慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	緑藻類Chlamydomonas reinhardtiiの貯蔵脂質に対する光量と酢酸の影響
Sub Title	
Author	新川, はるか(Shinkawa, Haruka)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.61- 70
JaLC DOI	
Abstract	緑藻のモデル生物であるChlamydomonas reinhardtiiは栄養欠乏, 光量の変化などに応答して脂質組成を変化することが知られている。この藻類は一般的に酢酸を含む培地で培養され, 酢酸を炭素源の一つとして脂質を合成する。そのため培地中に酢酸を添加しない光合成独立栄養条件下における脂質代謝に関して未解明な部分が多い。本研究では液体クロマトグラフィー: 飛行時間型質量分析計を用いて脂質を分子種ごとに定量し, 液体クロマトグラフィー: タンデム質量分析計を用いて脂肪酸鎖組成を解析し, 酢酸栄養の有無, 窒素栄養充足条件(光量160μmol/m2/s)と窒素栄養欠乏条件(光量0, 15, 30, 60, 160μmol/m2/s)に応じたC. reinhardtiiの脂質組成の変化を調査した。その結果窒素栄養欠乏条件下において酢酸の有無と光量によってそれぞれ脂質組成が変化した。トリアシルグリセロールの合成に関しては培地中の酢酸の有無と光量の変化に応答して新規合成の経路と葉緑体膜脂質を再利用する経路を使い分けていることが示唆され, 膜脂質に関してはエネルギー生産方法の違いに対して膜脂質の組成を変化させることで応答することが示された。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0061

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

緑藻類 *Chlamydomonas reinhardtii*の貯蔵脂質に対する光量と酢酸の影響

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科
新川 はるか

論文要旨

緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* は栄養欠乏，光量の変化などに応答して脂質組成を変化することが知られている．この藻類は一般的に酢酸を含む培地で培養され，酢酸を炭素源の一つとして脂質を合成する．そのため培地中に酢酸を添加しない光合成独立栄養条件下における脂質代謝に関して未解明な部分が多い． 本研究では液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析計を用いて脂質を分子種ごとに定量し，液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析計を用いて脂肪酸鎖組成を解析し，酢酸栄養の有無，窒素栄養充足条件（光量160 μmol/m^2/s）と窒素栄養欠乏条件（光量 0，15，30，60，160 μmol/m^2/s）に応じた *C. reinhardtii* の脂質組成の変化を調査した．その結果窒素栄養欠乏条件下において酢酸の有無と光量によってそれぞれ脂質組成が変化した．トリアシルグリセロールの合成に関しては培地中の酢酸の有無と光量の変化に応答して新規合成の経路と葉緑体膜脂質を再利用する経路を使い分けていることが示唆され，膜脂質に関してはエネルギー生産方法の違いに対して膜脂質の組成を変化させることで応答することが示された．

キーワード
1 *Chlamydomonas reinhardtii*，2 脂質，3 光量，4 有機栄養，5 液体クロマトグラフィー－質量分析計

序論

単細胞性の *Chlamydomonas reinhardtii* は緑藻のモデル生物として知られており，光合成機構，脂質代謝，ストレス応答などの研究において利用されている（Harris, 2009）．この緑藻は窒素栄養欠乏条件下において油滴状にトリアシルグリセロール（TAG）を蓄積する（Weers and Gulati, 1997）．近年藻類が蓄積する TAG が有望なバイオ燃料源として注目されていることから（Chisti, 2007；Hu *et al.*, 2008），この藻類を TAG 代謝研究のモデル生物として用いる研究が盛んに行われている（Fan *et al.*, 2011；Merchant *et al.*, 2011；Siaut *et al.*, 2011）．

この藻類は栄養欠乏，強光条件において TAG を蓄積することが知られている（Picaud *et al.*, 1991；Weers and Gulati, 1997）．しかし，窒素栄養条件下でも暗条件においては TAG を蓄積しないことが知られている（Fan *et al.*, 2012）．この藻類が環境ストレスに応答して TAG を蓄積する生理学的意義はまだ解明されていないが，一説には窒素栄養欠乏に伴い炭酸固定経路の抑制が起こり，その結果光化学反応系で生じた余剰な電子を消費するために TAG を合成するといわれている（Hu *et al.*, 2008）．このことから光刺激は TAG 蓄積に影響を与える重要な因子であると考えられる．また，*C. reinhardtii* は窒素栄養欠乏条件下において異なる光量条件下でも TAG 蓄積量が変化しないことは知られているが（Fan *et al.*, 2012），光量の変化が TAG 組成に与える影響は明らかになっていない．

光は膜脂質の組成にも大きな影響を与え，多くの藻類で光量の増加に伴って 葉緑体膜脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）が減少することが知られている（Hu *et. al.*, 2008）．一方，*C. reinhardtii* においては明条件下における脂質クラスごとのアシル基の組成が報告されているものの，暗条件との比較は行われていない（Eichenberger, 1976）．これまで *C. reinhardtii* において TAG と膜脂質の光量の変化に対する組成変化を網羅的に解析した研究は報告されていない．

脂質代謝に影響を与えるその他の重要な因子としては，培地中の有機物があげられる．*Chlamydomonas reinhardtii* は光合成独立栄養条件よりも培地中に酢酸を添加した混合栄養条件下において増殖が速いことから，実験室においては酢酸を多量に含むトリス–酢酸–リン酸（TAP）培地で培養されることが多い（Harris, 2009）．そのため，*C. reinhardtii* の脂質合成に関する報告のほとんどは混合栄養条件下での培養に基づいている（Fan *et al.*, 2011；Siaut *et al.*, 2011）．混合栄養条件下においては酢酸を炭素源の一つとして膜脂質や TAG を合成することが知られている（Miller *et al.*, 2011；Li *et al.*, 2012）．このためこの藻類での光合成独立栄養条件下における脂質代謝の研究報告はきわめて少なく，El-Sheekh（1993）では光合成独立栄養条件と従属栄養条件における脂質組成を比較し，暗条件の方が脂肪酸の不飽和度が低いと報告している．しかし，この研究では脂質クラスごとの定量は行われておらず，混合栄養条件と光合成独立栄養条件間で膜脂質の組成が同じなのか未解明である．一方 TAG 合成のアシル基の組成は光合成独立栄養条件下と混合栄養条件下とであまり変わらないものの（Msanne *et al.*, 2012），TAG の蓄積量では光合成独立栄養条件下の方がより少ないことが知られている（Fan *et al.*, 2011）．しかし，光合成独立栄養条件下における光量の変化が TAG 蓄積，組成に与える影響の詳細はほとんど調査されていない．

光合成生物である藻類にとって脂質代謝はエネルギー貯蔵の役割のみならず，光ストレスへの応答，光合成装置である葉緑体の機能維持など様々な生理学的役割を担っている．その脂質代謝に大きな影響を与える光量と酢酸の変化が膜脂質，貯蔵脂質の組成に与える影響を調査することは，藻類の環境応答における脂質代謝の機能解明に貢献すると期待される．特に，液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析計（LC-TOFMS）による脂質分子種ごとの定量により，脂質クラスごとのより詳細な代謝経路レベルでの議論が可能となる．

本研究では LC-TOFMS を用いて脂質を分子種ごとに定量し，液体クロマトグラフィーータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて脂肪酸鎖組成を解析し，酢酸栄養の有無，窒素栄養充足条件（光量160 μmol/m²/s）と窒素栄養欠乏条件（光量 0, 15, 30, 60, 160 μmol/m²/s）に応じた *C. reinhardtii* の脂質組成の変化を調査した．

対象と手法

培養株と培養条件，細胞の回収

Chlamydomonas reinhardtii, UTEX 90 株は TAP 培地と（Gorman and Levine, 1965）及び TAP 培地から酢酸を除いたトリス–リン酸（TP）培地それぞれ 100 mL 中で，25°C，明暗周期 14:10 時間，白色蛍光灯の光量 160 μmol/m²/s 下で振とうしながら（75 rpm）培養した．窒素栄養欠乏への誘導は以下の通りである．それぞれの培地で 3 日間培養した 約 5×10^7 細胞（対数増殖期後期）を 3310 *g* で 3 分間遠心して回収し，細胞のペレットをそれぞれの培地から窒素栄養（NH_4Cl）を除いた培地（TAP–N と TP–N）で一回リンスした．再度 3310 *g* で 3 分間遠心し，濃縮液を TAP–N と TP–N それぞれ 100 mL に懸濁し，異なる光量条件下（0, 15, 30, 60, 160 μmol/m²/s）で 3 日間培養した．細胞密度と体積は粒子計測器CDA-1000（Sysmex, Japan）を用いて測定した．これらの培養液を 3310 *g* で 3 分間遠心し，1 mL の超純水で一回リンスした．再度5000 *g* で 1 分間遠心して上清を捨て，そのペレットを 540 μL のメタノールに懸濁し，懸濁液を –80°C で保存した．

脂質の抽出

脂質の抽出法は Bligh and Dyer (1959) を一部改変した．細胞のメタノール懸濁液を直径 0.5 mm ジルコニアビーズ約 2 g と共に Micro Smash MS-100R（Tomy Seiko, Japan）を用いて 4000 rpm で 90 秒間破砕し，これを2 反復した後，破砕液 40 μL を DNA 抽出用に取り分けた．残り 500 μL の破砕液に対して，10 μM の1,2-dihexanoyl(d22)-*sn*-glycero-3-phosphocholine（Avanti Polar Lipids, USA）と 1,2-dimyristoyl(d54)-sn-glycero-3-phosphocholine（Avanti Polar Lipids, USA）を内部標準として含むクロロホルム 500 μL を混合し，各サンプルに 450 μL の超純水を添加してよく懸濁した．この混合液を2000 *g* で 15 分間遠心し，有機層 100 μLをガラスバイアルに取り分け測定まで –80°C で保存した．脂質分子種それぞれの定量分析には LC-TOFMS を用いて，各サンプルを窒素ガスで風乾し，クロロホルムで再懸濁し濃縮したものを使用した．脂質分子種それぞれの定性分析には LC-MS/MS を使用し，各サンプルから 5 μL ずつとり 1 本のガラスバイアルに混合したものを測定に使用した．脂質定量の標品として，10 μM の Tripalmitin, Tripalmitolein, Glyceryl-1,3-Palmitate-2-Oleate（Larodan Fine Chemicals, Sweden），MGDG 36:0（Matreya, USA），ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）36:0（Matreya, USA），1, 2-Dilinoleoyl-sn-Glycero-3-Phosphaethanolamine（Avanti Polar Lipids, USA），L-a-Phosphatidyl -DL-glycerol, 16:0-18:1（Avanti Polar Lipids, USA）と，1 μM のPalmitic Acid, (9Z)-hexadecenoic acid, Octadecanoic acid, 9E-octadecenoic acid, 9Z,11E-octadecadienoic acid, 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid, Eicosanoic acid, 11Z,14Z-eicosadienoic acid（Larodan Fine Chemicals, Sweden），クロロフィル *a*, *b*，アンスラキサンチンとビオラキサンチン（Larodan Fine Chemicals, Sweden）を含むクロロホルム溶液を作成し，サンプルと共に測定した．

DNA 定量

代謝物質量補正のための DNA 定量には細胞破砕液 40 μL を用いた．一度溶媒を風乾させた後，200 μL の超純水に再溶解し，トリス-EDTA 飽和フェノール 200 μL（Nacalai tesque, Japan）を混合した．混合液を 20,000 *g* で 5 分間遠心し，とりわけた．水層を同量のクロロホルムと混合し，再度遠心した．そして，水層をとりわけ QuantiT dsDNA HS assay kit と Qubit fluorometer（Life Technologies, USA）を用いて DNA を定量した．

液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析計

測定条件

LC-TOFMS による脂質分析は陰イオンモードにおける測定に使用したカラムをAscentis Express C8 column (粒子径 2.7 μm；内径 2.1 ×150 mm；Sigma-Aldrich, USA) に変更した部分以外はIto *et al.* (2012) に従った．

データ処理と解析

ピークの抽出とアライメントには Master Hands software（Sugimoto *et al.*, 2010）を用いた．いくつかの分子種に関しては標品によって同定し（表 1），それ以外の物質は理論質量電荷比と，LC-MS/MS によって同定した物質の保持時間の推移を参考にして同定した．ヒートマップの作成には MeV（Eisen, *et al.*, 1998）を使用した．

液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析計

測定条件

LC-MS/MS 分析にはquadrupole/time of flight micro 5600 system（AB Sciex, USA）と ACQUITY UPLC system（Waters Corporation, USA）を使用した．サンプルの分画にはAcquity UPLC HSS T3 separation カラム（粒子径 1.8 μm；内径2.1 × 50 mm；Waters, USA）を用い，カラムの温度は 45°C とした．移動相，濃度勾配は陽，陰イオンモード共に共通で，移動相はアセトニトリル/メタノール/水：2/2/6（5 mM ギ酸アンモニウム：A液），5 mM ギ酸アンモニウム–イソプロパノール溶液（B液）である．濃度勾配は移動相の混合液の割合 A/B=90/10 で開始してそのまま 7.5 分間流し，そして濃度勾配を 25 分間でA/B=70/30 まで徐々に変化させ，さらに 17.5 分間でA/B=40/60 まで変化させた．移動相の流量は 0.3 mL / 分で，サンプルの注入量は 1 μL とした．サンプルは陽イオン及び陰イオンモードで測定した．陽イオンモードでのTOF-MSの条件は以下の通りである．イオンスプレー電圧 ，5.5 kV；ディクラスタリングポテンシャル，80V；コリジョンエナジー，10 V；ターボスプレー温度，500°C；ネブライザーガス，40 psi；ヒートガス， heater gas，80 psi；カーテンガス，30 psi；スキャンレンジ，*m/z*,100–1250．TOF-MS/MS の条件は コリジョンエナジー，45 V 以外は同じである．陰イオンモードでのTOF-MSの条件は以下の通りである．イオンスプレー電圧，–4.5 kV；ディクラスタリングポテンシャル，–80V；コリジョンエナジー，–10 V；ターボスプレー温度，500°C； ネブライザーガス，50 psi；ヒートガス，50 psi；カーテンガス，30 psi；スキャンレンジ，*m/z*,90–1000．TOF-MS/MS の条件はCE，–45 V 以外は同じである．

データ処理と解析

MS/MS スペクトルの解析にはPeakview（AB Sciex, USA）を用いた．分子種を同定するために，MGDG及びDGDG は親ピークとの差分がそれぞれ*m/z* 197, *m/z* 359 のピーク（頭基が外れた分の差）が検出されたものを選択し，フォスファチジルエタノールアミン，フォスファチジルグリセロールとジアシルグリセリルトリメチルホモセリンはそれぞれの頭基の*m/z* 196, *m/z* 153, *m/z* 236 が検出されるものを選択した．TAG はプリカーサーイオンとしてジアシルグリセロールと脂肪酸が同定されたものを選択した．

結果

酢酸栄養の有無，窒素栄養充足条件（光量160 μmol/m²/s）と窒素栄養欠乏条件（光量 0, 15, 30, 60, 160 μmol/m²/s）での計 12 条件において 79 物質が検出された（表1；図 1）．これらの物質の変化を階層的クラスタリングによって確認したところ， 8 クラスターに大別された（図 1）．TAG 分子種の大部分（29/37）はクラスター B に分かれ，混合栄養，光合成独立栄養条件共に窒素栄養充足条件，光量0 μmol/m²/s ではほとんど蓄積しておらず，混合栄養条件下においては光量の増加に伴って蓄積量が増加する傾向が見られ，光量 160 μmol/m²/s で最も蓄積していた．一方光合成独立栄養条件下においては光量 60, 160 μmol/m²/s で蓄積しており，その他の条件ではあまり蓄積していなかった．（図 1）．しかし，クラスター C に分類されたTAG 48:6 と TAG 50:9 は光合成独立栄養条件下の光量 15 μmol/m²/s においてもっとも蓄積しており，混合栄養条件での窒素栄養欠乏条件の光量 15, 160 μmol/m²/s で蓄積していたものの，それ以外の条件ではほとんど蓄積していなかった（図 1）．この 2 つの TAG 分子種は共にアシル基に 16:4 や 18:3 という非常に不飽和度の高いアシル基を持っていた（表 1）．クラスター E に分類された TAG 48:0, 50:1, 50:3, 52:1, 54:1 は混合栄養条件下においては光量 15 μmol/m²/s で最も多く，光合成独立栄養条件下では光量 60 μmol/m²/s で蓄積していた．これらの TAG 分子種は TAG 50:3 以外の TAG 分子種のアシル基は 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 20:0, 20:1 など飽和脂肪酸，モノ不飽和脂肪酸で構成されていた（表 1）．

葉緑体膜脂質，細胞膜脂質は 5 クラスターに分かれたものの，多くの膜脂質は（19/28）混合栄養条件下においては窒素栄養欠乏に伴って減少し，光合成独立栄養条件下においては窒素栄養欠乏条件の光量 15 μmol/m²/s で最も増加した（図 1）．

表 1 液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析計（LC-TOFMS）で同定された物質一覧．質量電荷比（*m/z*）と保持時間（RT）はLC-TOFMS で測定し検出されたもの．グリセロ脂質に関しては液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析計（LC-MS/MS）で同定されたアシル基を表記．モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG），ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG），フォスファチジルグリセロール（PG），ホスホファチジルエタノールアミン（PE），ジアシルグリセリルトリメチルホモセリン（DGTS），脂肪酸（FA），アンスラキサンチン（Ant），クロロフィル（Chl），ビオラキサンチン（Vio）．

No	Compounds	*m/z*	RT	MS/MS fragments
1	TAG48:0[a]	824.77	38.66	16:0
2	TAG48:1	822.76	38.23	14:0, 16:0, 16:1, 18:1
3	TAG48:2	820.74	37.70	16:0, 16:1, 18:1, 18:2
4	TAG48:3[a]	818.72	37.13	14:0, 16:0, 18:3
5	TAG48:4	816.71	36.72	14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
6	TAG48:6	812.68	35.84	14:0, 16:3, 16:4, 18:2, 18:3
7	TAG50:0	852.80	39.38	16:0, 18:0
8	TAG50:1[a]	850.79	38.96	16:0, 18:1

9	TAG50:2	848.77	38.48	16:0, 16:1, 18:1, 18:2
10	TAG50:3	846.76	37.95	14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 18:1, 18:2, 18:3
11	TAG50:3	846.76	38.11	16:0, 16:1, 16:2, 18:1, 18:2, 18:3
12	TAG50:4	844.74	37.58	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
13	TAG50:5	842.73	37.00	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
14	TAG50:5	842.73	37.38	16:0, 16:4, 18:1
15	TAG50:6	840.71	36.79	16:0, 16:4, 18:2
16	TAG50:7	838.69	36.15	16:0, 16:4, 18:3
17	TAG50:8	836.68	35.62	16:1, 16:3, 16:4, 18:1, 18:3
18	TAG50:9	834.66	34.89	16:2, 16:3, 16:4, 18:1, 18:2, 18:3
19	TAG52:1	878.82	39.65	16:0, 18:0, 18:1, 20:1
20	TAG52:3	874.79	38.76	16:0, 18:0, 18:3
21	TAG52:4	872.77	38.33	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3
22	TAG52:5	870.76	37.73	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
23	TAG52:6	868.74	37.40	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4
24	TAG52:7	866.73	36.78	16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4
25	TAG52:8	864.71	36.11	16:4, 18:1, 18:2, 18:3
26	TAG52:8	864.71	36.49	16:2, 16:3, 18:2, 18:3, 18:4
27	TAG52:9	862.69	35.45	16:4, 18:2, 18:3
28	TAG52:9	862.69	35.87	16:3, 16:4, 18:2, 18:3, 18:4
29	TAG54:1	906.85	40.29	16:0, 18:0, 18:1, 20:0, 20:1
30	TAG54:2	904.84	39.89	16:0, 18:1, 20:1
31	TAG54:3	902.82	39.46	16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:1, 20:2
32	TAG54:4	900.81	39.00	16:3, 18:0, 18:1, 18:3, 20:0
33	TAG54:4	900.80	39.25	16:0, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:1, 20:3
34	TAG54:5	898.79	38.53	18:1, 18:2, 18:3
35	TAG54:6	896.77	38.28	18:0, 18:1, 18:2, 18:3
36	TAG54:8	892.74	37.17	18:2, 18:3, 18:4
37	TAG54:9	890.73	36.56	18:2, 18:3, 18:4
38	MGDG34:3	775.54	24.90	16:0, 16:1, 16:2, 18:1, 18:2, 18:3
39	MGDG34:4	773.52	23.87	16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
40	MGDG34:5	771.50	22.80	16:2, 16:3, 18:2, 18:3
41	MGDG34:6	769.49	21.67	16:3, 18:3
42	MGDG34:7	767.47	21.17	16:4, 18:3
43	DGDG34:1	941.62	24.81	16:0, 18:1
44	DGDG34:2	939.60	23.76	16:0, 16:1, 18:1, 18:2
45	DGDG34:3	937.59	22.72	16:0, 18:2, 18:3
46	DGTS32:1	710.60	24.74	16:0, 16:1
47	DGTS32:2	708.58	23.67	16:0, 16:2
48	DGTS32:4	704.55	22.27	16:0, 16:4
49	DGTS34:1	738.63	26.29	16:0, 18:1
50	DGTS34:2	736.61	25.28	16:0, 18:2
51	DGTS34:3	734.60	24.72	16:0, 18:2
52	DGTS34:4	732.58	23.68	16:0, 18:4
53	DGTS36:3	762.63	25.85	18:1, 18:2
54	DGTS36:3	762.63	26.53	18:0, 18:3
55	DGTS36:4	760.62	24.86	18:1, 18:2, 18:3
56	DGTS36:4	760.61	25.26	18:1, 18:3
57	DGTS36:5	758.60	23.81	18:2, 18:3
58	DGTS36:6	756.58	23.15	18:3
59	PE36:3	740.52	28.18	18:0, 18:3

60	PE36:4[a]	738.51	27.01	18:0, 18:1, 18:3, 18:4
61	PE36:5	736.49	26.07	18:2, 18:3
62	PG32:0	721.50	28.67	16:0
63	PG34:1[a]	747.52	28.95	16:0, 18:1
64	PG34:3	743.49	27.70	16:1, 18:2
65	PG34:4	741.47	26.80	16:1, 18:3
66	FA16:0[a]	255.24	19.22	
67	FA16:1[a]	253.22	17.40	
68	FA18:0[a]	283.27	21.90	
69	FA18:1[a]	281.25	20.18	
70	FA18:2[a]	279.23	19.05	
71	FA18:3[a]	277.22	17.47	
72	FA18:4[a]	275.20	15.80	
73	FA20:0[a]	311.30	24.38	
74	FA22:0[a]	339.33	26.63	
75	FA22:1[a]	337.31	24.82	
76	Ant[a]	585.43	16.36	
77	Chl *a*[a]	893.54	29.47	
78	Chl *b*[a]	907.52	25.48	
79	Vio[a]	601.43	14.09	

[a]標品で同定した物質.

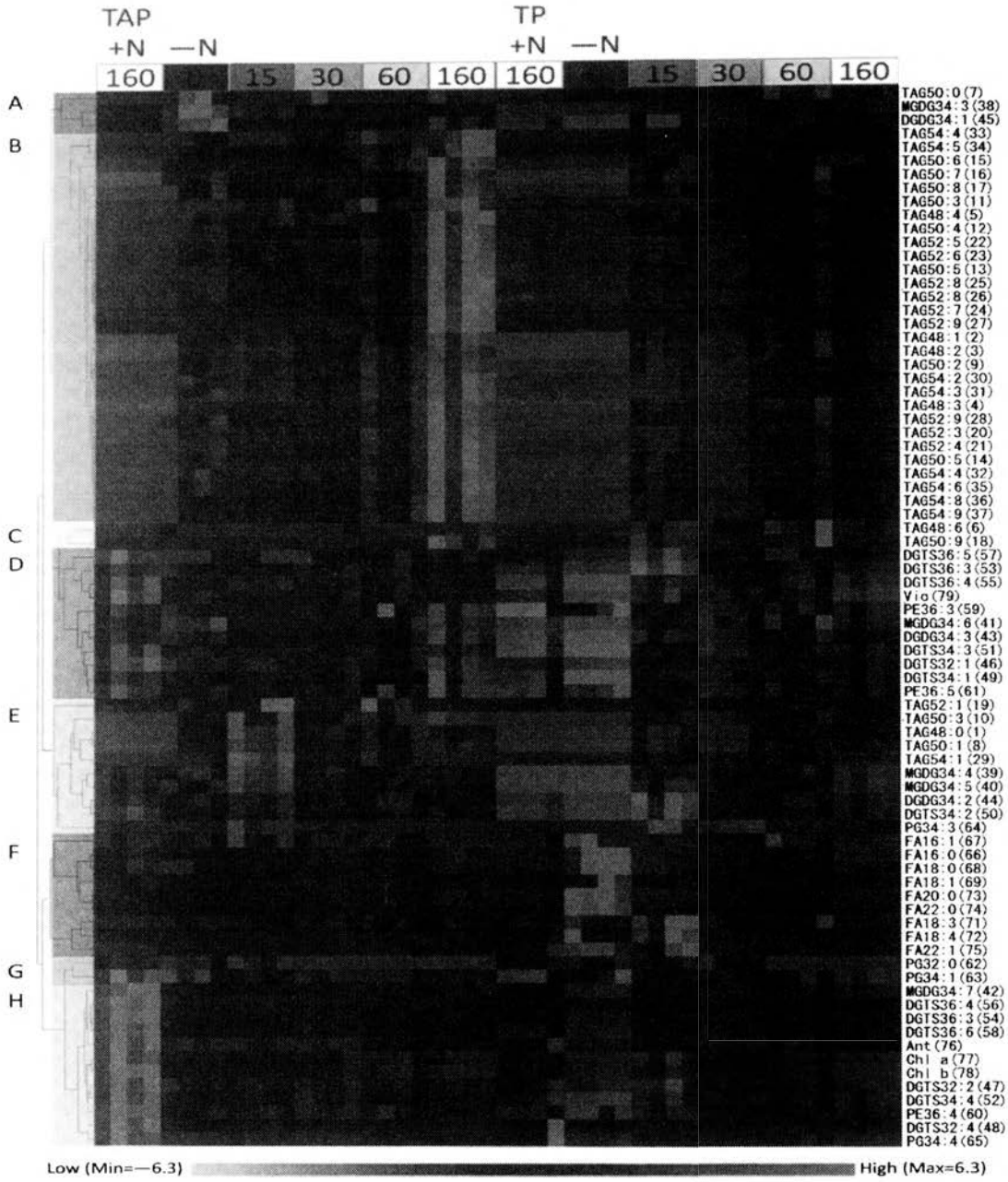

図 1 酢酸栄養の有無，窒素栄養充足条件（光量160 μmol/m²/s）と窒素栄養欠乏条件（光量 0, 15, 30, 60, 160 μmol/m²/s）における階層的クラスタリングに基づく物質の変化．物質の量は Z-スコアで正規化した．物質が多い場合は赤，少ない場合は緑で示している．クラスター A（赤）；クラスター B（オレンジ）；クラスター C（黄）；クラスター D（青）；クラスター E（ベージュ）；クラスター F（灰）；クラスター G（緑）；クラスター H（水色）．+N，窒素栄養充足条件．–N，窒素栄養欠乏条件．TAP，混合栄養条件；TP，光合成独立栄養条件．物質名の略語，括弧内番号は表 1 を参照．

議論

TAG 蓄積量と光量の変化に対して，これまで TAG 総量に関しては報告されているものの（Fan *et al.*, 2012），TAG 分子種ごとの違いは報告されていなかった．本研究において混合栄養，光合成独立栄養条件それぞれにおいて TAG 分子種ごとの光量の変化に対する応答を調査した結果，多くの TAG 分子種は光量の増加に伴って増加したが（図 1），クラスター E の TAG 分子種では光量 15 μmol/m²/s で最も多く蓄積しており（図 1），TAG 分子種によって光量に対する蓄積の応答が異なることが示された．多くの TAG 分子種で光量の増加に伴って蓄積量が増加した理由と

して，TAG は光化学系の酸化ストレスに応答するために蓄積するという説があり（Hu *et al.*, 2008），光量が増加すれば酸化ストレスが増加すると考えられ，酸化ストレスに対応するために TAG 蓄積量が増加したと考えられる．一方，クラスター E の TAG 分子種は，TAG 50:3 以外はアシル基が飽和脂肪酸，モノ不飽和脂肪酸のみから構成されていた（表 1）．飽和脂肪酸やモノ不飽和脂肪酸は*C. reinhardtii*においては新規合成されたものであり（Riekhof *et al.* 2005），混合栄養条件下においては酢酸を炭素源として TAG を合成することが知られており（Li *et al.*, 2012），弱光条件下では酢酸から新規合成する TAG 合成経路を積極的に利用すると考えられる．しかし，混合栄養条件下の弱光条件下においてなぜ TAG の新規合成が促進されたのかは本研究では解明できなかった．

また，光合成独立栄養条件下の光量 15 μmol/m^2/s においてもっとも蓄積していた TAG 48:6 と TAG 50:9 は共にアシル基に 16:4 や 18:3 を持っていた（表 1）．近年*C. reinhardtii* において MGDG を TAG に転用する酵素が発見され（Li *et al.*, 2012），本研究で検出されたすべての MGDG 分子種はアシル基に 16:2, 16:3, 16:4, 18:3 を含むように不飽和度が高いことから（表 1），これら不飽和度の高い TAG 分子種は MGDG からの転用物であると示唆された．さらに光合成独立栄養条件下の弱光条件においてこれらの TAG が蓄積していたことから，弱光条件下においては光合成効率が低下し二酸化炭素固定能が低下するため，葉緑体膜脂質から TAG への転用経路が促進されることが示唆された．

多くの膜脂質は混合栄養条件下において窒素栄養欠乏に伴って減少し，光合成独立栄養条件下においては窒素栄養欠乏条件下の弱光条件で最も増加した（図 1）．藻類は弱光条件下において光合成効率を上げるために葉緑体膜脂質が増加する傾向がある（Hu *et al.*, 2008）．しかし，混合栄養条件下においては酢酸からエネルギーを獲得できるため（Heifetz *et al.*, 2000），葉緑体を維持する必要性がなくなるために膜脂質が減少したと考えられる．一方，光合成独立栄養条件下においては貯蔵物質を分解するか，光合成から得られるエネルギーしかないため，光合成効率を上げるために，弱光条件下では葉緑体を増加させたと考えられる．

謝辞

本研究の指導をしてくださった仲田崇志博士には格別の感謝の意を表明いたします．池田和貴博士には LC-MS/MS の測定，解析の指導を行っていただきこの場を借りて感謝を申し上げます．伊藤卓朗博士には LC-TOFMS の操作・結果の解釈などにアドバイスをしてくださったこと感謝いたします．また，藤倉純子さんには LC-TOFMS による測定の際の補助をしていただきました．なお，本研究は山形研究費と森泰吉郎記念研究振興基金を使用して行われました．最後に素晴らしい研究環境を提供してくださった冨田勝教授にこの場を借りてお礼を申し上げます．

参考文献

Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem, Physiol.* **37**, 911-917.

Chisti, Y. (2007) *Biotechnol. Adv.*, **25**, 294-306.

Eichenberger, W. (1976) *Phytochemistry*,**15**, 459-463.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. and Botstein, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14863-14868.

El-Sheekh, M. M. (1993) *Biol. Plant*, **35**, 435-441.

Fan, J., Andre, C. and Xu, C. (2011) *FEBS Letters*, **585**, 1985-1991.

Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J. and Xu, C. (2012) *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1380-1390.

Gorman, D. S. and Levine, R. P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1665-1669.

Harris, E. H. (2009), *The Chlamydomonas Sourcebook second edition Volume 1*, Elsevier, Amsterdam.

Heifetz, P. B., Förster, B., Osmond, C. B., Giles, L. J. and Boynton, J. E. (2000) *Plant Physiol.*, **122**, 1439-1445.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M.and Darzins, A. (2008) *Plant J.*, **54**, 621-639.

Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N., Soga, T. and Tomita, M. (in press) *Metabolomics*, DOI 10.1007/s11306-012-0463-z.

Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., Kuo, M. H. and Benning, C. (2012) *Plant Cell.*, **24**, 4670-4686

Merchant, S. S., Kropat, J., Liu, B., Shaw, J. and Warakanont, J. (2011) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 352-363.

Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärther, K., Li., X., Moellering, E. R., Zäuner, S., Cornish, A. J. and Liu, B. (2010) *Plant Physiol.*, **154**, 1737-1753.

Msanne, J., Xub, D., Konda, A. R., Casas-Mollano, J. A., Awada, T., Cahoon, E.B., Cerutti, H. (2012) *Phytochemistry*, **75**, 50-59.

Picaud, A., Creach, A. and Trémolières, A. (1991) *Plant Physiol. Biochem.*, **29**, 441-448.

Riekhof, W. R., Sears, B. B. and Benning, C. (2005) *Eukaryot. Cell*, **4**, 242-252.

Siaut, M., Cuiné, S.,Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y. and Peltie, G. (2011) *BMC biotechnol.*, **11**, 7.

Sugimoto, M., Koseki, T., Hirayama, A., Abe, S., Sano, T., Tomita, M. and Soga, T. (2010) *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 374-383.

Weers, P. M. M. and Gulati, R. D. (1997) *Limnol. Oceanogr.*, **42**, 1584-1589.