氏名	BAKKU RANJITH KUMAR
学位の種類	博　士（ 学術 ）
学位記番号	博　甲　第　　８３９４　　号
学位授与年月日	平成　２９年　１０月　３１日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on the Metabolism of Lipids and Energy Storage Compounds to Elucidate the Regulation of Alkenone Biosynthesis in a Haptophyte alga *Emiliania huxleyi*（ハプト藻*Emiliania huxleyi*のアルケノン生合成の調節機構の解明にむけた脂質およびエネルギー貯蔵物質の代謝の解析）

主査	筑波大学教授	博士（農学）	鈴木　石根
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田　健一郎
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	古川　純
副査	筑波大学助教	博士（理学）	吉田　昌樹

論　文　の　要　旨

ハプト藻 *Emiliania huxleyi* は海洋で大規模な増殖（ブルーム）を起こす藻類で、この種は細胞表面に円形の炭酸カルシウム結晶（円石）を形成することでも知られる、地球規模の物質循環に大きな影響を与える生物のひとつである。また、*E. huxleyi* は、アルケノンと呼ばれる炭素数37～40の長鎖不飽和ケトンを蓄積する特徴をもつ。アルケノンは、海底堆積物から発見された化合物で、この種を含め５種のハプト藻類のみが合成することがわかっている独特な化合物である。アルケノンは合成時の温度環境が低下すると、分子内のトランス二重結合の数が増加することがわかっており、堆積物中のアルケノンの不飽和度からその当時の海洋温度を推定する試みが、地球化学的研究においてなされている。しかしながら、限られた数の藻類が、何のためにその化合物を、どの様に合成しているかに関する生物学的知見は明確ではなかった。そこで本論文の著者は、アルケノンに加えて、この藻類の主要な代謝物の多糖（中性多糖と酸性多糖）、タンパク質、脂質、低分子有機物の含量を測定し、アルケノンとその他の脂質や代謝化合物へ炭素がどのように分配されるかを明らかにすることを目指した。その後、*E. huxleyi* においてさらに脂質代謝を解析するため網羅的な Lipidomics の手法の確立を試みた。

藻類の炭素代謝の調節は、窒素の利用効率と密接に関係している。窒素欠乏条件では多くの藻類が、光合成により固定した炭素をトリアシルグリセロール（TAG）などの貯蔵脂質や、炭水化物のような貯蔵多糖の合成に振り向ける。そこで著者は、円石を形成しない*E. huxleyi* CCMP 2090株を用いて、窒素充分な培養条件から窒素欠乏の培養条件に変化したときの種々の代謝物への炭素の配分を明らかにすることとし、炭素の貯蔵物質として働く高分子への炭素フローの方向

の切替え機構の解明を試みた。その結果、アルケノンへの炭素の移動は窒素欠乏により促進され、窒素充分条件で全炭素量の15%だったものが、窒素欠乏条件では27%まで増加することを明らかにし、一方TAGは、どの窒素栄養条件においてもごく僅かにしか蓄積量がないことを見出した。また、その他の主要な成分の含量は窒素欠乏により低下し、脂肪酸は9%から7%に、タンパク質は46%から25%に、多糖は6.8%から4.5%に変化することを明らかにした。また、膜脂質の主要な成分である脂肪酸のうち主に葉緑体に局在するパルミチン酸（16:0）、ステアリン酸（18:0）、オレイン酸（18:1）、リノレン酸（18:2）は窒素欠乏条件で優先して蓄積すること、一方、オクタデカヘプタエン酸（18:5）は窒素充分条件で蓄積量が高いことも見出した。葉緑体には局在しないリン脂質に結合する主要な脂肪酸のドコサヘキサエン酸（DHA, 22:6）は窒素栄養条件が変わっても顕著に変動しないことを明らかにした。以上のことから、著者は*E. huxleyi*においてアルケノンが貯蔵脂質として機能していることを明らかにした。

著者は、脂質の代謝をさらに詳細に解析するため、*E. huxleyi*の全ての脂質分子を網羅的に解析する手法（Lipidomics）の開発を目指した。まず、主要な脂質クラスをHPLCで分離し、イオントラップ型のESI-MSで分析することにより、対数増殖期と静止期の細胞から約600種の脂質を分離同定し、自作したアルゴリズムを用いて定性・定量解析を行った。その結果、TAGは全リピドームの2%に満たないこと、ホスファチジルコリンが65-70%を占める主要な脂質であることを見出した。生体膜を構成する一般的なリン脂質、葉緑体の糖脂質に加えて、藻類に特徴的なホスファチジルジメチルプロパンチオールやベタイン脂質についても検出同定ができるシステムを構築した。また、炭素数24で二重結合が4つ、5つまたは6つの脂肪酸が検出されたことから、ハプト藻には動物型のDHA合成機構が存在することも示唆された。この手法は同じように特徴的な脂質クラスを持つ藻類のLipidomics解析に適応でき、特にアルケノンなど特殊な脂質を合成する藻類種の脂質代謝の解析に有効であると思われた。

審　査　の　要　旨

本論文で著者は、ハプト藻の様々な細胞内物質を定量しその変化を調べることで、アルケノンが貯蔵脂質であることを証明した。多糖やタンパク質を同時に測定して炭素の分配の機構を明らかとしたことは、本論文が初めてであり高く評価できる。また、特殊なリン脂質やベタインを含む脂質など藻類は他の生物と比較してユニークな脂質を含むため、その Lipidomics の手法は確立されていなかった。著者は HPLC と ESI-MS を組み合わせて一度にそれらの脂質を解析する手法の開発に取り組み、その手法を確立した。これらの成果は、当該分野の今後の研究の発展に大きく貢献したと評価できる。

平成２９年９月４日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。