2A01 (Invited)

海洋ハプト藻のバイオマーカー脂質分子アルケノン・アルケンの合成経路と生理機能

○白岩善博[1,3]、沢田健[2,3]、JST/CREST 白岩チーム[3*]
（[1]筑波大・生命環境，[2]北大院理学、[3]JST・CREST）

地球の一次生産の約半分は、海洋の植物プランクトンが担っている。そのため、海洋植物プランクトンによる物質生産過程の理解は、地球規模の物質循環や環境変動を理解する上で必要不可欠である。海洋の一次生産者としてハプト藻、珪藻、シアバクテリアが主要な一次生産者として重要な役割を担っており、そのバイオマスも膨大であることが報告されている(1)。その中で、ハプト藻は、海洋中の全クロロフィル a の 30-50%を占めるほどであり、海洋生態系を支える一次生産者としてその役割は非常に大きい。現生の生物による物質生産・代謝産物の解析は、地球化学研究にも重要であり、過去の海洋環境変遷や今後の海洋・地球環境の未来予測にも必要な基礎的データを提供するものである。

ハプト藻（ハプト植物門）は、第 3 の鞭毛ともいわれるハプトネマを有することを特徴とする生物群で、真核光合成藻類が真核細胞に入り込んで共生体を形成した「二次植物」であり、生物進化過程では比較的新しい（約 2 億年）生物群である。ハプト藻類には、細胞殻として炭酸カルシウムの結晶構造体からなる円石（ココリス）を有する円石藻群が含まれており、これらの生物は中生代白亜紀における石灰岩や原油の形成に寄与したものと考えられている。文献によれば、円石藻には約 300 種の化石種と約 200 種の現生種があると考えられている。

円石藻の中でも、代表種 *Emiliania huxleyi* は太平洋の中央部を除く赤道海域から極域に至る世界中の海洋で増殖する種であり、特に高緯度海域において巨大なブルーム（大増殖）を引き起こし、その様子は衛星画像で多くとられられている。そのブルームは、海洋環境の変遷に伴い変化し、東ベーリング海（アラスカ側）においては 1997 年以降顕著なブルームが観測されているが、年による増殖変化もみられている。円石藻 *Emiliania huxleyi* がこのように環境が異なる広範囲な海洋で生育できるカギは、種全体に共通するコアゲノムの他に、多くの株ごとに異なる特徴的なゲノムを有することであることが、パンゲノム解析により最近明らかにされた(2)。

円石藻 *Emiliania huxleyi* は、炭素数 37-39 の長鎖不飽和ケトン・アルケノンを合成することで知られている。アルケノンの蓄積量および不飽和度は細胞生育時の環境条件を反映することが知られており、特に温度条件と不飽和度の相関関係は、培養実験において正確に再現されるため、20 年ほど前から「アルケノン古海洋温度計」として、過去 30 万年間の古海洋表面温度を復元するツールとして有機地球化学分野で利用されている。すなわち、円石藻類の特定種のマーカー分子であるアルケノンは海底のセディメントコ

アに長く保存され、その細胞殻である円石（ココリス）の形態と合わせて古海洋環境の重要な指標として活用されている。その結果、過去における海流の変化や海洋の主要な一次生産者である円石藻群衆の変動に関する情報が得られている。そのため、環境要因変動とアルケノン代謝変動の相関やアルケノン分子の合成機構の解明は、アルケノン温度計の精度の向上にも大きく寄与するものである。

アルケノンはハプト藻類 *Emiliania, Isochrysis, Pseudoisochrysis, Gephyrocapsa, Chrysotila* の 5 属でのみ報告されている。我々は、文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)や世界中の藻類カルチャーコレクションの活用により、アルケノン合成種の中でも株によりアルケノンやアルケン組成が大きく異なることを見出した。アルケノンは、一般的な貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールとは異なる構造を持つが、その合成経路や生理的役割は全く不明である。我々は、イオントラップ型質量分析計 (Ion Trap MS / MS n)を用いたショットガンリピドミクス解析により、アルケノン合成経路の中間体と予測される複数種類の超長鎖 Fatty acyl-CoA の同定に成功した。この結果は、アルケノンが脂質の伸長反応を経て合成される可能性を示唆している。

円石藻 *E. huxleyi* は、中性多糖（β-グルカン）を貯蔵物質として蓄積する。しかし、アルケノンと中性多糖への光合成炭素フラックスは不明であり、貯蔵物質の代謝も不明である。我々は、^{14}C-トレーサー実験によって、光合成で固定された炭素の約 20%がアルケノンに、1%程度が中性多糖画分へ移行することを明らかにした。また、アルケノンが暗条件下で分解されることを明らかにした結果を合わせ、アルケノンが主要な貯蔵物質として機能していると推測した。現在、リピドミクス解析とトランスクリプトーム解析によってアルケノン合成に関与する遺伝子群を同定し、それらの発現が環境要因によってどのように制御されているかを解析している。本講演では、円石藻による物質生産系の機構解明とその環境要因による制御機構について最新の成果を報告する。

（1）Liu, H. et al: Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (31): 12803–12808

（2）Read, BA et al.: Pan genome of the phytoplankton Emiliania underpins its global distribution. *Nature* 499: 209-213 (11 July 2013).

*JST/CREST-白岩チーム（JST/CREST-Shiraiwa Team）: [筑波大(U. Tsukuba)]白岩善博(Y. Shiraiwa)、鈴木石根(I. Suzuki)、新家弘也(H. Araie)、辻敬典(Y. Tsuji)、佐藤真奈美(M. sato)、大井信明(N. Ohi)、古田島知則(T. Kotajima)、[北大(Hokkaido U.)]沢田健(K. Sawada)、中村英人(H. Nakamura)

○Y. Shiraiwa[1], K. Sawada[2] and JST/CREST-Shiraiwa Team[2] ([1]Fac. of Life & Environment. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Grad, Schl. of Sci., HokkaidoUniv., [3]CREST, JST) Biosynthetic Pathway and Physiological Function of Alkenones and Alkenes as Biomarker Molecules of Haptophytes.

2A02 ハプト藻培養試料から検出された特異的なステロールの考察

○加納千紗都[1]、沢田健[1,3]、中村英人[1,3]、新家弘也[2,3]、鈴木石根[2,3]、白岩善博[2,3]
（[1]北海道大学理学院、[2]筑波大学生命環境系、[3]CREST, JST）

【はじめに】ハプト藻は海洋における主要な基礎生産者であり、特に*Emiliania huxleyi*は世界中の海洋において繁栄している。また、*E. huxleyi*を含むイソクリシス目(Isochrysidales)が持つ長鎖アルケノンは、古水温計として地球科学分野において広く応用されている。近年ハプト藻のアルケノンに関する研究が進む一方で、そのステロイド組成に関する報告は依然として少なく、特に生物分類における綱より小さい分類単位でのステロイド組成を研究した例はほとんどない。演者らは、このハプト藻の培養試料を用いてステロイド分析を行い、その種間・種内多様性について検討している。藻類のステロール組成は種や生育環境によって多様性があることが指摘されている。ハプト藻ステロイド組成をより細かい分類単位で検討することによりステロイドバイオマーカーの生合成系と、ハプト藻ステロイド組成の生理機能への影響について知見を与えられる可能性もある。本研究では、ハプト藻のステロイド組成の種間の多様性を考察するとともに、限られた株から検出されたC_{30}ステロールに着目してその意義を考察した。

【試料と方法】本研究では、ハプト藻イソクリシス目(Isochrysidales)の*E. huxleyi, Gephyrocapsa oceanica, Isochrysis galbana, Crysotila lamellosa*と、円石藻目(Coccolithales)の*Pleurochrysis carterae*などの 8種の培養試料を用い、極性脂質画分をGC-FIDおよびGC-MSで分析した。

【結果と考察】イソクリシス目ではC_{27}ステロールであるCholesterolとC_{28}ステロールのBrassicasterolが、円石藻目ではCholesterol、Brassicasterolに加えて23, 24-dimethylcholesta-5-en-3β-ol(C_{29})、Stigmasterol(C_{29})が検出され、ステロイド組成は目レベルで大きく異なる。これらの培養株の中で、*C. lamellosa*と*Cruciplacolithus neoheilis*株のみからC_{30}ステロールが検出された。これら2株から検出されたC_{30}ステロールは同一のものである可能性が高い。このC_{30}ステロールの割合は、*C. lamellosa*では全ステロールの1.41%、*Cruciplacolithus neoheilis*では13.4%占める。一般的にC_{30}ステロールは渦鞭毛藻が合成する4, 23, 24メチルステロールが知られているが、ハプト藻における検出例はパブロバ目(Pavlovales)からの4α-methyl-24-ethyl-5α-cholest-22E-en-3β-olだけである（Volkman et al., 1990）。本研究で検出されたC_{30}ステロールのマススペクトルパターンは、パブロバ目のステロールのそれとよく似ていて、主要なフラグメントピークのm/zが2小さいので、いずれかの骨格に二重結合をさらに一つ持つステロールであると推定している。この特異的なステロールがハプト藻バイオマーカーとして応用できる潜在性があることを提案する。

Peculiar sterols detected from cultures of Haptophyte algae

○C. Kanoh[1], K. Sawada[1,3], H. Nakamura[1,3], H. Araie[2,3], I. Suzuki[2,3], Y. Shiraiwa[2,3] ([1]Faculty of Science, Hokkaido Univ., [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba., [3]CREST, JST)

2A03 ハプト藻 *Chrysotila lamellosa* のアルケノン,アルケン組成に対する塩分の効果

○中村英人[1,3]、沢田健[1,3]、新家弘也[2,3]、鈴木石根[2,3]、白岩善博[2,3]
（[1]北大院理学研究院、[2]筑波大生命環境系、[3]CREST, JST）

長鎖（C_{37}–C_{39}）アルケノンはハプト藻イソクリシス目に由来し、海洋においては *Emiliania huxleyi* と *Gephyrocapsa oceanica* が主な生産種とされる。アルケノンの不飽和指数は海洋表層水温の指標として確立され、海底堆積物からの古海洋変動の復元に広く応用されてきた。*E. huxleyi* や *G. oceanica* はおもに 2–, 3 不飽和アルケノンを含み、4 不飽和アルケノン（$C_{37:4}$ alkenones）に乏しい。一方、湖では 4 不飽和アルケノンがしばしば高い割合で検出され、沿岸や湖に生息する *Chrysotila lamellosa* や近縁のハプト藻の寄与を反映していると考えられている。海底堆積物からの 4 不飽和アルケノンの検出は、高緯度寒冷水塊やバルト海のような半閉鎖的海域に限られ、これらの海域における $\%C_{37:4}$ の増加と低塩分の関連性が指摘されてきた (Rosell-Melé, 1998, Paleoceanogr.; Schulz et al., 2000, GCA; Harada et al., 2003, GCA)。また、中国内陸湖でも、低塩分な環境で高い $\%C_{37:4}$ が報告されている（Liu et al., 2011, GCA）。これまでに、*E. huxleyi* と *G. oceanica* (Ono et al., 2009, Res. Org. Geochem.) 、*I. garbana* (Ono et al., 2011, Geochem. J.) の培養実験により低塩分におけるアルケノン組成が報告されているが、これらはいずれも 4 不飽和アルケノンを含まない株で行われたため、$\%C_{37:4}$ と塩分の関係は確かめられていない。本研究では、塩分がハプト藻のアルケノン組成に与える影響を確かめるため、既知のアルケノン生産種のうち最も 4 不飽和アルケノンに富む沿岸種 *C. lamellosa* を異なる塩分条件下（15–45 g/L）で培養し、そのアルケノン組成を解析した。

C. lamellosa は高塩分条件でよく増殖し、培養液あたり・光学密度あたりのアルケノン量は 40 g/L において最大となった。アルケノン組成は、塩分条件によらず 4 不飽和アルケノンおよび C_{40} アルケノンの含有・C_{38} メチルアルケノンの欠如で特徴づけられた。アルケノン不飽和指数（U^{K}_{37}, $U^{K'}_{37}$）はいずれの塩分条件でも顕著な変化を示さず、温度によるコントロールが強固であることが確認された。さらに、$\%C_{37:4}$ は塩分によらずほぼ一定の値をとった。このことから、環境試料で報告される $\%C_{37:4}$ と塩分の関係は、塩分変動に対する主なアルケノン生産種の個別の生理学的応答よりも、塩分変化と連動した他のアルケノン生産種の寄与を反映している可能性が高いことを指摘する。

The effect of salinity to alkenone and alkene compositions in haptophyte *Chrysotila lamellosa*

○H. Nakamura[1,3], K. Sawada[1,3] , H. Araie[2,3], I. Suzuki[2,3] and Y. Shiraiwa[2,3] ([1]Faculty of Science, Hokkaido Univ., [2]Faculty of Life and Environmental Science, Univ. Tsukuba, [3]CREST, JST)

2A04 (Invited) 地層中に存在するクロロフィル由来物質

○野本信也[1]
([1]筑波大院数理物質系)

光合成生物の持つテトラピロール色素であるクロロフィルは、主として海洋などの水界中で大量に合成されてきた。クロロフィル分子は、構成するピロールに結合する原子団の違いによって多くの種類が見いだされており、光合成生物の種類によって異なるクロロフィルを持つ場合もある。それらの一部は海底などの堆積層に埋没して地質学的年代に渡って保存されている。本発表では、地層中におけるクロロフィルの化石分子の存在形態と特徴について述べる（図 1)。

クロロフィルは、ケトン、アルデヒド、エステルの他、ビニル基や活性メチンのような化学反応性に富む原子団を持つ分子であるので、植物の死後速やかに化学変化を起こし始める。地層中に埋没してケロジェンに取り込まれた後、活性な官能基は消失して側鎖に安定な原子団のみを持つポルフィリン構造となる。ケロジェン結合態のポルフィリンの一部は、地熱などの作用で遊離する。一方、植物が新陳代謝でクロロフィルを分解

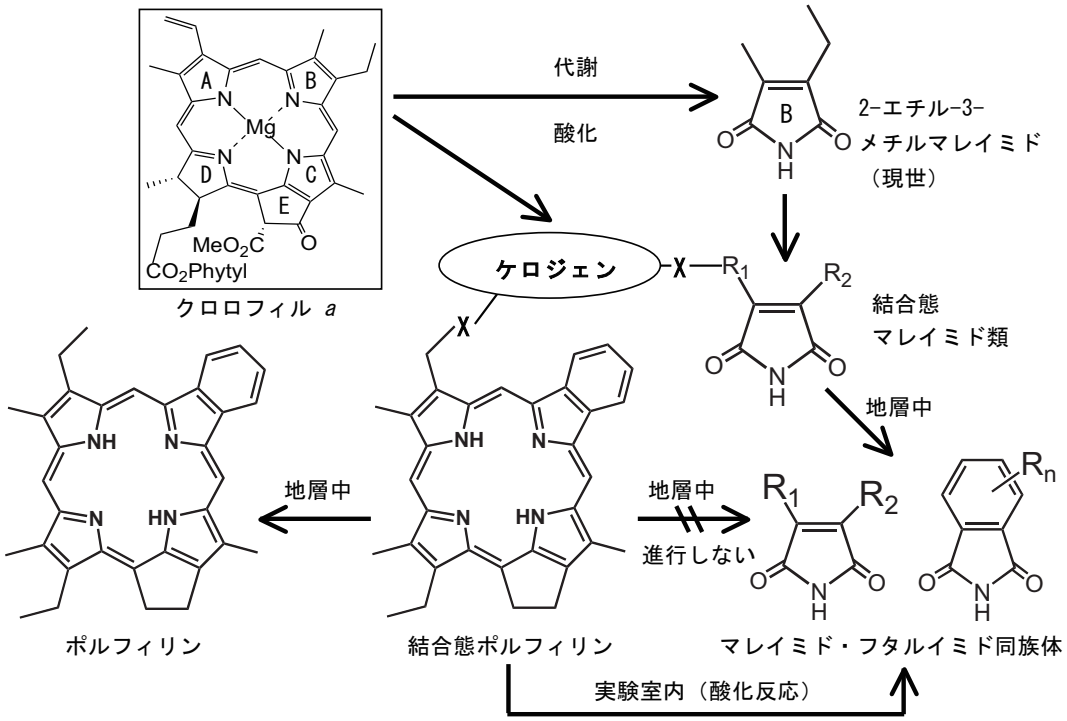

図 1.　地層中におけるクロロフィル化石分子の存在形態

した後の産物であるマレイミドの一種も現世で見いだされている。これもケロジェンに取り込まれて保存され、地熱で遊離したものが地層中に存在する。いずれの存在形態についてもそれらの側鎖構造が変化したものも多いが、十分な化学的検討を加えれば元のクロロフィルを推定できる場合もある。

1. 遊離態ポルフィリン

地層試料から抽出できるポルフィリンは、古くから研究され構造が決定されたものは80種類以上に上る。代表的なものは、E環まで残したPDEP型とそれが開環したエチオポルフィリン型で、炭素数32の基本骨格から減炭及び増炭したものが見られる。他にD、E環の間に5又は7員環が形成されたものやピロール側鎖にシクロヘキセン環やベンゼン環を持つものも見いだされている。比較的若い試料からは、カルボキシル基を残したポルフィリンも得られている。

2. 結合態ポルフィリン

結合態ポルフィリンを有機溶剤で抽出し分析することはできないが、ケロジェンに弱い結合で取り込まれたポルフィリンを加水熱分解や脱硫分解で取り出した例がある。

有機溶剤で十分洗浄した堆積岩をクロム酸などで酸化することで、結合態ポルフィリンのピロール部分をマレイミドとフタルイミドの同族体、異性体の混合物として取り出して分析することが可能である。この手法の分析は、遊離態ポルフィリンより古い時代の試料にまで適用できる。またそれらの標準物質は合成済みであるので定量分析を行い相互の比を得ることが可能である。ただし、酸化反応の収率が不明である為に試料中のそれらの濃度を求めることは出来ない。元の構造に由来するエチルメチルマレイミドから減炭及び増炭したものとフタルイミドの同族体が見いだされているが、様々なポルフィリンを用いた加熱実験に基づいて、それらが全てクロロフィルから生成しうることが証明されている。

3. 遊離態マレイミド・フタルイミド同族体

堆積岩の有機溶剤抽出物を分析すると、マレイミドとフタルイミドの同族体、異性体の混合物が見いだされる。現世の試料からはB環由来のエチルメチルマレイミド以外は見つかっていないので、これがケロジェンに取り込まれ続成作用を受けて構造が変化した後、地熱などによって遊離したと考えられる。また地層中では酸素を付加する酸化反応は起こらないとするのが妥当であり、結合態ポルフィリンからの生成はあり得ない。遊離態マレイミド類の分析例は少ない。結合態ポルフィリンから酸化で取り出すマレイミド類に比べて、遊離態のものは量が少ない。遊離態は抽出物を分析するので、試料中の濃度を求めることも可能である。エチルメチルマレイミドの加熱実験によって、地層試料に存在するこれらが生成しうることが確認されている。中でも遊離態のフタルイミド類はこれまで存在が知られていなかったものであり、我々が見いだした新しい光合成生物のバイオマーカーである。

Molecular Fossils of Chlorophylls

○ S. Nomoto[1] ([1]Fac. Pure & Applied Sci., Univ. Tsukuba)

2A05 好塩性アーキアの膜脂質イソプレノイド生成機構–ロイシン–メバロン酸経路と関連酵素の存在

○山内　敬明、田上　諒
（○九大院理・地球惑星）

古細菌（アーキア）は，膜脂質にイソプレノイドが結合したエーテル脂質を持っている。体表面を覆う膜脂質にイソプレノイドを使用しているということは，特に増殖速度の早い好塩性古細菌は，高効率でイソプレノイドを生成する機構を持っていると思われる。イソプレノイドの生合成はメバロン酸（MVA）経路と， MEP経路の２経路からなることは周知の事実であり，古細菌はメバロン酸経路を利用しているとされるが，経路中の一部の酵素は通常生物と異なり，未だ酵素としてその基質の特定と反応機構の推定が進んでいないものもある。一方，分枝アミノ酸とMVA経路との関係は近年病原性寄生虫や*Mycobacterium*の生産する様々なイソプレノイドにおいて，ロイシンが高い効率でこれらに変換されることが示され，関係する酵素遺伝子（及び酵素）の存在が指摘されている。すでに演者らは*Halobacterium salinarum*において，ロイシンからメバロン酸を経てイソプレノイド膜脂質が生合成されることを強く示唆する結果を得た。ここでプロキラル水素の立体特異的変換の有無と立体化学から，本経路に関連する酵素の存在を指摘し，酵素反応の立体化学を明らかにするため，位置および立体特異的重水素標識アミノ酸の合成と，これによる取り込み実験を行った。

これまでの実験でイソバレリル-CoA 脱水素酵素の存在を強く示唆する結果を得たが，この場合二重結合を形成するもう一方の水素であるロイシンの3位水素を立体特異的に重水素化する方法を開発し，(3*S*)- および(3*R*)-[3-^{2}H]ロイシンを調製した。微生物*Halobacterium salinarum* JCM 9120を好塩性古細菌培地 100 mlに，本化合物を200 mg加え７日間培養し，遠心分離にて集菌，脂質抽出の後，加水分解と精製で，イソプレノイド脂質コアを得てこれをESI-MSにて分析し，さらに分解，還元後炭化水素部分についてGC-MSにより重水素の挙動を追跡した。

(3*S*)- [3-^{2}H]ロイシンから得られた脂質コアおよびフィタンはそれぞれESI-MS，GC-MSでそれぞれ8.0, 9.8% ; 10.7, 12.9%の重水素取り込みが観測された。一方(3*R*)- [3-^{2}H]ロイシンから得られたた脂質コアおよびフィタンの標識率はそれぞれESI-MS，GC-MSでそれぞれ2.8, 1.6% ; 1.7, 1.4%とほぼ重水素の取り込みはないという結果が得られた。これは相当するイソバレリル-CoA 脱水素酵素が基質を立体特異的に認識していることを示しており，好塩性古細菌がロイシンからメバロン酸を経てイソプレノイドを生成する系が確実に存在していることを示す。酵素の立体化学はこれまで示されているラット肝臓の酵素と同じであり，これはFADを補酵素とするAcyl-CoA脱水素酵素の特徴である。イソバレリル-CoA 脱水素酵素は，様々な生物の遺伝子内に存在する。塩基配列の比較から，(好塩性)古細菌の進化上の位置の検討もデータベース利用で比較したいと考えている。

Involvement of leucine-mevalonate pathway in characteristic isoprenoidal lipid biosynthesis in halophilic archaea

○N. Yamauchi, R. Tanoue (Dept. of Earth and Planetary Sci., Graduate School of Sci., Kyushu Univ.)

2A06 アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階解析：光合成の共生

力石嘉人・土屋正史（海洋研究開発機構）

生物に含まれるアミノ酸には，食物連鎖に伴い ^{15}N が濃縮するもの（グルタミン酸など）と，食物連鎖の影響を受けずに同位体比が変化しないもの（フェニルアラニンなど）が存在する。すなわち，両者の同位体比を比較することで，その生物の栄養段階を見積もることができ，また，得られた同位体比や ^{15}N 濃縮率の程度からは，その生物が属する食物連鎖網のベースにある生物の同位体比（の積算値）や，生体内でのアミノ酸代謝とエネルギー獲得方法の多様性などについての多くの情報を得ることができる。実際に，グルタミン酸（Glu）とフェニルアラニン（Phe）の同位体比と栄養段階（TP：trophic position）の関係は，式 1 で与えられる。

$$TP = (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} + \beta) / 7.6 + 1 \qquad \text{式 1}$$

（βは，水棲生態系で−3.4，陸上 C3 生態系で+8.4，陸上 C4 生態系で−0.4）

このアミノ酸の窒素同位体比を用いた手法は，捕食者のみの調査で生物の栄養段階を推定することが可能であり，bulk 同位体比を用いた従来の推定法に比べて見積もり精度が極めて良い（水棲生態系で $1\sigma=0.12$，陸上 C3 生態系で $1\sigma=0.17$）。また，ホルマリン固定試料や軟体動物の殻体（炭酸カルシウム）・脊椎動物の骨・歯（リン酸カルシウム）などの殻体組織にも適用できる。さらに，測定に要する試料量が非常に少ないため（約 1nmol/アミノ酸），バクテリアを含む様々な生物試料・土壌や堆積物などの環境試料にも利用することができ，地球化学・生物学・生態学，およびその間にある横断的研究分野における様々な研究テーマへの応用が期待されている。

発表では，光合成生物の形成プロセスの研究を念頭に，生物におけるアミノ酸の獲得・代謝，またそれに伴う安定窒素同位体比の変動という側面から，植物プランクトン-動物プランクトンにおける捕食-被食の関係と，単一の生物における葉緑体と細胞本体の関係を比較して，それぞれがどのようなエネルギー獲得形態にあるのかに焦点をあてる。

現在の藻類は，数十億年前の祖先が，シアノバクテリアや他の藻類を獲得して成立したとされている。それが真実であるならば，その祖先は，動物として捕食活動を行っていたはずであり，当時の栄養段階は 2（または 2 以上）のはずである。ところが，現在の藻類の栄養段階は必ず 1 であり，祖先の持っていた動物的な捕食に対応するシグナルを見ることはできない。それでは，どのタイミングで「動物」から「植物」に変わったのであろうか？はたして，それは簡単に為し得るのであろうか？

これまでに得られた研究結果から「光合成の共生」をテーマに，盗葉緑体を持つ生物の分析例など紹介しながら議論を行いたい。

Estimation of trophic position based on nitrogen isotopic composition of amino acids: Symbiosis of functional photosynthesis

Y. Chikaraishi, M. Tsuchiya (JAMSTEC-Biogeos)