

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 24 年度博士課程 進学
氏 名 長崎 稔拓
指導教員名 井上 広滋

論文題目 深海性二枚貝におけるヒポタウリン生合成機構に関する研究

深海の熱水噴出域は、有毒な硫化水素等を含む熱水が噴出する過酷な環境であるにもかかわらず、それら化学物質に基づく化学合成生態系が存在しており、軟体動物や節足動物、環形動物等といった多様な生物が生息している。これらの生物の多くは細胞内外に硫黄酸化細菌を共生させており、その共生細菌が硫化水素の酸化により生じる化学エネルギーをもとに合成した有機物をエネルギー源として利用している。このため、熱水噴出域周辺に生息する生物は生存のために硫化水素を無毒化する必要がある、とくに細胞内に硫黄酸化細菌を共生させている場合、安全に生体内へ硫化水素を輸送することが必要と考えられる。熱水噴出域に生息するハオリムシ類やシロウリガイ類においては、硫化水素と結合するヘモグロビンや亜鉛含有リポタンパク質といった特殊なタンパク質が存在しており、それらが無毒化に関与していることが分かっているが、熱水噴出域の生態系において大きなバイオマスを占める二枚貝類であるシンカイヒバリガイ類やその他の多くの熱水噴出域固有生物では、そのような特殊なタンパク質の存在はこれまでに確認されていない。

一方、熱水噴出域に生息する無脊椎動物の組織中に、チオタウリンと呼ばれる含硫アミノ酸の一種が共通して含まれていることが知られている。このチオタウリンについては、多毛類を用いた飼育実験から環境中の硫化物濃度に応じてその含有量が変化すること、また二枚貝類やハオリムシ類の組織の磨砕液に硫化物を添加することでチオタウリン量が増加すること等が明

らかとなっている。従って、環境中から侵入してきた硫化水素を細胞内にあるヒポタウリンと反応させることで無毒なチオタウリンの形に変換し、有害な硫化物を体内に取り込み蓄積させている可能性が示唆されている。シンカイヒバリガイ類の組織中においても、このチオタウリンが蓄積していることから、ヒポタウリン及びチオタウリンを利用した硫化水素の無毒化を行っている可能性が高い。

チオタウリンの前駆体となるヒポタウリンはタウリンの前駆体でもあるため、タウリン生合成経路を介して生合成されると考えられる。タウリン生合成経路に関しては哺乳類を中心にして研究例があり、種ごとに差異はあるものの一般的にシステインスルフィン酸経路、システイン酸経路、システアミン経路の3つが存在しているとされている。海産二枚貝類は組織中に高濃度のタウリンを含んでおり、組織中のタウリンが細胞内浸透圧の調節にも関わっていることが知られているにもかかわらず、その生合成機構に関する研究は殆ど行われていない。

本研究の目的は、深海の熱水噴出域に固有の二枚貝類のヒポタウリンの生合成経路とその特性を解析し、硫化物に富む環境への二枚貝類の進出過程の分子基盤を解明することである。そのために、まず、シンカイヒバリガイ類の一種であるシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) を対象として、ヒポタウリン合成経路の実体である各酵素の遺伝子とその特性を明らかにした。続いて、ヒポタウリンの生合成中間体を含むアミノ酸関連物質を安定的に測定できる分析系を構築し、組織中の各酵素の活性の解析を行った。さらに、硫化物濃度等を変化させた環境へ曝露した個体について、組織中の遊離アミノ酸量変動の解析を行った。これらの結果から、ヒポタウリン生合成機構と硫化物に富む環境への適応との関係について考察を試みた。

ヒポタウリン生合成に関わる遺伝子の解析

近縁種である *Bathymodiolus azoricus* の EST データベース、および共同研究者によるシチヨウシンカイヒバリガイ EST 解析結果に対して、哺乳類の塩基配列情報をもとにヒポタウリン生合成に関連する酵素群の遺伝子の検索を行ったところ、システインジオキシゲナーゼ(CDO)とシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ(CSAD)様の配列が検出された。これらの配列を参考にシチヨウシンカイヒバリガイの鰓からクローニングを行い、CDO および CSAD 様の cDNA 配列それぞれ 651、1551bp を得た。得られた配列について分子系統学的解析を行った結果、他の分類群の生物における配列との関係から、単離された配列はそれぞれ CDO および CSAD であることが示された。生殖腺、閉殻筋、足糸牽引筋、足、外套膜、鰓の6組織を対象とした組織別発現解析の結果、鰓での発現が最も高く、次いで生殖腺、足、外套膜で発現が確認され、閉殻筋および足糸牽引筋ではほとんど発現が見られなかった。一方で、システアミンからヒポタウリンへの反応を触媒するシステアミンジオキシゲナーゼ(ADO)の配列は、EST からは検出されず、哺乳類の配列をもとに設計したプライマーによる cDNA スクリーニングでも取得できなかった。

次に CDO、CSAD 両遺伝子の環境中の硫化物への応答を調べるため、硫化物へのシチヨウシンカイヒバリガイの曝露飼育実験を、研究船なつしま平成 23 年度航海 NT11-09 において実施

した。硫化物源として、硫化ナトリウム(Na_2S)を使用し、飼育海水中の硫化物濃度がそれぞれ、0.1、1mg/Lとなるように添加する2区を設けた。 Na_2S は8時間おきに添加し、24、48時間後に組織のサンプリングを実施した。また、 Na_2S に替えてチオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)についても濃度が1mg/Lとなるように添加する曝露飼育実験も行った。これらのサンプルについて、鰹における発現解析をreal-time PCRにより実施した。その結果、CDO遺伝子は Na_2S の添加量の増加に伴ってやや上昇する傾向が見られたが、有意な変化は検出されなかった。また、48時間後の発現量は、24時間経過時点における傾向が維持される結果となった。CSAD遺伝子は Na_2S の添加量に関わらず、24時間後にやや発現量が上昇し、48時間後には低下する傾向が見られたが、何れも有意な発現量の変化は見られなかった。以上のことからヒポタウリン生合成に関わるCDO、CSADの2遺伝子については、鰹で最も高く発現していたこと、および、硫化物への飼育実験に対しても顕著な変化が認められなかったことから、無毒化に重要なヒポタウリンの継続的な供給を可能にするため、環境中硫化物濃度に関わらず常に高く一定の発現を示している可能性が示唆された。

ヒポタウリン生合成中間体を含む遊離アミノ酸の分析法の検討

ヒポタウリン生合成における中間体であるシステインスルフィン酸、システイン酸に加えて、ヒポタウリン、チオタウリン、シスタチオニンの5種のアミノ酸について、逆相HPLCで他のアミノ酸とともに同時に安定的に分析する方法について検討を行った。一般にフェニルイソチオシアネート(PITC)を誘導体化試薬としてアミノ酸の分析を行う際は、分析対象のアミノ酸のアルカリ化と誘導体化という2段階の前処理が必要であり、とくにアルカリ化においてはトリエチルアミンが用いられてきた。しかしながら、その方法ではヒポタウリンとチオタウリンの間で相互変化が生じて安定的な定量分析が困難であった。トリエチルアミンの代わりにアンモニア水を用いることで、その変化を大きく抑制できることが先行研究において明らかにされたため、その前処理方法を他のアミノ酸にも応用し、安定的に分析可能であるかについて検討した。その結果、アンモニアによるアルカリ化はシステインスルフィン酸とシステイン酸、シスタチオニンについても有効であり、トリエチルアミンを使用した場合以上に安定した分析が可能であることを確認した。次に、これまではタンパク質を構成する一般的な遊離アミノ酸の分析とチオタウリン、ヒポタウリンの分析がそれぞれ別々に行われていたことから、1度の分析において注目する全ての遊離アミノ酸を同時に定量分析する方法について検討を行った。このアミノ酸分析においては、アセトニトリル濃度が5%(v/v)となるように調整した0.1M酢酸アンモニウム緩衝液と60%アセトニトリルの2液を用いて実施したが、この2液のグラジエント条件を調整することで、1回あたり35分間の分析でタンパク質構成アミノ酸とヒポタウリン生合成中間体に加えてタウリン、チオタウリン、GABA、 β -アラニン、ノルロイシンの計26種類のアミノ酸を同時に定量分析できることが可能となった。システアミン経路における基質であるシステアミンについては、PITCによる誘導体化効率が著しく低く、PITCを用いた際の同時分析は困難であることが分かった。

ヒポタウリン生合成に関わる酵素の特性

鰓および消化盲嚢の組織から粗酵素液を調整し酵素学的解析を行った。調整した粗酵素液に基質となるシステインスルフィン酸(CSA)、システイン酸(CA)、システアミンをそれぞれ添加し、生成物であるヒポタウリン、タウリン、チオタウリンの量を測定し、粗酵素液中に含まれるタンパク質 1mg 当たり 1 分間の生成物量(nmol)を酵素活性とした。その結果、鰓および消化盲嚢において CSA からヒポタウリンを生成する CSA 脱炭酸活性はそれぞれ 0.66、2.00 であり、CA からヒポタウリンを経由しないでタウリンを生成する CA 脱炭酸活性は 0.13、0.61 であった。両反応はどちらも CSAD により触媒されるが、これまで浅海性二枚貝においてはタウリンの生成につながる CA 脱炭酸活性がより高いことが知られていたが、本実験でシチヨウシンカイヒバリガイにおいては逆の結果を示すことが明らかとなった。また、システアミン酸化酵素活性は、それぞれ 0.36、1.49 という結果となり、反応を触媒する酵素の遺伝子配列が取得できなかった ADO についても、鰓および消化盲嚢中に活性が存在していることが明らかとなった。また、その活性の値は浅海性二枚貝類を対象として行われた先行研究の報告を大きく上回る値であり、このことはチオタウリンをこれまで生成物として考慮していなかったことが要因として考えられる。

以上、本研究から深海性二枚貝類であるシチヨウシンカイヒバリガイにおいて、ヒポタウリン生合成経路の一つであるシステインスルフィン酸経路を構成する酵素群の遺伝子 2 種が単離されたこと、またその遺伝子がコードする酵素に相当する活性が最も高い値で組織中から認められたことから、当該経路を主としたヒポタウリン生合成が行われていることが示唆された。硫化物への曝露飼育実験において、これら 2 種の酵素の遺伝子の発現量に顕著な変動が見られなかったが、このことはヒポタウリンの生合成経路の発現を常に高く維持していることを示していると考えられ、それにより、環境中硫化物の無毒化および濃度の急激な変化への対応を可能にしていると考えられる。酵素活性の解析では、CSA 脱炭酸活性が CA 脱炭酸活性よりも高いこと、システアミン経路についても活性が認められたことより、タウリン合成経路が、全体としてヒポタウリンの供給に適した特性を持ち、このことが硫化物に富む環境への適応を可能にした要因の一つであったと推察される。