持っていなかった。一方、ω-ヒドロキシ酸をオキソ酸へ変換するHTHは*K. flaccidum*、*C. reinhardtii* ともに見つかった。したがって*K. flaccidum* はω-ヒドロキシ脂肪酸とω-オキソ酸を合成する可能性がある。しかしオキソ酸の酸化を触媒するタンパク質はいまのところわかっていないため、ゲノム情報から*K. flaccidum* がジカルボン酸を合成できるか推定するのは難しいが、*K. flaccidum* は*A. thaliana* のようなクチンポリマー構造を持つ可能性があると考えられた。一方、*C. reinhardtii* はヒドロキシ化された脂肪酸誘導体を持たないと考えられ、クチンポリマー構造を持たないと考えられた。実際に *C. reinhardtii* のクチンポリマーに関する知見はこれまで報告されていない。

ゲノム情報の解析から、VLCFA伸長については*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のVLCFAsは炭素数24以下に限られ、ワックスについては両種とも1級アルコールとワックスエステル、アルカン、2級アルコール、ケトンを合成できないと推測された。したがって*K. flaccidum*、*C. reinhardtii* の細胞外脂質は*A. thaliana* とは組成が大きく異なるであろうと考えられた。TAGやステロールエステル、フィチルエステルなどは*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のどちらも合成できるため、両種は動物に類似したこれらの脂質を主要な構成成分とした細胞外脂質を持つ可能性もある。したがって*K. flaccidum* は*A. thaliana* のようなクチクラ層やクチクラプロパーに相当する層を有し、その表面に中性脂質を配する、陸上植物のクチクラ構造に類似した構造を持つ可能性がある。一方、ホモロジーサーチから*C. reinhardtii* はクチンポリマーを持たないと予想されたため、細胞壁表面に直接、あるいは何らかの構造体を介し中性脂質を配置した構造を持つ可能性が考えられた。

K. flaccidum には 1238 個の陸上植物に特異的なタンパク質のカウンターパートが見つかっている（Hori ら、2014）。一方、クチクラ成分合成関連タンパク質群のカウンターパートを探索した結果、*K. flaccidum* に見つかった陸上植物特異的タンパク質は 5 個だった。ワックス合成関連タンパク質群については、アシル-CoA のチオエステル基を分解しアシル基を生成する ACH2（Tilton ら、2004；本研究では Li-Beisson ら（2013）の命名に則り Acyl-CoA Thioesterase2（ACT2）と表記する）が陸上植物と *K. flaccidum* に共通して存在した。ACT2 はβ酸化には関与せず、C20:0-CoA を分解して遊離 C20:0 を生成するため（Tilton ら、2004）、ワックス合成に寄与している可能性もある。クチン合成については、脂肪酸からω-ヒドロキシ酸を生成する CYP86A8、エステル結合形成を触媒しクチンポリマーを合成する AtCUS1、リグニン形成に関与する HYDROXYCINNAMOYL-COA SHIKIMATE/QUINATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE（HCT）が陸上植物と *K. flaccidum* に共通して存在した。CYP86A8 は C16:0、C18:1 の両方を基質とし、*cyp86a8* 変異体のω-ヒドロキシ酸、α,ω-ジカルボン酸が大きく減少したため（Benveniste ら、1998）、クチンモノマー合成の初期段階に関与していると考えられている重要なタンパク質である。AtCUS1 は最初にトマトで見つかったクチンポリマー形成を触媒する Cutin deficient1 のシロイヌナズナにおけるホモログであり、直鎖状ポリマーを形成することが確認されている（Yeats ら、2014）。HCT はリグニン合成に必須のタンパク質である（Li ら、2010）。*K. flaccidum* がリグニン様の構造をもつという報告はないが、同じ車軸藻植物門の *Coleochaete nitellarum* がリグニン様の構造を持つことが報告されている（Sørensen ら、2011）。*K. flaccidum* はワックス成分の合成においては陸上植物が持つタンパク質群を持たないと推測されたが、クチンポリマー合成経路については成分の種類は少ないものの、緑藻植物門が持たない陸上植物のタンパク質群を獲得していることが示唆された。

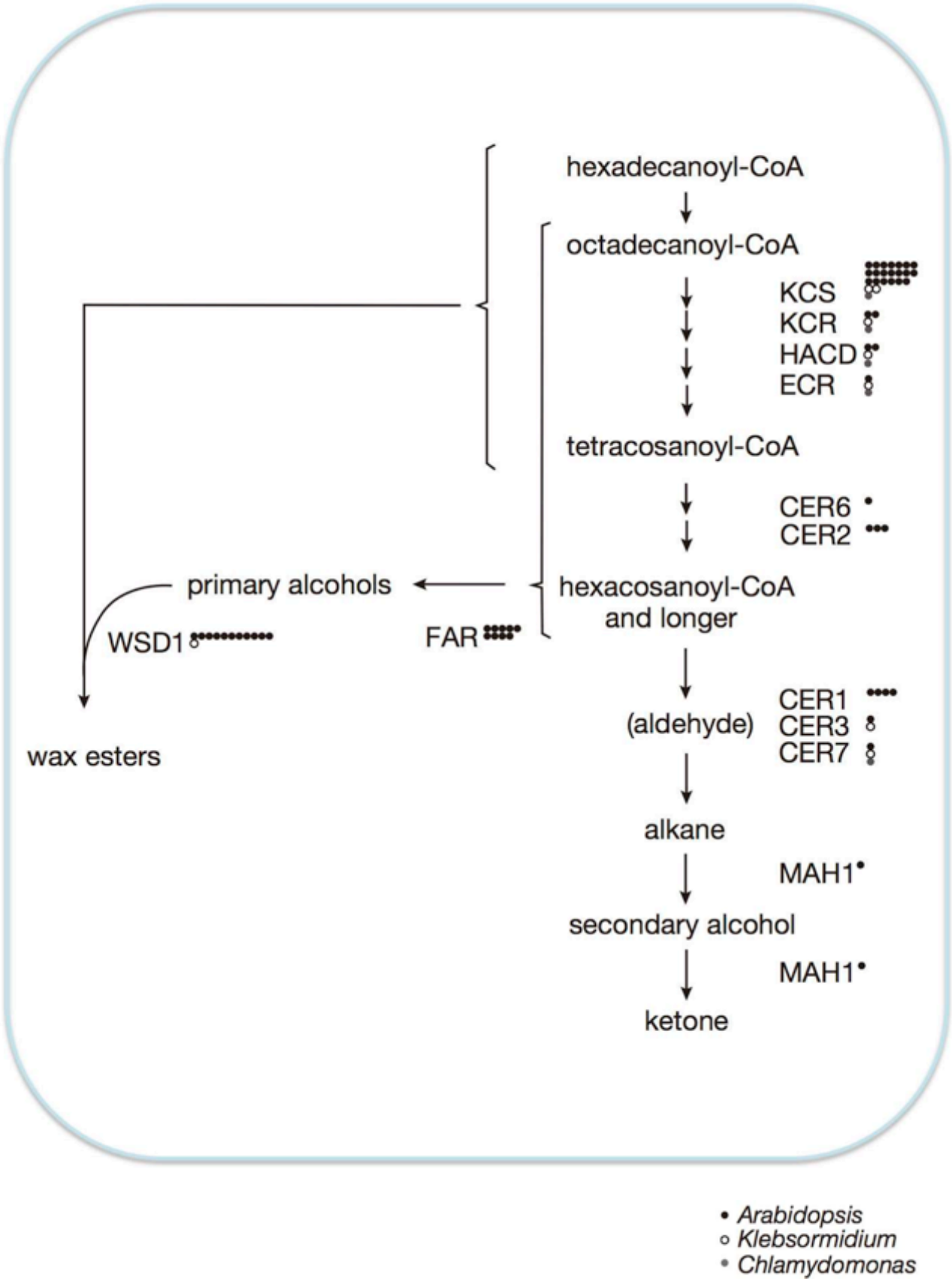


図 2-1. シロイヌナズナワックス合成経路における関連タンパク質の種間比較
黒丸は *A. thaliana*、白丸は *K. flaccidum*、灰丸は *C. reinhardtii* のタンパク質のホモログ数を表す。

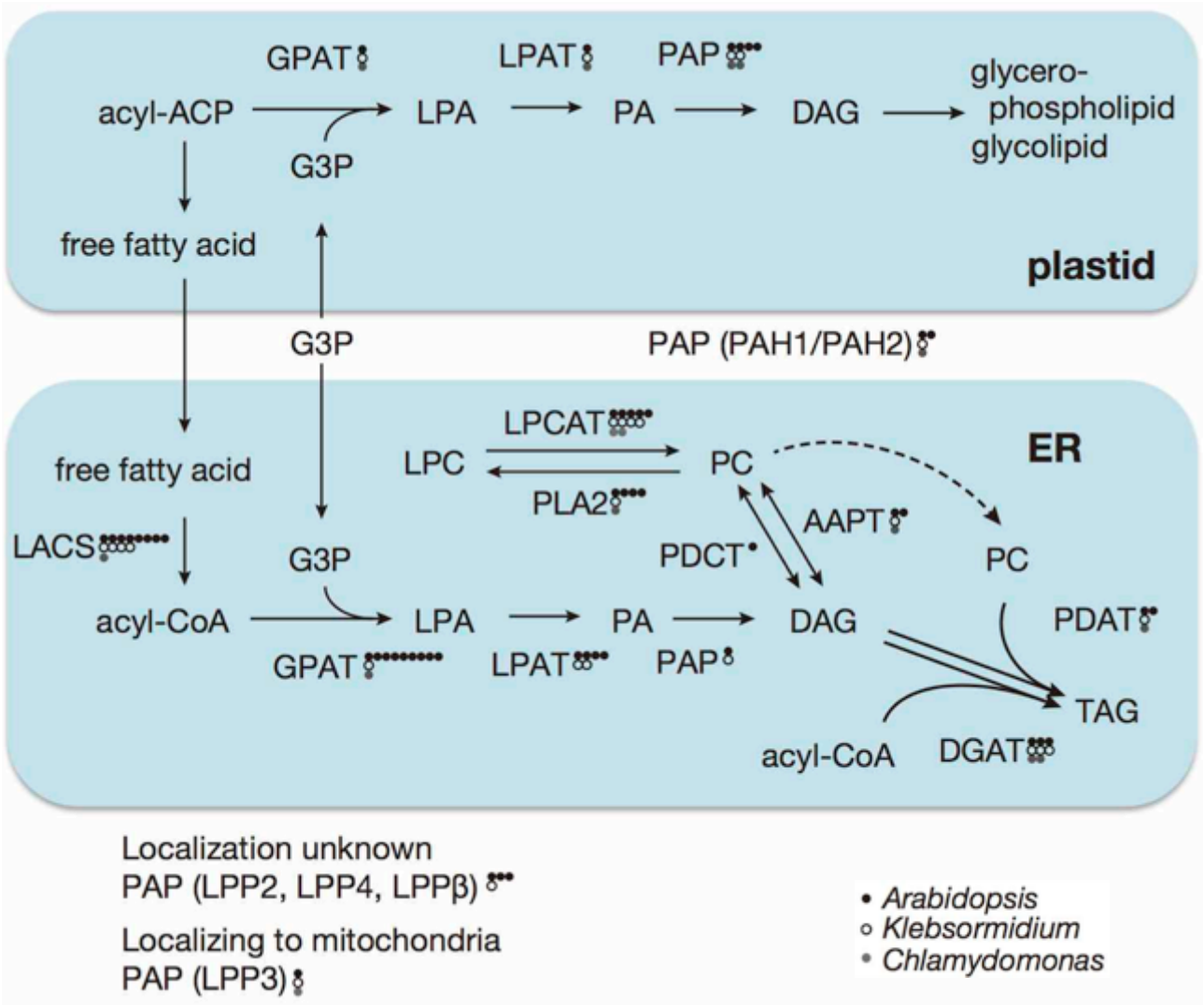


図 2-2．シロイヌナズナ TAG 合成経路における関連タンパク質の種間比較
黒丸は *A. thaliana*、白丸は *K. flaccidum*、灰丸は *C. reinhardtii* のタンパク質のホモログ数を表す。

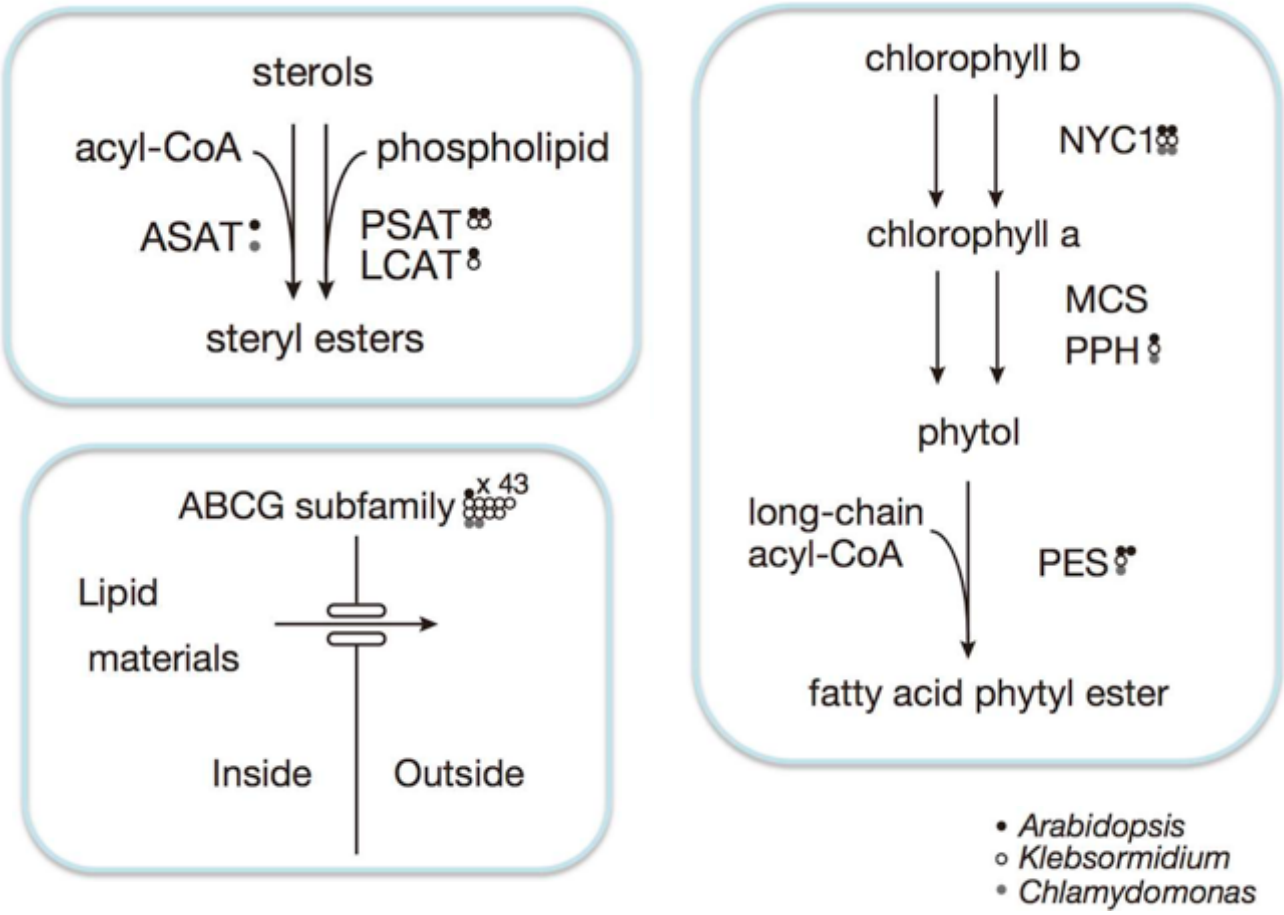


図 2-3. シロイヌナズナステロールエステル、フィチルエステル合成経路と ABCG 輸送体における関連タンパク質の種間比較
黒丸は *A. thaliana*、白丸は *K. flaccidum*、灰丸は *C. reinhardtii* のタンパク質のホモログ数を表す。

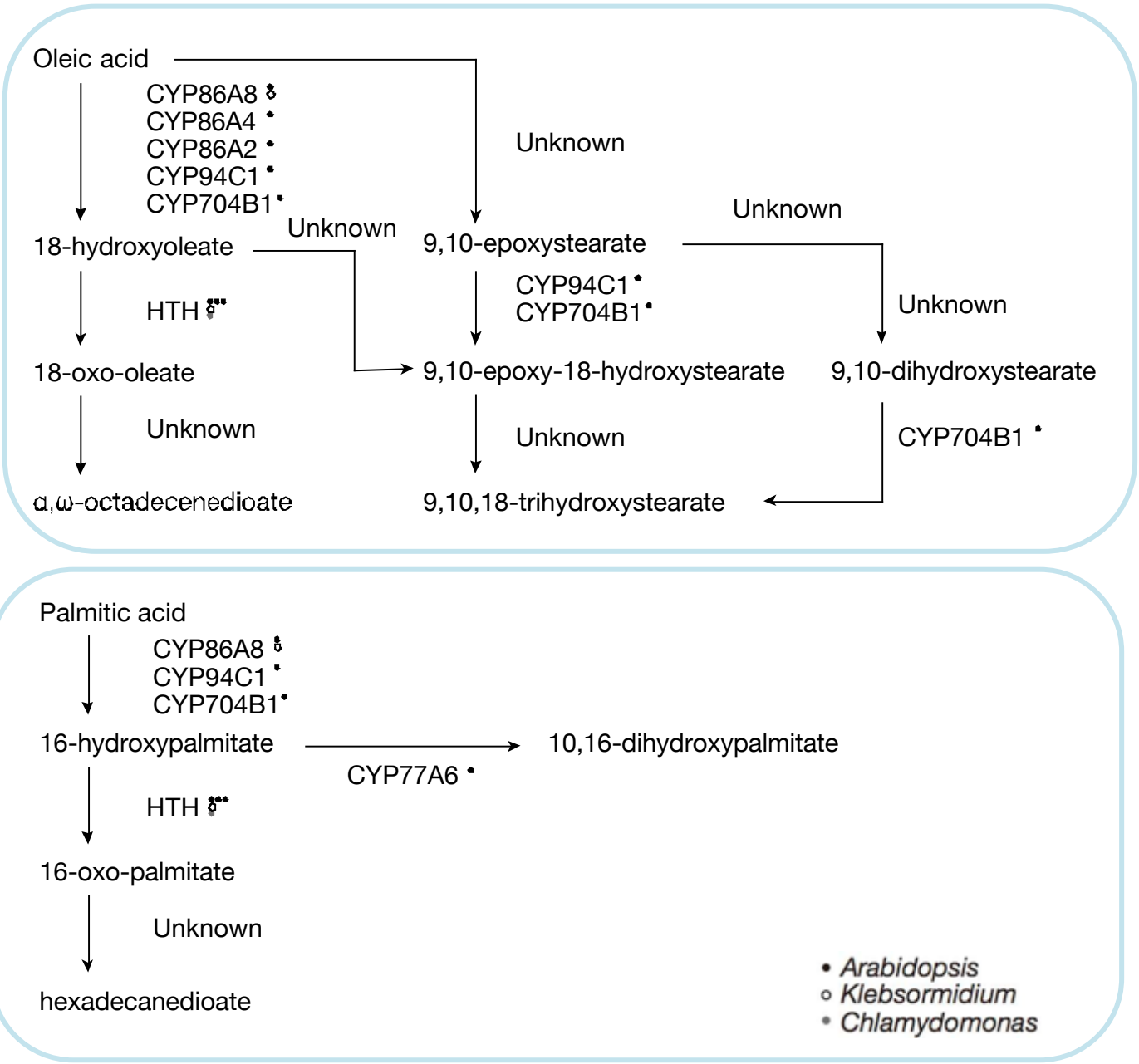


図 2-4. シロイヌナズナクチンモノマー合成経路における関連タンパク質の種間比較
黒丸は *A. thaliana*、白丸は *K. flaccidum*、灰丸は *C. reinhardtii* のタンパク質のホモログ数を表す。

表 2-1. ワックスおよびクチンモノマー関連タンパク質の種間比較

Pathway	Description	Locus	Abbreviation	Candidate Counterpart in *K. flaccidum*	e-value	Reciprocal e-value	Candidate Counterpart in *C. reinhardtii*	e-value	Reciprocal e-value	Presence of counterparts Chl[1)]	Kf	Emb[2)]	Phylogeny
TAG biosynthesis	sn1-Glycerol-3-phosphate acyltransferase	AT1G32200	ATS1/ACT1	kfl00319_0110	3.0E-153	5.0E-154	Cre02.g143000.t1.2	1.0E-99	1.0E-99	✓	✓	✓	Fig. 2-5
		AT5G60620	GPAT9	kfl00139_0130	4.0E-173	1.0E-172	g6130.t1	3.0E-132	2.0E-132	✓	✓	✓	Fig. 2-6
	1-Acylglycerol-3-phosphate acyltransferase	AT1G75020	LPAT4	kfl00129_0110	3.0E-107	6.0E-107	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-7
		AT3G57650	LPAT2	kfl00079_0020	2.0E-119	4.0E-119	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-7
		AT4G30580	LPAT1	kfl00653_0060	1.0E-80	2.0E-80	g9888.t1	5.0E-84	6.0E-84	✓	✓	✓	Fig. 2-8
	Phosphatidate phosphatase	AT3G02600	LPP3	kfl00214_0110	9.0E-70	6.0E-70	Cre05.g230900.t1.3	6.0E-36	8.0E-40	✓	✓	✓	Fig. 2-9
		AT4G22550	LPPβ	kfl00352_0080	3.0E-24	8.0E-22	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-10
		AT5G03080	LPPγ	kfl00010_0330	2.0E-56	4.0E-56	Cre06.g272400.t1.2	1.0E-23	1.0E-23	✓	✓	✓	Fig. 2-11
		AT3G58490	LPPδ	kfl00063_0290	6.0E-84	2.0E-91	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-12
		AT5G66450	LPPε2	kfl00001_0550	3.0E-33	9.0E-34	Cre06.g295250.t1.3	1.0E-30	2.0E-32	✓	✓	✓	Fig. 2-13
		AT5G42870	PAH2	kfl00577_0080	1.0E-145	3.0E-145	Cre12.g506600.t1.2	7.0E-68	2.0E-13	✓	✓	✓	Fig. 2-14
	Diacylglycerol cholinephosphotransferase	AT3G25585	AAPT2	kfl00450_0090	5.0E-145	8.0E-145	Cre12.g538450.t1.2	9.0E-36	1.0E-35	✓	✓	✓	Fig. 2-15
	Phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase	AT3G15820	PDCT	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
	1-Acylghycerol-3-phosphocholine acyltransferase	AT1G12640	LPLAT1	kfl00025_0100	8.0E-160	6.0E-151	g13221.t1	5.0E-68	2.0E-69	✓	✓	✓	Fig. 2-16
		AT1G78690	LPLAT	kfl00573_0090	3.0E-71	4.0E-71	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-16
		AT1G80950	LPEAT1	kfl00255_0160	1.0E-98	1.0E-96	Cre17.g70730.t1.2	1.0E-56	7.0E-59	✓	✓	✓	Fig. 2-17
		AT2G45670	LPEAT2	kfl00898_0040	1.0E-104	2.0E-104	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-17
	Oleate desaturase	AT3G12120	FAD2	kfl00096_0060	2.0E-163	4.0E-163	Cre17.g711150.t1.2	1.0E-129	1.0E-129	✓	✓	✓	Fig. 2-18
	Linoleate desaturase	AT2G29980	FAD3	No definite counterpart		-	No definite counterpart		-	✓	✓	✓	-
	Phospholipase A2	AT2G19690	PLA2β	kfl00026_0180	4.0E-39	2.0E-38	Cre02.g095000.t1.2	3.0E-29	1.0E-29	✓	✓	✓	Fig. 2-19
	Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	AT5G13640	PDAT1	kfl00076_0090	0	0	Cre02.g106400.t1.3	3.0E-56	1.0E-56	✓	✓	✓	Fig. 2-20
	Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase	AT1G48300	DGAT3	kfl00422_0070	6.0E-07	4.0E-07	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	-
		AT3G51520	DGAT2	kfl00368_0010	4.0E-97	7.0E-97	Cre03.g205050.t1.2	4.0E-56	3.0E-59	✓	✓	✓	Fig. 2-21
		AT2G19450	DGAT1	kfl00874_0010	5.0E-166	2.0E-164	g1030.t1	4.0E-70	1.0E-72	✓	✓	✓	Fig. 2-22
	Monoacylglycerol acyltransferase	AT1G52760	MAGAT	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
	Choline kinase	AT1G74320	CEK2	kfl00254_0100	2.0E-107	1.0E-112	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-23
		AT2G26830	CEK4	kfl00447_0070	6.0E-110	1.0E-109	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-23
	Choline-phosphate cytidylyltransferase	AT2G32260	CCT1	kfl00623_0050	3.0E-120	5.0E-118	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-24
Coat protein	oleosine	AT4G25140	OLE1	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
	steroleosin	AT5G50600	HSD1	kfl00097_0040	4.0E-75	1.0E-74	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-25
	caleosin	AT2G33380	ATCLO3	kfl00014_0110	9.0E-70	2.0E-69	Cre06.g287000.t1.2	9.0E-59	5.0E-59	✓	✓	✓	-
WAX biosynthesis	Ketoacyl-CoA synthase	AT1G19440	KCS4	kfl00169_0130	0	0	Cre17.g722150.t1.2	0	0	✓	✓	✓	Fig. 2-26
		AT1G19440	KCS4	kfl00132_0240	0	0	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-26
	Ketoacyl-CoA reductase	AT1G67730	KCR1	kfl00058_0310	7.0E-112	1.0E-111	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-27
		AT1G24470	KCR2	No blast hit	-	-	g9724.t1	2.0E-25	2.0E-25	✓	✓	✓	Fig. 2-27

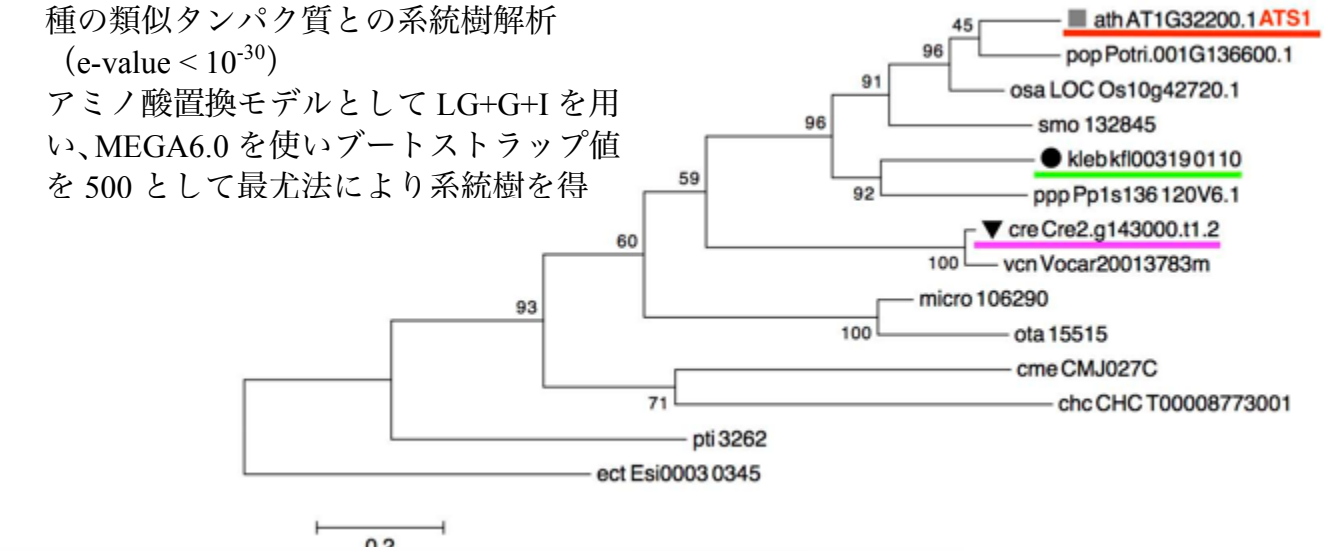
Chl[1)]: Chlorophytes; Emb[2)]: Embryophytes

表 2-1.（つづき）

Pathway	Description	Locus	Abbreviation	Candidate Counterpart in *K. flaccidum*	e-value	Reciprocal e-value	Candidate Counterpart in *C. reinhardtii*	e-value	Reciprocal e-value	Presence of counterparts Chl[1)]	Kf	Emb[2)]	Phylogeny
WAX biosynthesis	Hydroxyacyl-CoA dehydratase	AT5G10480	PAS2 (HACD)	kfl00054_0250	2.0E-64	3.0E-64	Cre03.g167950.t1.2	3.0E-49	9.0E-51	✓	✓	✓	Fig. 2-28
	Enoyl-CoA reductase	AT3G55360	ECR	kfl00019_0590	1.0E-112	1.0E-124	Cre14.g615050.t1.2	2.0E-104	1.0E-105	✓	✓	✓	Fig. 2-29
	Acyl-CoA thioesterase	AT1G01710	ACT2	kfl00409_0050	3.0E-94	5.0E-105	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-30
	Long-chain acyl-CoA synthetase	AT2G47240	LACS1	kfl00227_0090	0	0	Cre13.g566650.t2.1	0	0	✓	✓	✓	Fig. 2-31
		AT4G23850	LACS4	kfl00274_0140	0	0	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-31
		AT5G27600	LACS7	kfl00607_0030	0	0	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-31
		AT2G04350	LACS8	kfl00027_0510	0	0	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-31
	A component of the fatty acid elongation machinery required for C28 to C30 fatty acid elongation	AT4G24510	CER2	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
	Alcohol forming fatty acid reductase	AT5G22500	FAR1	No blast hit	-	-	No definite counterpart		-	-	-	✓	-
	Putative aldehyde decarbonylase	AT1G02190	CER1	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	-
		AT5G57800	CER3	kfl00392_0170	8.0E-72	0	No blast hit	-	-			✓	Fig. 2-32
	Positively regulates CER3 transcription, involved in cuticular wax biosynthesis	AT3G60500	CER7	kfl00020_0140	2.0E-119	3.0E-122	Cre03.g175000.t1.2	3.0E-85	6.0E-87	✓	✓	✓	Fig. 2-33
		AT1G57750	CYP96A15/MAH1	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
Ester biosynthesis	A bifunctional enzyme, wax ester synthase (WS) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT)	AT3G49210	WSD1-like	kfl00431_0050	2.0E-63	3.0E-64	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-34
	Phospholipid sterol acyl transferase 1	AT1G04010	PSAT1	kfl00160_0010p	0	0	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-35
	Acyl-CoA sterol acyl transferase 1	AT3G51970	ASAT1	No blast hit	-	-	Cre07.g349900.t1.3	9.0E-22	3.0E-21	✓	-	✓	-
	Lecithin:cholesterol acyltransferase 3	AT4G19860	LCAT3	kfl00069_0190	4.0E-126	6.0E-150	No blast hit	-	-	✓	✓	✓	Fig. 2-36
	Phytyl ester synthase	AT1G54570	PES1	kfl00048_0280	3.0E-165	3.0E-174	Cre12.g521650.t1.2	9.0E-110	3.0E-116	✓	✓	✓	Fig. 2-37
Chlorophyll degradation	Chlorophyllase	AT1G19670	CLH1	No blast hit	-	-	Cre03.g148750.t1.2	9.0E-12	9.0E-12	✓	-	✓	Fig. 2-38
		AT5G43860	CLH2	kfl00505_0030	7.0E-47	6.0E-45	g12031.t1	3.0E-12	9.0E-12	✓	✓	✓	Fig. 2-38
	Chlorophyll b reductase	AT4G13250	NYC1	kfl00003_0160	4.0E-134	9.0E-134	Cre12.g517700.t1.2	2.0E-81	5.0E-84	✓	✓	✓	Fig. 2-39
		AT5G04900	NYC1-like	kfl00376_0070	1.0E-114	3.0E-114	Cre14.g608800.t1.2	2.0E-113	2.0E-113	✓	✓	✓	Fig. 2-39
	Pheophytinase	AT5G13800	PPH	kfl00254_0150	3.0E-99	3.0E-106	Cre12.g514700.t1.2	4.0E-82	5.0E-83	✓	✓	✓	Fig. 2-40
Transporter	ABCG half transportert	AT1G17840	ABCG11	kfl00574_0100	0.0E+00	0.0E+00	Cre02.g096000.t2.1	1.0E-173	3.0E-168	✓	✓	✓	Fig. 2-41
Cutin monomer synthesis	CYP86 clan	AT2G44890	CYP704A1	No blast hit	-	-	Cre01.g003850.t1.3	8.0E-45	2.0E-50	✓	-	✓	-
		AT2G45970	CYP86A8	kfl00171_0160	4.0E-138	7.0E-138	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-42
		AT1G69500	CYP704B1	No definite counterpart		-	No blast hit	-	-	-	-	✓	-
	HOTHEAD (ω-OH fatty acyl dehydrogenase)	AT1G72970	HTH/EDA17	kfl00011_0020	2.0E-83	1.0E-83	Cre12.g514200.t1.2	4.0E-32	4.0E-32	✓	✓	✓	Fig. 2-43
Polymer synthesis	Cutin synthase-like protein (homolog of CD1)	AT3G04290	AtCUS1/ LTL1	Kfl00011_0050	3.0E-40	5.0E-40	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-44
	Defective in cuticular ridges	AT5G23940	DCR	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	
	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/ quinate hydroxycinnamoyl transferase	AT5G48930	HCT	kfl00513_0110	1.0E-50	2.0E-50	No blast hit	-	-	-	✓	✓	Fig. 2-45
HXXXD-type acyltransferase family protein	Acetyl CoA:(z)-3-hexen-1-ol acetyltransferase	AT3G03480	CHAT	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	
	Spermidine disinapoyl acyltransferase	AT2G23510	SDT	No blast hit	-	-	No blast hit	-	-	-	-	✓	

Chl[1)]: Chlorophytes; Emb[2)]: Embryophytes

図 2-5. シロイヌナズナ ACT1/ATS1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得



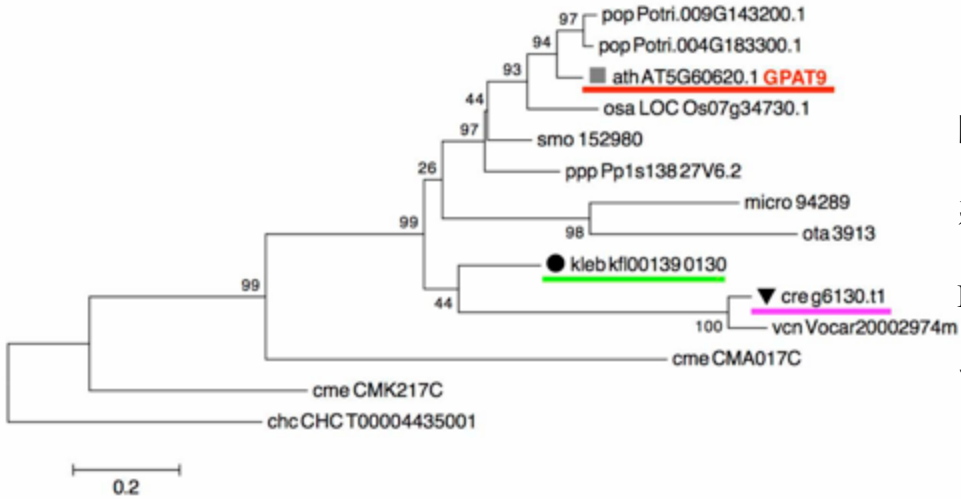


図 2-6. シロイヌナズナ GPAT9 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

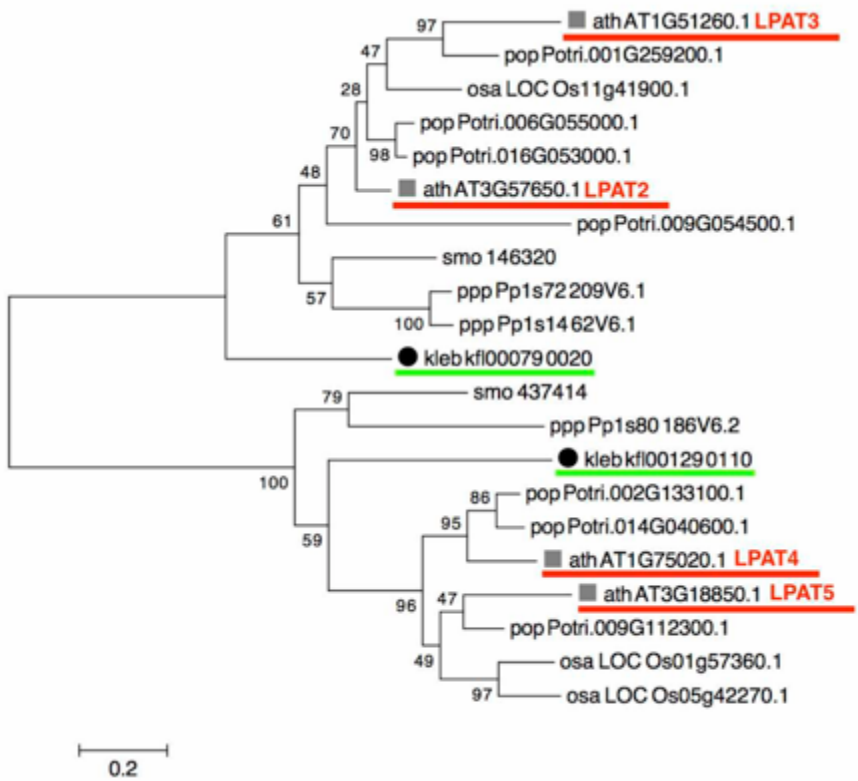


図 2-7. シロイヌナズナ LPAT4、LPAT2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

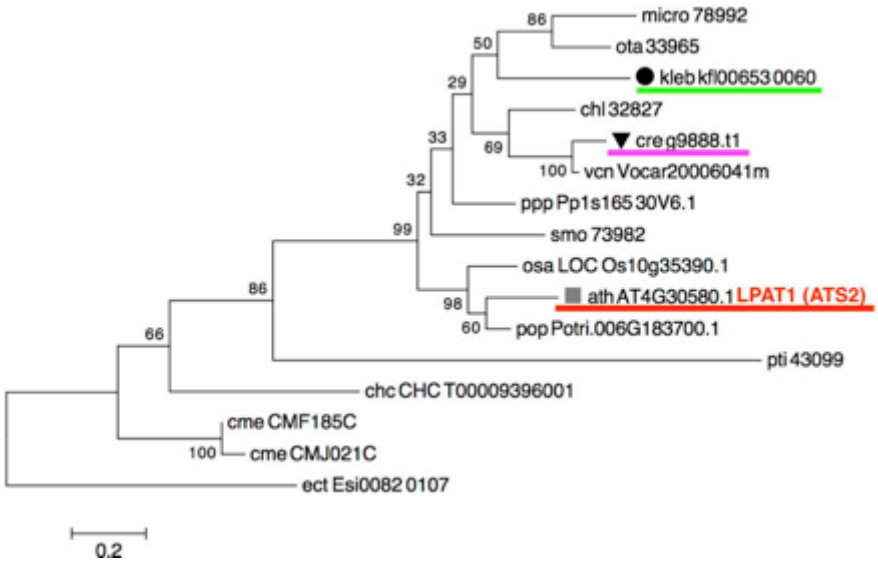


図 2-8. シロイヌナズナ LPAT1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-25}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

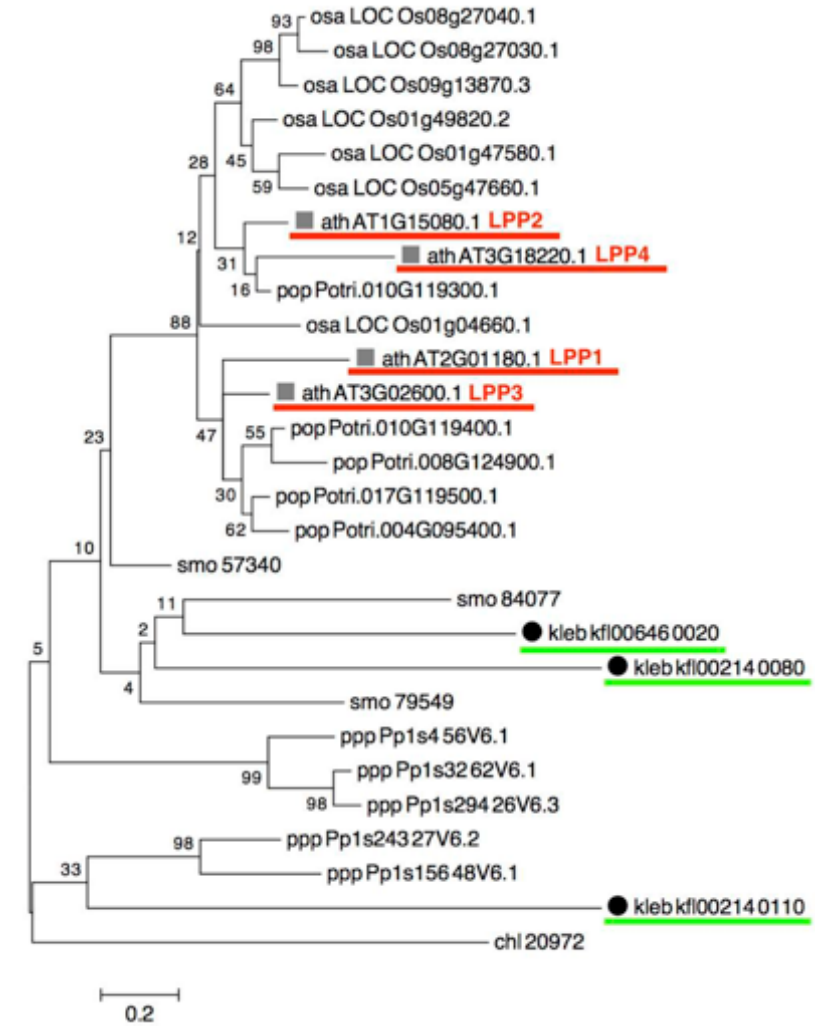


図 2-9. シロイヌナズナ LPPα1~4 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-40}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

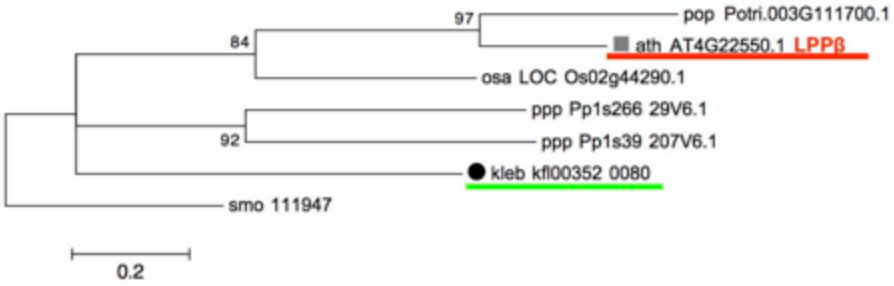


図 2-10. シロイヌナズナ LPPβ と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析 (e-value < 10^{-20})
アミノ酸置換モデルとして LG+G+F を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

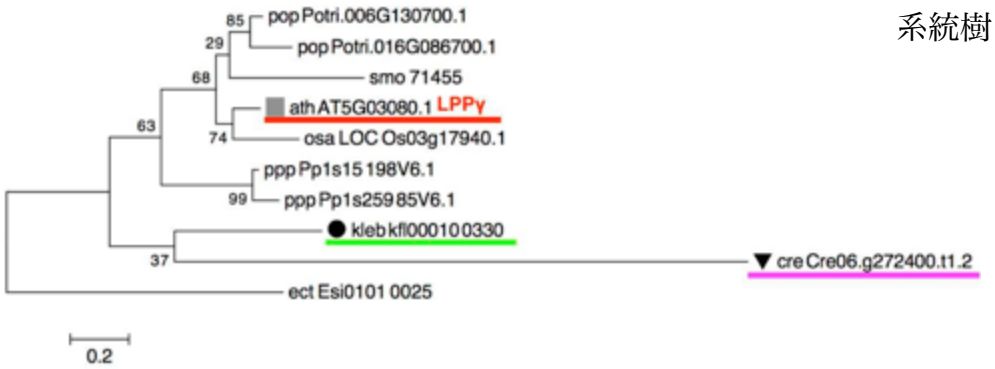


図 2-11. シロイヌナズナ LPPγ と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-20}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

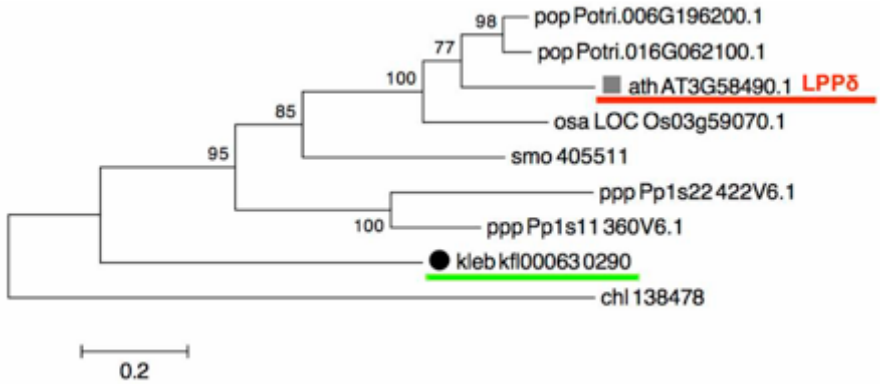


図 2-12. シロイヌナズナ LPPδ と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-40}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

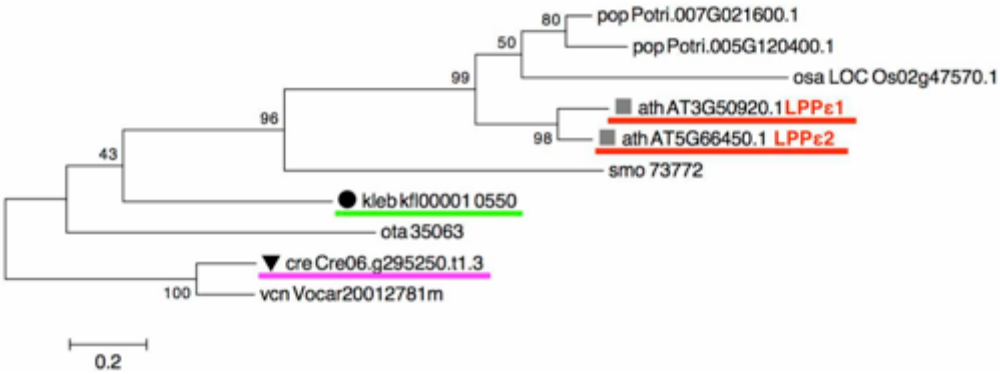


図 2-13. シロイヌナズナ LPPε と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-20}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+F を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

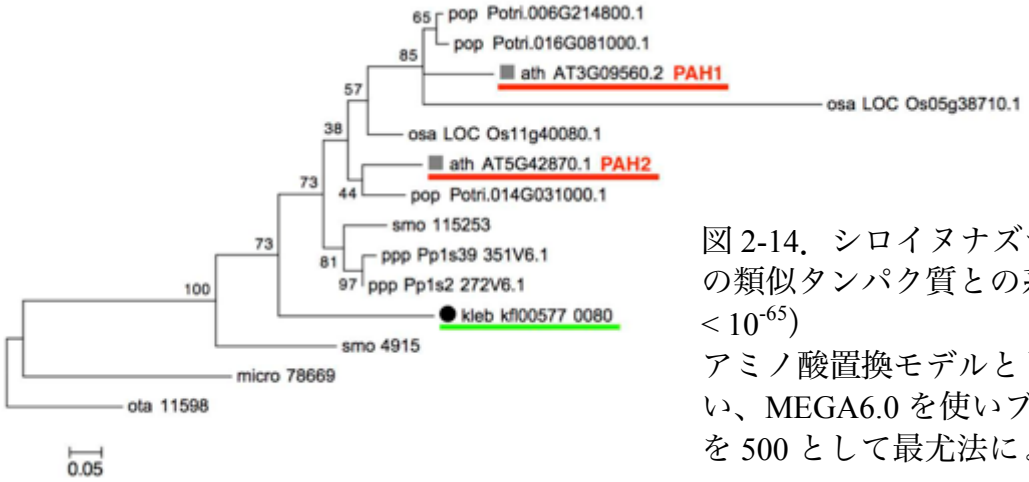


図 2-14．シロイヌナズナ PAH1/2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-65}）
アミノ酸置換モデルとして JTT+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

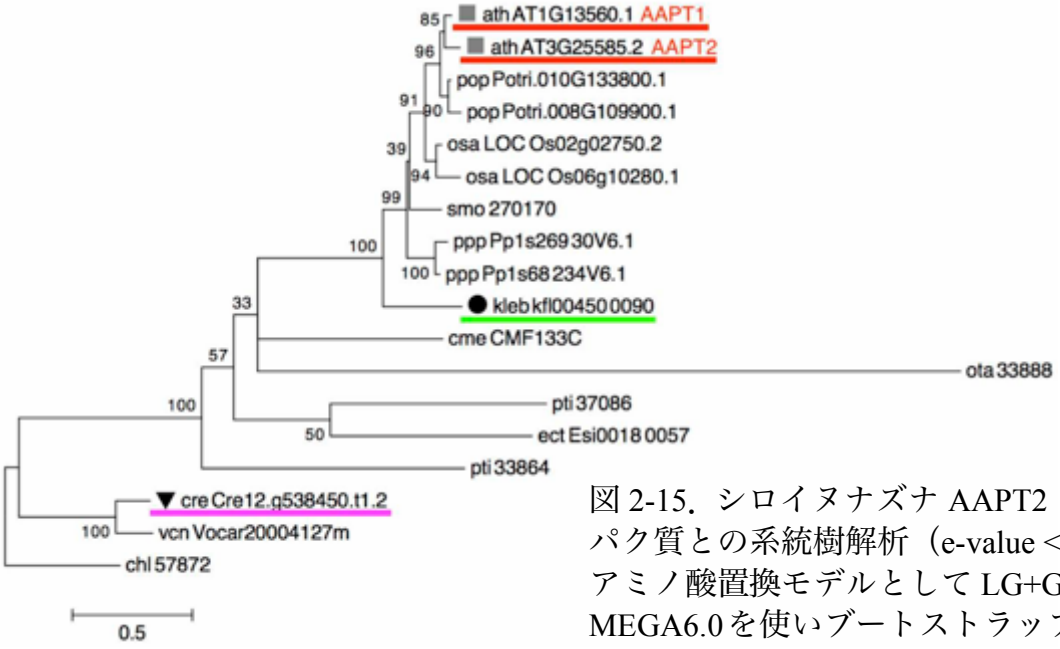


図 2-15．シロイヌナズナ AAPT2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-15}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

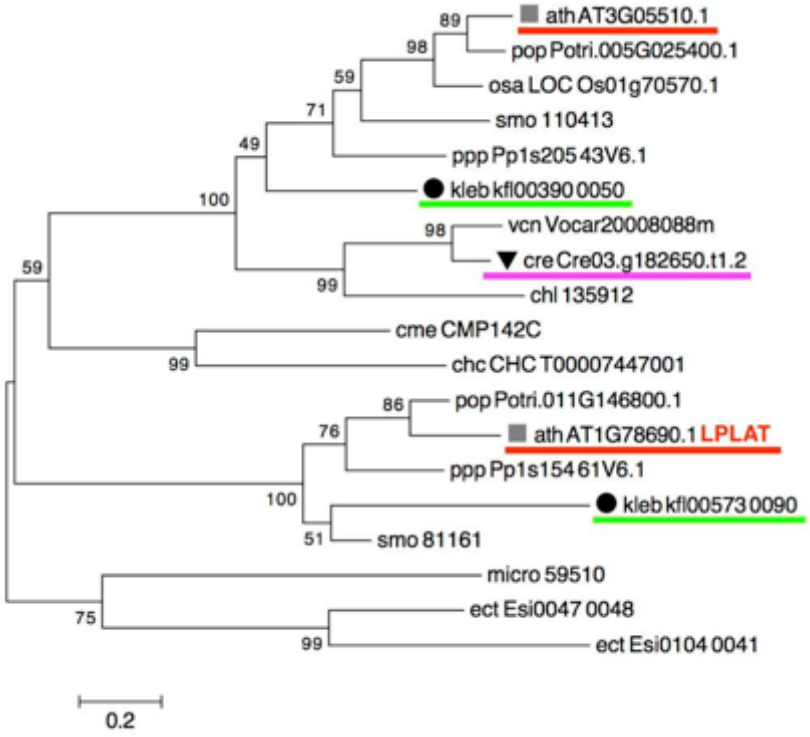


図 2-16．シロイヌナズナ LPLAT と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-25}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

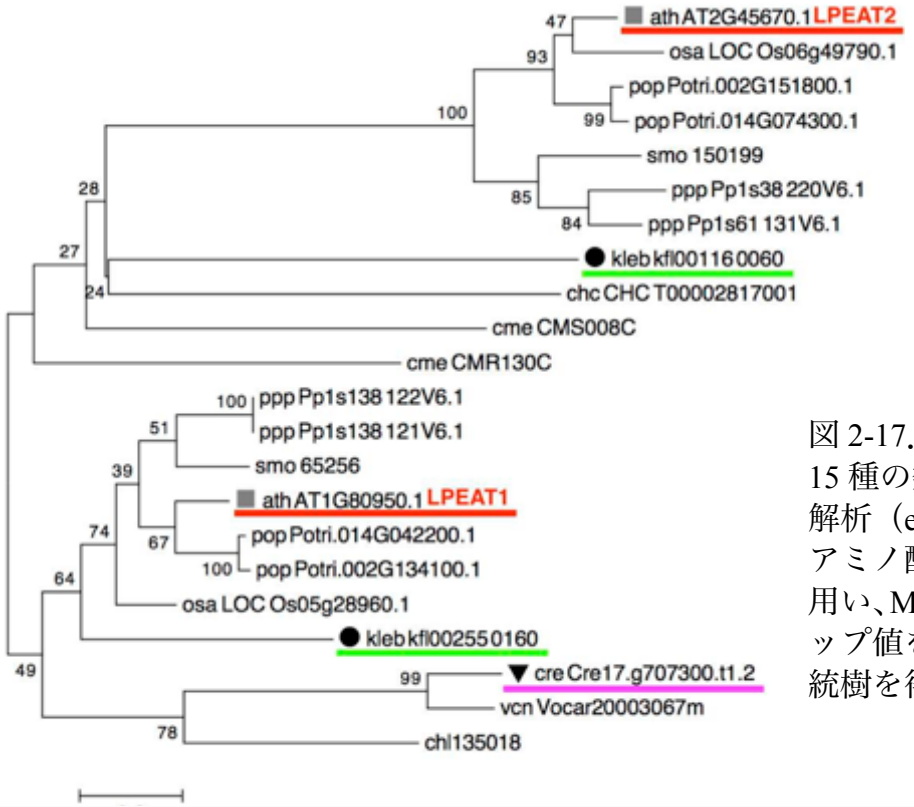


図 2-17. シロイヌナズナ LPEAT と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

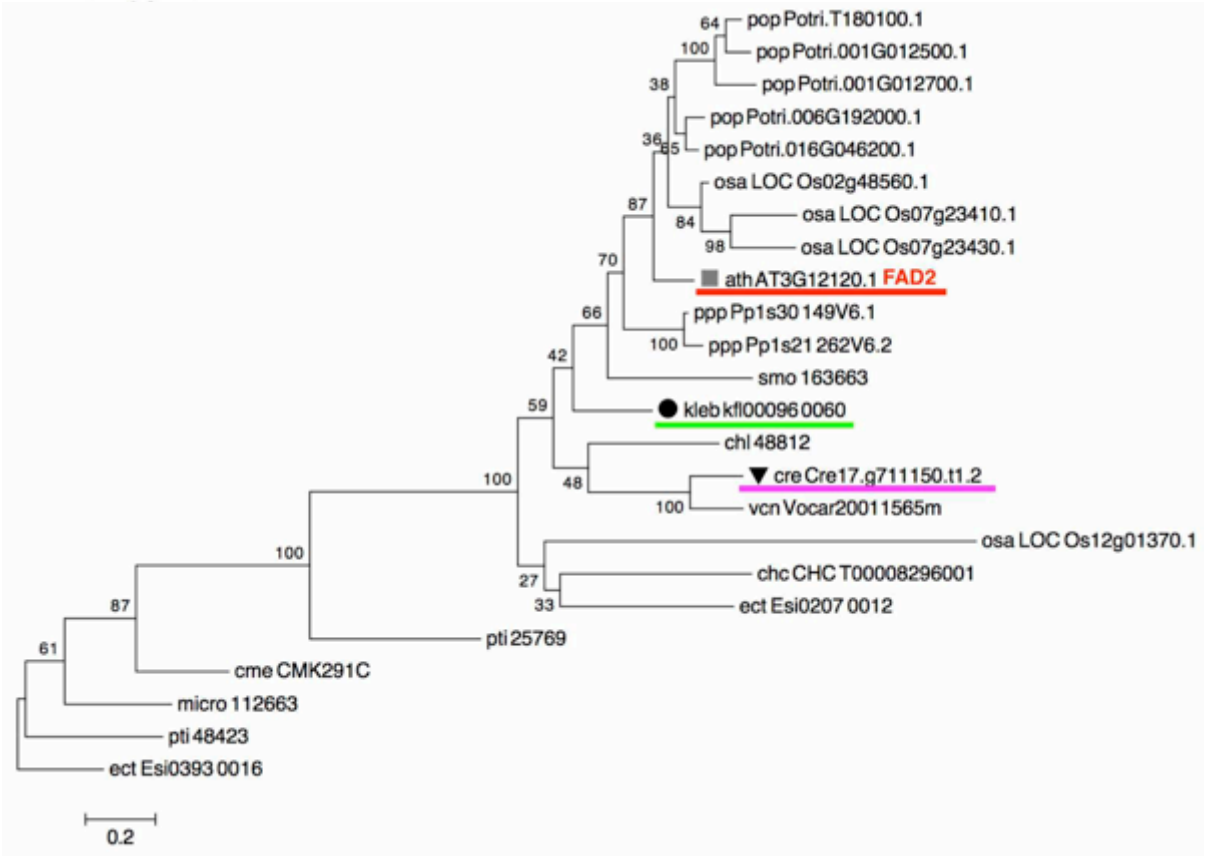


図 2-18. シロイヌナズナ FAD2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-70}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

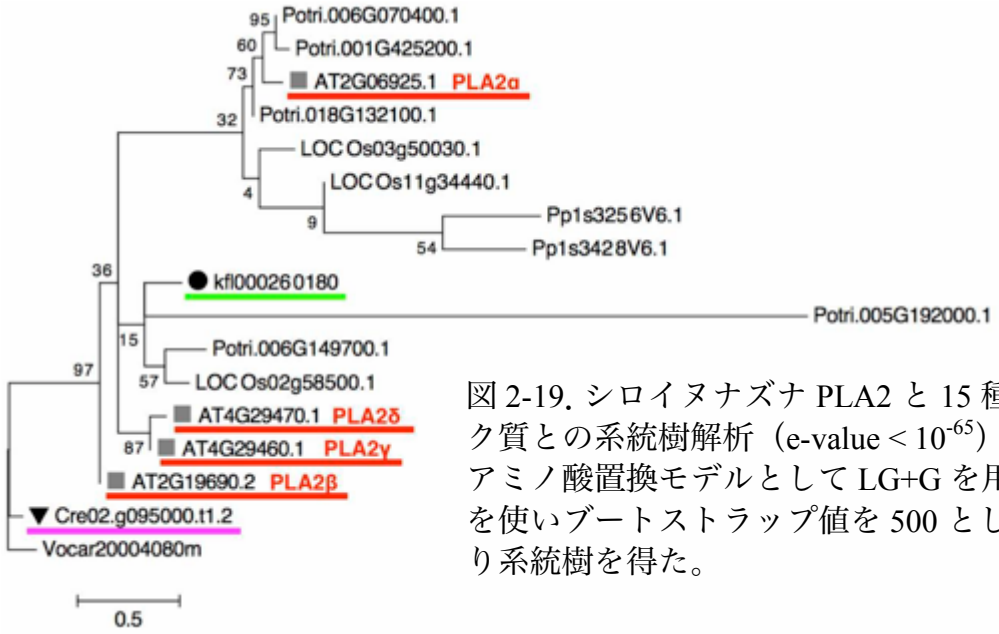


図 2-19. シロイヌナズナ PLA2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-65}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

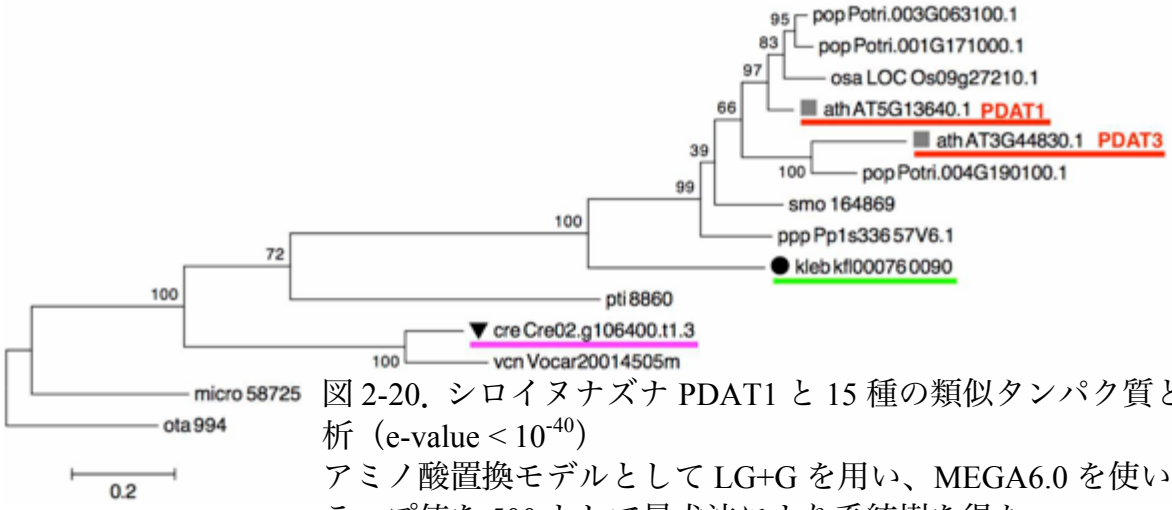


図 2-20. シロイヌナズナ PDAT1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-40}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

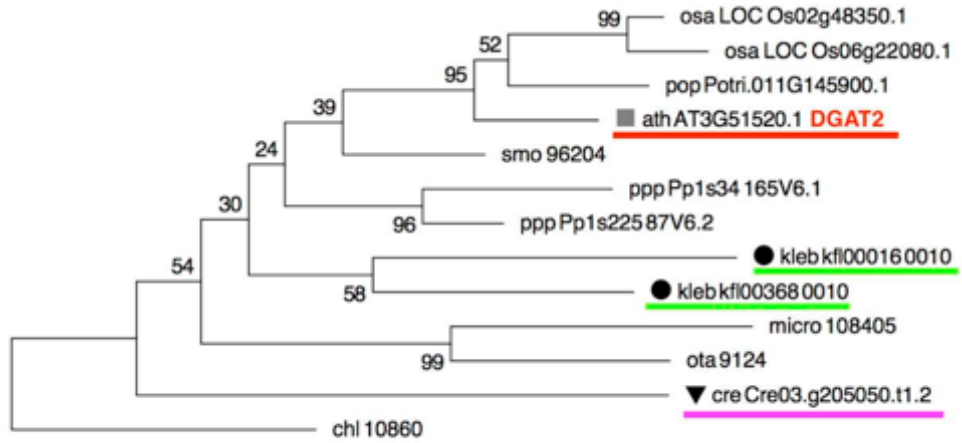


図 2-21. シロイヌナズナ DGAT2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-50}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

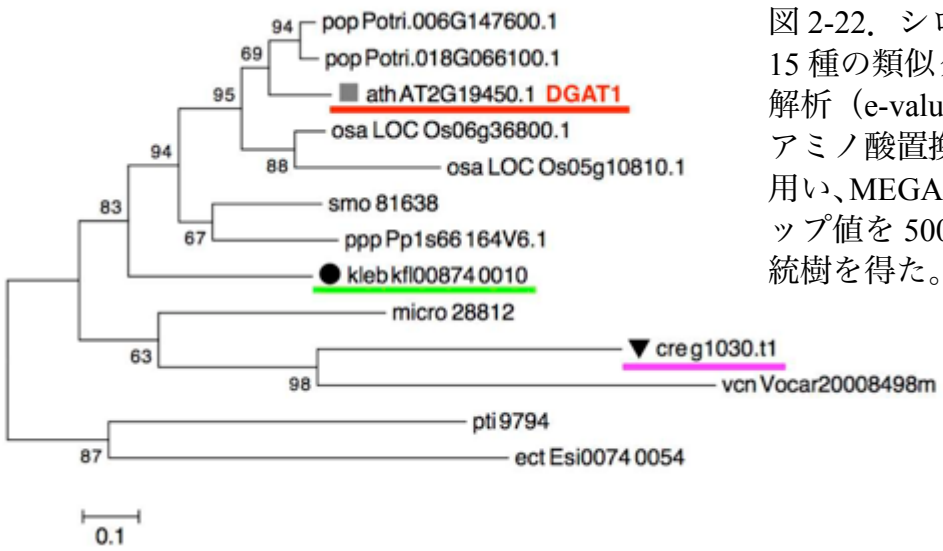


図 2-22．シロイヌナズナ DGAT1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-50}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

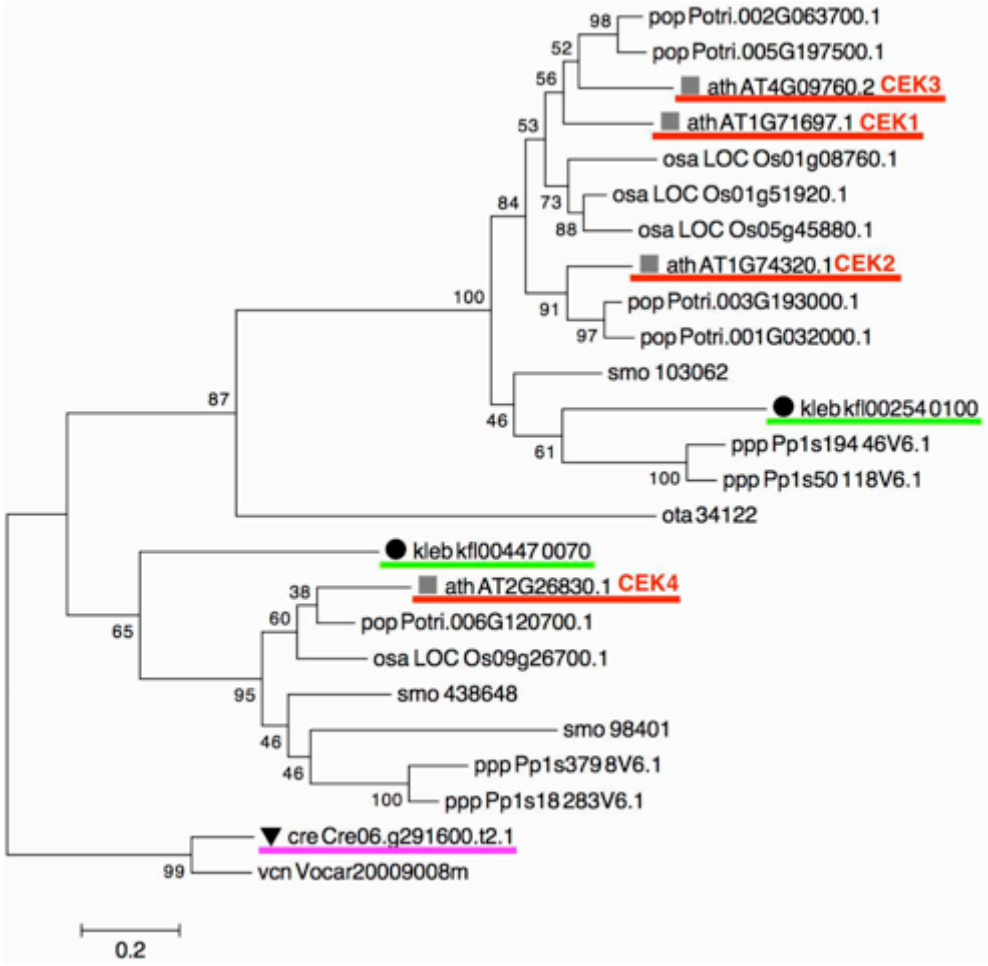


図 2-23．シロイヌナズナ CEK1/2/3/4 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

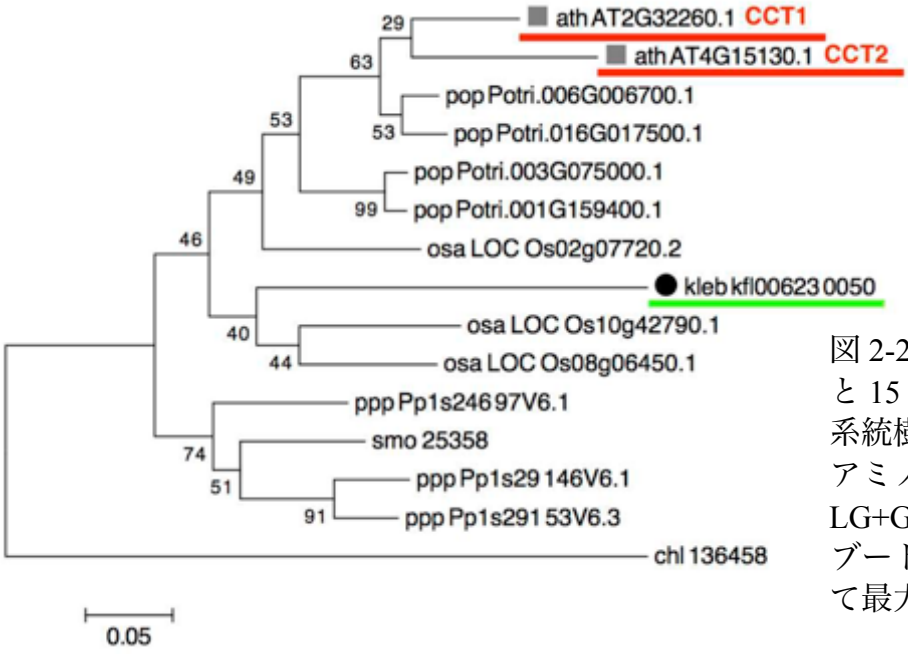


図 2-24．シロイヌナズナ CCT1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-100}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

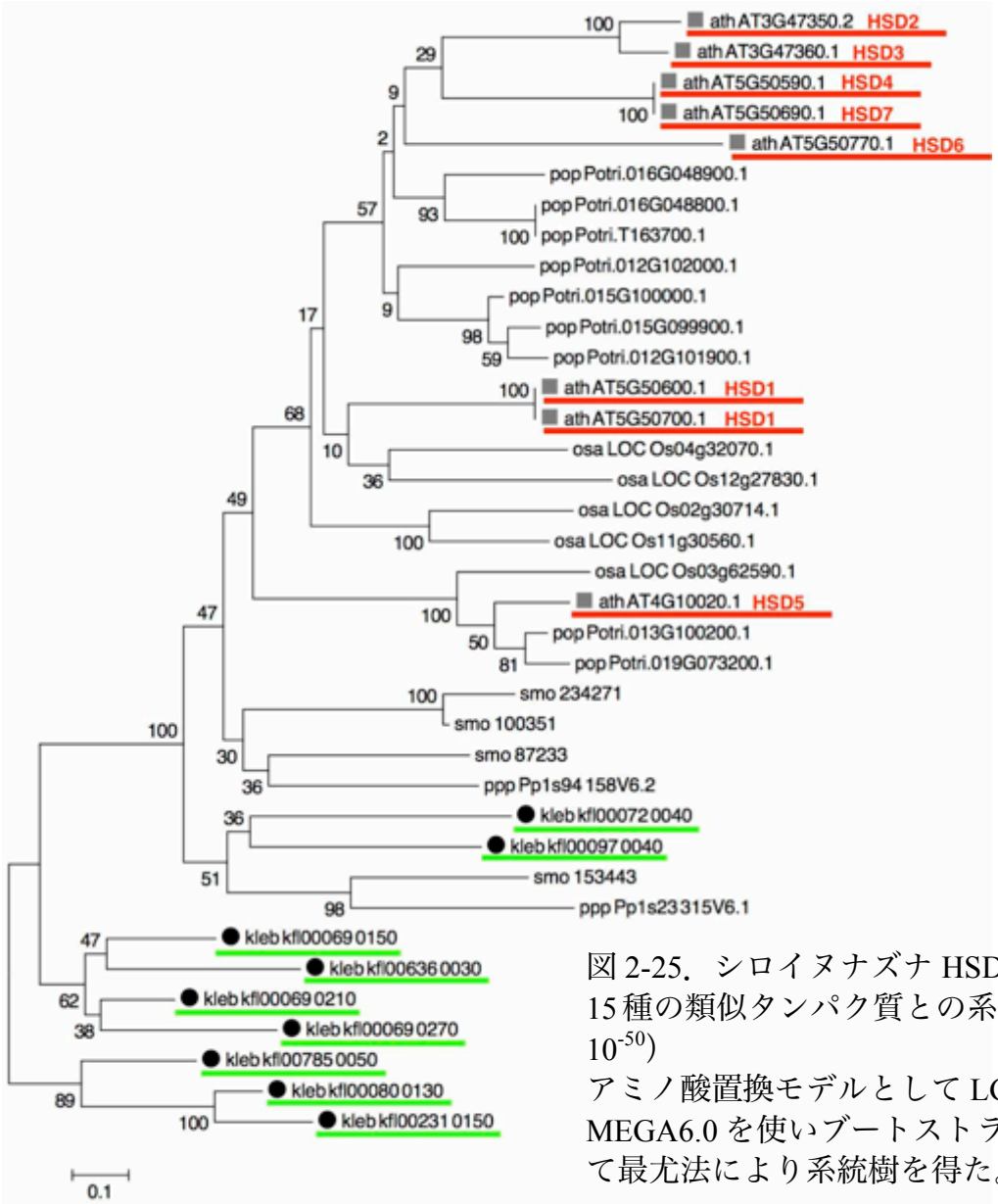


図 2-25．シロイヌナズナ HSD（steroleosin）と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-50}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

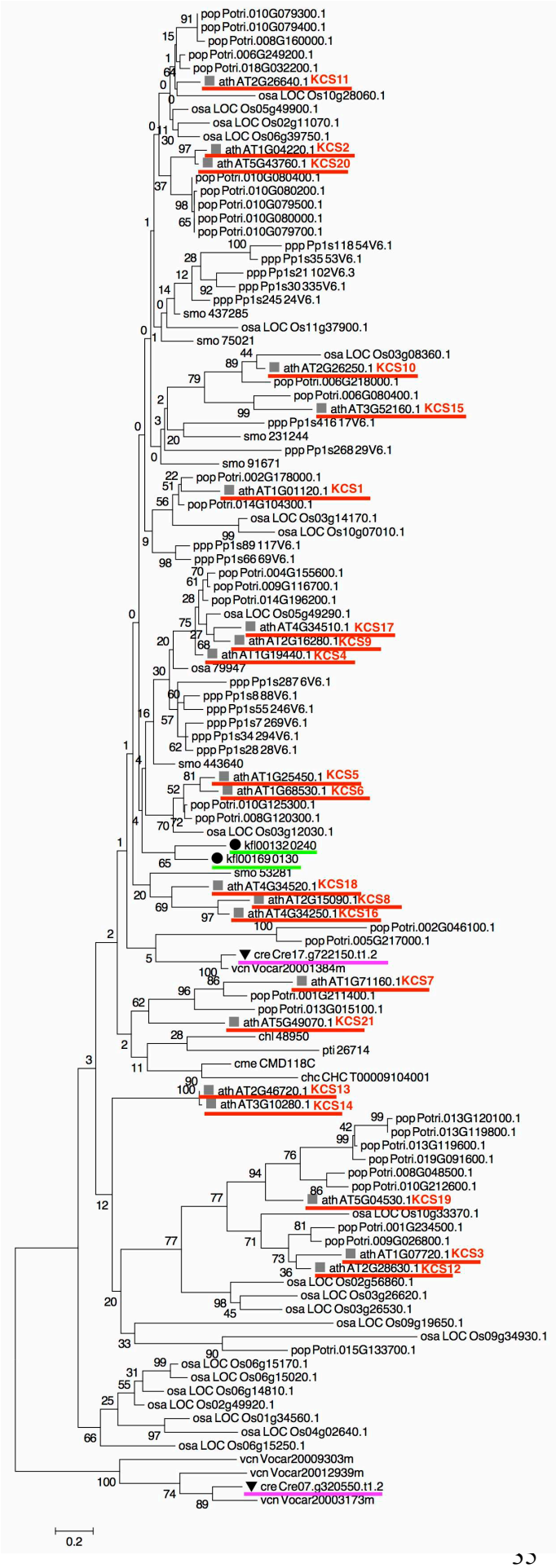


図 2-26. シロイヌナズナ KCSs と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-70}）アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

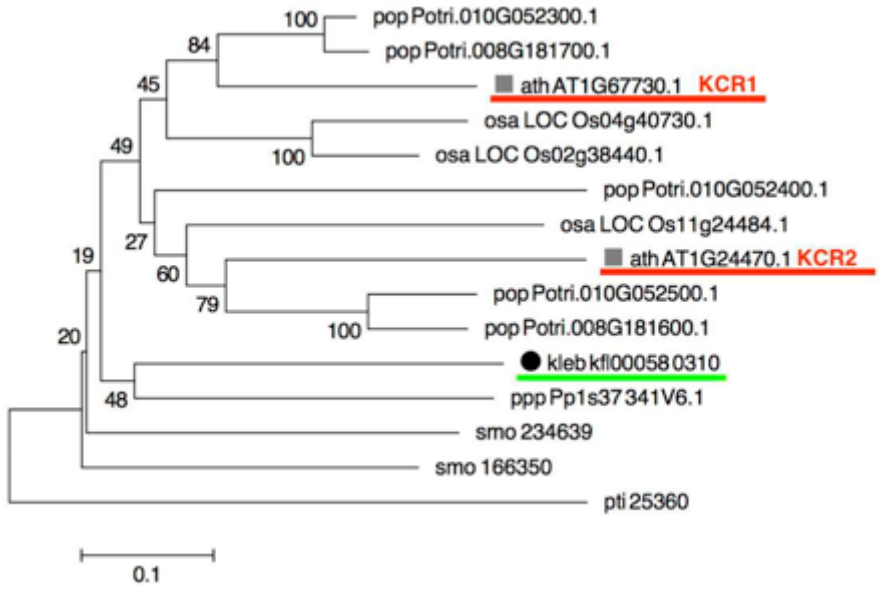


図 2-27. シロイヌナズナ KCR と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-80}）
アミノ酸置換モデルとして JTT+I+F を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

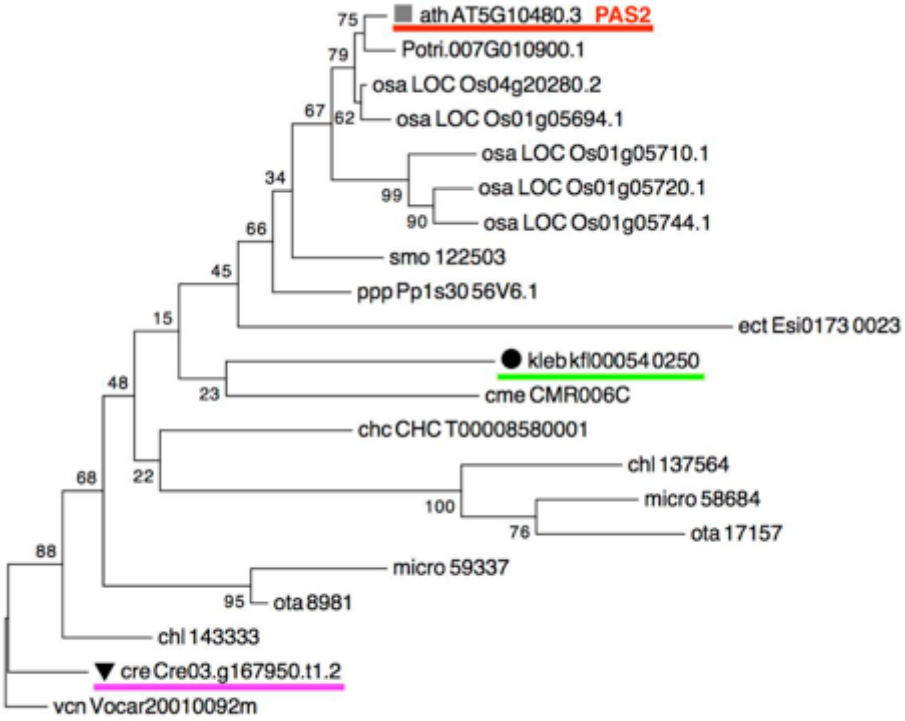


図 2-28. シロイヌナズナ PAS2（HACD）と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+F を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

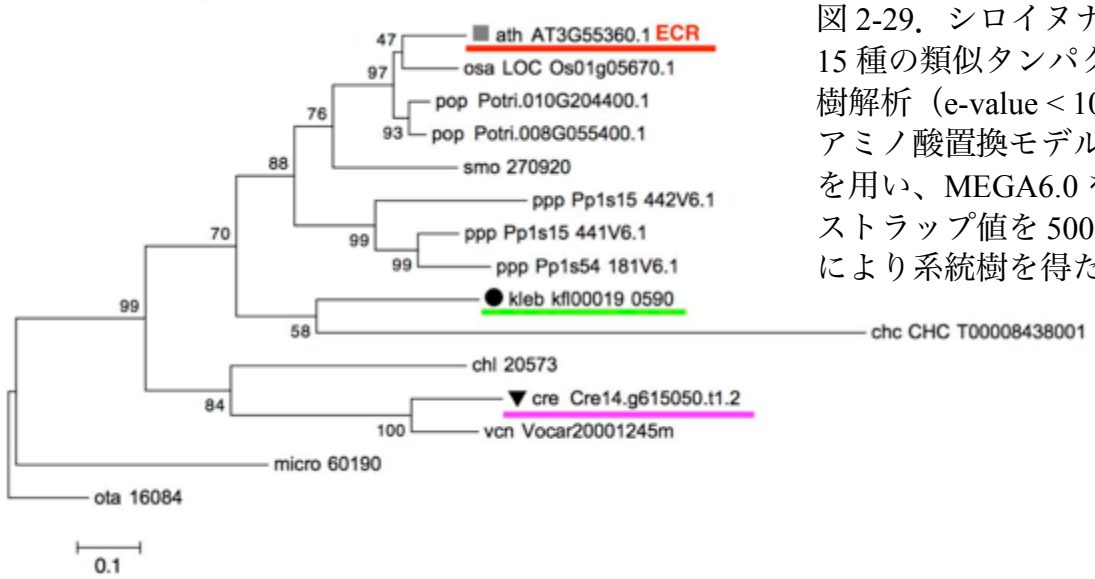


図 2-29. シロイヌナズナ ECR と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-70}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

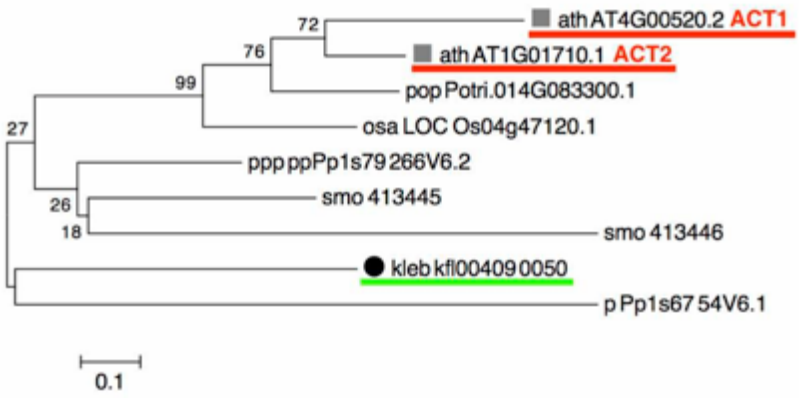


図 2-30. シロイヌナズナ ACT2 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析 (e-value < 10^{-30}) アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

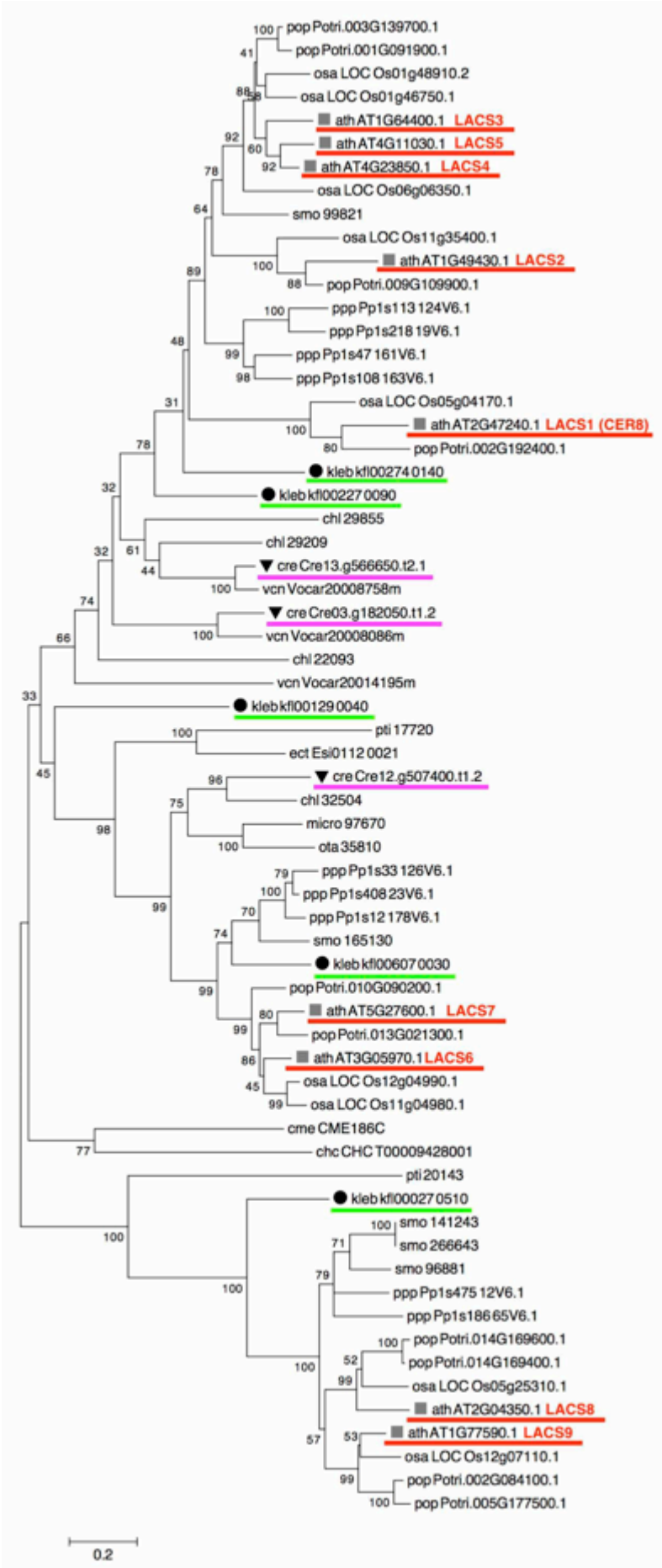


図 2-31. シロイヌナズナ LACS と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-70}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

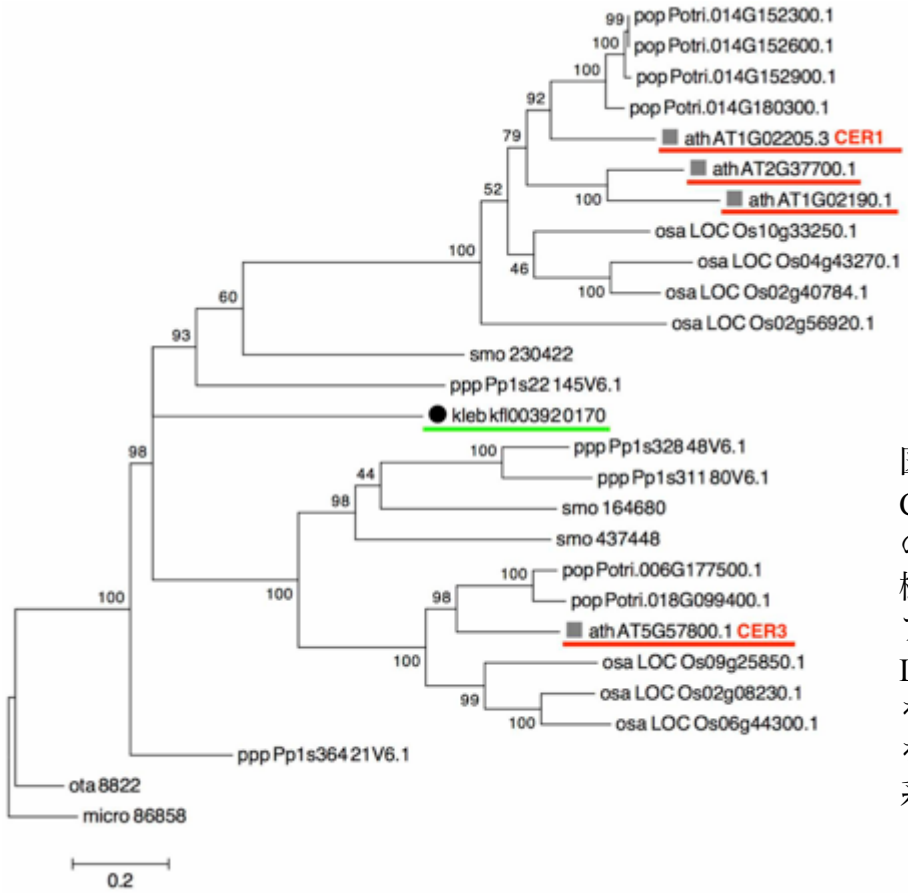


図 2-32．シロイヌナズナ CER1 および CER3 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-70}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

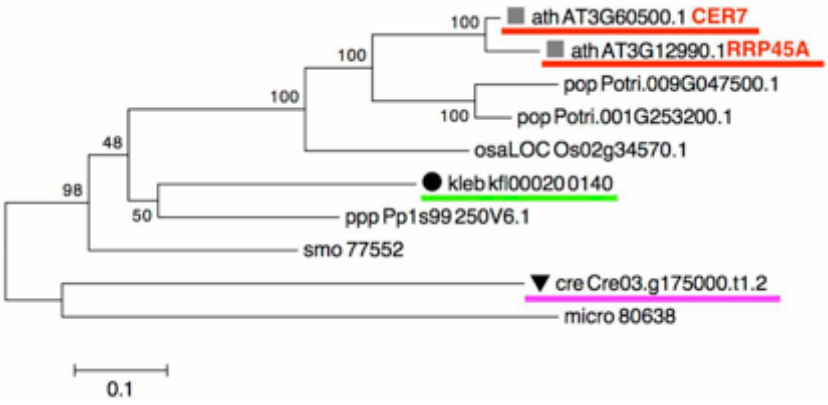


図 2-33．シロイヌナズナ CER7 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-60}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

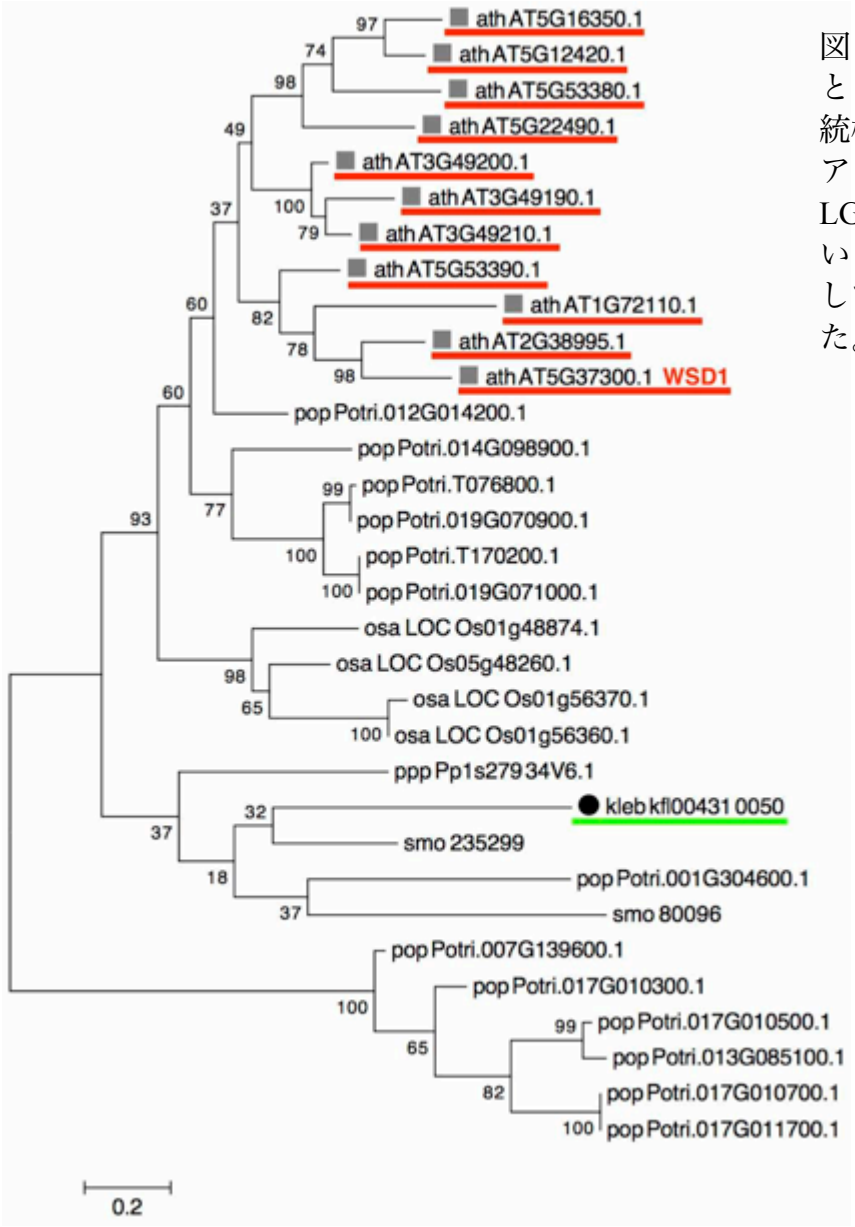


図 2-34．シロイヌナズナ WSD1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

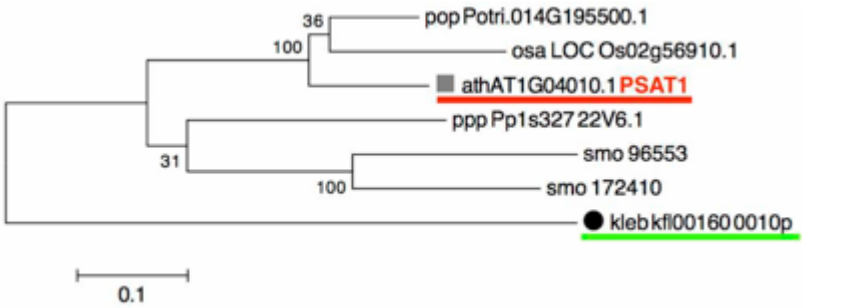


図 2-35．シロイヌナズナ PSAT1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-100}）
アミノ酸置換モデルとして JTT+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

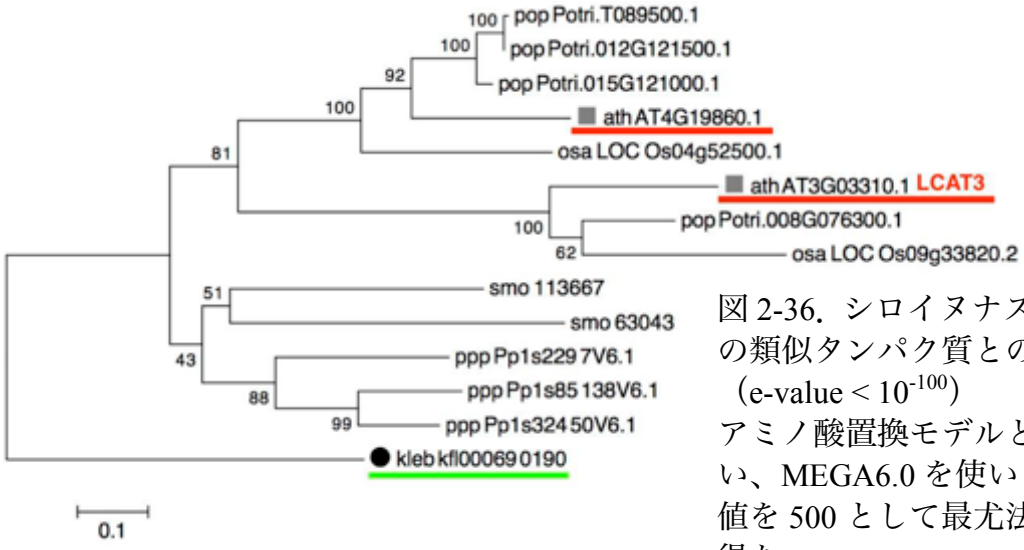


図 2-36. シロイヌナズナ LCAT と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-100}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

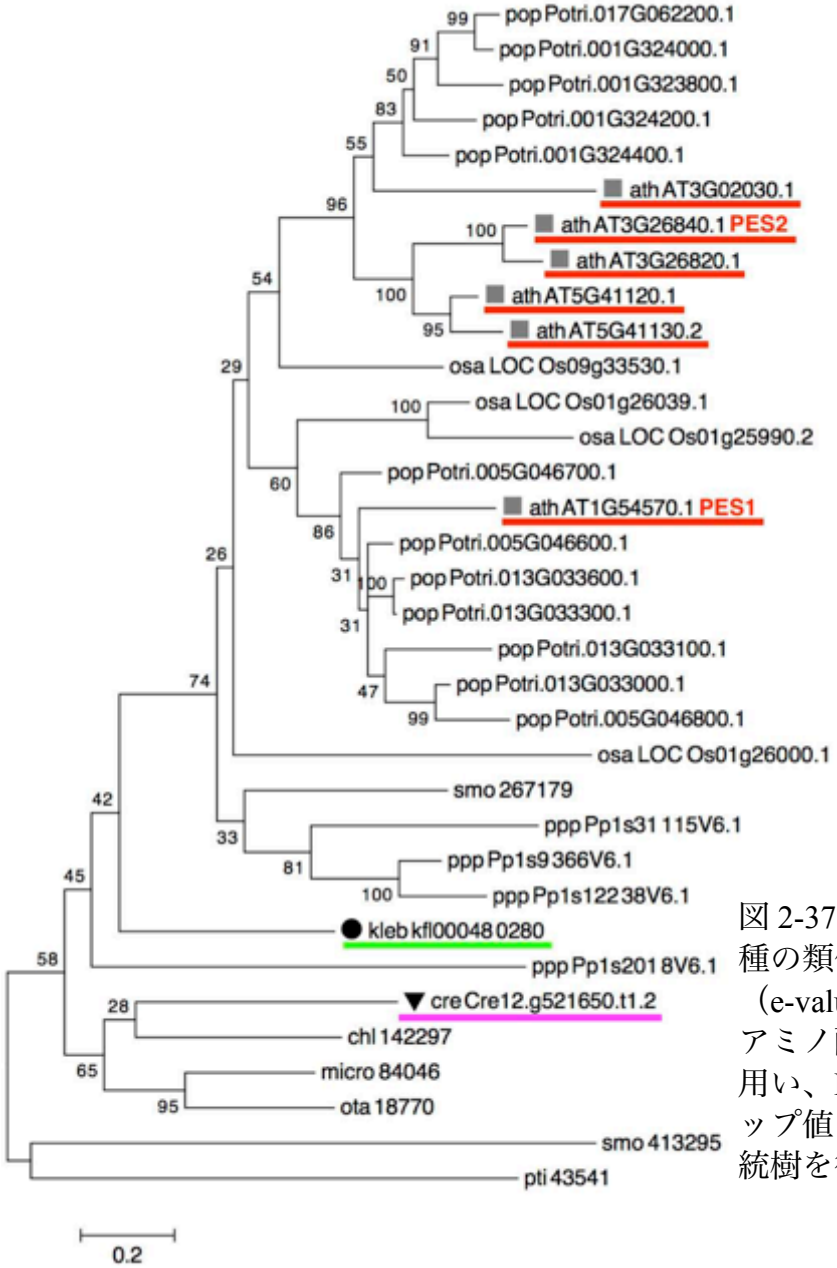


図 2-37. シロイヌナズナ PES1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-50}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

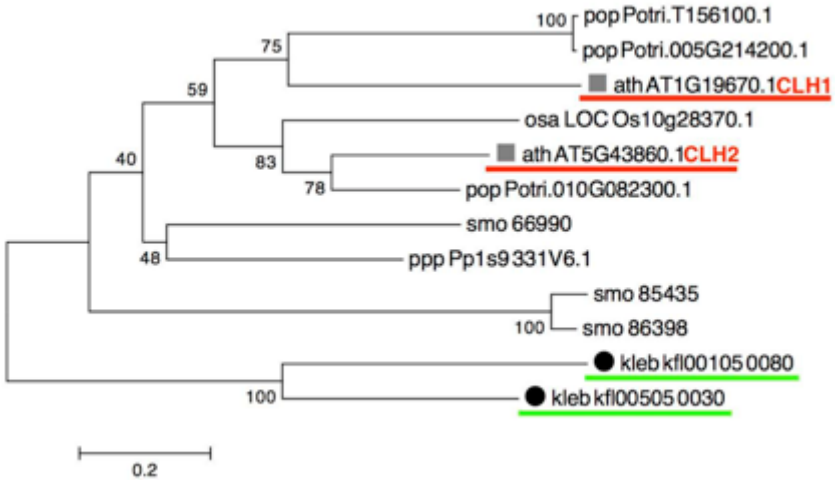


図 2-38. シロイヌナズナ CLH と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-35}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

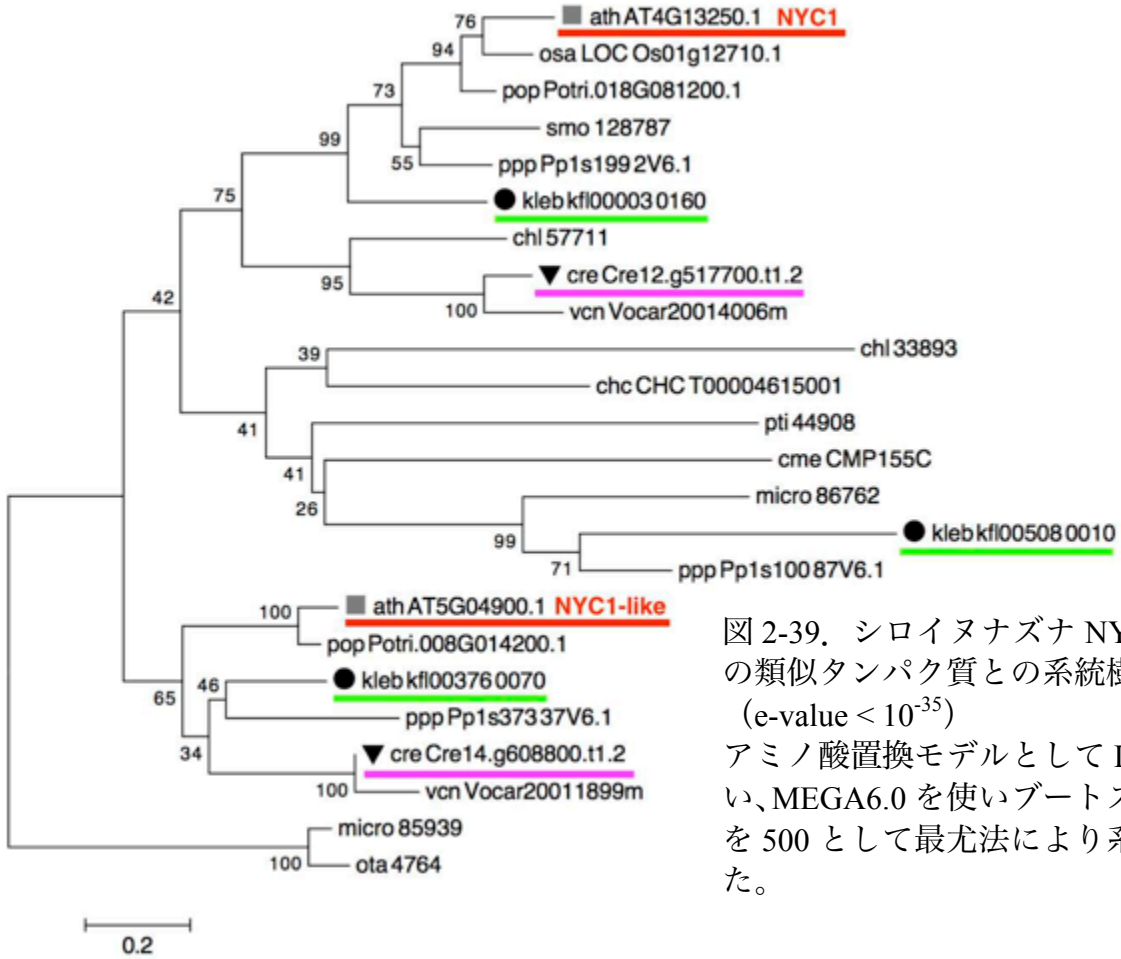


図 2-39. シロイヌナズナ NYC1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-35}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

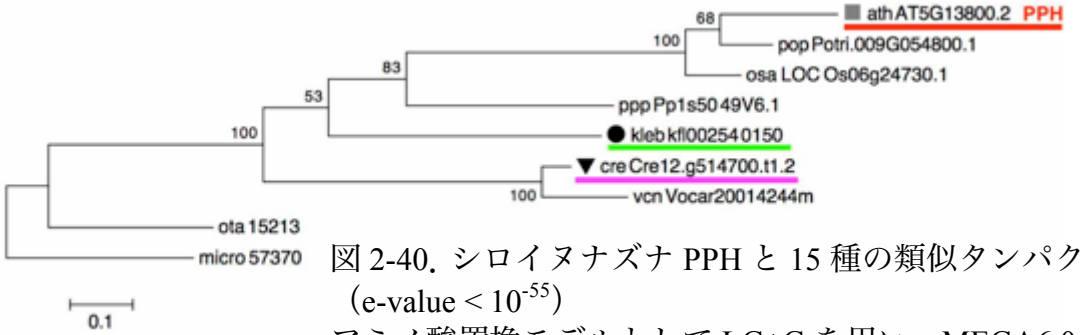


図 2-40. シロイヌナズナ PPH と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-55}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

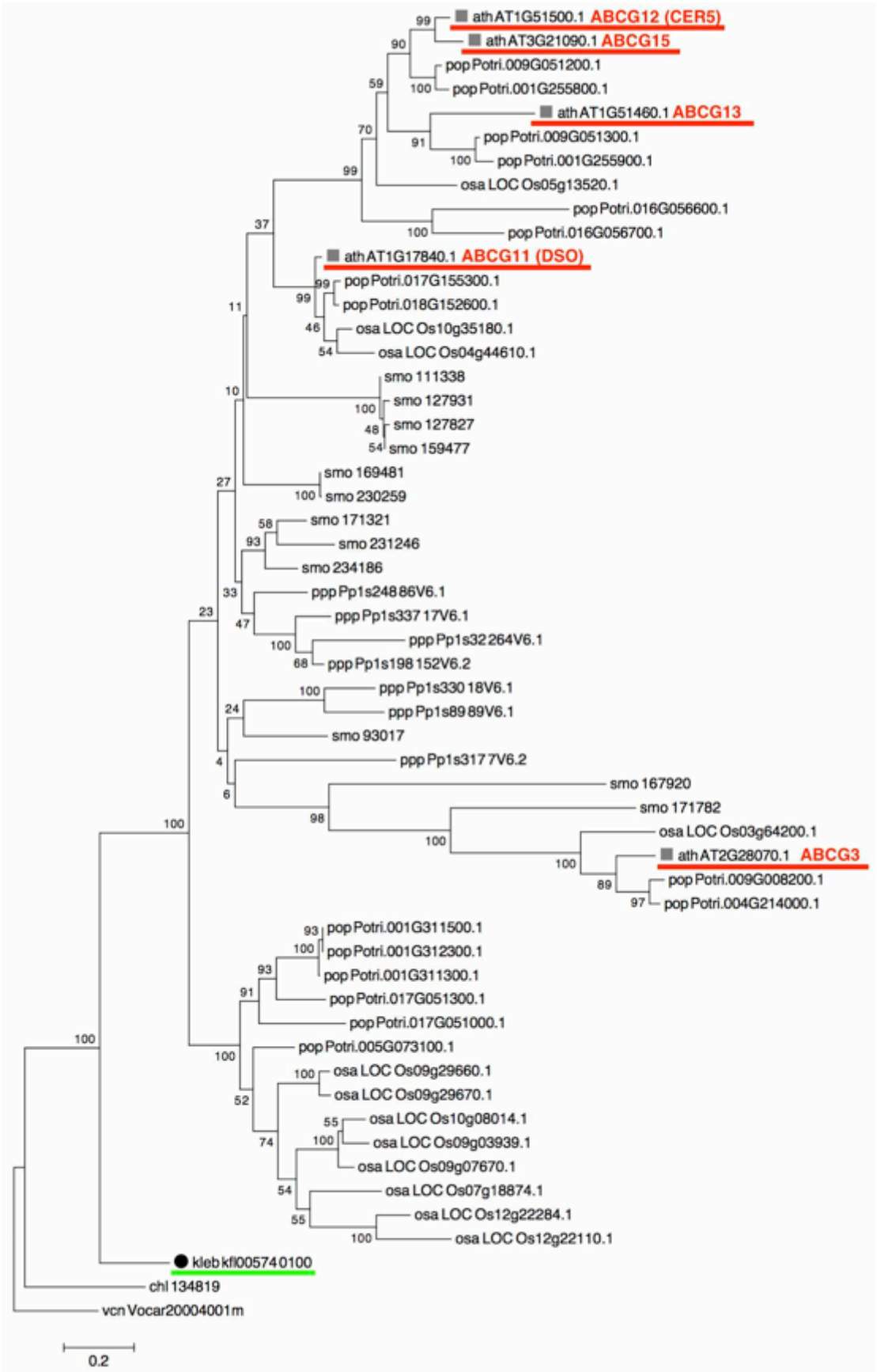


図 2-41. シロイヌナズナ ABCG 輸送体と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

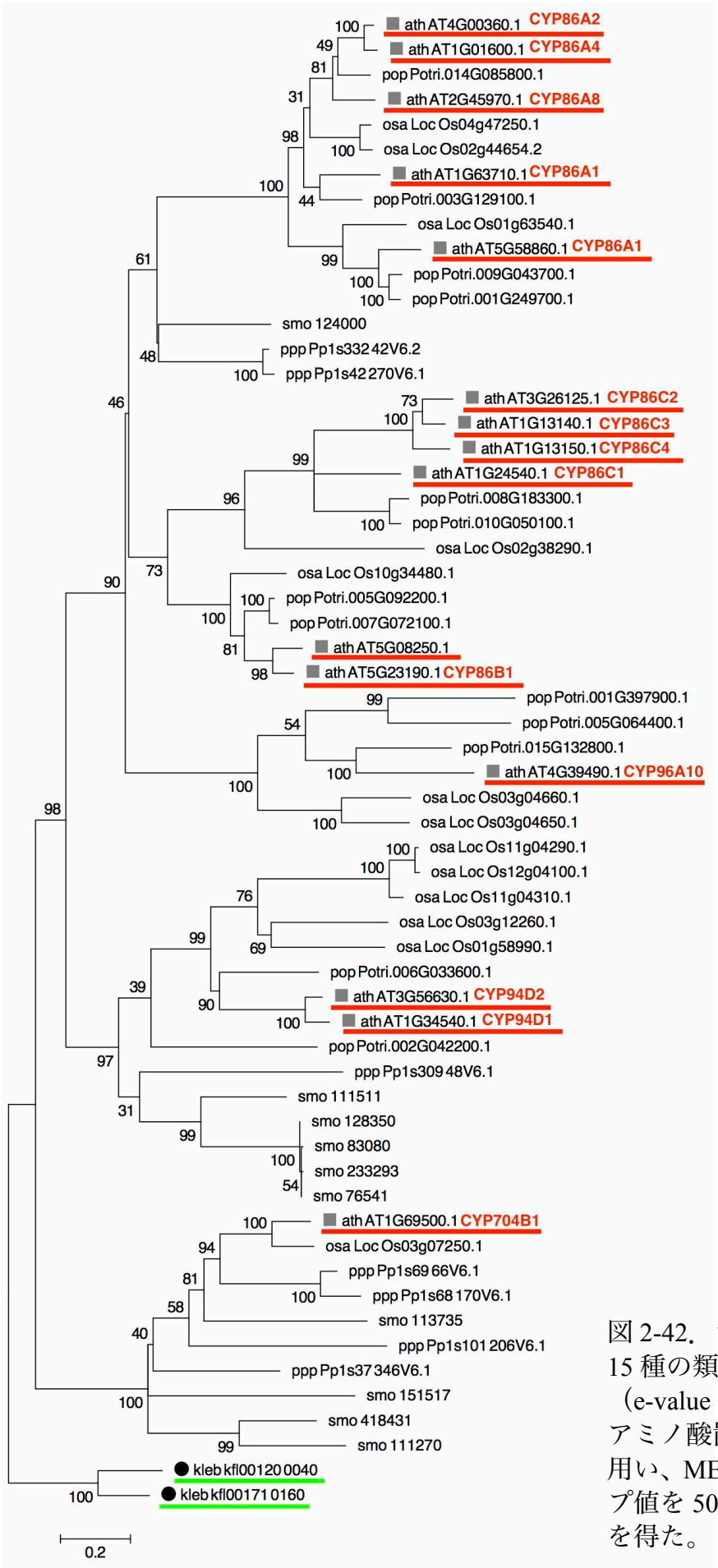


図 2-42. シロイヌナズナ CYP86A8 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-100}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G+I を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

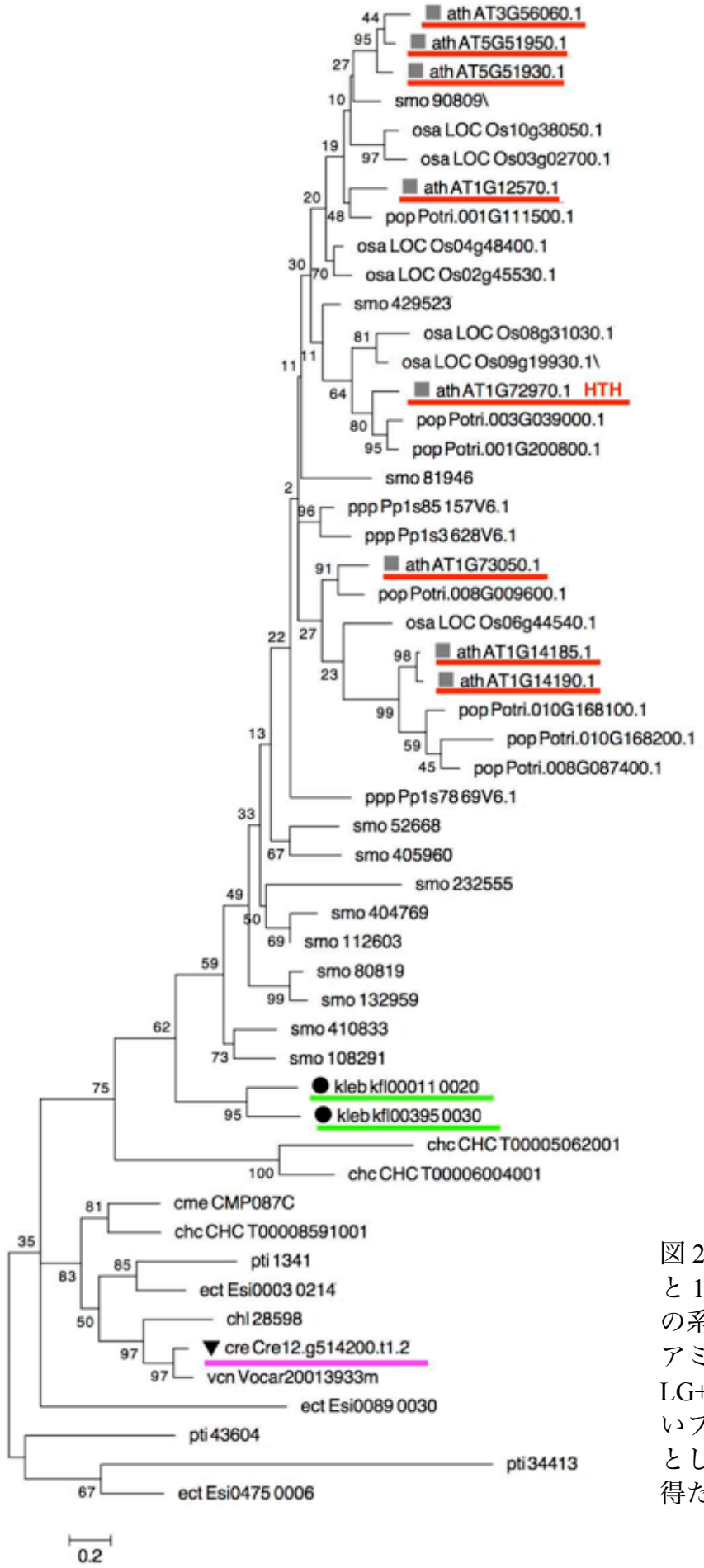


図 2-43. シロイヌナズナ HTH と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-3}）アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

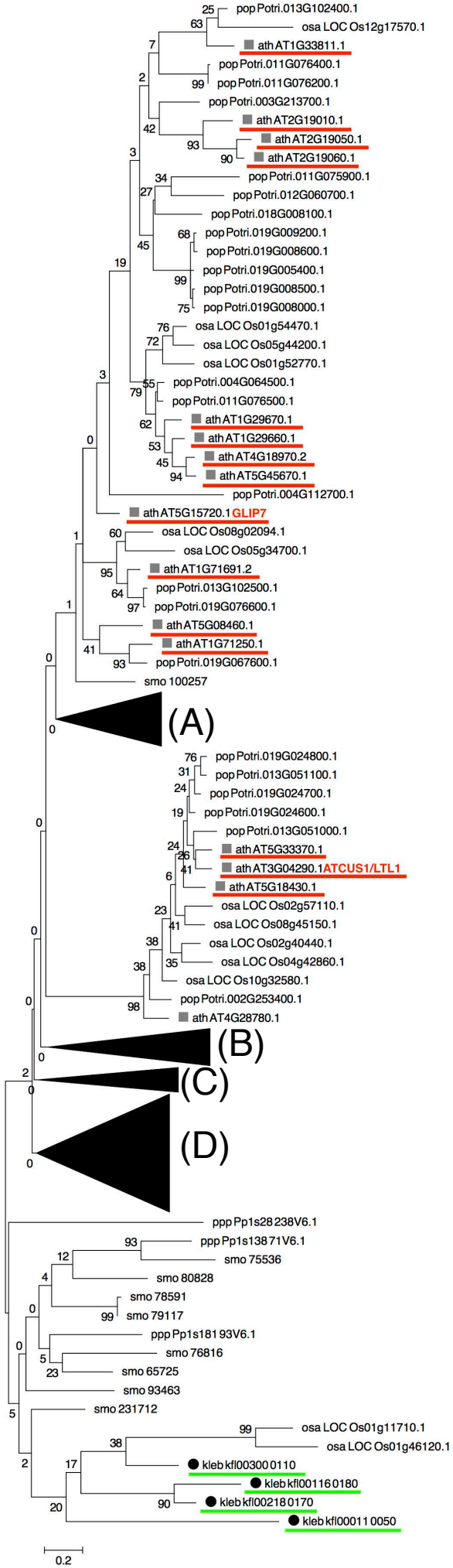
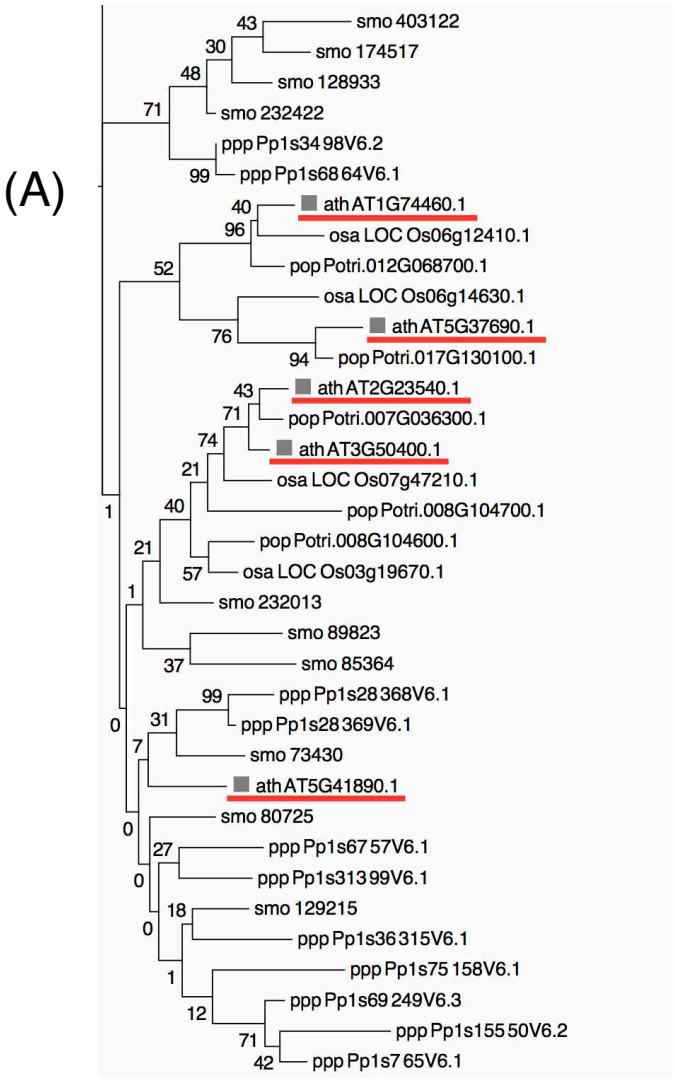
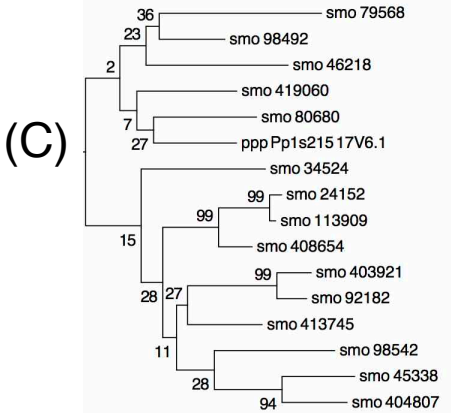


図 2-44. シロイヌナズナ AtCUS1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-30}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。





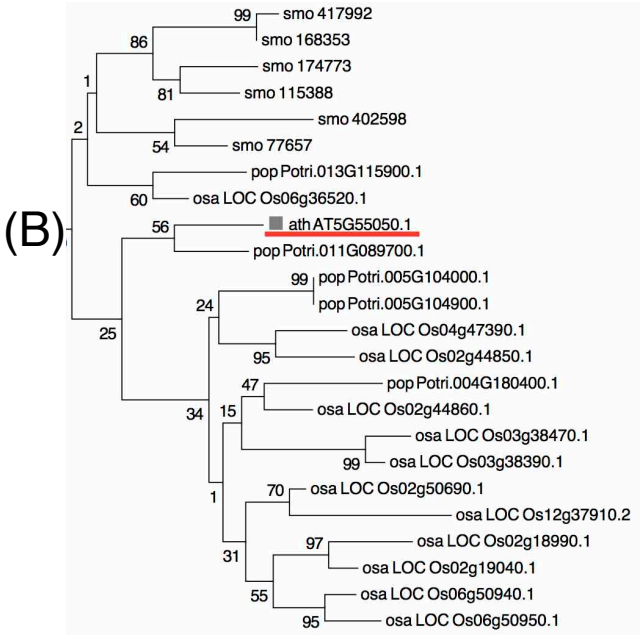


図 2-44. シロイヌナズナ AtCUS1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（続き）

(D)

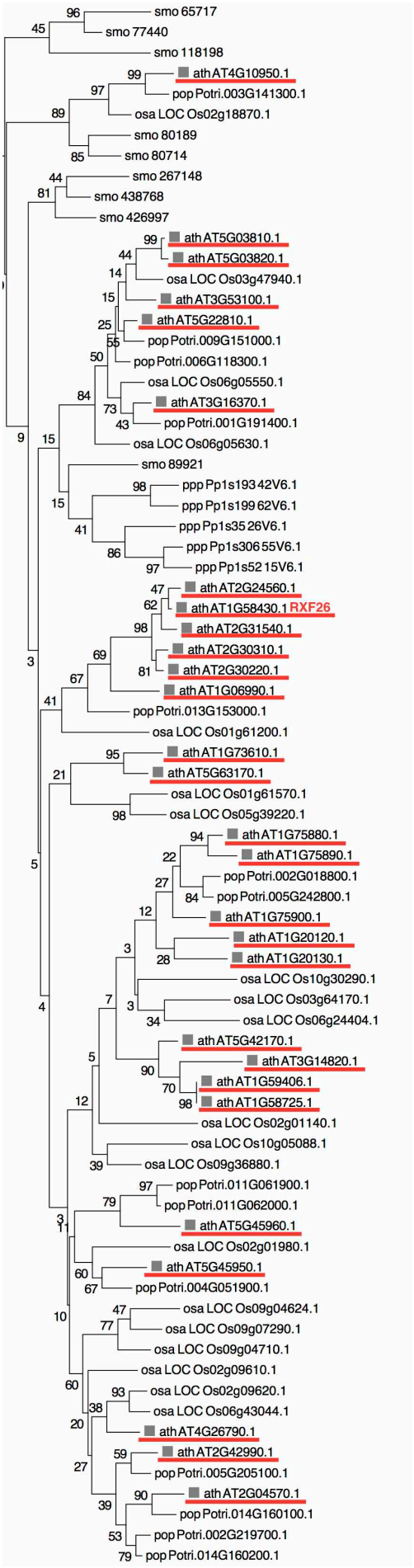


図 2-44. シロイヌナズナ AtCUS1 と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（続き）

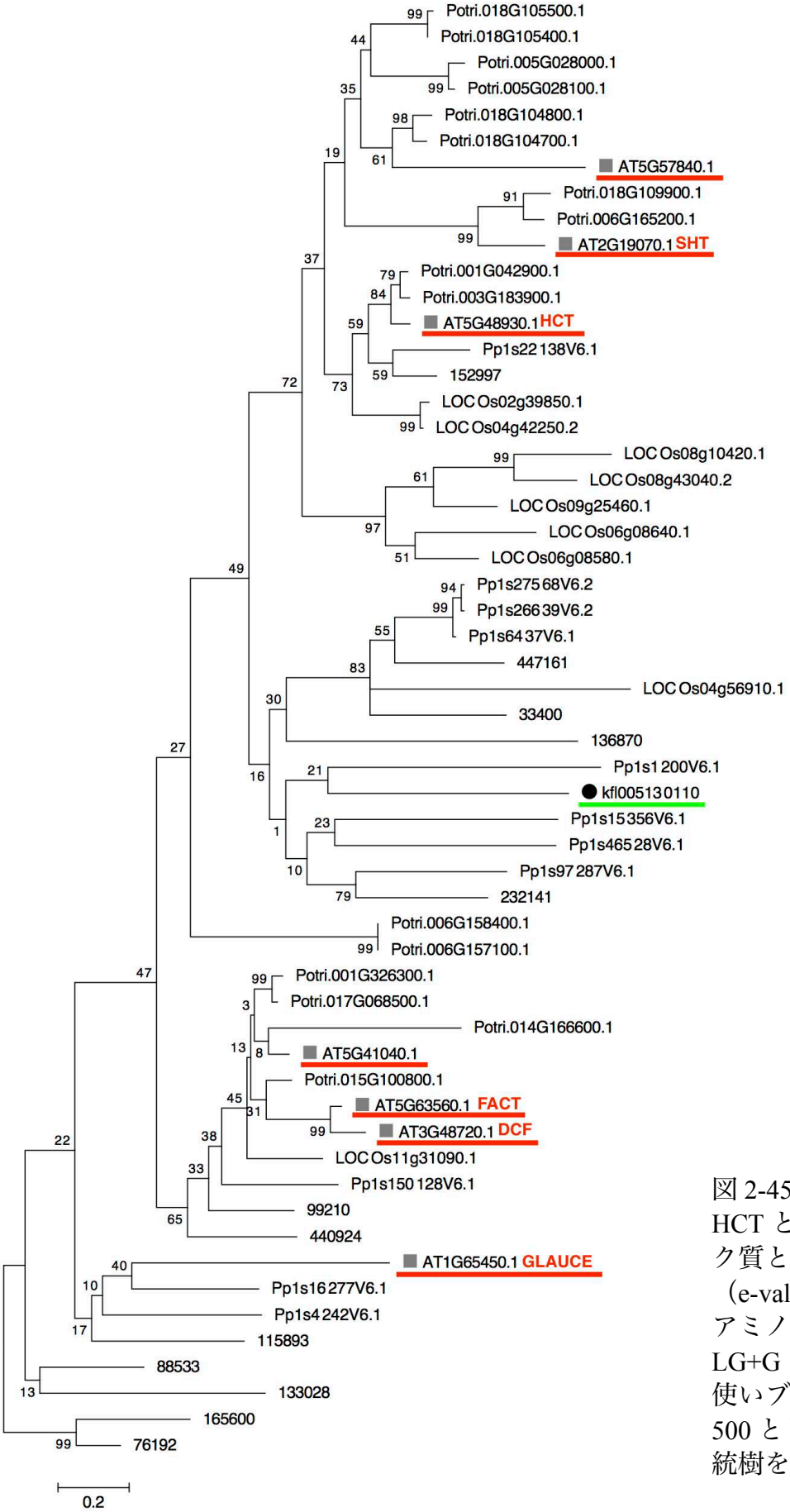


図 2-45．シロイヌナズナ HCT と 15 種の類似タンパク質との系統樹解析（e-value < 10^{-50}）
アミノ酸置換モデルとして LG+G を用い、MEGA6.0 を使いブートストラップ値を 500 として最尤法により系統樹を得た。

３．*K. flaccidum* および *C. reinhardtii* の細胞外脂質の分析

緒言

維管束植物はその地上部の表層にクチクラを持つ。クチクラは細胞壁の外側で、細胞内側から外側に向かってクチクラ層、クチクラプロパー、エピクチクラワックスと 3 層構造をなしている（Jetter ら、2006；Pollard ら、2008）。最内層であるクチクラ層は細胞壁から連続した構造をとっている（Sitte & Rennier, 1963; Schreiber & Schönherr, 2009）。クチクラ層は細胞壁から伸びた多糖と、クチンポリマーから構成された骨格にワックスが埋め込まれており、そのワックスは細胞壁内層から外側に向かい増加する（Sitte & Rennier, 1963；Bargel ら、2006；Schreiber & Schönherr, 2009）。クチクラプロパーでもクチンポリマーが骨格を形成し、その隙間をワックスが埋めている（Sitte & Rennier, 1963；Schreiber & Schönherr, 2009）。エピクチクラワックスにはポリマー構造が認められず、ワックスのみで形成されている（Jetter ら, 2006）。このワックスに含まれる化合物は主に鎖長 20 以上の極長鎖脂肪酸由来の脂肪酸誘導体、すなわちアルカン、1 級アルコール、2 級アルコール、ケトン、アルデヒド、脂肪酸、ワックスエステルである（Li-Beisson ら、2013）。なお、ワックスエステルには鎖長 18 以下の脂肪酸とアルコールも含まれる（Lai ら、2007）。すべてのワックス成分は固体状態で、一部結晶化しているものも認められる（Kunst & Samuels、2003；Kunst & Samuels、2009；Samuels ら、2008：Lee & Suh、2015）。植物種によってエピクチクラワックスの構成成分はやや異なっており、シロイヌナズナは上記成分をすべて持っているが、イネ科植物ではケトンを持たない種もある（Steinmüller & Terini、1985）。蘚苔類でも一部の種についてワックス組成が調べられている。その組成はアルカン、１級アルコール、アルデヒド、脂肪酸、ワックスエステルから成り、ケトンと２級アルコールが認められなかった点で維管束植物よりも簡素である（Haas、1982）。しかし、それぞれ炭素数 20 以上の VLCFA を元に誘導体化されている点は維管束植物と類似している（Haas、1982）。クチクラワックス

の欠損株についてシロイヌナズナで多く報告されている。*eceriferum1* はクチクラワックス合成の変異体でアルカンの量が減少しており（Bernard ら、2012）、低湿度条件下で花粉の稔性が低下する（Aarts ら、1995）。*eceriferum7* 変異体は種子の生存能が低下する（Hooker ら、2007）。

クチンポリマーを構成するモノマーはオレイン酸かパルミチン酸を出発原料とした誘導体であり、ω-ヒドロキシ脂肪酸、α,ω-ジカルボン酸、（ポリ）ヒドロキシ脂肪酸、エポキシ脂肪酸、長鎖アルコール、長鎖脂肪酸、グリセロールなどが相互にエステル結合して分岐ネットワークを構成している（Pollard ら、2008）。クチクラは乾燥（Riederer & Schreiber、2001）や UV 暴露（Barnes ら、1998）、害虫や病原菌からの防御（Serrano ら、2014）という重要な機能を果たしており、植物の陸上化に際し重要な要因となったと考えられる。シロイヌナズナで脂肪酸を活性化するタンパク質 Long-chain acyl-CoA synhtetase2（LACS2）の変異体 *lacs2* はクチンの厚さが減少し生育が抑制される（Schnurr ら、2004）。細胞外への脂質輸送体である ABCG11/DSO を欠損した変異体 *dso-3* では植物地上部表層のワックス量とクチンモノマー量の両方の減少が認められ、器官が融合し生育が抑制される（Panikashvili ら、2007）。また、シトクローム P450 の CYP86 クランに属する *CYP704B2* を欠損するイネでは生育抑制、雄性不稔、花粉粒の生育停止や葯のクチクラの発達異常が認められる（Li ら、2010）。このように、ワックスやクチンを欠損した変異体の多くは植物の生長や、花粉・種子の生存・機能に異常が認められる場合が多い。

これまで藻類については、*Botryococcus braunii* が細胞外に多量のアルカンを分泌することが知られている（Traverse、1955；Weiss ら、2012）。1900 年代前半にボグヘッド炭に含まれる油脂を産生する緑藻として報告され、*Botryococcus* 属が岩石に含まれる油脂の原因であろうと推定する報告は 1920 年代まで遡る（Traverse、1955）。油脂生産する緑藻の多くが TAG を細胞内に蓄積するのに対し、*B. braunii* race B が分泌する、ボトリオコッセンと呼ば

れる炭素数 30–40 の炭化水素は燃料生産に向けて現在の石油化学工場設備を利用できる点で TAG よりも優れている（Shiho ら、2012）。*B. braunii* の生長速度は、Showa 株で比増殖速度が 0.44/日（倍加時間 1.6 日、炭水化物含量 30%）から 0.5/日（倍加時間 1.4 日、炭水化物含量測定なし）と報告されている（Yoshimura ら、2013）。ただし、炭水化物含量が 60％とより高い株では比増殖速度が 0.15–0.2 程度とやや低くなる（Li & Qin、2005；Yoshimura ら、2013）。藻類を用いた油脂生産はトウモロコシのように食用作物と資源を競合しない点も長所であり、現在、効率的な油脂生産へ向けた培養技術の開発が進められている（Shiho ら、2012；Tanabe ら、2015）。一方で、細胞外脂質の藻類に対する意義として、*B. braunii* では群体を光合成に有利な水面へ浮上させるため（Niehaus ら、2012）、或いは細胞間の接着のため（Suzuki ら、2013）に脂質を分泌するのではないかと推測されている。しかし、植物体を被覆し環境ストレスに抗する陸上植物のワックスのように、藻類の細胞外脂質が細胞保護に果たす機能については報告されていない。藻類の多くは淡水中あるいは海水中に生息しており、とくに乾燥に耐えるため脂溶性化合物で表層を覆う必要はないと考えられる。しかし、*K. flaccidum* は他の藻類と比較して陸上で生息している場合が多く（Karsten ら、2010；Hori ら、2014；Karsten ら、2015）生息域によっては乾燥にさらされる場合も多い。このように、水中と比べ過酷な陸上環境でも生存が可能な *K. flaccidum* は表層に脂溶性化合物層をもっている可能性があるため、ゲノムからワックスおよびクチン合成関連遺伝子を探索した（第２章参照）。その結果、炭素数 24 までの VLCFA 伸長酵素と WS、CER3、CER7 のホモログが確認できた。しかし、炭素数 26 以上の VLCFA 伸長に関与する CER2 と CER6、１級アルコール合成を触媒する FAR やアルカン合成に関与する CER1、２級アルコールとケトンの合成を触媒する MAH1 のカウンターパートが見つからなかったため、細胞外ワックスの組成は陸上植物とは大きく異なることが予想された。そこで本章では、まず *K. flaccidum* が細胞外ワックスを持っているのかを確認し、その組成を生化学的に検討

した。シロイヌナズナやイネ、オオムギなどの表層ワックスを定性・定量する場合には植物体を有機溶媒に短時間浸漬し、溶媒に溶出した疎水性化合物を濃縮後、マススペクトロメトリー（MS）を用いて分析されている（Li ら、2008；Li-Beisson ら、2013）。本研究でもこれら維管束植物のワックス抽出法と機器分析法を適用し、クロロホルムに藻体を浸漬して脂溶性化合物を抽出・分析した。しかし藻類を有機溶媒に浸漬した場合、細胞膜の損傷による細胞内脂質の漏出が懸念されるため、本研究では新たにシリカゲル TLC プレートを使った簡便な脂質抽出法を考案し、植物で用いられている有機溶媒による抽出法と比較した。

クチンについては、*K. flaccidum* が ω-ヒドロキシ脂肪酸を合成し得る上に、クチンポリマーを合成する AtCUS1 のカウンターパートも見つかったため、クチンポリマーが存在し得ることが第 2 章で示唆された。そこで *A. thaliana* のクチンに相当する構造が *K. flaccidum* に存在するのかを確かめるため、脱脂した細胞壁をアルカリ加水分解して得られた脂溶性画分を、GC-MS を用いて生化学的に分析した。併せて脱脂した細胞壁を ATR-FTIR により分析し、この脂溶性画分の結合様式を確認した。こうして得られた分析結果をもとに、*K. flaccidum* のクチクラ構造を推定した。

方法

藻類の培養と植物の栽培

A. thaliana エコタイプ Columbia を、23℃で連続光下（40–50 µmol photons m^{-2} s^{-1}）にて土壌で 28 日間あるいは 42 日間生育した。*K. flaccidum* NIES-2285 株は NIES-C 培地（Ichimura、1971）の寒天培地に乗せたニトロセルロースメンブレン上で、連続光下（10 µmol photons m^{-2} s^{-1}）、23℃にて培養した。*C. reinhardtii* は Tris-acetate-phosphate（Gorman ら、1965）寒天培地に乗せたニトロセルロースメンブレン上で、*K. flaccidum* と同じ条件にて 14 日間培養し

た。なおニトロセルロースと寒天は使用前におよそ体積の 15 倍容のクロロホルムで 3 回脱脂した。

走査電子顕微鏡（SEM）観察

液体培地で培養した *K. flaccidum* を液体培地あるいは固体培地に植え継いだ。3 日後に 1.5%（w/v）寒天培地上の藻体を回収し、0.1 M リン酸バッファーに溶解した 2%（v/v）グルタルアルデヒドで細胞を固定した。サンプルをエタノールと t-ブタノールシリーズで脱水し、t-ブタノール凍結乾燥装置（VFD-21S、真空デバイス）で乾燥した。サンプルをアルミニウム製試料台に載せ、オスミウムコータ（Neoc-Pro、メイワフォーシス）を用いてオスミウムでコーティングした。走査電子顕微鏡（S-3400、日立）を用いて、加速電圧を 10 kV として細胞表層を観察した。

ステロールエステル、フィチルエステルの合成

フィトステロールと脂肪酸とのエステル、あるいはフィトールと脂肪酸とのエステルは市販されていないため、脂肪酸クロライドとアルコールを反応させて合成した（Wisnieski ら、1973；Terzaghi、1986）。脂肪酸クロライドとして市販のミリスチン酸クロライド、パルミチン酸クロライド、ステアリン酸クロライド、オレイン酸クロライドを使用した。またリノール酸およびリノレン酸のクロライドは市販されていないため合成した。すなわち、脂肪酸と等モルのオキサリルクロライドをジクロロメタン中に混合し 1 気圧下で 80ºC に熱しスターラーで撹拌した。反応後の溶液からアルカリトラップを備えたエバポレーターで未反応のオキサリルクロライドを除去し、溶媒を留去して脂肪酸クロライドを得た。これら脂肪酸クロライドを過剰量のステロールあるいはフィトールとジクロロメタン内で混合し、60ºC に熱しスターラーで撹拌した。溶媒をエバポレーターで留去しエステルとアルコール

の混合物を得た。この混合物を TLC プレートにアプライし、ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（80：20：1、v/v/v）で分離して溶媒フロント近くに溶出するエステルを単離した。合成したエステル類は GC-MS で分析し、目的物であることを確認した。

細胞外脂質のクロロホルム抽出

ディスポーサブル滅菌シャーレに 2% 寒天を含有する C 培地を充填し、寒天が固まったあとに置いたニトロセルロースメンブレン上で *K. flaccidum* を 28 日間培養した。培養後、*K. flaccidum* をメンブレンごと 5 ml クロロホルムに浸漬した（図 3-1(A)）。最適な浸漬時間を決定するため、浸漬 10 秒後、20 秒後、30 秒間、1 分後、2 分後、4 分後、8 分後、16 分後および 32 分後にクロロホルムを回収した。各サンプリングに際しクロロホルムを回収後すぐ新鮮なクロロホルムを補充した。2 枚のメンブレンから抽出した脂質をそれぞれのサンプリング時に併せ、窒素気流下で溶媒を留去し、脂質重量を秤量して 20 mg 脂質/ml 溶媒の割合でスクリューキャップ付きバイアル内にてクロロホルムに溶解し、窒素を充填した後 -80ºC で貯蔵した。浸漬時間を決定後、詳細な脂質の組成を測定するため、30 秒間クロロホルムに浸漬した 7 枚のメンブレンから得た脂質を併せて前記のとおり脂質を調製した。*C. reinhardtii* と *A. thaliana* からもクロロホルムを用いて細胞外脂質を抽出した。*A. thaliana* の脂質抽出は、茎生葉を除去した茎を 10ml クロロホルムに 30 秒間浸漬し、新しいクロロホルムでもう一度 30 秒間抽出した（図 3-1(B)）。*C. reinhardtii* の脂質抽出は *K. flaccidum* と同様に、ニトロセルロースメンブレン上で培養した *C. reinhardtii* を 30 秒間、5ml クロロホルムに浸漬した（図 3-1(A)）。

細胞外脂質のシリカゲルプレート抽出

K. flaccidum の培養条件はクロロホルム抽出と同様としたが、培養期間を 28 日間あるいは

42 日間とした。培養した *K. flaccidum* をメンブレンごと回収し、シリカゲルプレート上に、生育面がシリカゲル面に接するように、藻体をシリカゲルプレートに押さえつけないように注意し静置した（図 3-1(C)）。最適な抽出時間を決定するため、静置 1 分後、2.5 分後、5 分後、10 分後、20 分後にメンブレンをシリカゲルプレートから離した。脂質を転写したシリカゲルプレートはドラフト内で 30 分間乾燥させた。シリカゲルプレートに転写された脂質を検出するため、0.01%プリムリン（80%アセトン）を噴霧し、360nm の紫外線照射下で発色部分をマークした。発色部分をカミソリでかき取り、メンブレン 2 枚分を併せて試験管に入れ、3ml クロロホルムを注いでシリカゲルに転写された脂質を抽出した。抽出は 2 回行った。得られた脂質は濃縮・秤量し、20 mg 脂質/ml クロロホルムとなるよう調製し、スクリューキャップ付きバイアルに充填して-80ºC で貯蔵した。

C. reinhardtii の細胞外脂質も *K. flaccidum* と同様の方法で抽出した。ニトロセルロースメンブレン上で培養した *C. reinhardtii* を生育面がシリカゲル TLC プレートに接するように重ね（図 3-1(C)）、5 分後にメンブレンを離し、シリカゲル TLC プレートを 30 分間、ドラフト内で乾燥し、プリムリンで検出したスポットから脂質を抽出・貯蔵した。

A. thaliana からもシリカゲル TLC プレートを用いて細胞外脂質を抽出した。茎生葉を除去した *A. thaliana* の茎を 2 枚のシリカゲルプレートで挟んだ。このときシリカゲル TLC プレートはシリカゲル面がともに *A. thaliana* を向くよう配置した（図 3-1(D)）。植物体を潰さないよう全面をまんべんなく、およそ 300g の力で押し付けた。茎の全面から脂質を回収するため茎を回しては押さえつけ、およそ２周で抽出を終了した。0.01%プリムリンを噴霧し 360nm の紫外線照射下で脂質を確認しかきとった。かきとったシリカゲルをビーカーに移し、100 ml の新鮮なクロロホルムで 2 回抽出し、エバポレーターを用いて脂質を濃縮した。

TLC による脂質の分離

クロロホルムあるいはシリカゲル TLC プレートを用いて抽出した脂質は、TLC プレートにアプライし分離した。シロイヌナズナでの定法に従い、展開溶媒としてヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（90：7.5：1、v/v/v）を用いた。また、ワックスエステルとステロールエステルを分離するため、(1) ヘキサンを 20 cm、(2) トルエンを 20 cm、(3) ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70：30：1、v/v/v）を 10 cm、と同一方向に 3 回展開した（Yamashiro ら、2001）。標準物質として、トリアコンタン、1-トリアコンタノール、16-ヒドロキシパルミチン酸、テトラコサン酸、オレイン酸、7-テトラデカノール、16-トリアコンタノン、ジオレイン、トリオレイン、ベヘニルオレエート、コレステロールを共展開した。

脂質の検出

GC 分析に供するため脂質への影響がほとんどないプリムリンを検出に使用した。プリムリンは 80% アセトンに 0.01%溶解した検出試薬を作り、クロマトスプレーを使って TLC プレートに吹き付け、360nm の紫外線を照射し検出した。また、脂質の持つ極性頭部や官能基についての情報を得るため、展開した TLC プレートにアンスロンまたはオルシノール、$FeCl_3$、DNP のいずれかを噴霧し、TLC プレートをオーブンで 110ºC で 10 分間焼いてスポットの発色を観察した。

脂質の誘導体化と機器分析

TLC プレートで分離した脂質をかき取り、クロロホルムで抽出・濃縮後、GC-MS と GC-FID を用いて定性・定量した。一部脂質については ^{1}H-NMR を用いて構造を解析した。

アルカン画分は誘導体化せず抽出・濃縮した脂質をそのまま GC–MS で分析しマススペクトラムを得た。ステロールエステルは試験管に入れ、1 ml 2 M ナトリウムメトキシドを加えて 70ºC 60 分間で加水分解した。その後水とクロロホルムを添加し下層をとり、NaCl 水

溶液で洗い、硫酸ナトリウムで脱水してから窒素気流下で溶媒を留去した。そこに 20µl N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド（1%トリメチルクロロシランを含む）（BSTFA-TMCS）と 20µl ピリジンを添加して 70ºC 60 分間でヒドロキシ基をトリメチルシリル（TMS）化して沸点を下げ、検出感度を上げて GC-MS と GC-FID で定性・定量した。なお、予備実験でワックスエステル画分よりアルコールとしてフィトールのみが検出された。よってこの画分は前処理せず、別途合成したフィチルパルミテート、フィチルステアレート、フィチルオレエート、フィチルリノレート、フィチルリノレネートと GC-FID の Rf 値を比較しその構造を推定した。併せて GC-MS を用いてマススペクトラムを得、含有されるフィチルエステルの構造を推定した。トリアシルグリセロール（TAG）に相当するスポットをかき取って試験管に入れ、350µl メタノール性 5% HCl を添加し 80ºC 60 分間で加水分解した。生じた脂肪酸をヘキサンで抽出・濃縮後、GC-FID を用いて標準物質と比較し定性した。遊離ステロール類については乾固した脂質を BSTFA-TMCS で TMS 化して、GC-MS と GC-FID により分析した。

GC-MS 分析

質量分析にはトリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 GC-MS-TQ8030（島津製作所）を用いた。カラムは DB-5ms（長さ：30m、膜厚 0.25µm、直径 0.25mm、アジレント）を使って昇温分析した。アルカン以外の脂質分析の場合、オーブンの温度設定は以下のとおりとした。すなわち、50ºC で 2 分間維持し、その後 20ºC/分で 220ºC まで昇温し、220ºC で 2 分間維持した。そこから 3ºC/分で 320ºC まで昇温し、320ºC で 30 分間維持した後、分析を終了した。アルカンについては、50ºC で 1 分間維持し、その後 10ºC/分で 220ºC まで、220ºC から 2ºC/分で 260ºC まで昇温し、260ºC で 50 分間維持した後、分析を終了した。インジェクター温度を 250ºC、イオン源温度を 320ºC とした。またキャリアガスはヘリウム

を用い、流量 1.4 ml/min とした。

GC-FID 分析

水素炎イオン化検出器（FID）を接続したガスクロマトグラフィーGC-2014（島津製作所）をもちいて脂質を定量分析した。カラムは DB-5（長さ：30m、膜厚 0.25μm、直径 0.25mm）を用い、オーブンの昇温設定は GC-MS 分析と同様とした。なお、インジェクター温度は 250ºC、アルカン以外の脂質分析ではディテクター温度を 320ºC に、アルカンでは 260ºC に設定した。キャリアガスはヘリウムを用い、流量は 1.4 ml/min とした。

TAG の分離と ^{1}H-NMR 分析

TAG に相当する画分に含有される脂質の構造を確認するため、まず得られた画分をさらに脂肪酸の不飽和度により分離した。メタノール性 2% 硝酸銀溶液に 10 分間浸漬した TLC プレートを乾燥させ、硝酸銀含浸 TLC プレートを調製した。硝酸銀含浸 TLC プレートに TAG に相当する脂質をアプライし、ヘキサン／アセトン（50:3.25、v/v）で展開し分離した。最も大きいスポットをかき取り、クロロホルムで抽出・濃縮して NMR 分析に供した。^{1}H-NMR 分析では、溶媒を留去してから重水素化クロロホルムに溶解したサンプルを、JEOL JNM-ECS FT-NMR (400MHz)により分析した。

K. flaccidum の細胞外に存在する TAG の酵素的検出

リポプロテインリパーゼとグリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼが細胞内に取り込まれないことを前提として細胞外脂質を検出するため、GPO·DAOS 法によりグリセロ脂質存在下で最終的に生成する青色色素を定量した（Wako、Labassay™ Triglyceride）。手順はキットの説明書に従った。ニトロセルロースメンブレン上で生育した

K. flaccidum をメンブレンごとガラスシャーレに入れ、リポプロテインリパーゼ、ATP、グリセロキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（GPO）、ペルオキシダーゼ、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム塩（DAOS）、4-アミノアンチピリン、アスコルビン酸オキシダーゼを含む 10 ml PIPES バッファーを添加し、37ºC で 10 分間保温した。上清をろ過し、600nm の吸光度を測定した。濃度既知のグリセロールから得た検量線を用いて定量した。

K. flaccidum のクチンに相当する画分の分析

K. flaccidum と *C. reinhardtii* のクチンに相当する画分の調製は *A. thaliana* のクチンの分析方法に従った（Bonaventure ら、2004；Molina ら、2006；Li-Beisson ら、2013）。100 mg の細胞あるいは植物体に 2-プロパノールを添加し、80ºC 10 分間でインキュベートした。室温に冷まして乳鉢と乳棒で組織を摩砕し、1,500 x *g* で 5 分間遠心分離した後、溶媒をデカントにより除去した。新しい 2-プロパノールを添加し、室温で 1 時間震とうした後、1,500 x *g*、5 分間遠心分離し、溶媒をデカントにより除去した。メタノールを添加し、1 時間インキュベートして 1,500 x *g*、5 分間遠心分離し、溶媒を除去した。同様の操作を、クロロホルム／メタノール（1:2、v/v、1 時間）、クロロホルム／メタノール（2:1、v/v、1 時間）、メタノール（1 時間）の順に実施した。藻類については更に、水（1 時間）、2 M NaCl（1 時間）、水（1 時間）、クロロホルム／メタノール（1:2、v/v、1 時間）、クロロホルム／メタノール（2:1、v/v、1 時間）、メタノール（1 時間）の順に脱脂した。細胞と植物体とも、窒素気流下で溶媒を留去してから、24 時間凍結乾燥し細胞壁画分を得た。

メタノール／酢酸メチル／28% ナトリウムメトキシド（12:3:5、v/v/v）を 2 ml 残渣に加え、60ºC で 2 時間保温した。反応液を室温まで冷やし、0.5 ml 酢酸と 4 ml ジクロロメタン、1 ml バッファー（10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、0.9% (w/v) NaCl）を加えて、1,500 x g で 2 分間遠

心分離し二層分離した。下層を分取し、2 ml バッファーで洗い、硫酸ナトリウムで脱水した上清を窒素ガス気流下で溶媒留去した。残渣に 20 µl 無水ピリジンと 20µl BSTFA-TMCS を加え、10 秒間震とうしてから 70ºC で 1 時間保温し、ヒドロキシ基を TMS 化した。窒素気流下で溶媒を留去し、50 µl ヘプタン／トルエン（1:1、v/v）に溶解し、GC-MS および GC-FID を用いて定性・定量した。GC-MS と GC-FID の昇温条件は次の通りとした。すなわち、140ºC から 3ºC/min で 310ºC まで昇温し、310ºC を 10 分間維持した後、分析を終了した。

K. flaccidum の細胞壁画分の ATR-FTIR 分析

脱脂した *K. flaccidum*、*C. reinhardtii*、*A. thaliana* の細胞壁画分を ATR-FTIR を用いて分析した。前処理として以下の 4 つの処理を独立に行った。(1) イオン結合性ペクチンを可溶化するため 100 mM 1,2-シクロヘキシレンジニトロ四酢酸 (CDTA) に室温で 1 時間浸漬、(2) フェノール性成分を可溶化するため 0.34 M $NaClO_2$ と 65 mM 酢酸を溶解した反応液に 65ºC、1 時間浸漬、(3) ヘミセルロースを可溶化するため 0.1 M NaOH に室温で 1 時間浸漬、(4) ペクチンを可溶化するため 80ºC 熱水に 1 時間浸漬 (Carpita ら、2001；Moller ら、2007；Szymanska-Chargot ら、2013)。それぞれの処理を行った残渣を水で洗い、24 時間凍結乾燥して ATR-FTIR 分析に供した。IR スペクトラムは Attenuated total reflection（ATR）法により、一回反射型ダイアモンドプリズムを装着した Spectrum Two（パーキンエルマー）を用いて、分解能 4cm^{-1}、波数範囲 4000–450cm^{-1} で分析した。バックグラウンド測定のため試料を載せないで空気のみの測定を行った。4 回スキャンしたインターフェログラムを平均し、ノートン・ビア媒体アポダイズ関数によりパワースペクトラムを得た。

結果

SEM 観察結果

固体培地あるいは液体培地に移して 3 日後に細胞表面を SEM 観察したところ、液体培地に移した *K. flaccidum* は表面が滑らかで、シロイヌナズナでみとめられる微細な構造体（Bird ら、2007）などは認められなかった（図 3-2(A)と(C)）。一方、固体培地に移した *K. flaccidum* は膜状の薄い物質が細胞表層に付着し、一部は表層から剥がれたように見える様子が観察された（図 3-2(B)と(D)）。

K. flaccidum 細胞外脂質のクロロホルム抽出と脂質の TLC 展開

ニトロセルロースメンブレン上で培養した *K. flaccidum* をメンブレンごとクロロホルムに浸漬し、10 秒後～32 分後までの所定の時間に回収したクロロホルムから、含有される TAG と MGDG を GC-FID で定量した（図 3-3）。*K. flaccidum* の生育面積当り、および乾燥重量当りの TAG 回収量は浸漬 30 秒まで急速に立ち上がり、その後は漸増した。乾燥重量当りの TAG 回収量では、Bligh & Dyer 法（Bligh & Dyer、1959）による総 TAG 量の 19.2%が 30 秒間浸漬で回収された。4 分間の浸漬でも総 TAG の 20.1%が回収されただけであり、脂質抽出の時間をできるだけ短くするため、*K. flaccidum* から細胞外脂質を回収するための浸漬時間を 30 秒間とした。

K. flaccidum をクロロホルムに 30 秒間浸漬して得た細胞外脂質を *A. thaliana* のワックスとともに TLC プレートにアプライし、ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（90:7.5:1, v/v/v）で展開しプリムリンで検出した（図 3-4(A)）。*K. flaccidum* は *A. thaliana* とは異なる細胞外脂質組成を示したので、構成成分を調べるため標準物質との共展開による比較（図 3-4(B)）、および発色試薬による呈色（図 3-4(C)）から脂質を推定した。ニンヒドリンによる呈色が認められず、オルシノールとアンスロンではスタンダードと同じ特徴的な呈色が認められ

なかったため、*K. flaccidum* の細胞外脂質にはアミノ酸・アミド結合、および糖は含まれないと考えられた。また塩化鉄 III、ジニトロフェニルヒドラジン（DNP）でもスタンダードの特徴的な呈色が認められなかったため、フェノール類やアルデヒド、ケトンも含まれないと考えられた。ただし、塩化鉄 III についてはスタンダードとして比較に加えたコレステロールと同じ特徴的な呈色がスポット b とスポット f の２箇所に認められた。スタンダードとの共展開とスポットの呈色から、スポット a はアルカン、スポット b はステロールエステル、スポット c はワックスエステル、スポット d は TAG、スポット f はステロール類と推定された。なおスポット e は不明だった。

クロロホルム抽出による *K. flaccidum* 細胞外脂質構成成分の推定

図 3-4(C)レーン 1 のスポット a をかき取りクロロホルムで抽出した脂質を、GC-FID でアルカン標準品と Rf 値を比較したところ（図 3-5(A)）、*K. flaccidum* のピークは単一であり、ドコサンと一致した。またマススペクトラムを確認したところ（図 3-5(B)）、m/z 71 から 14 ずつの位置にピーク強度が漸減するアルカン特有のピークが認められ、310 以降にピークが認められなかったため、*K. flaccidum* はアルカンとしてドコサンのみを含むと考えられた。ステロールエステルと推定されるスポット b からクロロホルムで脂質抽出し、アルカリメタノリシスによってアルコールと脂肪酸に分解し、次いで BSTFA-TMCS でヒドロキシ基を TMS 化して GC-MS と GC-FID を用いて分析した。GC-FID により 37 分以降に認められたピーク（図 3-5(C)）の MS を確認したところ、それぞれ順にカンペステロール TMS エーテル、スティグマステロール TMS エーテル、β-シトステロール TMS エーテルのスペクトラムと一致した（図 3-5(D)–(F)）。

ワックスエステルと推定されるスポット c から得た脂質を、ステロールエステルと同様に分析したところ、アルコールとしてフィトールのみが見つかった。そこで有機合成したフ

ィチルエステルと *K. flaccidum* の脂質を比較したところ、唯一フィチルパルミテートのピークのみが認められた（図 3-5(G)）。このピークの MS を確認したところ（図 3-5(H)）、フィチルエステルに典型的な 71、81、95、111、123、239、278 のピークが認められた。しかしフィチルエステルの双極子モーメントが小さいため分子イオンピークは検出されなかった。よって *K. flaccidum* はワックスエステルとして唯一フィチルパルミテートを持つことがわかった。

遊離ステロールと推定されるスポット fから得た脂質を BSTFA-TMCS により誘導体化して GC-FID のクロマトグラムを確認すると、ステロールエステルの場合と同じ Rf 値を持つステロール類が見つかった（図 3-5(I)）。MS を確認すると、カンペステロール TMS エーテル、スティグマステロール TMS エーテル、β-シトステロール TMS エーテルとスペクトラムが一致したため、*K. flaccidum* はステロールエステルと同様に、遊離ステロールとしてカンペステロール、スティグマステロール、β-シトステロールを含むと考えられた。

ステロールエステルと遊離ステロールの成分組成をそれぞれ図 3-6(A)、(B)に示した。ステロールエステルのアシル部は 16:0、18:0、18:1、18:2 から構成されており、飽和脂肪酸が 90%あまりを占めた。またステロール部はカンペステロールとスティグマステロールで 90%以上を占め、カンペステロールが最も多かった。遊離ステロールの成分はステロールエステルと同じだったが、この場合はスティグマステロールがカンペステロールよりも多かった。

TAG は沸点が高く、使用している GC-MS では検出できないため、^{1}H-NMR による構造の推定を行った。TAG と推定されるスポットを 2% 硝酸銀含浸 TLC で分離し（図 3-7(A)）、その中から最も明瞭かつ大きなスポットの ^{1}H-NMR スペクトルを得た（図 3-7(B)）。5.25ppm にトリプレットのピーク、4.29–4.30 ppm と、4.26–4.27 ppm、4.25–4.30 ppm、4.10–4.16 ppm にそれぞれダブレットのピークが認められ、これらは全てグリセロール骨格に由来するプ

ロトンピークと推定されたため、このスポットに含まれる脂質は TAG であると考えられた。なお、得られた脂質の量が少なかったため、1.5ppm 付近にある水のピークを除くことができなかった。*K. flaccidum* の TAG の脂肪酸組成を、クロロホルム抽出した場合と、Bligh & Dyer 法で得た場合とで比較したところ（図 3-7(C)）、16:0 と 18:2 の含量にやや違いが認められるものの大きな差ではなく、概ね類似した組成だった。

シリカゲル TLC プレートを使った *K. flaccidum* 細胞外脂質の抽出と構成成分の推定

ニトロセルロースメンブレン上で 42 日間培養した *K flaccidum* をシリカゲル TLC プレートに、藻体がシリカゲル面に接するよう置き、30 秒、1 分、2.5 分、5 分、10 分、20 分間静置した。脂質をヘキサン／ジエチエルエーテル／酢酸（70:30:1、v/v/v）で 20cm、アセトン／トルエン／水（91:30:8、v/v/v）で 10cm 展開した（図 3-8A）。Bligh & Dyer 法で抽出した *A. thaliana* の総脂質と、MGDG 標準品をともに展開した。*K. flaccidum* の脂質では最大抽出時間の 20 分でも MGDG は認められず、中性脂質のみが認められた。この TLC プレートから ImageJ を使って中性脂質のスポットの濃さを測定し、時系列でプロットした（図 3-8B）。抽出 5 分後には 20 分後の回収量とほとんど同じ程度の脂質が回収できたため、抽出時間を 5 分とした。シリカゲル TLC プレートに転写し抽出した *K. flaccidum* の細胞外脂質を TLC プレートで分離すると、アルカンと TAG に相当するスポットが見つかった（図 3-8(C)）。*K. flaccidum* の 28 日培養と 42 日培養の、シリカゲル TLC プレート（転写 5 分間）による脂質回収の差を確かめた（図 3-9）。28 日間培養でも脂質は回収できたが 42 日間培養の方がプリムリンによる発色面積が広く、かつ発色が濃いため、42 日間培養した *K. flaccidum* を用いて以降の脂質分析を実施した。

K. flaccidum 細胞外に存在する TAG の酵素的検出

GPO·DAOS 法による検出では培地に含まれる β–Na_2-glycerophosphate からも同様に青色色素が生成するため、その発色を確認した。一枚のプレートに含まれる 2 mg の β–Na_2-glycerophosphate で、青色の呈色は認められたものの薄かった。しかも検定時には極力培地を除去したため、β–Na_2-glycerophosphate による呈色への影響は小さいと考えられた。*K. flaccidum* をニトロセルロースメンブレンごと試験液に浸漬し、37ºC、10 分間静置したところ、*K. flaccidum* 浸漬液は濃い青色を呈した（図 3-10）。標準グリセロールから得た検量線で定量した結果、ほとんどは TAG に由来すると考えられるグリセロールが約 1.2 (±0.17) nmol/cm^{-2} 検出された。

クロロホルムおよびシリカゲル TLC プレートを使った *C. reinhardtii* の細胞外脂質

C. reinahrdtii の細胞外脂質を、*K. flaccidum* と同じ方法により、抽出時間を 30 秒間としてクロロホルムを使って抽出した。*C. reinhardtii* は *K. flaccidum* と同様、ニトロセルロースメンブレン上で培養し、ニトロセルロースメンブレンごとクロロホルムに浸漬した。また、*K. flaccidum* と同様に、*C. reinahrdtii* の細胞外脂質をシリカゲル TLC プレートを使って抽出時間 5 分間で抽出した。こうして得られた *C. reinhardtii* の脂質を TLC シリカゲルプレートにアプライし、(1)トルエンを 20 cm、(2)ヘキサンを 20cm、(3)ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70:30:1, v/v/v）を 10 cm で展開した（図 3-11）。クロロホルム抽出およびシリカゲルプレート抽出とも、脂質クラスとしてアルカンと TAG に相当する画分が認められた。このアルカン画分をかき取り、GC-FID および GC-MS にて測定したところ、Rf 値と MS スペクトラムからドコサンのみが検出された（図 3-12(A)、(B)）。TAG 画分については、*K. flaccidum* と同じ Rf 値にスポットが現れたため TAG と推定した。

クロロホルムおよびシリカゲル TLC プレートを使った *A. thaliana* の細胞外脂質

A. thaliana をクロロホルムに 30 秒間、2 回浸漬して細胞外脂質を抽出した。また、予備実験で *A. thaliana* をシリカゲル TLC プレートで挟み押さえつけると脂質が回収できることが分かったため（図 3-13(A)と(B)）、シリカゲル TLC プレートを使って *A. thaliana* の細胞外脂質を抽出した。藻類と同じ方法で押さえつけずにシリカゲル TLC プレート上に静置するだけでは脂質が抽出できないので、図 3-1(D)にあるとおり、茎生葉を除去した *A. thaliana* を上下からプレートで挟んで押さえつけて脂質を抽出した。回収された脂質クラスの違いを確認したところ、クロロホルム抽出およびシリカゲル TLC プレート抽出で回収された脂質クラスに違いはなかった（図 3-13(C)）。

K. flaccidum、*C. reinhardtii* および *A. thaliana* の細胞外脂質構成成分の比較

K. flaccidum と *C. reinhardtii* の、それぞれクロロホルム抽出およびシリカゲル抽出により得られた細胞外脂質の組成を示した（図 3-14(A)）。アルカンは両藻類とも抽出法にかかわらずドコサンのみが認められ、またいずれもクロロホルム抽出よりシリカゲルプレート抽出の方が回収量が多かった。

クロロホルム抽出した *K. flaccidum* でのみ、ステロールエステルとフィチルエステル、遊離ステロール類が認められた（図 3-14(A)）。ステロールエステルとフィチルエステルの含有量はアルカンの含有量と同程度だったが、遊離ステロール類の含有量はそれら 3 脂質クラスの含有量よりも多かった。更に、*K. flaccidum* からクロロホルム抽出により得られた TAG の含有量は非常に多く、ステロール類の含量と比較しても 70 倍以上であった。一方、*K. flaccidum* のシリカゲルプレート抽出によりドコサンと TAG が得られたが、含有量はドコサンが多かった。クロロホルム抽出した *C. reinhardtii* ではドコサンよりも TAG が多かったが、シリカゲルプレート抽出した脂質ではドコサンが TAG よりも多く、*K. flaccidum* と同様にアルカンが最も多い脂質であった。

TAG の脂肪酸組成を、藻類ごとに抽出法別に示した（図 3-14(B)）。*K. flaccidum* ではクロロホルム抽出した TAG の中で多い順に 18:2、16:0、18:1、18:3、18:0、14:0 と不飽和脂肪酸が多く（図 3-14(B)）、この脂肪酸組成は Bligh & Dyer 法により得られた TAG の脂肪酸組成(図 3-7(C))とほぼ同じだった。シリカゲル TLC プレート抽出では多い順に 16:0、18:2、18:0、18:1、14:0 と飽和脂肪酸が多かった。一方 *C. reinhardtii* でも、クロロホルム抽出で多い順に 16:0、18:1、18:2、18:0 と不飽和脂肪酸が多かったが、シリカゲルプレート抽出では多い順に 16:0、18:1、14:0 であり、飽和脂肪酸の割合が大きかった（図 3-14(B)）。

A. thaliana の細胞外脂質の組成を示した（図 3-14(C)）。7 クラスの脂質が認められたが、*A. thaliana* について最も多く含まれる脂質はアルカンだった。

３種の細胞外脂質の総量を比較した（図 3-15）。クロロホルム抽出により得られた *K. flaccidum* の脂質は *A. thaliana* よりも約 2.4 倍と多かった。しかし、*K. flaccidum* のシリカゲルプレート抽出、および *C. reinhardtii* は抽出法にかかわらず、脂質含量は *A. thaliana* 対比でおよそ 1/50 だった。

脱脂した細胞壁画分のアルカリ加水分解画分の GC-MS および GC-FID 分析

K. flaccidum、*C. reinhardtii*、*A. thaliana* から得た細胞壁画分をアルカリ加水分解し得られた脂質の GC-FID クロマトグラムを示す（図 3-16）。*K. flaccidum* の細胞壁画分から脂肪酸が検出されたが、ヒドロキシ脂肪酸や α,ω-ジカルボン酸は認められなかった。*C. reinhardtii* の細胞壁画分からは脂肪酸とフィトールが検出された。*A. thaliana* の細胞壁画分からは（ポリ）ヒドロキシ酸やジカルボン酸などの脂肪酸誘導体が検出された。*K. flaccidum* で見つかった脂肪酸メチルエステルと、*C. reinhardtii* から得たフィトールの TMS エーテルの EI-MS スペクトラムを示す（図 3-17）。なお *C. reinhardtii* と *A. thaliana* から得られた脂肪酸メチルエステルのスペクトラムも図 3-17 と同様だった。また図 3-18 には *A. thaliana* から得られた

脂肪酸誘導体メチルエステルの、ヒドロキシ基が TMS 化された化合物の EI-MS スペクトラムを示した。

これらを定量化すると、細胞壁画分における脂質の中で *K. flaccidum* の脂肪酸含量が極めて多く、*A. thaliana* のモノマー含量のおよそ 30 倍であった（図 3-19(A)）。一方で *C. reinhardtii* の細胞壁画分における脂肪酸含量は *A. thaliana* のおよそ 1/200 以下と非常に少なかった。*K. flaccidum* の細胞壁画分では 18:2、16:0、18:1 が優占し、*C. reinhardtii* は 16:0 に富む脂肪酸を含んでいることがわかった（図 3-19(B)）。*A. thaliana* には脂肪酸として 16:0、18:1、18:2、22:0、24:0 が、α,ω-ジカルボン酸として 16:0、18:0、18:1、18:2 が、ω-ヒドロキシ脂肪酸として 16:0、18:1、18:2 が、そしてジヒドロキシ脂肪酸として 10,16-$(OH)_2$-16:0 が含まれていた。

脱脂した細胞壁画分の ATR-FTIR 分析

K. flaccidum、*C. reinhardtii* とも、脱脂した細胞壁画分をアルカリ加水分解したところ脂肪酸が得られたので、この脂肪酸が細胞壁の中でどのような形態で存在するのかを確認するため、ATR-FTIR による分析を行った。*K. flaccidum* のスペクトラムでは、1750cm^{-1} 付近のエステル結合したカルボン酸のカルボニル酸素由来の伸縮振動 ν(C=O)は *C. reinhardtii* と同様に熱水処理でも極わずかに認められただけであった（図 3-20(A)、(B)）。*K. flaccidum* の 1645cm^{-1} のピークは *C. reinhardtii* と同じ波数であり、アミド I 由来の伸縮振動 ν(C=O)であると考えられた（図 3-20(A)、(B)）（Dean ら、2008）。*K. flaccidum* の 1529cm^{-1} に認められるピークは CDTA 処理により減少が認められ、*C. reinhardtii* の 1545cm^{-1} のピークと同様の傾向を示した（図 3-20(A)、(B)）。*C. reinahrdtii* の 1545cm^{-1} はアミド II の変角振動 δ(N=H)と考えられるため（図 3-20(B)）（Dean ら、2008）、*K. flaccidum* の 1529cm^{-1} のピークもアミド II であると考えられた。一方 *A. thaliana* で認められた 1735cm^{-1} のピークが NaOH 処理で

消失するため（図 3-20(C)）、エステル結合したカルボン酸由来の伸縮振動 ν(C=O)であり、1624cm^{-1} と 1544cm^{-1} のピークはともに芳香環に由来する、それぞれ伸縮振動 ν(C-C)、および共役二重結合 ν(C=C)によるものと考えられた（Carpita ら、2001）。

考察

細胞外に脂質を分泌する緑藻として *Botryococcus braunii* が広く知られている。一方、*K. flaccidum* については、液体培地で培養された *K. flaccidum* が「superficial hydro-repellent layer」を持っているとの観察はあるが、その層に関する生化学的な解析は実施されていない（Rindi ら、2008）。

本研究で私はまず、液体培地で培養した *K. flaccidum* を液体培地あるいは固形培地に移して 3 日後の藻体表層を SEM により観察した。液体培地に移した藻体の表面がなめらかであったのに対し、固形培地に移したことで空気に触れ乾燥条件となった藻体の表面にはフィルム状構造体が細胞表面に巻きついたり、細胞表面から剥がれているように見える様子が確認された（図 3-2(B)、(D)）。本研究では認められなかったが、*K. flaccidum* の表面を覆う細い畝のネットワークは、疎水性の高い多糖であると報告されている（Barberousse ら、2006）。*K. flaccidum* が他の藻類のように多糖を分泌し自身を覆っている可能性は高いと考えられるが、脂質を分泌していることと矛盾しない。Barberousse らは *K. flaccidum* 表面の多糖の疎水性が高いと報告しており（Barberousse ら、2006）、多糖に混じって脂質が存在する可能性がある。図 3-2(B)、(D)のフィルム状構造体はこれまで報告されてきた、液体培養された *K. flaccidum* の表層構造（Barberousse ら、2006；Holzinger & Karsten、2013）には認められない。したがって図 3-2(B)、(D)で認められた構造体は乾燥条件で生じたと考えられたため、*K. flaccidum* の植物におけるワックスに相当する構造体ではないかと推測し、細胞外脂質成分を分析した。

K. flaccidum 細胞表層の脂質をクロロホルム抽出し、GC-MS を用いた生化学分析を実施した。比較として *C. reinhardtii* でも同様に脂質をクロロホルム抽出し分析した。その結果、*K. flaccidum* の細胞外脂質にはアルカンやステロールエステル、フィチルエステル、遊離ステロールが含まれていることがわかった（図 3-5）。TAG については ^{1}H-NMR による分析を実施し、化合物の構造からも TAG であることを確認した（図 3-7(B)）。質量分析以外の TAG 検出法として、GPO·DAOS 法を用いて細胞外脂質の TAG の酵素的検出を試みた（図 3-10）。TAG をグリセロールと脂肪酸に分けるリポタンパク質リパーゼ（LPL）、グリセロールをリン酸化するグリセロールキナーゼ（GK）、グリセロール-3-リン酸を酸化しジヒドロキシアセトンリン酸と過酸化水素を生成するグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（GPO）、過酸化水素存在下で4-アミノアンチピリンと N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム（DAOS）から酸化縮合体を作るペルオキシダーゼ（POD）は細胞膜を透過できないと考えられる。よってこの方法によれば細胞外にある TAG だけがグリセロールと脂肪酸へ分解され、最終的に青色色素が生成すると考えられる。*K. flaccidum* を反応液に混ぜると濃い青色を呈し（図 3-10）、ここでも細胞外に TAG が存在することが示された。

クロロホルム抽出した *K. flaccidum*（図 3-4(A)、(B)）と *C. reinhardtii*（図 3-11）の細胞外脂質からはアルカンとしていずれもドコサンのみが検出された（図 3-5(A)、図 3-12(A)）。偶数アルカンは珍しいものではなく、酵母 *Saccharomyces oviformis* や糸状菌 *Trichoderma viride*（Ladygina ら、2006）、細菌 *Vibrio furnissii*（Park、2005）などでも見つかっている。*A. thaliana* が主に奇数アルカンを持っていることを考えるとこれら藻類と *A. thaliana* とではアルカン合成経路に違いがあると考えられるため、*C. reinhardtii* や *K. flaccidum* で *A. thaliana* アルカン合成経路のタンパク質 CER1 のカウンターパートが見つからなくとも矛盾はないと考えられる。グラム陰性短桿菌 *Vibrio furnissii* では、1-ヘキサデカナールが還元されて 1-ヘキサ

デカノールが生成し、更に脱ヒドロキシ化により n-ヘキサデカンが生成することが標識前駆体を用いた実験により確認されている（Park, 2005）。*K. flaccidum* ではアルデヒドの生成は現状で確認できていないものの、*V. furnissii* に類似したアルカン合成経路が存在するであろうと考えられるが、関連する脱ヒドロキシ化タンパク質についてはまだ情報が少ないため見つかっていない。ステロールエステルとフィチルエステルについては、第２章で論じた通り *K. flaccidum* は関連タンパク質のカウンターパートを持っているためそれらの経路によって合成されると考えられた。ステロール合成関連タンパク質は本研究では探索していないが、ステロールエステル画分と遊離ステロール画分から同じフィトステロールが見つかったことから（図 3-5(C)、(I)）、*K. flaccidum* はステロール成分として *A. thaliana* と同様の生合成系を既にもっていることが推測された。

クロロホルム抽出画分には葉緑体の膜構成脂質で葉緑体中に最も多く含有される MGDG が微量ではあるが含まれており（図 3-3）、細胞内の中性脂質も同時に抽出している可能性があった。そこで、可能な限り細胞内の中性脂質の混入を避けるため、図 3-1(C)にあるように *K. flaccidum* の細胞外脂質をシリカゲル TLC プレートに転写し抽出した。転写時間を最長 20 分としても MGDG は検出されず（図 3-8(A)）、シリカゲルプレート転写による脂質抽出法が *K. flaccidum* の細胞外脂質抽出に有効であると考えられた。ただし、クロロホルム抽出では細胞内中性脂質も抽出している可能性があるものの、細胞外脂質の多くを抽出できていると考えられるのに対し、シリカゲル TLC プレート転写による抽出では全ての細胞外脂質を抽出しきれていない可能性がある。図 3-14(A)で *K. flaccidum* からのクロロホルム抽出では約 12 nmol/cm^2 の TAG が検出されたのに対し、シリカゲルプレート転写抽出で検出された TAG は 0.016 nmol/cm^2 だった。一方、GPO·DAOS 法による酵素的定量分析で検出された TAG は約 1.2 nmol/cm^2 であった。現状で真の細胞外脂質量はわからないため、抽出法による脂質の回収量の違いについて更なる検討が必要である。シリカゲル転写による

脂質抽出は *A. thaliana* にも適用が可能で（図 3-13）、本抽出法が藻類に限らず植物体からのワックス抽出にも応用が可能であることが示唆された。

シリカゲルパウダーを用いて昆虫表面の脂質を抽出し分析したとの報告がある（Choe ら、2012）。藻類でシリカゲルパウダーを用いた脂質抽出を実施すると、細胞とシリカゲルを分離することが難しい。したがって本研究ではシリカゲルがガラス板に固定されたシリカゲル TLC プレートを用いた脂質抽出を試みた。培養 28 日および 42 日経過した *K. flaccidum* から細胞外脂質をシリカゲルプレート転写により抽出したところ（図 3-9）、培養 42 日後では培養 28 日後よりも多く、ほぼ全面に脂質の発色が認められたため、*K. flaccidum* の細胞外脂質は成熟した細胞が分泌することが示唆された。

表層に TAG を分泌する陸上植物の報告は多くないが（Bianchi ら、1992a、1992b）、セイヨウヤマモモの果実に多量の TAG が含まれることが報告されている（Harlow、1965）。この TAG の合成経路について、セイヨウヤマモモでは細胞内での合成とは別に、細胞外に分泌された MAG をアシルドナーとして、DAG をアシルアクセプターとして、細胞外で TAG を合成する経路が存在すると報告されている（Simpson & Ohlrogge、2016）。この報告の中で最初の中間体である *sn*-2 MAG にアシル基を転移するのが *sn*-2 GPAT であり、シロイヌナズナでは GPAT4、GPAT5、GPAT6 が該当する（Yang ら、2010）が、*K. flaccidum* では *sn*-1 GPAT のカウンターパートしか見つかっていない（表 2-1）。したがって *K. flaccidum* の TAG 合成は、少なくともセイヨウヤマモモのように細胞外で *sn*-2 MAG から合成される可能性は低い。

シリカゲル抽出された *K. flaccidum* の脂質にはアルカンと TAG のみが含まれるが、クロロホルム抽出された脂質には更にステロールエステルやフィチルエステル、遊離ステロール類など、エステルも多く含まれていた。細胞に対し遊離脂肪酸や遊離アルコールは強い毒性があり、これらエステルには脂肪酸のカルボキシル基とアルコールのヒドロキシ基をマ

スクし細胞を保護する作用もある（Kaup ら、2002；Turkish ら、2005；Lippold ら、2012）。*K. flaccidum* では成熟した細胞がより多くの脂質を分泌しており、分泌する脂質にエステルが多いことから、もともと *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* は無毒化したエステルを排泄物として細胞から排出し、結果としてこの脂質が細胞を外部環境から保護する役割を果たしている可能性も考えられる。

抽出法の違いによる脂質の組成を比較すると、*K. flaccidum*、*C. reinhardtii* とも、シリカゲルプレート転写により抽出した脂質からはアルカンと TAG のみが得られた（図 3-8(B)、図 3-11）。クロロホルム抽出と同様に、両藻類ともアルカン画分からはドコサンのみが見つかった（図 3-12(A)）。一方、*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のどちらについても脂質抽出法で TAG 脂肪酸組成が異なっていた（図 3-14(B)）。*K. flaccidum*、*C. reinhardtii* ともにクロロホルム抽出よりもシリカゲル TLC プレート転写抽出で飽和脂肪酸含量が多かった。不飽和結合は大気中の酸素による自動酸化を受けて過酸化しやすいため（Porter ら、1995）、空気に暴露する機会の多い細胞外脂質に飽和脂肪酸が多いことは自動酸化を避ける点で理にかなっていると考えられる。また飽和脂肪酸の含量が多いと脂質の融点が高くなるため、場合によっては細胞内で結晶化し細胞を傷つける可能性がある（Pighin ら、2005）。実際に、トリオレインの融点が 5℃であるのに対し、トリステアリンの融点は 72−75℃と高く、*K. flaccidum* の生育環境ではこれらの脂質は個体になる。そのような危険な脂質を細胞外に排出することは細胞にとって必要なことであったと考えられる。

培地上に生育する藻類の面積あたりの総脂質量と、シロイヌナズナの表面積あたりの総脂質量とを比較すると、クロロホルム抽出による *K. flaccidumi* の脂質含量が最大であったが、シリカゲル TLC プレート転写により抽出した *K. flaccidum* と *C. reinhardtii* の脂質含量はともに、クロロホルム抽出した *A. thaliana* ワックスの 1/50 程度と低かった（図 3-15）。シリカゲル TLC プレート転写による脂質抽出の効率については更なる検討が必要だが、*C.*

reinhardtii はクロロホルム抽出でも細胞外脂質の含量は非常に低かったため、細胞外脂質の含量は *K. flaccidum* の方が *C. reinhardtii* よりも高いと考えられる。

A. thaliana のクチン画分を分析し、既報（Li-Beisson ら、2013；Yeats & Rose、2013）と同じモノマーがほぼ同程度の含量で確認できた（図 3-18、図 3-19(B)）。同じ実験法に則り、*K. flaccidum* から得られた脱脂した細胞壁画分をアルカリ加水分解することで多量の脂肪酸が得られた（図 3-19(A)、(B)）。*C. reinhardtii* からも脂肪酸が得られたが、その量は *K. flaccidum* の 1/5,000 以下と非常に少なかった（図 3-19(A)、(B)）。このように両藻類の細胞壁画分に脂肪酸の存在が認められたものの、エステル結合を作るカウンターパートであるヒドロキシ基を持つ脂質は見つからなかったため、第２章での予想に反し、*K. flaccidum* では *A. thaliana* とは異なり脂質のポリマーは形成されていないと考えられた。そこでこの脂肪酸がどのような形態で細胞壁近傍に存在しているのかを確かめる目的で ATR-FTIR を用いて分析した。*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* ではカルボン酸由来の伸縮振動が 1750cm^{-1} 付近でごくわずか認められた（図 3-20(A)、(B)）。しかし *K. flaccidum* 細胞壁中の脂肪酸の存在量が *A. thaliana* のクチンモノマーの 30 倍程度であることを考えると（図 3-19(A)）、*K. flaccidum* のこの伸縮振動が示すエステル結合が脂肪酸の主な結合様式であるとは考えにくかった。同時に、*K. flaccidum* の細胞外にある TAG が、このクチン相当画分の分析に異物として混入している可能性も低いと考えられた。*C. reinahrdtii* の細胞壁は植物のエクステンシンに相同なタンパク質で、ヒドロキシプロリンリッチな糖タンパク質が骨格を形成する（Roberts、1974；Goodenough & Heuser、1985；Ferris ら、2001）。また、*C. reinhardtii* ではこれまでのところ植物のクチクラのような構造は報告されていない。ATR-FTIR スペクトラムから *K. flaccidum* で *C. reinhardtii* と同様にアミド I とアミド II のピークが確認できたため、両種とも脂肪酸が細胞壁を構成するタンパク質に含まれるリジンのεアミノ基などと

アミド結合していると考えられた。

細胞壁のタンパク質について、*K. flaccidum* はアラビノガラクタンタンパク質やエクステンシンを持たないが、同じ車軸藻植物門である *Coleochaete nitellarum* ではいずれのタンパク質も確認されており、*Chara corallina* や *Chlorokybus atmophyticus* ではアラビノガラクタンタンパク質が確認されている（Sørensen ら、2011）。一方、Sørensen らの報告では細胞壁画分の糖タンパク質をモノクローナル抗体と carbohydrate-binding modules により検出している（Moller ら、2007；Sørensen ら、2011）ため、脂肪酸が結合したタンパク質が検出できなかった可能性も考えられる。

細胞壁多糖については、*K. flaccidum* の細胞壁画分を酸加水分解するとキシロースとグルコースが得られるが、ドリセラーゼ処理してもイソプリメベロースが得られないため、*K. flaccidum* は一般的なキシログルカンを欠くとの報告がある（Popper & Fry, 2003；Fry, 2011）。また、ドリセラーゼやセルラーゼを使った *K. flaccidum* のプロトプラスト化も成功していない（堀、私信）。一方、*K. cernulatum* と *K. nitens* をカルコフロールホワイトで処理すると発色が認められ（Herburger & Holzinger、2015）、*K. flaccidum* でも細胞壁でカルコフロールホワイトの発色が認められる（大高、私信）。したがって *K. flaccidum* もセルロースやカロースなどの多糖の微繊維構造を有することが推測される。これらの多糖が酵素により消化されないことと、ATR-FTIR の結果（図 3-20）を併せて考えると、*K. flaccidum* の細胞壁は多糖の微繊維の外側に糖タンパク質の骨格があり、このタンパク質でできた骨格によって酵素が多糖へと近づけない可能性がある。

以上から得られた結果をもとに、*K. flaccidum* と *C. reinahrdtii* の細胞壁とクチクラの構造に関するモデルを構築した（図 3-21）。*K. flaccidum* では先に述べた通り、多糖の外側にタンパク質の骨格を持ち、この骨格に結合した多量の脂肪酸が疎水性領域を形成していると考えられた。*C. reinhardtii* の細胞壁は繊維状および粒状の糖タンパク質で構成され、大きく

３層構造をなしている（Roberts、1974；Goodenough & Heuser、1985；Ferris ら、2001）。この糖タンパク質の一部に脂肪酸が結合し、疎水性領域を形成していると考えられた。シリカゲル TLC プレートへの転写により抽出された脂質は細胞壁の疎水性領域から表面へ露出していると推測され、*K. flaccidum* のクロロホルム抽出により得られた多量の TAG やステロールエステル、フィチルエステル、遊離ステロールは細胞壁内の疎水性領域に疎水性相互作用によって存在しているのではないかと考えられた。*K. flaccidum* 細胞壁の脂肪酸含量は *C. reinhardtii* より多いため、*K. flaccidum* の疎水性領域が広いと推測される。よって *K. flaccidum* では細胞壁内に蓄積される脂質が多く、*C. reinhardtii* と比較してクロロホルム抽出により得られた脂質量が多かったと考えられた。

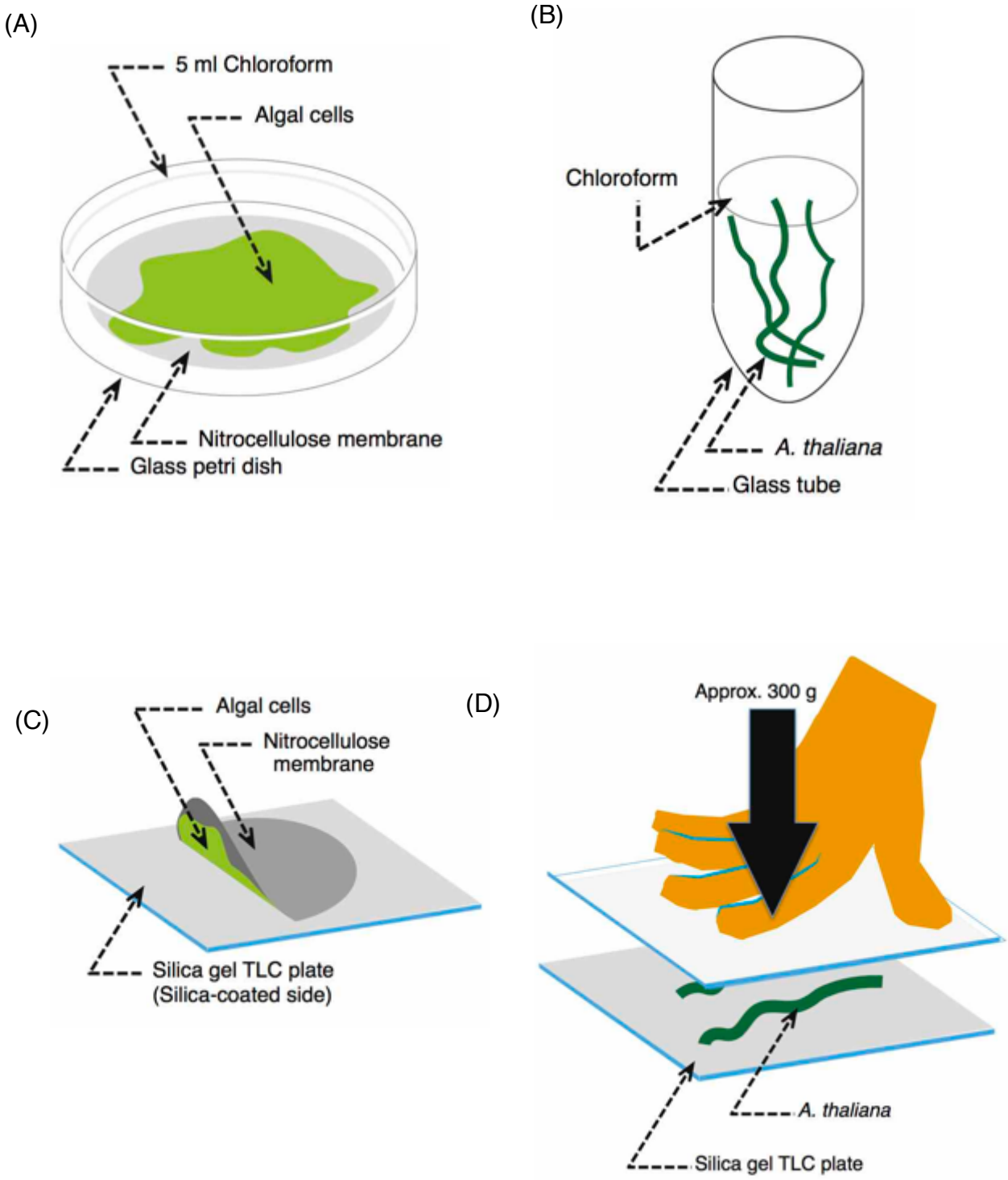


図 3-1. 脂質抽出法
(A)と(C)は藻類の細胞外脂質脂質抽出、(B)と(D)はシロイヌナズナの細胞外脂質脂質抽出を示す。
(A)と(B)はクロロホルム抽出法。
(C)と(D)はシリカゲル TLC プレートへの転写による抽出。

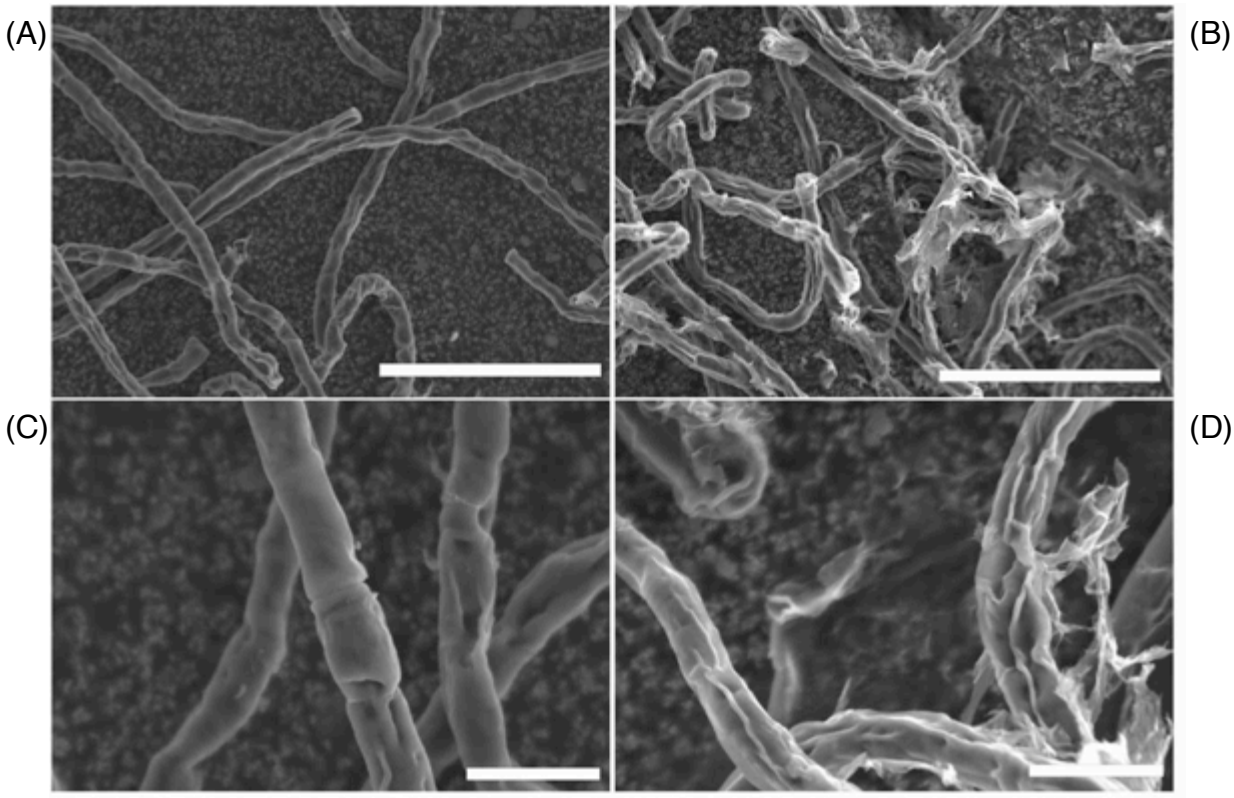


図 3-2．*K. flaccidum* 表層の SEM 画像
(A)と(C)は液体培地から液体培地へ継代 3 日後の表層の画像、
(B)と(D)は液体培地から固体培地へ継代 3 日後の表層の画像。
スケールバーは(A, B)=50μm、(C, D)=10μm。

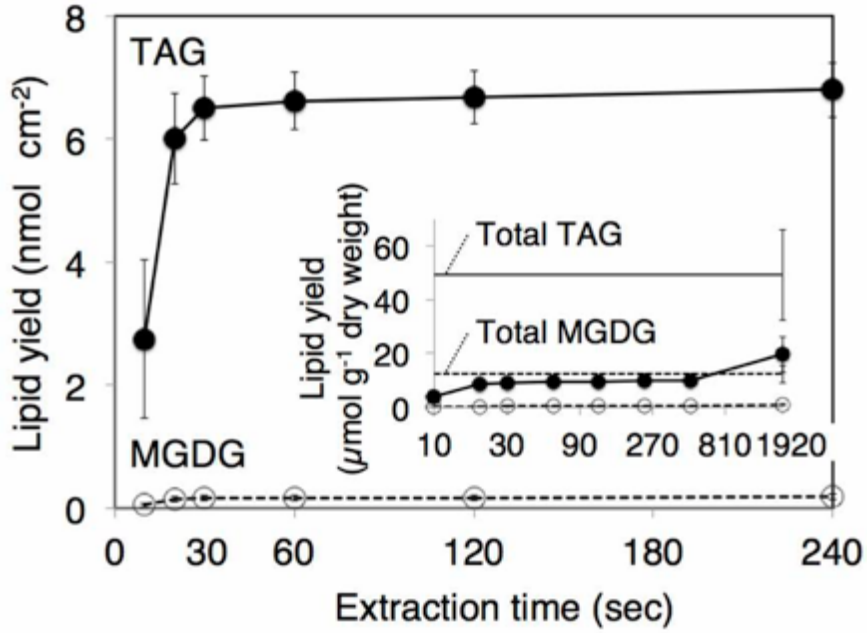


図 3-3．クロロホルム抽出による *K. flaccidum* の生育面積あたり脂質回収量の経時変化。
K. flaccidum からニトロセルロース 1 枚につき 5ml のクロロホルムで抽出し、所定の経過時間でクロロホルムを回収した。黒丸は TAG、白丸は MGDG を表す。差し込み図は乾物重あたりの脂質抽出量をしめす。実線、点線はそれぞれ、Bligh and Dyer 法により抽出した TAG と MGDG を表す（n=3、±標準偏差）。

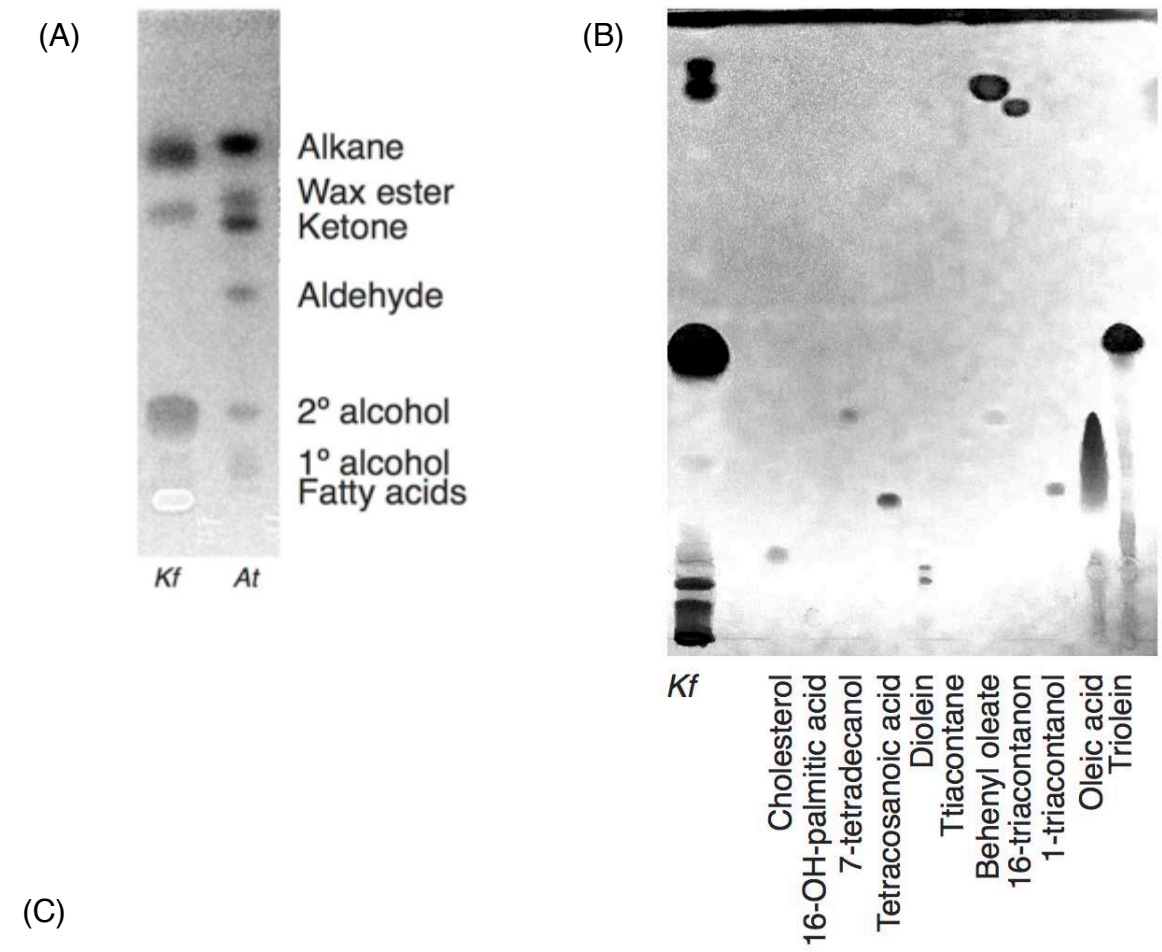


図 3-4. クロロホルム抽出した *K. flaccidum* 細胞外脂質の TLC 分離
(A) ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（90:7.5:1、v/v/v）により *K. flaccidum* と *A. thaliana* から抽出した脂質のプリムリン染色。
(B) (1)ヘキサン（20cm）、(2)トルエン（20cm）、(3)ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70:30:1、v/v/v、10cm）で展開した *K. flaccidum* の細胞外脂質のプリムリン染色。
(C) 発色試薬による脂質検出。展開溶媒は(B)に同じで、各レーンの発色試薬を以下の通りとし *K. flaccidum* 細胞外脂質を染色した後、110ºC 10 分間オーブンで加熱した。
レーン 1：プリムリン
レーン 2：ニンヒドリン
レーン 3：オルシノール
レーン 4：アンスロン
レーン 5：塩化鉄 III
レーン 6：DNP

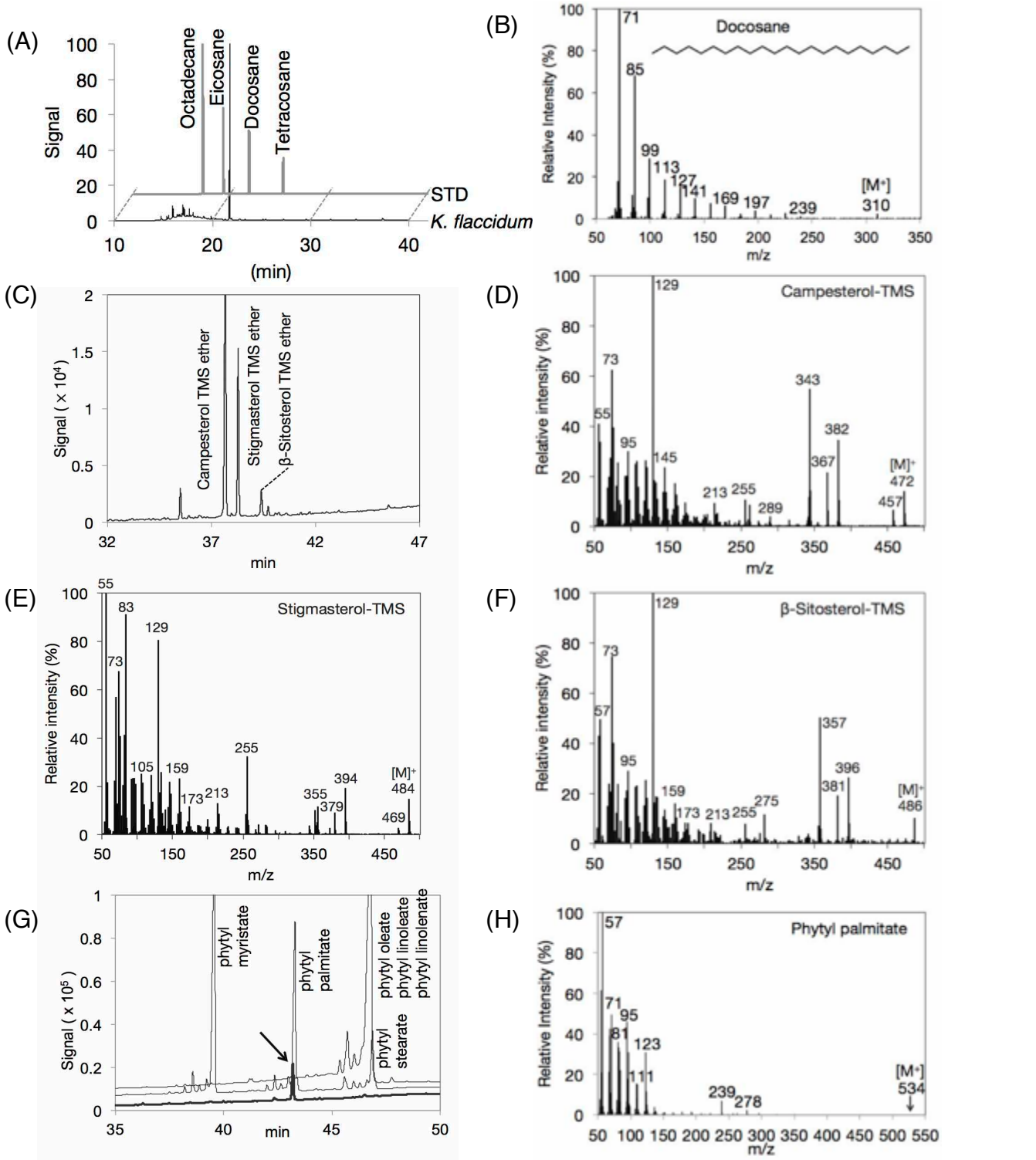


図 3-5. クロロホルム抽出した *K. flaccidum* 細胞外脂質の化学分析結果
(A) *K. flaccidum* のアルカン画分の GC-FID クロマトグラム、(B) アルカン画分の EI-MS スペクトラム、(C) ステロールエステル画分のステロール部位の GC-FID クロマトグラム、(D)–(F) 同ステロール部位の EI-MS スペクトラム、(G) フィチルエステルの GC-FID クトマトグラム、(H) フィチルエステルの EI-MS スペクトラム、(I) 遊離ステロールの GC-FID クトマトグラム

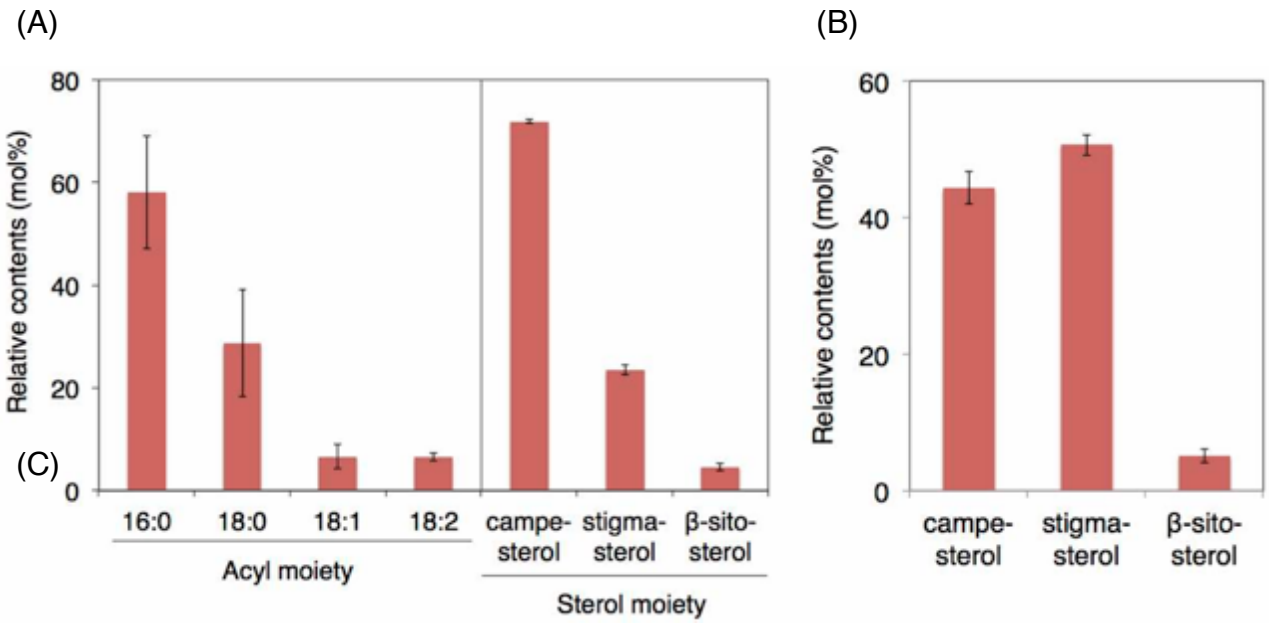
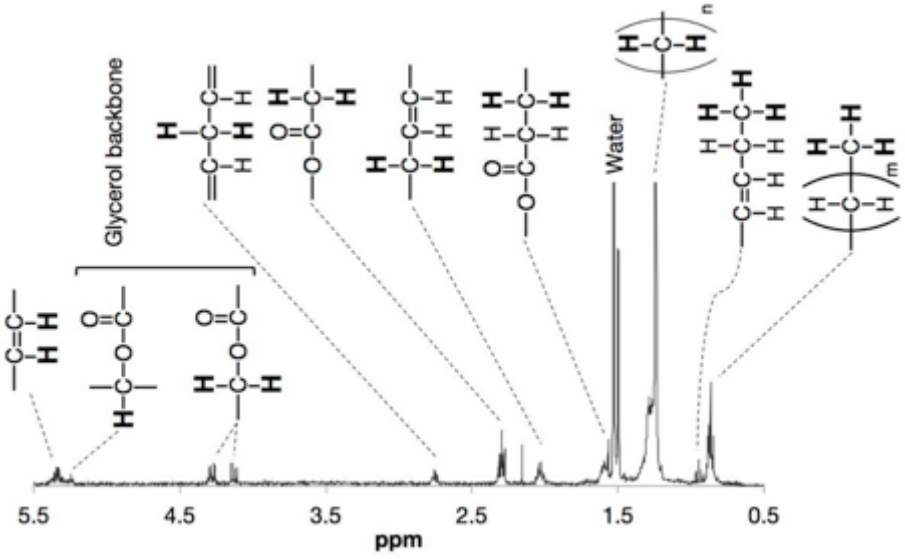


図 3-6. クロロホルム抽出した *K. flaccidum* のステロールエステル画分、遊離ステロール画分の成分組成
(A) ステロールエステル(n=3、±標準偏差)
(B) 遊離ステロール(n=3、±標準偏差)

(A)

(B)



(C)

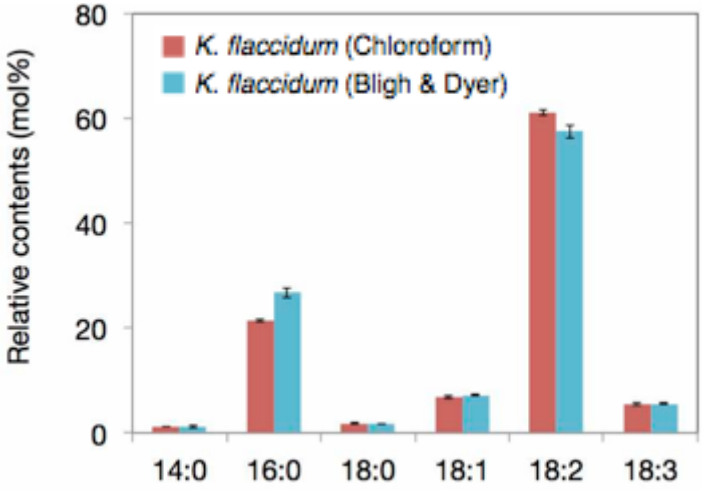
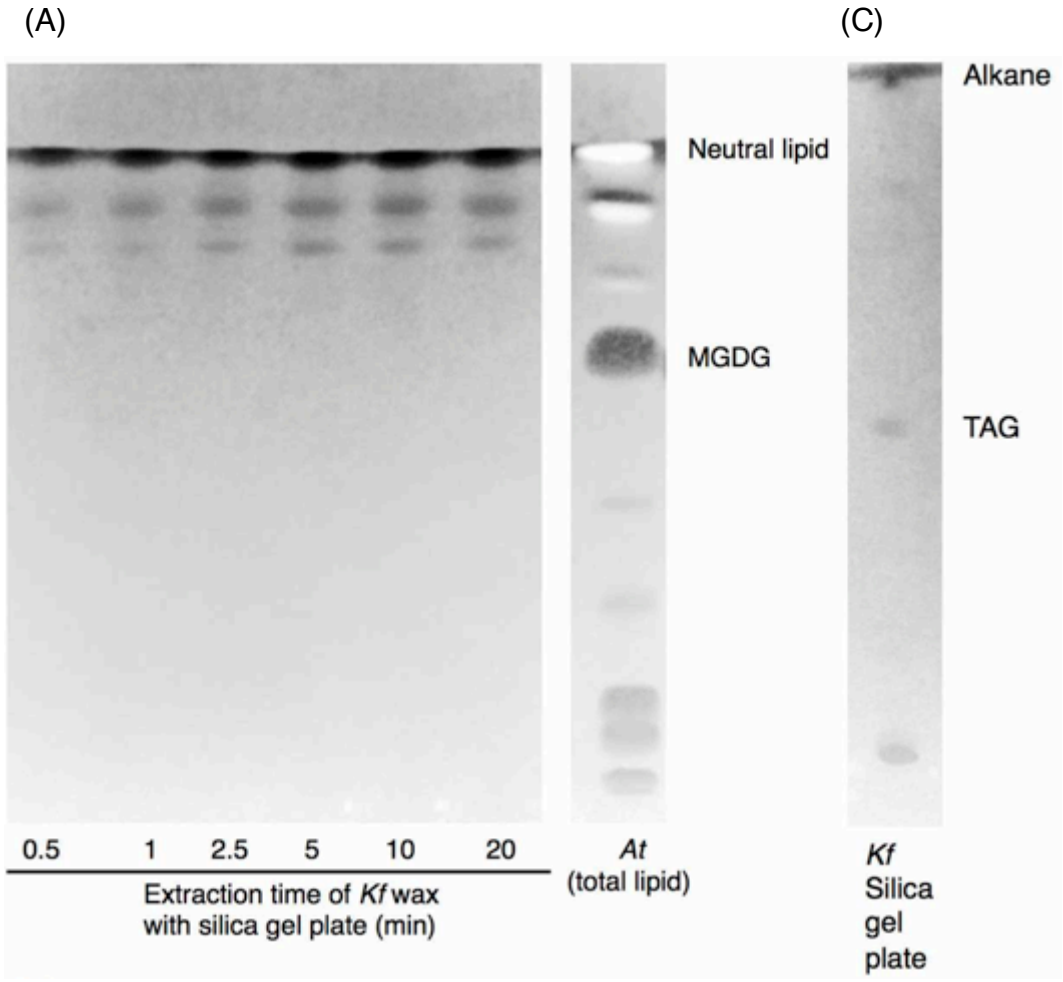


図 3-7. クロロホルム抽出した *K. flaccidum* 細胞外脂質中 TAG 画分の ^{1}H-NMR 分析と、TAG の脂肪酸組成

(A) 2%硝酸銀含浸 TLC を用いてヘキサン／アセトン（50:3.25、v/v）で分離した TAG のクロマトグラム

(B) ^{1}H-NMR 分析結果。溶媒：CD_3Cl、磁場強度：400MHz、測定スペクトル幅：9379Hz、積算回数：8 回、詳細は実験方法に記載した。

(C) クロロホルム抽出した *K. flaccidum* の細胞外脂質の TAG と、Bligh & Dyer 法で抽出した総脂質中の TAG との脂肪酸組成比較(n=3、±標準偏差)。



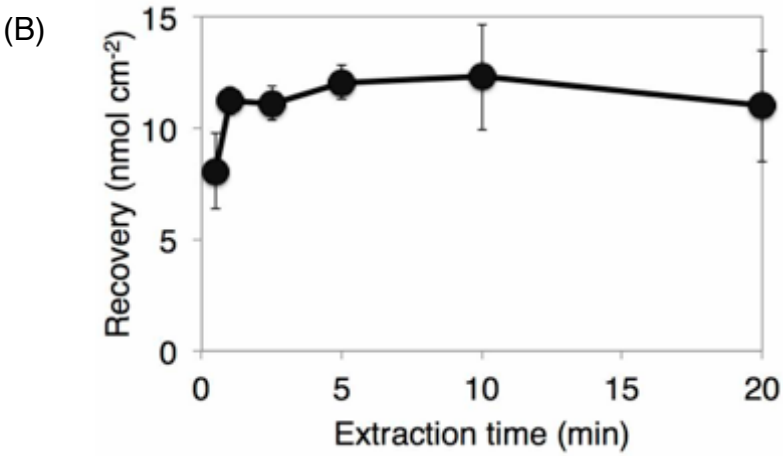


図 3-8. シリカゲル TLC プレートに転写し抽出した *K. flaccidum* の細胞外脂質
(A) 転写時間ごとの脂質の TLC 分離。回収した脂質をクロロホルム／メタノール／酢酸（18:15:1、v/v/v）で展開した。右はシロイヌナズナの茎葉部から Bligh and Dyer 法により得た総脂質の展開図。
(B)脂質回収量の経時変化　TLC プレート上のスポットの濃さを Image J を用いて定量化した（n=2、±標準偏差）。
(C) シリカゲル TLC プレート抽出した脂質の TLC 分離　(1) ヘキサン（20cm）、(2)トルエン（20cm）、(3)ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70:30:1、v/v/v）（10cm）により分離した。

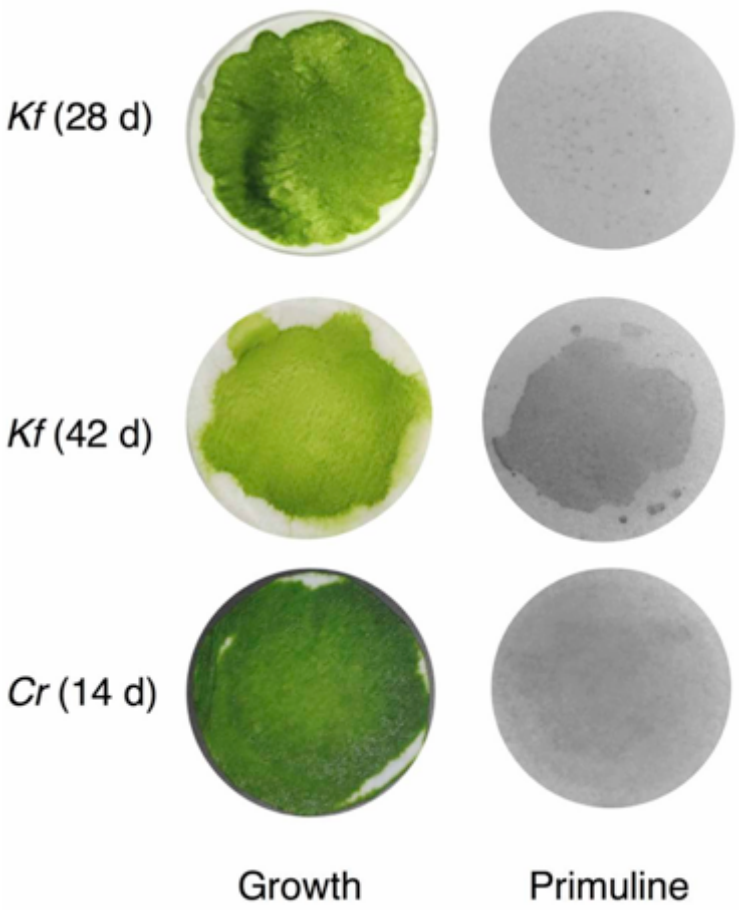


図 3-9. シリカゲル TLC プレートに転写し抽出した藻類の細胞外脂質
左は藻類の生育、右は 0.01% プリムリンによる蛍光。
上段は *K. flaccidum* 培養 28 日、中段は *K. flaccidum* 培養 42 日、下段は *C. reinhardtii* 培養 14 日の結果を示す。

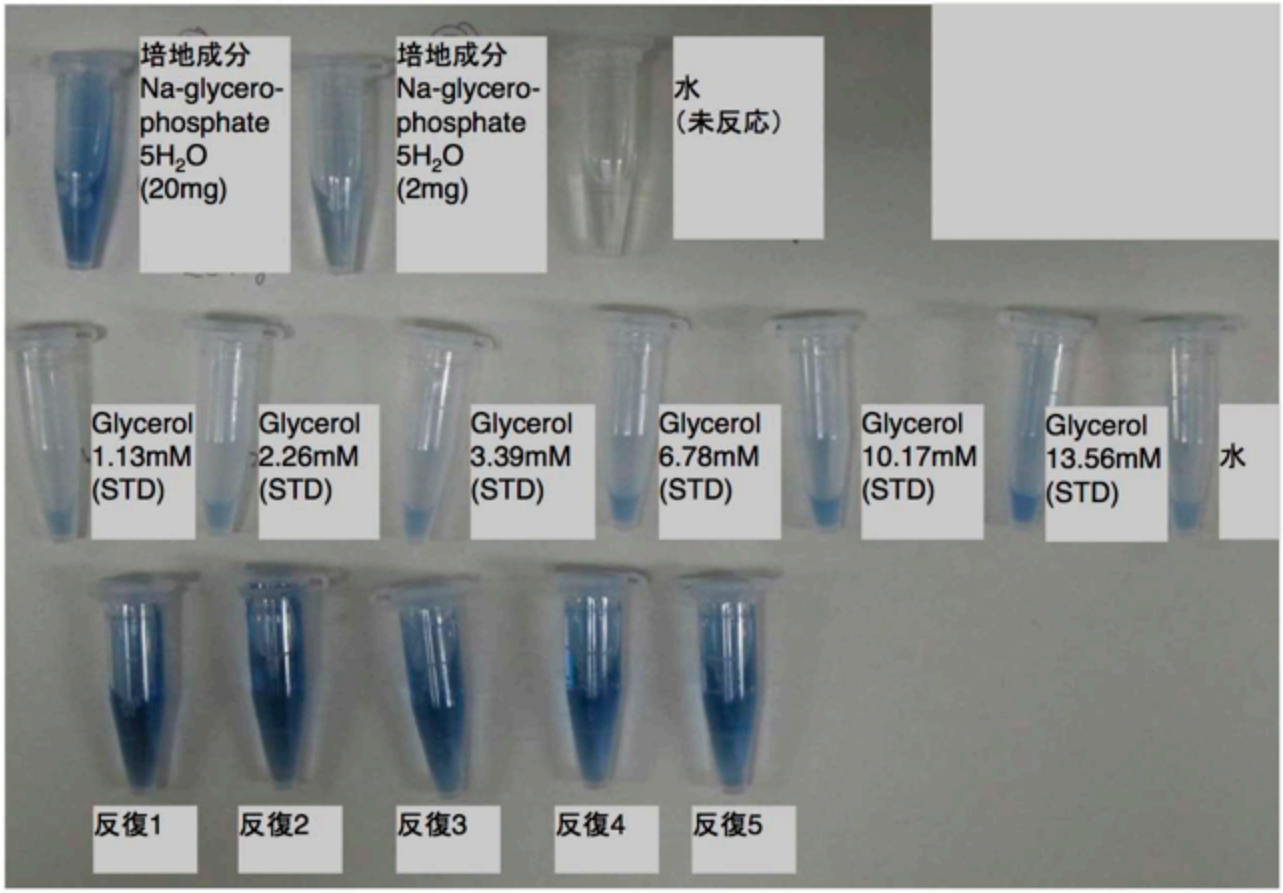


図 3-10．GPO·DAOS 法による *K. flaccidum* 細胞外脂質中の TAG の検出
ニトロセルロースメンブレンで生育させた *K. flaccidum* を、培地を除きガラスシャーレ内で反応させた（n=5）。詳細は実験方法に記した。

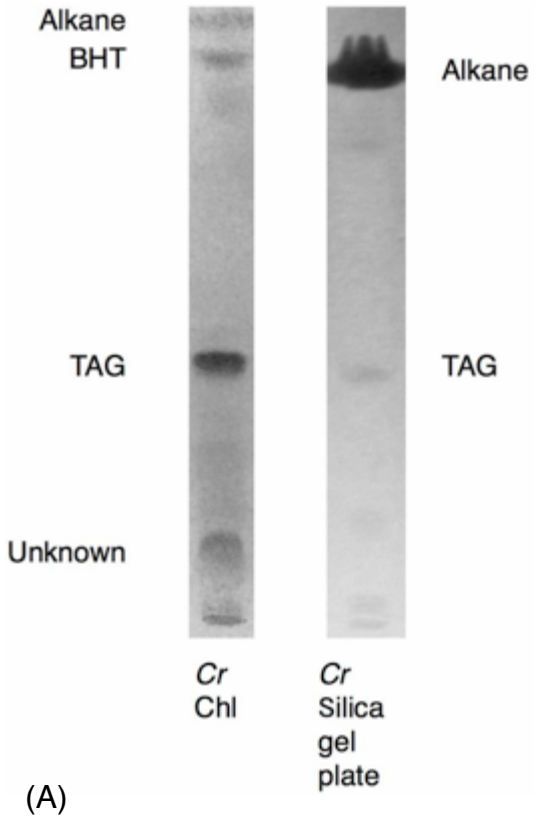
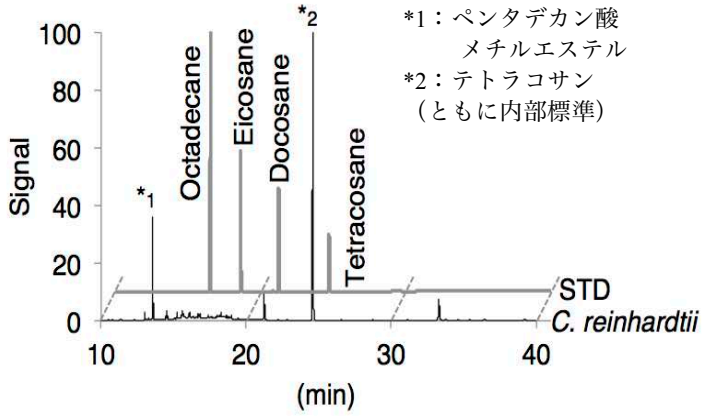


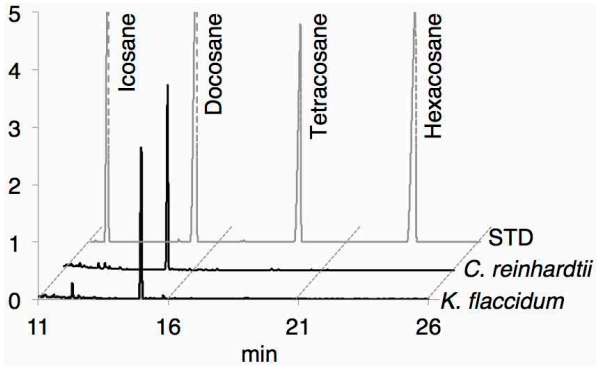
図 3-11．クロロホルム抽出あるいはシリカゲルプレートに転写し抽出した *C. reinhardtii* の細胞外脂質
左はクロロホルム抽出の結果で、抗酸化剤として添加した BHT のスポットが認められた。右はシリカゲル TLC プレート転写により抽出した脂質の TLC 展開図。いずれも、(1)ヘキサン（20cm）、(2) トルエン（20cm）、(3)ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70:30:1、v/v/v）（10cm）により展開した。

(A)

クロロホルム抽出



シリカゲル TLC プレート抽出



(B)

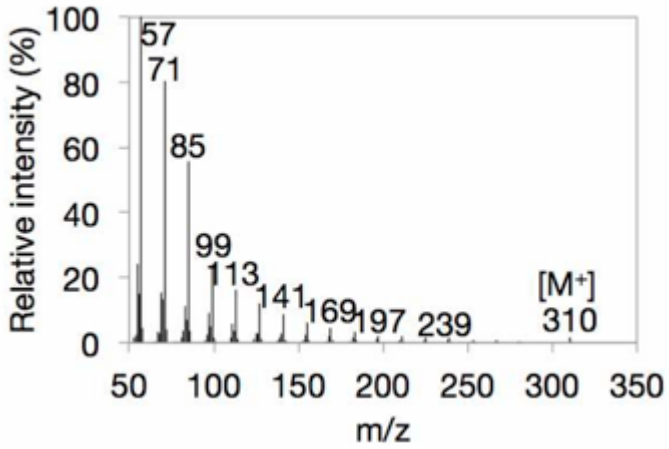


図 3-12．クロロホルム抽出およびシリカゲル TLC プレート転写により抽出した *C. reinhardtii* と *K. flaccidum* のアルカン画分
(A) GC-FID クトマトグラム　黒線がシリカゲル TLC プレート転写により得た *C. reinhardtii* 或いは *K. flaccidum*、灰線は標準物質のクトマトグラムを表す。なおクロロホルム抽出したアルカンはワックスエステルなどと同じ昇温プログラムを用いたため Rf 値が異なる。
(B) (A)のシリカゲルプレート抽出した *C. reinhardtii* の EI-MS スペクトラム

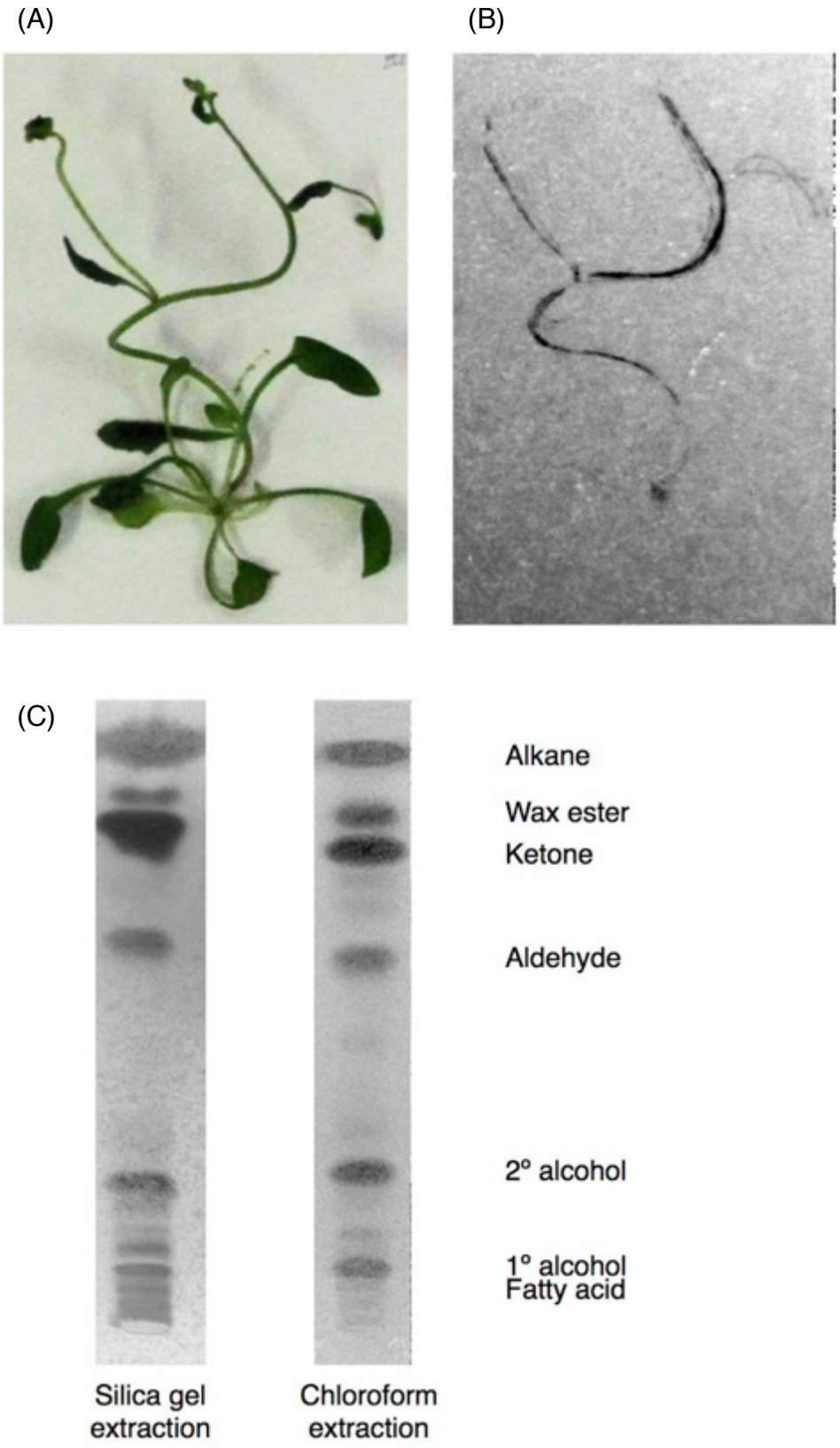


図 3-13. *A thaliana* のシリカゲル TLC プレート転写による細胞外脂質の抽出
(A) 転写に用いた *A. thaliana* の生育、(B) 転写された脂質のプリムリン呈色 シリカゲルプレートに *A. thaliana* を乗せ、その上にシリカゲルプレートを乗せ指で軽く押さえて脂質を転写した。
(C) シリカゲル TLC プレート抽出あるいはクロロホルム抽出された脂質の TLC 展開図 どちらもヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（90:75:1、v/v/v）により展開した。

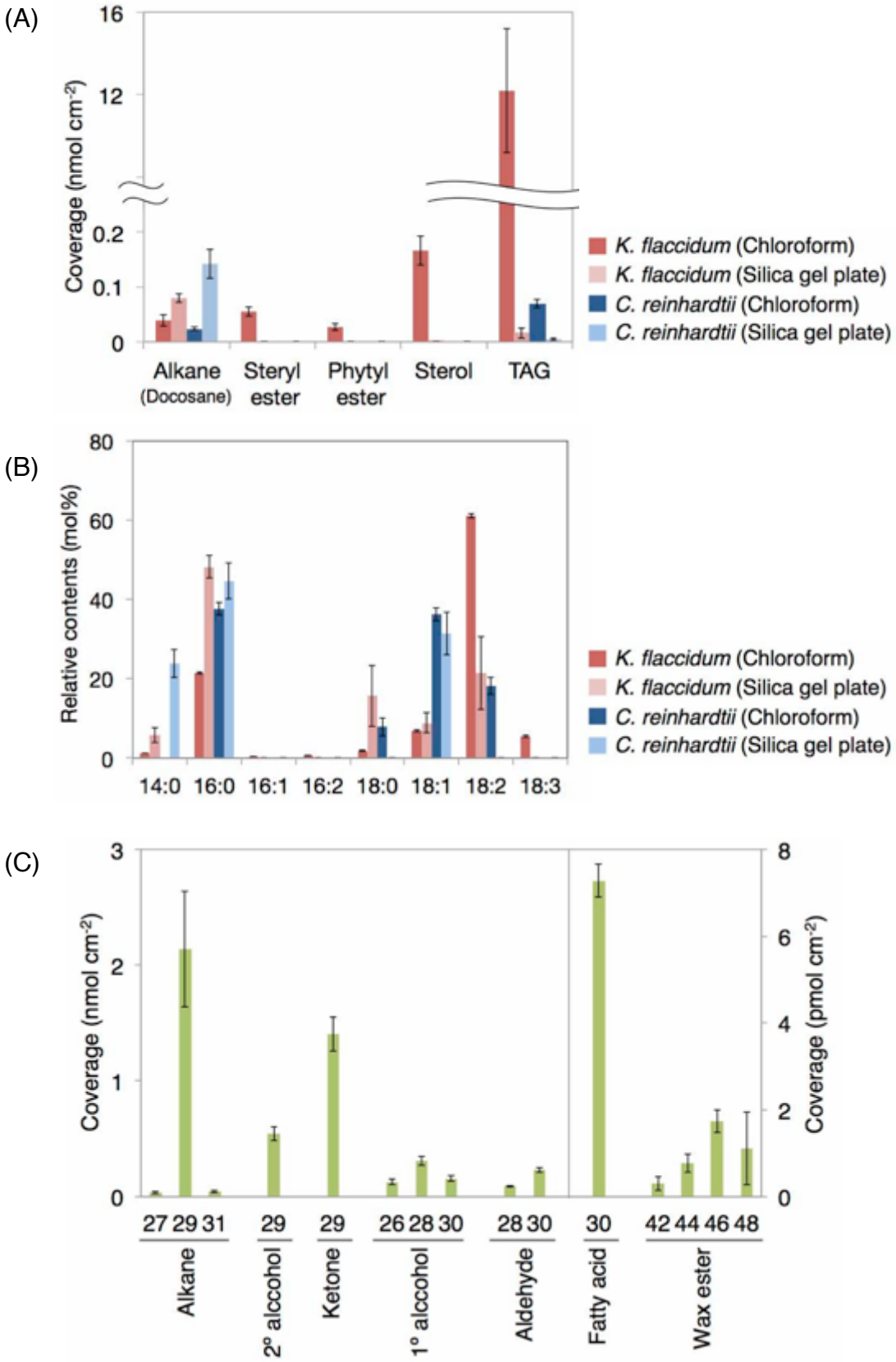


図 3-14. *K. flaccidum* と *C reinhardtii*、*A. thaliana* の細胞外脂質の含有量と成分組成
(A) 藻類の細胞外脂質における各脂質クラスの含有量、(B) 藻類の細胞外脂質における TAG 画分の脂肪酸組成、(C) *A. thaliana* のワックスの成分組成
全ての脂質は GC-MS で同定した成分を GC-FID により定量した（n=4、±標準偏差）。

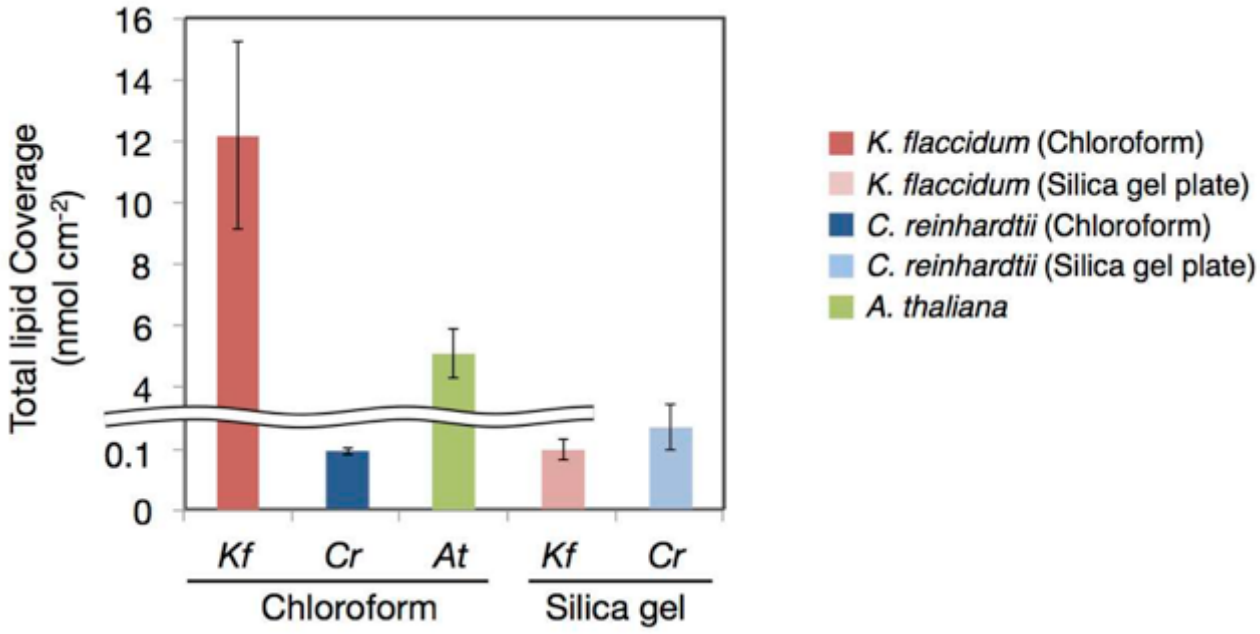
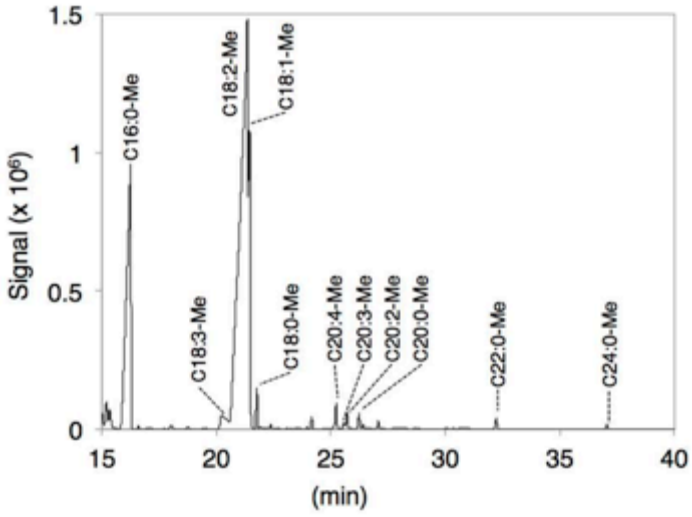
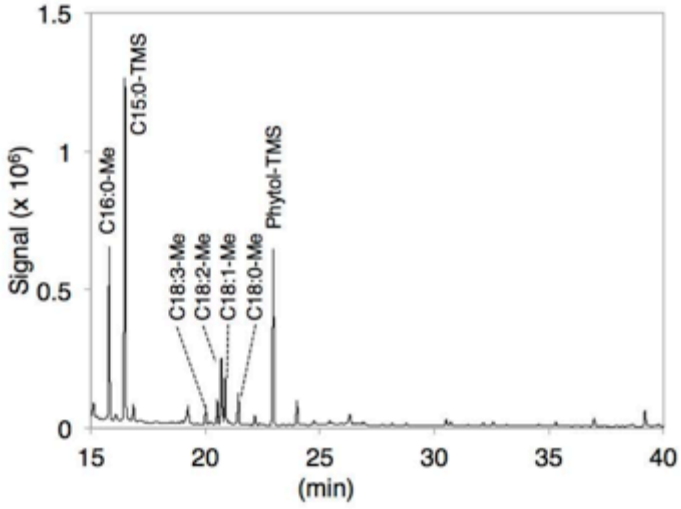


図 3-15．表層から抽出した総脂質含量の、種および抽出法間の比較（n=4、±標準偏差）

(A)



(B)



(C)

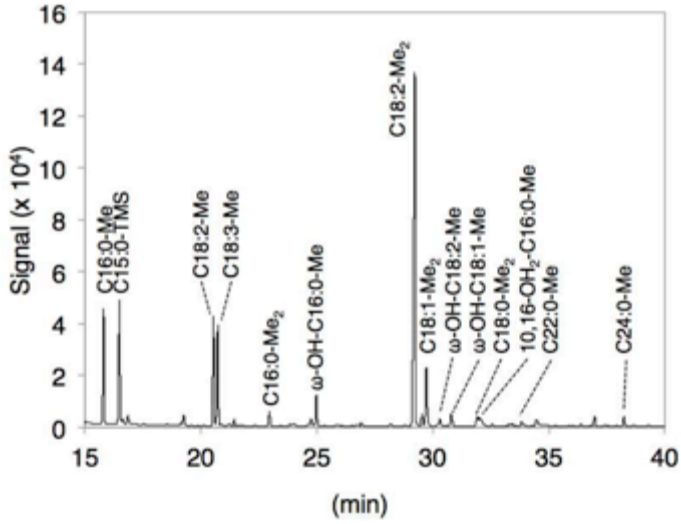


図 3-16. アルカリ分解した細胞壁画分の GC-FID クロマトグラム
(A) *K. flaccidum*、 (B) *C. reinhardtii*、 (C) *A. thaliana*
クロロホルムとメタノール、ブタノールで脱脂した細胞壁を凍結乾燥後、ナトリウムメドキシドでアルカリ加水分解した有機溶媒可溶性画分を分析した。

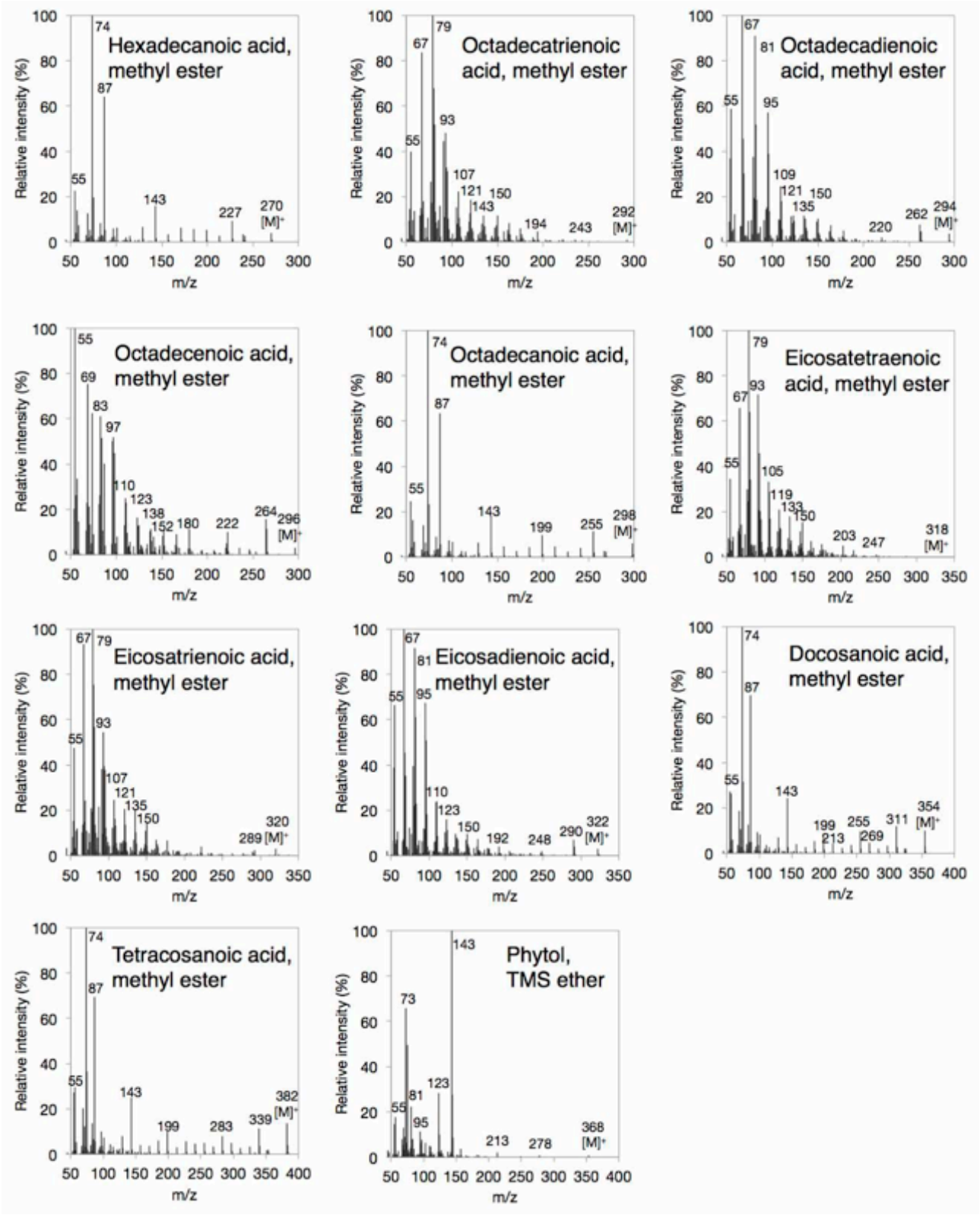


図 3-17. アルカリ分解した *K. flaccidum* および *C. reinhardtii* 細胞壁画分由来脂質の EI-MS スペクトラム
スペクトラムから推定される化合物名を図内に記載した。

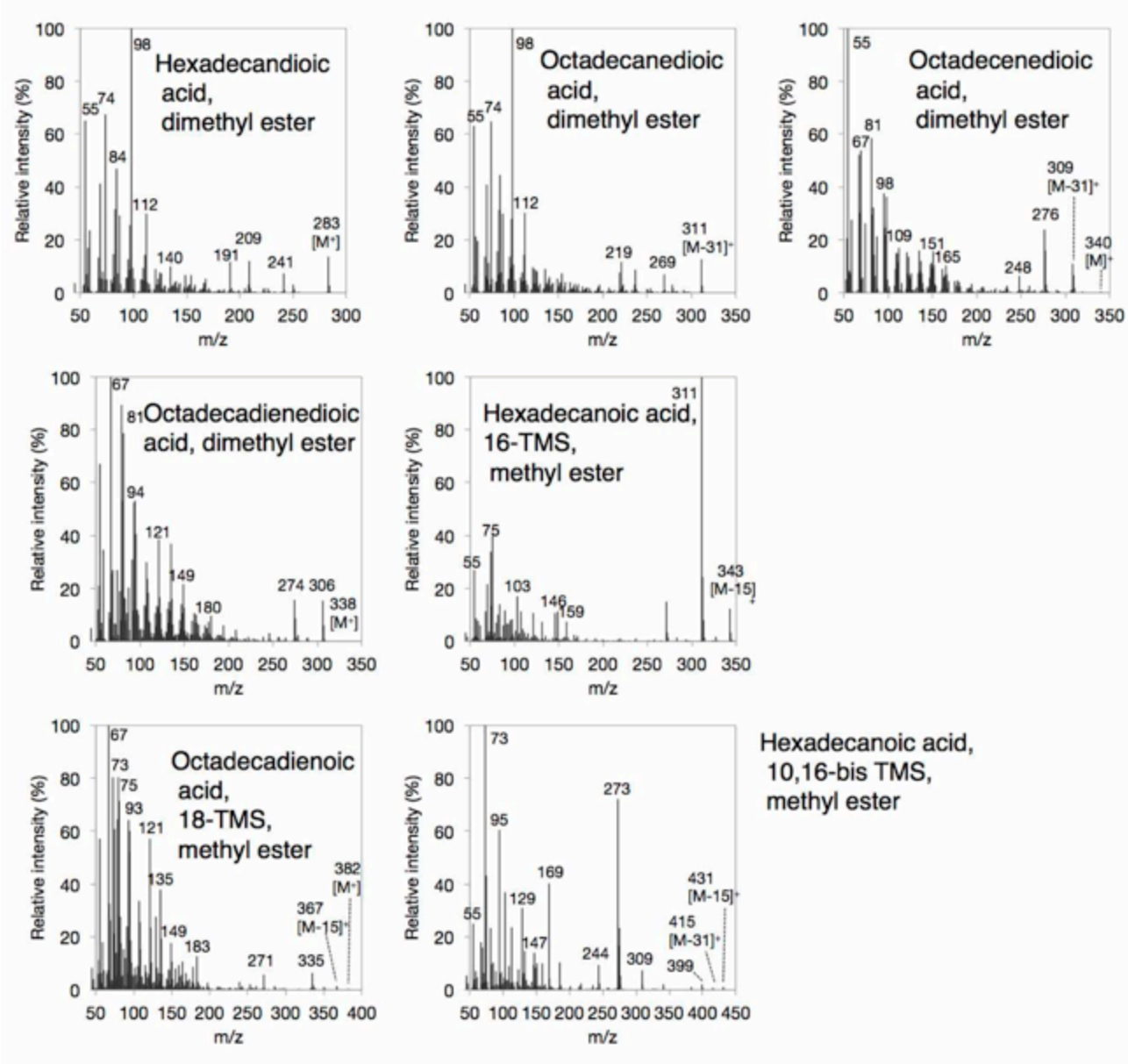
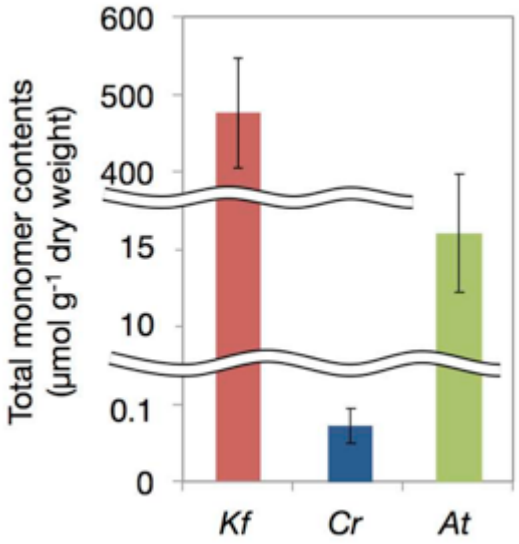


図 3-18. アルカリ分解した *A. thaliana* 細胞壁画分由来脂質の EI-MS スペクトラム
スペクトラムから推定される化合物名を図内に記載した。

(A)



(B)

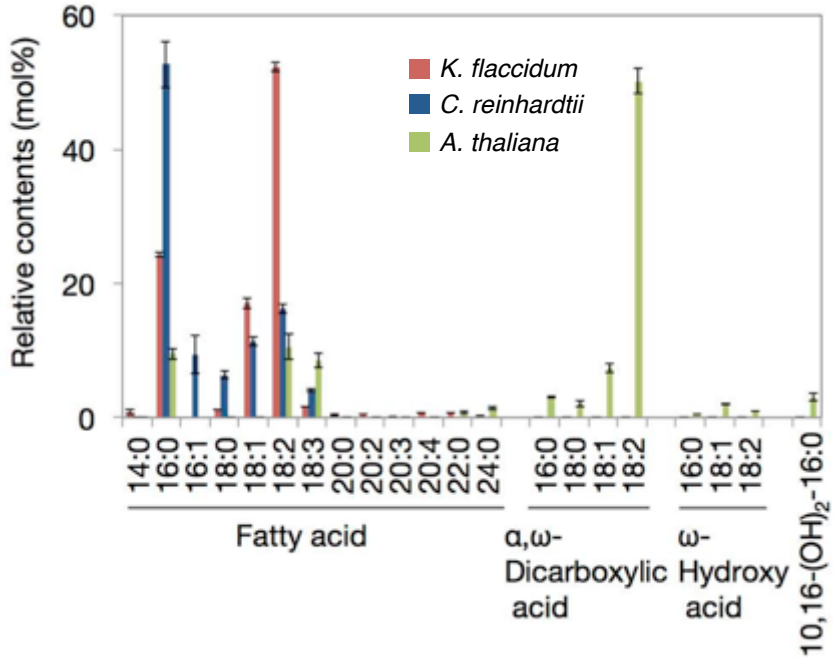


図 3-19. アルカリ分解した *K. flaccidum*、*C. reinhardtii*、*A. thaliana* 細胞壁画分由来脂質の成分組成と含量
(A) 細胞壁画分由来脂質の総量（n=4、±標準偏差）
(B) 細胞壁画分由来脂質の組成（n=4、±標準偏差）

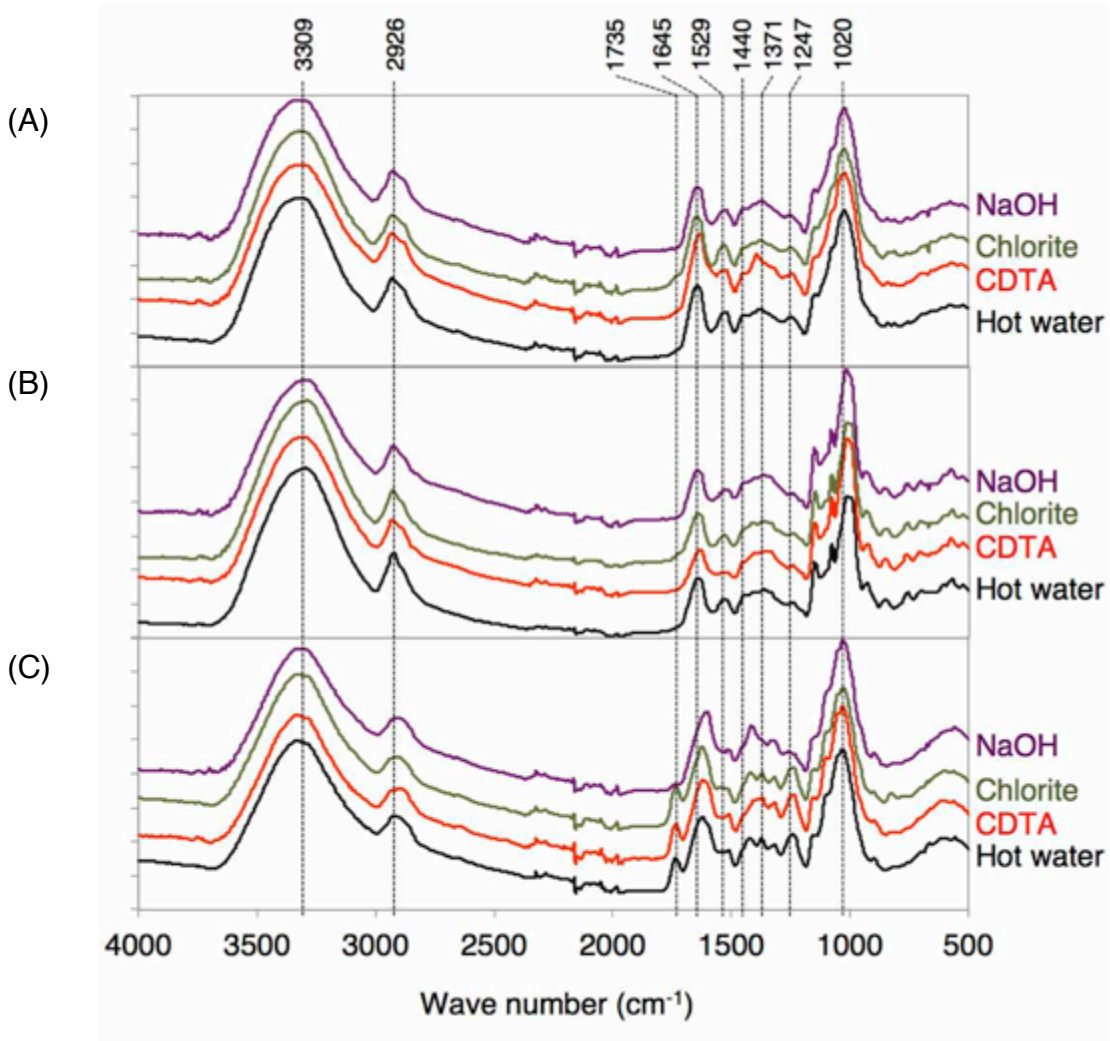


図 3-20. 細胞壁画分の ATR-FTIR スペクトラム
(A) *K. flaccidum*、(B) *C. reinhardtii*、(C) *A. thaliana*
脱脂した細胞壁画分を凍結乾燥し、次のいずれかの処理をほどこした残渣を ATR-FTIR で分析した。(1) 0.1 M NaOH を添加し室温で 1 時間培養（ヘミセルロース可溶化）、(2) 0.34 M $NaClO_2$ を添加し 65ºC で 1 時間培養（フェノール性成分可溶化）、(3) 100 mM CDTA を添加し室温で 1 時間培養（イオン結合性ペクチン可溶化）、(4) イオン交換水を添加し 80ºC で 1 時間培養（ペクチン可溶化）。

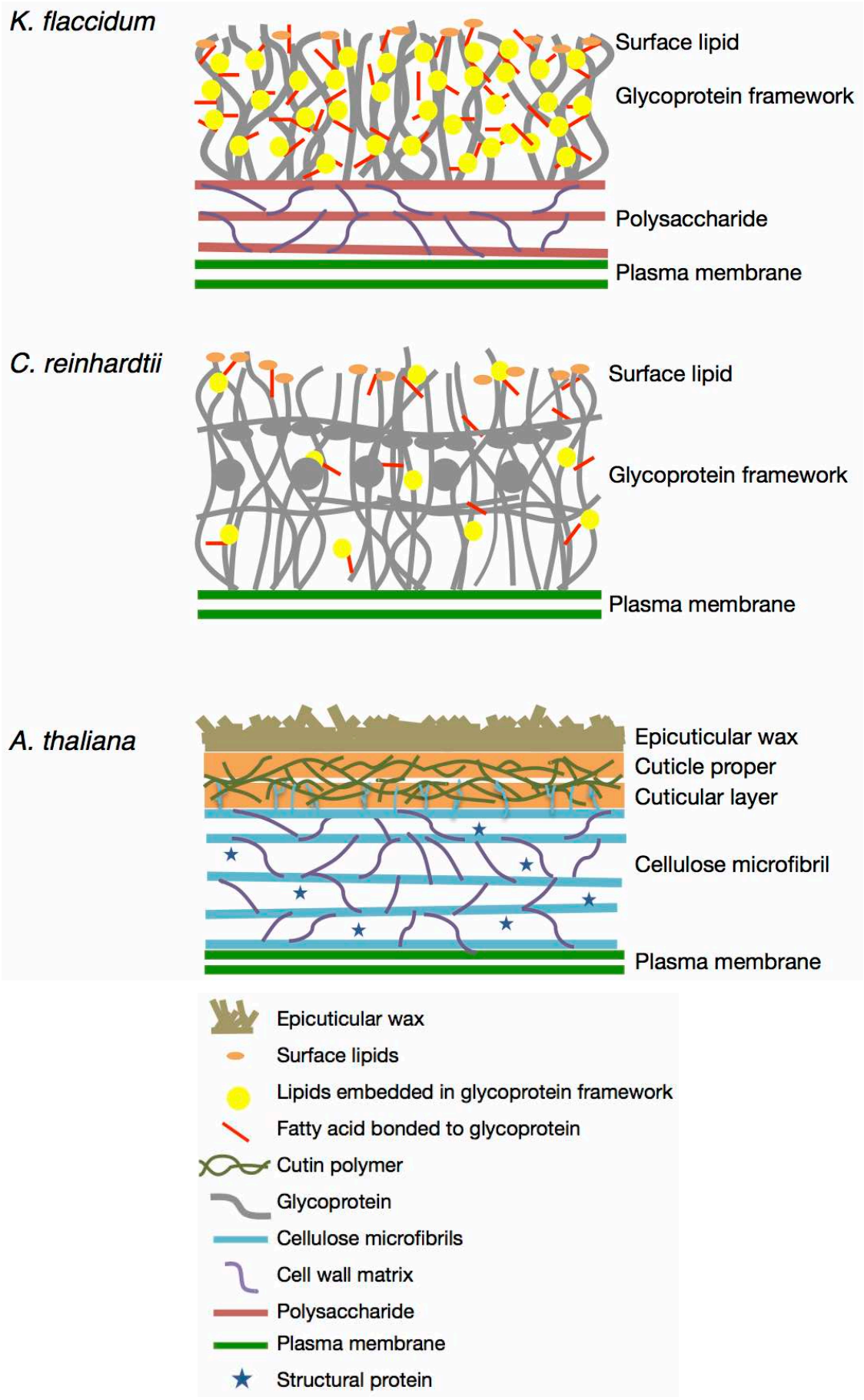


図 3-21. *K. flaccidum* の細胞外脂質と細胞壁内の疎水性領域の模式図。

４．総合考察

本研究では、世界中の高地や砂漠、都市部などあらゆる環境ストレス条件下で生育し、ゲノム解読が終了した車軸藻植物門 *Klebsormidium flaccidum* に注目し、その高度な環境適応能の要因の一つがクチクラ構造にあるのではないかと推定した。そこで第 2 章では、ゲノム情報から *A. thaliana* のワックス合成およびクチンポリマー形成関連タンパク質群に対する *K. flaccidum* におけるカウンターパートを探索した。その結果、*K. flaccidum* ゲノムからワックス合成関連タンパク質のカウンターパート遺伝子が幾つか見いだされワックスの存在が示唆されたが、１級アルコールとワックスエステル、アルカン、２級アルコール、ケトンの合成に関与するタンパク質のカウンターパートを持たない（図 2-1）ため、*K. flaccidum* のワックスは *A. thaliana* とは異なる成分で構成されることが示唆された。またクチンポリマーの合成に関与するタンパク質のカウンターパートの探索から、*K. flaccidum* が ω-ヒドロキシ酸と脂肪酸、グリセロールから成るクチンポリマーを持ち得ることが示唆された（図 2-4）。第 3 章では SEM を用いて、寒天培地上で培養し乾燥条件に晒した *K. flaccidum* の表面を観察したところ、液体培地で連続して培養した場合には認められなかったフィルム状の構造が藻体表面に認められた（図 3-2(B)、(D)）。乾燥時に現れた *K. flaccidum* 表面の構造体が陸上植物のワックスに相当するのではないかと推測された。次に、細胞外脂質のみを分取するためシリカゲル TLC プレートに転写する簡便な脂質抽出法（図 3-1(C)）を考案し、植物のワックス抽出法と比較しながら、それぞれの方法で得られた脂質を GC-MS により分析した。その結果、*A. thaliana* とは組成が異なるものの、*K. flaccidum* が主にアルカンと TAG から構成される脂質を細胞外に分泌することを見出した（図 3-8(C)）。ただし、植物のワックス分析法に準じクロロホルムにより *K. flaccidum* の細胞外脂質を抽出すると、シリカゲルプレートに転写し抽出した場合の約 120 倍の脂質が得られた（図 3-15）。またクロロホルム抽出ではアルカンと TAG に加えて、ステロールエステル、フィチルエステル、遊離

ステロールが得られた（図 3-5）。このように抽出法により得られる *K. flaccidum* 細胞外脂質の量および組成に違いがあるため、今後はこうした抽出法による違いの意味をより詳しく解析する必要がある。つづいて *K. flaccidum* における陸上植物のクチンポリマーに相当する画分を GC-MS で分析した結果、脂質ポリマーの存在は確認できなかったものの細胞壁に多量の脂肪酸が結合していることを見出した（図 3-19；図 3-20）。これらの結果を踏まえ、*K. flaccidum* の細胞壁画分にはクチクラ層やクチクラプロパーの代替となる疎水性領域がありその中にステロールエステルやフィチルエステル、TAG などの脂質が存在し、シリカゲル TLC プレートにより抽出されたアルカンと TAG が細胞表面に露出していると推測した（図 3-21）。

第 2 章で予測されたとおり、*K. flaccidum* の細胞表層にはワックスが存在したが、その成分は陸上植物とは異なっていた。子嚢菌門の 3 種、*Alternaria tenuis*、*Botrytis fabae*、*Neurospora crassa* の分生胞子表面や、ケカビ亜門 *Rhizopus stolonifer* の胞子表面には、アルカンや TAG、遊離脂肪酸等が含まれるとの報告があり（Fisher ら、1972；Fisher ら、1978）、*K. flaccidum* と *C. reinhardtii* のシリカゲル TLC プレート転写で抽出した脂質と一部が共通する。脂質合成系はそれぞれの生物で分岐後に独立して進化したと考えられるが、分岐の年代が異なる子嚢菌門や *C. reinhardtii*、*K. flaccidum* において細胞外脂質としてアルカンや TAG などが共通するのは興味深い。Fisher らの報告における細胞外脂質の鎖長については、*A. tenuis*、*B. fabae*、*N. crassa*、*R. stolonifer* 細胞外脂質の TAG、遊離脂肪酸で C16:0 と C18:0 が優占し、最長は遊離脂肪酸の C28:0 だった（Fisher ら、1978）。またアルカンは C18 から C36 まで見つかり、優占したのが C24 と C31 だった。このように子嚢菌門やケカビ亜門で VLCFA を原料とした脂質を分泌することが確認されており、成分からみて *K. flaccidum* の細胞外脂質がこれら菌類よりも格段に陸上環境に適応しているとは考え難い。

B. braunii のように、アルカンには光合成を効率的に行えるよう細胞を水面へ浮かせる役割

があると考えられており（Niehaus ら、2012）、アルカンを積極的に細胞外へ分泌するメリットがある。一方で TAG を含めたエステル類には、両親媒性により細胞毒性を示すアルコールと脂肪酸の官能基をマスクする役割もある（Duan & Schuler 、2005；Turkish ら、2005；Rani ら、2010；Lippold ら、2012）。よって細胞外にエステル類があることは細胞にとって不要なこれら脂質を細胞外へ排出した結果である可能性がある。これが妥当であれば、実際に *C. reinhardtii* にも *K. flaccidum* と比較して少量ではあるが細胞外脂質が認められたこともあり、より多くの藻類が細胞外へ脂質を分泌している可能性がある。*K. flaccidum* が陸上環境に適応しているのは、単に細胞外脂質が存在していることだけではなく、細胞壁にクチクラ様の疎水的な環境を形成することによって、より多量のワックスを蓄えることができるからであろう。

K. flaccidum のクチンポリマーについては、第 2 章の予測とは異なり分析によってその存在は確認できなかった。しかし *K. flaccidum* の細胞壁画分にはタンパク質に結合した多量の脂肪酸によって構成された疎水性領域が存在することが示唆された。*K. flaccidum* においてはこの疎水性領域が陸上植物のクチクラ層やクチクラプロパーに相当し、この層に脂質を蓄えられることが厳しい環境に耐える上で有利なのではないかと考えられる。*C. reinhardtii* も同様の構造を持つことが示唆されたため両種に質的な違いは認められないが、*K. flaccidum* は特に乾燥条件などでこの層が厚く、*C. reinhardtii* よりも多くの脂質を蓄えられることにより、より陸上環境に適応していると考えられる。

陸上植物のように細胞外にのみ配される VLCFA 誘導体ではなく、細胞内にも存在すると考えられる TAG やステロールエステル、フィチルエステルなどが分泌されて形成された細胞外ワックスと、細胞壁の一部に疎水性を付与してクチクラ様構造として利用する *K. flaccidum* の表層構造は、クチクラ層、クチクラプロパー、エピクチクラワックスという 3 層構造のクチクラを持ち、VLCFA 誘導体で形成されるワックスを持つ陸上植物からみると

単純ではあるが、原始的なクチクラ構造にあたると考えられる。

以上から、原始的なクチクラ構造は *K. flaccidum* が分岐する以前から存在していた可能性があるが、クチンに相当する細胞壁疎水性領域が非常に大きいことによって *K. flaccidum* は細胞壁に多量の脂質を蓄えることが可能で、世界中で乾燥など過酷な環境下においても生育が可能となり、現在のように繁栄したのだろうと推測された。

参考文献

Aarts, M. G., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J. and Pereira, A. (1995). Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell.* 12, 2115–2127. doi: 10.1105/tpc.7.12.2115

Bach, L., Faure, J. D. (2010). Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C. R. Biol.* 333, 361–370. doi: 10.1016/j.crvi.2010.01.014.

Barberousse, H., Ruiz, G., Gloaguen, V., Lombardo, R. J., Djediat, C., Mascarell, G. and Castaing, J. C. (2006). Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterisation and adsorption to surfaces. *Biofouling.* 22, 361-370. doi: 10.1080/08927010601035803

Bargel, H., Koch, K., Cerman, Z. and Neinhuis, C. (2006). Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material? *Funct. Plant Biol.* 33, 893-910. doi: 10.1071/FP06139

Barnes, J. D., Percy, K. E., Paul, N. D., Jones, P., Mclaughlin, C. K., Mullineaux, P. M., Creissen, G., and Wellburn, A. R. (1998). The influence of UV–B radiation on the physicochemical nature of Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) leaf surfaces. *J Exp Bot.* 47, 99–109. doi: 10.1093/jxb/47.1.99

Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J. P. and Durst, F. (1998). CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a Cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 688–693. doi: 10.1006/bbrc.1998.8156

Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Jetter, R., Renned, C., Faure, J. D., Haslam, R. P.,, Napier, J. A., Lessire, R., and Joubès, J. (2012). Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell.* 24, 3106–3118. doi: 10. 1105/ tpc. 112. 099796

Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A. C., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J. M., Métraux, J. P., Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea. EMBO J.* 26, 2158–2168. doi: 10.1038/sj.emboj.7601658

Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A. C., Métraux, J, P. and Nawrath, C. (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis. Plant Cell.* 23, 1958–1970. doi: 10. 1105/ tpc. 111. 083121

Bianchi, G., Murelli, C., Vlahov, G. (1992a). Surface waxes from olive fruits. *Phytochmistry.* 31, 3503–3506. doi: 10.1016/0031-9422(92)83716-C

Bianchi, G., Vlahov, G., Anglani, C., Murelli, C. (1992b). Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry.* 23, 49–52. doi: 10.1016/0031-9422(92)80104-M

Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A. and Samuels, L. (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* 52. 485–498. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03252.x

Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099

Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: occurrence of octadeca- *cis*-6, *cis*-9-diene-1,18-dioate as the major component. *Plant J.* 40, 920–930. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02258.x

Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R., and Joubès, J. (2011). Overexpression of Arabidopsis *ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 156, 29–45. doi: 10.1104/pp.111.172320

Bouvier-Navé, P., Berna, A., Noiriel, A., Compagnon, V., Carlsson, A. S., Banas, A., Stymne, S. and Schaller, H. (2010). Involvement of the *Phospholipid sterol acyltransferase1* in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol.* 152, 107–119. doi: 10. 1104/ pp. 109. 145672

Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R. Summons, R. E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science.* 285, 1033–1036. doi: 10.1126/science.285.5430.1033

Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., Wilson, R. H. and McCann, M. C. (2001). Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* 127, 551–565. doi: 10. 1104/ pp. 010146

Chen, G., Greer, M. S., Lager, I., Lindberg Yilmaz, J., Mietkiewska, E., Carlsson, A. S., Stymne, S. and Weselake, R. J. (2012). Identification and characterization of an LCAT−like *Arabidopsis thaliana* gene encoding a novel phospholipase A. *FEBS lett.* 586, 373–377. doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.034

Choe, D. H., Ramírez, S. R. and Tsutsui, N. D. (2012). A silica gel based method for extracting insect surface hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 38, 176–187. doi: 10.1007/s10886-012-0074-1

Dean,A. P., Nicholson, J. M. and Sigee, D. (2008). Impact of phosphorus quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii* : An FTIR microspectroscopy study. *Eur. J. Phycol.* 43, 345–354. doi: 10.1080/09670260801979287

Dobritsa, A. A., Shrestha, J., Morant, M., Pinot, F., Matsuno, M., Swanson, R., Møller, B. L. and Preuss, D. (2009). CYP704B1 is a long-chain fatty acid ω-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 151, 574–589. doi: 10. 1104/ pp. 109. 144469

Duan, H., and Schuler, M. A. (2005). Differential Expression and Evolution of the Arabidopsis CYP86A Subfamily. *Plant Physiol.* 137, 1067-1081. doi: doi/10.1104/pp.104.055715.

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. doi: 10.1093/pcp/pcs082

Ferris, P. J., Woessner, J. P., Waffenschmidt, S., Kilz, S., Drees, J. and Goodenough, U. W. (2001). Glycosylated polyproline II rods with kinks as a structural motif in plant hydroxyproline-rich glycoproteins. *Biochemistry.* 40, 2978–2987. doi: 10.1021/bi0023605

Fisher, D. J., Holloway, P. J. and Richmond, D. V. (1972). Fatty acid and hydrocarbon constituents of the surface and wall lipids of some fungal spores. *Microbiology.* 72, 71–78. doi: 10.1099/00221287-72-1-71

Fisher, D. J., Brown, G. A. and Holloway, P. J. (1978). Influence of growth medium on surface and wall lipid of fungal spores. *Phytochemistry.* 17, 85–89. doi: 10.1016/S0031-9422(00)89685-5

Fry, S. C. (2011). "1. Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking." in *Annual Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering.* eds Ulvskov, P. (Wiley-Blackwell, Oxford, UK.) 41, 1–42. doi: 10.1002/9781444391015.ch1

Goodenough, U. and Heuser, J. E. (1985). The Chlamydomonas cell wall and Its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *J. Cell Biol.* 101, 1550-1568. doi: 10.1083/jcb.101.4.1550

Gould, S. B., Waller, R. F. and McFadden, G. I. (2008). Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 491–517. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915

Gorman, D. S., and Levine, R. P. (1965). Cytochrome F and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54, 1665-1669.

Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R. (2007). The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145, 653–667. doi: 10. 1104/ pp. 107. 107300

Haas, K. (1982). Surface wax of Andreaea and Pogonatum species. *Phytochemistry.* 21, 657–659. doi: 10.1016/0031-9422(82)83159-2

Harlow, R. D., Litchfield, C., Fu, H. C., Reiser, R. (1965). The triglyceride composition of *Myrica carolinensis* fruit coat fat (bayberry tallow). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 747–750. doi: 10.1007/BF02631853

Haslam, T. M., Haslam, R., Thoraval, D., Pascal, S., Delude, C., Domergue, F., Fernández, A. M., Beaudoin, F., Napier, J. A., Kunst, L., and Joubès, J. (2015). ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Physiol.* 167, 682–692. doi: 10.1104/pp.114.253195

Haslam, T. M. and Kunst, L. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci.* 210, 93–107. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.05.008

Herburger, K. and Holzinger, A. (2015). Localization and quantification of callose in the Streptophyte green algae Zygnema and Klebsormidium: Correlation with desiccation tolerance. *Plant Cell Physiol.* 56, 2259–2270. doi: 10.1093/pcp/pcv139

Herburger, K. and Holzinger, A. (2015). Localization and quantification of callose in the Streptophyte green algae Zygnema and Klebsormidium: Correlation with desiccation tolerance. *Plant Cell Physiol.* 56, 2259–2270. doi: 10.1093/pcp/pcv139

Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361, 903–615. doi: 10.1098/rstb.2006.1838

Holzinger, A. and Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2013.00327

Hooker, T. S., Lam, P., Zheng, H., Kunst, L. (2007). A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19, 904–913. doi: 10.1105/tpc.106.049304

Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo,M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, S., Iwai, M., Nobusawa, T., Narise, T., Kondo, S., Saito, H., Sato, R., Murakawa, M., Ihara, Y., Oshima-Yamada, Y., Ohtaka, K., Satoh, M., Sonobe, K., Ishii, M., Ohtani, R., Kanamori-Sato, M., Honoki, R., Miyazaki, D., Mochizuki, H., Umetsu, J., Higashi, K., Shibata, D., Kamiya, Y., Sato, N., Nakamura, Y., Tabata, S., Ida, S., Kurokawa, K., and Ohta, H. (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat. Commun.* 5, 3978. doi, 10.1038/ncomms4978

Ichimura, T. (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum.* In "International Symposium on Seaweed Research, 7th, Sapporo."

Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, A. L. "4. Composition of Plant Cuticular Waxes." in *Annual Plant Reviews.* e.d. Riederer, M. and Müller, C. (John Wiley & Sons, Ltd.) 23, 145-181. doi: 10.1002/9780470988718.ch4

Jia, T., Ito, H., Hu, X. and Tanaka, A. (2015). Accumulation of the NON−YELLOW COLORING 1 protein of the chlorophyll cycle requires chlorophyll *b* in *Arabidopsis thaliana. Plant J.* 81, 586–596. doi: 10.1111/tpj.12753

Jones, J. G. (1969). Studies on lipids of soil micro-organisms with particular reference to hydrocarbons. *Microbiol.* 59, 145–152. doi: 10.1099/00221287-59-2-145

Kandel, S., Sauveplane, V., Compagnon, V., Franke, R., Millet, Y., Schreiber, L., Werck-Reichhart, D. and Pinot, F. (2007). Characterization of a methyl jasmonate and wounding−responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation *in vitro. FEBS J.* 274, 5116–5127. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06032.x

Kaplan, F., Lewis, L. A., Wastian, J., Holzinger, A. (2012). Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma.* 249, 789–804. doi: 10.1007/s00709-011-0324-z

Karsten, U. (2010). Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium Crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an Alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *J. Phycol.* 46, 1187–1197. doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00921.x

Karsten, U., Herburger, K., Holzinger, A. (2015). Living in biological soil crust communities of African deserts — Physiological traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients. *J. Plant Physiol.* doi: 10.1016/j.jplph.2015.09.002

Kaštovská,K., Elster, J., Stibal, M., Šantrůčková, H. (2005). Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microbial. Ecol.* 50, 396–407. doi: 10.1007/s00248-005-0246-4

Kaup, M. T., Froese, C. D., and Thompson, J. E. (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* 129, 1616-1626. doi: 10.1104/pp.003087.

Krolikowski, K. A., Victor, J. L., Wagler, T. N., Lolle, S. J. and Pruitt, R. E. (2003). Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene *HOTHEAD*. *Plant J.* 35, 501–511. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01824.x

Kunst, L., Samuels, A. L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* 42, 51–80. doi: 10.1016/S0163-7827(02)00045-0

Kunst, L., and Samuels, L. (2009). Plant cuticles shine- advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 721–727. doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.009

Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bär, S., Franke, R., Efremova, N., Tietjen, K., Schreiber, L., Saedler, H and Yephremov, A. (2006). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α-,ω-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta.* 224, 315–329. doi: 10.1007/s00425-005-0215-7

Ladygina, N., Dedyukhina, E. G., Vainshtein, M. B. (2006). A review on microbial synthesis of hydrocarbon. *Process Biochem.* 41, 1001–1014. doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.007

Lai, C., Kunst L. and Jetter, R. (2007). Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana cer* mutants. *Plant J.* 50, 189–196. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03054.x

Lam, P., Zhao, L., McFarlane, H. E., Aiga, M., Lam, V., Hooker, T. S., Kunst, L. (2012). RDR1 and SGS3, components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159, 1385–1395. doi: 10.1104/pp.112.199646

Le, S. Q. and Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320. doi: 10.1093/molbev/msn067

Lee, S. B. and Suh, M. C. (2015). Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant Cell Rep.* 34, 557–572. doi: 10.1007/s00299-015-1772-2

Lewis, L. A. and McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91, 1535–1556. doi: 10.3732/ajb.91.10.1535

Lewis, R. W. (1970). Fish cutaneous mucus: a new source of skin surface lipid. *Lipids.* 5, 947–949. doi: 10.1007/BF02531127

Li, F., Wu, X., Lam, P., Bird, D., Zheng, H., Samuels, L., Jetter, R. and Kunst, L. (2008). Identification of the wax ester synhtase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 148, 97–107. doi: 10.1104/pp.108.123471

Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J., Molina, I., Pollard, M., Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 18339–18344. doi: 10.1073/pnas.0706984104

Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J., and Pollard, M. (2007). Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase. *Plant Physiol.* 144, 1267–1277. doi: 10. 1104/ pp. 107. 099432

Li, Y., Beisson, F. (2009). The biosynthesis of cutin and suberin as an alternative source of enzymes for the production of bio-based chemicals and materials. *Biochimie.* 91, 685–691. doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.016

Li, Y. and Qin, J. G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three Botryococcus braunii strains. Journal of Applied Phycology, 17, 551–556. doi: 10.1007/s10811-005-9005-7

Li, X., Bonawitz, N. D., Weng, J. K. and Chapple, C. (2010). The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell.* 22, 1620–1632. doi: 10. 1105/ tpc. 110. 074161

Li-Beisson, Y., Pollard, M., Sauveplane, V., Pinot, F., Ohlrogge, J., Beisson, F. (2009). Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 22008–22013. doi: 10.1073/pnas.0909090106

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K. M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., Ohlrogge, J. (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book.* 11, e0161. doi: 10.1199/tab.0161

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., and De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critic. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46. doi: 10.1080/07352689.2011.615705

Lippold, F., vom Dorp, K., Abraham, M., Hölzl, G., Wewer, V., Yilmaz, J. L., Lager, I., Montandon, C., Besagni, C., Kessler, F., Stymne, S., and Dörmann, P. (2012). Fatty Acid Phytyl Ester Synthesis in Chloroplasts of *Arabidopsis. Plant Cell.* 24, 2001–2014. doi: 10. 1105/ tpc. 112. 095588

McFarlane, H. E., Shin, J. J., Bird, D. A. and Samuels, A. L. (2010). *Arabidopsis* ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell.* 22, 3066–3075. doi: 10. 1105/ tpc. 110. 077974

Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C., Kunst, L. (1999). *CUT1* , an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell.* 11, 825–838. doi: 10.1105/tpc.11.5.825

Molina, I., Bonaventure, G., Ohlrogge, J. Pollard, M. (2006). The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry.* 67, 2597–2610. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.011

Molina, I., Ohlrogge, J. B. and Pollard, M. (2008). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 53, 437–449. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03348.x

Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A. J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J. D., Knox, J. P., Bacic, A., Willats, W. G. (2007). High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J.* 50, 1118–1128. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03114.x

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean? *ProS Biol.* 9, e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127

Müller, C., Riederer, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 31, 2621–2151. doi: 10.1007/s10886-005-7617-7

Nagao, M., Matsui, K., Uemura, M. (2008). *Klebsormidium flaccidum,* a charophycean green alga, exhibits cold acclimation that is closely associated with compatible solute accumulation and ultrastructural changes. *Plant Cell Einviron.* 31, 872–885. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01804.x

Nelson, D. R., Schuler, M. A., Paquette, S. M., Werck-Reichhart, D. and Bak, S. (2004). Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.* 135, 756–772. doi: 10. 1104/ pp. 104. 039826

Niehaus, T. D., Kinison, S., Okada, S., Yeo, Y. S., Bell, S. A., Cui, P., Devarenne, T. P. and Chappell, J. (2012). Functional identification of triterpene methyltransferases from Botryococcus braunii race B. _J. Biol. Chem. 287, 8163–8173. doi: 10.1074/jbc.M111.316059

Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R. B., Hofer, R., Schreiber, L., Chory, J. and Aharoni, A. (2007). The Arabidopsis *DESPERADO/AtWBC11* transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.* 145. 1345–1360. doi: 10. 1104/ pp. 107. 105676

Panikashvili, D., Shi, J. X., Schreiber, L. and Aharoni, A. (2009). The Arabidopsis *DCR* encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiol.* 151, 1773–1789. doi: 10.1104/pp.109.143388

Panikashvili, D., Shi, J. X., Bocobza, S., Franke, R. B., Shreiber, L. and Aharoni, A. (2010). The *Arabidopsis* DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol. Plant.* 3. 563–575.

Panikashvili, D., Shi, J. X., Schreiber, L., Aharoni, A. (2011). The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol.* 190, 113–124. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03608.x

Park, M. O. (2005). New pathway for long-chain n-alkane synthesis via 1-alcohol in Vibrio furnissii M1. *J. Bacteriol*. 187, 1426–1429. doi: 10.1128/JB.187.4.1426-1429.2005

Pascal, S., Bernard, A., Sorel, M., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R., Domergue, F. and Joubès, J. (2013). The *Arabidopsis cer26* mutant, like the *cer2* mutant, is specifically affected in the very long chain fatty acid elongation process. *Plant J.* 73, 733–746. doi:

10.1111/tpj.12060

Pattathil, S., Avci, U., Miller, J. S., Hahn, M. G. (2012). "Immunological Approaches to Plant Cell Wall and Biomass Characterization: Glycome Profiling," in *Biomass Conversion: Methods and Protocols,* eds Himmel, M. E. (Humana Press), 61–72. doi: 10.1007/978-1-61779-956-3_6

Paul, S., Gable, K., Beaudoin, F., Cahoon, E., Jaworski, J., Napier, J. A., and Dunn T. M. (2006). Members of the Arabidopsis FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 281, 9018–9029. doi: 10.1074/jbc.M507723200

Pighin, J. A., Zheng, H., Balakshin, L. J., Goodman, I. P., Western, T. L., Jetter, R., Kunst, L., Samuels, A. L. (2005). Plant cuticular lipid export requires an ABC tranporter. *Science.* 306, 702–704. doi: 10.1126/science.1102331

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y. and Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci*. 13. 236–246. doi: 10.1016/j.tplants.2008.03.003

Popper, Z. A. and Fry, S. C. (2003). Primary cell wall composition of Bryophytes and Charophytes. *Ann. Bot.* 91, 1–12. doi: 10.1093/aob/mcg013

Porter, N. A., Caldwell, S. E., Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 30, 277-290. doi: 10.1007/BF02536034

Rani, S. H., Krishna, T. H. A., Saha, S., Negi, A. S., and Rajasekharan, R. (2010). Defective in cuticular ridges (*DCR*) of *Arabidopsis thaliana* , a Gene ssociated with surface cutin formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 285, 38337-38347. doi: 10.1074/jbc.M110.133116

Riederer, M., Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* 52, 2023–2032. doi: 10.1093/jexbot/52.363.2023

Rindi, F., Guiry, M. D. and López-Bautista, J. M. (2008). Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *J. Phycol.* 44, 1529–1540. doi: 10.1111/j.1529-887.2008.00593.x

Roberts, K. (1972). Crystalline glycoprotein cell walls of algae: their structure, composition and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 268, 129–146. doi: 10.1098/rstb.1974.0021

Rowland, O., Lee, R., Franke, R., Schreiber, L., Kunst, L. (2007). The *CER3* wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to *WAX2/YRE/FLP1. FEBS Lett.* 581, 3538–3544. doi: 10.1016/j.febslet.2007.06.065

Sakuradani, E., Zhao, L., Haslam, T. M., Kunst, L. (2013). The *CER22* gene required for the synthesis of cuticular wax alkanes in *Arabidopsis thaliana* is allelic to *CER1. Planta.* 237, 731–738. doi: 10.1007/s00425-012-1791-y

Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 638–707. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.103006.093219

Sauveplane, V., Kandel, S., Kastner, P. E., Ehlting, J., Compagnon, V., Werck - Reichhart, D. and Pinot, F. (2009). *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants. *FEBS J.* 276, 719–735. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06819.x

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. and Hörtensteiner, S. (2009). Pheophytin pheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis. Plant Cell.* 21, 767–785. doi: 10. 1105/ tpc. 108. 064089

Schnurr, J., Shockey, J., Browse, J. (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by_ LACS2_ is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell.* 16, 629–642. doi: 10.1105/tpc.017608

Schreiber, L., and Schönherr, J. (2009). Water and solut permeability of plant cuticles. (Springer Berlin Heidelberg). doi: 10.1007/978-3-540-68945-4

Serrano, M., Coluccia, F., MarthaTorres, F. L. H. and Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* 6. 274. doi: 10.3389/fpls.2014.00274

Shiho, M., Kawachi, M., Horioka, K., Nishita, Y., Ohashi, K., Kunimitsu, O., Watanabe, M. M. (2012). Business evaluation of a green microalgae Botryococcus braunii oil production system. *Procedia Environ. Sci.* 15, 90–109. doi: 10.1016/j.proenv.2012.05.014

Shimamura, R., Watanabe, S., Sakakura, Y., Shiho, M., Kaya, K., Watanabe, M. M. (2012). Development of *Botryococcus* seed culture system for future mass culture. *Procedia Environ. Sci.* 15, 80–89. doi: doi:10.1016/j.proenv.2012.05.013

Simpson, J. P. and Ohlrogge, J. B. (2016). A Novel pathway for triacylglycerol biosynthesis is responsible for the accumulation of massive quantities of glycerolipids in the surface wax of Bayberry (Myrica pensylvanica) fruit. *Plant Cell.* doi: 10. 1105/ tpc. 15. 00900

Sitte, P. and Rennier, R. (1963). Untersuchungen an cuticularen Zellwandschichten. *Planta.* 60, 19–40. doi: 10.1007/BF01911229

Smith, K. R. and Thiboutot, D. M. (2008). Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* 49, 271–281. doi: 10.1194/jlr.R700015-JLR200

Sørensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., Fei, Z., Rose, J. K., Domozych, D. S., Willats, W. G. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant J.* 68, 201–211. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04686.x

Steinmüller, D. and Tevini, M. (1985). Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta.* 164, 557–564. doi: 10.1007/BF00395975

Suzuki, R., Ito, N., Uno, Y., Nishii, I., Kagiwada, S., Okada, S. and Noguchi, T. (2013). Transformation of lipid bodies related to hydrocarbon accumulation in a green alga, Botryococcus braunii (Race B). *PloS one.* 8, e81626. doi: 10.1371/journal.pone.0081626

Szymanska-Chargot, M., and Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food biophysics.* 8, 29-42. doi: 10.1007/s11483-012-9279-7

Talavera, G. and Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Sys. Biol.* 56, 564–577. doi: 10.1080/10635150701472164

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

Tanabe, Y., Okazaki, Y., Yoshida, M., Matsuura, H., Kai, A., Shiratori, T., Ishida, K., Nakano, S. and Watanabe, M. M. (2015). A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii. Sci. Rep.* 5, 10467. doi: 10.1038/srep10467

Tilton, G. B., Shockey, J. M. and Browse, J. (2004). Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from *Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem.* 279, 7487–7494. doi: 10.1074/jbc.M309532200

Timme, R. E., Bachvaroff, T. R., Delwiche, C. F. (2012). Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. *PLos One.* 7, e29696. doi: 10.1371/journal.pone.0029696

Traverse, A. (1955). Occurrence of the oil-forming alga Botryococcus in lignites and other tertiary sediments. *Micropalenontology.* 1, 343–349. doi: 10.2307/1484478

Turkish, A. R., Henneberry, A. L., Cromley, D., Padamsee, M., Oelkers, P., Bazzi, H.,Christiano, A. M., Billheimer, J. T. and Sturley, S. L. (2005). Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases. Members of the DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 2 (DGAT2) gene superfamily. *J. Biol. Chem.* 280, 14755–14764. doi: 10.1074/jbc.M500025200

Vishwanath, S. J., Kosma, D. K., Pulsifer, I. P., Scandola, S., Pascal, S., Joubès, J., Dittrich-Domergue, F., Lessire, R., Rowland, O., Domergue, F. (2013). Suberin-associated fatty alcohols in Arabidopsis: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. *Plant Physiol.* 163, 1118–1132. doi: 10. 1104/ pp. 113. 224410

Weiss, T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T. P., and Goodenough, U. (2012). Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (race B) is specified by a complex extracellular matrix. *Eukaryotic Cell.* 11, 1424–1440. doi: 10.1128/EC.00184-12

Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H. and Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω-hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 9694–9699. doi: 10.1073/pnas.171285998

Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M. S., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Ruhfel, B. R., Wafula, E., Der, J. P., Graham, S. W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Miles, N. W., Rothfels, C. J., Pokorny, L., Shaw, A. J., DeGironimo, L. Stevenson, D. W., Surek, B., Villarreal, J. C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C. W., Chen, T., Deyholos, M. K., Baucom, R. S., Kutchan, T. M., Augustin, M. M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G. K., Leebens-Mack, J. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, E4859–E4868. doi: 10.1073/pnas.1323926111

Wisnieski, B. J., Williams, R. E., and Fox, C. F. (1973). Manipulation of fatty acid composition in animal cells grown in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 3669-3673. doi: -

Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I. Q., Rothstein, S. J. and Reed, J. W. (2014). ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis. Plant Cell.* 26, 3569–3588. doi: 10.1105/tpc.114.129049

Yamashiro, H., Oku, H., Onaga, K., Iwasaki, H., Takara, K. (2001). Coral tumors store reduced level of lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 265, 171–179. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00333-1

Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with *sn*-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107. 12040–12045. doi: 10.1073/pnas.0914149107

Yeats, T. H., Martin, L. B., Viart, H. M., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A. J., Buda, G. J., Domozych, D. S., Clausen, M. H., Rose, J. K. (2012). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat. Chem. Biol.* 8, 609–611. doi: 10.1038/nchembio.960

Yeats, T. H., Huang, W., Chatterjee, S., Viart, H. M. F., Clausen, M. H., Stark, R. E. and Rose, J. K. C. (2014). Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *Plant J.* 77, 667–675. doi: 10.1111/tpj.12422

Yeats, T. H. and Rose, J. K. C. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 163, 5–20. doi: 10.1104/pp.113.222737

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., and Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 809–818. doi: 10.1093/molbev/msh075

Yoshimura, T., Okada, S. and Honda, M. (2013). Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO 2, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Biores. Technol.* 133, 232–239. doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.095

坂山. (2010). 植物の上陸作戦＝シャジクモの辿った道. *植物科学の最前線.* 1, 30–35.

福澤秀哉、久保雄昭、山野隆志. (2008). 緑藻クラミドモナスのゲノムから植物と動物の機能を探る. *蛋白質核酸酵素.* 53, 1133–1143.

堀孝一、太田啓之. (2016). 車軸藻クレブソルミディウムのゲノムから見た植物の陸上化. *植物科学の最前線.* 7B, 55–65.

謝辞

本研究は著者が東京工業大学大学院生命理工学研究科博士課程在学中に、同大学生命理工学院教授　太田啓之博士指導のもとに行ったものです。常に暖かい激励とご指導、ご鞭撻をいただいた太田啓之博士に心より感謝申し上げます。太田教授には突飛なお願いだったにもかかわらず快く私の入学希望を承諾いただいた時が本研究の端緒でした。入学を許していただけなければ本研究ができなかったであろうと思うと、感謝してもしきれません。日本大学短期大学部食物栄養学科教授　太田尚子博士と同　加藤つばさ博士にはATR-FTIR 分析を実施いただき、脂質分析だけでは推定できなかった現象について手がかりを得ることができました。心より感謝申し上げます。静岡大学理学部准教授　粟井光一郎博士には著者を太田啓之博士にご紹介いただいき、研究を進めるきっかけを与えていただいたことについて、厚く御礼申し上げます。考究や実験において、東京工業大学生命理工学研究院准教授　下嶋美恵博士からは脂質分析全般について、同准教授　増田真二博士からは FTIR 分析について、貴重なご指導とご助言をいただきましたことを心より感謝申し上げます。ゲノム解析や論文執筆作法について多大なるご指導とご助言をいただきました同助教　堀孝一博士に心より感謝申し上げます。東京工業大学　地球生命研究所研究員小林厚子博士には美しい SEM 画像を撮影いただき、厚く感謝申し上げます。GC-MS 分析においてご指導とご助言をいただき、分析を支援いただいた同研究員　佐々木結子博士に心より感謝申し上げます。

2015 年 4 月以降の太田・下嶋研究室、および 2015 年 3 月までの太田・増田研究室に所属された皆様には実験遂行において、サンプルの供与や検体の準備、実験法の教授等、多大なサポートをいただきましたことを深く感謝申し上げます。太田・下嶋研究室事務員の細野晶子さん、東京工業大学生体システム専攻事務の皆様、同すずかけ台放射線実験施設事務の皆様には実験遂行や手続き等におきまして厚くご支援いただきましたことを深く感謝

申し上げます。

最後に、著者の両親・兄弟や友人らの手助けがなければ研究を挫折していたかもしれません。思いやりあふれるご支援に厚く御礼申し上げます。