

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

## 論 文 要 旨 (和文2000字程度)

報告番号	乙 第 号	氏 名	近藤 智
<p>(要 旨)</p> <p>現存する陸上植物は、車軸藻植物門の祖先から分岐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陸上環境に適応した藻類の一種であり、穏やかな環境から厳しい環境ストレス条件下まで世界中に生息している。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表層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 <i>Klebsormidium flaccidum</i> 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 <i>K. flaccidum</i> 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酵素群と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が、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デヒドまでは合成できる可能性があるがそれ以降のアルカン、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<math>\omega</math>-ヒドロキシ脂肪酸と<math>\omega</math>-オキシ脂肪酸は合成できる可能性があるものの、ポリヒドロキシ脂肪酸や<math>\alpha,\omega</math>-ジカルボン酸は合成できないと推測された。よって <i>K. flaccidum</i> にクチクラ構造は存在しないか、あるいは存在したとしても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 <i>K. flaccidum</i> 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、<i>Arabidopsis thaliana</i> 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 <i>K. flaccidum</i> の表層脂質量は <i>A. thaliana</i> の約2倍と多かった。しかし、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を排除できない可能性が考えられた。そこでニトロセルロース膜上で培養した <i>K. flaccidum</i> の表層脂質をシリカゲルTLCプレートに直接転写し、脂質を抽出する方法を考案し、表層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1%に満たなかった。<i>K. flaccidum</i> にクチクラに相当する構造があるかどうかを探るため、<i>A. thaliana</i> のクチンポリマー抽出法に準じ脱脂した <i>K. flaccidum</i> の細胞壁面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、<i>K. flaccidum</i> の細胞壁面分に脂肪酸が多量に結合して</p>			

いることがわかった。一方*A. thaliana*の場合と異なり、(ポリ)ヒドロキシ脂肪酸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、*C. reinhardtii*と同様な細胞壁を構成するタンパク質とアミド結合により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報告されているため、*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ステロールエステルやフィチルエステル、TAG、アルカン、遊離ステロールなどの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*は細胞壁の一部をクチクラ層のような疎水性環境とし、そこに細胞内にも存在する脂質を蓄積してワックス層を形成するという、陸上植物とは異なる原始的なクチクラ構造を持つことが想定され、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。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

## 論 文 要 旨 ( 英 文 )

(300語程

度)

(Summary)

報告番号	乙 第 号	氏 名	近藤 智
<p>( 要 旨 )</p> <p><i>Klebsormidium flaccidum</i> is a charophytic alga living in terrestrial and semiaquatic environments. <i>K. flaccidum</i> grows in various habitats, such as low-temperature areas and under desiccated conditions, because of its ability to tolerate harsh environments. Wax and cuticle polymers that contribute to the cuticle layer of plants are important for the survival of land plants, as they protect against those harsh environmental conditions and were probably critical for the transition from aquatic microorganism to land plants. Bryophytes, non-vascular land plants, have similar, but simpler, extracellular waxes and polyester backbones than those of vascular plants. The presence of waxes in terrestrial algae, especially in charophytes, which are the closest algae to land plants, could provide clues in elucidating the mechanism of land colonization by plants. Here, we compared genes involved in the lipid biosynthetic pathways of <i>Arabidopsis thaliana</i> to the <i>K. flaccidum</i> and the <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> genomes, and identified wax-related genes in both algae. A simple and easy extraction method was developed for the recovery of the surface lipids from <i>K. flaccidum</i> and <i>C. reinhardtii</i>. Although these algae have wax components, their surface lipids were largely different from those of land plants. We also investigated aliphatic substances in the cell wall fraction of <i>K. flaccidum</i> and <i>C. reinhardtii</i>. Many of the fatty acids were determined to be lipophilic monomers in <i>K. flaccidum</i>, and a Fourier transform infrared spectroscopic analysis indicated that they connected to proteins via amide linkage. <i>K. flaccidum</i> might have polysaccharide layers in its cell wall since similar structure was reported in <i>K. nitens</i> by using calcoflour white staining. Given that cell wall was not digested by driselase or cellulase in previous study, a glycoprotein framework with acyl side chains seemed to be laid on the polysaccharide layers in <i>K. flaccidum</i>. Thus, we propose that <i>K. flaccidum</i> has a cuticle-like hydrophobic layer composed of lipids and glycoproteins, with a different composition from the cutin polymer typically found in land plant cuticles.</p>			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).