

博士論文

単細胞紅藻シアニジオシゾンにおける グリセロ脂質代謝に関する研究

平成 29 年度

東京大学大学院 総合文化研究科

広域科学専攻 生命環境科学系

毛利 奈津美

目次

略語	1
脂肪酸の名称および表記	4
第 1 章 序論	5
1.1 植物の脂質代謝に関するこれまでの研究	5
1.2 陸上植物における脂質代謝の概要	7
1.3 緑藻の脂質代謝について	16
1.4 紅藻の脂質代謝について	17
1.5 本研究の目的	18
1.6 図	20
第 2 章 シアニジオシゾンにおける脂質代謝関連酵素の比較ゲノム解析と細胞内局在解析	28
2.1 序文	28
2.2 材料と方法	29
2.3 結果	36
2.4 考察	48
2.5 表	53
2.6 図	70
第 3 章 比較ゲノム解析によるシアニジオシゾンとその他の紅藻との脂質代謝系の比較	81
3.1 序文	81
3.2 材料と方法	82
3.3 結果	82
3.4 考察	87
3.5 表	91
3.6 図	99
第 4 章 単離葉緑体における放射性ラベルを用いた代謝フロー解析	104
4.1 序文	104
4.2 材料と方法	106
4.3 結果	115

4.4 考察	128
4.5 表	135
4.6 図	140
第 5 章 総括	155
謝辞	160
参考文献	161

略語

AAT	アシル-ACP チオエステラーゼ
ACAT	アセチル-CoA:ACP アセチルトランスフェラーゼ
ACBP	アシル-CoA 結合タンパク質
ACCase	アセチル-CoA カルボキシラーゼ
ACDH	アシル-CoA デヒドロゲナーゼ
ACP	アシルキャリアータンパク質
ACT	アシル-CoA チオエステラーゼ
ACX	アシル-CoA オキシダーゼ
ALIS	ALA-インタラクティングサブユニット
BCCP	ビオチンカルボキシキャリアータンパク質
BSA	ウシ血清アルブミン
CAR	カルバモイルリン酸合成酵素
CCT	ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ
CDP-DAG	CDP-ジアシルグリセロール
CDP-DAGS	CDP-ジアシルグリセロール合成酵素
CK	コリンキナーゼ
CL	カルジオリピン
CLS	カルジオリピン合成酵素
CoA	補酵素 A
CPT	ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ
DAG	ジアシルグリセロール
DAPI	4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DGAT	ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ
DGDG	ジガラクトシルジアシルグリセロール
DHAP	ジヒドロキシアセトンリン酸
DIC	微分干渉
EAR	エノイル-ACP レダクターゼ
ECH	エノイル-CoA ヒドラターゼ

ECR	エノイル-CoA レダクターゼ
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EK	エタノールアミンキナーゼ
EPT	エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ
FAME	脂肪酸メチルエステル
FAS	脂肪酸合成
G3P	グリセロール-3-リン酸
GC-MS	ガスクロマトグラフィー質量分析計
GFP	緑色蛍光タンパク質
GGGT	ガラクト脂質:ガラクト脂質ガラクトシルトランスフェラーゼ
GK	グリセロールキナーゼ
GlcDG	モノグルコシルジアシルグリセロール
GPAT	グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ
GPDH	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
HA	ヘماغルチニン
HACDH	ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ
HAD	ヒドロキシアシル-ACP デヒドラターゼ
HCD	ヒドロキシアシル-CoA デヒドラターゼ
HCS	ホロカルボキシラーゼ合成酵素
IVD	イソバニル-CoA デヒドロゲナーゼ
KAR	3-ケトアシル-ACP レダクターゼ
KAS	3-ケトアシル-ACP 合成酵素
KAT	3-ケトアシル-CoA チオラーゼ
KCR	3-ケトアシル-CoA レダクターゼ
KCS	3-ケトアシル-CoA 合成酵素
LACS	長鎖アシル-CoA 合成酵素
LPA	リゾホスファチジン酸
LPAT	リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ
LPC	リゾホスファチジルコリン
LPCAT	リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ
LPL	リゾリン脂質
LPLAT	リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ

MCC	メチルクロノイル-CoA カルボキシラーゼ
MCMT	マロニル-CoA : ACP マロニルトランスフェラーゼ
MFP	多機能タンパク質
MGDG	モノガラクトシルジアシルグリセロール
PA	ホスファチジン酸
PAP	ホスファチジン酸ホスファターゼ
PC	ホスファチジルコリン
PCC	プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ
PDAT	ホスファチジルコリン:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ
PDCT	ホスファチジルコリン:ジアシルグリセロールコリントランスフェラーゼ
PE	ホスファチジリエタノールアミン
PEAMT	ホスホエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ
ECT	ホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ
PEG	ポリエチレングリコール
PEMT	ホスファチジリエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ
PG	ホスファチジルグリセロール
PGP	ホスファチジルグリセロールリン酸
PGPP	ホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼ
PGPS	ホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素
PI	ホスファチジルイノシトール
PI4K	ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ
PIP5K	ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ
PIS	ホスファチジルイノシトール合成酵素
PL	リン脂質
PLA1	ホスホリパーゼ A1
PLA2	ホスホリパーゼ A2
PLAP	ホスホリパーゼ A2 活性化タンパク質
PLC	ホスホリパーゼ C
PLD	ホスホリパーゼ D
PLMT	リン脂質メチルトランスフェラーゼ
PS	ホスファチジルセリン
PSD	ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ

PSS	ホスファチジルセリン合成酵素
RP-TLC	硝酸銀逆相クロマトグラフィー
SAD	ステアロイル-ACP 不飽和化酵素
SCD	ステアロイル-CoA 不飽和化酵素
SQDG	スルホキノボシルジアシルグリセロール
TAG	トリアシルグリセロール
TAGL	トリアシルグリセロールリパーゼ
TLC	薄層クロマトグラフィー
$\Delta 9$ Des	アシル脂質 $\Delta 9$ 不飽和化酵素
$\Delta 12$ Des	アシル脂質 $\Delta 12$ 不飽和化酵素

脂肪酸の名称および表記

脂肪酸の名称および表記について以下にまとめた。本論文では、脂肪酸を炭素数 X および、二重結合の数 Y を用いて、 $X:Y$ の形で表記する。また括弧内の数字は、カルボキシ基から数えた際の二重結合の位置を示す。二重結合の位置の表記は省略する場合がある。

14:0	ミリスチン酸	18:4	オクタデカテトラエン酸
16:0	パルミチン酸	20:0	エイコサン酸
16:1	パルミトレイン酸	20:1(11)	エイコセン酸
18:0	ステアリン酸	20:2(11, 14)	エイコサジエン酸
18:1(9)	オレイン酸	20:3	エイコサトリエン酸
18:2(9,12)	リノール酸	20:4(5,8,11,14)	アラキドン酸
18:3(9,12,15)	α リノレン酸	20:5(5,8,11,14,17)	エイコサペンタエン酸
18:3(6,9,12)	γ リノレン酸		

第1章 序論

1.1 植物の脂質代謝に関するこれまでの研究

約 16 億年前に起こったとされる細胞内共生によって、原始真核細胞が葉緑体を獲得し、藻類が誕生した。このとき誕生した植物の共通祖先は、その後、灰色藻、緑藻、および紅藻の 3 つの系統に分かれ、さらに一部の緑藻は陸上へ進出し、最終的に陸上植物へと進化した。さらには原始紅藻が他の真核細胞に取り込まれることで二次的に葉緑体を獲得し、ケイ藻や褐藻、黄金色藻などが誕生したと考えられている。これらの藻類は、灰色藻や緑藻および紅藻を含む一次共生藻と区別して、二次共生藻と呼ばれている。緑藻由来の葉緑体をもつ二次共生藻も存在しており、クロララクニオン藻やユーグレナなどがそれにあたる。これらのことから、植物進化の初期の段階で分岐した紅藻は、これまで緑藻や陸上植物とは異なる進化を遂げてきたと推定される。

植物脂質についての知見は、陸上植物および緑藻において多く蓄積している。葉緑体ではリン脂質の 1 種であるホスファチジルグリセロール (PG) および糖脂質が合成されており、これらのグリセロ脂質はチラコイド膜を構成する主要成分である。これらの膜脂質は遺伝子欠損などによって合成が阻害されると、葉緑体の発達や光合成が正常に行われなくなることから (Kobayashi 2016)、植物にとって重要な膜脂質とされ、現在も精力的に研究が行われている。小胞体で合成されているリン脂質についても、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の合成に関わる遺伝子を欠損させるとその多くが胚性致死を示すことや (Mizoi et al. 2006; Lin et al. 2015; Yunus et al. 2016)、ホスファチジルコリン (PC) が花成誘導因子と相互作用することで花成が促進されることなどから (Nakamura et al. 2014)、これらの

リン脂質が陸上植物における芽生えや開花に重要であることが分かる。近年、微細藻類を用いたバイオエネルギー生産が注目されたことで、モデル生物である緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いた研究が盛んに行われ、2015年には脂質代謝についての総説が発表された (Li-Beisson et al. 2015)。

紅藻は、陸上植物とは異なり、アラキドン酸 (22:4) やエイコサペンタエン酸 (22:5) などの高度に不飽和化された脂肪酸をもつことから、このような高度不飽和脂肪酸の合成についての研究がいくつか報告されている (Shiran et al. 1996; Khozin et al. 1997)。これまで紅藻では、大型藻類であるスサビノリ (*Pyropia yezoensis*) や、単細胞紅藻であるチノリモ (*Porphyridium purpureum*、または *P. cruentum*) などの海洋性の藻類が多く実験に用いられてきた。しかし、これらの紅藻は、陸上植物や緑藻などと比べてゲノム配列の解析が最近行われた点や、遺伝学的な実験手法も開発されていなかった点から、脂質代謝についての研究手法は放射性ラベルを用いた代謝フロー解析 (Pettitt and Harwood 1989; Shiran et al. 1996; Khozin et al. 1997) が主であった。そのため、紅藻における脂質代謝についての知見は、緑藻や陸上植物などと比べるとあまり蓄積していない。しかし、2007年に行われた単細胞紅藻シアニジオシゾン (*Cyanidioschyzon merolae*) を用いた研究 (Sato and Moriyama 2007) によって、紅藻は陸上植物や緑藻のものとは異なる、独自の脂質代謝系をもっていることが示唆された。

シアニジオシゾンは、単細胞性の真核藻類で、二分裂によって増殖する。硫酸酸性下の高温強酸性 (pH 1.5~2.5、40~50 °C) の極限環境に生息しており、イタリアの温泉から単離され、日本に持ち込まれた (Kuroiwa 1998)。シアニジオシゾンの細胞構造は非常に単純で、核・ミトコンドリア・葉緑体・ペルオキシソームなどのオルガネラが1個ずつしか存在しない (図 2.2A; Misumi et al. 2005)。また、小胞体は核の周りを取り巻くように存在している様子

が観察されている (Yagisawa et al. 2012)。核・葉緑体・ミトコンドリアに存在する全てのゲノム配列が解読された結果 (Ohta et al. 2003; Matsuzaki et al. 2004; Nozaki et al. 2007)、シアニジオシズンは遺伝子重複が少なく (遺伝子数 5311 個)、またイントロンも非常に少ない (27 個) ことが明らかとなった。同調培養法 (Suzuki et al. 1994) や、形質転換法 (Ohnuma et al. 2008, 2014)、オルガネラの単離法 (Miyagishima et al. 1999; Yoshida et al. 2006; Moriyama et al. 2008; Imoto et al. 2013) などのさまざまな実験手法が確立され、葉緑体やミトコンドリアの分裂に関する解析を中心に用いられてきた。シアニジオシズンの脂質代謝について述べる前に、陸上植物および緑藻の脂質代謝についてまとめることとする。

1.2 陸上植物における脂質代謝の概要

脂肪酸およびグリセロ脂質の代謝は高等生物から細菌まで、全ての生物がもっている重要な代謝経路の一つである。グリセロ脂質は、グリセロール骨格を有する脂質の総称で、リン脂質や糖脂質、および中性脂質であるトリアシルグリセロール (TAG) などが含まれる。リン脂質や糖脂質は、グリセロール骨格の *sn-1* 位および *sn-2* 位に脂肪酸が付加しており、*sn-3* 位にはリン酸や糖などの極性基が付加した構造をしている。TAG は *sn-1* 位および *sn-2* 位だけでなく、*sn-3* 位にも脂肪酸が付加したグリセロ脂質である。陸上植物において、細胞膜を構成するリン脂質には、PC、PE、PG、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、およびホスファチジン酸 (PA) が知られている。葉緑体においては、PG および糖脂質によってチラコイド膜が形成されており、主要な糖脂質として、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)、およびスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) が知られている。陸上植物において、チラコイド膜を構成する脂質や脂肪酸の合成は主に葉緑体で行われ、リン脂質および

TAG の合成は小胞体で行われている (図 1.1)。

1.2.1 脂肪酸の合成

グリセロ脂質を構成する主な脂肪酸は、多くの生物においてパルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1)、リノール酸 (18:2)、およびリノレン酸 (18:3) などの炭素数 16 または 18 の脂肪酸である (脂肪酸は X:Y の形で表し、X は炭素数を、Y は二重結合の数を示す)。陸上植物や藻類において、葉緑体内で合成される脂肪酸は、主に 16:0、18:0、18:1 の 3 種類である (図 1.2)。脂肪酸合成における基質はマロニル-[アシルキャリアータンパク質 (ACP)] であり、そのマロニル-ACP の合成は、アセチル-[補酵素 A (CoA)] カルボキシラーゼ (ACCase) およびマロニル-CoA マロニルトランスフェラーゼ (MCMT) によって行われる。ACCase によってアセチル-CoA から合成されたマロニル-CoA は (Konishi et al. 1996)、MCMT によってマロニル-ACP に変換される。3-ケトアシル-ACP 合成酵素 (KAS) によって、マロニル-ACP とアシル-ACP が縮合されると 3-ケトアシル-ACP となり、その後 3-ケトアシル-ACP レダクターゼ (KAR)、3-ヒドロキシ-ACP デヒドラターゼ (HAD)、エノイル-ACP レダクターゼ (EAR ; Mou et al. 2000) が触媒する 3 反応を経て、最終的にアシル-ACP が合成される。これら 4 つの反応を 1 サイクルとすると、1 サイクルごとにアシル-ACP のアシル基部分が 2 炭素ずつ伸長していく。KAS は KAS I / II / III の 3 種類が存在しており、それぞれ基質特異性が異なる。1 番目の縮合反応であるアセチル-CoA とマロニル-ACP との反応は KAS III が、炭素数 4 から 16 までの伸長サイクルにおける縮合反応は KAS I が、16:0-ACP から 18:0-ACP への伸長段階での縮合反応は KAS II がそれぞれ関与している (Shimakata and Stumpf 1982; Clough et al. 1992; Pidkowich et al. 2007)。18:1 は、18:0-ACP がステアロイル-ACP 不飽和化酵素 (SAD) によって不飽和化されることで合成される (Kachroo

et al. 2007)。その他の 18:2 や 18:3 などの不飽和脂肪酸は、MGDG、DGDG、PC などのグリセロ脂質の形で不飽和化を受けることで合成される。合成された 16:0-ACP および 18:1-ACP は、アシル-ACP チオエステラーゼによって、ACP が外され、それぞれ 16:0 および 18:1 となり、葉緑体外へ輸送される。陸上植物ではアシル-ACP チオエステラーゼとして FATA および FATB が同定されており、FATA は主に 18:1-ACP への、FATB は 16:0-ACP や 18:1-ACP への基質特異性を示すことが知られている (Salas and Ohlrogge 2002)。近年、脂肪酸輸送体として FAX1 が発見されたが (図 1.5 ; Li et al. 2015)、遊離脂肪酸の葉緑体外への輸送メカニズムについては未だ詳しいことが分かっていない。

1.2.2 グリセロール-3-リン酸からホスファチジン酸の合成

陸上植物における葉緑体でのグリセロ脂質合成については図 1.3 に、小胞体でのグリセロ脂質合成については図 1.4 にそれぞれまとめた。グリセロ脂質合成は、まずグリセロール-3-リン酸 (G3P) に脂肪酸を 2 分子付加することで、PA が合成される。1 番目のアシル基はグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) によって、2 番目のアシル基はリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAT) によってそれぞれ付加される。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、GPAT をコードする遺伝子として、*ATS1* および *GPAT1~9* が同定されており、葉緑体では *ATS1* (Nishida et al. 1993; Xu et al. 2006) が、小胞体では *GPAT9* (Gidda et al. 2009) がそれぞれ GPAT として機能していると考えられている。一方、*GPAT1~8* については、膜脂質の合成ではなく、クチンやスベリンなどの合成に関わっていると考えられている (Beisson et al. 2007; Li et al. 2007; Yang et al. 2010, 2012)。LPAT をコードする遺伝子としては、*ATS2* および *LPAT2~5* が同定されており、*ATS2* については葉緑体での脂質合成に関わっていることが明らかになっている (Kim and Huang 2004; Yu et

al. 2004)。LPAT2 が小胞体局在であることは実験的に明らかとなっているが、LPAT3~5 における細胞内局在については実験的に確かめられていない (Kim et al. 2005)。

G3P から PA までの経路は、葉緑体・小胞体ともに共通であるが、それぞれのオルガネラに局在する LPAT の基質特異性の違いにより、生成される PA の脂肪酸組成が異なる。葉緑体で合成された PA は *sn*-2 位に炭素数 16 の脂肪酸が付加されるが、小胞体で合成された PA は炭素数 18 の脂肪酸が付加される。このような違いから、葉緑体または小胞体での PA の合成は、それぞれ原核経路、真核経路と呼ばれて区別されてきた (図 1.5 ; Ohlrogge and Browse 1995)。しかし最近、原核経路に関わる 2 種のアシルトランスフェラーゼが、シアノバクテリア由来ではなく真核生物由来の遺伝子であることが、系統解析により判明した (Sato and Awai 2017)。したがって本論文では、Sato and Awai (2017) に則って、以前まで原核経路と呼ばれていたものを葉緑体経路、真核経路と呼ばれていたものを小胞体経路と呼ぶこととする。小胞体経路で合成された脂質の一部は、葉緑体へ輸送された後、MGDG や DGDG などへ代謝されると考えられている。陸上植物では、TGD 複合体が小胞体から葉緑体への脂質輸送における脂質トランスポーターとして働いている。TGD 複合体は TGD1~5 と名付けられた 5 つのサブユニットから構成される。TGD1~3 は ABC トランスポーター複合体を構成しており、葉緑体の内膜に局在している (Xu et al. 2005; Awai et al. 2006b; Lu et al. 2007)。一方、TGD4 は β バレル構造の膜タンパク質で、ホモダイマーを形成し、葉緑体の外膜に局在している (Wang et al. 2012)。TGD5 は近年発見されたサブユニットで、TGD1~3 複合体と TGD4 を橋渡しするような構造をしており、葉緑体の外膜から内膜への脂質輸送をスムーズにする役割をもつと考えられている (Fan et al. 2015)。TGD1~3 複合体および TGD4 は、どちらも PA との結合能をもつが (Lu and Benning 2009; Wang et al. 2012, 2013b)、実際に小胞体から葉緑体への脂質輸送が PA の形で行われているかについては、まだ実験的に証

明されていない。

1.2.3 ホスファチジン酸からの CDP-ジアシルグリセロールおよびジアシルグリセロールの合成

合成された PA は、ジアシルグリセロール (DAG) または CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) へと代謝される。PA から DAG への合成は、ホスファチジン酸ホスファターゼによって行われる。葉緑体に局在するホスファチジン酸ホスファターゼとして、PAP γ 、PAP ϵ 1、および PAP ϵ 2 が同定されている (Nakamura et al. 2007)。これらはシアノバクテリア由来の酵素として見つかったが、Sato と Awai による系統解析 (2017) によってこの点については否定された。小胞体における DAG の合成に関わる酵素として、PAH1/2 (Nakamura et al. 2009; Eastmond et al. 2010) および LPP1~4 (Pierrugues et al. 2001; Katagiri et al. 2005) が知られている。PAH1/2 は水溶性タンパク質でサイトゾルに局在している。LPP α 1~4 は膜タンパク質であるが、これらの細胞内局在は実験的には明らかになっていない。CDP-DAG の合成は CDP-ジアシルグリセロール合成酵素によって行われている。シロイヌナズナでは、5 個ある CDP-ジアシルグリセロール合成酵素のうち、CDS1~3 は小胞体に、CDS4 および CDS5 は葉緑体に局在することが分かっている (Kopka et al. 1997)。

1.2.4 葉緑体における糖脂質および PG の合成

DAG にガラクトースが付加されると MGDG や DGDG となり、スルホキノボースが付加すると SQDG となる。シロイヌナズナでは、MGDG 合成酵素として MGD1~3 が (Awai et al. 2001)、DGDG 合成酵素として DGD1 および DGD2 が同定されている (Dörmann et al. 1999; Kelly and Dörmann 2002)。これらの酵素とは別のガラクト脂質を合成する酵素として SFR2

が存在している (Moellering et al. 2010)。SFR2 は MGDG のガラクトース基を MGDG や DGDG へ転移する酵素ある。低温時には SFR2 によりガラクトースが 3 個付加したトリガラクトシルジアシルグリセロールが合成されることがある。SQDG の合成は、UDP-グルコースを UDP-スルホキノボースに変換する SQD1 (Essigmann et al. 1998) と、DAG に UDP-スルホキノボースを基質としてスルフォキノボースを DAG に付加する SQD2 (Yu et al. 2002) によって行われている。

CDP-DAG は、PGP 合成酵素によって G3P が付加され、ホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP) が合成される。シロイヌナズナの PGP 合成酵素については、PGP1 が葉緑体およびミトコンドリアに局在することが分かっており、このことからミトコンドリアにおける脂質合成系にも関与していると考えられている (Müller and Frentzen 2001; Babiychuk et al. 2003)。PGP が脱リン酸化を受けるとホスファチジルグリセロール (PG) となる。この反応を触媒する酵素であるホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼについては、近年クラミドモナス (Hung et al. 2015) およびシロイヌナズナ (Lin et al. 2016; Zhou et al. 2017) において PGPP1 が同定され、葉緑体における PG 合成に関わっていることが明らかとなった。

1.2.5 小胞体におけるリン脂質および TAG の合成

小胞体においては CDP-DAG からは PI および PG が合成され、DAG からは PE、PC、および PS が合成される。PG の合成については、葉緑体と同様の経路が小胞体にも存在しており、小胞体局在型 PGP 合成酵素として PGP2 が同定されているが (Tanoue et al. 2014)、PGP ホスファターゼについては小胞体局在を示すものは未だ同定されていない。CDP-DAG からの PI の合成は、ホスファチジルイノシトール合成酵素 1/2 (PIS1/2) によって行われている

(Collin et al. 1999; Xue et al. 2000; Löffke et al. 2008)。DAG からの PC および PE の合成は、アミノアルコールアミノホスホトランスフェラーゼ 1/2 (AAPT1/2) によって行われると考えられている。この反応では、前駆体として CDP-コリンまたは CDP-エタノールアミンが必要となる。CDP-エタノールアミンおよび CDP-コリンは、それぞれエタノールアミンおよびコリンから合成される (図 1.4B)。エタノールアミンやコリンをリン酸化する酵素として、コリン/エタノールアミンキナーゼ 1~4 (CEK1~4) が同定されている。CEK4 についてはエタノールアミンリン酸の合成を行っていると考えられているが (Lin et al. 2015; Nakamura 2017)、CEK1-4 の基質特異性などは明らかになっていない。エタノールアミンリン酸は CTP : ホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ 1 (PECT1; Mizoi et al. 2006) によって CDP-エタノールアミンに変換される。一方、CDP-コリンの合成については、CDP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ 1/2 (CCT1/2 ; Inatsugi et al. 2002) によって行われている。陸上植物はさらに、エタノールアミンリン酸をコリンリン酸へメチル化するホスホエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ 1~3 (PMT1~3) ももっている (Bolognese and McGraw 2000; Nuccio et al. 2000)。この酵素は陸上植物と一部の藻類に特有のもので、酵母やヒトには存在しない。酵母などでは、PC は PE のメチル化によっても合成されており、3 段階あるメチル化反応のうち、1 番目のメチル化はホスファチジルエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ (PEMT) によって行われているが、残りのメチル化反応はリン脂質メチルトランスフェラーゼ (PLMT) によって行われる (Klug and Daum 2014)。しかし、陸上植物の場合、PLMT のみが同定されている (Keogh et al. 2009)。したがって、PLMT の役割は、PMT1~3 の反応により生じた中間産物である CDP-モノメチルコリンが、DAG と反応して生じたモノメチル PE を PC へ代謝することであると考えられている。PS はホスファチジルセリン合成酵素 1 (PSS1) によって合成されている (Yamaoka et al. 2011)。また、その逆反応にあたる

PE から PS への脱炭酸反応は、ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ 1~3 (PSD1~3) によって触媒されている (Nerlich et al. 2007)。

陸上植物における TAG の合成は、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT; Hobbs et al. 1999; Zou et al. 1999; Routaboul et al. 1999; Bouvier-Navé et al. 2000) やホスファチジルコリン:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT; Dahlqvist et al. 2000) によって行われている。DAG にアシル基を付加する際に DGAT はアシル-CoA を基質とし、PDAT は PC に存在するアシル基を基質とする。合成された TAG は脂質顆粒 (Lipid droplet) と呼ばれるオルガネラに蓄積される。陸上植物では、TAG は種子に多く存在し、発芽時のエネルギー源として消費される (Chapman et al. 2012)。一方、藻類では栄養欠乏などのストレス環境にさらされると、細胞内に TAG を脂質顆粒の形で蓄積されることが知られている (Iwai et al. 2014; Toyoshima and Sato 2015)。陸上植物における TAG の合成には、2つの経路が存在する (Bates et al. 2013)。1つ目は G3P へのアシル化によって TAG が合成される経路である (図 1.6)。2つ目は PC を経由して TAG が合成される経路である。小胞体において、18:2 や 18:3 は、不飽和化酵素である FAD2 および FAD3 によって不飽和化されるが、これらの酵素は PC を基質としている (Browse et al. 1993; Okuley et al. 1994)。したがって、後者の経路では、不飽和化を受けた PC から、DAG を合成することができ、結果的に不飽和度の高い TAG を合成することができる。PC から DAG への代謝は、ホスホリパーゼ C (PLC) やホスホリパーゼ D (PLD) による分解や、ホスファチジルコリン:ジアシルグリセロールコリントランスフェラーゼ (PDCT ; Lu et al. 2009) による PC と DAG とのコリンリン酸の交換などによって行われている。

1.2.6 ミトコンドリアにおける脂質合成

陸上植物では、ミトコンドリアにも葉緑体とは独立した脂肪酸合成系が存在することが知られている (Wada et al. 1997; Gueguen et al. 2000)。主に膜脂質を構成する脂肪酸を合成している葉緑体脂肪酸合成系とは異なり、ミトコンドリア脂肪酸合成系では、補酵素であるリポ酸の前駆体となるオクタン酸 (8:0) の合成が主な役割であると考えられている。しかし、陸上植物におけるミトコンドリア脂肪酸合成系に関わる酵素のうち、これまでに知られている酵素は ACP、KAS および HAD のみで、その他の酵素はまだ同定されていない (Shintani and Ohlogge 1994; Yasuno et al. 2004; Meyer et al. 2007; Guan et al. 2017)。また、単離ミトコンドリアに PG やカルジオリピンの合成活性が存在することから (Frentzen and Griebau 1994; Griebau and Fretzen 1994)、ミトコンドリアにも脂質合成系が存在すると考えられている。カルジオリピンは、ミトコンドリアに特異的に存在しているグリセロ脂質であり、カルジオリピン合成酵素によって PG から合成される。ミトコンドリアにおける脂質合成に関わる酵素の多くはいまだ同定されていないが、カルジオリピン合成酵素や PG 合成に関わる PGP1 などは、ミトコンドリアに局在していることが実験的に証明されている (Xu et al. 2002; Katayama et al. 2004)。

1.2.7 脂質の分解と β 酸化

脂肪酸の分解反応である β 酸化は、陸上植物や菌類ではペルオキシソームで、動物ではペルオキシソームとミトコンドリアの両方で行われている (Graham and Eastmond 2002)。脂肪酸の β 酸化は 4 段階の反応からなり (図 1.7)、この 4 つの反応を 1 サイクルとすると、1 サイクルごとに脂肪酸のアシル基が 2 炭素分短くなるため、18:0 脂肪酸の完全分解を行う場合、8 サイクル必要となる。 β 酸化における最初の反応はアシル-CoA の酸化反応であり、

一般的にペルオキシソームではアシル-CoA オキシダーゼ (ACX) が、ミトコンドリアではアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (ACDH) が行っている。ACX による酸化反応では H_2O_2 の生成を伴うため、カタラーゼによる H_2O_2 の分解が必要となるが、ACDH による反応では電子が速やかにミトコンドリア呼吸鎖へ送られるため、 H_2O_2 は生成されない。シロイヌナズナでは ACX をコードする遺伝子として ACX1~6 が同定されており、ACX1~4 については基質特異性などの酵素学的特徴が明らかとなっている (Hayashi et al. 1999; Hooks et al. 1999; Froman et al. 2000; Eastmond et al. 2000)。ペルオキシソーム局在の ACDH としては、IBR3 が同定されているが、この酵素は脂肪酸ではなくインドール酢酸の β 酸化に関わっていると考えられている (Zolman et al. 2007)。2 段階目の反応は 2-トランス-エノイル-CoA ヒドラターゼ (ECH) による水和反応、3 段階目の反応は 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (HACDH) による酸化反応である。陸上植物では、この 2 つの反応は多機能タンパク質 2 (MFP2) によって触媒されている (Richmond and Bleecker 1999; Eastmond et al. 2000)。最後の反応は、3-ケトアシル-CoA からアセチル-CoA とアシル CoA が生成される反応で、3-ケトアシル-CoA チオラーゼ (KAT) によって触媒されている (Germain et al. 2001; Carrie et al. 2007)。

1.3 緑藻の脂質代謝について

緑藻ではクラミドモナスやクロレラなどが脂質代謝の研究に多く用いられている。クラミドモナスはクラミドモナスは、植物、酵母および動物において主要なリン脂質である PC をもたず、その代わりにベタイン脂質である 1,2-ジアシルグリセリル-*O*-4'-(*N,N,N*-トリメチル)ホモセリン (DGTS) をもつという特徴がある (Eichenberger and Boschetti 1978)。DGTS は BTA1 によって DAG から合成される (Riekhof et al. 2005b)。しかし、近年クラミドモナスの

近縁種に PC をもつものが存在することが発見され (Sakurai et al. 2014a)、これらのクラミドモナスのゲノム配列を解読した結果、PC 合成に関わる酵素が存在していることが明らかとなった (Hirashima et al. 2016)。そのうち、ホスホエタノールアミンメチルトランスフェラーゼについては、陸上植物のものと基質特異性が異なることが明らかとなっている (Hirashima et al. 2017)。またクラミドモナスは、陸上植物にはみられない 16:3(5,9,12)、16:4(4,7,10,13)、および 18:4(5,9,12,15) などの脂肪酸が検出されており、16:4(4,7,10,13) は MGDG に特異的に存在する脂肪酸である。藻類では、窒素やリンなどが欠乏した環境下に置かれると TAG を蓄積することが知られており、クラミドモナスでもこの現象が見られる (Sakurai et al. 2014b; Iwai et al. 2014; Toyoshima and Sato 2015)。多くの藻類では、TAG を含む脂質顆粒はサイトゾルに蓄積されるが、クラミドモナスでは葉緑体とサイトゾルの両方に脂質顆粒が合成されるという報告もあった。しかし、電子顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いた詳細な観察によって、クラミドモナスの脂質顆粒はサイトゾルにのみ局在しており、そのうちいくつかの脂質顆粒は葉緑体のくぼみに入り込んでいるために、葉緑体に局在するように見えていたことが明らかとなった (Moriyama et al. 2017)。

1.4 紅藻の脂質代謝について

シアニジオシゾンの脂質代謝において特に興味深い特徴は、18:1 や 18:2 などの不飽和脂肪酸が葉緑体ではなく、小胞体のみで合成されている点である (Sato and Moriyama 2007)。通常、陸上植物や緑藻の葉緑体には、ステアロイル-ACP 不飽和化酵素が存在しており、ステアロイル-ACP (18:0-ACP) からオレオイル-ACP (18:1-ACP) への不飽和化を触媒しているが、シアニジオシゾンを含む紅藻の葉緑体には、この不飽和化酵素が存在しない (Sato et al. 2017)。そのため、葉緑体で合成される脂肪酸は飽和脂肪酸のみであると推定されている。

さらに、シアニジオシゾンの場合、18:2 の合成に関わる不飽和化酵素が小胞体に局在していることから、葉緑体で行われているガラクト脂質の合成は、16:0 は葉緑体から、18:2 は小胞体からそれぞれ供給されていると考えられている。このガラクト脂質の合成経路は、陸上植物の葉緑体経路と区別して ‘Coupled pathway’ と呼ばれている (Sato and Moriyama 2007)。シアニジオシゾンでは、ガラクト脂質の合成に関わる遺伝子がシアノバクテリア型と植物型が混在している。MGDG 合成酵素は植物型 MGD1 をもつが、DGDG 合成酵素は葉緑体ゲノムにコードされたシアノバクテリア型の *dgdA* 遺伝子をもつ (Sakurai et al. 2007; Sato and Awai 2016)。さらにシアノバクテリアにおける MGDG 合成に関わる 2 種の遺伝子 (*mgdA* および *mgdE*; Awai et al. 2006a, 2014) のうち、*mgdA* のホモログも存在することがわかっている (Sato and Moriyama 2007)。SQDG の合成に関わる遺伝子については、シアニジオシゾンの *SQD1* および *SQD2* が、シアノバクテリアの SQDG 合成遺伝子欠損株を相補することが報告されている (Sato et al. 2016a)。リン脂質の合成については、シアニジオシゾンは陸上植物とは異なり、PC の合成が PE のメチル化によってのみ行われていることが、 $[^{32}\text{P}]$ リン酸を用いたラベル実験によって実験的に確かめられている (Sato et al. 2016b)。シアニジオシゾンは、クラミドモナスなどと同様に、栄養欠乏時にサイトゾルに TAG を蓄積することが知られており (Toyoshima et al. 2016; Takusagawa et al. 2016)、バイオ燃料生産を目的とした遺伝子改変による TAG 合成能の強化についてもいくつか報告されている (Imamura et al. 2015; Sumiya et al. 2015)。

1.5 本研究の目的

以上のことを踏まえて、本研究では単細胞紅藻シアニジオシゾンを用いた解析により、陸上植物や緑藻とは異なる独自の進化を遂げてきた紅藻のグリセロ脂質代謝についての特

徴を明らかにすることを目的とした。第 2 章では、シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素について比較ゲノム解析および細胞内局在解析を行い、脂質代謝についての基礎的なデータをまとめた。第 3 章では、比較ゲノム解析を用いてその他の紅藻の脂質代謝関連酵素を探索し、シアニジオシゾンと比較することで、紅藻の脂質代謝の特徴を調べた。第 4 章では、単離葉緑体を用いた代謝フロー解析を行い、葉緑体での脂肪酸および脂質合成についての特徴を明らかにした。

1.6 図

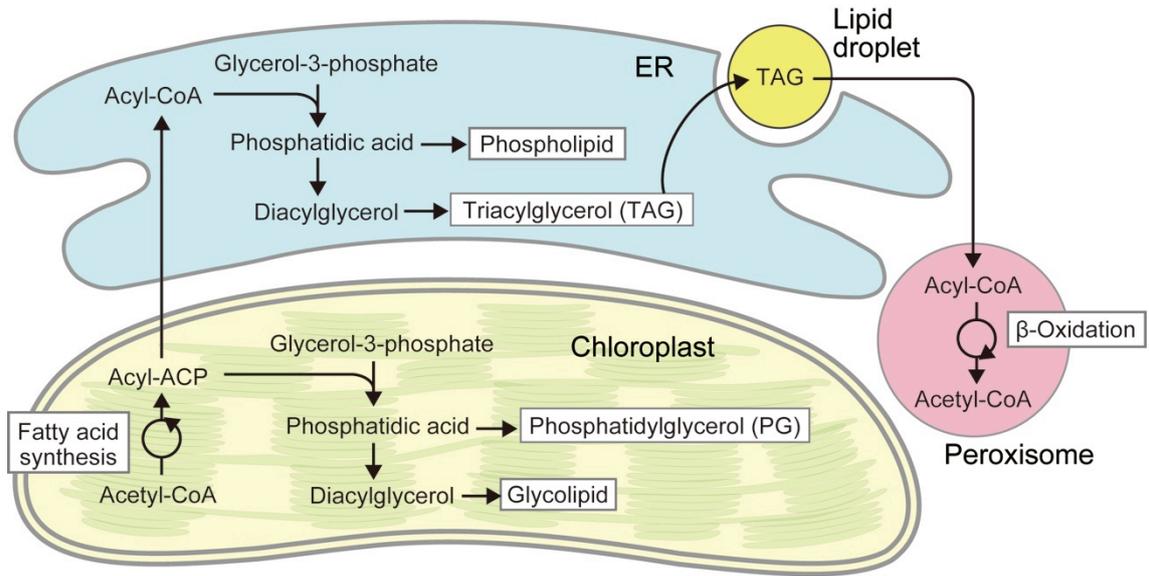


図 1.1 陸上植物における脂質代謝

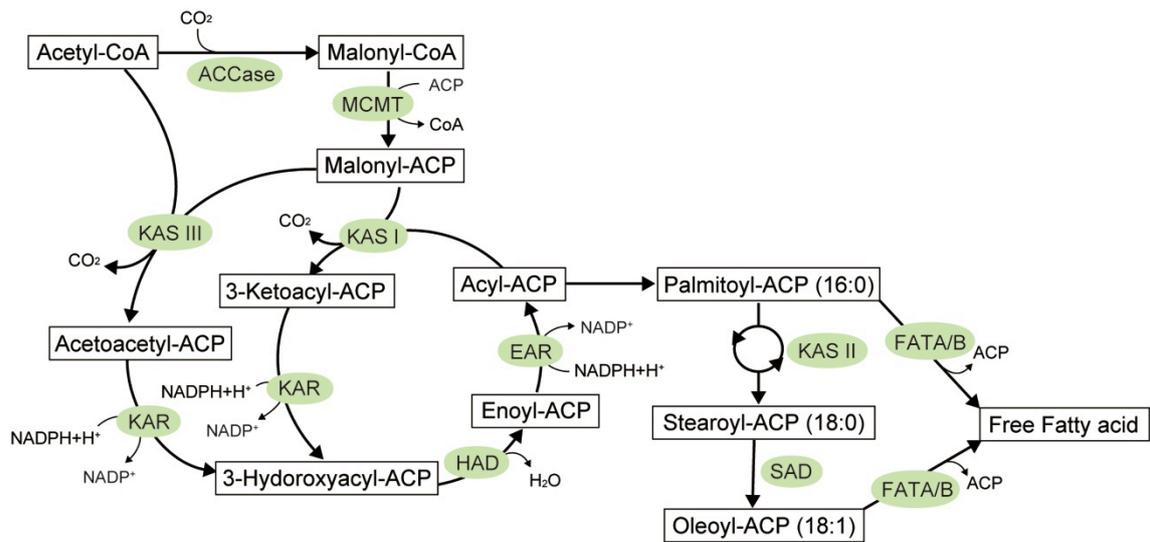


図 1.2 陸上植物における脂肪酸合成

略語および酵素名：ACCase, アセチル-CoA カルボキシラーゼ；ACP, アシルキャリアータンパク質；EAR, エノイル-ACP レダクターゼ；FATA/B, 脂肪酸-ACP チオラーゼ A/B；HAD, 3-ヒドロキシアシル-ACP デヒドロゲナーゼ；KAR, 3-ケトアシル-ACP レダクターゼ；KAS I/II/III, 3-ケトアシル-ACP 合成酵素 I/II/III；MCMT, マロニル-CoA:ACP マロニルトランスフェラーゼ；SAD, ステアロイル-ACP 不飽和化酵素

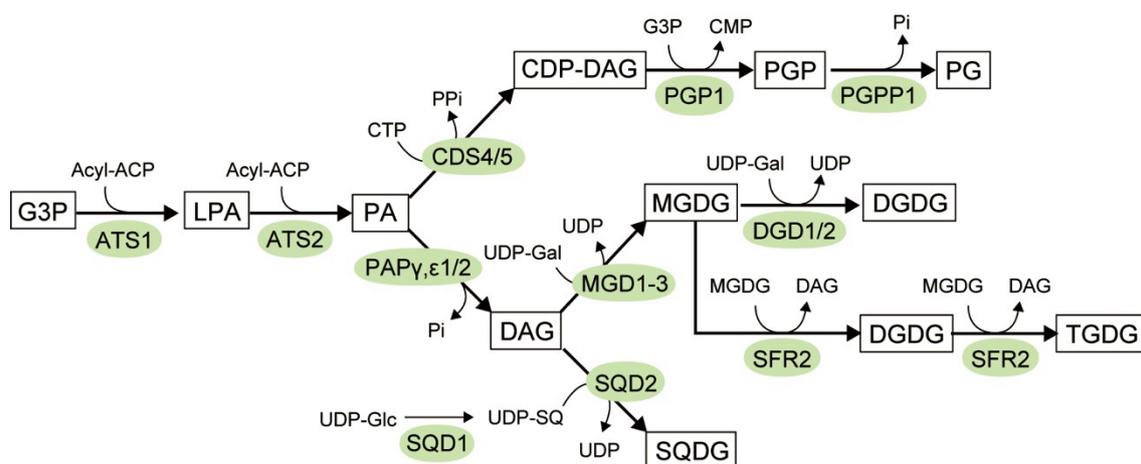


図 1.3 陸上植物における葉緑体での脂質合成

略語および酵素名：ATS1、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ；ATS2、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ；CDP-DAG、CDP-ジアシルグリセロール；CDS4-5、CDP-ジアシルグリセロール合成酵素 4-5；DAG、ジアシルグリセロール；DGD1/2、ジガラクトシルジアシルグリセロール合成酵素；DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール；G3P、グリセロール-3-リン酸；LPA、リゾホスファチジン酸；MGD1-3、モノガラクトシルジアシルグリセロール合成酵素；MGDG、モノガラクトシルジアシルグリセロール；PAP γ,ϵ 1/2、ホスファチジン酸ホスファターゼ γ,ϵ 1/2；PA、ホスファチジン酸；PGP1、ホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素；PGPP1、ホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼ；PGP、ホスファチジルグリセロールリン酸；PG、ホスファチジルグリセロール；SFR2、ガラクト脂質：ガラクト脂質ガラクトシルトランスフェラーゼ；SQD1、UDP-スルホキノボース合成酵素 SQD2、スルホキノボシルジアシルグリセロール合成酵素；SQDG、スルホキノボシルジアシルグリセロール；TGDG：トリガラクトシルジアシルグリセロール；UDP-Gal、UDP-ガラクトース；UDP-Glc、UDP-グルコース；UDP-SQ、UDP-スルホキノボース

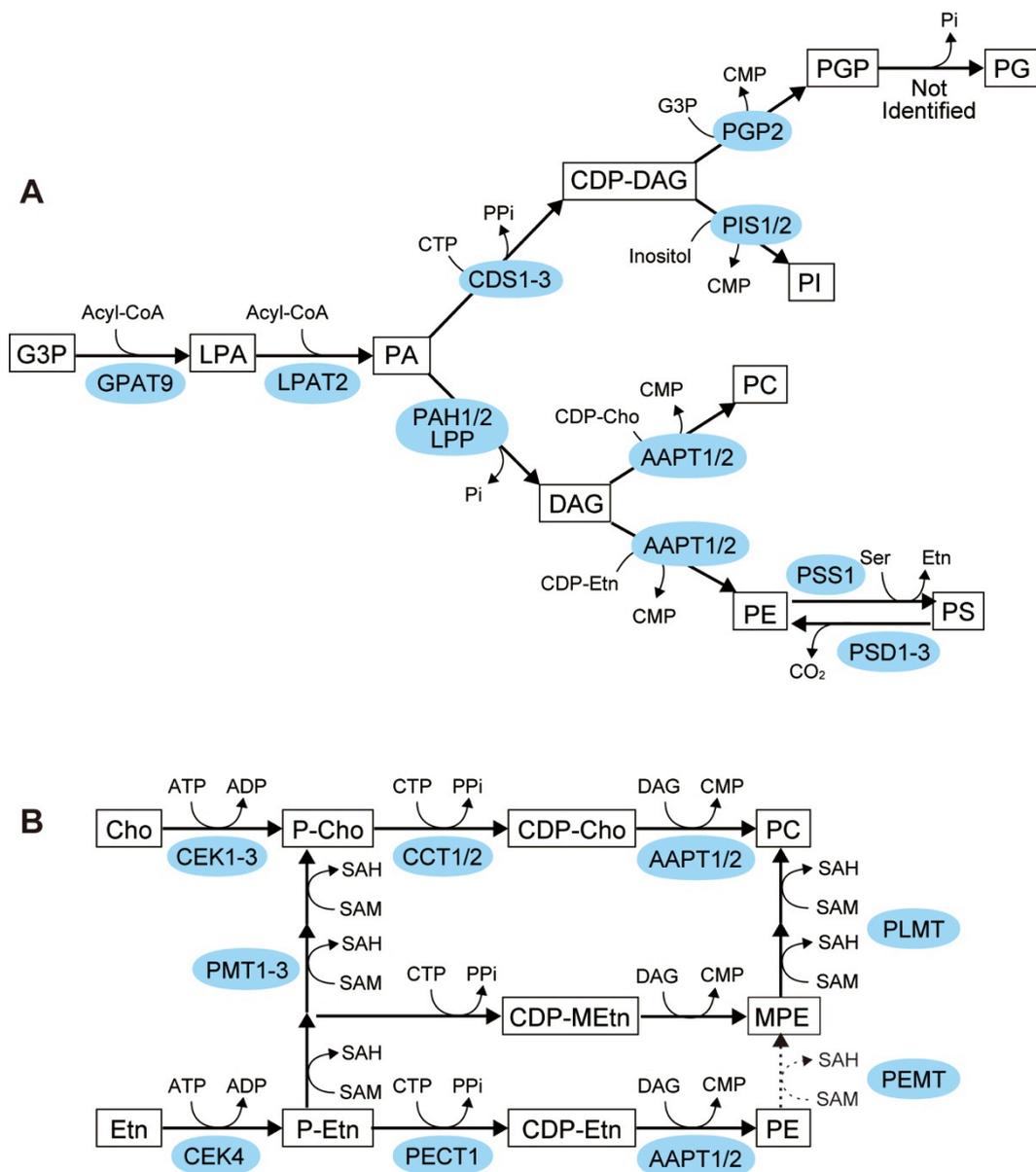


図 1.4 陸上植物における小胞体でのリン脂質合成

A は陸上植物におけるリン脂質の合成経路を示す。小胞体局在の PGPP はまだ同定されていない。PC および PE については詳細な合成経路を B に示す。陸上植物には PE メチルトランスフェラーゼ (PEMT) が存在しないが、PC をもつクラミドモナスでは PEMT をコードする遺伝子がいくつか同定されている。略語および酵素名 : AAPT1/2、ジアシルグリセロールコリン (エタノールアミン) ホスホトランスフェラーゼ ; CCT1/2, ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ 1/2 ; CDP-Cho, CDP-コリン ; CDP-DAG、CDP-ジアシルグリセロール ; CDP-Etn, CDP-エタノールアミン ; CDP-MEtn、CDP-モノエタノールアミン ; CDS1-3、CDP-ジアシルグリセロール合成酵素 1-3 ; CEK1-3、コリンキナーゼ ; CEK4、エタノールアミンキナーゼ ; Cho, コリン ; Cho-P, コリンリン酸 ; DAG、ジアシルグリセロール ; Etn, エ

タノールアミン ; Etn-P, エタノールアミンリン酸 ; G3P、グリセロール-3-リン酸 ; GPAT9、
グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ 9 ; LPAT2、リゾホスファチジン酸アシル
トランスフェラーゼ 2 ; LPA、リゾホスファチジン酸 ; MPE、ホスファチジルモノメチルエ
タノールアミン ; PAH1/2, LPP、ホスファチジン酸ホスファターゼ ; PA、ホスファチジン酸 ;
PC、ホスファチジルコリン ; PECT1、ホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラー
ゼ 1 ; PEMT、ホスファチジルエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ ; PE、ホスファ
チジルエタノールアミン ; PGP2、ホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素 2 ; PGP、ホ
スファチジルグリセロールリン酸 ; PG、ホスファチジルグリセロール ; PIS1/2、ホスファ
チジルイノシトール合成酵素 1/2 ; PI、ホスファチジルイノシトール ; PLMT、リン脂質メ
チルトランスフェラーゼ ; PSD1-3、ホスファチジルセリン脱水素酵素 1-3 ; PSS1、ホスファ
チジルセリン合成酵素 1 ; PS、ホスファチジルセリン ; SAH、S-アデノシルホモシステイン ;
SAM、S-アデノシルメチオニン

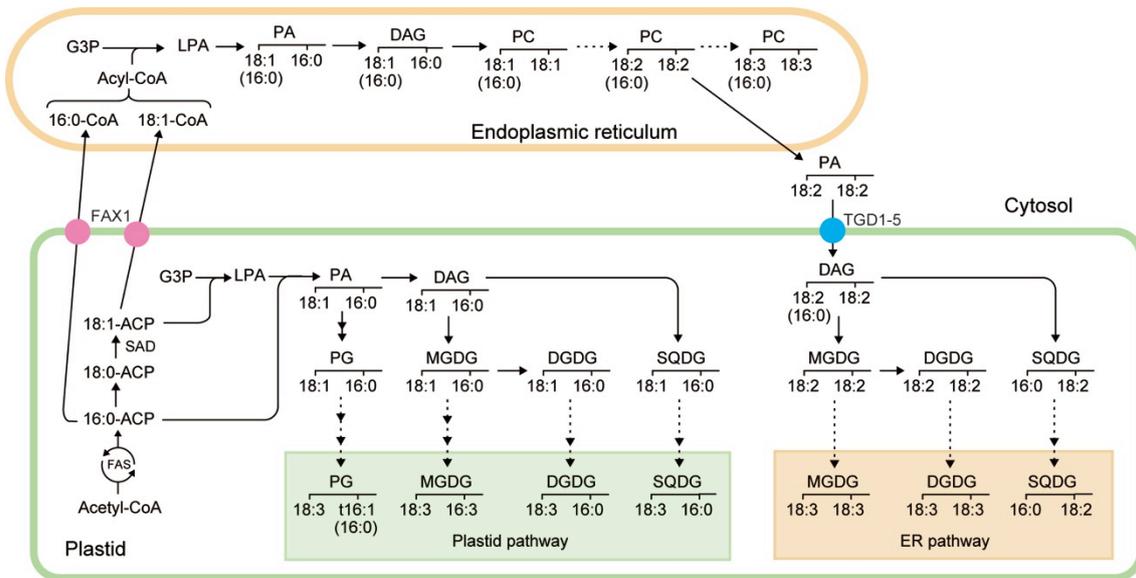


図 1.5 陸上植物における葉緑体経路および小胞体経路を経由した葉緑体脂質の合成 (Ohlrogge and Browse (1995) より一部改変)

各脂質の脂肪酸は左側が *sn-1* 位、右側が *sn-2* 位に付加したものを示す。点線は不飽和化反応を示す。略語および酵素名：ACP, アシルキャリアータンパク質；DAG, ジアシルグリセロール；DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール；FAS; 脂肪酸合成；FAX1, 脂肪酸トランスポーター；G3P, グリセロール 3-リン酸；LPA, リゾホスファチジン酸；MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール；PA, ホスファチジン酸；PC, ホスファチジルコリン；PG, ホスファチジルグリセロール；SAD, ステアロイル-ACP 不飽和化酵素；SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール；TGD1~5, トリガラクトシルジアシルグリセロール 1~5 (PA トランスポーター)

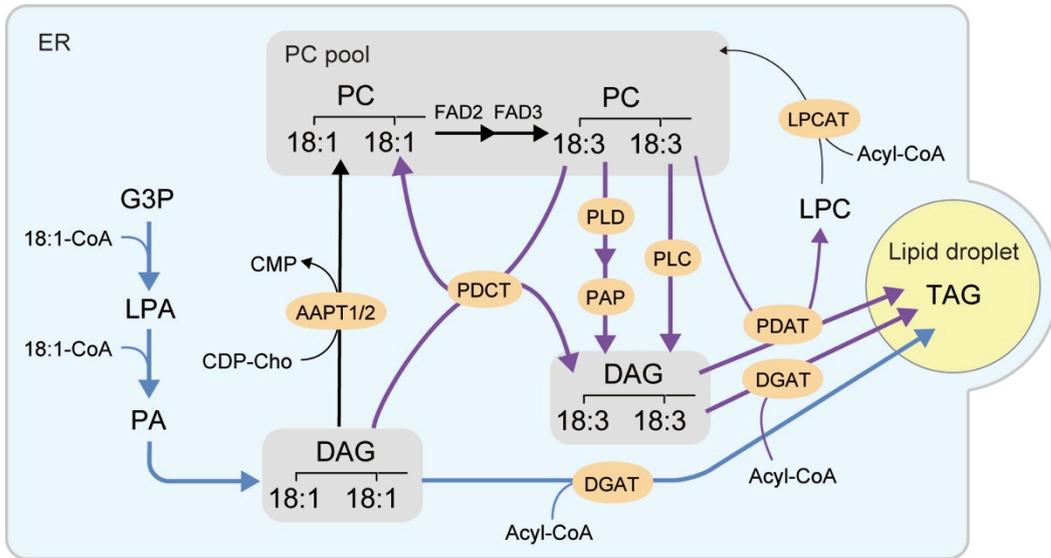


図 1.6 陸上植物における TAG の合成 (Bates et al. (2013) より一部改変)

PCおよびDAGの脂肪酸はそれぞれ左側が *sn*-1位、右側が *sn*-2位に付加したものを示す。G3Pのアシル化によるTAGの合成は青の矢印で、PCを経由したTAGの合成は紫の矢印で示した。略語および酵素名：AAPT1/2, ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ；CDP-Cho, CDP-コリン；DAG, ジアシルグリセロール；DGAT, ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ；G3P, グリセロール3-リン酸；LPA, リゾホスファチジン酸；LPC, リゾホスファチジルコリン；LPCAT, リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ；PA, ホスファチジン酸；PAP, ホスファチジン酸ホスファターゼ；PC, ホスファチジルコリン；PDAT, リン脂質:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ；PDCT, ホスファチジルコリン:ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ；PLC, ホスホリパーゼC；PLD, ホスホリパーゼD

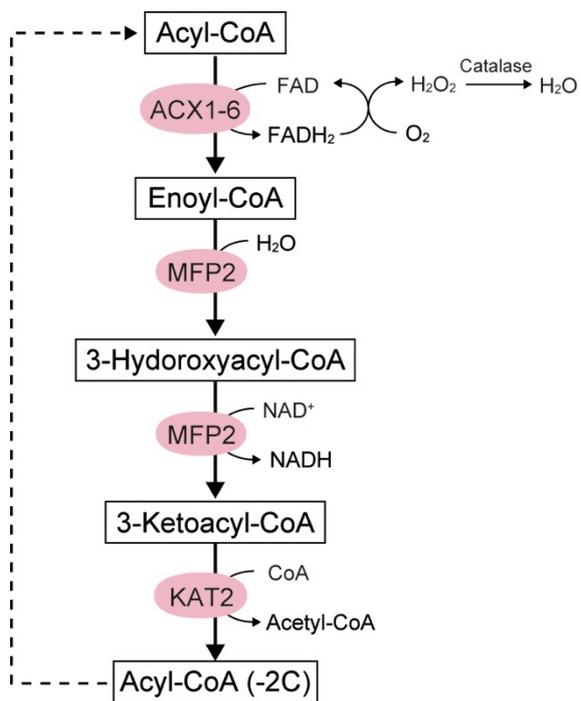


図 1.7 ペルオキシソームにおける β 酸化

酵素名 : ACX1-6, アシル-CoA オキシダーゼ 1-6 ; KAT2, 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ 2 ;
MFP2, 多機能タンパク質 2

第2章

シアニジオシゾンにおける 脂質代謝関連酵素の比較ゲノム解析と 細胞内局在解析

2.1 序文

第1章で述べたように、陸上植物や藻類における脂質代謝は葉緑体や小胞体、ミトコンドリアなどのさまざまなオルガネラが関わっており、またオルガネラによって脂質代謝における役割が異なる。したがって、脂質代謝に関わる酵素がどのオルガネラに局在するのかが、その酵素を特徴づける重要な要素の一つであるといえる。

酵素の細胞内局在を調べる方法として最も簡便なものに、細胞内局在予測ソフトウェアを用いた解析がある (Emanuelsson et al. 2000; Horton et al. 2007)。これらのソフトウェアは、酵素のアミノ酸配列の *N* 末端あるいは *C* 末端に存在するシグナル配列を特定し、その結果からどのオルガネラに局在するのかを予測する。しかし、現在使用されている局在予測ソフトウェアのほとんどは、陸上植物のシグナル配列を基に作製されたものであるため、藻類におけるタンパク質の場合には、ソフトウェアによる推測が実際の局在解析結果と異なることが多い。近年では、緑藻クラミドモナスのプロテオーム解析データを基に、緑藻のタンパク質に特化した局在予測ソフトウェアが開発されている (Tardif et al. 2012)。

シアニジオシゾンは細胞構造が単純なため (Misumi et al. 2005)、オルガネラの観察が容易である点や、形質転換も比較的簡便に行うことができる点から (Ohnuma et al. 2008)、GFP

を用いた細胞内局在解析に適した紅藻である。また、シアニジオシズンはイントロンが非常に少ないため (Matsuzaki et al. 2004)、遺伝子のコード領域の決定が比較的簡便であること、遺伝子重複が少ないため、解析候補となる遺伝子が陸上植物などに比べて少ないと予想されることから、本研究のような網羅的な解析も可能である。以上の理由から、シアニジオシズンの脂質代謝における代謝経路図を作成し、それを陸上植物や緑藻、動物などと比較することで、紅藻における脂質代謝の特徴を明らかにすることを目的として、陸上植物であるシロイヌナズナの既知の脂質代謝関連酵素をもとに、シアニジオシズンのもつオーソログについて調べた比較ゲノムデータベースを作成し、さらにそこに含まれる酵素について細胞内局在解析を行い、シアニジオシズンの脂質代謝関連酵素についての基礎的なデータをまとめることとした。

2.2 材料と方法

2.2.1 脂質代謝関連酵素の探索

脂肪酸、糖脂質、リン脂質および中性脂質の合成に関わる酵素や、脂質分解、 β 酸化、脂質輸送などに関わる酵素を脂質代謝関連酵素とし、それらについての比較ゲノムデータベースを作成した。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の既知の脂質代謝関連酵素をもとに、シアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 や *Anabaena* sp. PCC 7120、紅藻シアニジオシズン (*Cyanidioschyzon merolae* 10D)、緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* CC-503) のもつオーソログを、Gclust データベース (Sato 2009; <http://gclust.c.u-tokyo.ac.jp/>) のデータセット Gclust2012_42 を用いて探索した。そこで見出されたシアニジオシズンの脂質代謝関連酵素を細胞内局在解析の解析候補としたが、そのうちの葉緑体ゲノムにコードされている酵素については、葉緑体に局在することが確実であ

るため、解析候補から除外した。シアニジオシゾンやシロイヌナズナのゲノム情報は、*Cyanidioschyzon merolae* Genome Project (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>) や TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)、KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>) から入手した。

2.2.2 遺伝子コンストラクトの作製

GFP コンストラクトの作製

シアニジオシゾンの GFP ベクターである pCG1 は、*APCC* プロモーターの下流に *sGFP(S65T)*、*NOS* ターミネーターをもつ (Watanabe et al. 2011)。しかし、シアニジオシゾンの場合、*sGFP(S65T)*との融合タンパク質を強制的に発現させても、GFP 蛍光が弱く観察が困難であったため、pCG1 ベクターの *sGFP (S65T)* 遺伝子を *EGFP* 遺伝子に入れ替えたベクターを作製した (以後、pCEG1 ベクターと呼ぶ)。pCEG1 ベクターの作製に使用したプライマーの配列は表 2.4 に示す。まず、pCG1 ベクターの *sGFP (S65T)* 遺伝子以外の部分を、プライマー No.1 および No.2 を用いて PCR により増幅した。*EGFP* 遺伝子は、pEGFP ベクター (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) を鋳型とし、プライマー No.3 および No.4 を用いた PCR によって増幅した。それぞれの PCR 産物は Infusion Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いてクローニングし、得られたプラスミドは Quantun Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて精製した。

細胞内局在解析は、シグナル配列が存在すると推定される解析候補酵素の *N* 末端延長配列部分を、EGFP の *N* 末端に付加するように挿入した EGFP コンストラクトを用いて行った (図 2.1A)。まず、Clustal X 2.0.10 (Larkin et al. 2007) を用いて解析候補酵素のアライメントを作製し、*N* 末端延長配列部分を特定した。アライメントによって *N* 末端延長配列が特定できなかった酵素は、*N* 末端から 30~60 アミノ酸残基部分を pCEG1 ベクターに挿入した。

N末端配列部分をコードする DNA 断片は、シアニジオシゾンゲノムを鋳型とし、それぞれの配列に特異的なプライマー (表 2.5) を用いて、PCR によって増幅した。ここで得られた PCR 産物と、あらかじめ *XbaI* を用いて *APCC* プロモーターと *EGFP* との間に切断しておいた直鎖 pCEG1 ベクターを、Infusion Cloning Kit によってクローニングした。

一部の β 酸化関連酵素については、C 末端部分にペルオキシソームへのシグナル配列が存在する可能性があったため、解析候補酵素の C 末端部分を挿入した GFP コンストラクトを作製し、局在解析に使用した (図 2.1B)。解析候補酵素の C 末端から 67 アミノ酸残基までに対応する DNA 配列をインサートとした。その部分をコードする DNA 断片は、シアニジオシゾンゲノムを鋳型として、それぞれの配列に特異的なプライマー (表 2.5) を用いて、PCR によって増幅した。ベクターは、*NotI* で処理した pCEG1 を鋳型とし、プライマー No.5 および No.6 を用いた PCR によって増幅した (表 2.4)。それらの PCR 産物を上記と同様の方法を用いてクローニングし、ミニプレップ法によって GFP コンストラクトを精製した。

3×ヘマグルチニン (HA) タグコンストラクトの作製

シアニジオシゾンの 3×HA タグベクターである pBSHAb-T3' (Ohnuma et al. 2008) は、強制発現用プロモーターをもっていなかったため、*APCC* プロモーターを挿入した pBSHAb-T3' を作製した (以後、pBSHAb-T3'_2 と呼ぶ)。pBSHAb-T3'_2 ベクターの作製に使用したプライマーの配列は表 2.4 に示す。pBSHAb-T3' を *SacII* および *PasI* で制限酵素処理した後、アルカリホスファターゼを用いて、制限酵素切断部位の脱リン酸化を行った。*APCC* プロモーターは、pCG1 ベクターを鋳型として、プライマー No.7 および No.8 を用いて PCR で増幅した後、*SacII* および *PasI* を用いて制限酵素処理を行った。制限酵素処理済みの pBSHAb-T3' と PCR 産物でライゲーションを行い、コンピテントセル (DH5 α) に形質転換した。プラス

ミドは Quantun Prep Plasmid Miniprep Kit を用いて精製した。

3×HA タグコンストラクトに挿入するインサートは、解析候補遺伝子の全長とし、それぞれの配列に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した (表 2.5)。pBSHAb-T3' _2 を *PacI* で制限酵素処理しておき、In-Fusion Cloning Kit を用いて 3×HA タグが解析候補酵素の C 末端に付加するように、PCR 産物を挿入した (図 2.1C)。

2.2.3 培養

シアニジオシゾン細胞は、100 ml の 2×Allen 培地 (pH 2.5 ; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0.05 μM FeCl₃, 0.01 μM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) · 2Na, 200 nM CuSO₄, 360 nM ZnSO₄, 160 nM Na₂MoO₄, 300 nM CoCl₂, 16 μM H₃BO₃, 3.2 μM MnCl₂) で、50 μmol/m²/s の光を連続照射し、40 °C の条件で振盪培養することにより維持した。

2.2.4 ゲル板を用いた高密度培養

シアニジオシゾン細胞は、40 ml の 2×Allen 培地で、50 μmol/m²/s、40 °C、1%CO₂ の条件で OD₇₅₀=1~2 になるまで、試験管を用いて通気培養した。その後、シアニジオシゾン細胞を遠心して集藻し (1680 ×g、5 分間、30 °C)、培地を捨て、新鮮培地で OD₇₅₀=10 になるように細胞濃度を調整した。高密度培養装置は、ゲル板の間隙が 2 mm のポリアクリルアミドゲル電気泳動用のゲル板 (10 cm × 10 cm) をもとに作製した (図 2.1D ; Moriyama et al. 2015)。1%CO₂ を通気するため、ゲル板にシリコンチューブ (0.8 mm wall, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を通し、さらにゲル板の開口部には、シリコン製の厚さ 2 mm の専用スペーサーを取り付けた。濃度調整したシアニジオシゾンの培養液を、高密度培養装置に 9 ml

流し込み、側面から LED ランプにより $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光を照射した。培養温度は 42°C に設定し、 $1\%\text{CO}_2$ を含む空気を通気して培養した。形質転換には明期 12 時間後の細胞を使用した。

2.2.5 形質転換

シアニジオシゾン細胞への GFP コンストラクトまたは 3×HA タグコンストラクトの導入は、ポリエチレングリコール法 (Ohnuma et al. 2008) を用いて行った。GFP または 3×HA タグとの融合タンパク質は、APCC プロモーターを用いて一過的に発現させた。精製した GFP コンストラクトまたは 3×HA タグコンストラクト ($10\sim 50 \mu\text{g}$) を $110 \mu\text{l}$ なるように調整し、そこに熱変性処理したサケ精子 DNA 水溶液 ($4 \text{ mg}/\text{ml}$) を $25 \mu\text{l}$ 、 $10\times\text{MA-I}$ ($\text{pH } 2.0$; $200 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $20 \text{ mM } \text{MgSO}_4$, $6.4 \mu\text{M } \text{CuSO}_4$, $15.4 \mu\text{M } \text{ZnSO}_4$, $33.2 \mu\text{M } \text{Na}_2\text{MoO}_4$, $3.4 \mu\text{M } \text{CoCl}_2$, $920 \mu\text{M } \text{H}_3\text{BO}_3$, $180 \mu\text{M } \text{MnCl}_2$) を $15 \mu\text{l}$ 、高密度培養したシアニジオシゾン培養液を $100 \mu\text{l}$ 加えて、軽く混合した。そこに 40°C に保温しておいたポリエチレングリコール溶液 (60% PEG4000 MA-I 溶液) を $250 \mu\text{l}$ 加えて、すばやく 3 回転倒混和させた後、 40 ml の MA 培地 (Minoda et al. 2004; $\text{pH } 2.5$; $20 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $4 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4$, $2 \text{ mM } \text{MgSO}_4$, $1 \text{ mM } \text{CaCl}_2$, $0.1 \mu\text{M } \text{FeCl}_3$, $0.075 \mu\text{M } \text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$, $640 \text{ nM } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $1540 \text{ nM } \text{ZnSO}_4$, $3320 \text{ nM } \text{Na}_2\text{MoO}_4$, $340 \text{ nM } \text{CoCl}_2$, $92 \mu\text{M } \text{H}_3\text{BO}_3$, $18 \mu\text{M } \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) に移し、 $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 40°C 、 $1\%\text{CO}_2$ の条件で、一晚通気培養した。GFP コンストラクトを形質転換したシアニジオシゾン細胞は、復帰培養後に遠心 ($200 \times g$ 、10 分間、 30°C) したあと、蛍光顕微鏡を用いて GFP 蛍光を観察した。GFP の蛍光が弱く観察が困難な場合は、集めた細胞を固定して免疫染色を行った。3×HA タグコンストラクトを形質転換したシアニジオシゾン細胞は、復帰培養後にその細胞を固定して免疫染色を行った。

2.2.6 免疫染色

復帰培養後のシアニジオシゾン細胞を遠心 (800 ×g、5 分間、30 °C) して、100 μl まで濃縮したあと、予め -80 °C に冷却しておいた 1 ml の固定液 (1%パラホルムアルデヒド; w/v、10%ジメチルスルホキシド; v/v メタノール溶液) を加え、軽く転倒混和させて-20 °C で 5 分間冷却した。その後細胞を-80 °C で冷却したメタノールで 2 回、PBS 緩衝液 (pH 7.2 ; 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.04 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM K₂HPO₄) で 1 回洗浄した。その際、細胞を集めるために、2000 ×g、3 分間、4 °C で遠心した。以後の遠心は全てこの条件で行った。洗浄した細胞を 50 μl の PBS 緩衝液に溶解した 5%ウシ血清アルブミン (BSA) に懸濁し、15 分間室温に置いてブロッキングを行った。ブロッキング後の細胞は、PBS 緩衝液に溶解した 0.1% BSA (以後 0.1%BSA 溶液とする) で 2 回洗浄したあと、50 μl の Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B (Toyobo, Osaka, Japan) で 1/200 に希釈した一次抗体 (抗 GFP 抗体または抗 HA 抗体) に懸濁し、1 時間室温に置いた。その後、0.1% BSA 溶液で 2 回洗浄したあと、50 μl の Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B で 1/200 に希釈した Alexa flour 488 結合抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) に懸濁し、さらに 1 時間室温に置いた。最後に 0.1% BSA 溶液で 2 回洗浄した後、20 μl の退色防止剤 (Slow Fade Gold Antifade Reagent with DAPI; Molecular Probes) に懸濁し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2.2.7 チラミド法を用いた免疫染色の増感

通常の免疫染色では蛍光強度が弱く観察しにくいサンプルについては、TSA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて免疫染色の増感を行った。上記と同様の方法で固定

を行ったシアニジオシゾン細胞は、メタノールで 2 回、PBS 緩衝液で 1 回洗浄した。その後、50 μ l の PBS 緩衝液に溶かした 1%ブロッキング試薬 (以後 1%ブロッキング溶液) に懸濁し、室温で 1 時間ブロッキングした。そこに 50 μ l の 1%ブロッキング溶液で希釈した抗 HA 抗体 (1/200 倍希釈) を加え、30 分から 1 時間室温に置いた。PBS 緩衝液で 3 回洗浄した後、1%ブロッキング溶液で 1/100 に希釈した Horse Radish Peroxidase 結合二次抗体を 50 μ l 加え、30 分間室温に置いた。PBS 緩衝液で 3 回洗浄した後、0.0015% H_2O_2 溶液で 1/100 に希釈したチラミド溶液を 50 μ l 加え、遮光した状態で 10 分間室温に置いた。最後に PBS 緩衝液で 3 回洗浄し、20 μ l の退色防止剤 (Slow Fade Gold Antifade Reagent with DAPI) に懸濁して、蛍光を観察した。

2.2.8 蛍光顕微鏡観察

形質転換後や免疫染色後のシアニジオシゾン細胞は、蛍光顕微鏡 BX-60 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。画像取得は CCD カメラ DP70 (Olympus) を用いて行った。フィコビリןやクロロフィルの自家蛍光は U-MWIG キューブ (Olympus; 励起波長 530~550 nm、透過波長 570 nm 以上) を用いて検出した。GFP や Alexa flour 488 の蛍光は U-MNIBA キューブ (Olympus; 励起波長 470~495 nm、透過波長 510~550 nm) を用いて検出した。

2.3 結果

2.3.1 脂質代謝関連酵素の比較ゲノム解析

本研究では、まず解析候補となる脂質代謝関連酵素における比較ゲノムデータベースを作成した (表 2.1)。その際、脂肪酸、糖脂質、リン脂質、中性脂質の合成に関わる酵素や、脂質分解、 β 酸化、脂質輸送などに関わる酵素を脂質代謝関連酵素とし、シロイヌナズナの既知の脂質代謝関連酵素をもとに、シアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 および *Anabaena* sp. PCC 7120、シアニジオシゾン、クラミドモナスのもつオーソログを、Gclust データベースを用いて探索した。その結果、シロイヌナズナでは 328 個、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では 54 個、*Anabaena* sp. PCC 7120 では 59 個、シアニジオシゾンでは 124 個、クラミドモナスでは 135 個の脂質代謝関連酵素が見出された。これらシアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素 124 個のうち、9 個は葉緑体ゲノムにコードされた酵素であった。115 個のシアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素について、GFP や HA タグを用いた細胞内局在解析を行った。その際、葉緑体ゲノムにコードされている 9 個の酵素については、葉緑体局在であることが確実であるため、細胞内局在解析の対象から外した。

2.3.2 シアニジオシゾンにおける脂質代謝関連酵素の細胞内局在解析

シアニジオシゾンにおける脂質代謝関連酵素の細胞内局在を解析するために、GFP コンストラクトまたは 3×HA タグコンストラクトをシアニジオシゾン細胞に導入し、それらの融合タンパク質を APCC プロモーター (Watanabe et al. 2011) によって一過的に発現させた。図 2.2 はシアニジオシゾンにおける GFP を用いた細胞内局在解析の例を示す。それぞれ上からマロニル-CoA : ACP マロニルトランスフェラーゼ (MCMT; CMT240C) は葉緑体局在の、ホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ (ECT ; CMS052C) はミトコンド

リア局在の、多機能型 ACCase (ACC1; CMM188C) はサイトゾル局在の、ホスファチジン酸ホスファターゼ (PAP; CMT239C) およびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT; CMQ199C) は小胞体局在の、カタラーゼ (CMI050C; Imoto et al. 2013) はペルオキシソーム局在の、フリッパーゼ (ARA1; CMR306C) は小胞体と細胞膜の両局在の例を示している。シアニジオシゾンの小胞体は、核の周りを取り囲むようにして観察されることが報告されているため (Yagisawa et al. 2012)、CMT239C のように核の周辺が丸く光ったものは、小胞体局在であるとした。また、CMQ199C のように、サイトゾル部分にもやのようにして GFP 蛍光が観察される場合もあった。サイトゾル局在を示す場合は、多機能型 ACCase (ACC1; CMM188C) のように、サイトゾル部分全体が均一に光っているように観察される。したがって、CMQ199C のようにサイトゾル部分にもやのような蛍光が観察されたものについては、小胞体の一部が光っていると考えられるため、小胞体局在であると判断した。その他の脂質代謝関連酵素の細胞内局在解析の結果は表 2.2 および図 2.3~2.9 に示す。

2.3.3 脂肪酸の合成・伸長

シアニジオシゾンにおいて、脂肪酸合成に関わる酵素として検出されたマロニル-CoA : ACP マロニルトランスフェラーゼ (図 2.2B ; MCMT; CMT420C)、3-ケトアシル-ACP レダクターゼ (KAR; CMS393C)、ヒドロキシアシル-ACP デヒドロゲナーゼ (HAD; CMI240C)、エノイル-CoA レダクターゼ (EAR; CMT380C)、アシル-ACP チオエステラーゼ (AAT; CMH111C) は、それぞれ葉緑体局在を示した (図 2.3A)。また、シアニジオシゾンには陸上植物同様、マルチサブユニット型アセチル-CoA カルボキシラーゼおよび多機能型アセチル-CoA カルボキシラーゼの2種類が存在することが分かった (表 2.1)。多機能型アセチル-CoA カルボキシラーゼをコードする遺伝子としては *CMM188C* が検出された。一方、マルチサ

ブユニット型 ACCase については、それを構成する 4 種のサブユニットのうち、*accA*, *accB* および *accD* は葉緑体ゲノムに、*accC* (CMS299C) は核ゲノムにそれぞれコードされていることが分かった。細胞内局在解析の結果、多機能型アセチル-CoA カルボキシラーゼはサイトソール局在を (図 2.2)、マルチサブユニット型アセチル-CoA カルボキシラーゼの AccC サブユニットは葉緑体局在をそれぞれ示した (図 2.3A)。

シアニジオシゾンには 3-ケトアシル-ACP 合成酵素 (KAS) をコードする遺伝子を 2 個もっており、系統解析によりそれぞれ CMM286C は KAS I を、CML329C はミトコンドリア KAS をコードしていると推定された。細胞内局在解析の結果、CMM286C は葉緑体局在を、CML329C はミトコンドリア局在をそれぞれ示した (図 2.3A)。ミトコンドリア脂肪酸合成系の ACP をコードする遺伝子として CMS372C があるが、細胞内局在解析の結果、CMS372C はミトコンドリア局在であった (図 2.3A)。以上のことから、シアニジオシゾンは陸上植物同様、葉緑体とミトコンドリアにそれぞれ独立した脂肪酸合成系が存在することが示唆された。葉緑体では主に膜脂質を構成する脂肪酸が合成されており、その際のマロニル-CoA の合成は、マルチサブユニット型アセチル-CoA カルボキシラーゼによって行われていると思われる。ミトコンドリア脂肪酸合成系については、陸上植物同様、補酵素であるリポ酸の前駆体となる 8:0 脂肪酸の合成が主な役割であると思われる。また、葉緑体やミトコンドリアの脂肪酸合成系における縮合反応は、それぞれ 1 種類の KAS によって行われていることも示唆された。

シアニジオシゾンの脂肪酸伸長に関わる酵素である 3-ケトアシル-CoA 合成酵素 (KCS ; CMD118C)、3-ケトアシル-CoA レダクターゼ (KCR; CMK172C)、ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (HCD; CMR006C)、エノイル-CoA レダクターゼ (ECR; CMD146C) は小胞体局在を示した (図 2.3B)。このことからシアニジオシゾンは陸上植物同様、脂肪酸伸長は

小胞体で行っており、基質となるマロニル-CoA は細胞質局在の多機能型アセチル-CoA カルボキシラーゼによって合成されていると思われる。シロイヌナズナは KCS の他に、酵母における脂肪酸伸長の縮合酵素をコードする遺伝子である *Elo* のホモログを多数もっているが、これらの酵素が脂肪酸伸長時にどのように分担しているのかについては、まだ詳しいことは分かっていない (Haslam and Kunst 2013)。シアニジオシゾンについてもシロイヌナズナ同様、*Elo* 遺伝子のホモログを 3 個もっていることが分かり (表 2.1)。局在解析の結果、これらはすべて小胞体局在であることが分かった (図 2.3B)。

2.3.4 不飽和化酵素

先行研究により、シアニジオシゾンは、ステアロイル-CoA 不飽和化酵素 (SCD ; CMM045C)、アシル脂質 Δ 9 不飽和化酵素 (Δ 9Des ; CMJ201C)、およびアシル脂質 Δ 12 不飽和化酵素 (Δ 12Des ; CMK291C) をもち、これらは全て小胞体に局在していることが報告されている (Sato and Moriyama 2007)。しかし、その報告では細胞内局在解析はタマネギの表皮細胞を用いたものであったため、これら 3 種の不飽和化酵素についてもシアニジオシゾン細胞を用いた細胞内局在解析を行った。これらの不飽和化酵素は N 末延長配列部分に開始メチオニンとなりうるメチオニンが 2 個または 3 個存在していたため、それぞれについて解析を行った (図 2.4A)。その結果、これら 3 種の不飽和化酵素はサイトゾルや小胞体への局在を示した。以上のことから、シアニジオシゾン細胞を用いた細胞内局在解析においても、SCD、 Δ 9Des、および Δ 12Des が小胞体局在であることを確認することができた。

本研究の比較ゲノム解析によって、シアニジオシゾンは FAD4 (CMF187C) のホモログをもつことがわかった。FAD4 は PG 特異的な Δ 3-*trans* 不飽和化酵素であり (Gao et al. 2009)、その産物である 16:1(3*trans*) 脂肪酸はシアニジオシゾンの PG から検出されている (Sato and

Moriyama 2007; Toyoshima et al. 2016)。FAD4 についても *N* 末延長配列部分に開始メチオニンとなりうるメチオニンが 4 個存在していたため、それぞれについて解析を行った (図 2.4A)。その結果、1 番目および 2 番目のメチオニンから翻訳させた GFP コンストラクトでは、葉緑体およびサイトゾルでそれぞれ蛍光が観察された。3 番目のメチオニンから翻訳させた GFP コンストラクトでは葉緑体への、4 番目のメチオニンから翻訳させた GFP コンストラクトではサイトゾルへの局在を示した。1 番目および 2 番目のメチオニン翻訳させたコンストラクトの局在解析ではサイトゾルおよび葉緑体に蛍光が観察されたが、特に葉緑体から強い蛍光が観察されたことから、FAD4 は他の光合成生物と同様に、葉緑体に局在していると思われる。以上のことから、FAD4 はシアニジオシゾンにおいて唯一葉緑体に局在する不飽和化酵素であることが分かった。

2.3.5 葉緑体脂質の合成

シアニジオシゾンにおける糖脂質および PG の合成に関わる酵素である MGDG 合成酵素 (MGD1; CMI271C)、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT; CMJ027C)、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAT; CMF185C)、UDP-スルホキノボース合成酵素 (SQD1; CMR012C)、SQDG 合成酵素 (SQD2; CMR015C)、CDP-DAG 合成酵素 (CDP-DAGS; CMS056C, CMM311C)、PGP 合成酵素 (PGPS; CMJ134C) は葉緑体局在を示した (図 2.4B)。CDP-DAG 合成酵素をコードする CMS056C と CMM311C は、*N* 末延長配列部分のアミノ酸配列がほとんど同じであったため、同じ GFP コンストラクトを用いて細胞内局在解析を行った。PG 合成の最後の反応を触媒しているホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼ 1 (PGPP1) については、シアニジオシゾンからはそのオーソログが検出されなかった (表 2.1)。以上の結果から、シアニジオシゾンは陸上植物同様、糖脂質や PG

の合成は葉緑体で行われていると思われる。しかし、シアニジオシゾンのもつ PAP のうち、葉緑体局在を示すものはなかった。

シアニジオシゾンは、シアノバクテリアの MGDG 合成に関わる遺伝子である *mgdA* のホモログをもっているが、この酵素は葉緑体ではなく小胞体への局在を示した (図 2.4B)。シアニジオシゾンにおいて *MgdA* の産物であるモノグルコシルジアシルグリセロールが検出されていないことや (Sato and Moriyama 2007)、その後の反応を触媒する *MgdE* のホモログをもっていないこと (表 2.1) などから、シアニジオシゾンにおける MGDG の合成は、植物型 MGDG 合成酵素 (CMI271C) によって行われていると思われる。シアニジオシゾンの *mgdA* ホモログが、脂質代謝にどのように関わっているのかは今後検討が必要である。ガラクト脂質：ガラクト脂質ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする *SFR2* についても、シアニジオシゾンのゲノム情報から検出されなかった (表 2.1)。

2.3.6 リン脂質および TAG の合成

リン脂質や TAG の合成に関わる酵素の多くは、サイトゾルや小胞体局在を示した (図 2.5)。そのため、シアニジオシゾンは陸上植物同様、リン脂質や TAG の合成は小胞体で行われていると思われる。しかし、PE の合成に必要となる CDP-エタノールアミンを合成するホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ (ECT; CMS052C) は、陸上植物同様にミトコンドリア局在を示した (図 2.2B, Mizoi et al. 2006)。また、EPT (CMF133C) では、顆粒状の GFP 蛍光が観察された。この顆粒状の蛍光は、カタラーゼとの GFP 融合タンパク質を発現させた際にみられる顆粒状の GFP 蛍光 (図 2.2B) よりも大きかったため、EPT (CMF133C) はペルオキシソーム局在ではないと思われる。先行研究でカルジオリピン合成酵素 (CLS) とされた CMN196C (Katayama et al. 2004) は細胞質局在を示し、また、カルジ

オリピンのアシル基交換反応を行う酵素として知られるリゾカルジオリピンアシルトランスフェラーゼである *TAZI* のホモログ (*CMP142C*) は、小胞体と細胞膜の両局在を示した (図 2.5)。陸上植物では、カルジオリピンはミトコンドリアで合成されていると考えられているが、シアニジオシゾンではカルジオリピンが検出されていないため (Sato and Moriyama 2007)、カルジオリピンの合成については詳しい検討が必要であると思われる。また、シアニジオシゾンはホスファチジルセリン合成酵素 (*PSS*) をコードする遺伝子をもっていなかった (表 2.1)。この結果は、シアニジオシゾン細胞から *PS* が検出されていないことと一致している (Sato and Moriyama 2007; Toyoshima et al. 2016)。*PC* および *PE* 合成の前駆体である *CDP*-コリン、*CDP*-エタノールアミンの合成については、シアニジオシゾンは、エタノールアミンから *CDP*-エタノールアミンを合成する酵素は検出されたが、コリンから *CDP*-コリンを合成する酵素は検出されなかった (表 2.1)。また、*PEAMT* をコードする遺伝子ももっていないことが分かった (表 2.1)。したがって、シアニジオシゾンは *DAG* から *PE* を合成する経路しかなく、*PC* は *PE* のメチル化によってのみ合成されると考えられ、この点については放射性ラベルを解析に解析によって実証されている (Sakurai et al. 2014a)。このことから、シアニジオシゾンの *PC* 合成経路は、陸上植物に比べて非常にシンプルであることが明らかになった。

2.3.7 脂質分解と β 酸化

β 酸化に関わる酵素の多くはミトコンドリアへの局在を示した (図 2.6A)。そのうち、*HACDH* をコードする *CMC137C* は、ミトコンドリアとサイトゾルの両局在を示した。それ以外としては、*ECH* をコードする *CMT074C* が葉緑体局在、*ACX* (*CMK115C*) と *KAT* (*CMA042C*) がサイトゾル局在を示し、*MFP* (*CMR380C*) は顆粒状の GFP 蛍光が観察された。

シアニジオシゾンの場合、ペルオキシソームはミトコンドリア近傍に存在することから、MFP (CMR380C) は顆粒状にみられた GFP 蛍光はペルオキシソームを示していないと思われる。ペルオキシソームへの輸送配列はタンパク質の C 末端に存在するため、ミトコンドリアや葉緑体への局在を示さなかった 3 個の酵素については、ペルオキシソーム局在である可能性があった。そこでそれぞれの酵素の C 末端部分を挿入した GFP コンストラクトを作製し、同様の方法を用いて局在解析を行ったが、これらの酵素はペルオキシソームへの局在を示さなかった (図 2.6B)。特に KAT (CMA042C) では、2 つの顆粒状の GFP 蛍光が観察されたが、シアニジオシゾンではペルオキシソームは 1 つしか存在しないため、KAT (CMA042C) との GFP 融合タンパク質はペルオキシソームに局在していないと結論づけた。

陸上植物や動物のペルオキシソームにみられる MFP は N 末端側に ECH ドメインを、C 末端側に HACDH ドメインをもっている (Poirier et al. 2006)。動物のミトコンドリアにみられる MFP は、ECH 活性と HACDH 活性に加え、KAT 活性ももっているため、 β 酸化の 2~4 番目の反応を行うことが可能である (Eaton et al. 1996)。また、動物のミトコンドリア MFP は、 α サブユニットと β サブユニットからなる複合体を形成しており、それぞれ α サブユニットは N 末端側に ECH ドメインを、C 末端側に HACDH ドメインをもち、 β サブユニットは KAT ドメインをもっている。シアニジオシゾンの MFP のアミノ酸配列について、BLASTP (Altschul et al. 1990) を用いたドメイン検索を行ったところ、1 個のポリペプチド鎖に ECH ドメイン、HACDH ドメイン、および KAT ドメインが存在することが分かった (図 2.11A)。このことから、シアニジオシゾンの MFP は β 酸化の 2~4 番目の反応を触媒している可能性が示唆された。シアニジオシゾンとは別の綱に属する紅藻のチノリモやクラミドモナスの MFP についても、同様にドメイン検索を行ったところ、クラミドモナスの MFP のドメイン構造は陸上植物と同様であったが、チノリモの MFP のドメイン構造はシアニジオシゾンと

同様であった (図 2.11A)。このことから、MFP のドメイン構造において、1 個のポリペプチド鎖に 3 個の機能ドメインが存在するという事は紅藻特有の特徴であることが示唆された。以上の結果から、シアニジオシゾンにおける β 酸化は、ミトコンドリア局在を示した酵素からなるものと、サイトゾル局在を示した酵素からなるものの 2 つの経路が存在する可能性が示唆された (図 2.11B)。

比較ゲノム解析を用いて脂質分解に関わる酵素を探索した結果、シアニジオシゾンでは、TAG リパーゼ (TAGL) が 8 個、ホスホリパーゼ A1 (PLA1) が 3 個、ホスホリパーゼ A2 (PLA2) が 2 個、リパーゼとして機能している可能性をもつ加水分解酵素が 6 個検出された (表 2.1)。しかし、ガラクトリパーゼや PLC、PLD について既知のものと相同なものは見つからなかった。細胞内局在を解析したところ、TAGL のうち 6 個はサイトゾルや小胞体局在を示し、2 個は葉緑体局在を示した (図 2.7)。また、リパーゼとして機能している可能性をもつ加水分解酵素のうち、5 個はサイトゾルや小胞体への局在を、1 個は葉緑体への局在を示した (図 2.7)。これらの結果から、葉緑体局在を示した 2 個の TAG リパーゼと 1 個の加水分解酵素は、実際には TAG の分解ではなく、糖脂質や PG の分解に関わっている可能性が考えられる。3 個ある PLA1 については、CMP267C、CMH204C はサイトゾルへの局在を示し、CMQ423C は細胞膜とサイトゾルにある顆粒状のものが観察された (図 2.7)。また、PLA2 をコードする CMR500C と CMT312C は、それぞれ葉緑体と核の、葉緑体とサイトゾルの両局在であった (図 2.7)。これらの LPA2 はリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) とともに、小胞体においてリン脂質のアシル基交換反応である Acyl editing を行っていると思われる (図 2.10; Bates and Browse 2011; Tjellstrom et al. 2012)。

2.3.8 脂質輸送

シアニジオシゾンにおいて、*TGD1* と *TGD2* は葉緑体ゲノムにコードされているが、*TGD3* の候補遺伝子としては *CMR180C*、*CMJ039C*、*CMH235C*、および *CMR388C* が検出された (表 2.1)。細胞内局在解析の結果、*CMR180C*、*CMJ039C*、および *CMH235C* は小胞体局在を、*CMR388C* は葉緑体局在を示した (図 2.8A)。この結果から、4 個ある *TGD3* の候補遺伝子のうち *CMR388C* が *TGD3* であると思われる。また、シアニジオシゾンは *TGD4* および *TGD5* をコードする遺伝子をもっていなかった (表 2.1)。

アシル-CoA 結合タンパク質 (ACBP) は、葉緑体から小胞体への脂肪酸輸送に関わっていると考えられており、シロイヌナズナでは 6 個の ACBP (*AtACBP1*~*6*) が同定されている (Xiao and Chye 2011)。シアニジオシゾンは ACBP をコードする遺伝子を 1 個もっており (*CMP278C*)、Gclust データベースの検索結果から *AtACBP6* と同じクラスターに属していることが分かった (Gclust ID 1362)。*AtACBP6* は約 10 KDa と *AtACBP* の中で最も小さいタンパク質であり、またサイトゾル局在であることが分かっている (Xiao and Chye 2011)。細胞内局在解析の結果、シアニジオシゾンの ACBP も、*AtACBP* と同様に、サイトゾル局在であることがわかった (図 2.8A)。

フリッパーゼは脂質二重膜を構成するリン脂質を膜の反対側に輸送する酵素である。シロイヌナズナでは、フリッパーゼをコードする遺伝子として *ALA1*~*12* が同定されおり (Gomès et al. 2000)、そのうち *ALA1*~*3* については詳しい解析が行われている (Poulsen et al. 2008; López-Marqués et al. 2010, 2012)。*ALA1*~*3* における細胞内局在解析から、これらのフリッパーゼの細胞内局在は ALIS (*ALA*-インタラクティングサブユニット) と呼ばれるタンパク質によって制御されていることが明らかになっている。*ALIS* をコードする遺伝子として *ALIS1*~*5* が既に Poulsen ら (2008) によって同定されているが、実際に生体内で機能して

いるのは、ALIS1、ALIS3 および ALIS5 の 3 個であると考えられている。N 末端に GFP を付加した ALA1~3 を用いて細胞内局在解析を行うと、ALA1~3 はすべて小胞体局在を示すが、ALIS1,3,5 のうちどれか 1 個を強制発現させた状態で、同様に細胞内局在解析を行うと、ALA1 は細胞膜への、ALA2 は prevacuolar compartment への、ALA3 はゴルジ体への局在をそれぞれ示す (Poulsen et al. 2008; López-Marqués et al. 2010, 2012)。これらの結果から、ALIS は ALA1~3 が発現する際のシャペロンとして機能しているのではないかと考えられている。シアニジオシゾンでは、フリッパーゼをコードする遺伝子として *CMR306C* と *CMS375C* が、ALIS をコードする遺伝子として *CMT246C* がそれぞれ見出された (表 2.1)。細胞内局在解析の結果、フリッパーゼについては *CMR306C* が細胞膜と小胞体との両局在を (図 2.2B)、*CMS375C* が核とサイトゾルとの両局在を (図 2.8A) それぞれ示した。ALIS については細胞膜と小胞体との両局在を示した (図 2.8A)。しかし、シロイヌナズナと同様に、ALIS を強制発現させた状態のシアニジオシゾン細胞では、それぞれのフリッパーゼは上記の結果とは異なる細胞内局在を示す可能性があるため、ALIS 強制発現下の細胞を用いて、フリッパーゼの細胞内局在解析を行うことが必要であると思われる。

2.3.9 その他の酵素について

シアニジオシゾンは、脂肪酸に CoA を付加する長鎖アシル-CoA 合成酵素 (LACS) をコードする遺伝子として *CME186C*、*CMG147C*、*CMO037C*、*CML197C*、および *CMT459C* をもっており、局在解析の結果、*CME186C*、*CMG147C*、および *CMO037C* の 3 つはサイトゾル局在を、*CML197C* はサイトゾルと葉緑体との両局在を、*CMT459C* は葉緑体局在を示した (図 2.8B)。一方、アシル-CoA を脂肪酸と CoA に加水分解するアシル-CoA チオエステラーゼ (ACT) については、*CMJ263C* と *CMR113C* をもっていることが分かり、これらの ACT

は両方ともミトコンドリア局在であった (図 2.8B)。

PI をリン酸化するホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ (PI4K) をコードする遺伝子である *CMI125C* と *CMS267C* は、それぞれ *CMI125C* は小胞体、*CMS267C* は細胞膜への局在を示した (図 2.9A)。PI4K のリン酸化によって生成されたホスファチジルイノシトール-4-リン酸は、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸キナーゼ (PIP5K) によってさらにリン酸化を受け、ホスファチジルイノシトール-4,5-2 リン酸となる。その PIP5K をコードする遺伝子である *CMN333C* と *CME153C* は、それぞれ *CMN333C* は小胞体、*CME153C* は細胞膜への局在を示した (図 2.9A)。

ACCase や PSD といったカルボキシラーゼまたはデカルボキシラーゼは、補酵素としてビオチンをもっている。そのビオチンは翻訳後修飾によって酵素に付加され、その反応はホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) によって触媒されている。シロイヌナズナの HCS は葉緑体とサイトゾルの両局在であることが報告されているが (Puyaubert et al. 2008)、細胞内局在解析の結果、シアニジオシゾンの HCS についても、シロイヌナズナと同様に、葉緑体とサイトゾルの両局在を示した (図 2.9B)。ビオチンを補酵素にもつ代表的な酵素であるメチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ (MCC)、プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (PCC)、についても局在解析を行ったところ、これらはミトコンドリアへの局在を示した (図 2.9B)。カルバモイルリン酸合成酵素 (CAR) については、2 個のサブユニットからなる CarA/B と、1 個のサブユニットからなる CAR1 の 2 つのタイプが存在しており、CAR1 はサイトゾル局在を示した (図 2.9B)。CarA は葉緑体ゲノムにコードされており、また CarB は葉緑体局在を示したため、CarA/B は葉緑体局在の酵素であると思われる。

2.4 考察

2.4.1 脂質代謝関連酵素の細胞内局在に基づいたシアニジオシゾンの脂質代謝経路図の構築

本研究で行った脂質代謝関連酵素の網羅的な細胞内局在解析結果を基に、シアニジオシゾンにおける脂質代謝経路図を作成した (図 2.10)。解析の結果、脂肪酸や葉緑体脂質の合成に関わる酵素は主に葉緑体局在を示し、リン脂質や TAG の合成に関わる酵素は小胞体やサイトゾルへの局在を示した (表 2.2)。したがって、シアニジオシゾンの脂肪酸や脂質の合成におけるオルガネラの役割は、陸上植物とほぼ同じであることが示唆された (図 2.10)。しかし、シアニジオシゾンは陸上植物に比べて、脂肪酸や脂質の合成に関わる酵素の種類が少なく、最小限の酵素群によって構成されるシンプルな脂質代謝経路からなることが分かった。具体例としては、葉緑体における脂肪酸合成酵素の一つである KAS が 1 種類しか存在しない点や、PC の合成経路が 1 つしかない点などが挙げられる。本研究では以下の 3 点について考察を行った。

2.4.2 葉緑体における脂肪酸合成の縮合反応は 1 種類の KAS によって行われている

2.3.3 でも述べたように、脂肪酸合成酵素の細胞内局在解析の結果から、シアニジオシゾンは葉緑体とミトコンドリアに脂肪酸合成系をもつことが示唆された。またシアニジオシゾンは、脂肪酸合成の縮合酵素である KAS を、葉緑体とミトコンドリアにそれぞれ 1 個ずつもっていることがわかった (図 2.3A)。陸上植物におけるミトコンドリア脂肪酸合成系は、1 種類の KAS (mtKAS) によって行われていることが知られており (Yasuno et al. 2004)、このことからシアニジオシゾンにおけるミトコンドリア脂肪酸合成系も、陸上植物と同様であることが推測される。しかし、陸上植物における葉緑体での脂肪酸合成には、基質特異性の異なる 3 種類の KAS (KAS I~III) が関わっている (Shimakata and Stumpf 1982; Clough et

al. 1992; Pidkowich et al. 2007)。また、大腸菌 (Parsons and Rock 2013) やシアノバクテリア (Lem and Stumpf 1984; Kuo and Khosla 2014) における脂肪酸合成でも複数の KAS が関わっていることから、シアニジオシゾンのように、葉緑体脂肪酸合成系が 1 種類の KAS で行われているのは非常に珍しいケースであるといえる。

脂肪酸合成の最初の縮合反応は、細菌や植物では KAS III によって行われ、アセチル-CoA とマロニル-ACP からアセトアセチル-ACP を合成する。それ以降の縮合反応は KAS I/II によって行われており、アシル-ACP とマロニル-ACP から 3-ケトアシル-ACP を合成する。シアニジオシゾンは KAS III をコードする遺伝子をもっていないことから、最初の縮合反応は KAS I によって行われていることが考えられ、その際にアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (ACAT) によるアセチル-CoA からアセチル-ACP への変換も伴うのではないかと考えられる (図 2.10)。アセチル-CoA からアセチル-ACP への変換は、動物や酵母の脂肪酸合成でみられる。ACAT は脂肪酸シントラーゼの機能ドメインの一つであり、動物の脂肪酸シントラーゼでは MCMT と同じドメインで行われていると考えられている (Smith et al. 2003)。ヒトや酵母の脂肪酸シントラーゼのもつ、ACAT ドメインのアミノ酸配列を用いたホモロジー検索から、シアニジオシゾンの ACAT を探索したが、それらしいものは見出すことができなかった。グラム陰性菌である *Pseudomonas aeruginosa* では、脂肪酸合成における最初の縮合反応は KAS III をコードする FabH ではなく、FabY によって行われている (Yuan et al. 2012)。この FabY は KAS I/II ドメインをもつタンパク質であるにも関わらず、KAS III として機能している酵素で、*Pseudomonas* 属に保存されている。このことから、シアニジオシゾンの KAS I が FabY のように、最初の縮合反応を行っている可能性は十分考えられる。しかし、FabY は最初の縮合反応のみを触媒しており、その後のアシル-ACP とマロニル-ACP との縮合反応は他の KAS によって行われているため、仮にシアニジオシゾンの KAS I が最初

の縮合反応を行っているとしても、シアニジオシゾンの KAS I は FabY ともまた異なる、非常に特殊な KAS であることが考えられる。シアニジオシゾンの葉緑体脂肪酸合成系が実際に KAS I のみで行われているのか、脂肪酸合成の初期反応がどのように行われているのかについては、今後さらに詳しい解析が必要である。

2.4.3 シンプルな TAG 合成経路

第 1 章でも述べたように、陸上植物における TAG の合成では、G3P から新規に合成される経路と、一度 PC を経由して合成される経路の 2 つ存在している (Bates et al. 2013)。PC から DAG への代謝は、PDCT、PLC、および PLD によって行われるが、シアニジオシゾンではこれらの酵素について既知のものと相同なものは見つからなかった。このことから、シアニジオシゾンにおける TAG 合成では、PC を経由することなく、G3P から新規に合成されていることが考えられる。しかし、シアニジオシゾンの TAG からは不飽和脂肪酸が多く検出されていることから (Sumiya et al. 2015; Toyoshima et al. 2016)、シアニジオシゾンは PDCT、PLC および PLD について、既知の酵素とは異なる新規の酵素が存在している可能性がある。

2.4.4 β 酸化はどこで行われているのか

2.3.8 で述べたように、 β 酸化関連酵素における細胞内局在解析の結果から、シアニジオシゾンは陸上植物とは異なり、ミトコンドリア局在を示した酵素からなるものと、サイトゾル局在を示した酵素からなるものの 2 種類の経路が存在することが示唆された (図 2.11)。ペルオキシソームへのシグナル配列 (PTS1) は、タンパク質の C 末端部分に存在していることから (Lingner et al. 2011)、後者の経路に関わる酵素については、C 末端配列を挿入した

GFP コンストラクトを作製し、局在解析を行ったが、ペルオキシソームへの局在は示さなかった (図 2.6B)。後者の経路を構成しているとされる ACX (CMK115C)、MFP (CMR380C)、および KAT (CMA041C) について、PTS1 は ACX (CMK115C) からは検出されたが、他の 2 個の酵素からは検出されなかった。また、シアニジオシゾンの単離ペルオキシソームにおけるプロテオーム解析でも、これら 3 個の β 酸化に関わる酵素は検出されていない (Imoto et al. 2013)。以上のことから、後者の経路は、バクテリアと同様に、サイトゾルに存在しているのではないかと考えられる。シアニジオシゾンにおいて、光呼吸に関わる酵素であるグリコール酸オキシダーゼ (CMQ463C) およびセリン：グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (CMS429C) がペルオキシソームに局在していることや (Imoto et al. 2013; Rademacher et al. 2016)、シアニジオシゾンはグリオキシル酸回路をもっていないことから (Moriyama et al. 2014)、シアニジオシゾンのペルオキシソームは、緑葉ペルオキシソームのように、 β 酸化を行わず光呼吸を行うことに特化している可能性が考えられる。

緑藻 *Mougeotia. sp* では、陸上植物同様、ペルオキシソームのみで β 酸化を行っているが、黄緑藻綱である *Bumilleriopsis filiformis* では、 β 酸化はミトコンドリアにおいてのみで行われている (Stabenau et al. 1984; Gross et al. 1985; Winkler et al. 1988)。また、緑藻 *Eremosphaera viridis* では、ペルオキシソームとミトコンドリアの両方で β 酸化が行われていることから (Stabenau et al. 1984; Winkler et al. 1988)、藻類における β 酸化は、陸上植物に比べて多様であることがわかる。シアニジオシゾンの近縁種であるシアニジウム (*Cyanidium caldarium*) とガルデリア (*Galdieria sulphuraria*) では、ミトコンドリアで β 酸化が行われていることが報告されている (Gross 1989)。このように、これまで藻類においてサイトゾルで β 酸化が行われているという報告はなく、このことから、シアニジオシゾンにおいて β 酸化がどこで行われているのかについては、さらに詳しく解析する必要がある。

2.4.5 シアニジオシゾンにおける局在予測ソフトウェアによる推測結果

本研究で行った脂質代謝関連酵素の局在解析結果と、3種の局在予測ソフトウェア (TargetP、WoLF PSORT、および PredAldo) を用いた際の局在推測結果を比較し、一致した割合 (Performance score) を調べた (表 2.3)。その結果、ほとんどの Performance score は 0.6 以下であった。TargetP によって葉緑体局在 (Pt) と推測された酵素の Performance score は 0.72 と比較的高い値を示すが、実際に葉緑体局在を示した酵素のうち約 4 割 (10/27) はミトコンドリア局在であると推測されていた。TargetP および PredAlgo において分泌経路 (SP) と予測された酵素についても同様に高いスコアを示しているが、実際に ER や細胞膜への局在を示した酵素のうち約半数はミトコンドリア (Mt) やサイトゾル (Other) への局在であると推測されていた。TargetP および WoLF PSORT は陸上植物における局在データを基に開発されたソフトウェアだが (Emanuelsson et al. 2000; Horton et al. 2007)、PredAlgo はクラミドモナスのプロテオーム解析のデータを基に開発されたソフトウェアである (Tardif et al. 2012)。しかし、この PredAlgo も推測の一致率は低く、紅藻のタンパク質局在の推測には適していなかった (表 2.3)。これは紅藻が陸上植物や緑藻と比較してシグナル配列部分が長いなどのような、シグナル配列の構造が異なることが原因であると考えられる。本研究の解析結果や本研究室の先行研究 (Moriyama et al. 2014) などは、紅藻の局在解析ソフトの開発に有益なデータとなると思われる。

2.5 表

表 2.1 紅藻、緑藻およびシアノバクテリアにおける脂質代謝関連酵素の比較ゲノムデータベース

シロイヌナズナの既知の脂質代謝関連酵素を基に、シアニジオシゾン、クラミドモナス、2種のシアバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120) について、Gclust データベースを用いて脂質代謝関連酵素を探索した。特にシアニジオシゾンの脂質代謝系の特徴が見られる箇所を赤色で示した。また、N.D. は目的の遺伝子が検出されなかったことを示す。シロイヌナズナの脂質代謝関連酵素では、すでに報告されているものについて細胞内局在を調べ、以下のように表記した。Apo ; アポプラスト、Cp ; 葉緑体、CW ; 細胞壁、Ec ; 細胞外区画、Endo ; エンドソーム、ER ; 小胞体、Cyt ; サイトゾル、Gol ; ゴルジ装置、LB ; 脂質顆粒、Micro ; ミクロソーム、Mt ; ミトコンドリア、Nuc ; 核、Per ; ペルオキシソーム、PM ; 細胞膜、PVC ; 液胞前区画、Tono ; 液胞膜、Vesi ; 小胞。

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	Reference
					Locus tag and/or gene name	Localiza-tion					
Fatty acid synthesis and elongation											
Acetyl-CoA	Malonyl-CoA	Acetyl-CoA carboxylase (Multifunctional type)	6.4.1.2	<i>ACC1/2</i>	AT1G36160=ACC1 AT1G36180=ACC2	PM, Cyt	CMM188C	N.D.	N.D.	g8736.t1=ACC1	Konishi et al. 1996 Sasaki and Nagano 2004
		Acetyl-CoA carboxylase (Multisubunit type)		<i>accA/CAC3</i>	AT2G38040	Cp	CMEc_accA	sl10728	alr5285	Cre12.g519100.t1.2=ACX1	Joyard et al. 2010
				<i>accB</i>	AT1G52670 AT3G15690 AT3G56130 AT5G15530=BCCP2 AT5G16390=BCCP1	Cp Cp Cp Cp	CMEc_accB CMC015C	slr0435	al15057	Cre01.g037850.t1.1=BCC2, Cre17.g715250.t1.2=BCC1	Joyard et al. 2010
				<i>accD</i>	ATHc_accD	Cp	CMEc_accD	sl10336	al12364	Cre12.g484000.t1.2=BCX1	Joyard et al. 2010
				6.3.4.14 <i>accC/CAC2</i>	AT5G35360	Cp	CMS299C	sl10053	alr0939	Cre08.g359350.t1.2=BCR1	Joyard et al. 2010
Malonyl-ACP + Acyl-ACP	3-Ketoacyl-ACP (+2C)	3-Ketoacyl-ACP synthase I	2.3.1.41	<i>KAS I</i>	AT5G46290	Cp	CMM286C			g11653.t1=KAS1 g11653.t2=KAS2	Joyard et al. 2010
		3-Ketoacyl-ACP synthase II	2.3.1.179	<i>fabF</i> <i>FAB1/fabF2</i>	AT1G74960	Cp		sl11069	alr3343		Shimakata and Stumpf 1982 Pidkowich et al. 2007
		Mitochondrial 3-ketoacyl-ACP synthase		<i>mtKAS</i>	AT2G04540	Mt	CML329C			Cre10.g438050.t1.3	Yasuno et al. 2004
		Nitrogen fixation-related 3-ketoacyl-ACP synthase		<i>nodE/hgIE</i>					all1646=hgIE		
		Unknown 3-ketoacyl-ACP synthase		<i>fabB?/F?</i>				slr1332=fabF	al4286		
Malonyl-ACP + Acetyl-CoA	Acetoacetyl-ACP	3-Ketoacyl-ACP synthase III	2.3.1.180	<i>fabH</i>	AT1G62640	Cp	N.D.	slr1511	alr0239	Cre04.g216950.t1.2=KAS3	Clough et al. 1992, Joyard et al. 2010
Malonyl-CoA + Acyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA (+2C)	3-Ketoacyl-CoA synthase (Elongase)	2.3.1.199	<i>CUT1/2</i> <i>FAE1</i>	AT1G01120 AT1G04220 AT1G07720 AT1G19440 AT1G25450 AT1G68530 AT1G71160 AT2G15090 AT2G16280 AT2G26250 AT2G26640 AT2G28630 AT2G46720 AT3G10280 AT3G52160 AT4G34250 AT4G34510 AT4G34520 AT5G04530 AT5G43760 AT5G49070	ER ER	CMD118C	N.D.	N.D.	Cre17.g722150.t1.2 Cre04.g228150.t1.2 Cre07.g319600.t1.2 Cre07.g318500.t1.3 Cre07.g320550.t1.2	Joubès et al. 2008 Kim et al. 2013
					<i>CER2</i> <i>CER2-LIKE 1/2</i>	AT4G24510=CER2 AT4G13840=CER2-LIKE1 AT3G23840=CER2-LIKE2				ER ER	N.D.
		Homologs of yeast ELO protein	2.3.1.199	<i>ELO-LIKE</i>	AT3G06460=AiELO2 AT3G06470=AiELO3 AT1G75000=AiELO1 AT4G36830=HOS3-1,AtELO4	ER ER ER	CMT175C CMM126C CML178C			N.D.	Quist et al. 2009; Haslam and Kunst 2013; Wang et al. 2014
		Plastid acyl carrier protein		<i>ACP1-5</i> <i>acpP</i>	AT1G54580=ACP2 AT1G54630=ACP3 AT3G05020=ACP1		CMEc_acpP	ssl2084=acp	asr3342	Cre13.g577100.t1.2=ACP2	

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	Reference	
					Locus tag and/or gene name	Localiza-tion						Locus tag and/or gene name
						AT4G25050=ACP4 AT5G27200=ACPS5						
		Mitochondrial acyl carrier protein		<i>mtACP</i>		AT2G44620=mtACP1 AT1G65290=mtACP2 AT5G47630=mtACP3 AT5G36280		CMS372C	N.D.	N.D.	g16122.t1=ACP1	Shintani and Ohlogge 1994
Malonyl-CoA	Malonyl-ACP	ACP S-malonyltransferase	2.3.1.39	<i>fabD</i> <i>MCT</i>		AT2G30200	Cp	CMT420C	slr2023=fabD	alr0240	Cre14.g621650.t1.3=MCT1 Cre02.g088250.t1.2=MCT2	Joyard et al. 2010
3-Ketacyl-ACP	(3R)-3-OH-acyl-ACP	3-Ketacyl-ACP reductase	1.1.1.100	<i>fabG</i>		AT1G24360	Cp	CMS393C	slr0886=fabG	alr1894=fabG	Cre03.g172000.t1.2=KAR1	Joyard et al. 2010
3-Ketacyl-CoA	(3R)-3-OH-acyl-CoA	Very-long-chain-ketoacyl-CoA reductase	1.1.1.330	<i>KCR1/2</i>		AT1G24470=KCR2 AT1G67730=KCR1	ER	CMK172C=KCR			g9724.t1	
(3R)-3-Hydroxyacyl-ACP	2-Enoyl-ACP	3R-Hydroxyacyl-ACP dehydrase	4.2.1.59	<i>fabZ</i>		AT2G22230 AT5G10160	Cp Cp	CM1240C	sll1605=fabZ	alr2271=fabZ	Cre03.g208050.t1.2=HAD1	Joyard et al. 2010
(3R)-3-hydroxyacyl-CoA	2-enoyl-CoA	Very-long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	4.2.1.134	<i>PHS1</i> <i>PAS2</i>		AT5G10480=PAS2 AT5G59770	ER	CMR006C			Cre03.g167950.t1.2 Cre08.g363500.t1.2	Da Costa et al. 2006 Bach et al. 2008
<i>trans</i> -2,3-Dehydroacyl-ACP	Acyl-ACP	Enoyl-ACP reductase I/II/III	1.3.1.9	<i>fabI/K/L</i>		AT2G05990	Cp	CMT381C	slr1051	al14391	Cre06.g294950.t1.3=ENR1	Joyard et al. 2010
<i>trans</i> -2,3-Dehydroacyl-CoA	Acyl-CoA	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	1.3.1.93	<i>TSC13</i> <i>CER10</i>		AT3G55360=CER10	ER	CMD146C			Cre14.g615050.t1.2	Zheng et al. 2005 Bach et al. 2008
Desaturase												
		Fatty acid delta7/9-desaturase	1.14.19.1	<i>ADS1/2</i> <i>SCD</i> , <i>FADS</i> <i>FADS-like</i>		AT3G15870 AT1G06080_ADS1 AT1G06090 AT1G06100 AT1G06120 AT1G06350 AT1G06360 AT2G31360_ADS2 AT3G15850_FAD5	ER ER, Gol, Cp	CMJ201C CMM045C	sll0541=desC	all1599=desC al14991=desC	Cre09.g397250.t1.2=CrFAD5 g4576.t1=CrFAD5-like g4576.t2=CrFAD5-like g4576.t3=CrFAD5-like g4550.t1=CrFAD5-like g4570.t1=CrFAD5-like g4555.t1	Nishida and Murata 1996 Smith et al. 2013 Chen and Thelen 2013 Joyard et al. 2010
		Fatty acid delta 12-desaturase (cyano, alpha)	1.14.19.-	<i>FAD6</i> <i>desA</i>		AT4G30950_FAD6	Cp		slr1350=desA	all1598=desA	Cre13.g590500.t1.1=CrFAD6 Cre06.g288650.t1.2=CrFAD6a	Falcone et al. 1994 Nishida and Murata 1996 Joyard et al. 2010
		Fatty acid delta 12-desaturase	1.14.19.-	<i>FAD6</i> <i>desA</i>		AT3G12120_FAD2	ER	CMK291C			Cre17.g11150.t1.2=CrFAD2	Okuley et al. 1994
		Fatty acid delta 15-desaturase	1.14.19.-	<i>FAD3/7/8</i> <i>desB</i>		AT2G29980_FAD3 AT3G11170_FAD7 AT5G05580_FAD8	ER Cp Cp		sll1441=desB	all1597	Cre01.g038600.t1.2=CrFAD7	Nishida and Murata 1996 McCartney et al. 2004 Joyard et al. 2010
		Fatty acid delta3-trans-desaturase	1.14.19.-	<i>FAD4</i> <i>FADA</i>		AT1G62190 AT2G22890 AT4G27030=FAD4	Cp	CMF187C			g16665.t1=CrFAD4, Cre16.g672900.t1.3	Gao et al. 2009
		Stearoyl-ACP desaturase	1.14.19.2 (1.14.99.6)	<i>FAB2</i>		AT1G43800 AT2G43710 AT3G02610 AT3G02620 AT3G02630 AT5G16240 AT5G16230	EC Cp Cp	N.D.	N.D.	N.D.	Cre17.g701700.t1.2=CrSAD/FAB2 g17011.t1=CrSAD/FAB2 g15201.t1 g11239.t1	Kachroo et al. 2007 Joyard et al. 2010
		Fatty acid delta-6 desaturase	1.14.19.3	<i>desD</i>					sll0262=desD			Nishida and Murata 1996
		Chloroplast glycerolipid specific omega-13/Δ-4 desaturase		<i>CrDES</i> <i>CrAFAD</i>							Cre10.g453600.t1.2=CrDES g1135.t2=CrDES Cre01.g037700.t1.2=Cr4FAD	
		Fatty acid desaturase				AT1G06090 AT3G15870						
		Desaturase ?							sll1611			
Lipid synthesis												
G3P	<i>sn</i> -2 LPA	<i>sn</i> -2 G3P acyltransferase	2.3.1.198	<i>GPAT1-8</i>		AT1G06520=GPAT1 AT1G01610=GPAT4 AT1G02390=GPAT2 AT2G38110=GPAT6 AT3G11325 AT3G11430=GPAT5 AT4G00400=GPAT8 AT4G01950=GPAT3 AT5G06090=GPAT7	Mt ER	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Zheng et al. 2003 Beisson et al. 2007 Li et al. 2007 Yang et al. 2010, 2012
G3P	<i>sn</i> -1 LPA	<i>sn</i> -1 G3P acyltransferase	2.3.1.15	<i>ATS1</i> , <i>PlsB</i> <i>PlsXY</i> <i>GPAT9</i>		AT1G32200=ATS1 N.D. AT5G60620=GPAT9	Cp ER	CMJ027C CMK217C CMA017C	sll1752 slr1510=PlsX sll1973=PlsY	al14871 alr0238=PlsX al10492=PlsY	Cre02.g143000.t1.2=GPA1 N.D. g6130.t1=GPA2	Nishida et al. 1993 Weier et al. 2005; Okazaki et al. 2006 Xu et al. 2006 Gidda et al. 2009
LPA	PA	LPA acyltransferase	2.3.1.51	<i>ATS2</i> , <i>PlsC</i> <i>LPAT2-5</i>		AT4G30580=ATS2 AT1G51260=LPAT3 AT3G57650=LPAT2 AT3G18850=LPAT5 AT1G75020=LPAT4	Cp ER	CMJ021C CMF185C CMS008C CME109C	sll1848	alr0241	g9888.t1 Cre05.g248150.t1.2 Cre10.g460350.t1.3	Yu et al. 2004 Xu et al. 2006 Kim et al. 2005
PA	DAG	PA phosphatase	3.1.3.4	<i>PAP1/2</i> or <i>LPP(a)1-4</i>		AT1G15080=LPP2 AT2G01180=LPP1 AT3G02600=LPP3 AT3G18220=LPP4 AT4G22550=LPP6 AT5G03080=LPP7 AT3G58490=LPP8 AT3G50920=LPPe1 AT5G66450=LPPe2	Cp Cp Cp Cp	CMR054C CMR488C CMT106C CMT239C	slr0545	al17623 alr1715	Cre05.g230900.t1.3=PAP1 Cre05.g240000.t1.2=PAP2 Cre03.g150050.t1.3=PAP2-like	Pierrugues et al. 2001 Katagiri et al. 2005
		Lipid phosphate phosphatase		<i>LPPβ - ε</i>								Cre06.g295250.t1.3 Cre06.g272400.t1.2

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	Arabidopsis thaliana		Cyanidioschyzon merolae 10D	Synechocystis sp. PCC 6803	Anabaena sp. PCC 7120	Chlamydomonas reinhardtii CC-503	Reference
					Locus tag and/or gene name	Localiza tion					
				<i>PAH1/2</i>	AT5G42870=PAH2 AT3G09560=PAH1	Cyt Cyt	CMN061C			Cre12.g506600.t1.2=PAH1	Nakamura et al. 2009 Eastmond et al. 2010
DAG	MGDG	MGDG synthase	2.4.1.46	<i>MGD1/2/3</i>	AT4G31780 AT5G20410 AT2G11810	Cp Cp Cp	CM1271C	N.D.	N.D.	g14367.t1=MGD1	Awai et al. 2001 Kobayashi et al. 2004
DAG	GlcDG	MGDG synthase	2.4.1.157	<i>mgdA</i>	N.D.		CMT267C	sl11377	alr4933		Awai et al. 2006
GlcDG	MGDG	Glucolipid pimerase		<i>mgdE</i>	N.D.		N.D.	sl11376	alr1909	N.D.	Sato and Murata 1982; Awai et al. 2014
MGDG	DGDG	DGDG synthase	2.4.1.241	<i>DGD1/2</i> <i>Ycf82</i> <i>dgdA</i>	AT3G11670=DGD1 AT4G00550=DGD2 N.D.	Cp,Mt Cp	N.D.	N.D.	N.D.	Cre13.g583600.t1.2=DGD1	Dörmann et al. 1999; Kelly and Dörmann 2002
MGDG	DGDG	Galactolipid:galactolipid galactosyltransferase	2.4.1.184	<i>GGGT</i>	AT3G06510=SFR2		N.D.			N.D.?	van Besouw and Winternans 1978; Moellering et al. 2010
UDP-glucose	UDP-sulfoquinovose	UDP-sulfoquinovose synthase	3.13.1.1	<i>sqdB</i> <i>SQD1</i>	AT4G33030	Cp	CMR012C	slr1020=sqdB	alr1744	Cre16.g656400.t1.2=SQD1	Joyard et al. 2010
DAG	SQDG	Sulfolipid synthase	2.4.1.-	<i>sqdX</i> <i>SQD2</i>	AT5G01220	Cp	CMR015C	slr0384 sl10380=rfbW sl11231=mtfB	alr2265=sqdX alr4494	Cre01.g038550.t1.3=SQD2 Cre16.g689150.t1.2=SQD3	Essigmann et al. 1998 Yu et al. 2002
Lyso-MGDG	MGDG	Acyl-ACP:lyso-MGDG acyltransferase	2.3.1.141	<i>Unidentified</i>							Chen et al. 1988
PA	CDP-DG	CDP-DG synthase	2.7.7.41	<i>CDS1/cdsA</i>	AT1G62430=CDS1 AT4G22340=CDS2 AT4G26770=CDS3 AT2G45150=CDS4 AT3G60620=CDS5	ER ER ER Cp Cp	CMN215C			Cre03.g186200.t1.2=PCT1	Kopka et al. 1997 Haseliner et al. 2010 Zhou et al. 2013
PGP	PG	PGP phosphatase	3.1.3.27	<i>PGPP1</i>	AT3G58830		N.D.			Cre04.g219900.t1.3	Hung et al. 2015
CDP-DG	PGP	PGP synthase	2.7.8.5	<i>PGS1/2</i> , <i>pgsA</i>	AT2G39290=PGP1 AT3G55030=PGP2	Cp,Mt ER, Micro	CMJ134C	sl11522=pgsA	al4063	g1879.t1=PGPS1 Cre03.g162600.t1.3=PGPS3	Hagio et al. 2000 Müller and Frenzen 2001 Xu et al. 2002 Babiyehuk et al. 2003 Tanoue et al. 2014
PG	CL	CL synthase (PGP-like) CL synthase (PLaseD-like)	2.7.8.-	<i>CLS</i>	AT4G04870 N.D.	Mt	CMN196C	N.D.	N.D.	Cre13.g604700.t1.3=PGPS2	Katayama et al. 2004 Nowicki et al. 2005
CL	LysoCL	LysoCL acyltransferase	2.3.1.-	<i>TAZ1</i>	AT3G05510 AT1G78690		CMJ142C			g11737.t1 g11737.t2	
CDP-DG	PI	PI synthase	2.7.8.11	<i>PIS1/2</i>	AT1G68000 AT4G38570	ER, Gol ER, Gol	CMM125C	N.D.	N.D.	Cre10.g419800.t1.2=PIS1	Collin et al. 1999 Xue et al. 2000 Lofke et al. 2008
Choline	Phosphocholine	Choline kinase	2.7.1.32	<i>CK1-3</i>	AT1G71697=CK1 AT1G74320 AT4G09760		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Tasseva et al. 2004; Lin et al. 2015
Ethanolamine	Phosphoethanolamine	Ethanolamine kinase	2.7.1.82	<i>CK4</i>	AT2G26830	ER	CMR011C	N.D.	N.D.	g6757.t2=ETK1 Cre06.g291600.t1.3=ETK1	Mizoi et al. 2006
phosphoethanolamine	CDP-ethanolamine	Phosphoethanolamine cytidylyltransferase	2.7.7.14	<i>PECT1</i>	AT2G38670=PECT1	Mt	CMS052C	N.D.	N.D.	Cre12.g539000.t1.2=ECT1	
Phosphocholine	CDP-choline	Phosphocholine cytidylyltransferase	2.7.7.15	<i>EPT1</i> <i>AAPT1/2</i>	AT2G32260=CCT1 AT4G15130=CCT2		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Inatsugi et al. 2002
DAG	PE	Aminoalcohol phosphotransferase	2.7.8.1	<i>EPT1</i> <i>AAPT1/2</i>	AT1G13560=AAPT1 AT3G25585=AAPT2		CMF133C	N.D.	N.D.	Cre12.g538450.t1.2	Dewey et al. 1994; Choi et al. 2000
Ethanolaminephosphate	Cholinephosphate	Phosphoethanolamine methyltransferase	2.1.1.103	<i>PEAMT</i>	AT1G48600=PMEAMT AT1G73600 AT3G18000=PEAMT		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Bolognese and McGraw 2000 Nuccio et al. 2000
PE	PC	PE methyltransferase PL methyltransferase	2.1.1.17 2.1.1.71	<i>PEMT</i> <i>PLMT</i>	<i>Unidentified</i> AT1G80860=PLMT		CMF090C CMP111C CMA134C	N.D. N.D.	N.D. N.D.	N.D. N.D.	Keogh et al. 2009
DAG	DGTS	Betain lipid synthase		<i>BTA1</i> <i>(btaA/btaB)</i>	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	Cre07.g324200.t1.2=BTA1	Riekhof et al. 2005
DAG	TAG	DAG acyltransferase (Acyl-CoA as a donor)	2.3.1.20	<i>DGAT1</i> <i>DGAT2</i> <i>DGTT1-5</i> <i>GDAT3</i>	AT2G19450=DGAT1 AT3G51520=DGAT2 AT1G48300=DGAT3	ER, LB LB Cyt	CMQ199C CME100C CMJ162C	N.D.	N.D.	g1030.t1=CrDGAT1 Cre03.g205050.t1.2=CrDGTT4 Cre12.g557750.t1.3=CrDGTT1 g1439.t1 g9572.t1=CrDGTT2 Cre06.g299050.t1.2=CrDGTT3 Cre02.g079050.t1.3=CrDGTT5	Cases et al. 1998 Hobbs et al. 1999 Zou et al. 1999 Bouvier-Navé et al. 2000 Hernandez et al. 2012 Aymé et al. 2014
MGDG	Acyl-MGDG	Galactolipid:galactolipid acyltransferase	2.3.1.134	<i>Unidentified</i>							Heemskerck et al. 1986
LPL	PL	LPL acyltransferase	2.3.1.51, 2.3.1.23, 2.3.1.-	<i>LPLAT</i> <i>LPCAT</i> <i>LPEAT</i>	AT1G12640=LPCAT1 AT1G63050=LPCAT2 AT1G80950 AT2G45670		CM1139C CMR130C			g13221.t1 Cre17.g707300.t1.2=LPAT	Stähl et al. 2008 Stälberg et al. 2009
PE	PS	PS synthase (Base-exchange enzyme)	2.7.8.29, 2.7.8.-	<i>PS2</i> <i>(Human)</i> <i>psd/PSD1</i>	AT1G15110=PS1 AT4G16700	ER, Nuc, Ves Mt	N.D. CMK243C	N.D.	N.D.	N.D.	Yamaoka et al. 2011
PS	PE	PS decarboxylase	4.1.1.65	<i>PSD2/3</i>	AT4G25970=PSD3 AT5G57190=PSD2	ER Tono				Cre02.g119600.t1.2	Nerlich et al. 2007
PC	DG	PC-DAG cholinephosphotransferase	2.7.8.	<i>PDCT</i> <i>rod1</i>	AT3G15820=ROD1 AT3G15830		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Lu et al. 2009
		Acyltransferase?					CMB069C				
Lipid trafficking											
		PA transporter		<i>TGD1</i>	AT1G19800	Cp	CMEc_ORF251 =ycx chromosome553	slr1045, slr1344	alr4015	Cre06.g268200.t1.2=TGD1	Xu et al. 2005
		PA transporter		<i>TGD2</i>	AT3G20320	Cp	CMEc_ORF193 =ycf22	sl11002=ycf22, sl10751=ycf22,	alr0181	Cre16.g694400.t1.2=TGD2	Awai et al. 2006b

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	Reference
					Locus tag and/or gene name	Localiza-tion					
		PA transporter		<i>TGD3</i>	AT1G65410=TGD3	Cp	CMR180C CMH039C CMH235C CMR388C	sl11041 sl11001 sl10759 sl10415 sl10489 slr1113	alr0180 alr0972 al10126=cysA alr2372 alr4389 alr0077 alr2486 al12218=phnK alr1619	g15909.t1=TGD3	Lu et al. 2007
		PA transporter		<i>TGD4</i>	AT3G06960=TGD4 (AT2G44640=TGD4-like)	ER, Cp Cp, Mt, Nuc	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Wang et al. 2012, 2013
		PA transporter		<i>TGD5</i>	AT1G27695=TGD5	Cp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Fan et al. 2015
		Flippase (P4 type-ATPase)	3.6.3.1	<i>ALA1-12</i>	AT1G13210=ACA1, ALA11 AT1G17500=ALA4 AT1G26130=ALA12 AT1G54280=ALA6 AT1G59820=ALA3 AT1G68710=ALA9 AT1G72700=ALA5 AT3G13900=ALA7 AT3G25610=ALA10 AT3G27870=ALA8 AT5G04930=ALA1 AT5G44240=ALA2	Gol ER, PM PM PVC	CMR306C CMS375C	N.D.	N.D.	g15868.t1=ALA3 Cre16.g656500.t1.3=ALA3 Cre12.g536000.t1.2=ALA2 Cre12.g536050.t1.2=ALA1	Gomès et al. 2000; Poulsen et al. 2008; López-Marqués et al. 2010, 2012; Botella et al. 2015
		ALA-interacting subunit (Chaperon protein?)		<i>ALIS1-5</i>	AT1G16360=ALIS4 AT1G54320=ALIS3 AT3G12740=ALIS1 AT5G46150=ALIS2 AT1G79450=ALIS5	ER, PM, Gol, PVC ER, PM, Gol, PVC ER, PM, Gol, PVC	CMT246C			Cre06.g278300.t1.2	Poulsen et al. 2008; López-Marqués et al. 2010, 2012
		Acyl-CoA binding protein		<i>ACBP1-6</i>	AT1G31812=ACBP6 AT3G05420=ACBP4 AT4G24230=ACBP3 AT4G27780=ACBP2 AT5G27630=ACBP5 AT5G53470=ACBP1	Cyt PM, ER Apo, EM, EC Cyt Cyt PM, ER	CMP278C			Cre14.g627800.t1.2 Cre02.g074650.t1.2 Cre12.g489800.t1.2 g12189.t2 Cre02.g118850.t1.2	Xiao and Chye 2011
Lipase											
TAG	DAG/MAG	TAG lipase	3.1.1.3	<i>LIPG1/2/3</i>	AT5G14180=MPL1 AT2G15230=LIP1 AT1G18460 AT1G73920					g9673.t1=LIP1, FAP12	
				<i>PRLIP1-9</i> (Pathogenesis is related lipase)	AT5G24180=PRLIP5 AT5G24190=PRLIP7 AT5G24220=PRLIP4 AT5G24200=PRLIP2 AT5G24210=PRLIP1 AT2G05260=PRLIP3 AT4G10955=PRLIP9 AT5G24230=PRLIP6 AT5G50890=PRLIP8						Jakab et al. 2007
				<i>TGL3/4</i> <i>SDP1</i>	AT3G57140=SDP1-like AT5G04040=SDP1	LB	CMJ049C			Cre17.g699100.t1.2=SDP1/TG L20	Eastmond 2006
				<i>GID1A/B/C</i>	AT5G27320=GID1C AT3G63010=GID1B AT3G05120=GID1A	Nuc, Cyt	CMF053C				Willige et al. 2007
					AT3G14075 AT4G16070 AT5G23530 AT5G17670 AT1G05790 AT3G07400 AT5G18640 AT5G18630 AT4G13550	Cp Cp	CMT151C CMP157C CMS254C CMH156C CMA056C CMR088C	sl10482 sl11969 sl10644	alr1352 al10254	Cre14.g611600.t1.2 Cre01.g025150.t1.2 Cre07.g313550.t1.3	Li et al. 2012a Joyard et al. 2010
		Hydrolase (Lipase?)			AT1G52750 AT1G74640 AT5G19850 AT4G25290 AT4G36530 AT1G78210 AT2G18360 AT4G33180 AT4G36610 AT4G39955 AT5G09430 AT5G21950 AT1G17430 AT1G72620 AT4G24160=mtL.PAT	Mt	CMT274C CMP032C CMT308C CML191C CMO177C CMS228C	sl10553 slr1827 slr1917	alr3514 alr1709 alr5028 alr4625 al12761 al11205	Cre16.g664350.t1.2 Cre12.g53850.t1.2 Cre13.g586350.t1.3 Cre10.g456150.t1.2 Cre01.g000300.t1.3	Ghosh et al. 2009
DGDG	MGDG	α -Galactosidase (?)	3.2.1.22		AT3G56310 AT5G08370=AGAL2 AT5G08380=AGAL1 AT3G26380	CW	N.D.			Cre01.g026250.t1.2	Chrost et al. 2007
MGDG	Lyso-MGDG/3-gal	Galactolipase		<i>PGD1</i>			N.D.			Cre03.g193500.t1.2=PGD1,	Li et al. 2012b

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	Reference	
					Locus tag and/or gene name	Localiza tion						Locus tag and/or gene name
	acetylgllycerol			<i>CGLD15</i>						<i>CGLD15</i>		
			3.1.1.26	<i>DGL</i>	AT1G05800=DGL	Cp	N.D.			g9712.t1		
PL	LPL	Phospholipase A1 (But some PLA1 have a galactolipase and/or TAG lipase activity)	3.1.1.32	<i>PLA1-1/2/3</i>	AT1G06250							Lo et al. 2004 Seo et al. 2009, 2011 Kim et al. 2011a Joyard et al. 2010
					AT1G06800=DALL4	Cp						
					AT1G30370=DLAH	Mt						
				<i>PLA1</i>	AT1G61850=PLA1		N.D.			Cre10.g425100.t1.2		
		Patatin-like PLA1 also galactolipase		<i>SGR2</i>	AT1G31480=SGR2		CMP267C CMH204C CMQ413C			N.D.	Kato et al. 2002 Morita et al. 2002	
		PA preferring PLA1		<i>PLP2</i>	AT2G39220 AT3G54950 AT3G63200 AT4G29800 AT5G43590 AT4G37070 AT4G37060		CMR500C CMT312C		all2302		La Camera et al. 2005 Li et al. 2011b	
PL	LPL	Patatin-like phospholipase A2										
		Phospholipase A2	3.1.1.4	<i>PLA2</i>	AT4G37050 AT2G26560 AT2G06925 AT2G19690 AT4G29460 AT4G29470	PM Cyt Gol, Apo, EC ER ER, Gol ER, Gol	N.D.			Cre02.g095000.t1.2	Seo et al. 2008 Kim et al. 2011b Jung et al. 2012	
		Phospholipase A2 activating protein (G-protein?)		<i>PLAP</i>	AT3G18860		CMC146C			g9654.t1		
PI (PIP2)	DAG	Phosphoinositide-specific phospholipase C	3.1.4.11	<i>PLC</i>	AT3G47220 AT3G47290 AT4G38530 AT5G58670 AT2G40116 AT3G08510 AT3G55940 AT5G58690 AT5G58700	PM PM, Cyt	N.D.	N.D.	N.D.	Cre06.g270200.t1.3	Cao et al. 2007 Zheng et al. 2012	
		Phospholipase C	3.1.4.3		AT1G13680 AT1G49740 AT3G19310 AT4G36945 AT5G67130 AT4G34930 AT4G34920 AT4G38690		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
PL	DAG	Non-specific phospholipase C	3.1.4.3	<i>NPC</i>	AT1G07230 AT2G26870 AT3G03520 AT3G03530 AT3G03540 AT3G48610	Tono PM Cyt	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Nakamura et al. 2005 Pokotylo et al. 2013	
PL	PA	Phospholipase D	3.1.4.4	<i>PLD</i>	AT1G52570 AT1G55180 AT2G42010 AT3G15730 AT4G00240 AT4G11830 AT4G11840 AT4G11850 AT4G35790 AT5G25370 AT3G05630 AT3G16785	PM Cp Tono	N.D.	N.D.	N.D.	Cre13.g591900.t1.2	Yamaryo et al. 2008 Hong et al. 2009 Joyard et al. 2010	
<i>β-oxidation</i>												
Acyl-CoA	Enoyl-CoA + H ₂ O ₂	Acyl-CoA oxidase	1.3.3.6	<i>ACX1-6</i>	AT1G06290=ACX3 AT1G06310=ACX6 AT2G35690=ACX5 AT4G16760=ACX1 AT5G65110=ACX2 AT3G06690 AT3G51840=ACX4	Per Per Per Per	CMK115C			Cre11.g467350.t1.2 Cre16.g687350.t1.2=ACX3 g5140.t2=ACX2 g5140.t1=ACX2 g16176.t1=ACX1 Cre16.g695100.t1.3=ACX4	Hayashi et al. 1999 Hooks et al. 1999 Froman et al. 2000 Eastmond et al. 2000 Rylott et al. 2003 Eubel et al. 2008	
Acyl-CoA	Enoyl-CoA	Acyl-CoA dehydrogenase		<i>IBR3</i>	AT3G06810	Per	CML080C		N.D.		Zolman et al. 2007 Eubel et al. 2008	
Isovaleryl-CoA	Methylcrotonyl-CoA	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	1.3.8.4	<i>ivd</i>	AT3G45300	Mt	CMT072C			Cre06.g296400.t1.2	Däschner et al. 2001	
Enoyl-CoA	3-Hydroxyacyl-CoA	Enoyl-CoA hydratase	4.2.1.17 5.3.3.-	<i>ECH1</i> <i>SCEH</i>			CMK139C CMT074C			Cre03.g190850.t1.2		
delta(3,5)-Dienoyl-CoA	delta(2,4)-Dienoyl-CoA	delta(3,5),delta(2,4)-Dienoyl-CoA isomerase	5.3.3.-	<i>ECH2</i>	AT1G76150=ECH2	Per				Cre06.g308100.t1.2=ECH2	Goepfert et al. 2006	
3-Hydroxybutyryl	Acetoacetyl-CoA	3-Hydroxybutyryl-CoA	1.1.1.35	<i>ECH1/DC11</i>	AT5G43280	Per				Cre10.g463150.t1.3=DC11	Goepfert et al. 2005	
							CMC137C					

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	Reference	
					Locus tag and/or gene name	Localiza-tion						Locus tag and/or gene name
-CoA		dehydrogenase	1.1.1.157									
		3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase?										AT3G15290
2-trans,4-cis-Dienoyl-CoA	3-trans-Enoyl-CoA	2,4-Dienoyl-CoA reductase	1.3.1.34	<i>DECRI/2, RED</i>	AT2G07640 AT3G12800=SDRB	Per Per	N.D.				Cre17.g723650.t1.2=RED	Eubel et al. 2008
delta(3)-Enoyl-CoA	delta(2)-Enoyl-CoA	delta(3), delta(2)-Enoyl-CoA isomerase	5.3.3.-	<i>ECII-3</i>	AT1G65520=ECI1 AT4G14430=ECI2 AT4G14440=ECI3	Per Per Cyt	N.D.				N.D.?	Goepfert et al. 2008 Eubel et al. 2008
Enoyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA	Enoyl-CoA hydratase/ 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	4.2.1.17	<i>hhd fadB</i>	AT4G29010=AIM1 AT3G06860=MFP2	Per Per	CMR380C				Cre16.g695050.t1.2=ECH1	Richmond and Blecker 1999 Ryllott et al. 2006 Arent et al. 2010
3-Ketoacyl-CoA	Acyl-CoA + Acetyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA thiolase	2.3.1.16 2.3.1.9	<i>fadA1</i>	AT1G04710=PKT4 AT2G33150=PKT3 AT5G47720 AT5G48230=ACAT2 AT5G48880=PKT5	Per Per Per, Cyt Per, Cyt Per, Cyt	CMA042C CME087C	slr1993=thl	N.D.		Cre17.g723650.t1.2=ATO1 Cre02.g146050.t1.2=ATO2	Germain et al. 2001 Carrie et al. 2007 Eubel et al. 2008
Acyl-CoA synthetase/thioesterase												
Acyl-CoA	Fatty acid	Acyl-CoA thioesterase	3.1.2.1 3.1.2.2 3.1.2.27		AT4G00520 AT1G01710 AT2G30720 AT5G48370 AT2G29590 AT1G04290 AT3G61200 AT3G16175 AT1G52191	Per Per Per	CMJ263C CMR113C				Cre01.g037350.t1.3 Cre16.g683350.t1.2 Cre07.g323150.t1.2 Cre03.g148450.t1.3 Cre13.g568250.t1.3 Cre09.g388900.t1.2 Cre02.g093600.t1.2 Cre16.g677250.t1.2	Eubel et al. 2008
Acyl-ACP	Fatty acid	Acyl-ACP thioesterase	3.1.2.14	<i>FATA/B</i>	AT3G25110=FATA AT4G13050 AT1G08510=FATB		N.D.				Cre06.g256750.t1.2=FAT1/FATA	Salas and Ohlogge 2002
								alr2045 asl2657			g15127.t1 g15127.t2	
			3.1.2.14, 3.1.2.21	<i>ALT1-4</i>	AT1G35250=ALT2 AT1G35290=ALT1 AT1G68260=ALT3 AT1G68280=ALT4	Cp Cp Cp Cp	CMH111C	sl10410	alr4079		g4492.t1 g4492.t2	Pulsifer et al. 2014
Fatty acid	Acyl-CoA	Long-chain acyl-CoA synthetase	6.2.1.3	<i>fadD ACSL LACS</i>	AT1G49430 AT1G64400 AT2G04350 AT4G11030 AT4G23850 AT5G27600 AT1G77590 AT3G05970 AT2G47240	ER ER PM Cp Per ER	CME186C CMG147C CML197C CMO037C				Cre12.g500715.t1.2, g13944.t2=LCS2 Cre13.g566650.t1.1=LCS2 Cre12.g507400.t1.2 Cre03.g182050.t1.2=LCS1	Fulda et al. 2002 Weng et al. 2010 Zhao et al. 2010 Joyard et al. 2010 Eubel et al. 2008
		Long-chain acyl-CoA synthase					AT3G23790 AT4G14070	Cp Cp	CMT459C	slr1609	alr3602	
PI signaling												
PI	PIP	Phosphatidylinositol 4-kinase	2.7.1.67	<i>PI4K</i>	AT1G49340 AT1G51040 AT5G09350 AT5G64070	Nuc PM, Vesi	CM1125C CMS267C				Cre06.g304650.t1.3 Cre05.g245550.t1.3	Stevenson-Paulik et al. 2003
PIP	PIP2	1-Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	2.7.1.68	<i>PIP5K</i>	AT1G10900 AT1G01460 AT1G21980 AT1G34260 AT1G60890 AT1G71010 AT1G77740 AT2G26420 AT2G41210 AT3G07960 AT3G14270 AT3G56960 AT4G01190 AT4G33240	PM Cp PM PM Endo PM Endo	CMN333C CME153C				g9964.t1 Cre06.g249950.t1.3 Cre12.g523050.t1.3	Shimada et al. 2004 Lee et al. 2007 Ischebeck et al. 2008 Camacho et al. 2009 Mikami et al. 2010 Zhao et al. 2010b Hirano and Sato 2011
Biotin-dependent enzymes and Holocarboxylase synthetase												
Methylcrotonoyl-CoA	Methylglutaconyl-CoA	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase	6.4.1.4	<i>mccA</i> <i>mccB</i>	AT1G03090 AT4G34030	Mt	CMT073C CMT071C				g6242.t1 g3755.t1	
Propionyl-CoA	Methylmalonyl-CoA	Propionyl-CoA carboxylase	6.4.1.3	<i>pcpA</i> <i>pcpB</i>			CMN243C CMN132C					
Glutamine	Carbamoylphosphate + Glutamate	Carbamoylphosphate synthetase (multisubunit type) Carbamoylphosphate synthetase (multifunctional type)	6.3.5.5	<i>carA</i> <i>carB</i> <i>CAD</i>	AT3G27740=CARA AT1G29900		CMEc_carA CML055C	sl11498=carA sl10370	alr1155 alr3809		Cre06.g308500.t1.2 g8395.t1	
		Holocarboxylase synthetase	6.3.4.15	<i>birA, BPL1, HCSI/2</i>	AT1G37150 AT2G25710	Cp,Cyt	CMC080C	sl11655	alr5256		Cre09.g406000.t1.3	Puyaubert et al. 2008

表 2.2 シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素の局在解析結果と細胞内局在解析ソフトウェアによる推測結果

β酸化関連酵素である CMK115C (ACX)、CMR380C (MFP)、および CMA042C (KAT) の局在解析結果は、N末端挿入コンストラクトでの結果 [X] と、C末端挿入コンストラクトでの結果 [Y] を、X/Y と表記した。略語：CM, 細胞膜；Cyt, サイトゾル；ER, 小胞体；Mt, ミトコンドリア；Nuc, 核；Per, ペルオキシソーム；Pt, 葉緑体；Pt-genome, 葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子；SP, 分泌経路；Glan, 顆粒。参考文献: [1], Sato and Moriyama 2007; [2], Itoh et al. 1998; [3], Sakurai et al. 2007; [4], Katayama et al. 2004; [5] Sato et al. 2016a (この文献は我々とは違うグループである); [6] Sato et al. 2016b

Enzyme name	Abbreviation of enzyme name and/or gene name	Locus tag	Subcellular localization	Result of prediction of subcellular localization		
				TargetP	WoLF PSORT	Pred Algo
Fatty acid synthesis and elongation						
Acetyl-CoA carboxylase (Multifunctional type)	ACCase (ACC1)	CMM188C	Cyt	Other	Nuc, Cyt	Other
Acetyl-CoA carboxylase (Multisubunit type)	ACCase (AccA)	CMV056C	Pt-genome			
	(AccB)	CMV134C	Pt-genome			
	(AccC)	CMS299C	Pt	Pt	Pt, Cyt	Mt
	(AccD)	CMV201C	Pt-genome			
Malonyl-CoA:ACP malonyltransferase	MCMT	CMT420C	Pt	Other	Pt	Pt
Acetyl-CoA:ACP acetyltransferase	ACAT	Not detected				
Acyl carrier protein	ACP (AcpP) (mtACP)	CMV132C	Pt-genome	Mt	Pt	Mt
		CMS372C	Mt			
3-Ketoacyl-ACP synthase	KAS (KAS I) (mtKAS)	CMM286C	Pt	Pt	Mt	Other
		CML329C	Mt	Other	Pt	Other
3-Ketoacyl-ACP reductase	KAR	CMS393C	Pt	Pt	Pt	Other
3-Hydroxyacyl-ACP dehydratase	HAD	CMI240C	Pt	Mt	Pt	Other
Enoyl-ACP reductase	EAR	CMT381C	Pt	Mt	Pt	Pt
Acyl-ACP thioesterase	AAT	CMH111C	Pt	Pt	Cyt	Other
3-Ketoacyl-CoA synthase (Elongase)	KCS	CMD118C	ER	Pt	CM	Mt
3-Ketoacyl-CoA reductase	KCR	CMK172C	ER	Other	Pt	SP
3-Hydroxyacyl-CoA dehydratase	HCD	CMR006C	ER	SP	CM	Other
Enoyl-CoA reductase	ECR	CMD146C	ER	Mt	Pt	Mt
		CMT175C	ER	Mt	Pt	Other
		CMM126C	ER	Other	Cyt	Other
Homologs of yeast ELO genes (3-Ketoacyl-CoA synthase?)	ELO-like	CML178C	ER, Cyt	Mt	Pt	Pt
Desaturase						
Stearoyl-CoA desaturase	SCD	CMM045C [1,2]	ER, Cyt	Other	Cyt	Other
Acyl lipid Δ9 desaturase	Δ9Des	CMJ201C [1]	ER, Cyt	Other	CM	Pt
Acyl lipid Δ12 desaturase	Δ12Des	CMK291C [1]	ER, Cyt	Other	Pt, Pt_Mt	Other
Phosphatidylglycerol specific Δ3-trans desaturase	FAD4	CMF187C	Pt, Cyt	Other	Nuc	Other
Synthesis of glycolipids and PG						
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAT	CMJ027C	Pt	Mt	Pt	Pt
Lysophosphatidic acid acyltransferase	LPAT	CMF185C	Pt	Mt	CM	Mt

Enzyme name	Abbreviation of enzyme name and/or gene name	Locus tag	Subcellular localization	Result of prediction of subcellular localization		
				TargetP	WoLF PSORT	Pred Algo
Phosphatidic acid phosphatase	PAP	Not detected				
Monogalactosyldiacylglycerol synthase	MGD1	CMI271C	Pt	Pt	Pt	Pt
Monoglucosyldiacylglycerol synthase	MgdA	CMT267C	ER	Mt	CM	SP
Glucolipid epimerase	MgdE	Not detected				
Digalactosyldiacylglycerol synthase	DgdA	CMV121C [3]	Pt-genome			
Galactolipid:galactolipid galactosyltransferase	SFR2	Not detected				
UDP-sulfoquinovose synthase	SQD1	CMR012C [5]	Pt	Pt	Pt	Pt
Sulfoquinovosyldiacylglycerol synthase	SQD2	CMR015C [5]	Pt	Pt	Pt	Mt
CDP-diacylglycerol synthase	CDP-DAGS	CMS056C	Pt	Pt	CM	Pt
		CMM311C	Pt	Pt	CM	Pt
Phosphatidylglycerolphosphate synthase	PGPS	CMJ134C	Pt, Cyt	Other	CM	Other
Phosphatidylglycerolphosphate phosphatase	PGPP	Not detected				
Synthesis of phospholipids and TAG						
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAT	CMK217C	ER	Mt	CM	Other
		CMA017C	Cyt	Other	CM	Other
Lysophosphatidic acid acyltransferase	LPAT	CMJ021C	ER	Mt	Pt	Other
		CMS008C	Cyt	Mt	CM	Mt
		CME109C	ER	Other	CM	SP
Phosphatidic acid phosphatase	PAP	CMR054C	ER	Other	CM	SP
		CMR488C	ER	Other	CM	SP
		CMT106C	Cyt	Other	Nuc	Other
		CMT239C	ER	SP	Nuc	SP
Phosphatidic acid phosphatase	PAP	CMN061C	ER	Other	CM	Mt
		CMN215C	Cyt	Other	CM	Other
CDP-diacylglycerol synthase	CDP-DAGS	CMN215C	Cyt	Other	CM	Other
Choline kinase	CK	Not detected				
Phosphocholine cytidyltransferase	CCT	Not detected				
CDP-choline:diacylglycerol cholinephosphotransferase	CPT	Not detected				
Phosphoethanolamine methyltransferase	PEAMT	Not detected				
Ethanolamine kinase	EK	CMR011C	ER	Other	Cyt	Other
Phosphoethanolamine cytidyltransferase	ECT	CMS052C	Mt	Mt	Pt	SP
CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase	EPT	CMF133C	Glan	Other	CM	Other
Phosphatidylethanolamine methyltransferase	PEMT	CMF090C	ER, Cyt	Pt	CM	Pt
Phospholipid methyltransferase	PLMT	CMP111C	ER	Other	Pt	SP
		CMA134C	ER	Other	CM	SP
Phosphatidylserine synthase	PSS	Not detected				
Phosphatidylserine decarboxylase	PSD	CMK243C	ER	Mt	Mt	Other
Phosphatidylinositol synthase	PIS	CMM125C	Cyt	SP	CM	Other
Cardiolipin synthase	CLS	CMN196C [4]	Cyt	SP	Pt	Other
Lysocardiolipin acyltransferase	TAZ1	CMP142C	ER, CM	Mt	Pt	Mt
Diacylglycerol acyltransferase	DGAT	CMQ199C	ER	Mt	Pt	Other
		CME100C	Cyt	Mt	CM	Mt
		CMJ162C	ER	SP	Mt	SP
Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	PDAT	Not detected				

Enzyme name	Abbreviation of enzyme name and/or gene name	Locus tag	Subcellular localization	Result of prediction of subcellular localization			
				TargetP	WoLF PSORT	Pred Algo	
Phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase	PDCT	Not detected					
Lysophospholipid acyltransferase	LPLAT	CMI139C	ER	Mt	Pt	Pt	
		CMR130C	ER	Other	CM	SP	
Acyltransferase?		CMB069C	ER	Pt	Pt	Pt	
β-Oxidation							
Acyl-CoA oxidase	ACX	CMK115C	Cyt/Cyt	Other	Cyt	Pt	
Acyl-CoA dehydrogenase	ACDH	CML080C	Mt	Mt	Mt	Other	
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD	CMT072C	Mt	Mt	Nuc	Other	
Enoyl-CoA hydratase	ECH	CMK139C	Mt	Mt	Pt	Mt	
		CMT074C	Pt	Mt	Pt	Other	
3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HACDH	CMC137C	Mt, Cyt	Other	Pt	Mt	
Multifunctional protein	MFP	CMR380C	Glan/Cyt	Other	ER, ER_CM	SP	
3-Ketoacyl-CoA thioesterase	KAT	CMA042C	Cyt/Glan	Other	Cyt	Mt	
		CME087C	Mt	Mt	Pt	Mt	
Lipase							
Triacylglycerol lipase	TAGL	CMT151C	ER	Pt	Nuc, CM	Pt	
		CMP157C	Pt	Mt	Pt	Pt	
		CMS254C	ER	SP	CM	Other	
		CMH156C	Cyt	Other	Cyt	Other	
		CMA056C	ER	Mt	Pt	SP	
		CMR088C	Pt	Mt	Mt	Pt	
		CMJ049C	ER	Mt	ER	Other	
		CMF053C	ER, CM	Mt	Nuc	Pt	
Phospholipase A1 (PA-preferring phospholipase A1?)	PLA1	CMP267C	Cyt	Other	Nuc	Other	
		CMH204C	Cyt	Other	CM	Other	
		CMQ413C	Ves, CM	Other	Nuc	Pt	
Phospholipase A2	PLA2	CMR500C	Nuc, Pt	Pt	Nuc	Pt	
		CMT312C	ER, Pt	Other	Pt	Other	
Phospholipase A2 activating protein	PLAP	CMC146C	Cyt	Other	Pt	Other	
Phospholipase C	PLC	Not detected					
Phospholipase D	PLD	Not detected					
Hydrolase (Lipase?)	-	CMT274C	Cyt	Other	Cyt	Other	
		CMP032C	Cyt, CM	Other	Ext	Other	
		CMT308C	Pt	Mt	Pt	Mt	
		CML191C	ER	Other	Pt	SP	
		CMO177C	ER	SP	Pt	Pt	
		CMS228C	Cyt	Other	Pt	Other	
Lipid trafficking							
Phosphatidic acid transporter (Complex of TGD1,2,3,4 and 5)	TGD1	CMV212C	Pt-genome				
	TGD2	CMV057C	Pt-genome				
	TGD3	CMR180C	ER	ER	Mt	Pt	Mt
		CMH235C	ER	ER	Other	CM	Other
		CMJ039C	ER	ER	Mt	CM	SP
		CMR388C	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt
TGD4	Not detected						

Enzyme name	Abbreviation of enzyme name and/or gene name	Locus tag	Subcellular localization	Result of prediction of subcellular localization		
				TargetP	WoLF PSORT	Pred Algo
	TGD5	Not detected				
Acyl-CoA binding protein	ACBP	CMP278C	Cyt	Other	Pt	Other
Flippase (P4 type-ATPase)	ALA1	CMR306C	ER, CM	Other	CM	Other
	ALA2	CMS375C	Cyt, Nuc	Mt	Cyt	Mt
ALA-interacting subunit	ALIS	CMT246C	ER, CM	Other	Nuc	Other
Fatty acid activation						
Acyl-CoA thioesterase	ACT	CMJ263C	Mt	Mt	Mt	Pt
		CMR113C	Mt	Mt	Pt	Pt
Long-chain acyl-CoA synthetase	LACS	CME186C	Cyt	Other	Cyt	Other
		CMG147C	Cyt	Other	Pt	Mt
		CML197C	Cyt, Pt	Other	Cyt	Other
		CMO037C	Cyt	Other	Pt	Other
		CMT459C	Pt	Pt	Pt	Pt
PI signaling						
Phosphatidylinositol-4-kinase	PI4K	CMI125C	ER	Other	Pt	Mt
		CMS267C	Cyt, CM	Other	Nuc	Other
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	PIP5K	CMN333C	ER	Other	Nuc	Other
		CME153C	Cyt, CM	Mt	Pt, Nuc	Pt
Biotin-dependent carboxylase						
Holocarboxylase synthetase	HCS	CMC080C	Pt, Cyt	Mt	Pt	SP
Methylcrotonyl-CoA carboxylase	MCC (MCCA) (MCCB)	CMT073C	Mt	Pt	Cyt	Other
		CMT071C	Mt	Mt	Pt	SP
Propionyl-CoA carboxylase	PCC (PCCA) (PCCB)	CMN243C	Mt	Mt	Mt	Other
		CMM132C	Mt	Mt	Pt, Pt_Mt	Pt
Carbamoylphosphate synthase (Multifunctional type)	CAR (CAR1)	CMQ255C	Cyt	Other	Cyt	Other
Carbamoylphosphate synthase (Multisubunit type)	CAR (CarA) (CarB)	CMV036C	Pt-genome			
		CML055C	Pt	Pt	Cyt	Pt
Biotin carboxyl carrier protein	BCCP	CMC015C	Pt	Mt	Pt	Pt

表 2.3 シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素における局在解析ソフトウェアの推測結果

略語は表 2.2 を参照のこと。Performance score はソフトウェアにおける局在推測結果と、本研究の細胞内局在解析の結果が一致した酵素の割合を示す。TargetP および PledAlgo の予測結果について、SP は小胞体または細胞膜局在、Other はサイトゾル局在であることとした。WoLF PSORT の予測結果については、共局在と予測されたものは除外した。

Computer program	Prediction	Confirmed subcellular localization				Performance score
		Pt	Mt	ER and/or CM	Cyt	
TargetP	Pt (18)	13	1	3	1	0.72
	Mt (38)	10	11	15	2	0.29
	SP (7)	0	0	5	2	0.71
	Other (43)	4	2	22	15	0.35
WoLF PSORT	Pt (44)	16	8	14	6	0.36
	Mt (7)	2	2	3	0	0.29
	ER, CM (27)	4	0	16	7	0.59
	Cyt (12)	3	1	3	5	0.42
PredAlgo	Pt (27)	14	3	8	2	0.52
	Mt (17)	4	4	6	3	0.24
	SP (16)	1	2	13	0	0.81
	Other (46)	8	5	18	15	0.33

表 2.4 pCEG1 ベクターおよび pBSHAb-T3'_2 ベクターの作製に使用したプライマー

大文字で表記した配列は、In-Fusion を用いたクローニング反応に必要な pCEG1 ベクター、または pBSHAb-T3'ベクターとの共通配列を、下線部分はそれぞれ *Sac*II、*Pas*I の認識配列を示す。GFP コンストラクト、または HA タグコンストラクトの作製の際に、インサートの増幅に使用したプライマーは表 X を参照。

Primer No.	Primer name	Sequence of primer (5' to 3')
1	pCG1-nos-F	agcggccgcccgggtgcagatcgttcaaacattg
2	pCG1-pro-R	ggatcctctagaggtaacgaacgaagaaacacag
3	EGFP-F	ACCTCTAGAGGATCCatggtgagcaagggcgagga
4	EGFP-R	AGCCGGGCGGCCGCTttacttgtacagctcgtcca
5	EGFP-Cterminal-vector-F	taaagcggccgcccgggtgcagatcgttca
6	EGFP-Cterminal-vector-R	cttgtacagctcgtccatgccgagagtgat
7	<i>APCC-Sac</i> II-pBSHAb-T3-F	atgcccgcgggttacaataccgatagatgagtttcg
8	<i>APCC-Pas</i> I- pBSHAb-T3-R	gc <u>atctgcagg</u> gatcctctagaggtaacgaacga

表 2.5 EGFP または HA タグコンストラクトにおけるインサートの増幅に使用したプライマー

大文字で表記した配列は、In-Fusion を用いたクローニング反応に必要な pCEG1 ベクター、または pBSHAb-T3'ベクターとの共通配列を示す。CMS056C と CMM311C はアミノ酸配列が同一であったため、同じプライマーを使用した。

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')	Cloned length (aa)	Full length of enzyme (aa)
<i>N</i>-terminal peptide-EGFP construct				
CMK217C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctttttgtacgcaactg	CCATGGATCCTCTAGAgtcgagcccgagagtctcc	103	673
CMA017C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcagcgaccaccgcca	CCATGGATCCTCTAGAcgtagataactcctgggtca	110	556
CMJ021C	TTCGTTGACCTCTAGAatgatccctgatccataccg	CCATGGATCCTCTAGAggcacgctgatgaataccag	32	202
CMF185C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtacctagctttggggctc	CCATGGATCCTCTAGAgcgaggtctcgagcctcgagc	91	373
CMS008C	TTCGTTGACCTCTAGAatggaacagcactctact	CCATGGATCCTCTAGAAAacgggttccgaccagtt	103	430
CMR054C	TTCGTTGACCTCTAGAatggaacgggaaccaggtgc	CCATGGATCCTCTAGAcgggtaccaatgattcgcgt	69	294
CMR488C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaacggcagttacgtct	CCATGGATCCTCTAGAcggaagtgaacgctgggat	60	302
CMT106C	TTCGTTGACCTCTAGAatggttctcagcagacgcc	CCATGGATCCTCTAGAgccggccccgcacaagagc	74	363
CMT239C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcttctggcggaagcct	CCATGGATCCTCTAGAgcaccaggtatttccgctct	142	532
CMN061C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcataactgcatgaaga	CCATGGATCCTCTAGAtcgggctatacgtactgg	75	944
CMT267C	TTCGTTGACCTCTAGAatgttcccgaaacagca	CCATGGATCCTCTAGAgaacgggagacttccagtat	73	450
CMI271C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgacccttccggcttt	CCATGGATCCTCTAGAAactcgggtaaacagagcta	66	683
CMR012C	TTCGTTGACCTCTAGAatgacgttcgtgacgtacc	CCATGGATCCTCTAGAcaccaagaacaagaacagttt	80	511
CMR015C	TTCGTTGACCTCTAGAatgttctactgtcgaacagc	CCATGGATCCTCTAGAcactcagcggcgagggcg	100	517
CMN215C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgacggaggaccgga	CCATGGATCCTCTAGAcgtgctttccagcttccc	90	542
CMS056C, CMM311C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtgggtgtctacagtca	CCATGGATCCTCTAGAtcggacagccagatcacgtg	133	439
CMJ134C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgtcagagcatcgaatc	CCATGGATCCTCTAGAAattgggcaagttccaaaagc	248	429
CMN196C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcacgcccaaacctggt	CCATGGATCCTCTAGAggccaaggcagctatactat	33	208
CMM125C	TTCGTTGACCTCTAGAatgacaggaaggcagcttg	CCATGGATCCTCTAGAcggtacttccagaaggcga	33	237
CMR011C	TTCGTTGACCTCTAGAatggtgctgcaaaccttga	CCATGGATCCTCTAGAcaccaagattcgaacagaa	84	385
CMS052C	TTCGTTGACCTCTAGAatggataacaacccggctcg	CCATGGATCCTCTAGAAccaacaatgagttcgtccc	92	442

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')	Cloned length (aa)	Full length of enzyme (aa)
CMF133C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcacotcgttgctctaa	CCATGGATCCTCTAGAaagctcttcagttgacaaat	78	554
CMF090C	TTCGTTGACCTCTAGAatggagttaccgagcgtcca	CCATGGATCCTCTAGAcggcgacgctggcgttacac	102	749
CMP111C	TTCGTTGACCTCTAGAatggatacgttaggagctcg	CCATGGATCCTCTAGAcggtgctcgatgatgtacg	66	264
CMA134C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtggcacttgatcgtcg	CCATGGATCCTCTAGAcggcgctaaatgatctga	99	311
CMQ199C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgtgcttgtgtcgtcg	CCATGGATCCTCTAGAcgtgggcaacgaacaag	130	572
CME100C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgtcagctcagaactc	CCATGGATCCTCTAGAatcttctccgggagacgag	118	506
CMJ162C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcctctacggacactacat	CCATGGATCCTCTAGAttgactcgaatctaggatgc	88	310
CMI139C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaatgcgtgtctgcecca	CCATGGATCCTCTAGAccatctagccgatggcagac	82	550
CMK243C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtccgtcaacgaacgct	CCATGGATCCTCTAGAatctagctgacagcgagta	92	384
CMR180C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaacggtacacgagtctt	CCATGGATCCTCTAGAgaactggcgcaataattgtc	65	636
CMJ039C	TTCGTTGACCTCTAGAatgggactggtctcttttcg	CCATGGATCCTCTAGAccccgtcgttcgagagaaaa	67	1055
CMH235C	TTCGTTGACCTCTAGAatggagcgggtatagtttc	CCATGGATCCTCTAGAatggtactaaacaccttga	233	996
CMR388C	TTCGTTGACCTCTAGAatgggcagactgggctgca	CCATGGATCCTCTAGActtgatacgtcctctactc	93	455
CMR306C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaggttcgagcagcggc	CCATGGATCCTCTAGAgttgaacgtcgggtattga	92	1334
CMS375C	TTCGTTGACCTCTAGAatggaccacagcagctac	CCATGGATCCTCTAGActccaggtatatggtcgtg	168	1157
CMT246C	TTCGTTGACCTCTAGAatggtcactgtggaggacct	CCATGGATCCTCTAGAgaagagcggttaccgctg	210	527
CMI125C	TTCGTTGACCTCTAGAatggccagtctcgagaaggg	CCATGGATCCTCTAGAccatgcatcgaanaagtcg	148	1175
CMS267C	TTCGTTGACCTCTAGAatgagcgtatgttcgctcca	CCATGGATCCTCTAGAccattgagagtttcgcccac	86	1147
CMN333C	TTCGTTGACCTCTAGAatgggctcgtctcttctct	CCATGGATCCTCTAGAcaaaagagaaccagcaactg	94	788
CME153C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaagagccgagagagacg	CCATGGATCCTCTAGAgcaggtgctaggactttggt	50	767
CMM188C	TTCGTTGACCTCTAGAatgggggatttgggtgaaca	CCATGGATCCTCTAGAgtttgcgaccaataagcgt	38	2719
CMC015C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcgtacctcgtctttt	CCATGGATCCTCTAGAgaactcttcactccgaca	155	351
CMS299C	TTCGTTGACCTCTAGAatggaacagtcgagcgcatt	CCATGGATCCTCTAGAcgcaatgagaactttgaaag	82	550
CMT073C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaactcggcagcaatagc	CCATGGATCCTCTAGAtcgcacagttcagcgcgag	45	917
CML055C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcaaacgatcaactcgag	CCATGGATCCTCTAGAtctgtcttcggaggaggga	146	1316
CMN243C	TTCGTTGACCTCTAGAatgccgttcggagagtgtct	CCATGGATCCTCTAGAaaagaccgctcgcgctg	74	672

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')	Cloned length (aa)	Full length of enzyme (aa)
CMM132C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgagacacctctcgccc	CCATGGATCCTCTAGAcgtggttacggagccgtta	60	604
CMT071C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcggcctttcggttcgt	CCATGGATCCTCTAGAtgacgaagctagcccgtg	33	590
CMC080C	TTCGTTGACCTCTAGAatgacgagcacaagtgcg	CCATGGATCCTCTAGAaaacgcaaaagatcgtatca	114	365
CMM286C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtttcgggcgcaactgt	CCATGGATCCTCTAGAagttacgacaacacgcttc	80	490
CMD118C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcttccagatccgagtctc	CCATGGATCCTCTAGAactcaaaatgagaacagga	138	549
CMT420C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaaacccagtggttt	CCATGGATCCTCTAGAcggacaagaactacacag	81	398
CMK172C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaaactcgctacctac	CCATGGATCCTCTAGAtgtgatgaaggccaatcc	69	327
CMS393C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctgcttttgcgaacc	CCATGGATCCTCTAGAacccgactgccaccagtga	88	321
CMI240C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtttctgttcaactgg	CCATGGATCCTCTAGAaatggcctcggcgtccagca	114	136
CMR006C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcgtacggcaagactg	CCATGGATCCTCTAGAaccgacgagtacgtacggg	65	303
CMT381C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaccttcttctctttg	CCATGGATCCTCTAGAaccaccgccgtatccgaga	84	332
CMD146C	TTCGTTGACCTCTAGAatgagcctgctgattcaatc	CCATGGATCCTCTAGAccaagagacctgcggcccca	97	311
CMJ263C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctttcagtgaaagcct	CCATGGATCCTCTAGActgcgggtgccctgggccc	117	516
CMR113C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctttcggcctgtagg	CCATGGATCCTCTAGAacgaccatactcaactggt	95	230
CMH111C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtttgttagtggtgcaa	CCATGGATCCTCTAGAccgtttccgcagcgaacc	100	240
CME186C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctttaaacaaggagt	CCATGGATCCTCTAGAttccgacaaccacgtagga	59	656
CMG147C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctgacggctaataact	CCATGGATCCTCTAGAggcacgtgccacgtccacgc	53	641
CML197C	TTCGTTGACCTCTAGAatggtatgaaacattttcg	CCATGGATCCTCTAGAtctagtctctcttgagtaa	145	775
CMO037C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcacctgccagcgcaccc	CCATGGATCCTCTAGAttggtattgagtgcgcac	160	1092
CMT459C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcctttgtctcgggacg	CCATGGATCCTCTAGAcgcgccggcgtctcgttcc	101	824
CMM045C -1stMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgacagccaaggtgaaac	CCATGGATCCTCTAGAtccaatgagcggcgtgaaga	96	476
CMM045C -2ndMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgagcagagaaggaactgaa	CCATGGATCCTCTAGAccacaagcagatgataccgc	66	476
CMJ201C -1stMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgattgatgctagagacgg	CCATGGATCCTCTAGAgcctttcagggcgaagacgt	78	412
CMJ201C -2ndMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgtcgggtccgaaatcg	CCATGGATCCTCTAGAgcctttcagggcgaagacgt	34	412
CMK291C -1stMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgaatacaagcatatatga	CCATGGATCCTCTAGAggcccgctatccgacgacg	119	499
CMK291C -2ndMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgctcgcgtcggaccaggc	CCATGGATCCTCTAGAgccaactttggccagcagc	103	499

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')	Cloned length (aa)	Full length of enzyme (aa)
CMK291C -3rdMet	TTCGTTGACCTCTAGAatgattacgaatcgggagtt	CCATGGATCCTCTAGAgccaactttggccagcgcagc	72	499
CMK115C	TTCGTTGACCTCTAGAatgaaaaacattaccgat	CCATGGATCCTCTAGAacgctgtcgcagaaagtaa	87	773
CML080C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcttcgggtatttagact	CCATGGATCCTCTAGAtgtcgcttgagcacagaca	58	450
CMT072C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctttggcttggccgagc	CCATGGATCCTCTAGAcgcgacagtgtttggcgcg	151	632
CMK139C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcgctctttctcacagg	CCATGGATCCTCTAGAcaaagccgctggctgatgaa	68	300
CMT074C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtcagcttctcattctg	CCATGGATCCTCTAGAtgtcgttccggccggttca	98	347
CMC137C	TTCGTTGACCTCTAGAatgcaggttcttagattgt	CCATGGATCCTCTAGAttcggcacctcgaaggact	52	256
CMR380C	TTCGTTGACCTCTAGAatgacgggagagagtgtgag	CCATGGATCCTCTAGAatcagtgctgctcaacgc	159	1145
CMA042C	TTCGTTGACCTCTAGAatggatgcacctgcgctgc	CCATGGATCCTCTAGActcgagggcgctctaccg	46	438
CME087C	TTCGTTGACCTCTAGAatgctgtttctctggcac	CCATGGATCCTCTAGAaagcttgcaccgaaagagc	54	584
CMT151C	TTCGTTGACCTCTAGAatggctgctgtgttacctc	CCATGGATCCTCTAGAtgtcagctgtaggtgacgg	96	1016
CMP157C	TTCGTTGACCTCTAGAatgttcgtgcagagaacgtt	CCATGGATCCTCTAGAcgaaccctaccagaggata	144	778
CMS254C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtggcggtaggcaagtt	CCATGGATCCTCTAGAgctccaattgttccacat	271	1117
CMJ049C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtccacaaaacgtcagg	CCATGGATCCTCTAGAggagtacgaatctcctgac	150	780
CMH156C	TTCGTTGACCTCTAGAatgccctcgtggaccaccag	CCATGGATCCTCTAGAacggaagcttctcgtattg	137	547
CMA056C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtggtttctcttgcgct	CCATGGATCCTCTAGAacctcgcagtcgcaacatgc	66	1035
CMR088C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtatatagctcgtgca	CCATGGATCCTCTAGAgttcccaaacaggcagaa	59	292
CMF053C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcaacaggagagcagc	CCATGGATCCTCTAGAaaagtcttctcgcaccacgc	120	1089
CMT274C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtcgtacgtggaccatt	CCATGGATCCTCTAGAtccgaatccatgcagtagaa	129	442
CMP032C	TTCGTTGACCTCTAGAatggatcggcgctatgatga	CCATGGATCCTCTAGAacctgtgagaccgcccg	78	257
CMT308C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtttgaggctgtagcct	CCATGGATCCTCTAGAttcagcagcaattggacgct	99	765
CML191C	TTCGTTGACCTCTAGAatggaagatagggaagttt	CCATGGATCCTCTAGAaacaagtactggtttctcag	75	433
CMO177C	TTCGTTGACCTCTAGAatgtgcagtcgcgagttgg	CCATGGATCCTCTAGAatttcggaggagcgaatgc	93	562
CMR500C	TTCGTTGACCTCTAGAatggcgttcttactttcgg	CCATGGATCCTCTAGAcggcacacatacacgcaccg	139	1284
CMT312C	TTCGTTGACCTCTAGAatgccgggcaacgattgcag	CCATGGATCCTCTAGAtatccggataccgtcgggcc	261	600
CMC146C	TTCGTTGACCTCTAGAatggatgctgaacaacgttc	CCATGGATCCTCTAGAgttcagttcgttaccgcgcc	61	741

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')	Cloned length (aa)	Full length of enzyme (aa)
CMS228C	TTCGTTGACCTCTAGAAatgggaaagacagactgga	CCATGGATCCTCTAGAgacataagcgcgaacatttc	97	384
CMP278C	TTCGTTGACCTCTAGAAatgagcaaccttaaacaggt	CCATGGATCCTCTAGActgaacctccgagccaaagg	92	92
CMS372C	TCGTTGACCTCTAGAAatgacgctcgttacagtagc	CATGGATCCTCTAGActtggcgtgcgctgttgg	129	129
CMT175C	TCGTTGACCTCTAGAAatgactcgcctacaaccgct	CATGGATCCTCTAGAcccgaaacctgccaacg	74	321
CMM126C	TCGTTGACCTCTAGAAatgaacctgaatgatcct	CATGGATCCTCTAGAgccgaggaaacatcccccg	106	289
CME109C	TTCGTTGACCTCTAGAAatgctcgaacatgggaaaa	CCATGGATCCTCTAGAAagagaccagactccacc	122	436
CMP142C	TTCGTTGACCTCTAGAAatgattcatgtaacaggtc	CCATGGATCCTCTAGAcaccgctcgtgcaacgcat	208	446
CMR130C	TTCGTTGACCTCTAGAAatggcggcgactagccctga	CCATGGATCCTCTAGAttccgctgctttcttctca	83	371
CMB069C	TTCGTTGACCTCTAGAAatgctttttgcgatttgag	CCATGGATCCTCTAGAtgcttgtcaatcgaaaaca	188	1040
CMP267C	TCGTTGACCTCTAGAAatgtaaaaaacatggagag	CATGGATCCTCTAGAAaccgtccagggacaaccaac	180	944
CMH204C	TCGTTGACCTCTAGAAatggcgctttttgaccca	CATGGATCCTCTAGAAacacaaaaacatgctcta	193	889
CMQ413C	TCGTTGACCTCTAGAAatgggttgacttgcgggga	CATGGATCCTCTAGAAataacacgcatgggagcgaa	114	388
CMF187C -1st Met	TCGTTGACCTCTAGAAatgctttgtggcaacattct	CATGGATCCTCTAGActcccagaatatccgaagc	175	403
CMF187C -2nd Met	TCGTTGACCTCTAGAAatgcttgacaggagcgct	CATGGATCCTCTAGActcccagaatatccgaagc	160	403
CMF187C -3rd Met	TCGTTGACCTCTAGAAatggaagaagcggagcgtgca	CATGGATCCTCTAGActcccagaatatccgaagc	152	403
CMF187C -4th Met	TCGTTGACCTCTAGAAatgggacgtgcaattcagag	CATGGATCCTCTAGActcccagaatatccgaagc	122	403
CML178C	TCGTTGACCTCTAGAAatgcagtcgaagcgccat	CATGGATCCTCTAGAcacgtaccaaacgctgagcg	79	313
CMQ255C	TCGTTGACCTCTAGAAatgaccacaattcagggtga	CATGGATCCTCTAGAgctgcaagttccagccttg	37	2328
HA tag construct				
CMJ027C	CTGCAGTTAATTAATatgtgggtgcttgtatttc	TGGGTAATTAATTAAttgcgcatcgtacgcacca	452	452
CML329C	CTGCAGTTAATTAATatgtcgcacgaactgtcca	TGGGTAATTAATTAAggtcgatagccatccccct	477	477
EGFP-C-terminal peptide construct				
CMK115C	GACGAGCTGTACAAGgccccacattcacaatacgg	CGGGCGGCCGCTTTAgagacgcgggaatcgccaac	67	773
CMR380C	GACGAGCTGTACAAGaatggcggtgcaattgcaact	CGGGCGGCCGCTTTAaagtgtctctcgaaccgtc	67	1145
CMA042C	GACGAGCTGTACAAGcgggagctgcctcgattcg	CGGGCGGCCGCTTTAagccagtcgccaatgagaa	67	438

2.6 図

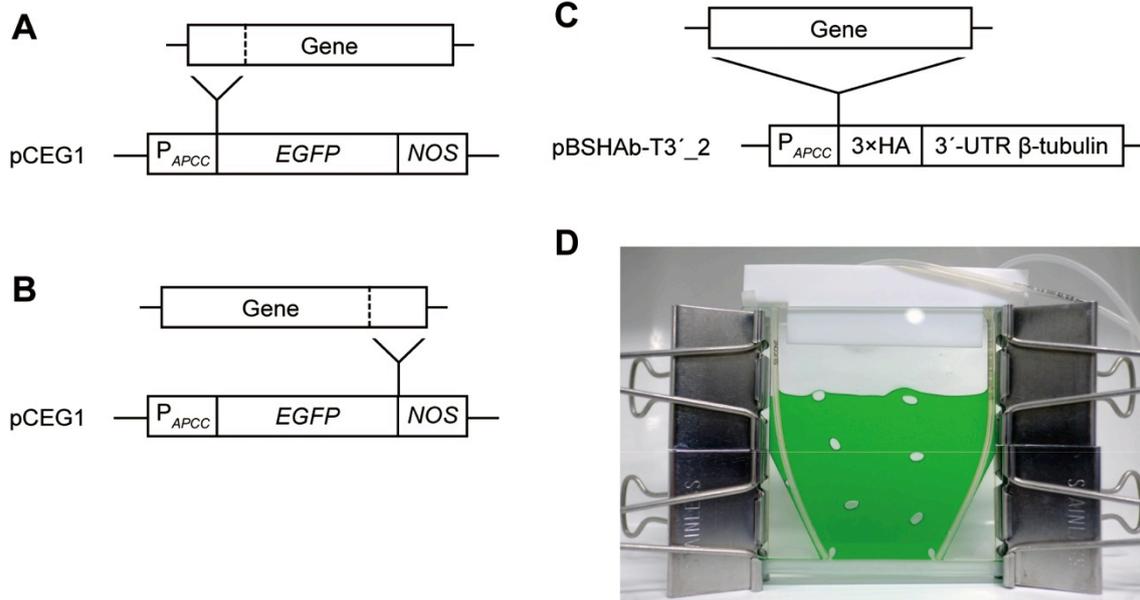


図 2.1 細胞内局在解析に使用したコンストラクトの模式図 (A~C) と高密度培養の様子 (D)

細胞内局在の解析に使用した GFP コンストラクト (A,B)、および HA タグコンストラクト (C) の模式図を示す。GFP コンストラクトの作製では、解析候補遺伝子の N 末端配列部分の DNA 断片を、pCEG1 ベクターに挿入した。また、一部の β 酸化関連酵素については、それらの C 末端配列部分 (67 アミノ酸) を pCEG1 ベクターに挿入したコンストラクトを用いて解析した (B)。HA タグを用いた局在解析には、解析候補遺伝子の全長を pBShAb-T3'_2 ベクターに挿入したコンストラクトを使用した (C)。D はシアニジオシゾンの高密度培養を行っている写真である。幅 2 mm のゲル板の間隙に高密度に調整した培養液 ($OD_{750} = 10$) を流し込み、シリコンチューブを使って 1%CO₂ を通気して、強光 ($250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) をゲル板の側面から照射し培養した。略語：3xHA, 3xHA タグ；3'-UTR β -tubulin, シアニジオシゾンの β チューブリン遺伝子の 3' 非翻訳領域；EGFP, EGFP 遺伝子；NOS, NOS ターミネーター；P_{APCC}, APCC プロモーター。

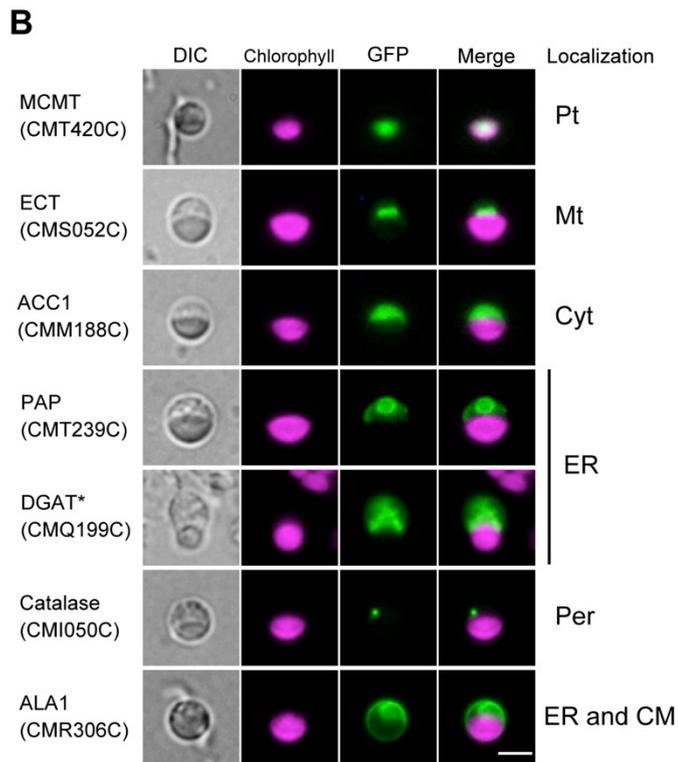
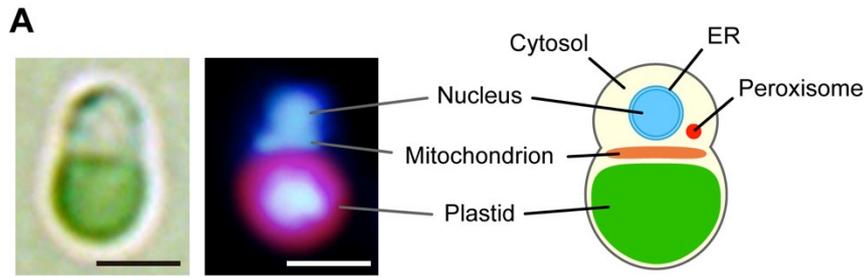


図 2.2 シアニジオシゾンの細胞構造 (A) と細胞内局在解析の一例 (B)

A は左からシアニジオシゾン細胞の明視野像および DAPI 染色像、シアニジオシゾンの細胞構造の模式図の順に示した。B は GFP を用いた細胞内局在解析の一例を示した。顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

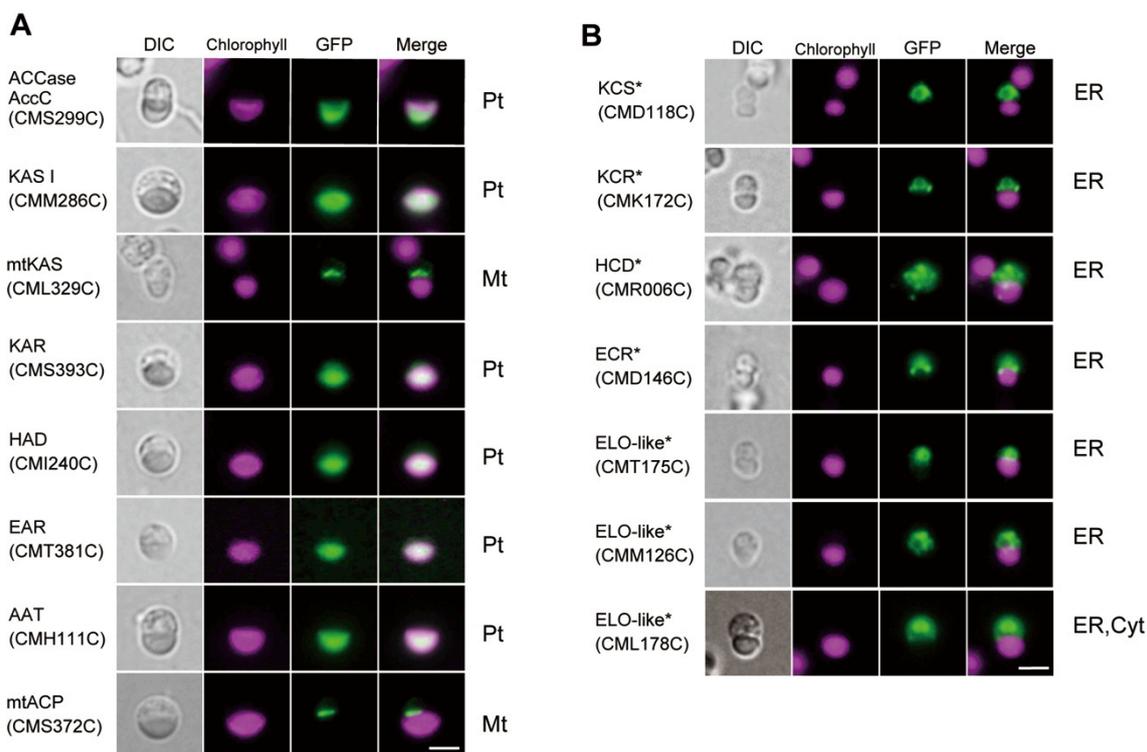


図 2.3 脂肪酸合成 (A) および脂肪酸伸長 (B) に関わる酵素の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。mtKAS (CML329C) は 3×HA タグコンストラクトを用いて解析した。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

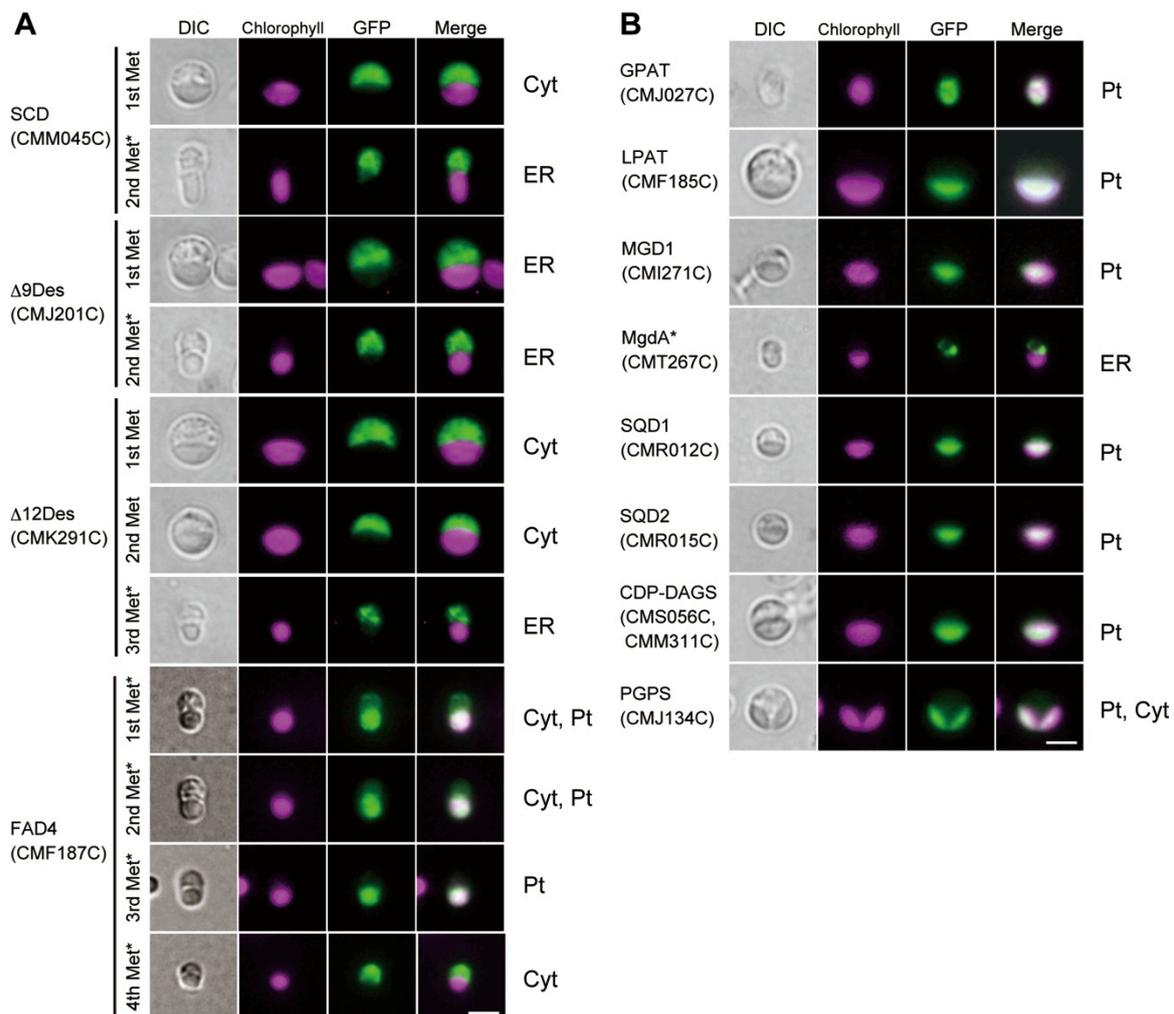


図 2.4 不飽和化酵素 (A) および葉緑体脂質の合成 (B) に関わる酵素の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアンジオシゾン細胞の写真を示す。GPAT (CMJ027C) は 3×HA タグコンストラクトを用いて解析した。CDP-DGAS をコードする CMS056C および CMM311C はアミノ酸配列が同一であったため、同じコンストラクトを使用した。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

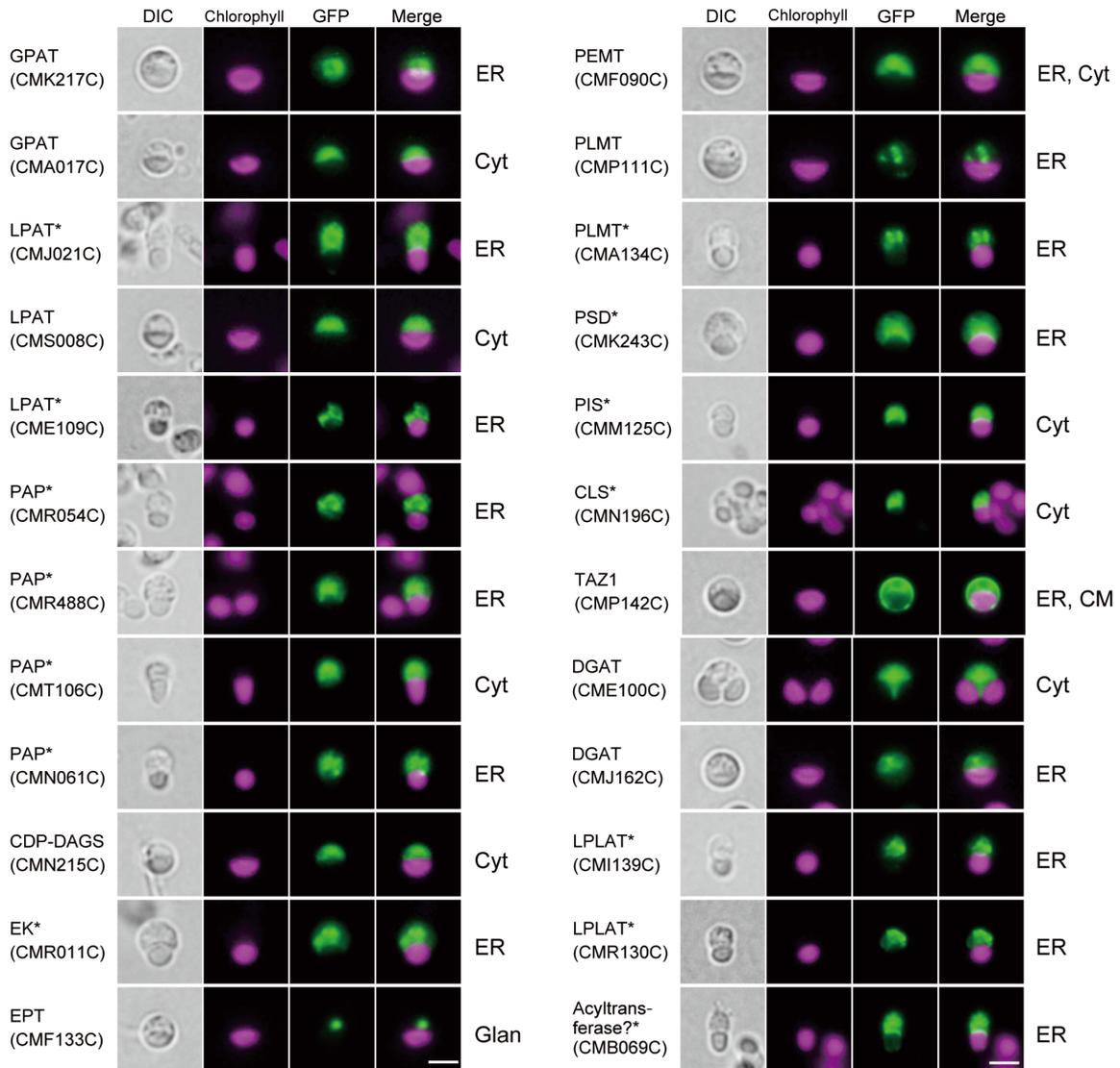


図 2.5 リン脂質や TAG 合成に関わる酵素の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

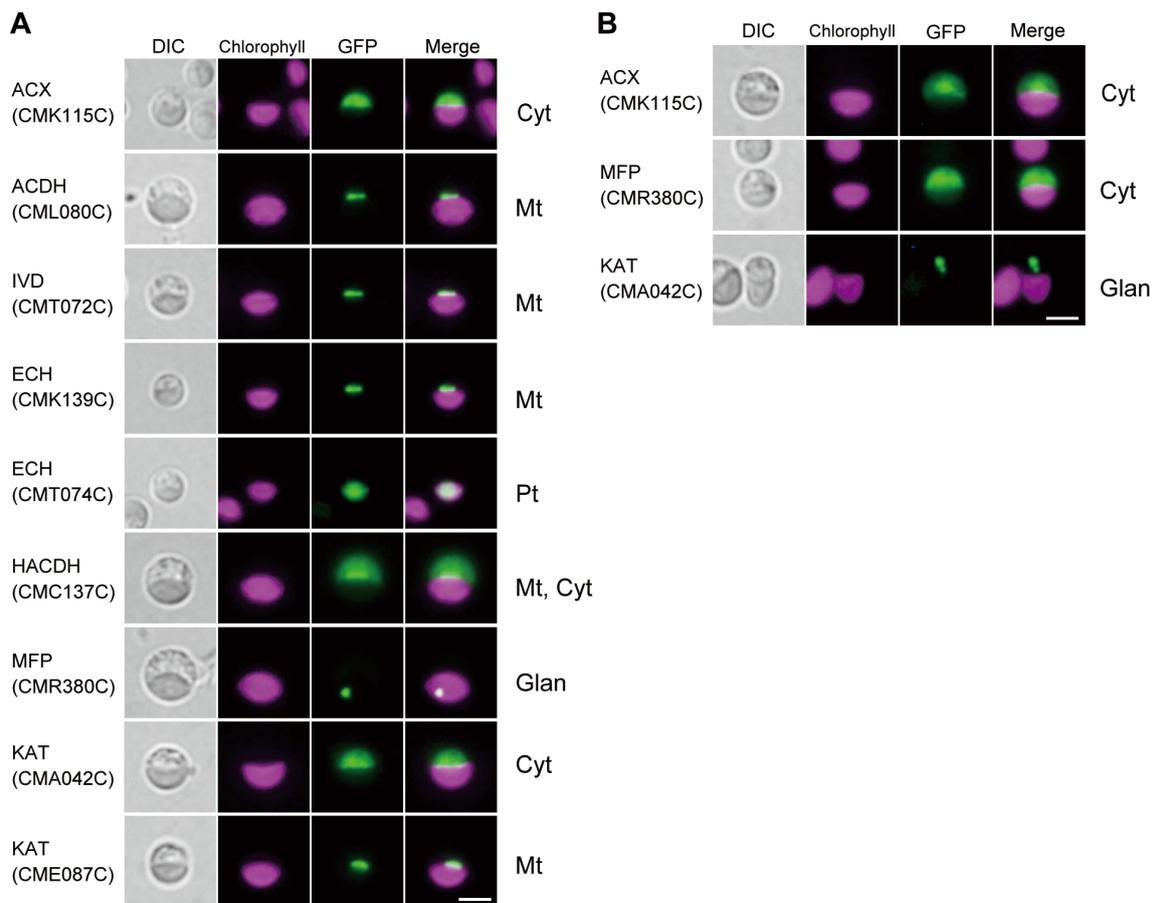


図 2.6 脂肪酸の β 酸化に関わる酵素の細胞内局在解析

A は *N* 末端配列を挿入した GFP コンストラクトを用いて行った解析の結果を示す。また、B には、3 種の β 酸化関連酵素における *C* 末端配列を挿入した GFP コンストラクトを用いて行った解析結果を示す。顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

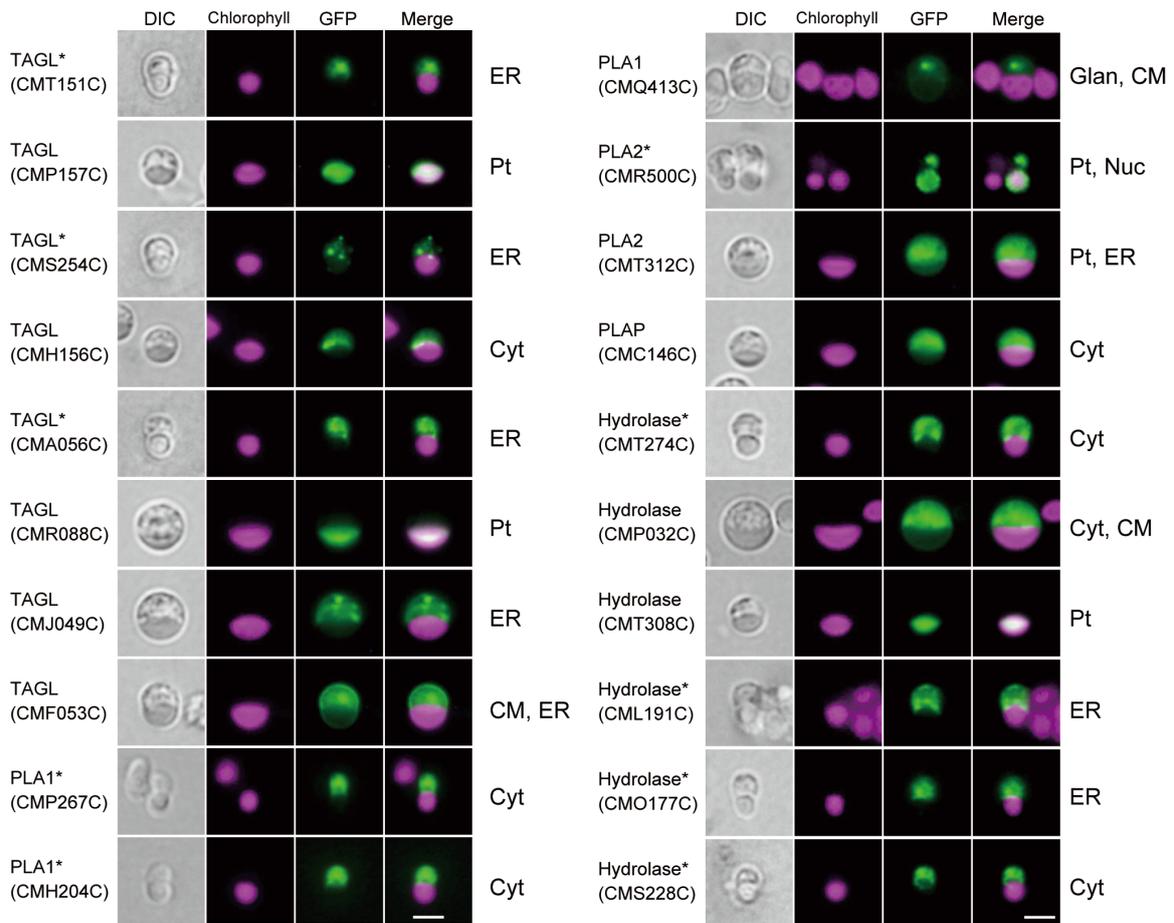


図 2.7 リパーゼ、およびリパーゼとして機能していることが予想される加水分解酵素の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

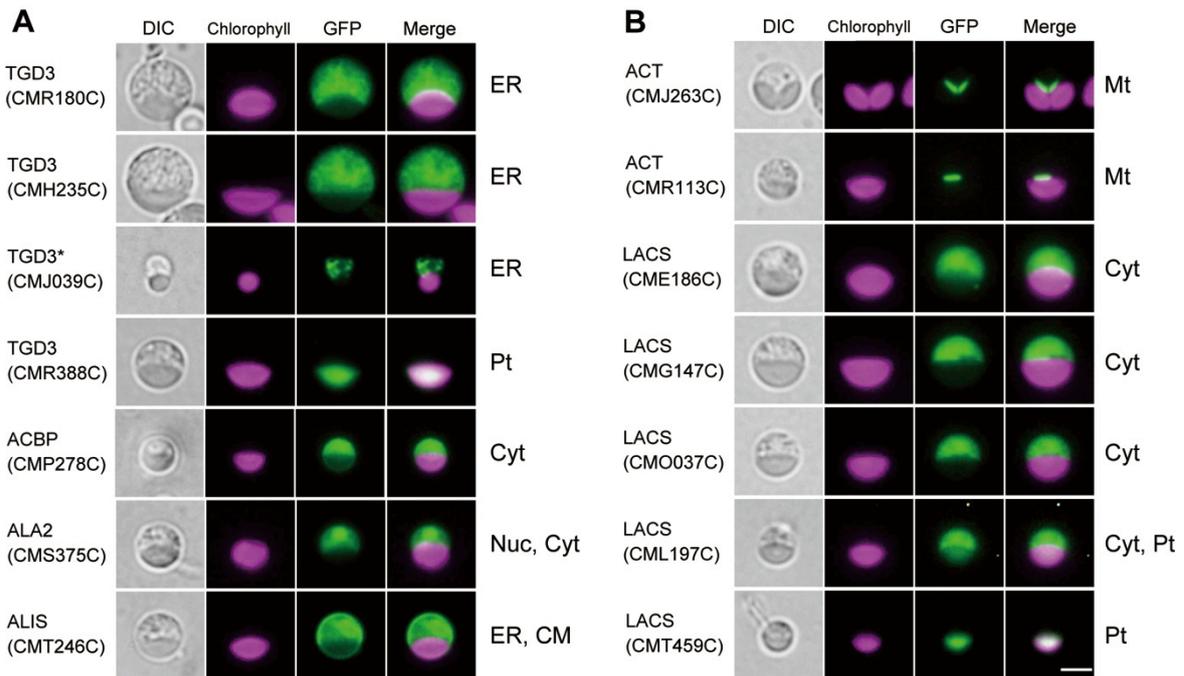


図 2.8 脂質輸送に関わる酵素 (A)、およびアシル-ACP/CoA 合成酵素(B)の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

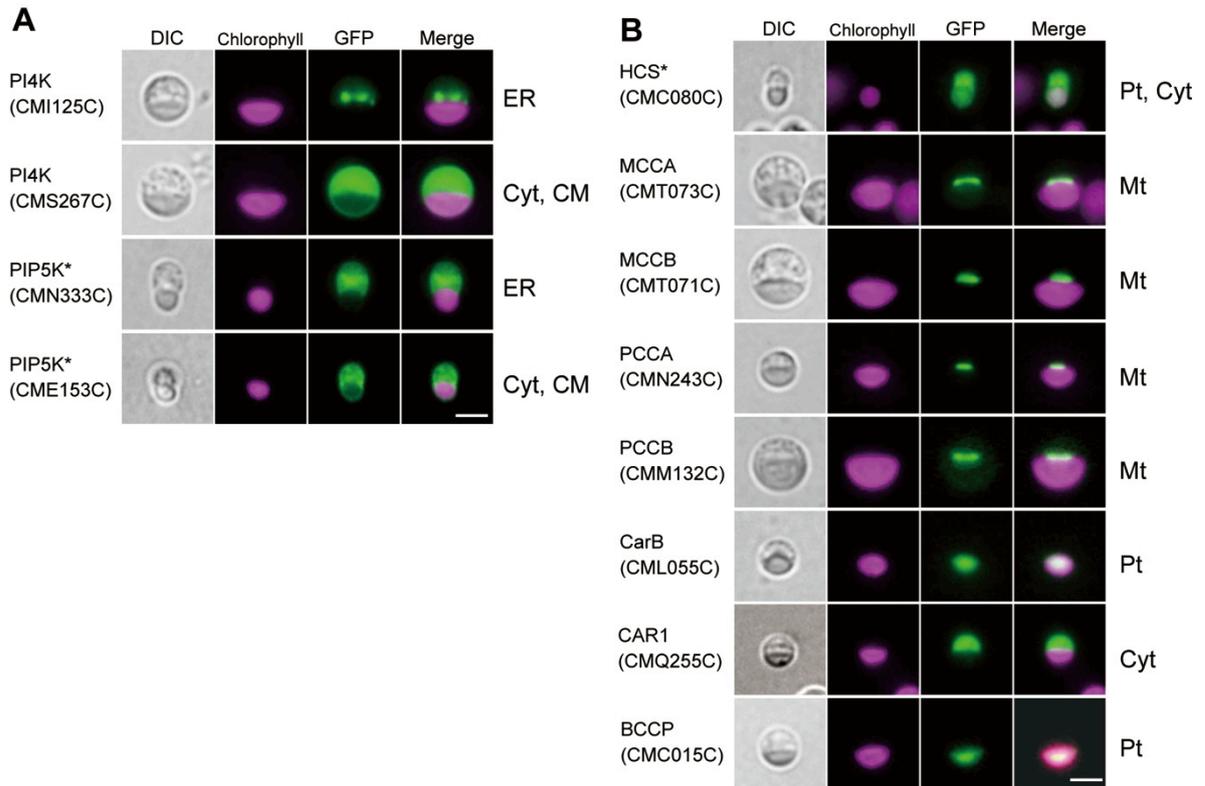


図 2.9 PI シグナリングに関わる酵素(A)、およびビオチン依存カルボキシラーゼ (B) の細胞内局在解析

顕微鏡写真は左から、微分干渉像、クロロフィルおよびフィコシアニンの自家蛍光像、GFP 蛍光像、自家蛍光像と GFP 蛍光像をマージしたものの順に示す。それぞれの顕微鏡写真の右側に解析結果を表記した。アスタリスクは抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったシアニジオシゾン細胞の写真を示す。酵素名および細胞内局在の表記については表 2.2 を参照のこと。スケールバーは 2 μm を示す。

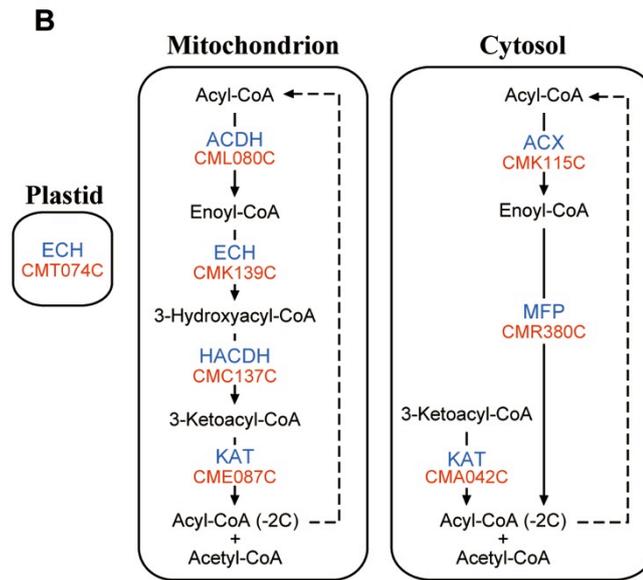
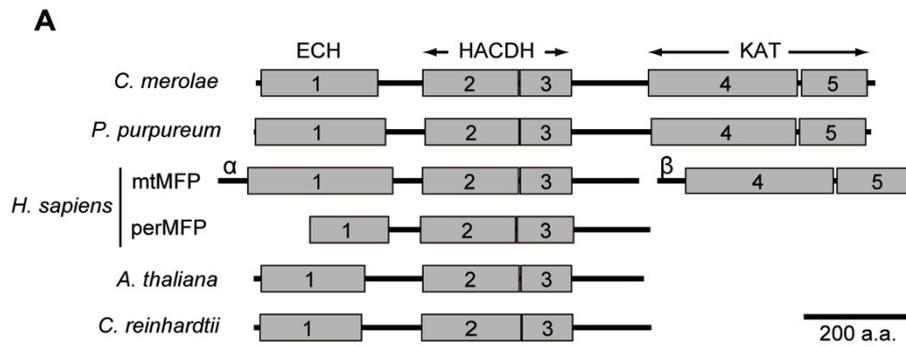


図 2.11 MFP のドメイン構造の比較 (A) とシアニジオシゾンにおける脂肪酸の β 酸化の代謝経路図 (B)

シアニジオシゾン (*C. merolae*)、チノリモ (*P. purpureum*)、ヒト (*H. sapiens*)、シロイヌナズナ (*A. thaliana*)、クラミドモナス (*C. reinhardtii*) における MFP の機能ドメイン構造を示す。ヒトの場合は、ミトコンドリア (mtMFP) とペルオキシソーム (perMFP) にそれぞれ異なる MFP が存在する。また、mtMFP は α サブユニットと β サブユニットからなる複合体である。1~5 は検出された機能ドメインを示す (1; エノイル-CoA ヒドラターゼ/イソメラーゼドメイン, 2; 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ NAD 結合ドメイン, 3; 3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ C 末端ドメイン, 4; チオラーゼ N 末端ドメイン, 5; チオラーゼ C 末端ドメイン)。B は本研究の解析結果を基に作成したシアニジオシゾンにおける β 酸化の代謝経路図である。酵素名は表 2.2 を参照のこと。

第3章

比較ゲノム解析によるシアニジオシゾンと その他の紅藻との脂質代謝系の比較

3.1 序文

紅藻はおおきく分けて紅藻植物亜門 (Rhodophyceae) とイデユコゴメ亜門 (Cyanidiophyceae) に分類される (Yoon et al. 2006)。紅藻植物亜門はさらにウシケノリ綱、真正紅藻綱、ロデラ綱、ベニミドロ綱、チノリモ綱、およびオオイシソウ綱の 6 綱に分けられる。スサビノリやヤハズツノマタ (*Chondrus crispus*)、チノリモなどの海に生息する紅藻は紅藻植物亜門に属している。一方、イデユコゴメ亜門にはシアニジオシゾンやガルデリア、シアニジウム (*Cyanidium caldarium*) が属しており、これらの藻類は高温・強酸性の極限環境に生息している。近年、Muñoz-Gómez らによって、紅藻の新たな分類体系が発表された (2017)。ここでは、紅藻を Cyanidiophyceae (イデユコゴメ亜門)、Eurhodophytina、Proteorhodophytina の 3 門に分け、Eurhodophytina にはウシケノリ綱および真正紅藻綱が、Proteorhodophytina にはロデラ綱、ベニミドロ綱、チノリモ綱、およびオオイシソウ綱がそれぞれ含まれる。本研究では、Yoon らの分類体系に則ってまとめた。

海洋性紅藻とシアニジオシゾンでは脂質組成が非常に類似している (図 3.1a)。ガルデリアのみ、ベタイン脂質である DGTS や 1,2-ジアシルグリセリル-*O*-2'-(ヒドロキシメチル)-(*N,N,N*トリメチル)- β -アラニン (DGTA) などが検出されている (Vítová et al. 2016)。一方、脂肪酸組成については、紅藻植物亜門とイデユコゴメ亜門で大きく異なる (図 3.1b)。紅藻植物亜門に属する紅藻は、アラキドン酸 (20:4) やエイコサペンタエン酸 (20:5) などの多価不飽和脂肪酸を有しているが (Araki et al. 1986; Trevor et al. 1989; Khozin-Goldberg et al.

2000)、シアニジオシゾンおよびガルデリアではこのような不飽和脂肪酸は存在しない (Sato and Moriyama 2007; Vítová et al. 2016)。このように、シアニジオシゾンと海洋性紅藻とでは脂肪酸組成が大きく異なっていることから、これらの紅藻はそれぞれ異なる脂質代謝系をもっていると考えられる。

したがって、第 3 章ではシアニジオシゾンとその他の紅藻との間で脂質代謝についての相違点および共通点を明らかにすることを目的とし、シアニジオシゾンやその近縁種であるガルデリア、および海洋性紅藻であるスサビノリ、ヤハズツノマタ、チノリモにおける脂質代謝関連酵素について比較ゲノム解析を行い、それぞれの紅藻の脂質代謝についての特徴をまとめた。

3.2 材料と方法

3.2.1 比較ゲノム解析による脂質代謝関連酵素の探索

第 2 章 2.1 脂質代謝関連酵素の探索と同様の方法を用いて、スサビノリ (*Pyrophyra yezoensis*)、ヤハズツノマタ (*Chondrus crispus*)、チノリモ (*Porphyridium purpureum*)、ガルデリア (*Galdieria sulphuraria*) の脂質代謝関連酵素を探索した。シアニジオシゾンやシロイヌナズナの既知の脂質代謝関連酵素をもとに、Gclust データベース (Sato 2009; <http://gclust.c.u-tokyo.ac.jp/>) のデータセット Gclus2016_R を用いて、これらの紅藻のオーソログを探索した。

3.3 結果

シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素を基に、スサビノリ、ヤハズツノマタ、チノリモ、およびガルデリアについて、それらのオーソログを Gclust データベースによって探索した。比較ゲノム解析に使用した紅藻のゲノム情報については表 3.1 に示した。ほとんどの紅藻で

核、ミトコンドリア、および葉緑体のゲノムがすでに解読されているが、チノリモのみミトコンドリアゲノムが解読されていない。比較ゲノム解析の結果は、紅藻における脂質代謝関連酵素の比較ゲノムデータベースとして表 3.2 にまとめ、特に重要だと思われる紅藻の特徴については以下にまとめた。

3.3.1 3-ケトアシル-ACP 合成酵素 (KAS) の種類

陸上植物における葉緑体での脂肪酸合成には、基質特異性の異なる 3 種類の KAS (KAS I/II/III) が関わっている (Shimakata and Stumpf 1982; Clough et al. 1992; Pidkowich et al. 2007)。これは大腸菌 (Parsons and Rock 2013) やシアノバクテリア (Lem and Stumpf 1984; Kuo and Khosla 2014) にも共通している。第 2 章において、シアニジオシゾンの葉緑体には KAS I のホモログしか存在しないことを報告した。その他の紅藻についても、KAS について調べたところ、ガルデリアはシアニジオシゾンと同様に KAS I のみが検出された (表 3.3)。一方、海洋性紅藻については、KAS I および KAS III が検出されたが、KAS II のホモログは検出されなかった (表 3.3)。また、KAS III のホモログは葉緑体ゲノムにコードされていた。このことから、海洋性紅藻およびガルデリアは、シアニジオシゾンと同様に、葉緑体脂肪酸合成に関わる KAS が、3 種類全て揃っていないことがわかった。

3.3.2 不飽和脂肪酸の合成

図 3.2 に紅藻における不飽和脂肪酸の合成についてまとめた。調べた 5 種全ての紅藻において、ステアロイル-ACP 不飽和化酵素は検出されず、代わりにステアロイル-CoA 不飽和化酵素 (SCD) が検出された (表 3.2)。このことから、他の紅藻もシアニジオシゾンと同様に、小胞体で 18:0 から 18:1 の不飽和化が行なわれていると思われる。

シアニジオシゾンの主な不飽和脂肪酸は 18:1 と 18:2 であり、二重結合が 3 個以上の不飽和脂肪酸が存在しない。これらの脂肪酸の合成に関わる不飽和化酵素として、SCD に加えて、アシル脂質 $\Delta 9$ 不飽和化酵素 ($\Delta 9\text{Des}$) およびアシル脂質 $\Delta 12$ 不飽和化酵素 ($\Delta 12\text{Des}$) が同定されている (Sato and Moriyama 2007)。存在比は 1~2%程度と非常に少ないが、20:1(11) や 20:2(11,14) もシアニジオシゾン細胞から検出されており (Toyoshima et al. 2016)、このことから小胞体で行われる脂肪酸伸長反応によって、18:1 または 18:2 がこれらの脂肪酸へと代謝されていると思われる。ガルデリアでは、主な不飽和脂肪酸は 18:1、18:2、および 18:3 であり、20:2(11,14) や 20:3(11,14,17) も微量であるが存在が確認されている (Vítová et al. 2016; Sakurai et al. 2016)。ガルデリアでは、シアニジオシゾンで検出された 3 個の不飽和化酵素に加えて、アシル脂質 $\Delta 15$ 不飽和化酵素 ($\Delta 15\text{Des}$) が検出され、18:3 の合成に関わっていると思われる。

海洋性紅藻は 20:4(5,8,11,14) や 20:5(5,8,11,14,17) が多く存在しており、脂肪酸伸長と不飽和化を繰り返すことで、このような多価不飽和脂肪酸が合成されている。海洋性紅藻の多価不飽和脂肪酸の合成については、チノリモにおける放射性ラベルを使用した解析によって詳しく調べられている (Shiran et al. 1996; Khozin et al. 1997)。チノリモでは、20:5(5,8,11,14,17) の合成経路が 2 通り存在し、それぞれ $\omega 3$ 経路および $\omega 6$ 経路と呼ばれており、チノリモでは主に $\omega 6$ 経路によって多価不飽和脂肪酸が合成されていると考えられている。 $\omega 3$ 経路では、18:2(9,12) から 18:3(9,12,15)、18:4(6,9,12,15) へと順に不飽和化されたのち、脂肪酸伸長により 20:4(8,11,14,17) となり、最終的に 20:5(5,8,11,14,17) へと不飽和化される。 $\omega 6$ 経路では、18:2(9,12) から 18:3(6,9,12) へ不飽和化されたのち、脂肪酸伸長により 20:3(8,11,14) となり、その後 20:4(5,8,11,14)、20:5(5,8,11,14,17) へと順に不飽和化される。

チノリモ、ヤハズツノマタ、スサビノリの不飽和化酵素を探索した結果、シアニジオシ

ゾンやガルデリアとは異なり、アシル脂質 $\Delta 5$ 不飽和化酵素およびアシル脂質 $\Delta 6$ 不飽和化酵素が検出された。 $\omega 6$ 経路において、最後の反応を触媒するアシル脂質 $\Delta 17$ 不飽和化酵素については、候補遺伝子がみつからなかった。また、ヤハズツノマタおよびスサビノリでは、 $\Delta 9\text{Des}$ が検出されなかったため、これらの紅藻では 18:1 の合成は SCD によってのみ行われている可能性が考えられた。

3.3.3 PC の合成

図 3.3 は、陸上植物およびシアニジオシゾンにおける PC 合成経路を比較したものである。PC の合成経路は、CDP-コリンと DAG から PC が合成される CDP-コリン経路と、PE のメチル化によって合成される PE メチル化経路の 2 種類が存在する。陸上植物では、PC は主に CDP-コリン経路 (図 3.3 ; 反応 7~9) によって合成されていると考えられている。陸上植物では、PE メチル化経路において PEMT (図 3.3 ; 反応 4) は同定されておらず (Keogh et al. 2009)、この経路の役割は中間産物であるモノメチル PE を PC へ代謝することであると考えられている。一方、シアニジオシゾンでは、PE メチル化経路 (図 3.3 ; 反応 4-5) によってのみ PC の合成が行われており、このことはシアニジオシゾン細胞を用いたラベル実験によって確認されている (Sato et al. 2016b)。

他の紅藻についても PC 合成に関わる酵素を調べたところ、シアニジオシゾンと同様に、CDP-コリン経路に関わる酵素が検出されなかった (表 3.4)。このことから、他の紅藻についても、シアニジオシゾンと同様に、PC は PE メチル化経路によってのみ行われていることが示唆された。

3.3.4 ガラクト脂質の合成に関わる酵素

陸上植物とシアノバクテリアでは、ガラクト脂質の合成に関わる遺伝子が異なる (Sato and Awai 2016)。第2章でも報告した通り、シアニジオシゾンでは陸上植物型 MGDG 合成酵素 MGD1 と、シアノバクテリア型 DGDG 合成酵素 DgdA のホモログによってガラクト脂質が合成されていると考えられている。ガルデリアでは、シアニジオシゾンと同様に、MGD1 および DgdA が検出され、*dgdA* は葉緑体ゲノムにコードされていることがわかった。一方、海洋性紅藻では、*dgdA* のホモログは検出されず、代わりに植物型 DGDG 合成酵素である *DGDI/2* のホモログが検出された。このことから、紅藻において *dgdA* から *DGDI/2* への置換は、イデユコゴメ綱と真正紅藻綱とが分岐したのちに、真正紅藻綱においてのみ行われたと考えられる。スサビノリでは、シアノバクテリアの MGDG 合成に関わる *mgdA* のホモログが2個検出された (表 3.2)。しかし、先行研究では GlcDG が検出されておらず (Araki et al. 1986)、シアニジオシゾンと同様に、*mgdA* ホモログがどのような働きをしているのかについては不明である。

3.4 考察

本研究では、脂質代謝関連酵素における比較ゲノム解析を用いて、シアニジオシゾンとその近縁種であるガルデリア、そして海洋性紅藻であるスサビノリ、ヤハズツノマタ、チノリモとの間での脂質代謝系の比較を試みた。その結果、シアニジオシゾンとその他の紅藻において、脂質代謝について共通点および相違点がいくつか見出された。共通点としては、葉緑体脂肪酸合成系の酵素である KAS が 3 種類揃っていないこと、PC の合成は PE メチル化経路によってのみ行われていることが挙げられる。相違点としては、合成される脂肪酸が異なることや、DGDG 合成酵素をコードする遺伝子が異なることが挙げられる。そこで、この 2 つの相違点についての考察を以下に記す。

脂質代謝という面からみると、イデユコゴメ亜門に属するシアニジオシゾンやガルデリアと、真正紅藻亜門に属する海洋性紅藻における大きな違いは脂肪酸組成である。シアニジオシゾンやガルデリアは、海洋性紅藻と比較して脂肪酸組成がシンプルである (Vítová et al. 2016; Toyoshima et al. 2016)。しかし、海洋性紅藻では、葉緑体で合成された 18:0 を出発点とし、不飽和化や脂肪酸伸長を行うことで、20:4(5,8,11,14) や 20:5(5,8,11,14,17) が合成される (Shiran et al. 1996; Khozin et al. 1997)。シアニジオシゾンやガルデリアでも、炭素数が 20 以上の脂肪酸が検出されているため、海洋性紅藻と同様に、これらの脂肪酸を合成するのに脂肪酸伸長が機能していると思われる。シアニジオシゾンでは、不飽和脂肪酸の合成は主に小胞体で行われているが、他の紅藻もシアニジオシゾンと同様に、小胞体が不飽和脂肪酸の合成の場であるのだろうか？

残念ながらシアニジオシゾン以外の紅藻において、不飽和化酵素の細胞内局在について実験的に解析したという報告はほとんどない。しかし、チノリモについては放射性ラベルを用いた解析により、ガラクト脂質の合成について詳細に解析されている (Khozin et al.

1997)。図 3.4 に、シロイヌナズナ、シアニジオシゾンおよびチノリモにおけるガラクト脂質合成経路をまとめた。シロイヌナズナの場合、葉緑体経路では 18:1/16:0 分子種のガラクト脂質が、小胞体を経由する経路では 18:2/18:2 分子種のガラクト脂質が合成され、その後それぞれ葉緑体で不飽和化を受ける。シアニジオシゾンでは、小胞体から供給された 18:2 と、葉緑体から供給された 16:0 から葉緑体経路型のガラクト脂質が合成されており、この経路は ‘Coupled pathway’ と呼ばれている (Sato and Moriyama 2007)。小胞体を経由して合成されるガラクト脂質は、陸上植物と同様に、18:2/18:2-PC が代謝されることで合成されていると思われるが、これを裏付ける実験的なデータはまだ示されていない (Sato and Moriyama 2007)。チノリモでは、小胞体で合成された 20:4(5,8,11,14) と、葉緑体で合成された 16:0 から葉緑体経路型のガラクト脂質 (20:4/16:0) が合成されたのち、葉緑体局在のアシル脂質 $\Delta 17$ 不飽和化酵素によって、20:5/16:0-MGDG が合成されていると考えられている (Khozin et al. 1997)。この合成経路はシアニジオシゾンの ‘Coupled pathway’ に非常に類似している。また、チノリモでは 20:5/20:5 というガラクト脂質分子種も存在しており、これらは 20:4/20:4-PC が葉緑体へ輸送され、20:4/20:4-MGDG へと代謝されたのち、20:5/20:5-MGDG へと不飽和化されると考えられている (Khozin et al. 1997)。このことから、シアニジオシゾンとチノリモでは脂肪酸の種類は異なるものの、どちらもガラクト脂質の合成に必要な不飽和脂肪酸は小胞体から供給されていると思われる。しかし、チノリモの不飽和化酵素の細胞内局在については、GFP などを用いた解析によって明らかにする必要があると思われる。

本研究によって、イデユコゴメ綱に属する紅藻と、真正紅藻綱に属する紅藻とでは、DGDG 合成酵素をコードする遺伝子が異なることがわかった (表 3.2)。イデユコゴメ綱では葉緑体ゲノムにシアノバクテリア型 DGDG 合成酵素 *dgdA* のホモログが、真正紅藻綱では

核ゲノムに植物型 DGDG 合成酵素 *DGDI/2* のホモログが、それぞれコードされていた。このことから、紅藻において *dgdA* から *DGDI/2* への置換は、イデユコゴメ綱と真正紅藻綱が分岐したのちに行われたと考えられる。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 において、*dgdA* 遺伝子を植物型 *DGD2* 遺伝子に置き換えても、生育に影響がないことが報告されており (Maida and Awai 2016)、これはシアノバクテリアにおいて、シアノバクテリア型と植物型のどちらの酵素が合成に関わっていても、正常に DGDG が合成されれば、生育には問題ないことを示している。したがって、紅藻においてもシアノバクテリア型および植物型と異なる遺伝子をもっているが、どちらの遺伝子についても葉緑体において DGDG の合成を行っていることには変わりないと思われるため、脂質代謝の面からみると大きな違いにはならないと考えられる。

本研究の解析によって、シアニジオシゾンとは他の紅藻に比べて脂肪酸組成が単純であるものの、脂質合成系については共通した点が多く発見された。具体的には、‘Coupled pathway’によってガラクト脂質が合成されていることや、PC 合成経路が 1 つしか存在しない点などが挙げられる。また、シアニジオシゾンの単純な脂肪酸組成は、脂肪酸や脂質の分析が行いやすく、代謝フロー解析に適しているというメリットにもなるため、シアニジオシゾンは紅藻の脂質代謝におけるモデル生物に非常に適した紅藻であるといえる。

3.5 表

表 3.1 比較ゲノム解析に使用した紅藻のゲノム情報

和名	紅藻植物亜門			イデユコゴメ亜門	
	スサビノリ	ヤハズツノマタ	チノリモ	ガルデリア	シアニジオシゾン
種名	<i>Pyropia yezoensis</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	<i>Galdieria sulphuraria</i>	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>
核ゲノム サイズ(Mbp)	43.5	105.0	19.7	13.7	16.5
遺伝子数	10,327	9,606	8,355	6,623	5,311
イントロン数	約 7,200	3,066	235	13,630	27
葉緑体ゲノム サイズ (kbp)	192	173	218	168	150
ミトコンドリア ゲノムサイズ (kbp)	42	26	未解読	21	32
文献	Nakamura et al. (2013) Wang et al. (2013a) Kong et al. (2014)	Leblanc et al. (1995a, b) Collén et al. (2013)	Bhattacharya et al. (2013) Tajima et al. (2014)	Schönknecht et al. (2013) Jain et al. (2014)	Ohta et al. (1998) Ohta et al. (2003) Matsuzaki et al. (2004) Nozaki et al. (2007)

表 3.2 紅藻における脂質代謝関連酵素の比較ゲノムデータベース

N.D.は比較ゲノム解析で検出されなかったことを示す。また (Pt) は葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子であることを示す。

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	Locus tag				
					<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Galdieria sulphuraria</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Pyropia yezoensis</i>
Fatty acid synthesis and elongation									
Acetyl-CoA	Malonyl-CoA	Acetyl-CoA carboxylase (Multifunctional type)	6.4.1.2	ACC1/2	CMM188C	03050	4470.1 4490.1	T00009359001	16197_g3909 14823_g3557 24731_g6105
		Acetyl-CoA carboxylase (Multisubunit type)		accA, CAC3	CMV056C (Pt)	JL72_p022 (Pt)	N.D.	1060 (Pt)	PoyeCp185 (Pt)
				accB	CMV134C (Pt) CMM015C	JL72_p129 (Pt) 6370	N.D.	640 (Pt) T00008359001	PoyeCp096 (Pt) 27819_g6847
				accD	CMV207C (Pt)	JL72_p062 (Pt)	N.D.	55 (Pt)	PoyeCp012 (Pt)
	6.3.4.14	accC, CAC2	CMS299C	09490	2030.6	T00007145001	3418_g729		
Malonyl-CoA	Malonyl-ACP	ACP S-malonyltransferase	2.3.1.39	fabD, MCT	CMT420C	00730	3792.1	T00008765001	N.D.
		Plastidic acyl carrier protein Mitochondrial acyl carrier protein		ACP1-5, acpP mtACP	CMV132C (Pt) CMS372C	JL72_p131 (Pt) 17290	BAO23726.1 (Pt) 4400.8	655 (Pt) T00009135001	PoyeCp095 (Pt) N.D.
Malonyl-ACP + Acyl-ACP	3-Ketoacyl-ACP	3-Ketoacyl-ACP synthase I	2.3.1.141	KAS I	CMM286C	14230	4451.6	T00009465001	10419_g2500
		3-Ketoacyl-ACP synthase II	2.3.1.179	fabF, FAB1					
		Mitochondrial 3-ketoacyl-ACP synthase		mtKAS	CML329C	08550	3410.10	T00009465001 T00008601001	10419_g2500
Malonyl-ACP + Acetyl-CoA	Acetoacetyl-ACP	3-Ketoacyl-ACP synthase III	2.3.1.180	fabH	N.D.	N.D.	BAO23630 (Pt)	45 (Pt)	PyycP010 (Pt)
Malonyl-CoA + Acyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA synthase (Elongase)	2.3.1.199	CUT1/2, FAE1	CMD118C	26960	3397.10	T00009104001	28410_g6982 37247_g8777 37248_g8778
		Homologs of yeast ELO protein	2.3.1.199	ELO-LIKE	CMT175C CMM126C CML178C	15340 34740	2039.9 3572.1 4430.4	T00009032001 T00009084001 T00008855001	8798_g2075 5313_g1180 8112_g1900, 16288_g3942, 41479_g9448
3-Ketacyl-ACP	3-Hydroxyacyl-ACP	3-Ketacyl-ACP reductase	1.1.1.100	fabG	CMS393C	60850	2102.13	T00008517001	24967_g6163
3-Hydroxyacyl-ACP	Enoyl-ACP	3-Hydroxyacyl-ACP dehydrase	4.2.1.59	fabZ	CMI240C	42260	456.10	T00009190001	23859_g5881
Enoyl-ACP	Acyl-ACP	Enoyl-ACP reductase I/II/III	1.3.1.9	fabI/K/L	CMT381C	47760	3606.4	T00009325001	27092_g6673
3-Ketacyl-CoA	3-Hydroxyacyl-CoA	Very-long-chain-3-ketoacyl-CoA reductase	1.1.1.330	KCR1/2	CMK172C=KCR	55690	491.2	T00008557001	38281_g8958
3-Hydroxyacyl-CoA	Enoyl-CoA	Very-long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	4.2.1.134	PHS1, PAS2	CMR006C	12280	2016.10 3401.11	T00008580001 T00005797001	44171_g9855
Enoyl-CoA	Acyl-CoA	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	1.3.1.93	TSC13, CER10	CMD146C CMO284C	39620 (ABC transporter B family protein-fusion)	815.2	T00008438001	10348_g2485
Desaturase									
Stearoyl-ACP	Oleoyl-ACP	Stearoyl-ACP desaturase	1.14.19.2 (1.14.99.6)	FAB2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Stearoyl-CoA	Oleoyl-CoA	Stearoyl-CoA desaturase	1.14.19.1	SCD	CMM045C (Cytb5-fusion, C-ter)	05920 (Cytb5-fusion, C-ter)	2306.6 (Cytb5-fusion, C-ter)	T00009557001 (Cytb5-fusion, C-ter)	8777_g2070 (Cytb5-fusion, C-ter)
		Fatty acid delta9-desaturase	1.14.19.1	FAD5, FAD5-like	CMJ201C	52000	4413.10 3456.6	N.D.	N.D.
		Fatty acid delta12-desaturase (bacteria-type)	1.14.19.-	FAD6, desA	N.D.	32800	N.D.	N.D.	N.D.
		Fatty acid delta12-desaturase		FAD2	CMK291C	N.D.	2077.16	T00008296001	27230_g6699
		Fatty acid delta15-desaturase	1.14.19.-	FAD3/7/8, desB	N.D.	25760	2141.6	T00009454001	21620_g5341
		Fatty acid delta3-trans-desaturase (Plastid PG specific)	1.14.19.-	FAD4, FADA	CMF187C	21010 28340 48000	2161.1	N.D.	40396_g9279
		Fatty acid delta-5 desaturase	1.14.19.44	FADSD5	N.D.	N.D.	2015.1 (Cytb5-fusion, N-ter)	T00008301001 (Cytb5-fusion, N-ter)	4519_g973 (Cytb5-fusion, N-ter) 8161_g1907 (Cytb5-fusion, N-ter)
		Fatty acid delta-6 desaturase	1.14.19.3	desD	N.D.	N.D.	2612.6 (Cytb5-fusion, N-ter)	T00008879001 (Cytb5-fusion, N-ter)	14865_g3573 (Cytb5-fusion, N-ter)
Lipid synthesis									
G3P	LPA	G3P acyltransferase	2.3.1.15	ATS1, PlsB	CMJ027C	33910	3555.1	T00008773001	30373_g7435 44871_g9961
				GPAT9	CMK217C CMA017C	56890 59870	430.6 717.2	T00004435001	14303_g3430
LPA	PA	LPA acyltransferase	2.3.1.51	ATS2, PlsC	CMJ021C CMF185C	44870	4448.6	T00009396001 T00009195001	8064_g1890
				LPAT2-5	CMS008C CME109C	04580 21410 09040	2040.4 2059.30	T00008325001	24193_g5959 32080_g7813
PA	DAG	PA phosphatase	3.1.3.4	PAP1/2 or LPP(α)1-4	CMR054C CMR488C	38610 06460 58240	2015.27 3409.5	T00008446001 T00009530001	34337_g8266 671_g46
				LPPβ -c	CMT106C	08240	461.10	T00005997001	18816_g4626

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	Locus tag				
					<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Galdieria sulphuraria</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Pyropia yezoensis</i>
					CMT239C	44130	3385.16 4476.4		34944_g8391
				PAH1/2	CMN061C	06620	4424.3	T00000518001	5434_g1225
DAG	MGDG	MGDG synthase	2.4.1.46	MGD1/2/3 murG homolog	CM1271C	39500	3413.1 2111.2 3416.3 635.4	T00008381001 T00008619001 T00009002001	26209_g6455 23002_g5678 47190_g10288 34395_g8276 18798_g4615
DAG	GlcDG	GlcDG synthase	2.4.1.157	mgdA	CMT267C	N.D.	N.D.	N.D.	3060_g650 8821_g2086
GlcDG	MGDG	Glucolipid epimerase		mgdE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MGDG	DGDG	DGDG synthase	2.4.1.241	DGD1/2	N.D.	N.D.	3569.7 496.8	T00008344001	39246_g9111 45466_g10062
				YecR2, dgdA	CMV121C (Pt)	JL72_p173 (Pt)	N.D.	N.D.	N.D.
UDP-glucose	UDP-sulfoquinovose	UDP-sulfoquinovose synthase	3.13.1.1	SQD1, sqdB	CMR012C	35090	2227.1	T00009188001	18955_g4660
DAG	SQDG	Sulfolipid synthase	2.4.1.-	SQD2, sqdX	CMR015C	35100 23580	4418.1	T00003861001	8967_g2126
PA	CDP-DAG	CDP-DAG synthase	2.7.7.41	CDS1, edsA	CMN215C CMS056C CMM311C	26040 30330	2015.13 2040.3	T00010117001 T00009577001	34877_g8379 5748_g1294
CDP-DAG	PGP	PGP synthase	2.7.8.5	PGS1/2, pgsA	CMJ134C	01450	2246.1	T00009507001	N.D.
PGP	PG	PGP phosphatase	3.1.3.27	PGPP1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CDP-DAG	PI	PI synthase	2.7.8.11	PIS1/2	CMM125C	50190	2185.6	T00008593001	N.D.
PG	CL	CL synthase	2.7.8.-	CLS	CMN196C	07980	4418.7	T00008428001	N.D.
CL	LysoCL	LysoCL acyltransferase	2.3.1.-	TAZ1	CMP142C	35780	458.7	T00007447001	41690_g9480 46259_g10165
Ethanolamine	Phosphoethanolamine	Ethanolamine kinase	2.7.1.82		CMR011C	18300	671.2	T00008383001	N.D.
Choline	Phosphocholine	Choline kinase	2.7.1.32	CK1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Phosphoethanolamine	CDP-ethanolamine	Phosphoethanolamine cytidylyltransferase	2.7.7.14	ECT1	CMS052C	N.D.	4429.4	T00008907001	1266_g1177
Phosphocholine	CDP-choline	Phosphocholine cytidylyltransferase	2.7.7.15	CCT1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
phosphoethanolamine	phosphocholine	Phosphoethanolamine methyltransferase	2.1.1.103	PEAMT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DAG	PE, PC	Aminoalcohol phosphotransferase	2.7.8.1	AAPT1/2	CMF133C	08520 53390	4428.3	N.D.	24730_g6104
PE	PC	PE methyltransferase	2.1.1.17	PEMT	CMF090C	60670	559.7	T00009414001	20737_g5088 25115_g6198
		PL methyltransferase	2.1.1.71	PLMT	CMP111C CMA134C	14870 08230	3415.4	T00009046001 T00008258001	8161_g1906
DAG	DGTS	Betain lipid synthase		BTA1, btaA/B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DAG	TAG	DAG acyltransferase	2.3.1.20	DGAT1	CMQ199C CME100C	29900 51320 00890	4402.9 4483.1	T00009240001 T00010127001 T00007755001	N.D.
				DGAT2, DGTT1-5	CMJ162C	08390	3609.3	N.D.	43538_g9751
				GDAT3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		PL-DAG acyltransferase	2.3.1.158	PDAT1	N.D.	N.D.	3587.12 3587.9	N.D.	23946_g5901 20009_g4921
LPL	PL	LPL acyltransferase	2.3.1.51, 2.3.1.23, 2.3.1.-	LPLAT, LPCAT, MBOAT	CMH139C	03450	2296.16	T00008526001	24612_g6069
				LPEAT	CMR130C	00390	605.1 533.5	T00002817001	24689_g6090
PE	PS	PS synthase (Base-exchange enzyme)	2.7.8.29, 2.7.8.-	PSS2	N.D.	10430	2030.4	N.D.	N.D.
PS	PE	PS decarboxylase	4.1.1.65	psd, PSD1	CMK243C	07890	462.13	T00008892001	N.D.
				PSD2/3					
PC	DAG	PC-DAG cholinephosphotransferase	2.7.8.	PDCT, rod1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		Acyltransferase?			CMB069C	60530	3401.7 2185.2	T00002571001	3497_g748
Lipid trafficking									
		PA transporter		TGD1	CMV212C (Pt)	N.D.	N.D.	1175 (Pt)	N.D.
		PA transporter		TGD2	CMV057C (Pt)	N.D.	N.D.	1065 (Pt)	N.D.
		PA transporter		TGD3	CMR388C	12700 51260 01810 55680	2024.14	T00007676001 T00008607001 T00008847001 T00005733001	25161_g6207 15861_g3802 19638_g4829 11718_g2788 1916_g312
		Flippase (P4 type-ATPase)	3.6.3.1	ALA1-12	CMR306C CMS375C	07720	4451.3	T00003061001 T00004261001 T00000829001 T00000723001 T00000226001	9358_g2239 12941_g3087 9163_g2177
		ALA-interacting subunit		ALIS1-5	CMT246C	14370	2122.1	T00004167001	5104_g1130 24702_g6097
		Acyl-CoA binding protein		ACBP1-6	CMP278C	17970 19770	4619.2 693.5	T00008546001	6386_g1449
β-Oxidation									

Substrate	Product	Enzyme	EC number	Gene	Locus tag				
					<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Galdieria sulphuraria</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Pyropia yezoensis</i>
Acyl-CoA	Enoyl-CoA + H ₂ O ₂	Acyl-CoA oxidase	1.3.3.6	ACX1-6	CMK115C	21670 50940	3399.4 700.1 545.4	T00008478001 T00007910001 T00009531001 T00008935001 T00009142001 T00008400001	28229_g6938 25086_g6188 27342_g6732 25087_g6189 36375_g8641 25377_g6255 40073_g9238
Acyl-CoA	Enoyl-CoA	Acyl-CoA dehydrogenase			CML080C	17150 59510 06720 26350	2017.13	N.D.	32310_g7858, 18504_g4551
Enoyl-CoA	3-Hydroxyacyl-CoA	Enoyl-CoA hydratase	4.2.1.17, 5.3.3.-	ECHS1,SCEH	CMK139C CMT074C	22050 12770	2012.4 633.2	T00009110001 T00008882001	43545_g9755 45233_g10019
3-Hydroxybutyryl-CoA	Acetoacetyl-CoA	3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1.1.1.35, 1.1.1.157		CMC137C	25130	2502.11	N.D.	N.D.
Enoyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA	Multifunctional protein (Enoyl-CoA hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase)	4.2.1.17	hbd, fadB	CMR380C	52740	2025.12	T00009349001	1975_g331
3-Ketoacyl-CoA	Acyl-CoA + Acetyl-CoA	3-Ketoacyl-CoA thiolase	2.3.1.16, 2.3.1.9	fadA/I	CMA042C CME087C	55920 26380	2285.10 2062.16	T00008981001	43497_g9742 9179_g2185 9179_g2184 19535_g4802
Acyl-CoA synthetase/thioesterase									
Acyl-CoA	Fatty acid	Acyl-CoA thioesterase	3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.2.27		CMJ263C CMR113C	58210 56830 46590	N.D.	N.D.	N.D.
Acyl-ACP	Fatty acid	Acyl-ACP thioesterase	3.1.2.14, 3.1.2.21	ALT1-4	CMH111C	27560	482.12	N.D.	N.D.
Fatty acid	Acyl-CoA	Long-chain acyl-CoA synthetase	6.2.1.3	fadD, ACSL, LACS	CME186C CMG147C CML197C CMO037C	01790 03440	516.13 2082.7 2273.12 435.8	T00009428001 T00008811001	18428_g4526 22269_g5504 25133_g6201
		Long-chain acyl-CoA synthase (cp)			CMT459C	35980	2696.2	T00008500001	33783_g8157

表 3.3 比較ゲノム解析によって検出された紅藻の 3-ケトアシル-ACP 合成酵素

N.D.は比較ゲノム解析によって検出されなかったことを示す。

Enzyme	Reaction	Land plants Cyanobacteria <i>E. coli</i>	<i>C. merolae</i> <i>G. sulphuraria</i>	<i>P. yezoensis</i> <i>C. crispus</i> <i>P. purpureum</i>
KAS I	Elongation from C4-ACP to C16-ACP	1	1	1
KAS II	Elongation from C16-ACP to C18-ACP	1	N.D.	N.D.
KAS III	Synthesis of C4-ACP	1	N.D.	1

表 3.4 陸上植物と紅藻における PC 合成に関わる遺伝子数の比較

各反応の番号は図 3.3 の代謝経路図と対応している。N.D. は比較ゲノム解析で検出されなかったことを示す。(1) は TBLASTN を用いた探索において相同の配列が検出されたことを示す。

Reaction	Enzyme	Land plants		Red algae			
		<i>A. thaliana</i>	<i>P. yezoensis</i>	<i>C. crispus</i>	<i>P. purpureum</i>	<i>G. sulphuraria</i>	<i>C. merolae</i>
1	Ethanolamine Kinase	1	N.D.	1	1	1	1
2	Phosphoethanolamine cytidyltransferase	1	1	1	1	N.D. ⁽¹⁾	1
3	CDP-choline/CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase	2	1	N.D. ⁽¹⁾	1	2	1
4	Phosphatidylethanolamine methyltransferase	Not identified	2	1	1	1	1
5	Phospholipid methyltransferase	1	1	2	1	2	2
6	Phosphoethanolamine methyltransferase	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	Choline kinase	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	Phosphocholine cytidyltransferase	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

3.6 図

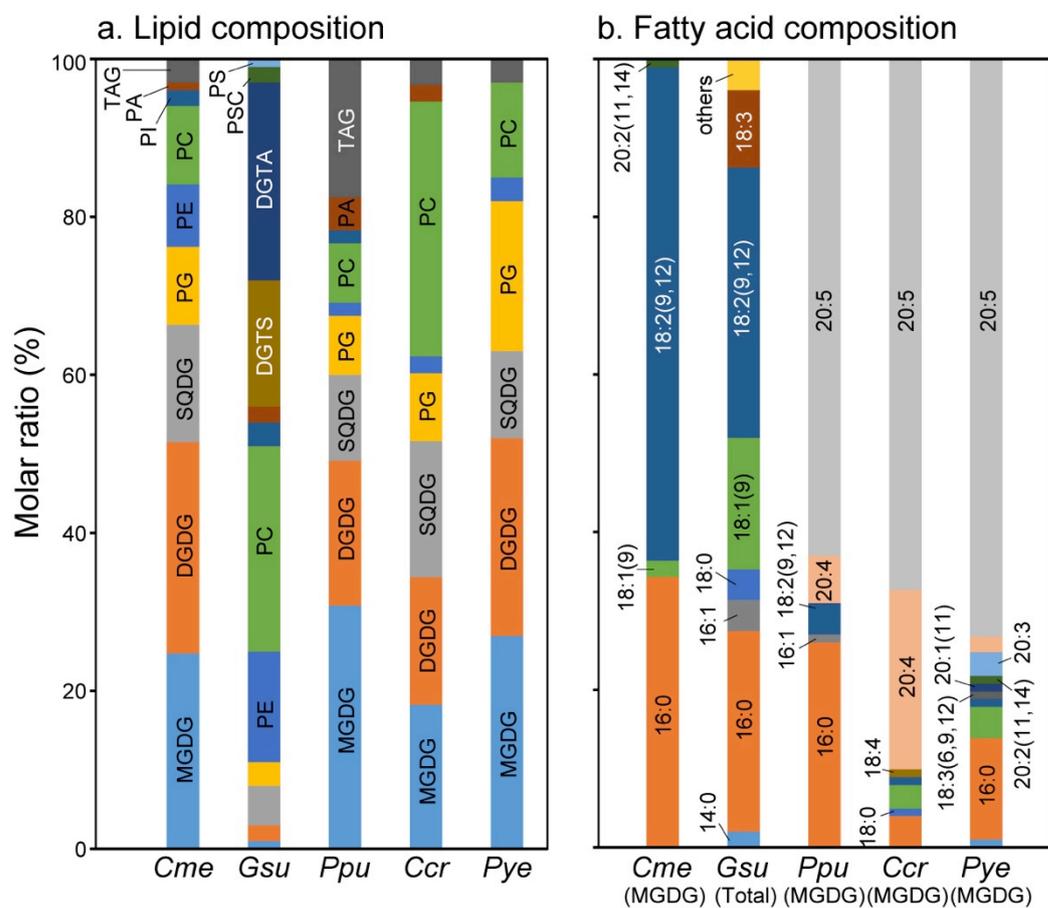


図 3.1 紅藻における脂質組成および脂肪酸組成 (Moriyama et al. 2018 より引用)

シアニジオシゾン (Cme)、ガルデリア (Gsu)、チノリモ (Ppu)、ヤハズツノマタ (Ccr)、およびスサビノリ (Pye) における脂質組成 (a) と脂肪酸組成 (b) を示す。

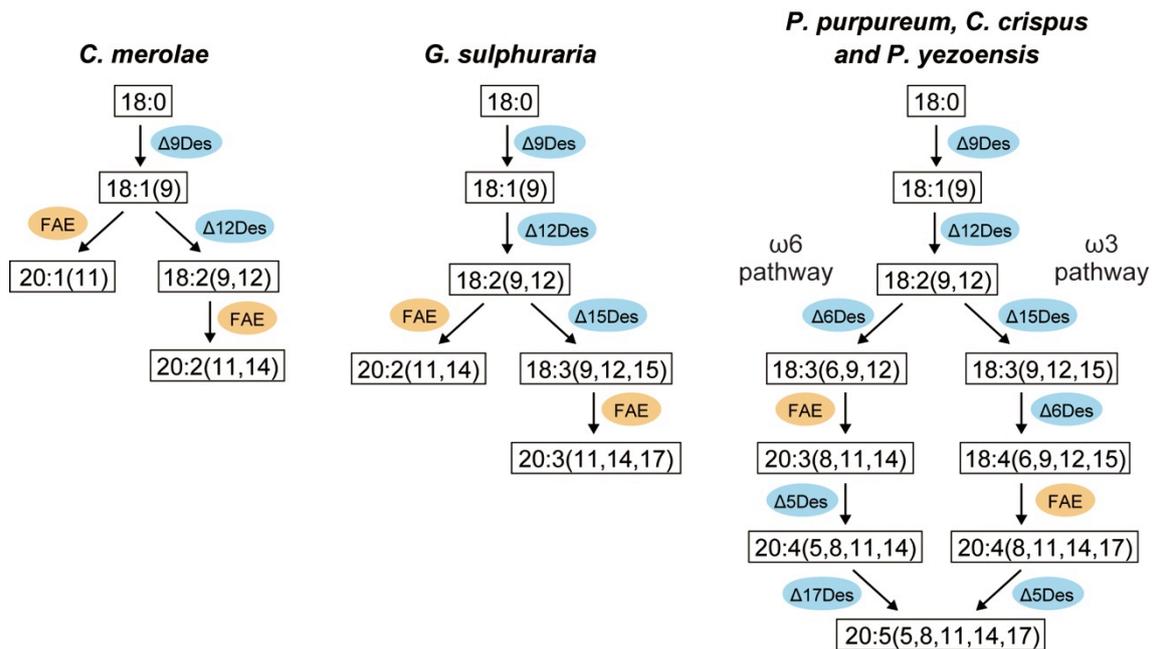


図 3.2 紅藻における極長鎖脂肪酸の合成

極長鎖脂肪酸の合成経路を、左からシアニジオシゾン、ガルデリア、海洋性紅藻 (チノリモ、ヤハズツノマタ、スサビノリ) の順で示す。黄色で示した反応は脂肪酸伸長を、青で示した反応は不飽和化を示す。二重結合の位置は $\Delta 9$ などのように、 Δ +数字で表記した。略語: Des, 不飽和化; FAE, 脂肪酸伸長

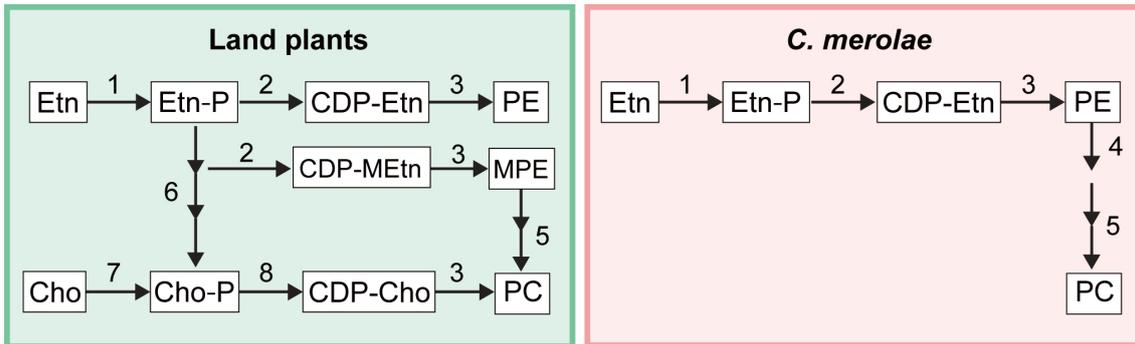
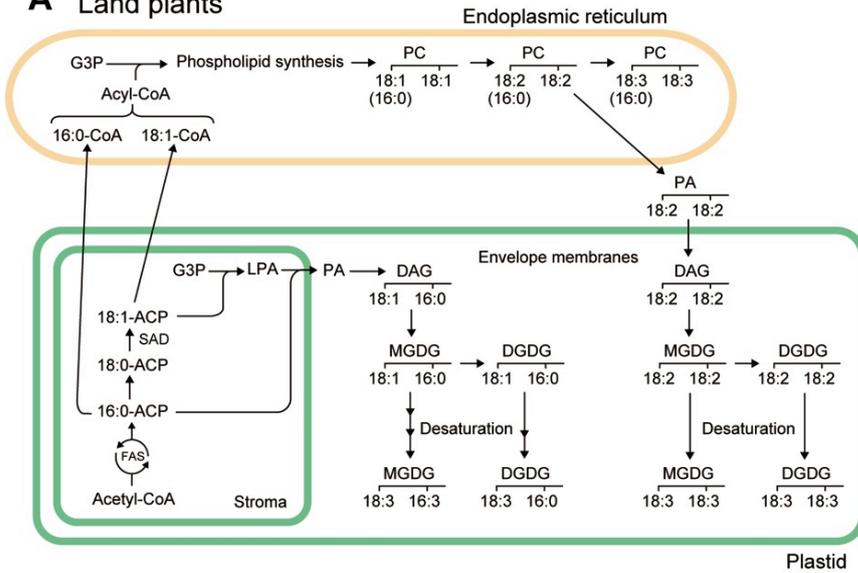


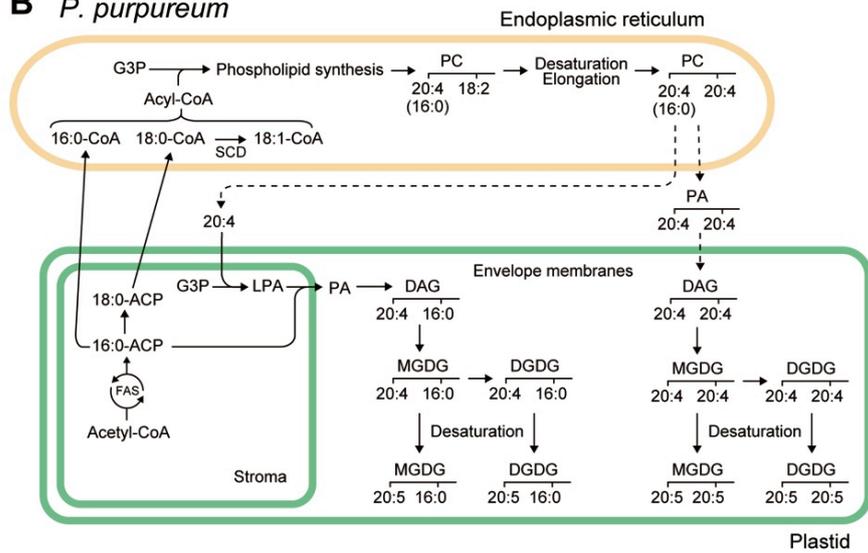
図 3.3 陸上植物およびシアニジオンゾンにおける PC 合成経路の比較

1~8 の反応を触媒する酵素については表 3.4 を参照のこと。略語：CDP-Cho, CDP-コリン；CDP-Etn, CDP-エタノールアミン；CDP-MEtn, CDP-モノメチルエタノールアミン；Cho, コリン；Cho-P, コリンリン酸；Etn, エタノールアミン；Etn-P, エタノールアミンリン酸；MPE, モノメチルエタノールアミン；PC, ホスファチジルコリン；PE, ホスファチジルエタノールアミン

A Land plants



B *P. purpureum*



C *C. merolae*

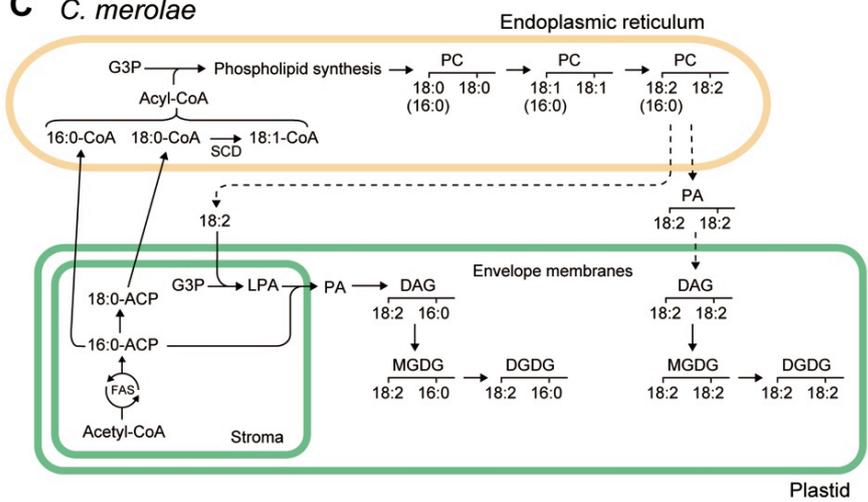


図 3.4 陸上植物 (A)、チノリモ (B)、およびシアニジオシゾン (C) におけるガラクト脂質合成の比較

各脂質の脂肪酸は左側が *sn-1* 位、右側が *sn-2* 位に付加したものを示す。これらのガラクト脂質合成の代謝経路図は、Ohlrogge and Browse (1995)、Khozin et al. (1997) および Sato and Moriyama (2007) を基に作成した。点線で示した小胞体からの葉緑体への不飽和脂肪酸の供給については詳しい仕組みはまだ判明していない。略語：ACP, アシルキャリアータンパク質；DAG, ジアシルグリセロール；DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール；FAS, 脂肪酸合成；G3P, グリセロール 3-リン酸；LPA, リゾホスファチジン酸；MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール；PA, ホスファチジン酸；PC, ホスファチジルコリン；SAD, ステアロイル-ACP 不飽和化酵素；SCD, ステアロイル-CoA 不飽和化酵素

第4章

単離葉緑体における放射性ラベルを用いた 代謝フロー解析

4.1 序文

シアニジオシソンの脂質代謝における特徴として、主要な不飽和脂肪酸の合成は、葉緑体ではなく小胞体で行われていることが推定される。この特徴により、シアニジオシソンにおいてガラクト脂質を合成する際には、16:0 は葉緑体から、18:2 は小胞体からそれぞれ供給されており、この経路は ‘Coupled pathway’ と呼ばれている (Sato and Moriyama 2007)。古くから陸上植物では、グリセロ脂質代謝における葉緑体の機能を明らかにするために、単離葉緑体を用いた代謝フロー解析が行われてきた (Nakamura and Yamada 1974; Roughan et al. 1976, 1980; Murphy and Leech 1977; Heemskerk et al. 1991)。このような解析は、主にホウレンソウの単離葉緑体を用いて行われてきたが、エンドウやレタス、オリーブなどの葉から単離した葉緑体を用いた解析についても報告されている (Stumpf and James 1963; Drapier et al. 1982; Daza and Donaire 1982)。

図 4.1 に陸上植物におけるガラクト脂質の合成をまとめた。ホウレンソウの単離葉緑体を [2-¹⁴C]酢酸ナトリウムを用いてラベルすると、葉緑体内に取り込まれた [2-¹⁴C]酢酸は、[2-¹⁴C]アセチル-CoA へ代謝され、脂肪酸合成の出発物質となる。[2-¹⁴C]酢酸によってラベルされる脂肪酸は、主に 16:0 と 18:1 であり (Nakamura and Yamada 1974)、これらの脂肪酸は脂質合成の基質となる。MGDG および DGDG の合成に必要な UDP-ガラクトースは

葉緑体で合成されず、サイトゾルから供給されている。そのため、ホウレンソウの単離葉緑体では、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いて光合成的に葉緑体脂質をラベルしようとしても、ガラクト脂質のガラクトース部分はラベルされない (Murphy and Leech 1981)。シアニジオシゾンの単離葉緑体において、外部から与えた $\text{UDP-}[^{14}\text{C}]$ ガラクトースによって MGDG および DGDG がラベルされることが報告されており (Sato and Moriyama 2007)、このことからシアニジオシゾンも陸上植物と同様に、ガラクト脂質を合成する際にサイトゾルから UDP- ガラクトースが供給されていると考えられる。

陸上植物の単離葉緑体において、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムからの脂肪酸へのラベルの取り込みは、 $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ 酢酸の 1/10 程度と非常に少ないことが報告されている (Roughan et al. 1979)。これはおそらく、光合成産物から脂肪酸合成の基質であるアセチル-CoA を合成するときに、サイトゾルを経由する必要があるためだと思われる (図 4.2)。光合成組織の葉緑体では、ホスホグリセリン酸ムターゼおよびエノラーゼが存在していないため、トリオースリン酸をサイトゾルへ輸送し、サイトゾルに局在する酵素によってホスホエノールピルビン酸まで代謝した後、葉緑体に戻ることでアセチル-CoA が合成されることが考えられている (Andriotis et al. 2010)。シアニジオシゾンも、ホスホグリセリン酸ムターゼおよびエノラーゼが葉緑体に局在していないため、上記と同様の経路によって光合成産物からのアセチル-CoA の合成が行われていると思われる (Moriyama et al. 2014)。

藻類では葉緑体の単離方法が確立された種が少なく、このような解析はほとんど行われていない。しかしながら、シアニジオシゾンではオルガネラの単離方法が確立されており、葉緑体、ミトコンドリアおよびペルオキシソームの単離が可能である (Miyagishima et al. 1999; Yoshida et al. 2006; Moriyama et al. 2008; Imoto et al. 2013)。第 2 章で行ったシアニジオ

シゾンの網羅的な細胞内局在解析によって、シアニジオシゾンの脂質代謝には、陸上植物と同様に、葉緑体と小胞体が主に関わっていることが示唆された。

これらのことから、第4章ではシアニジオシゾンの単離葉緑体を用いた脂質代謝解析を行うことで、その結果を陸上植物の単離葉緑体での知見と比較することにより、紅藻の葉緑体における脂質合成についての特徴を明らかにすること、および単離葉緑体における脂肪酸合成や脂質合成の活性を測定することで、第2章で行った比較ゲノム解析や細胞内局在解析の結果を再確認することを目的とした。

4.2 材料と方法

4.2.1 培養

第2章 2.3 培養に記載した。

4.2.2 ゲル板を用いた高密度培養

第2章 2.4 ゲル板を用いた高密度培養に記載した方法を用いて行った。シアニジオシゾン細胞は、500 ml の 2×Allen 培地で、 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 40°C 、 $1\%\text{CO}_2$ の条件で $\text{OD}_{750}=1\sim 2$ になるまで通気培養した。その後、シアニジオシゾン細胞を遠心して集藻し ($1700 \times g$ 、5 分間、 30°C)、 $\text{OD}_{750}=10$ になるように新鮮培地に懸濁した。2 組のゲル板 ($25 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 、間隙の幅 2 mm) に濃度調整した培養液を 25 ml ずつ流し入れ、通気培養した。葉緑体の単離には明期 12 時間後の細胞を使用した。

4.2.3 葉緑体の単離

高密度培養を行った細胞を遠心 (1700 ×g, 5 分間, 4 °C)して、20 ml の細胞破碎緩衝液 (100 mM ソルビトール, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM EDTA, 0.1% BSA; w/v、1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂; pH 7.5) に懸濁した。電動式フレンチプレス (5501-M; Ohtake, Tokyo, Japan) を用いて、4000 psi で細胞を破碎した後、すぐに等量の葉緑体調製液 (330 mM ソルビトール, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM EDTA, 0.1% BSA; w/v, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂; pH 7.5) と混合した。さらに DNase I (100 µg/mL)、RNase A (20 µg/mL) および MgCl₂ (2 mM) を加えて、氷上に 1 時間置き、核酸を分解させた。細胞破碎液をナイロンメッシュ (目開き 10 µm) とミラクロスでろ過した後、遠心 (2900 ×g, 10 分間, 4 °C) して、壊れた葉緑体などが含まれる上清を捨てた。残った沈殿は絵筆を用いて 40 ml の 20%パーコール溶液 (葉緑体調製液) に懸濁した。下から 80%パーコール溶液 10 ml、40%パーコール溶液 20 ml、20%パーコール溶液 20 ml の順に重層し、遠心 (2900 ×g, 60 分間, 4 °C) した。パーコールの 40%-80%界面に生じた緑色バンドを回収したあと、反応液 (330 mM ソルビトール, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.3 mM KH₂PO₄; pH 7.9) で 2 回洗浄した。単離した葉緑体の精製度は蛍光顕微鏡を用いて確認した (図 4.4A,C)。

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の葉緑体の単離は、Douce and Joyard (1982) の方法を用いて行った。ホウレンソウは近くの八百屋で購入した。葉に含まれるデンプンを減少させるために、水道水でよく洗い、水で湿らせたペーパータオルで巻いたあと、ビニール袋に入れて遮光し、4°C に一晩置いた。手で細かくちぎったホウレンソウの葉 100 g を葉緑体の単離に使用した。ブレンダーにホウレンソウの葉およそ 20 g と、細胞破碎緩衝液 (330 mM ソルビトール, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM EDTA, 0.1% BSA; w/v; pH 7.5) およそ 200 ml を加

えて、軽く破碎した。この破碎作業を数回繰り返して得られた細胞破碎液は、二層のガーゼとミラクロスでろ過したあと、すばやく遠心 ($2900 \times g$, 3 分間, 4°C) して上清を取り除いた。沈殿は 40 ml の 20% パーコール溶液に懸濁し、上記と同様の方法を用いてパーコール密度勾配遠心を行い、無傷葉緑体を精製した。単離した葉緑体の精製度は蛍光顕微鏡を用いて確認した (図 4.4B,D)。

4.2.4 放射性同位体の取り込み

シアニジオシゾンの単離葉緑体 (30 mg クロロフィル *a*) に、 $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム (0.3 mM; 10 μCi ; 0.37 MBq; 58.8 mCi/mmol; PerkinElmer)、または $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウム (1 mM; 30 μCi ; 1.11 MBq; 58.8 mCi/mmol; First Clarity) を加えて、液量を 600 μl にあわせた。ただし、 $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムの取り込みの際には、10 mM NaHCO_3 を反応液に添加した。光照射下 ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で 5 ~ 120 分間、 38°C で振盪した。取り込み後は 3 ml のクロロホルム-メタノール混液 (1:2, v/v) を加えて反応を停止させた。ホウレンソウの単離葉緑体 (250 μg クロロフィル *a, b*) を用いた際には、反応温度を 25°C で行い、その以外の条件は上記と同様にした。

シアニジオシゾンの単離葉緑体における脂肪酸合成に対する光の影響、および阻害剤セルレニンの影響を調べるために、さまざまな条件下における脂肪酸への $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムの取り込みを測定した。暗所における脂肪酸合成活性を測定する際には、上記と同様にして調製した反応液をアルミホイルで遮光した状態で、 $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムを 1 時間取り込ませた。また、補酵素を添加した条件では、1 mM ATP, 1 mM ADP, 1mM Pi, 0.5 mM NADPH, および 0.5mM NADH を反応液に添加し、暗所または明所における脂肪酸へのラベルの取り

込みを測定した。また、脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンは、1.6 mg/ml の濃度になるように反応液に加え、 ^{14}C 酢酸ナトリウムを用いて 1 時間ラベルした。脂肪酸へのラベルの取り込みは、液体シンチレーションカウンターを用いて行った。抽出した全脂質画分の一部から脂肪酸メチルエステル (FAME) を調整し、それらを *n*-ヘキサンを用いて回収した。回収したヘキサン層はコンセントレーターを用いて減圧乾燥させることで濃縮し、液体シンチレーションカクテルに全量を加えて、放射能を測定した。脂質抽出、FAME の調製、および液体シンチレーションカウンターにおける放射能の測定についての詳細は、下記の 4.2.5 脂質解析に記載した。

^{14}C PC を用いた解析では、シアニジオシゾンの単離葉緑体 (60 mg クロロフィル *a*) に、エタノールに溶解した ^{14}C PC (2.6 μCi ; 96.2 kBq) を 20 μl 加え、液量を 1 ml にあわせた。光照射下 ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で 1 時間、38 °C で振盪したあと、4 ml のクロロホルム-メタノール混液 (1:2, v/v) を加えて反応を停止させた。ここで使用した ^{14}C PC は、シアニジオシゾン細胞を ^{14}C 酢酸ナトリウム (50 μCi ; 2 MBq) によってラベルすることで作製した。したがって、作製した ^{14}C PC は、脂肪酸部分が ^{14}C によってラベルされている。25 ml のシアニジオシゾン培養液 ($\text{OD}_{750} = 1$) に、 ^{14}C 酢酸ナトリウム (50 μCi ; 2 MBq) を加えて 1 時間反応させたあと、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) により PC を精製した。精製した PC は少量のエタノールに溶かして、-20 °C で保存した。

4.2.5 脂質解析

脂質の抽出

脂質の抽出は Bligh and Dyer (1959) の方法を用いて行った。3 ml のクロロホルム-メタノ

ール混液 (1:2, v/v) を加えた反応液は、室温で 30 分間放置した後、PBS 緩衝液とクロロホルムをそれぞれ 1 ml ずつ加えて、ボルテックスした。その後、遠心 (1700 ×g, 15 分間, 15 °C) によってクロロホルム層とメタノール層に分け、クロロホルム層のみを回収した。クロロホルム層はコンセンレーターを用いて減圧乾燥した後、少量のクロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v) に溶かし、-20 °C に保存した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) による脂質の分画

脂質クラスに分画は、TLC を用いて行った。全脂質画分の一部を、シリカゲルプレート (TLC silica gel plate 60, 20×20 cm; Merck, Darmstadt, Germany) の下端から 2.5 cm のところに塗布した後、以下に示す展開液を用いてプレートの上端まで展開した。極性脂質の分画にはアセトン-トルエン-メタノール-水 (8:3:2:1, v/v) を、中性脂質の分画には *n*-ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (80:30:1, v/v) を展開液として使用した。展開後は、TLC プレートをよく乾燥し、0.01% プリムリン (80% 水性アセトン溶液) を噴霧したのち、366 nm の紫外線下で観察し、脂質のスポットを検出した。

FAME の調製と硝酸銀逆相クロマトグラフィー (RP-TLC) による分画

脂肪酸へのラベルの取り込みを調べるために、抽出した全脂質画分の一部、または TLC により分画した脂質をメタノリシスによって FAME に変換した後、RP-TLC を用いて分画した。そのためには、抽出した全脂質画分の一部、または TLC プレートからかき取ったシリカゲルを蓋付きガラスチューブに入れ、そこに 2 ml の 2.5% 塩化水素-メタノール (w/v) を加えて、85 °C で 2.5 時間加熱した。FAME の抽出は *n*-ヘキサンを用いて行った。RP-TLC

は Marquardt and Wilson (1998) の方法を用いて行った。プレートは RP-18 HPTLC (5×10 cm; Merck) を使用し、10% 硝酸銀 (w/v) を含むアセトニトリル-1,4-ジオキサン-酢酸 (80:20:1 v/v) を用いて展開した。その際に標準物質として、 $[^{14}\text{C}]$ ステアリン酸メチルエステルを使用した。

MGDG の極性基部分および非極性基部分の分画

まず、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムによってラベルした MGDG を TLC によって精製した。TLC で分画した MGDG のスポット部分のシリカゲルを、カミソリを用いて削り取り、脱脂綿を詰めたパスツールピペットの中に入れた。シリカゲルの入ったパスツールピペットは、試験管内に立てかけ、そこに 4 ml のクロロホルム-メタノール混液 (2:1; v/v) を 3 回に分けて流し入れ、MGDG を抽出した。この抽出液に 1 ml の PBS 緩衝液を加え、試験管に残った抽出液を軽くボルテックスした。数分間静置して、メタノール層とクロロホルム層に分けた後、クロロホルム層のみを回収して減圧乾燥させた。この MGDG を少量のクロロホルム-メタノール混液 (2:1; v/v) に溶解した。

上記と同様の方法でメチルエステル化処理をしたあと、*n*-ヘキサンを用いて FAME を抽出し、RP-TLC によって各 FAME に分画した。残ったメタノール層には、グリセロールやメチルガラクトシドが含まれているため、脱脂綿をつめたパスツールピペットに一度通してシリカゲルを除き、コンセンレーターを用いて減圧乾燥させた。2 ml の 2.4 N HCl に溶かした後、100 °C で 3 時間ないし 4 時間加熱して加水分解した。加水分解後はコンセンレーターを用いて濃縮したのち、TLC プレートに塗布し、クロロホルム-メタノール-水 (15:10:2, v/v) を用いて展開した。

硝酸銀 TLC を用いた MGDG 分子種の分画

シリカゲルプレート (TLC silica gel plate 60) を 5%硝酸銀アセトニトリル溶液に浸し、ドラフト内で軽く乾燥させた。その後、プレートを 60°C で 30 分間加熱した後、すばやく試料 (MGDG) を塗布し、アセトン-トルエン-水 (91:30:8 ; v/v) を用いて展開した。展開後のプレートはよく乾燥させたあと、0.01% プリムリン (80%水性アセトン) により脂質を染色し、366 nm の紫外線照射下で観察し、脂質のスポットを検出した。

4.2.6 放射性ラベルの検出と定量

放射性ラベルの検出は、オートラジオグラフィーにより行った。X 線フィルム (Super RX; Fujifilm, Tokyo, Japan) に TLC プレートを密着させて 7 日間から 14 日間露光した後、フィルムを現像した。硝酸銀を用いた場合は、プレートをラップで包んでから X 線フィルムに露光させた。放射線量の定量は液体シンチレーションカウンター (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter; Beckman Coulter, Brea, CA; USA) を用いて行った。脂質や FAME の測定にはシンチゾール AL1 (Wako, Osaka, Japan) を、ガラクトースやグリセロールの測定には Insta-Gel Plus (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用した。

4.2.7 安定同位体を用いた代謝フロー解析

シアニジオシゾン (100 mg クロロフィル *a*) の単離葉緑体に、[2-¹³C]酢酸ナトリウム (2 mM; 99% ¹³C, Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) 、または[¹³C]炭酸水素ナトリウム (10 mM; 99% ¹³C, Cambridge Isotope Laboratories) を加えて、液量を 1 ml にあわせ

た。光照射下 ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で 1 時間 38°C で振盪した。 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムの取り込みの際には、 10 mM NaHCO_3 を反応液に添加した。取り込み後は 4 ml のクロロホルム-メタノール混液 ($1:2, \text{ v/v}$) を加えて反応を停止させ、全脂質画分を抽出した。ハウレンソウ ($250 \mu\text{g}$ クロロフィル *a, b*) を用いた際には、反応温度を 25°C で行い、その以外の条件は上記と同様にした。

脂肪酸へのラベルの取り込みは、抽出した全脂質画分から調製した FAME を GC-MS (GC-MS-QP2010 Ultra; Shimadzu, Kyoto, Japan) によって分析することで測定した。カラムは BPX70 カラム (長さ 60 m ; 内径 0.22mm ; SGE Analytical Science, Victoria, Australia) を使用し、カラム温度は、 170°C から $3^\circ\text{C}/\text{min}$ で 250°C まで加熱した後、 250°C で 5 分間ホールドした。キャリアーガスにはヘリウムを使用し、カラム流量は $0.85 \text{ ml}/\text{min}$ に設定した。

MGDG の極性基部分へのラベルの取り込みは、メタノリシスした MGDG を用いて解析した。*n*-ヘキサンを用いて FAME を取り除いた際に残ったメタノール層をコンセンتراتーにより減圧乾燥させ、そこにトリメチルシリル化剤 BSTFA (Tokyo Kasei, Tokyo, Japan) を加えて、 95°C で 5 分間加熱した。トリメチルシリル化した 1-メチルグリコシドは GC-MS によって分析し、目的産物のマススペクトルデータを取得した。カラムは Rtx-5MS (長さ 30 m ; 内径 0.25 mm ; Restek, Bellefonte, PA, USA) を使用し、カラム温度は 130°C で 1 分間ホールドした後、 $7^\circ\text{C}/\text{min}$ で 250°C まで加熱し、その後 250°C で 1 分間ホールドした。キャリアーガスのカラム流量は $1.40 \text{ ml}/\text{min}$ に設定した。

^{13}C ラベルの取り込みは、GC-MS 解析により得られたマススペクトルから、C13dist ソフトウェア (Sato et al. 2016c; <http://nsato4.c.u-tokyo.ac.jp/old/C13dist.html>) を用いて解析した。FAME の質量スペクトルにおける分子イオンの質量分布から ^{13}C アイソトポマー分布を求

めた (図 4.3)。ただし 18:1 については M-31、M-32 のイオンの質量分布をそれぞれ解析に用いた。また、ガラクトースは M-121 のイオンの質量分布を、グリセロールは M-90 のイオンの質量分布をそれぞれ解析に用いた。 ^{13}C は約 1.08% の割合で天然に存在しているため、 ^{13}C アイソトポマー分布から標識濃度 (isotopic abundance) p の分布を求め、天然に存在した ^{13}C をもつアイソトポマーの割合を求めた。

4.2.8 G3P および UDP-ガラクトースの合成に関わる酵素の細胞内局在解析

GFP コンストラクトの作製は、第 2 章 2.2.2 コンストラクトの作製と同様に行った。その他の方法については、第 2 章 2.2.4 形質転換、2.2.5 免疫染色、2.2.6 蛍光顕微鏡観察に記載した。HA コンストラクトは、解析候補酵素の全長およびその酵素の 3'-UTR (2 kb) にあたる DNA 断片を PCR により増幅し、pBSHAb-T3' に挿入した (図 4.11B)。シアニジオシゾン細胞に形質転換した後は、細胞を固定し、チラミド法を用いて免疫染色を行った。チラミド法による免疫染色の増感については、第 2 章 2.2.7 チラミド法による免疫染色の増感に記載した。表 4.4 にコンストラクト作製の際のインサートの増幅に使用したプライマーをまとめた。

4.3 結果

4.3.1 単離葉緑体における[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムの取り込み

シアニジオシゾン細胞から単離した葉緑体を[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムで 5~120 分間ラベルした後、全脂質画分を抽出した。全脂質画分の一部をメタノリシスによって FAME に変換したあと、RP-TLC によって FAME を各脂肪酸に分画した。その結果、14:0、16:0 および 18:0 のスポットが検出された (図 4.5A)。一方、ハウレンソウの葉から単離した葉緑体についても同様に[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムによってラベルし、各脂肪酸へのラベルの取り込みを検出した。その結果、14:0、16:0、18:0 などのに加えて、不飽和脂肪酸である 18:1 のスポットが検出された (図 4.5B)。

オートラジオグラフィーによって検出された各脂肪酸のスポットについて、液体シンチレーションカウンターを用いて放射線量を定量した。その結果、シアニジオシゾンの単離葉緑体では、16:0 および 18:0 が脂肪酸合成系の主な産物であることがわかった (図 4.5C)。また、ハウレンソウとシアニジオシゾンについて、反応時間 60 分後の各脂肪酸へのラベルの取り込みを比較したところ、シアニジオシゾンでは 16:0 に最も多くラベルが取り込まれていたが、ハウレンソウでは 18:1 に最も多くラベルが取り込まれていることがわかった (図 4.5D)。以上の結果から、シアニジオシゾンは、陸上植物とは異なり、葉緑体で合成される脂肪酸は 16:0 や 18:0 などの飽和脂肪酸のみであることを、実験的に明らかにすることができた。

陸上植物の単離葉緑体では、脂肪酸合成に光が必要であることがわかっている。次にシアニジオシゾンの単離葉緑体において、脂肪酸合成に対する光の影響を調べた。明所および暗所におけるシアニジオシゾンの単離葉緑体での脂肪酸への[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムから

のラベルの取り込みを測定した (図 4.5E)。その結果、シアニジオシゾンの葉緑体では、陸上植物と同様に、暗所では脂肪酸にほとんどラベルが取り込まれないことがわかった。このことから、脂肪酸の合成には、光合成により ATP や NADPH などのエネルギーが供給されることが必要ではないかと考え、次に ATP や NADPH を反応液に加え、明所および暗所での脂肪酸へのラベルの取り込みが変化するののかについて調べた。明所においては ATP や NADPH を添加した条件では、非添加条件の結果と比べて脂肪酸へのラベルの取り込みが低下した (図 4.5D)。これは補酵素を過剰に加えたことが、逆に脂肪酸合成活性の低下を招いてしまったと思われる。補酵素添加条件においても、暗所では脂肪酸にほとんどラベルが取り込まれないことがわかった (図 4.5D)。以上のことから、シアニジオシゾンの葉緑体における脂肪酸合成には、陸上植物と同様に、光が必要であることが確かめられた。また、補酵素添加条件でも光がないと脂肪酸へのラベルの取り込みがみられなかったことから、暗所でのラベル取り込みが減少する原因は、光合成により供給されるエネルギーが減少するためではないことが考えられた。

脂肪酸合成の阻害剤として知られるセルレニンを追加した際の、シアニジオシゾンの単離葉緑体における脂肪酸合成に対する影響を調べた。セルレニン 1.6 mg/ml を反応液に添加し、 ^{14}C 酢酸ナトリウムを 1 時間取り込ませたあと、抽出した脂質を FAME に変換して ^{14}C ラベルの取り込みを定量した。その結果、セルレニン存在下では脂肪酸メチルエステルへの ^{14}C ラベルの取り込みが大きく減少していた (図 4.5E)。セルレニンは脂肪酸合成荷か変わる酵素のうち、縮合酵素である 3-ケトアシル-ACP 合成酵素 (KAS) を阻害する。第 2 章の結果から、シアニジオシゾンにおける葉緑体脂肪酸合成では、1 種類の KAS によって全ての縮合反応が触媒されている可能性が示唆された。シアニジオシゾンの単離葉緑体にお

いて、セルレニン存在下では脂肪酸合成活性が大きく減少したことから、シアニジオシゾンの単離葉緑体における脂肪酸合成には、セルレニンによる阻害を受けない未知の KAS が関わっている可能性がないと考えられる。

葉緑体で合成された脂肪酸の一部は小胞体へ輸送され、リン脂質や中性脂質の合成の基質として使われることが知られている。次にシアニジオシゾンの単離葉緑体において、合成された脂肪酸のうち、どれぐらいの脂肪酸が葉緑体外へ輸送されているのかを測定した。シアニジオシゾンの単離葉緑体を[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムでラベルした後、卓上遠心機を用いて軽く遠心し、上清画分と沈殿画分(単離葉緑体)に分けて、それぞれから脂質を抽出した。抽出した脂質は TLC によって各脂質クラスに分画し、オートラジオグラフィーによって放射能を検出した(図 4.6A)。その結果、沈殿画分からは MGDG、SQDG、PG および PA+PI のスポットが検出された。今回使用した展開方法では PA と PI のスポットを分画することはできないことがわかっている。また DGDG の放射能のスポットは検出されなかった。上清画分からも MGDG や PA+PI のスポットがわずかに検出されたが、これらはラベルの取り込みの際に壊れた葉緑体が上清画分に混入したためと思われる。上清画分への葉緑体成分のコンタミネーションを確認するため、上清画分におけるクロロフィル *a* 量を測定した。

単離葉緑体を反応液に懸濁し、[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムを加えない状態で、ラベルの取り込みを行い、その後遠心により葉緑体画分を沈殿させて上清画分を回収し、クロロフィル *a* 量を測定した。その結果、上清画分のクロロフィル *a* の濃度は $4.8 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ であった。これは反応液に加えた単離葉緑体のクロロフィル *a* 量の 0.01% にあたることから、破碎した葉緑体の上清画分へのコンタミネーションは非常に微量であると思われる。

どちらの画分についても、遊離脂肪酸のスポットが最も大きなスポットとして検出され

た (図 4.6A)。上清画分の遊離脂肪酸と、沈殿画分の極性脂質および遊離脂肪酸について、放射能を測定したところ、合成された脂肪酸のおよそ 60~70%は、遊離脂肪酸として上清画分に存在していることがわかった (図 4.6B)。このことから、シアニジオシゾンの単離葉緑体では、合成した脂肪酸を積極的に葉緑体外へ輸送していることが示唆された。また、極性脂質に取り込まれたラベルは、全体のおよそ 10%と比較的少ないことが明らかになった。極性脂質である MGDG、DGDG、SQDG および PG について、どのような脂肪酸がラベルされているのかを調べるために、各極性脂質をメタノリシスし、回収した FAME を RP-TLC によって分画した。その結果、どの極性脂質についても 16:0 のスポットが検出された (図 4.6C)。この結果から、合成された飽和脂肪酸のうち、16:0 のみが極性脂質の合成に使われることがわかった。

4.3.2 安定同位体を用いた単離葉緑体における脂肪酸合成の解析

単離葉緑体における放射性ラベルを用いた解析によって、シアニジオシゾンの葉緑体では、不飽和脂肪酸が合成されないことが分かった。この結果について詳細に解析するために、安定同位体を用いた解析を行った。シアニジオシゾンの単離葉緑体を[2-¹³C]酢酸ナトリウムでラベルした後、全脂質画分を抽出し、そこから FAME を調製した。調整した FAME は GC-MS によって分析し、16:0、18:0、18:1 および 18:2 のそれぞれのメチルエステルのマススペクトルを測定した後、そのデータを基に C13dist ソフトウェアによって ¹³C アイソトポマーの割合を算出した (図 4.7)。用いた[2-¹³C]酢酸は、2 個の炭素のうち一方だけがラベルされているので、そこから作られる脂肪酸も、半分の炭素がラベルされることになる。その結果、16:0 および 18:0 では、¹³C 含量の高いアイソトポマーが検出された。一方、18:1

や 18:2 では ^{13}C を 9 個含むアイソトポマーなど高度にラベルされたアイソトポマーはみられなかった。いずれの脂肪酸についても、 ^{13}C を 2 個ないし 3 個含むアイソトポマーが微量に検出されたものの、これらのアイソトポマーは天然の ^{13}C によってラベルされたものであることが、標識濃度 p の分布によって確認できた。以上のことから、安定同位体を用いた解析においても、単離葉緑体では不飽和脂肪酸が合成されないことを確かめることができた。

4.3.3 単離葉緑体における $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムの取り込み

次にシアニジオシゾンの単離葉緑体における $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いた代謝フロー解析を行った。上記の $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムを用いた代謝フロー解析と同様の方法を用いて、シアニジオシゾンの単離葉緑体を $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムでラベルし、全脂質画分を抽出した。極性脂質へのラベルの取り込みを確認するために、TLC によって極性脂質を分画した後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、MGDG、DGDG、SQDG、PG および PA+PI のスポットが検出された (図 4.8A)。これらの極性脂質について、液体シンチレーションカウンターによってラベルの取り込みを測定したところ、特に $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムのラベルは主に MGDG に取り込まれていることが明らかになった (図 4.8B)。

先ほどの $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムを用いた解析では、DGDG へのラベルの取り込みはみられなかったが、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いた解析では DGDG へのラベルの取り込みも見られた。これは $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸と $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムとで、極性脂質の中でラベルされる部分が異なるためではないかと考えられた。つまり、 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムを用いた場合は極性脂質の脂肪酸部分がラベルされるが、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いた場合は、極性脂

質の極性基部分がラベルされているのではないかとということが考えられた。そこで上記の可能性を確かめるために、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムでラベルした MGDG を用いて詳しい解析を行った。 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムでラベルした MGDG をメタノリシス処理し、アシル基部分を FAME にすることで、MGDG を脂肪酸部分と極性基部分に分離した (図 4.9A)。回収した FAME は RP-TLC によって各脂肪酸に分画した。極性基部分はメチルガラクトシドおよびグリセロールとして回収されているため、加水分解処理を行うことによって前者をガラクトースに変換した後、TLC を用いてガラクトースとグリセロールを分画した。その結果、FAME を分画した際のオートラジオグラムでは、顕著なスポットが検出されなかった (図 4.9B)。一方、ガラクトースとグリセロールを分画した際のオートラジオグラムでは、これらの物質のスポットを検出することができた (図 4.9C)。このことから、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムのラベルは MGDG の脂肪酸部分ではなく極性基部分に取り込まれていることを確かめることができた。以上の結果から、シアニジオシゾンの葉緑体内部には、光合成産物であるトリオースリン酸から G3P および UDP-ガラクトースを合成する経路が存在していると考えられた (図 4.9D)。

さらに、DGDG や SQDG、PG についても同様の方法で、極性基部分へのラベルの取り込みを確認したところ、これらの脂質についてもガラクトースやスルホキノボースなどから放射性ラベルが検出された (図 4.9E)。以上のことから、シアニジオシゾンの単離葉緑体において $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムでラベルされた MGDG などの極性脂質は、脂肪酸部分ではなく、極性基部分が主にラベルされていることが明らかになった。

4.3.4 安定同位体の MGDG への取り込み

放射性同位体を用いた代謝フロー解析の結果を詳細に確認するため、安定同位体を用いた代謝フロー解析を行った。シアニジオシゾン細胞または単離葉緑体に、 $[^{13}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを1時間取り込ませた後、MGDGを抽出し、脂肪酸、グリセロールおよびガラクトースへの ^{13}C ラベルの取り込みについてC13distソフトウェア (Sato et al. 2016c) により算出した (図 4.10)。シアニジオシゾンの MGDG の分子種は、主に 18:2/16:0 または 18:2/18:2 であるため、脂肪酸へのラベルの取り込みは 16:0 および 18:2 のみ確認した。シアニジオシゾン細胞を用いた解析では、MGDG の 16:0 と、グリセロール、ガラクトースにおいてラベルの取り込みがみられたが、18:2 にはラベルの取り込みがみられなかった。*in vivo* での放射性ラベルによる代謝解析 (Sato and Moriyama 2007) において、反応時間1時間では MGDG の 18:2 はラベルされなかったことが報告されており、この結果は上記の結果と一致している。単離葉緑体では、グリセロールおよびガラクトースからは、高度にラベルされたアイソトポマーが検出されたが、16:0 および 18:2 などの脂肪酸部分にはそのようなアイソトポマーは検出されなかった。またガラクトースについては、シアニジオシゾン細胞および単離葉緑体の両方で、 ^{13}C を2個ないし3個もつアイソトポマーが検出された。以上のことから、安定同位体を用いた代謝フロー解析においても、単離葉緑体で合成された MGDG は、極性基部分にのみ $[^{13}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムのラベルが取り込まれていることが確認された。

4.3.5 G3P 合成に関わる遺伝子の比較ゲノム解析と細胞内局在解析

シアニジオシゾンの単離葉緑体における $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムを用いた代謝フロー解析によって、葉緑体内部で G3P および UDP-ガラクトースが合成されている可能性が示唆

された。したがって、次に G3P の合成に関わる遺伝子を比較ゲノム解析により検出し、GFP を用いて細胞内局在を確認することで、葉緑体での G3P 合成に関わる酵素の特定を試みた。G3P の合成は、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) およびグリセロールキナーゼ (GK) によって行われる。GPDH はジヒドロキシアセトンリン酸を還元することで、GK はグリセロールをリン酸化することで、G3P を合成する。GPDH はジヒドロキシアセトンリン酸を還元する際に NADH を消費するものと FADH を消費するものの 2 種類存在し、陸上植物では、前者の GPDH は葉緑体や小胞体に、後者の GPDH はミトコンドリアに局在している。シアニジオシゾンにおいて、これらの酵素を Gclust データベースにより検索したところ、NAD⁺依存型 GPDH のホモログが 2 個 (CMR476C、CMD113C)、FAD 依存型 GPDH のホモログが 1 個 (CML209C)、GK のホモログが 1 個 (CMJ173C)、それぞれ検出された (表 4.3)。次に、これら 4 個の G3P 合成に関わる酵素について、GFP を用いて細胞内局在を確認した。各酵素の N 末端延長配列部分を GFP の N 末端に付加するように作製した GFP コンストラクトを作製し (図 4.11A)、シアニジオシゾン細胞に導入して GFP 蛍光を観察した。その結果、NAD⁺依存型 GPDH をコードする CMR476C は葉緑体局在を、CMD113C はサイトゾル局在をそれぞれ示した (図 4.11C)。FAD 依存型 GPDH をコードする CML209C については、開始メチオニンの候補となるメチオニンが 2 個検出されたため、それぞれのメチオニンからはじまる N 末端延長配列部分を挿入したコンストラクトを用いて解析した。その結果、1 番目のメチオニンを含む N 末端延長配列部分を用いた場合はサイトゾルに、2 番目のメチオニンを含む N 末端延長配列部分を用いた場合はミトコンドリアに GFP の蛍光が観察された (図 4.11C)。GK をコードする CMJ173C はサイトゾル局在を示した (図 4.11C)。以上のことから、葉緑体内部での G3P 合成に関わっているのは、葉緑体局在を示した NAD⁺

依存型 GPDH をコードする CMR476C であることが示唆された。また、サイトゾルへの局在を示した NAD⁺依存型 GPDH をコードする CMD113C や、GK をコードする CMJ173C は、小胞体における脂質合成の際に G3P を供給する酵素であると思われる。

4.3.6 UDP-ガラクトース合成に関わる遺伝子の比較ゲノム解析と細胞内局在解析

次にシアニジオシゾンにおける UDP-ガラクトースの合成に関わる酵素について比較ゲノム解析を用いて検索した。UDP-ガラクトースの合成には、UDP-グルコースピロホスホリラーゼおよび UDP-グルコース 4-エピメラーゼが関わっている。シロイヌナズナの既知の遺伝子を基に Gclust データベースを用いてシアニジオシゾンやその他の紅藻（ガルデリア、スサビノリ、ヤハズツノマタ、チノリモ）のもつオーソログを検索した（表 4.1）。その結果、シアニジオシゾンではサイトゾル局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (UGP; CMS159C)、サイトゾル局在型 UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (UGE; CMA041C)、および葉緑体局在型 UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (PHD1; CMO263C) を特定したが、葉緑体局在型グルコースピロホスホリラーゼである *UGP3* (Okazaki et al. 2009) のホモログは検出されなかった（表 4.2）。他の紅藻についてもシアニジオシゾンと同様に、その他の遺伝子のホモログは 1 個または 2 個が検出されたものの、*UGP3* のホモログは検出されなかった（表 4.2）。シアニジオシゾンの単離葉緑体における解析によって、UDP-ガラクトースが葉緑体内部で合成されていることが示唆されたため、これらのことから、シアニジオシゾンを含む紅藻では *UGP3* 以外の新規の葉緑体局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼが葉緑体に存在している可能性が考えられた。

唯一の UDP-グルコースピロホスホリラーゼのホモログとして検出された CMS159C が、

サイトゾルと葉緑体の両方に局在し、葉緑体内で UGP3 の代替酵素として機能していることが想定されたため、これらの酵素の細胞内局在について GFP を用いて解析した。解析候補酵素の N 末端延長配列部分を付加した GFP コンストラクトを作製し (図 4.11A)、シアニジオシゾン細胞に導入して GFP 蛍光を観察した (表 4.3、図 4.11D)。その結果、サイトゾル局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (UGP; CMS159C)、およびサイトゾル局在型 UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (UGE; CMA041C) のホモログは、どちらもサイトゾルにのみ局在していることがわかった。また、葉緑体局在型 UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (PHD1; CMO263C) のホモログである CMO263C は、葉緑体局在を示した。

CMS159C の細胞内局在についてさらに詳しく解析するために、図 4.11B に示すような 3×HA タグコンストラクトを作製し、細胞内局在解析を行った (図 4.11E)。このコンストラクトを用いると、解析候補酵素自身のプロモーターを用いて HA との融合タンパク質を発現させることが可能となる。解析の結果、サイトゾル局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (UGP; CMS159C) はサイトゾルにのみ局在することが確認された (図 4.11E)。以上のことから、葉緑体内に存在するはずの UDP-ガラクトース合成系について、これらの合成に関わる酵素を比較ゲノム解析によって検出することができたが、唯一葉緑体局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼのみ特定することができなかった。次に糖ヌクレオチドの合成に関わる酵素に着目し、これらについても細胞内局在を実験的に確かめることにした。

4.3.7 その他の糖ヌクレオチドの合成に関わる酵素の細胞内局在解析

UDP-グルコースおよび UDP-ガラクトース以外の糖ヌクレオチドの合成に関わる遺伝子を比較ゲノム解析により検索したところ、GDP-マンノース合成酵素と UDP-アセチルグルコ

サミン合成酵素のホモログが 2 個ずつ検出された (表 4.1)。GDP-マンノース合成酵素のホモログである CML145C および CMO003C と、UDP-アセチルグルコサミン合成酵素のホモログである CMF136C および CMT085C について、GFP を用いて細胞内局在を解析した (図 4.12A)。その結果、GDP-マンノース合成酵素をコードする CML145C および CMO003C と、UDP-アセチルグルコサミン合成酵素をコードする CMF136C は、いずれもサイトゾルへの局在を示した。UDP-アセチルグルコサミン合成酵素をコードする CMT085C は、*N* 末延長配列部分が長く、開始メチオニンの候補となるメチオニンが 4 個存在していたため、それぞれについて GFP コンストラクトを作製して解析に用いた。その結果、1 番目のメチオニンを含む *N* 末延長配列部分を挿入したコンストラクトではミトコンドリアへの局在を、3 番目のメチオニンを含む *N* 末延長配列部分を挿入したコンストラクトでは葉緑体への局在を示した。また、2 番目および 4 番目のメチオニンを含む *N* 末延長配列部分を挿入したコンストラクトでは、どちらもサイトゾルへの局在を示した。さらに CMT085C については、3×HA タグコンストラクトを用いた解析もあわせて行った。自身のプロモーターを用いてシアンジオシズン細胞で HA との融合タンパク質を発現し、免疫染色を行った。その結果、CMT085C はサイトゾル、葉緑体、およびミトコンドリアの両局在であることが分かった (図 4.12B)。以上の結果から、葉緑体への局在を示した UDP-アセチルグルコサミン合成酵素のホモログである CMT085C が、葉緑体内部での UDP-グルコースの合成に関わっている可能性が示唆された。

4.3.8 MGDG の各分子種へのラベルの取り込み

[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを用いて単離葉緑体をラベルすると、脂肪酸にはほとんどラベ

ルが取り込まれない (図 4.9B)。つまり、脂肪酸はほとんど新規合成されていないと考えられる。それにもかかわらず、MGDG の極性基部分にはラベルが多く取り込まれており、これは新規合成された脂肪酸がほとんど存在していない状態で、MGDG が合成されていることを示す。単離葉緑体において、どのようにして MGDG のジアシルグリセロール骨格が合成されているのかを調べるために、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムによってラベルされた MGDG の分子種を硝酸銀 TLC によって分析した (図 4.13)。その結果、 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムによってラベルされた MGDG の分子種は、18:2/18:2 および 18:2/16:0 であることがわかった。この結果は、単離葉緑体を UDP- $[^{14}\text{C}]$ ガラクトースでラベルした際の MGDG におけるラベルパターンと類似していた (Sato and Moriyama 2007)。また、 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸でラベルした MGDG についても同様に硝酸銀 TLC により各分子種に分画し、オートラジオグラフィーによって放射能を検出した。 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸により新規合成された $[^{14}\text{C}]$ 飽和脂肪酸のうち、MGDG に取り込まれるのが 16:0 のみであることはすでに確認している (図 4.6C)。オートラジオグラフィーの結果、 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムによってラベルされた MGDG の分子種は、16:0/18:2 が主であることが分かった (図 4.13)。これらの結果から、単離葉緑体において $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムおよび $[^{13}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムでラベルされた MGDG には 18:2 が含まれていることがわかった。18:2 は葉緑体で合成されないことから、単離葉緑体には 18:2 のプールが存在しているのではないかと考えられた。

18:2 のプールが葉緑体に存在するならば、18:2 はどのような形でプールされているのだろうか？シアニジオシゾンにおいて、ガラクト脂質以外で 18:2/18:2 分子種の割合が多い脂質は PC であり、さらに 18:2 は PC 上で合成されていると考えられている (Sato and Moriyama 2007)。これらのことから、小胞体で合成された 18:2/18:2-PC が葉緑体へ輸送されたのち、

18:2/18:2-DAG へと代謝され、さらに UDP-ガラクトースが付加されることで 18:2/18:2 分子種のガラクト脂質が合成されているのではないかと考えた。そこで単離葉緑体における $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ の取り込み実験を行った。シアニジオシゾン細胞を $[2-^{14}\text{C}]\text{酢酸}$ で 1 時間ラベルした後に $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ を精製し、この $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ を単離葉緑体を懸濁した反応液に加えて 1 時間インキュベートした。この精製した $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ は脂肪酸部分に ^{14}C ラベルが取り込まれたものである。ガラクト脂質へのラベルの取り込みをオートラジオグラフィーによって確認した結果、PI+PA のスポットが検出されたが、MGDG などのガラクト脂質からは ^{14}C ラベルは検出されなかった (図 4.14)。

4.4 考察

4.4.1 単離葉緑体における脂肪酸の合成

シアニジオシゾンの単離葉緑体を[2-¹⁴C]酢酸ナトリウムによりラベルした際に、16:0 や 18:0 などの飽和脂肪酸にラベルが取り込まれていた。一方で、18:1 などの不飽和脂肪酸からは¹⁴Cラベルが検出されなかった。ハウレンソウの単離葉緑体を用いた解析では、合成された脂肪酸のうち約40%が18:1であることが分かった。これらのことから、シアニジオシゾンでは陸上植物と異なり、葉緑体で合成される脂肪酸は飽和脂肪酸のみであることを実験的に確かめることができた。

第2章および第3章でも報告した通り、シアニジオシゾンは葉緑体に脂肪酸合成に関わる縮合酵素である3-ケトアシル-ACP合成酵素がKAS Iしか存在しない(表2.1)。陸上植物では、KAS IはC4-ACPからC16-ACPまでの伸長反応に関わっており、C16-ACPからC18-ACPへの伸長反応にはKAS IIが関わっている。シアニジオシゾンの単離葉緑体を用いたラベル実験では、主な産物が16:0と18:0であった(図4.5)。それに加えて、KAS I/IIの阻害剤であるセルレニン存在下では、シアニジオシゾンの脂肪酸合成活性が顕著に低下した(図4.5F)。このことから、セルレニン非感受性である未知のKASがシアニジオシゾンの葉緑体に存在する可能性がないことが考えられる。以上のことから、通常KAS IIが触媒しているC16-ACPからC18-ACPへの伸長における縮合反応を、シアニジオシゾンのKAS Iが代わりに触媒していることが示唆された。KAS IIホモログの欠失は、他の海洋性紅藻やガルデリアにも共通してみられており(表3.3)、これらの紅藻についても、シアニジオシゾンと同様に、KAS IのホモログがKAS IIの役割も担っていると思われる。

一方、[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを用いてシアニジオシゾンの単離葉緑体をラベルした場

合、MGDGの脂肪酸部分にはほとんどラベルが取り込まれていなかった(図4.9B、図4.10)。これはシアニジオシゾンでは光合成産物であるトリオースリン酸からアセチル-CoAを合成する際にサイトゾルを経由する必要があるためであると考えられる。シアニジオシゾンは、陸上植物の光合成組織と同様に、トリオースリン酸からアセチル-CoAの合成に関わる酵素のうち、ホスホグリセリン酸ムターゼとエノラーゼはサイトゾルにのみ局在していることが、先行研究によって明らかになっている(Moriyama et al. 2014)。

シアニジオシゾンの単離葉緑体において、新規合成された脂肪酸の葉緑体外への輸送を測定したところ、およそ60%の脂肪酸が葉緑体外に遊離脂肪酸の形で存在していることが示唆された(図4.6B)。第2章で報告した網羅的な細胞内局在解析によって、4個の長鎖アシル-CoA合成酵素(LACS)がサイトゾル局在であることがわかっている。このことから、細胞内では、葉緑体で合成された飽和脂肪酸が葉緑体外へ輸送された後に、サイトゾル局在の長鎖アシル-CoA合成酵素によってアシル-CoAに変換され、小胞体へ供給されていると思われる。

4.4.2 単離葉緑体における葉緑体脂質の合成

シアニジオシゾンの単離葉緑体を $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸または $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムによってラベルしたところ、MGDG、DGDG、SQDG、およびPGにラベルの取り込みがみられた(図4.6A、図4.8A)。この結果から、シアニジオシゾンも、陸上植物と同様に、これらの脂質は葉緑体で合成されていることを実験的に確かめることができた。 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸を用いた解析では、DGDGへのラベルの取り込みがみられなかった(図4.6A)。先行研究で行われたシアニジオシゾン細胞を用いた代謝フロー解析(Sato and Moriyama 2007)において、DGDGへの

[2-¹⁴C]酢酸の取り込みは非常に遅いことが報告されており、同様の理由から単離葉緑体における解析についても DGDG へのラベルの取り込みがみられなかったものと思われる。また、葉緑体脂質以外では PI へのラベルの取り込みも観察された。本研究で用いた TLC による分画では、PA と PI を分画することができなかった。このスポットは反応時間 5 分後にはすでに顕著なスポットとして現れており、このことから代謝中間体である PA が主にラベルされているものと思われる。また、第 2 章で行った脂質代謝関連酵素における網羅的な細胞内局在解析では、PI 合成酵素である CMM125C はサイトゾルへの局在を示した。このことから PI は小胞体で合成されていると思われるため、PI にラベルの取り込みがあったとしても、それは葉緑体で新規に合成されたものではなく、アシル基交換反応などによるものであると思われるが、この点については今後詳細に解析する必要があると思われる。

[2-¹⁴C]酢酸を用いた解析において、単離葉緑体によって合成された脂肪酸のうち葉緑体脂質に取り込まれたのは、全体の約 10%で、ほとんどの新規合成された脂肪酸は遊離脂肪酸として存在していることがわかった (図 4.6B)。シアニジオシゾンでは小胞体から葉緑体へ 18:2 が供給されているが、単離葉緑体の状態では 18:2 の供給がないため、葉緑体脂質の合成活性が低下し、その結果新規に合成された脂肪酸が遊離脂肪酸として蓄積したのではないかと思われる。また、新規合成された [¹⁴C]飽和脂肪酸のうち 16:0 のみが葉緑体脂質に取り込まれていた (図 4.6C)。先行研究で行われたシアニジオシゾン細胞を用いた代謝フロー解析 (Sato and Moriyama 2007) においても、ガラクト脂質に取り込まれる脂肪酸は 16:0 および 18:2 であり、葉緑体で新規に合成される 18:0 はほとんど取り込まれていない。これらのことから、シアニジオシゾンでは葉緑体経路におけるアシルトランスフェラーゼの基質特異性が厳密であり、*sn-1* には 18:2 が、*sn-2* には 16:0 が付加した PA が合成され、葉緑

体で合成された 18:0 は、18:2 の合成の基質として小胞体へ積極的に輸送されていると思われる。

シアニジオシゾンの単離葉緑体において、[2-¹⁴C]酢酸ナトリウム、または[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムによってラベルした MGDG は、18:2 を含む分子種が主であることがわかった (図 4.13)。このことから、葉緑体には 18:2 のプールが存在していることが示唆された。18:2 がどのような形で存在しているのかという疑問が生じる。考えられる可能性としては、18:2-ACP または 18:2-CoA としてプールされ、G3P のアシル化の際の基質となっている場合と、18:2 を持つリン脂質の形でプールされ、DAG に分解されたのち、UDP-ガラクトースが付加されることで MGDG が合成されている場合が考えられる。本研究では後者の可能性について検討するために、単離葉緑体における [¹⁴C]PC を用いたラベル実験を行ったが、[¹⁴C]PC のラベルは葉緑体脂質に取り込まれなかった (図 4.14)。しかし、今回の解析では、反応液から直接全脂質画分を抽出したため、反応液に加えた遊離の [¹⁴C]PC がどの程度葉緑体に取り込まれたのかはわからないため、小胞体からの 18:2 の供給や葉緑体での代謝については今後詳しく解析する必要があると思われる。

4.4.3 葉緑体における G3P および UDP-ガラクトースの合成

本研究の解析により、シアニジオシゾンは葉緑体内部に G3P および UDP-ガラクトースの合成が行われていることが示唆された。UDP-ガラクトースの合成に関わる主要な酵素として、UDP-グルコースピロホスホリラーゼおよび UDP-グルコース 4-エピメラーゼが存在するが、シアニジオシゾンには葉緑体局在型 UDP-グルコース合成酵素である *UGP3* (Okazaki et al. 2009) のホモログが存在しないことが分かった (表 4.1、表 4.2)。また、他の

紅藻についても、シアニジオシゾン同様、*UGP3* のホモログが検出されなかった (表 4.1、表 4.2)。Gelust データベースにおいて、*UGP3* は単一のクラスターを形成しており (クラスターID: 11659)、そのクラスターには陸上植物や緑藻などの緑色植物のみが属していたことから、*UGP3* は緑色植物において保存された遺伝子であると考えられる。単離葉緑体における^[14C]炭酸水素ナトリウムを用いた解析によって、葉緑体内で G3P および UDP-ガラクトースの合成が行われていることが示唆されたことから、シアニジオシゾンの葉緑体には、*UGP3* 以外の新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼが存在する可能性が示唆された。そこで比較ゲノム解析および細胞内局在解析により、新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼを探索した結果、候補遺伝子として *CMT085C* が見出された。シアニジオシゾンにおける糖脂質およびその前駆体の合成についての代謝経路図を図 4.15 に示す。先行研究によって、シアニジオシゾンの単離葉緑体を UDP-^[14C]ガラクトースによってラベルすると、MGDG や DGDG がラベルされることから (Sato and Moriyama 2007)、シアニジオシゾンにおけるガラクト脂質の合成では、サイトゾルおよび葉緑体の両方から UDP-ガラクトースが供給されていると思われる。また、G3P の合成については、NAD⁺依存型 GPDH をコードする *CMR476C* が葉緑体局在を示したため (図 4.11C)、シアニジオシゾンは陸上植物と同様に、葉緑体における G3P の合成は葉緑体局在の GPDH によって主に行われていると思われる (Singh et al. 2016)。

CMT085C は、UDP-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼをコードする遺伝子として、比較ゲノム解析で見出され、細胞内局在解析の結果、ミトコンドリア、サイトゾルおよび葉緑体に局在する酵素であることがわかった (図 4.12)。Pfam データベース (Finn et al. 2014) によって *CMT085C* のドメイン構造を検索したところ、UDP-アセチルグルコサミン

ピロホスホリラーゼおよびホスホアセチルグルコサミンターゼの機能ドメインをもつ二機能酵素であることが判明した。ガルデリアやチノリモなどの他の紅藻には CMT085C のような二機能酵素が検出されなかったことから (表 4.1)、この遺伝子はシアニジオシゾン特有のもので紅藻全般に広く保存されたものではないと思われる。UGP3 をもたない紅藻では、その代替として機能していると思われる新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼが、紅藻全般で保存されていることが考えられるため、本研究によって見出された CMT085C はその新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼではない可能性が高いと思われる。しかし、シロイヌナズナの UDP-アセチルグルコサミン合成酵素において、アセチルグルコサミン-1-リン酸に対する活性のおよそ 1/10 であるが、グルコース-1-リン酸への活性ももつことが報告されている (Decker and Kleczkowski 2017)。このことから、CMT085C が UDP-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼの活性に加えて、UDP-グルコースピロホスホリラーゼの活性ももつ可能性が考えられる。シアニジオシゾンにおいて、CMT085C がガラクト脂質合成に関与しているのかを検討するために、基質特異性など酵素学的特徴をを明らかにする必要があると思われる。

4.5 表

表 4.1 紅藻における UDP-ガラクトースおよび糖ヌクレオチドの合成に関わる酵素

N.D. は比較ゲノム解析で検出されなかったことを示す。

Substrate	Product	Enzyme	EC Number	Gene name	Land plants	Green algae	Red algae					Reference
					<i>A. thaliana</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. merolae</i>	<i>P. purpureum</i>	<i>G. sulphuraria</i>	<i>C. crispus</i>	<i>P. yesoensis</i>	
UDP-galactose synthesis												
Glucose-1-phosphate	UDP-glucose	UDP-Glucose pyrophosphorylase (Plants type)	2.7.7.9	<i>UGP1/2</i>	AT3G03250=UGP1 AT5G17310=UGP2	Cre04.g229700.t1.2	CMS159C	PoPU_3396.11 PoPU_3601.4	GaSU_EME32720	ChCR_CDF37168	PyYE_c25732_g6344 PyYE_c29138_g7162	Meng et al. 2008; Park et al. 2010
		UDP-Glucose pyrophosphorylase (Cyanobacteria GalU-type)		<i>UGP3</i>	AT3G56040=UGP3	Cre12.g554250.t1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Okazaki et al. 2009
		UDP-Glucose pyrophosphorylase (Cyanobacteria CugP type)		<i>galU</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Maeda et al. 2014
Glucose-1-phosphate	UDP-glucose	UDP-Glucose pyrophosphorylase (Cyanobacteria CugP type)	2.7.7.9	<i>cugP</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Maeda et al. 2014
		UDP-sugar pyrophosphorylase		<i>USP</i>	AT5G52560=ATUSP USP	Cre14.g621750.t1.2 Cre06.g276750.t1.3	N.D.	PoPU_2284.29	N.D.	N.D.	N.D.	
UDP-glucose	UDP-galactose	UDP-glucose epimerase	5.1.3.2.	<i>UGE1-5</i>	AT4G23920=UGE2 AT1G64440=RHD1, UGE4 AT1G12780=UGE1 AT3G28530 AT4G10960=UGE5 AT1G63180=UGE3	g4686.t1	CMA041C	PoPU_2302.7	GaSU_EME31528	ChCR_CDF32840	PyYE_c20015_g4925	Dörmann and Benning 1998 Barber et al. 2006
				<i>PHD1</i>	AT2G39080	Cre13.g608000.t1.2	CMO263C	PoPU_3440.13	GaSU_EME28001	ChCR_CDF37085	PyYE_c4063_g891 PyYE_c6457_g1467	Li et al. 2011a
NDP-sugar pyrophosphorylase												
Glucose-1-phosphate	ADP-Glucose	ADP-Glucose pyrophosphorylase	2.7.7.27	<i>APS1/2 (Small subunit)</i>	AT1G05610=APS2 AT5G48300=ADG1 APS1	Cre03.g188250.t1.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
				<i>APL1-4 (Large subunit)</i>	AT1G27680=APL2 AT2G21590=APL4 AT4G39210=APL3 AT5G19220=ADG2 APL1	Cre13.g567950.t1.2 (g7708.t1)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
				<i>Not classified</i>		Cre16.g683450.t1.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Mannose-1-phosphate	GDP-mannose	GDP-mannose pyrophosphorylase	2.7.7.13	<i>CYT1</i>	AT2G39770=CYT1 VTC1 AT3G55590 AT4G30570	Cre16.g672800.t1.2	CML145C	PoPU_3690.5	GaSU_EME29785	ChCR_CDF40263	PyYE_c10197_g2432	Sawake et al., 2015 Qin et al, 2016
				<i>KJC1/2</i>	AT1G74910=KJC1 AT2G04650=KJC2	N.D.	CMO003C	PoPU_2044.31	GaSU_EME30517	N.D.	N.D.	
N-acetylglucosamine-1-phosphate	UDP-N-acetylglucosamine	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	2.7.7.23 (2.7.7.28)		AT1G31070=GlcNAc1pUT1 AT2G35020=GlcNAc1pUT2	g8035.t1	CMF136C	PoPU_2500.16 PoPU_4443.20	GaSU_EME28756	N.D.	N.D.	
Glucosamine-1-phosphate	UDP-N-acetylglucosamine	Fused N-acetyl glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase/phosphoacetylglucosamine mutase		<i>glmU</i>	N.D.	N.D.	CMT085C	N.D.	N.D.	N.D.	PyYE_c38636_g9015	
Other enzymes												
Glucose-1-phosphate UDP-galactose	Galactose-1-phosphate UDP-glucose	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7.7.12		AT5G18200	N.D.	CMQ030C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Galactose	Galactose-1-phosphate	Galactokinase	2.7.1.6	<i>GAL1</i>	AT3G06580=GAL1	Cre17.g732300.t1.2	CMN198C	PoPU_32121.21	Gasu_09360	N.D.	N.D.	

表 4.2 UDP-ガラクトース合成に関わる遺伝子数の比較

シアニジオシゾン以外の紅藻には、ガルデリア (*G. sulphuraria*)、スサビノリ (*P. yezoensis*)、チノリモ (*P. purpureum*)、ヤハズツノマタ (*C. crispus*) が含まれる。詳細は表 4.3 を参照。

Localization (Land plants)	Gene	<i>A. thaliana</i> (Land plants)	<i>C. reinhardtii</i> (Green algae)	<i>C. merolae</i> (Red algae)	Other red algae
Cytosol	<i>UGP1/2</i>	2	1	1	1~2
	<i>UGE</i>	5	1	1	1
Plastid	<i>UGP3</i>	1	1	0	0
	<i>PHD1</i>	1	1	1	1~2

表 4.3 シアニジオシゾンにおける UDP-ガラクトース合成に関わる酵素、および糖ヌクレオチド合成酵素の細胞内局在解析

Enzyme name	Abbreviation of enzyme name and/or gene name	Locus tag	Subcellular localization
Glycerol-3-phosphate synthesis			
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺ -dependent)	GPDH	CMR476C CMD113C	Pt Cyt
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (FAD-dependent)	GPDH	CML209C	Mt, Cyt
Glycerol kinase	GK	CMJ173C	Cyt
UDP-galactose synthesis			
UDP-Glucose pyrophosphorylase	UGP	CMS159C	Cyt
UDP-glucose 4-epimerase	UGE	CMA041C	Cyt
Plastid type UDP-glucose 4-epimerase	PHD1	CMO263C	Pt
NDP-sugar synthesis			
GDP-mannose pyrophosphorylase	GMP1 GMP2	CML145C CMO003C	Cyt Cyt
UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	UGNP1 UGNP2	CMF136C CMT085C	Cyt Mt, Pt, Cyt

表 4.4 GFP または HA タグコンストラクトの作製に使用したプライマー

大文字で表記した配列は、In-Fusion を用いたクローニング反応に必要な pCEG1 ベクター、または pBSHAb-T3'ベクターとの共通配列を示す。

Locus tag	Sequence of forward primer (5' to 3')	Sequence of reverse primer (5' to 3')
N-terminal peptide-EGFP construct		
CMR476C	TCGTTGACCTCTAGAatgcagcctgagcaaaactgt	CATGGATCCTCTAGAaccattgtagccaaggcaa
CMD113C	TCGTTGACCTCTAGAatgacggagaaacataaggt	CATGGATCCTCTAGAcgattctgtctctgtttga
CML209C 1st Met	TCGTTGACCTCTAGAatggaaaggatgctgaaagt	CATGGATCCTCTAGAcacacgccgttcgaaagtcca
CML209C 2nd Met	TCGTTGACCTCTAGAatgatgccctgcgttcgtat	CATGGATCCTCTAGAgtcgagtgcaacgccggagc
CMJ173C	TCGTTGACCTCTAGAatgaaagagaacgctttgc	CATGGATCCTCTAGAaatgtcggcaggctttatgc
CMS159C	TCGTTGACCTCTAGAatgcctttggtgcgaaccag	CATGGATCCTCTAGActtcagtacagcgacgcggc
CMA041C	TCGTTGACCTCTAGAatggatcatacgaagagat	CATGGATCCTCTAGAccgctgctcactggccccgg
CMO263C	TCGTTGACCTCTAGAAatgttcgtagcgcttcgct	CATGGATCCTCTAGAAaccgtaagtgcggcatccg
CML145C	TCGTTGACCTCTAGAAatgaaagcactactactggt	CATGGATCCTCTAGAAcatcacgtgtggctggtagc
CMO003C	TCGTTGACCTCTAGAAatgtctcctagattataccg	CATGGATCCTCTAGAAgcctcctactagatcacag
CMF136C	TCGTTGACCTCTAGAAatgtatgaggcaagccccaa	CATGGATCCTCTAGAAtgcaactgctgctcttggg
CMT085C -1stMet	TCGTTGACCTCTAGAAatgtacgttttcagaacaat	CATGGATCCTCTAGAAgcatttccaggaggaatcgt
CMT085C -2ndMet	TCGTTGACCTCTAGAAatgacgctgccatcgattt	CATGGATCCTCTAGAAgcagggtcgaaccgcacgc
CMT085C -3rdMet	TCGTTGACCTCTAGAAatgttcggggcaagcggcct	CATGGATCCTCTAGAAcgagcagagcgtggcacgct
CMT085C -4thMet	TCGTTGACCTCTAGAAatgataactgttcccacaa	CATGGATCCTCTAGAAtcgctgaaagagctgttat
HA tag construct		
CMS159C	CTGCAGTTAATTAATgtggacacgacgtcgttac	TGGGTAATTAATTAACacgtccaaaacatgaaggt
CMT085C	CTGCAGTTAATTAATcgaaaccacggagtgaatg	TGGGTAATTAATTAAGgaatgcgttcgagtgggcg

4.6 図

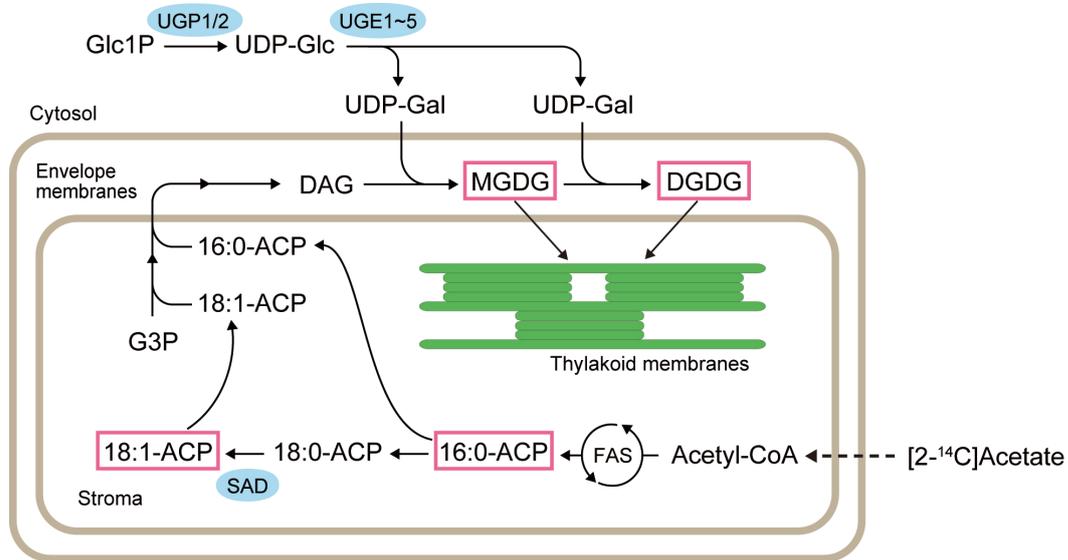


図 4.1 陸上植物におけるガラクト脂質の合成

略語：ACP, アシルキャリアータンパク質；DAG, ジアシルグリセロール；DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール；FAS, 脂肪酸合成；G3P, グリセロール 3-リン酸；Glc1P, グルコース 1-リン酸；MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール；SAD, ステアロイル-ACP 不飽和化酵素；UDP-Gal, UDP-ガラクトース；UDP-Glc, UDP-グルコース；UGE1-5, UDP-グルコース 4-エピメラーゼ；UGP1/2, UDP-グルコースピロホスホリラーゼ 1/2

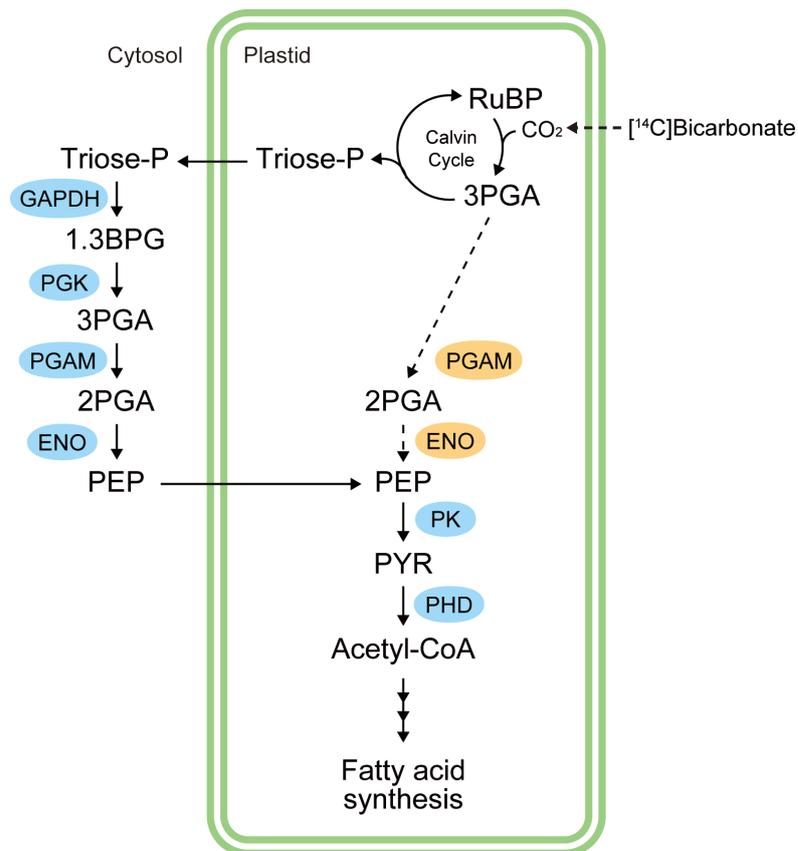


図 4.2 光合成産物からアセチル-CoA の合成

陸上植物における光合成産物であるトリオースリン酸からアセチル-CoA の合成を示す。黄色で示した酵素は非光合成組織の色素体において局在していることがわかっている。略語：1.3BPG, 1.3-ビスホスホグリセリン酸；2PGA, 2-ホスホグリセリン酸；3PGA, 3-ホスホグリセリン酸；ENO, エノラーゼ；GAPDH, グリセルアルデヒド 3-リン酸；PEP, ホスホエノールピリン酸；PGAM, ホスホグリセリン酸ムターゼ；PGK, ホスホグリセリン酸キナーゼ；PHD, ピルビン酸デヒドロゲナーゼ；PK, ピルビン酸キナーゼ；PYR, ピルビン酸；RuBP, リブローズ 1.5-ビスリン酸；Triose-P, トリオースリン酸

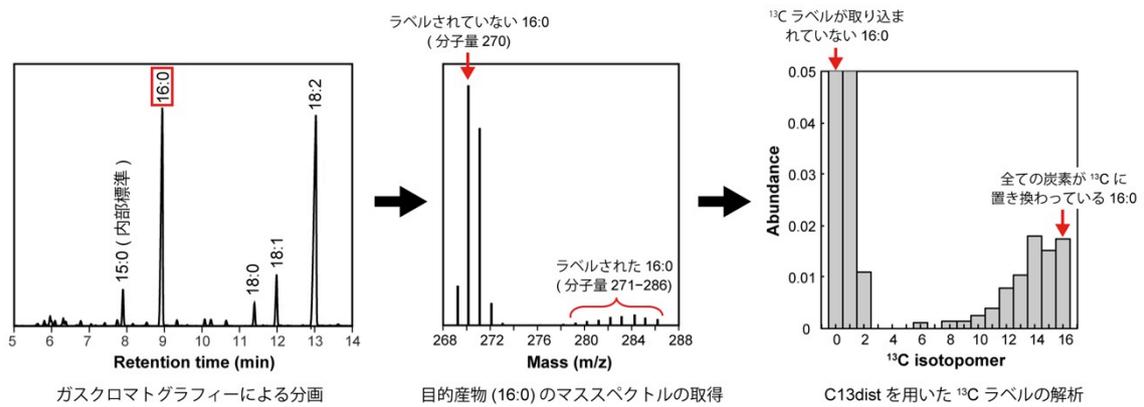


図 4.3 C13dist を用いた ^{13}C ラベルの取り込みの解析例

^{13}C 炭酸水素ナトリウムを用いてシアニジオシゾン細胞をラベルした際の、16:0 における ^{13}C ラベルの解析例を示す。GC-MS を用いて FAME を分画した後、16:0 のマススペクトルを入手し、C13dist を用いてそのデータを ^{13}C アイソトポマーの分布に変換した。

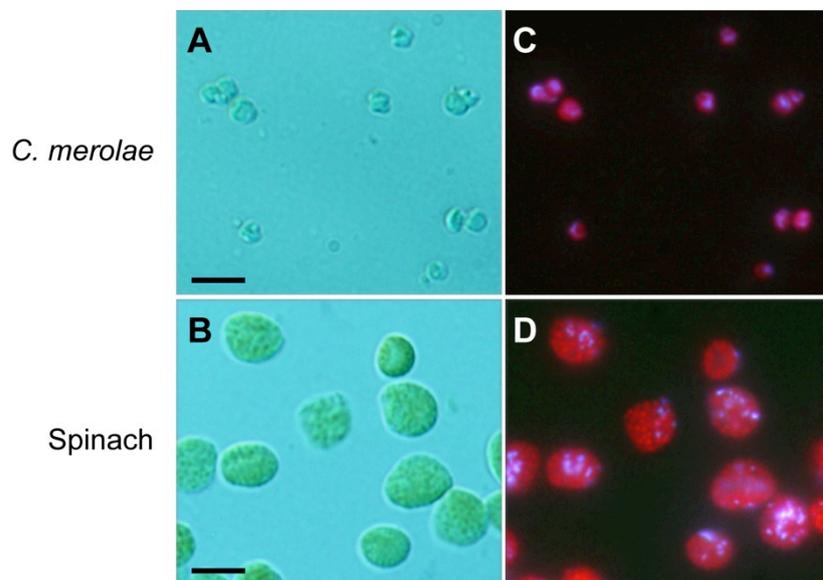


図 4.4 シアニジオシゾン (A, C) またはハウレンソウ (B, D) から単離した葉緑体の
蛍光顕微鏡写真

A, B は微分干渉像、C, D は DAPI 染色像をそれぞれ示す。バーの長さは 5 μm を示す。

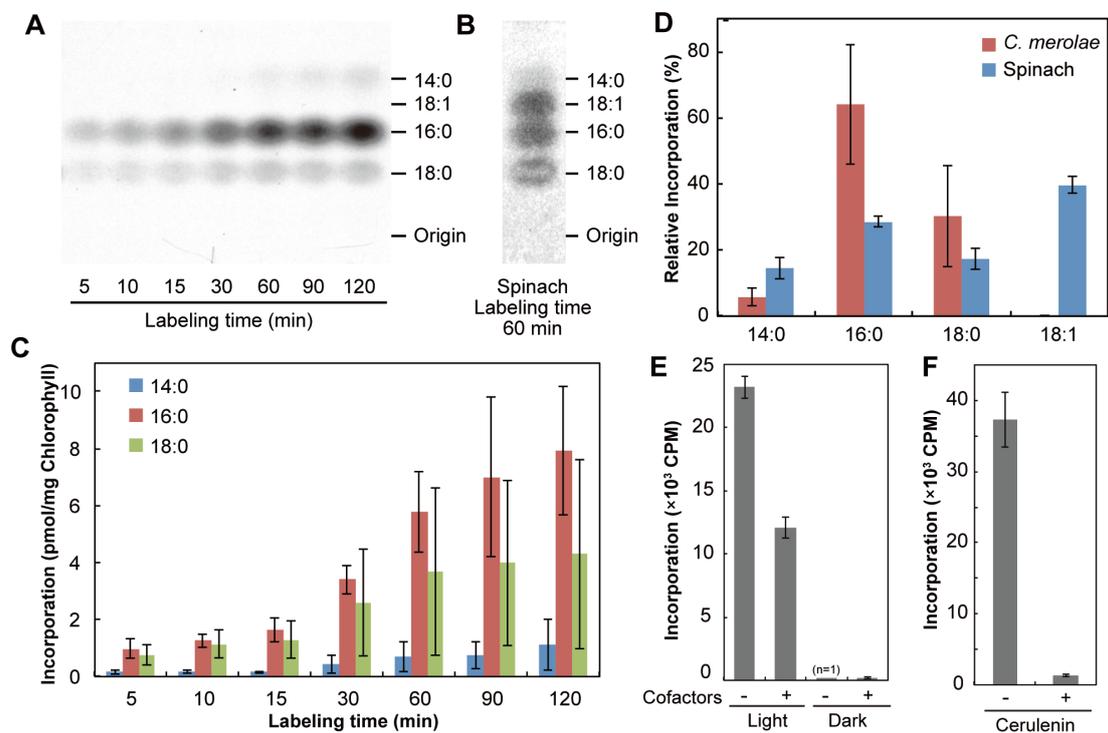


図 4.5 シアニジオシゾンとホウレンソウの単離葉緑体における脂肪酸への $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸の取り込みの比較

A と B は、RP-TLC によって FAME を分画した際のオートラジオグラムである。シアニジオシゾンの単離葉緑体 (A) では 5~120 分間、ホウレンソウの単離葉緑体 (B) では 60 分間、 $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸でラベルした。C はシアニジオシゾンの単離葉緑体について、反応時間ごとの脂肪酸へのラベルの取り込みを定量した結果を示す。D は、反応時間 60 分後の各脂肪酸へのラベルの取り込みをについて、シアニジオシゾンの単離葉緑体と、ホウレンソウの単離葉緑体で比較した結果を示す。さらに、シアニジオシゾンの単離葉緑体における脂肪酸へのラベルの取り込みに対する光の影響 (E) および阻害剤セルレニンの影響 (F) についても解析した。

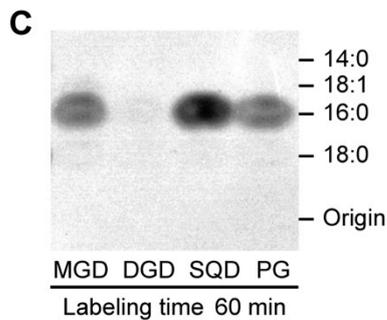
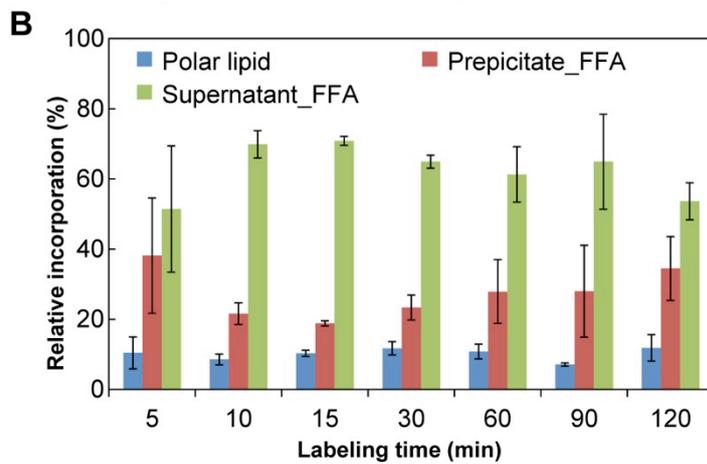
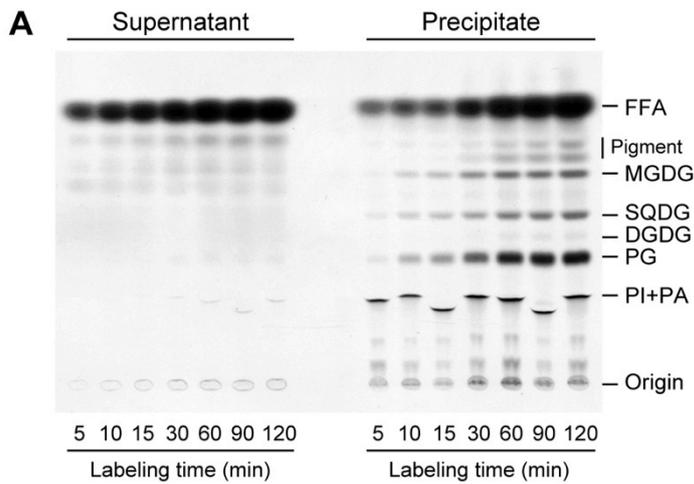


図 4.6 シアニジオシゾンの単離葉緑体における脂肪酸の輸送

シアニジオシゾンの単離葉緑体を $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸でラベルした後、軽く遠心して上清画分と沈殿画分に分け、それぞれから脂質を抽出した。Aは抽出した脂質をTLCで分画した際のオートラジオグラムを示す。Bは、上清画分または沈殿画分の遊離脂肪酸と、沈殿画分の極性脂質へのラベルの取り込みを定量した結果を示す。また、葉緑体脂質における脂肪酸へのラベルの取り込みを調べるために、TLCによって分画した葉緑体脂質から調製したFAMEについても、RP-TLCを用いて分画し、オートラジオグラフィーを行った (C)。

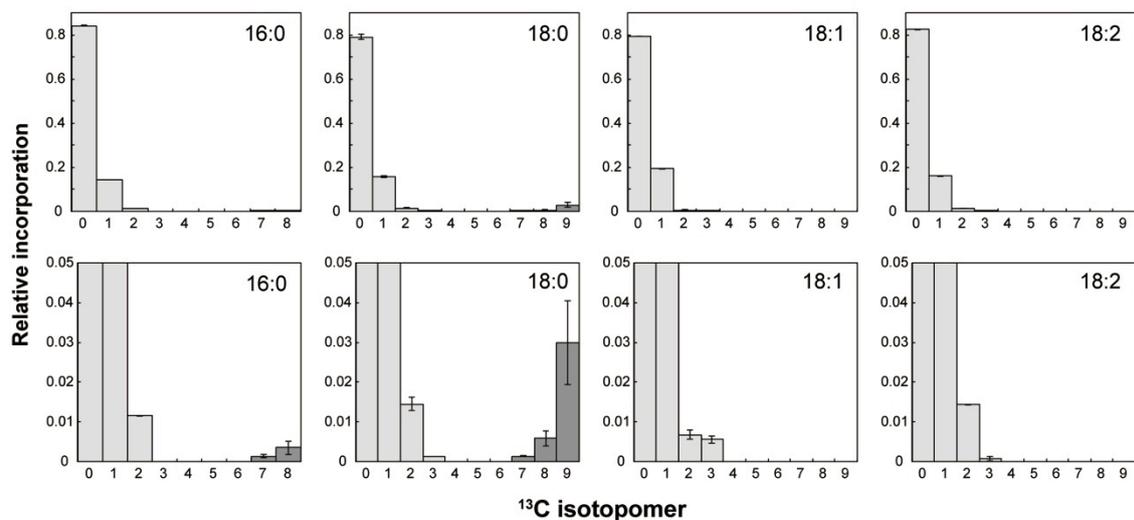


図 4.7 単離葉緑体における脂肪酸への $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムの取り込み

シアニジオシソンの単離葉緑体における各脂肪酸への $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸の取り込みを定量した。薄いグレーの部分は $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸によってラベルされていない脂肪酸の割合を、濃いグレーの部分はラベルされた脂肪酸の割合をそれぞれ示す。上段のグラフと下段のグラフは同じサンプルの測定結果を示し、下段のグラフは、上段のグラフを拡大したものを示す。

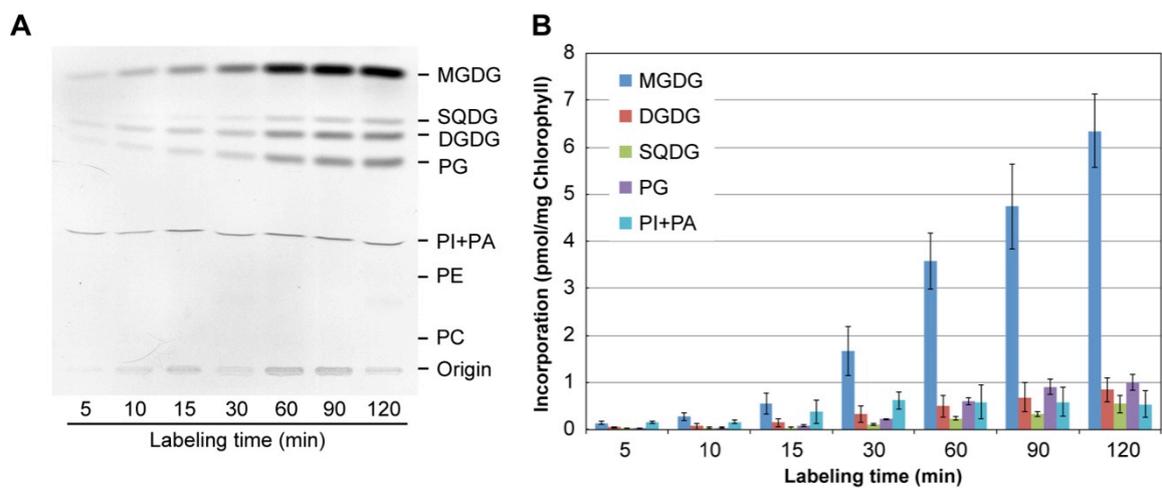


図 4.8 シアニジオシゾンの単離葉緑体における ^{14}C 炭酸水素ナトリウムの取り込み

Aは、 ^{14}C 炭酸水素ナトリウムでラベルした脂質をTLCで分画した際のオートラジオグラムを示す。Bは極性脂質へのラベルの取り込みを定量した結果を示す。

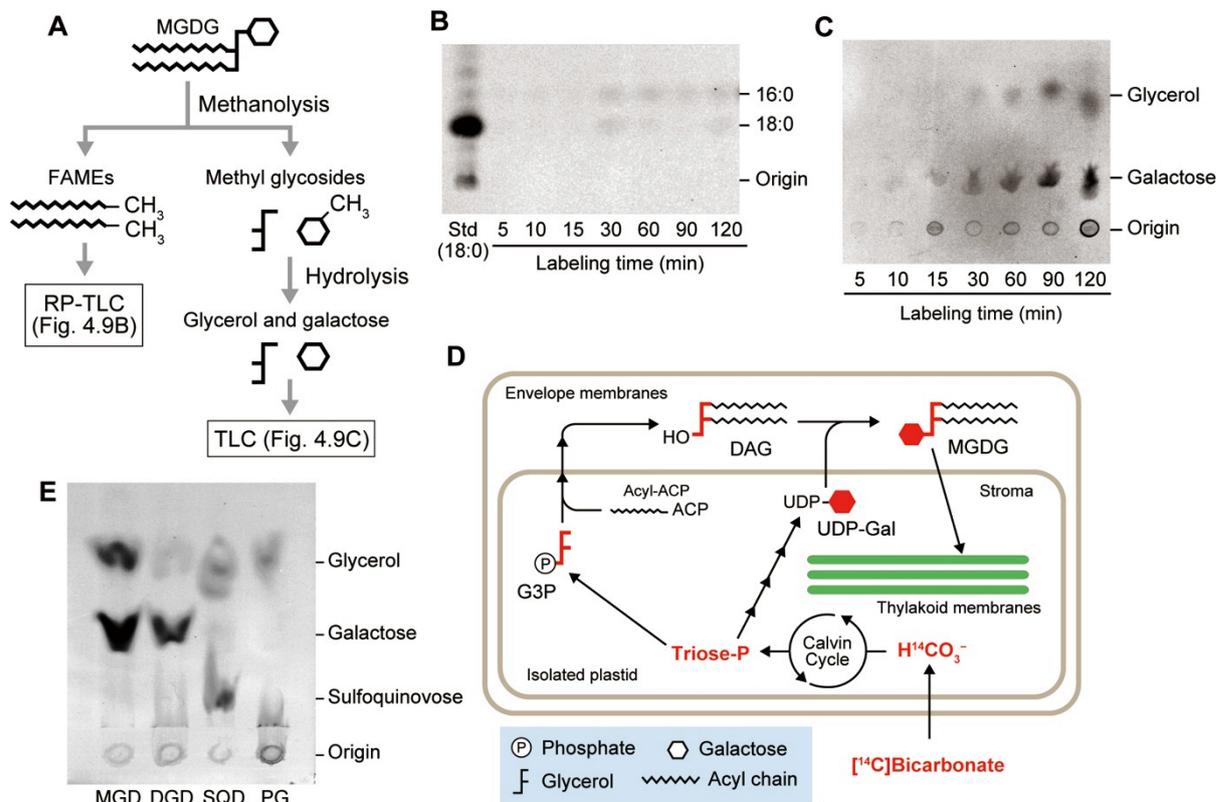


図 4.9 MGDG への¹⁴C炭酸水素ナトリウムラベルの取り込み

A は、MGDG の極性基部分と非極性基部分の分離方法の模式図である。このようにして分離させた非極性基部分 (B) と極性基部分 (C) は、TLC または RP-TLC によって分離した後、オートラジオグラフィーによって放射能を検出した。D は、¹⁴C炭酸水素ナトリウムから MGDG の極性基部分へのラベルの取り込みをまとめた代謝経路図を示す。代謝経路図において、赤は¹⁴C炭酸水素ナトリウムによってラベルされたことを示す。単離葉緑体に取り込まれた¹⁴C炭酸水素ナトリウムは、まずカルビンベンソン回路に取り込まれてトリオースリン酸へ代謝される。その後、ラベルされたトリオースリン酸が葉緑体内部で G3P や UDP-ガラクトースへ代謝されることで、最終的に MGDG の極性基部分にラベルが取り込まれたと思われる。また A の方法を用いて、その他の葉緑体脂質についても極性基部分へのラベルの取り込みを確認した (E)。MGD, モノガラクトシルジアシルグリセロール ; DGD, ジガラクトシルジアシルグリセロール ; SQD, スルホキノボシルジアシルグリセロール ; PG, ホスファチジルグリセロール

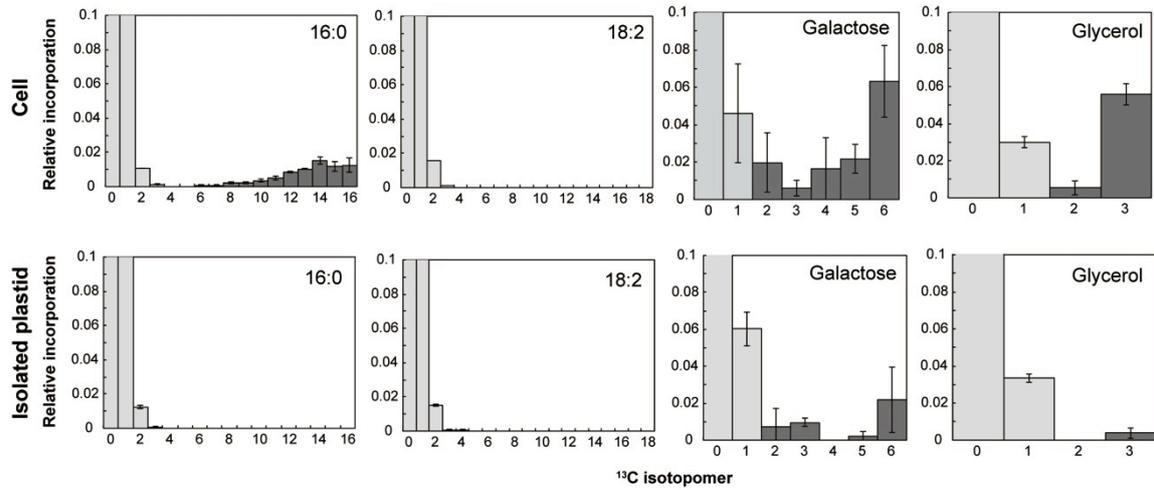


図 4.10 ^{13}C 炭酸水素ナトリウムの MGDG へのラベルの取り込み

単離葉緑体またはシアニジオシゾン細胞における MGDG への ^{13}C 炭酸水素ナトリウムのラベルの取り込みを定量した。上段はシアニジオシゾン細胞を、下段は単離葉緑体を用いた解析での結果を示す。薄いグレーの部分は ^{13}C 炭酸水素ナトリウムによってラベルされていない産物の割合を、濃いグレーの部分はラベルされた産物の割合をそれぞれ示す。

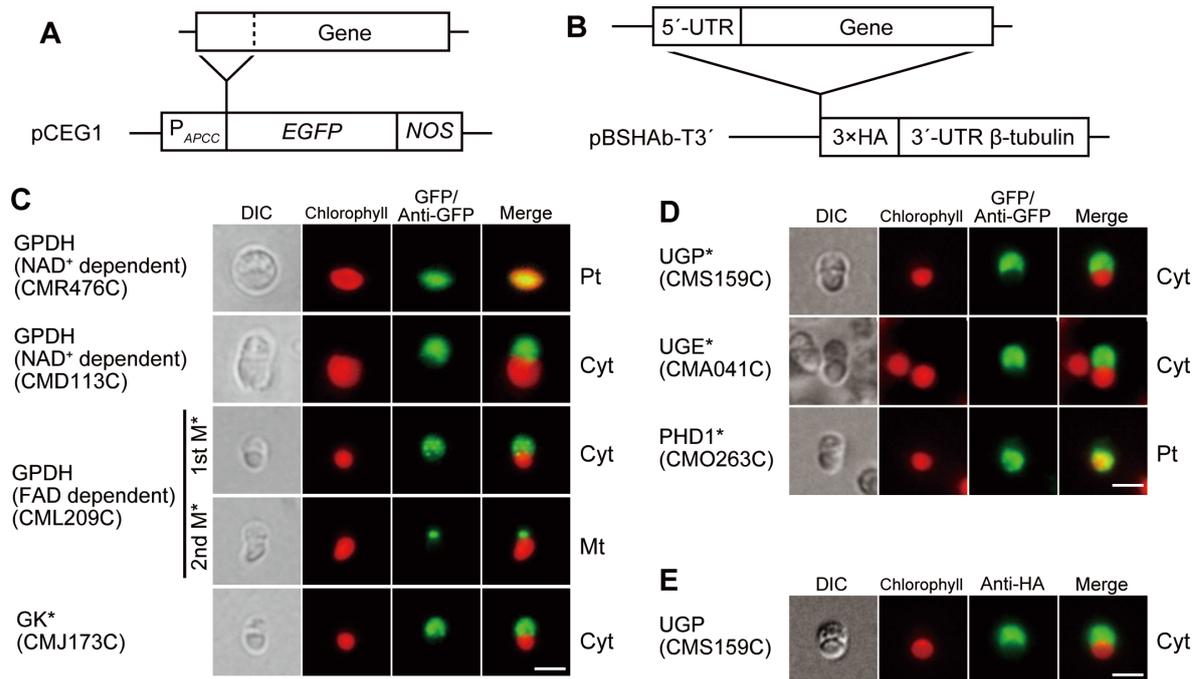


図 4.11 G3P (C) および UDP-ガラクトース (D, E) の合成に関わる酵素の細胞内局在解析

解析候補酵素の *N* 末端延長配列部分を GFP に付加したコンストラクト (A) を作製し、G3P や UDP-ガラクトースの合成に関わる酵素の細胞内局在を解析した。C は G3P 合成に関わる酵素の解析結果を、D は UDP-ガラクトース合成に関わる酵素の解析結果をそれぞれ示す。アスタリスクは免疫染色によって観察したものを示す。また CMS159C については、5' 末端の非翻訳領域と翻訳領域を挿入した 3×HA タグコンストラクト (B) を作製し、局在解析に使用した (E)。酵素名は表 4.3 を参照。バーの長さは 2 μm である。略語：3×HA, 3×HA タグ；5'-UTR, 5'末端非翻訳領域；EGFP, EGFP 遺伝子；NOS, NOS ターミネーター；P_{APCC}, APCC プロモーター；TP, *N* 末端延長配列 (シグナル配列)。

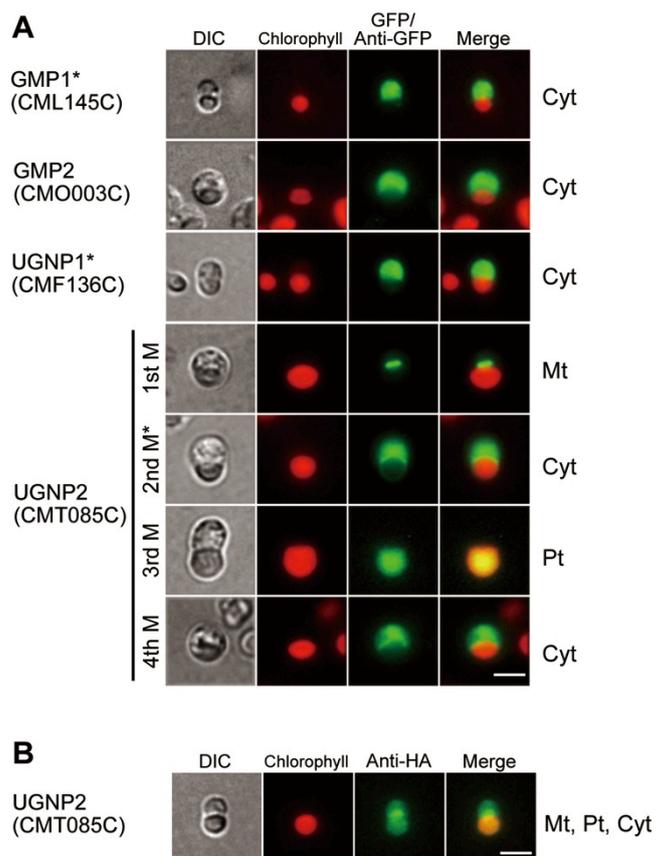


図 4.12 糖ヌクレオチド合成酵素の細胞内局在解析

GFP を用いて糖ヌクレオチド合成に関わる酵素の細胞内局在を解析した (A)。アスタリスクは免疫染色によって観察したものを示す。また、CMT085C については 5'末端の非翻訳領域と翻訳領域を挿入した 3×HA タグコンストラクト (図 4.11B) を作製し、局在解析に使用した (B)。酵素名は表 4.3 を参照。バーの長さは 2 μm である。

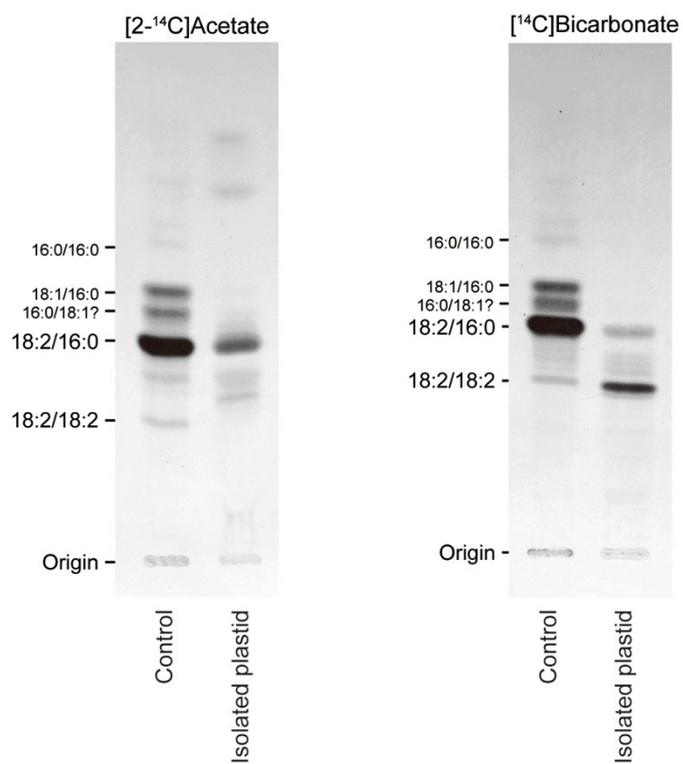


図 4.13 MGDG の各分子種におけるラベルの取り込み

[2-¹⁴C]酢酸および[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムでラベルした MGDG について硝酸銀 TLC により各分子種に分画した際のオートラジオグラフィーを示す。コントロールは[2-¹⁴C]酢酸により 1 時間ラベルしたシアニジオシゾン細胞より精製した MGDG を使用した。

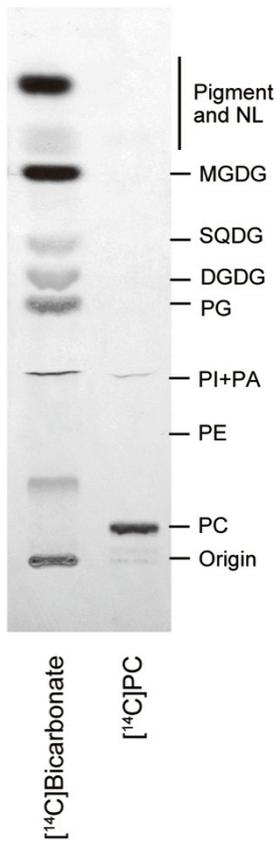


図 4.14 $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ を用いた単離葉緑体におけるラベルの取り込み

単離葉緑体を $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムまたは $[^{14}\text{C}]\text{PC}$ によってラベルした際のオートラジオグラムを示す。 $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素ナトリウムはポジティブコントロールとして行った。

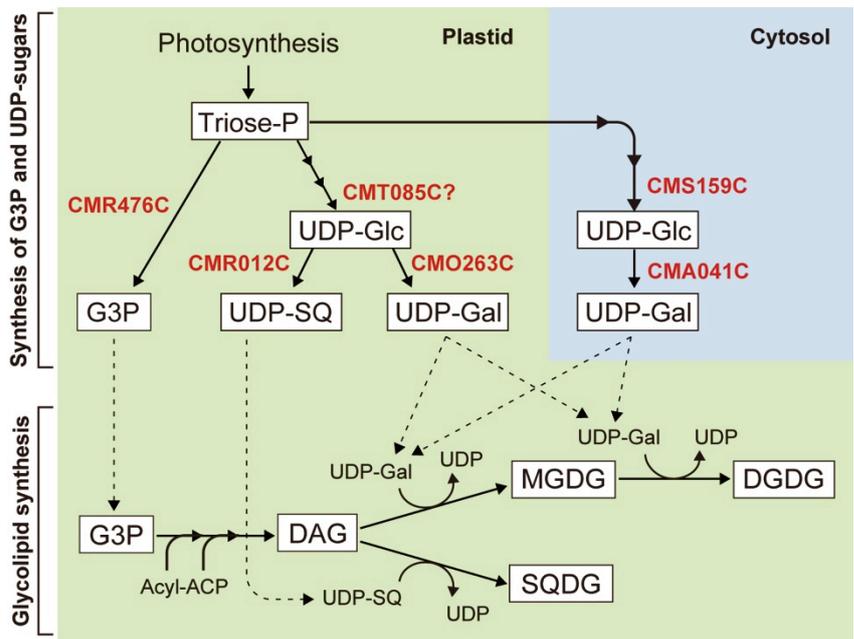


図 4.15 シアニジオシゾンにおける G3P および UDP-ガラクトースの合成

上段は G3P および糖ヌクレオチドの合成を、下段は糖脂質の合成をそれぞれ示す。緑は葉緑体で、青はサイトゾルでの反応を示す。略語：ACP, アシルキャリアータンパク質；DAG, ジアシルグリセロール；DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール；G3P, グリセロール 3-リン酸；MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール；SAD, ステアロイル-ACP 不飽和化酵素；SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール；Triose-P, トリオースリン酸 UDP-Gal, UDP-ガラクトース；UDP-Glc, UDP-グルコース；UDP-SQ, UDP-スルホキノボース

第5章 総括

本研究では、紅藻の脂質代謝についての特徴を明らかにするために、単細胞紅藻シアニジオシゾンを用いた解析を行った。第 2 章では、シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素を比較ゲノム解析によって探索し、さらにそれらの細胞内局在について網羅的な解析を行った。その結果、シアニジオシゾンは陸上植物と同様に、脂肪酸や葉緑体脂質の合成は葉緑体で、リン脂質や TAG の合成は小胞体で行われていることが示唆され、このことから、シアニジオシゾンの脂質代謝における各オルガネラの役割は、陸上植物と同様であることが示唆された。しかし、シアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素の数は、陸上植物のものに比べて少なく、最小限の酵素群によって構成されたシンプルな脂質代謝系をもっていることが明らかになった。具体例としては、葉緑体脂肪酸合成の縮合酵素である KAS が 1 種類しか存在しない点や、PC の合成が PE メチル化経路によってのみ行われていることなどが挙げられる。この 2 点の特徴については、第 3 章での 5 種の紅藻における比較ゲノム解析の結果から、シアニジオシゾンの近縁種であるガルデリアや、海洋性紅藻のスサビノリ、チノリモ、ヤハズツノマタにも共通してみられることが明らかとなり、紅藻全般で共通した特徴であることが分かった。一方、 β 酸化については、シアニジオシゾンは陸上植物とは異なって 2 個の β 酸化経路をもっており、ミトコンドリアとサイトゾルにそれぞれ存在していることが示唆された。動物や陸上植物では、ペルオキシソームが β 酸化の行われる重要な場であるが、シアニジオシゾンの β 酸化関連酵素はペルオキシソームへの局在を示さなかった。しかし、これまで藻類においてサイトゾルで β 酸化が行われているという報告は

なく、この点については今後詳しい解析を行う必要があると思われる。

第3章で行った、シアニジオシゾンとその他の紅藻 (ガルデリア、スサビノリ、チノリモ、ヤハズツノマタ) における脂質代謝系の比較では、シアニジオシゾンが海洋性紅藻の脂質代謝における特徴を有していることが明らかとなった。先行研究で行われたチノリモの放射性ラベルによる代謝フロー解析 (Khozin et al. 1997) からは、チノリモのガラクト脂質合成が、シアニジオシゾンの ‘Coupled pathway’ に類似していることが判明した。シアニジオシゾンは多価不飽和脂肪酸をもたないため、これらの脂肪酸の合成についての解析には向かないが、そのシンプルな脂肪酸組成は代謝フロー解析の面からみるとメリットとなる。したがって、シアニジオシゾンは紅藻の脂質代謝におけるモデル生物として適した紅藻であることが明らかとなった。

そこで第4章では、シアニジオシゾンの葉緑体における脂質代謝について実証的な解析を行うために、単離葉緑体における放射性ラベルを用いた代謝フロー解析を行った。このような解析はこれまで他の紅藻では行われておらず、本研究が初の試みである。単離葉緑体を[2-¹⁴C]酢酸を用いてラベルすると、ハウレンソウの場合とは異なって、飽和脂肪酸のみラベルが取り込まれていた。このことから、シアニジオシゾンの葉緑体における脂肪酸合成の主な産物は、16:0 や 18:0 などの飽和脂肪酸であることが、実験的に確認された。また、MGDG や DGDG、SQDG、PG の合成活性についても、単離葉緑体から検出された。これらの結果は、第2章で報告したシアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素における細胞内局在解析において、脂肪酸や葉緑体脂質の合成に関わる酵素が葉緑体局在を示したという結果と一致している。また、[¹⁴C]炭酸水素ナトリウムを用いた代謝フロー解析では、MGDG の極性基部分にラベルが取り込まれていた。ハウレンソウの単離葉緑体では、[¹⁴C]炭酸水

素ナトリウムのラベルはガラクト脂質にはほとんど取り込まれないことが分かっている (Murphy and Leech 1981)。このことから、シアニジオシゾンでは陸上植物とは異なり、葉緑体内部で G3P や UDP-ガラクトースの合成経路が存在することが示唆された。シアニジオシゾンにおける UDP-ガラクトースの合成に関わる酵素について探索したところ、紅藻には葉緑体局在型 UDP-グルコースピロホスホリラーゼである *UGP3* のホモログが存在しておらず、このことから紅藻の葉緑体には新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼが存在する可能性が示唆された。本研究では、この新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼについて比較ゲノム解析によって検索し、それらの細胞内局在を実験的に解析した。その結果、その解析候補として UDP-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼをコードする *CMT085C* が見出された。しかし、*CMT085C* のホモログは他の紅藻には存在しないことから、この酵素は紅藻における *UGP3* の代替酵素ではない可能性が高いことが考えられ、結果的に紅藻に保存されていると思われる新規の UDP-グルコースピロホスホリラーゼを特定することはできなかった。

シアニジオシゾンおよびガルデリアなどのイデユコゴメ綱に属する紅藻は、高温・強酸性の極限的な環境に生息している。陸上植物や藻類では、低温環境下では不飽和脂肪酸量を増加させることで、膜の安定化を保っていると考えられている。シアニジオシゾンでは二重結合が 3 つ以上の不飽和脂肪酸をもっていない。これはおそらく、シアニジオシゾンが高温の環境に適応したためであると考えられる。シアニジオシゾンなどのイデユコゴメ綱の紅藻は強酸性の温泉に生息しており、ガルデリアやシアニジウムでは、日本でもいくつかの株が単離されている。おそらく温泉は、海などに比べて急激な温度低下がない環境であることが予想され、このことからイデユコゴメ綱の紅藻は、スサビノリなどの海洋性

紅藻などがもつ高度に不飽和された脂肪酸が必要ではない環境で進化してきたため、多価不飽和脂肪酸をもっていないのではないかと考えられる。また、シアニジオシズンは、他の藻類にくらべて高温耐性が高いことから、タンパク質の結晶構造解析にも適した藻類であるといえる。最近では、シアニジオシズンの光化学系 I の結晶構造が解析されており、シアノバクテリアにみられる特徴と陸上植物にみられる特徴の両方をもつことが報告されている (Antoshvili et al. 2018)。紅藻の脂質代謝において、特徴的な酵素 (シアノバクテリア型 DGDG 合成酵素、陸上植物にはみられないホスファチジルエタノールアミンメチルトランスフェラーゼ、および不飽和化酵素など) について、結晶構造解析を行うことで、光化学系 I のような紅藻に特有の特徴が見出されることで、紅藻の脂質代謝の進化について理解を深めることができるのではないかとと思われる。

また、紅藻の脂質代謝において特徴的な酵素として葉緑体局在型 G3P アシルトランスフェラーゼ (GPAT) が挙げられる。この酵素は ‘Coupled pathway’ において、小胞体から供給される不飽和脂肪酸を G3P に付加する酵素である。つまり、シアニジオシズンでは 18:2-ACP を、チノリモでは 20:4-ACP を G3P に付加する。通常、陸上植物や緑藻では、葉緑体局在の GPAT は 18:1-ACP に高い基質特異性を示すと考えられている。しかし、本研究の第 4 章で行った単離葉緑体を用いた代謝フロー解析では、[2-¹⁴C]酢酸を用いてラベルした MGDG の主な分子種は 18:2/16:0-MGDG であった (図 4.13)。この解析で検出された 18:2/16:0-MGDG は、新規に合成された [¹⁴C]16:0 と、既に葉緑体に存在していた 18:2 から合成されたと考えられる。このことから、シアニジオシズンでは、葉緑体に局在する GPAT および 2 段階目のアシル化を触媒する LPA アシルトランスフェラーゼ (LPAT) の基質特異性が非常に厳密であることが予想される。これらのことから、紅藻における ‘Coupled

pathway’の分子生物学的な仕組みを明らかにするためには、シアニジオシゾンやチノリモなどのもつアシルトランスフェラーゼの基質特異性などの酵素学的な特徴を明らかにする必要があると思われる。

本研究では、比較ゲノム解析や細胞内局在解析を用いてシアニジオシゾンの脂質代謝関連酵素における基礎的なデータをまとめ、海洋性紅藻における脂質代謝の特徴と比較することで、シアニジオシゾンは紅藻の脂質代謝の解析において有用なモデル生物であることを示した。さらに実証的な解析として、シアニジオシゾンの単離葉緑体を用いた代謝フロー解析を行った。その結果、シアニジオシゾンは陸上植物と異なり、葉緑体脂肪酸合成系の産物が飽和脂肪酸のみであることを実証することができた。また、ガラクト脂質の前駆体であるUDP-ガラクトースを合成する経路が葉緑体内部にも存在する可能性が示唆された。本研究のようなシアニジオシゾンを用いた解析は、紅藻全般における脂質代謝の解明や、ケイ藻などの二次共生藻における葉緑体の脂質代謝についての理解にもつながると思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導と適切な助言を頂きました佐藤直樹教授に心から感謝申し上げます。森山崇博士をはじめ佐藤研究室の皆様からもご尽力を頂きました。感謝申し上げます。特に森山博士には、形質転換法や葉緑体単離法など、シアニジオキシゾンにおける様々な実験手法について細部にわたってご指導を頂きました。感謝の意を表します。

最後に、これまであたたかく見守ってくれた両親や祖父母に心より感謝致します。ありがとうございました。

参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Andriotis VME, Kruger NJ, Pike MJ, Smith AM (2010) Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytol* 185:649–662
- Antoshvili M, Caspy I, Hippler M, Nelson N (2018) Structure and function of photosystem I in *Cyanidioschyzon merolae*. *Photosynth. Res.* 1–10
- Araki S, Sakurai T, Omata T, et al (1986) Lipid and fatty acid composition in the red alga *Porphyra yezoensis*. *Japanese J Phycol* 34:94–100
- Arent S, Christensen CE, Pye VE, et al (2010) The multifunctional protein in peroxisomal β -oxidation: Structure and substrate specificity of the *Arabidopsis thaliana* protein MFP2. *J Biol Chem* 285:24066–24077
- Awai K, Kakimoto T, Awai C, et al (2006a) Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol* 141:1120–1127
- Awai K, Maréchal E, Block M a, et al (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10960–10965
- Awai K, Ohta H, Sato N (2014) Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc Natl Acad Sci* 111:13571–13575
- Awai K, Xu C, Tamot B, Benning C (2006b) A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10817–10822
- Aymé L, Baud S, Dubreucq B, et al (2014) Function and localization of the *Arabidopsis thaliana* diacylglycerol acyltransferase DGAT2 expressed in yeast. *PLoS One* 9:e92237
- Babiychuk E, Müller F, Eubel H, et al (2003) *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J* 33:899–909
- Bach L, Michaelson L V, Haslam R, et al (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14727–14731
- Barber C, Rösti J, Rawat A, et al (2006) Distinct properties of the five UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 281:17276–17285
- Bates PD, Browse J (2011) The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds. *Plant J* 68:387–399
- Bates PD, Stymne S, Ohlrogge J (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr Opin Plant Biol* 16:358–364

- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, et al (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:351–368
- Bhattacharya D, Price DC, Chan CX, et al (2013) Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat Commun* 4:
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochem Cell Biol* 37:911–917
- Bolognese CP, McGraw P (2000) The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine *N*-methyltransferase. *Plant Physiol* 124:1800–1813
- Botella C, Sautron E, Boudière L, et al (2015) ALA10, a phospholipid flippase, controls FAD2/FAD3 desaturation of phosphatidylcholine in the ER, and affects chloroplast lipid composition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 170:pp.15.01557-
- Bouvier-Navé P, Benveniste P, Oelkers P, et al (2000) Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur J Biochem* 267:85–96
- Browse J, McConn M, James D, Miquel M (1993) Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of α -linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J Biol Chem* 268:16345–16351
- Camacho L, Smertenko AP, Pérez-Gómez J, et al (2009) *Arabidopsis* Rab-E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Cell Sci* 122:4383–4392
- Cao Z, Zhang J, Li Y, et al (2007) Preparation of polyclonal antibody specific for AtPLC4, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol-specific phospholipase C in rabbits. *Protein Expr Purif* 52:306–312
- Carrie C, Murcha MW, Millar AH, et al (2007) Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Mol Biol* 63:97–108
- Cases S, Smith SJ, Zheng YW, et al (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13018–13023
- Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* 53:215–226
- Chen HH, Wickrema A, Jaworski JG (1988) Acyl-acyl-carrier protein: lysomonogalactosyldiacylglycerol acyltransferase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 963:493–500
- Chen M, Thelen JJ (2013) *ACYL-LIPID DESATURASE2* is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1430–44
- Choi YH, Lee JK, Lee CH, Cho SH (2000) cDNA cloning and expression of an aminoalcoholphosphotransferase isoform in Chinese cabbage. *Plant Cell Physiol* 41:1080–1084
- Chrost B, Kolukisaoglu U, Schulz B, Krupinska K (2007) An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta* 225:311–320
- Clough RC, Matthis AL, Barnum SR, Jaworski JG (1992) Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-coenzyme A to initiate fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 267:20992–20998

- Collén J, Porcel B, Carré W, et al (2013) Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5247–52
- Collin S, Justin AM, Cantrel C, et al (1999) Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from *Arabidopsis*. *Eur J Biochem* 262:652–658
- Da Costa M, Bach L, Landrieu I, et al (2006) *Arabidopsis* PASTICCINO2 is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. *Plant Cell* 18:1426–1437
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, et al (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6487–6492
- Däschner K, Couée I, Binder S (2001) The mitochondrial isovaleryl-coenzyme a dehydrogenase of *Arabidopsis* oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism. *Plant Physiol* 126:601–612
- Daza LM, Donaire JP (1982) Lipid biosynthesis by chloroplasts from olive tree leaves. *Physiol Plant* 54:207–212
- Decker D, Kleczkowski LA (2017) Substrate Specificity and Inhibitor Sensitivity of Plant UDP-Sugar Producing Pyrophosphorylases. *Front Plant Sci* 8:1610
- Dewey RE, Wilson RF, Novitzky WP, Goode JH (1994) The *AAPT1* gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. *Plant Cell* 6:1495–1507
- Dörmann P, Balbo I, Benning C (1999) *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284:2181–2184
- Dörmann P, Benning C (1998) The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. *Plant J* 13:641–652
- Douce R, Joyard J (1982) Purification of the chloroplast envelope. In: *Methods in chloroplast molecular biology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 239–256
- Drapier D, Dubacq J-P, Trémolières A, Mazliak P (1982) Cooperative Pathway for Lipid Biosynthesis in Young Pea Leaves: Oleate Exportation from Chloroplasts and Subsequent Integration into Complex Lipids of Added Microsomes. *Plant Cell Physiol* 23:125–135
- Eastmond PJ (2006) *SUGAR-DEPENDENT1* encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 18:665–675
- Eastmond PJ, Hooks MA, Williams D, et al (2000) Promoter trapping of a novel medium-chain acyl-CoA oxidase, which is induced transcriptionally during *Arabidopsis* seed germination. *J Biol Chem* 275:34375–34381
- Eastmond PJ, Quettier A-L, Kroon JTM, et al (2010) PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22:2796–2811
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J* 320 (Pt 2):345–357
- Eichenberger W, Boschetti A (1978) Occurrence of 1(3),2-diacylglycerol-(3)-O⁴-(*N,N,N*-trimethyl)-homoserine in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 88:201–204
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005–1016

- Essigmann B, Güler S, Narang R a, et al (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1950–1955
- Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, et al (2008) Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of *Arabidopsis* cell culture peroxisomes. *Plant Physiol* 148:1809–1829
- Falcone DL, Gibson S, Lemieux B, Somerville C (1994) Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast $\omega 6$ desaturase activity. *Plant Physiol* 106:1453–1459
- Fan J, Zhai Z, Yan C, Xu C (2015) *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 Interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to Facilitate Lipid Transfer from the Endoplasmic Reticulum to Plastids. *Plant Cell* 27:tpc.15.00394
- Finn RD, Bateman A, Clements J, et al (2014) Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:222–230
- Frentzen M, Griebau R (1994) Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* 106:1527–1532
- Froman BE, Edwards PC, Bursch a G, Dehesh K (2000) ACX3, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 123:733–742
- Fulda M, Shockey J, Werber M, et al (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant J* 32:93–103
- Gao J, Ajjawi I, Manoli A, et al (2009) FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant J* 60:832–839
- Germain V, Rylott EL, Larson TR, et al (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid β -oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 28:1–12
- Ghosh AK, Chauhan N, Rajakumari S, et al (2009) At4g24160, a soluble acyl-coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiol* 151:869–881
- Gidda SK, Shockey JM, Rothstein SJ, et al (2009) *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: Functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol Biochem* 47:867–879
- Goepfert S, Hiltunen JK, Poirier Y (2006) Identification and functional characterization of a monofunctional peroxisomal enoyl-CoA hydratase 2 that participates in the degradation of even *cis*-unsaturated fatty acids in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 281:35894–35903
- Goepfert S, Vidoudez C, Rezzonico E, et al (2005) Molecular identification and characterization of the *Arabidopsis* $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-coenzyme A isomerase, a peroxisomal enzyme participating in the β -oxidation cycle of unsaturated fatty acids. *Plant Physiol* 138:1947–1956
- Goepfert S, Vidoudez C, Tellgren-Roth C, et al (2008) Peroxisomal Δ^3, Δ^2 -enoyl CoA isomerases and evolution of cytosolic paralogues in embryophytes. *Plant J* 56:728–742
- Gomès E, Jakobsen MK, Axelsen KB, et al (2000) Chilling tolerance in *Arabidopsis* involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* 12:2441–2454
- Graham IA, Eastmond PJ (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog Lipid Res* 41:156–181
- Griebau R, Fretzen M (1994) Biosynthesis of Phosphatidylglycerol in Isolated Mitochondria of Etiolated

- Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Seedlings. *Plant Physiol* 105:1269–1274
- Gross W (1989) Intracellular Localization of Enzymes of Fatty Acid- β -Oxidation in the Alga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiol* 91:1476–1480
- Gross W, Winkler U, Stabenau H (1985) Characterization of Peroxisomes from the Alga *Bumilleriopsis filiformis*. *Plant Physiol* 77:296–299
- Guan X, Okazaki Y, Lithio A, et al (2017) Discovery and Characterization of the 3-Hydroxyacyl-ACP Dehydratase Component of the Plant Mitochondrial Fatty Acid Synthase System. *Plant Physiol* 173:2010–2028
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, et al (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol Chem* 275:5016–5025
- Hagio M, Gombos Z, Várkonyi Z, et al (2000) Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol* 124:795–804
- Haselier A, Akbari H, Weth A, et al (2010) Two closely related genes of Arabidopsis encode plastidial cytidinediphosphate diacylglycerol synthases essential for photoautotrophic growth. *Plant Physiol* 153:1372–1384
- Haslam TM, Haslam R, Thoraval D, et al (2015) ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Physiol* 167:682–692
- Haslam TM, Kunst L (2013) Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci* 210:93–107
- Haslam TM, Manas-Fernandez A, Zhao L, Kunst L (2012) Arabidopsis ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths. *Plant Physiol* 160:1164–1174
- Hayashi H, De Bellis L, Ciurli A, et al (1999) A novel acyl-CoA oxidase that can oxidize short-chain acyl-CoA in plant peroxisomes. *J Biol Chem* 274:12715–12721
- Heemskerk JW, Bögemann G, Scheijen M a, Wintermans JF (1986) Separation of chloroplast polar lipids and measurement of galactolipid metabolism by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 154:85–91
- Heemskerk JW, Schmidt H, Hammer U, Heinz E (1991) Biosynthesis and desaturation of prokaryotic galactolipids in leaves and isolated chloroplasts from spinach. *Plant Physiol* 96:144–52
- Hernandez ML, Whitehead L, He Z, et al (2012) A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued Arabidopsis seed oil catabolism mutants. *Plant Physiol* 160:215–225
- Hirano T, Sato MH (2011) Arabidopsis *FABIA/B* is possibly involved in the recycling of auxin transporters. *Plant Signal Behav* 6:583–585
- Hirashima T, Tajima N, Sato N (2016) Draft Genome Sequences of Four Species of *Chlamydomonas*. *Genome Announc* 4:4–5
- Hirashima T, Toyoshima M, Moriyama T, et al (2017) Characterization of phosphoethanolamine-*N*-methyltransferases in green algae. *Biochem Biophys Res Commun* 488:141–146
- Hobbs DH, Lu C, Hills MJ (1999) Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Lett* 452:145–149

- Hong Y, Devaiah SP, Bahn SC, et al (2009) Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth. *Plant J* 58:376–387
- Hooks M a., Kellas F, Graham I a. (1999) Long-chain acyl-CoA oxidases of *Arabidopsis*. *Plant J* 20:1–13
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, et al (2007) WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35:W585–587
- Hung C-H, Kobayashi K, Wada H, Nakamura Y (2015) Isolation and characterization of a phosphatidylglycerophosphate phosphatase1, PGPP1, in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol Biochem* 92:56–61
- Imamura S, Kawase Y, Kobayashi I, et al (2015) Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae. *Plant Mol Biol* 89:309–318
- Imoto Y, Kuroiwa H, Yoshida Y, et al (2013) Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery. *Proc Natl Acad Sci* 110:9583–9588
- Inatsugi R, Nakamura M, Nishida I (2002) Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43:1342–1350
- Ischebeck T, Stenzel I, Heilmann I (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate *Arabidopsis* and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *Plant Cell* 20:3312–3330
- Itoh R, Toda K, Takahashi H, et al (1998) Delta-9 fatty acid desaturase gene containing a carboxyl-terminal cytochrome b5 domain from the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Curr Genet* 33:165–170
- Iwai M, Ikeda K, Shimojima M, Ohta H (2014) Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnol J* 12:808–819
- Jain K, Krause K, Grewe F, et al (2014) Extreme features of the *Galdieria sulphuraria* organellar genomes: A consequence of polyextremophily. *Genome Biol Evol* 7:367–380
- Jakab G, Manrique A, Zimmerli L, et al (2007) Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132:2230–2239
- Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, et al (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol Biol* 67:547–566
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, et al (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 49:128–158
- Jung J, Kumar K, Lee HY, et al (2012) Translocation of phospholipase A $_{2\alpha}$ to apoplasts is modulated by developmental stages and bacterial infection in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 3:126
- Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, et al (2007) The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol Biol* 63:257–271
- Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, et al (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43:107–117
- Katayama K, Sakurai I, Wada H (2004) Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Lett* 577:193–198
- Kato T, Morita MT, Fukaki H, et al (2002) SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a

- SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:33–46
- Kelly A a., Dörmann P (2002) *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* 277:1166–1173
- Keogh MR, Courtney PD, Kinney AJ, Dewey RE (2009) Functional characterization of Phospholipid N-methyltransferases from *Arabidopsis* and soybean. *J Biol Chem* 284:15439–15447
- Khozin-Goldberg I, Yu HZ, Adlerstein D, et al (2000) Triacylglycerols of the red microalga *Porphyridium cruentum* can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids. *Lipids* 35:881–889
- Khozin I, Adlerstein D, Bigongo C, et al (1997) Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum* II. Studies with radiolabeled precursors. *Plant Physiol* 114:223–230
- Kim EY, Seo YS, Kim WT (2011a) AtDSEL, an *Arabidopsis* cytosolic DAD1-like acylhydrolase, is involved in negative regulation of storage oil mobilization during seedling establishment. *J Plant Physiol* 168:1705–1709
- Kim HJ, Ok SH, Bahn SC, et al (2011b) Endoplasmic reticulum- and Golgi-localized phospholipase A₂ plays critical roles in *Arabidopsis* pollen development and germination. *Plant Cell* 23:94–110
- Kim HU, Huang AHC (2004) Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1206–1216
- Kim HU, Li Y, Huang AHC (2005) Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1073–1089
- Kim J, Jung JH, Lee SB, et al (2013) *Arabidopsis* 3-ketoacyl-coenzyme a synthase9 is involved in the synthesis of tetracosanoic acids as precursors of cuticular waxes, suberins, sphingolipids, and phospholipids. *Plant Physiol* 162:567–80
- Klug L, Daum G (2014) Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res* 14:369–388
- Kobayashi K (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129:565–580
- Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H (2004) *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* 134:640–648
- Kong F, Sun P, Cao M, et al (2014) Complete mitochondrial genome of *Pyropia yezoensis* : reasserting the revision of genus *Porphyra*. *Mitochondrial DNA* 25:335–336
- Konishi T, Shinohara K, Yamada K, Sasaki Y (1996) Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol* 37:117–122
- Kopka J, Ludewig M, Müller-Röber B (1997) Complementary DNAs encoding eukaryotic-type cytidine-5'-diphosphate-diacylglycerol synthases of two plant species. *Plant Physiol* 113:997–1002
- Kuo J, Khosla C (2014) The initiation ketosynthase (FabH) is the sole rate-limiting enzyme of the fatty acid synthase of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Metab Eng* 22:53–59
- Kuroiwa T (1998) The primitive red algae *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae* as model system for investigating the dividing apparatus of mitochondria and plastids. *BioEssays* 20:344–

- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, et al (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:810–825
- Larkin M a., Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948
- Leblanc C, Boyen C, Loiseaux-De Goër S (1995a) Organisation of the plastid genome from the rhodophyte *Chondrus crispus* (Gigartinales); sequence and phylogeny of the 16S rRNA gene. *Eur J Phycol* 30:133–140
- Leblanc C, Boyen C, Richard O, et al (1995b) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the rhodophyte *Chondrus crispus* (Gigartinales). Gene content and genome organization. *J Mol Biol* 250:484–495
- Lee CP, Eubel H, O'Toole N, Millar a H (2008) Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic *Arabidopsis* metabolism. *Mol Cell Proteomics* 7:1297–1316
- Lee Y, Kim YW, Jeon BW, et al (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J* 52:803–816
- Lem NW, Stumpf PK (1984) *In vitro* fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: I. Some characteristics of fatty acid synthesis. *Plant Physiol* 74:134–138
- Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W (2015) Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 82:504–522
- Li C, Wang Y, Liu L, et al (2011a) A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency. *PLoS Genet* 7:e1002196
- Li M, Bahn SC, Guo L, et al (2011b) Patatin-related phospholipase pPLAIII β -induced changes in lipid metabolism alter cellulose content and cell elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1107–1123
- Li N, Gügel IL, Giavalisco P, et al (2015) FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol* 13:e1002053
- Li X, Benning C, Kuo MH (2012a) Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity. *Eukaryot Cell* 11:1451–1462
- Li X, Moellering ER, Liu B, et al (2012b) A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24:4670–4686
- Li Y, Beisson F, Koo AJK, et al (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18339–18344
- Lin Y-C, Kobayashi K, Hung C-H, et al (2016) *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate phosphatase 1 involved in phosphatidylglycerol biosynthesis and photosynthetic function. *Plant J* 88:1022–1037
- Lin Y-C, Liu Y, Nakamura Y (2015) The Choline/Ethanolamine Kinase Family in *Arabidopsis*: Essential Role of CEK4 in Phospholipid Biosynthesis and Embryo Development. *Plant Cell* 27:1497–1511
- Lingner T, Kataya AR, Antonicelli GE, et al (2011) Identification of novel plant peroxisomal targeting signals by a combination of machine learning methods and in vivo subcellular targeting analyses. *Plant Cell* 23:1556–1572
- Lo M, Taylor C, Wang L, et al (2004) Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in *Arabidopsis*.

- Löfke C, Ischebeck T, König S, et al (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 413:115–124
- López-Marqués RL, Poulsen LR, Hanisch S, et al (2010) Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P₄-ATPase complex reside in the catalytic ALA α -subunit. *Mol Biol Cell* 21:791–801
- López-Marqués RL, Poulsen LR, Palmgren MG (2012) A putative plant aminophospholipid flippase, the arabidopsis P₄ ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a β -subunit. *PLoS One* 7:e33042
- Lu B, Benning C (2009) A 25-amino acid sequence of the *Arabidopsis* TGD2 protein is sufficient for specific binding of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 284:17420–17427
- Lu B, Xu C, Awai K, et al (2007) A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J Biol Chem* 282:35945–35953
- Lu C, Xin Z, Ren Z, et al (2009) An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18837–18842
- Maeda K, Narikawa R, Ikeuchi M (2014) CugP is a novel ubiquitous non-GalU-type bacterial UDP-glucose pyrophosphorylase found in cyanobacteria. *J Bacteriol* 196:2348–54
- Maida E, Awai K (2016) Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1861:1309–1314
- Marquardt TC, Wilson RF (1998) An improved reversed-phase thin-layer chromatography method for separation of fatty acid methyl esters. *J Am Oil Chem Soc* 75:1889–1892
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, et al (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653–657
- McCartney AW, Dyer JM, Dhanoa PK, et al (2004) Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J* 37:156–173
- Meng M, Wilczynska M, Kleczkowski LA (2008) Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1784:967–72
- Meyer EH, Heazlewood JL, Millar AH (2007) Mitochondrial acyl carrier proteins in *Arabidopsis thaliana* are predominantly soluble matrix proteins and none can be confirmed as subunits of respiratory Complex I. *Plant Mol Biol* 64:319–327
- Mikami K, Saavedra L, Hiwatashi Y, et al (2010) A dibasic amino acid pair conserved in the activation loop directs plasma membrane localization and is necessary for activity of plant type I/II phosphatidylinositol phosphate kinase. *Plant Physiol* 153:1004–1015
- Minoda A, Sakagami R, Yagisawa F, et al (2004) Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol* 45:667–671
- Misumi O, Matsuzaki M, Nozaki H, et al (2005) *Cyanidioschyzon merolae* genome. A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol* 137:567–585

- Miyagishima SY, Itoh R, Aita S, et al (1999) Isolation of dividing chloroplasts with intact plastid-dividing rings from a synchronous culture of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 209:371–375
- Mizoi J, Nakamura M, Nishida I (2006) Defects in CTP:PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3370–3385
- Moellering ER, Muthan B, Benning C (2010) Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 330:226–228
- Morita MT, Kato T, Nagafusa K, et al (2002) Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:47–56
- Moriyama T, Mori N, Sato N (2015) Activation of oxidative carbon metabolism by nutritional enrichment by photosynthesis and exogenous organic compounds in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: evidence for heterotrophic growth. *Springerplus* 4:559
- Moriyama T, Mori N, Sato N (2018) Carbon metabolism. In: Kuroiwa T, Miyagishima S, Matsunaga S, et al. (eds) *Cyanidioschyzon merolae*: a new model eukaryote for cell and organelle. Springer Singapore, Singapore, pp 297–321
- Moriyama T, Sakurai K, Sekine K, Sato N (2014) Subcellular distribution of central carbohydrate metabolism pathways in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 240:585–598
- Moriyama T, Terasawa K, Fujiwara M, Sato N (2008) Purification and characterization of organellar DNA polymerases in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS J* 275:2899–2918
- Moriyama T, Toyoshima M, Saito M, et al (2017) Revisiting the algal “chloroplast lipid droplet”: the absence of an entity that is unlikely to exist. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.17.01512
- Mou Z, He Y, Dai Y, et al (2000) Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* 12:405–418
- Müller F, Frentzen M (2001) Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 509:298–302
- Muñoz-Gómez SA, Mejía-Franco FG, Durnin K, et al (2017) The New Red Algal Subphylum Proteorhodophytina Comprises the Largest and Most Divergent Plastid Genomes Known. *Curr Biol* 27:1677–1684.e4
- Murphy DJ, Leech RM (1977) Lipid biosynthesis from [¹⁴C] bicarbonate, [2-¹⁴C] pyruvate and [1-¹⁴C] acetate during photosynthesis by isolated spinach chloroplasts. *FEBS Lett* 77:164–168
- Murphy DJ, Leech RM (1981) Photosynthesis of lipids from ¹⁴CO₂ in *Spinacia oleracea*. *Plant Physiol* 68:762–765
- Nakamura Y (2017) Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein-Lipid Interactions. *Trends Plant Sci* 22:1027–1040
- Nakamura Y, Andrés F, Kanehara K, et al (2014) *Arabidopsis* florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nat Commun* 5:4–8
- Nakamura Y, Awai K, Masuda T, et al (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280:7469–7476
- Nakamura Y, Koizumi R, Shui G, et al (2009) *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20978–20983

- Nakamura Y, Sasaki N, Kobayashi M, et al (2013) The First Symbiont-Free Genome Sequence of Marine Red Alga, *Susabi-nori* (*Pyropia yezoensis*). PLoS One 8:1–11
- Nakamura Y, Tsuchiya M, Ohta H (2007) Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin. J Biol Chem 282:29013–29021
- Nakamura Y, Yamada M (1974) Fatty acid synthesis by spinach chloroplasts I. Property of fatty acid synthesis from acetate. Plant Cell Physiol 16:139–149
- Nerlich A, von Orlow M, Rontein D, et al (2007) Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the *psd1 psd2 psd3* triple mutant of *Arabidopsis* affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. Plant Physiol 144:904–914
- Nishida I, Murata N (1996) CHILLING SENSITIVITY IN PLANTS AND CYANOBACTERIA: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:541–568
- Nishida I, Tasaka Y, Shiraishi H, Murata N (1993) The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 21:267–277
- Nowicki M, Müller F, Frentzen M (2005) Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 579:2161–2165
- Nozaki H, Takano H, Misumi O, et al (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. BMC Biol 5:28
- Nuccio ML, Ziemak MJ, Henry S a., et al (2000) cDNA cloning of phosphoethanolamine *N*-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. J Biol Chem 275:14095–14101
- Ohlrogge J (1995) Lipid Biosynthesis. Plant Cell Online 7:957–970
- Ohnuma M, Yokoyama T, Inouye T, et al (2008) Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. Plant Cell Physiol 49:117–120
- Ohnuma M, Yokoyama T, Inouye T, et al (2014) Optimization of polyethylene glycol (PEG)-mediated DNA introduction conditions for transient gene expression in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. J Gen Appl Microbiol 60:156–159
- Ohta N, Matsuzaki M, Misumi O, et al (2003) Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. DNA Res 10:67–77
- Ohta N, Sato N, Kuroiwa T (1998) Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. Nucleic Acids Res 26:5190–5198
- Okazaki K, Sato N, Tsuji N, et al (2006) The significance of C16 fatty acids in the *sn*-2 positions of glycerolipids in the photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. Plant Physiol 141:546–556
- Okazaki Y, Shimojima M, Sawada Y, et al (2009) A chloroplastic UDP-glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis* is the committed enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis. Plant Cell 21:892–909
- Okuley J, Lightner J, Feldmann K, et al (1994) *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. Plant Cell 6:147–158
- Park JI, Ishimizu T, Suwabe K, et al (2010) UDP-glucose pyrophosphorylase is rate limiting in vegetative and reproductive phases in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 51:981–996

- Parsons JB, Rock CO (2013) Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res* 52:249–276
- Pascal S, Bernard A, Sorel M, et al (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
- Pettitt TR, Harwood JL (1989) Alterations in lipid metabolism caused by illumination of the marine red algae *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*. *Phytochemistry* 28:3295–3300
- Pidkowich MS, Nguyen HT, Heilmann I, et al (2007) Modulating seed β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4742–4747
- Pierrugues O, Brutesco C, Oshiro J, et al (2001) Lipid phosphate phosphatases in *Arabidopsis*. Regulation of the AtLPP1 gene in response to stress. *J Biol Chem* 276:20300–20308
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK (2006) Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763:1413–1426
- Pokotylo I, Pejchar P, Potocký M, et al (2013) The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling. *Prog Lipid Res* 52:62–79
- Poulsen LR, López-Marqués RL, McDowell SC, et al (2008) The *Arabidopsis* P₄-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* 20:658–676
- Pulsifer IP, Lowe C, Narayanan SA, et al (2014) Acyl-lipid thioesterase1-4 from *Arabidopsis thaliana* form a novel family of fatty acyl-acyl carrier protein thioesterases with divergent expression patterns and substrate specificities. *Plant Mol Biol* 84:549–563
- Puyaubert J, Denis L, Alban C (2008) Dual targeting of *Arabidopsis* HOLOCARBOXYLASE SYNTHETASE1: a small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting. *Plant Physiol* 146:478–491
- Quist TM, Sokolchik I, Shi H, et al (2009) HOS3, an ELO-like gene, Inhibits effects of ABA and implicates a S-1-P/ceramide control system for abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 2:138–151
- Rademacher N, Kern R, Fujiwara T, et al (2016) Photorespiratory glycolate oxidase is essential for the survival of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* under ambient CO₂ conditions. *J Exp Bot* erw118
- Richmond T a, Bleecker a B (1999) A defect in β -oxidation causes abnormal inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11:1911–1924
- Riekhof WR, Andre C, Benning C (2005a) Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 441:96–105
- Riekhof WR, Sears BB, Benning C (2005b) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1_{Ct}. *Eukaryot Cell* 4:242–252
- Roughan PG, Holland R, Slack CR (1980) The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [1-¹⁴C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochem J* 188:17–24
- Roughan PG, Holland R, Slack CR (1979) Acetate is the preferred substrate for long-chain fatty acid synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Biochem J* 184:565–569

- Roughan PG, Slack CR, Holland R (1976) High rates of [1-¹⁴C]acetate incorporation into the lipid of isolated spinach chloroplasts. *Biochem J* 158:593–601
- Routaboul JM, Benning C, Bechtold N, et al (1999) The *TAG1* locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol Biochem* 37:831–840
- Rylott EL, Eastmond PJ, Gilday AD, et al (2006) The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal β -oxidation is essential for seedling establishment. *Plant J* 45:930–941
- Rylott EL, Rogers CA, Gilday AD, et al (2003) *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain Acyl-CoA oxidase activities accumulate Acyl-CoAs and reveal that fatty acid β -oxidation is essential for embryo development. *J Biol Chem* 278:21370–21377
- Sakurai I, Mizusawa N, Wada H, Sato N (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol* 145:1361–1370
- Sakurai K, Mori N, Sato N (2014a) Detection and characterization of phosphatidylcholine in various strains of the genus *Chlamydomonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *J Plant Res* 127:641–650
- Sakurai K, Moriyama T, Sato N (2014b) Detailed identification of fatty acid isomers sheds light on the probable precursors of triacylglycerol accumulation in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 13:256–266
- Sakurai T, Aoki M, Ju X, et al (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour Technol* 200:861–866
- Salas JJ, Ohlrogge JB (2002) Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch Biochem Biophys* 403:25–34
- Sasaki Y, Nagano Y (2004) Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1175–1184
- Sato N (2009) Gclust: *trans*-kingdom classification of proteins using automatic individual threshold setting. *Bioinformatics* 25:599–605
- Sato N, Awai K (2017) “Prokaryotic pathway” is not prokaryotic: Non-cyanobacterial origin of the chloroplast lipid biosynthetic pathway revealed by comprehensive phylogenomic analysis. *Genome Biol Evol* 1:3162–3178
- Sato N, Awai K (2016) Diversity in Biosynthetic Pathways of Galactolipids in the Light of Endosymbiotic Origin of Chloroplasts. *Front Plant Sci* 7:1–5
- Sato N, Kobayashi S, Aoki M, et al (2016a) Identification of genes for sulfolipid synthesis in primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biochem Biophys Res Commun* 470:123–129
- Sato N, Mori N, Hirashima T, Moriyama T (2016b) Diverse pathways of phosphatidylcholine biosynthesis in algae as estimated by labeling studies and genomic sequence analysis. *Plant J* 87:281–292
- Sato N, Moriyama T (2007) Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: Lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis. *Eukaryot Cell* 6:1006–1017
- Sato N, Moriyama T, Mori N, Toyoshima M (2017) Lipid metabolism and potentials of biofuel and high added-value oil production in red algae. *World J Microbiol Biotechnol* 33:74
- Sato N, Murata N (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis* I. LIPID CLASSES. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 710:271–278

- Sato N, Okazaki Y, Saito K (2016c) Isotopic combinator analysis provides *in vivo* evidence of the direct epimerization of monoglucosyl diacylglycerol in cyanobacteria. *Biochemistry* 55:5689–5701
- Schönknecht G, Chen W-H, Ternes CM, et al (2013) Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. *Science* (80-) 339:1207–1210
- Seo J, Lee HY, Choi H, et al (2008) Phospholipase A₂β mediates light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 59:3587–3594
- Seo YS, Kim EY, Kim JH, Kim WT (2009) Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 583:2301–2307
- Seo YS, Kim EY, Kim WT (2011) The *Arabidopsis* *sn-1*-specific mitochondrial acylhydrolase AtDLAH is positively correlated with seed viability. *J Exp Bot* 62:5683–5698
- Shimada H, Koizumi M, Kuroki K, et al (2004) ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol* 45:960–967
- Shimakata T, Stumpf PK (1982) Isolation and function of spinach leaf β-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5808–5812
- Shintani DK, Ohlrogge JB (1994) The characterization of a mitochondrial acyl carrier protein isoform isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 104:1221–1229
- Shiran D, Khozin I, Heimer YM, Cohen Z (1996) Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. I: The use of externally supplied fatty acids. *Lipids* 31:1277–1282
- Singh V, Singh PK, Siddiqui A, et al (2016) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* *SFD1/GLY1*, the gene encoding plastid localized glycerol-3-phosphate dehydrogenase, increases plastidic lipid content in transgenic rice plants. *J Plant Res* 129:285–293
- Smith MA, Dauk M, Ramadan H, et al (2013) Involvement of Arabidopsis ACYL-COENZYME A DESATURASE-LIKE2 (At2g31360) in the biosynthesis of the very-long-chain monounsaturated fatty acid components of membrane lipids. *Plant Physiol* 161:81–96
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK (2003) Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42:289–317
- Stabenau H, Winkler U, Säftel W (1984) Enzymes of β-Oxidation in Different Types of Algal Microbodies. *Plant Physiol* 75:531–533
- Ståhl U, Carlsson AS, Lenman M, et al (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:1324–1335
- Ståhl U, Ståhlberg K, Stymne S, Ronne H (2008) A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Lett* 582:305–309
- Ståhlberg K, Ståhl U, Stymne S, Ohlrogge J (2009) Characterization of two *Arabidopsis thaliana* acyltransferases with preference for lysophosphatidylethanolamine. *BMC Plant Biol* 9:60
- Stevenson-Paulik J, Love J, Boss WF (2003) Differential regulation of two *Arabidopsis* type III phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. A regulatory role for the pleckstrin homology domain. *Plant Physiol* 132:1053–1064
- Stumpf PK, James AT (1963) The biosynthesis of long-chain fatty acids by lettuce chloroplast preparations. *Biochim Biophys Acta - Spec Sect Lipids Relat Subj* 70:20–32
- Sumiya N, Kawase Y, Hayakawa J, et al (2015) Expression of cyanobacterial Acyl-ACP reductase

- elevates the triacylglycerol level in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell Physiol* 56:1962–1980
- Suzuki K, Ehara T, Osafune T, et al (1994) Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Biol* 63:280–8
- Tajima N, Sato S, Maruyama F, et al (2014) Analysis of the complete plastid genome of the unicellular red alga *Porphyridium purpureum*. *J Plant Res* 127:389–397
- Takusagawa M, Nakajima Y, Saito T, Misumi O (2016) Primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* accumulates storage glucan and triacylglycerol under nitrogen depletion. *J Gen Appl Microbiol*. doi: 10.2323/jgam.2015.12.001
- Tanoue R, Kobayashi M, Katayama K, et al (2014) Phosphatidylglycerol biosynthesis is required for the development of embryos and normal membrane structures of chloroplasts and mitochondria in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 588:1680–1685
- Tardif M, Atteia A, Specht M, et al (2012) PredAlgo: A new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae. *Mol Biol Evol* 29:3625–3639
- Tasseva G, Richard L, Zachowski A (2004) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 566:115–120
- Tjellström H, Yang Z, Allen DK, et al (2012) Rapid kinetic labeling of *Arabidopsis* cell suspension cultures: Implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiol* 158:601–611
- Toyoshima M, Mori N, Moriyama T, et al (2016) Analysis of triacylglycerol accumulation under nitrogen deprivation in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Microbiology* 162:803–812
- Toyoshima M, Sato N (2015) High-Level Accumulation of Triacylglycerol and Starch in Photoautotrophically Grown *Chlamydomonas debaryana* NIES-2212. *Plant Cell Physiol* 56:2447–2456
- Trevor R, Pettitt A, Jones L, Harwood JL (1989) Lipids of the marine red algae, *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*. *Phytochemistry* 28:399–405
- van Besouw A, Wintermans JF (1978) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochim Biophys Acta* 529:44–53
- Vítová M, Goecke F, Sigler K, Řezanka T (2016) Lipidomic analysis of the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* in response to changes in pH. *Algal Res* 13:218–226
- Wada H, Shintani D, Ohlrogge J (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1591–1596
- Wang L, Mao Y, Kong F, et al (2013a) Complete Sequence and Analysis of Plastid Genomes of Two Economically Important Red Algae: *Pyropia haitanensis* and *Pyropia yezoensis*. *PLoS One* 8:
- Wang Q, Jiang Q, Lian JP, et al (2014) Functional Identification of ELO-Like Genes Involved in Very Long Chain Fatty Acid Synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Russ J Plant Physiol* 61:853–861
- Wang Z, Anderson NS, Benning C (2013b) The phosphatidic acid binding site of the *Arabidopsis* trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *J Biol Chem* 288:4763–4771
- Wang Z, Xu C, Benning C (2012) TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J* 70:614–623
- Watanabe S, Ohnuma M, Sato J, et al (2011) Utility of a GFP reporter system in the red alga

Cyanidioschyzon merolae. J Gen Appl Microbiol 57:69–72

- Weier D, Müller C, Gaspers C, Frentzen M (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. Biochem Biophys Res Commun 334:1127–1134
- Weng H, Molina I, Shockey J, Browse J (2010) Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. Planta 231:1089–100
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, et al (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. Plant Cell 19:1209–1220
- Winkler U, Säftel W, Stabenau H (1988) β -Oxidation of fatty acids in algae: Localization of thiolase and acyl-CoA oxidizing enzymes in three different organisms. Planta 175:91–98
- Xiao S, Chye ML (2011) New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. Prog Lipid Res 50:141–151
- Xu C, Fan J, Froehlich JE, et al (2005) Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:3094–3110
- Xu C, Härtel H, Wada H, et al (2002) The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. Plant Physiol 129:594–604
- Xu C, Yu B, Cornish AJ, et al (2006) Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. Plant J 47:296–309
- Xue HW, Hosaka K, Plesch G, Mueller-Roeber B (2000) Cloning of *Arabidopsis thaliana* phosphatidylinositol synthase and functional expression in the yeast *pis* mutant. Plant Mol Biol 42:757–764
- Yagisawa F, Fujiwara T, Kuroiwa H, et al (2012) Mitotic inheritance of endoplasmic reticulum in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Protoplasma 249:1129–1135
- Yamaoka Y, Yu Y, Mizoi J, et al (2011) *PHOSPHATIDYL SERINE SYNTHASE1* is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 67:648–661
- Yamaryo Y, Dubots E, Albrieux C, et al (2008) Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD ζ 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D. FEBS Lett 582:685–690
- Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, et al (2010) A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with *sn*-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. Proc Natl Acad Sci U S A 107:12040–12045
- Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, et al (2012) A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: Substrate specificity, *sn*-2 preference, and evolution. Plant Physiol 160:638–652
- Yasuno R, Von Wettstein-Knowles P, Wada H (2004) Identification and molecular characterization of the β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase component of the *Arabidopsis* mitochondrial fatty acid synthase. J Biol Chem 279:8242–8251
- Yoon HS, Müller KM, Sheath RG, et al (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). J Phycol 42:482–492
- Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, et al (2006) Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. Science 313:1435–1438
- Yu B, Wakao S, Fan J, Benning C (2004) Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes

- embryo-lethality in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45:503–510
- Yu B, Xu C, Benning C (2002) *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5732–5737
- Yuan Y, Sachdeva M, Leeds JA, Meredith TC (2012) Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the fabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J Bacteriol* 194:5171–5184
- Yunus IS, Liu YC, Nakamura Y (2016) The importance of SERINE DECARBOXYLASE1 (SDC1) and ethanolamine biosynthesis during embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 88:559–569
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB (2009) DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* 21:3885–3901
- Zhao L, Katavic V, Li F, et al (2010a) Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in *Arabidopsis* seed oil biosynthesis. *Plant J* 64:1048–1058
- Zhao Y, Yan A, Feijó JA, et al (2010b) Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22:4031–4044
- Zheng H, Rowland O, Kunst L (2005) Disruptions of the *Arabidopsis* Enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell* 17:1467–1481
- Zheng SZ, Liu YL, Li B, et al (2012) Phosphoinositide-specific phospholipase C9 is involved in the thermotolerance of *Arabidopsis*. *Plant J* 69:689–700
- Zheng Z, Xia Q, Dauk M, et al (2003) *Arabidopsis AtGPAT1*, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell* 15:1872–1887
- Zhou Y, Hölzl G, vom Dorp K, et al (2017) Identification and characterization of a plastidial phosphatidylglycerophosphate phosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 89:221–234
- Zhou Y, Peisker H, Weth A, et al (2013) Extrplastidial cytidinediphosphate diacylglycerol synthase activity is required for vegetative development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 75:867–879
- Zolman BK, Nyberg M, Bartel B (2007) IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant Mol Biol* 64:59–72
- Zou J, Wei Y, Jako C, et al (1999) The *Arabidopsis thaliana TAG1* mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J* 19:645–653