

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580253

研究課題名（和文）タウロピンを介する紅藻類と海洋細菌の相互作用に関する研究

研究課題名（英文）Probable tauropine-mediated interaction between marine red algae and marine bacteria

研究代表者

菅野 信弘（KAN-NO NOBUHIRO）

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：40169800

研究成果の概要（和文）：スギノリ目の紅藻類を中心に分布するタウロピン（紅藻酸）の生理機能解明を目的として、紅藻類と海洋細菌との間にタウロピンを介した相互作用の存在を作業仮説として検討を行なった。紅藻ハリガネ・タウロピン脱水素酵素の精製と性状解析、N-末端および部分アミノ酸配列の解析に成功した。しかし、部分アミノ酸配列情報を利用したタウロピン脱水素酵素 cDNA のクローニングには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the physiological role of tauropine (rhodoic acid) which shows limited distribution among Gigartinales (Rhodophyta), the tauropine-mediated interaction between marine algae and marine bacteria was assumed and demonstrated. Tauropine dehydrogenases (Ahp-TaDH1 and Ahp-TaDH2) were highly purified from *Ahnfeltiopsis paradoxa*. The catalytic properties and N-terminus and the partial amino acid sequences were determined. However, cloning of the tauropine dehydrogenase cDNA using partial amino acid sequence information was incomplete.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：紅藻，タウロピン，タウロピン脱水素酵素，アミノ酸配列，cDNA クローニング，*Ahnfeltiopsis paradoxa*

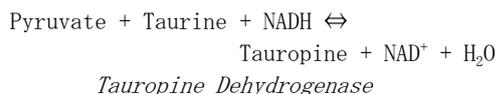
## 1. 研究開始当初の背景

海藻類の正常な成長には環境微生物の共存が不可欠であることは経験的に知られていたが、近年、Matsuo らによって緑藻類の成長に付着細菌が生産するサルシンが不可欠であることが証明された。このような海藻と細菌の相互作用は緑藻類に限らず紅藻類、褐藻類でも予想されているが、その証明には至っていない。海洋生態系の中での海藻類と他生

物との相互作用を解明することは、海藻類の有効活用技術開発の基盤として極めて重要である。陸上高等植物においても環境細菌と相互作用する例は数多く知られているが、その中には *N*-(carboxyalkyl)-amino acid、いわゆるオピン類を排他的栄養物質として利用することによって相互作用関係を形成しているものが知られている。スギノリ科の紅藻類を中心に分布する *N*-(1-D-carboxy-

ethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (紅藻酸またはタウロピン; 本報告書内では“タウロピン”を呼称として用いる)もオピン類の一種であるが、本成分の生理機能については未だに明らかにされていない。紅藻類のタウロピンが、陸上植物に見出されるオピン類と同様に、共生または寄生細菌によって誘導される成分である可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、“紅藻類に見出されるタウロピンは共生または寄生細菌によって誘導される排他的栄養物質である”という作業仮説をたて、(1) タウロピン代謝酵素の触媒特性の解析、(2) タウロピン代謝酵素の分子構造解析、(3) タウロピン生産量の解析、(4) タウロピン資性化細菌の検索と性状解析、の4方向からその証明を行おうとする。

本研究で着目したタウロピンは、紅藻類の中でもスギノリ科の藻類を中心に分布する成分である。タウロピンが紅藻類から新規なアミノスルホン酸として見出されたのは1961年であり、海産無脊椎動物(エゾアワビ)からの発見に先んじた。その後1987年に至って漸く紅藻類におけるタウロピンの生合成機構が明らかにされ、代謝酵素としてタウロピン脱水素酵素が特定された。



紅藻類におけるタウロピンおよびその代謝酵素に関する研究は、代謝酵素の特定以後ほとんど進展していない。代謝酵素の性状解析も極めて基本的な部分に留まっている。

## 2. 研究の目的

本研究では“紅藻類に見出されるタウロピンは、高等植物と細菌の寄生/共生関係において認められるような、生物間相互作用に密接に関係した化学物質、すなわち、共生または寄生細菌によって誘導される排他的栄養物質である”という仮説に立ち、タウロピンとその代謝酵素に関する検討を軸として、本仮説の証明を目指す。具体的には、海藻から精製したタウロピン脱水素酵素の酵素化学的性状、特に基質阻害および反応生成物阻害を精査することによって、タウロピンの生合成がどのように調節されているかを明らかにする。得られた結果をこれまでに蓄積されているクラウンゴール、海産無脊椎動物の結果と比較することによって、海藻の代謝酵素の特性を明確にする。タウロピン脱水素酵素の部分アミノ酸配列情報をもとにcDNAをクローニングし、一次構造情報および塩基配列情報を得る。データベースを利用してタンパク質構造から機能の類推を図る。海藻のタウロピン含量を精査する。特に藻体部位、成長段

階、季節変動に着目し、タウロピンが最も盛んに生合成される条件を特定する。タウロピン資性化能を有する細菌をスクリーニングし、その性状を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) タウロピン脱水素酵素の精製

#### 材料

ハリガネ(スギノリ目オキツノリ科)は2010年3月に岩手県三陸町袖ノ沢で採集し、直ちに実験に使用した。D-タウロピン(TauOp)はKan-noらの方法に準じて合成した。

#### TaDH活性の測定

TaDH活性は30°Cにおける酵素反応の進行に伴うNADHの減少速度を、調温セルホルダー付きの分光吸光度計(UV/VIS Spectrophotometer V560, Jasco)を用いて340 nmにおける吸光度変化として測定した。酵素反応液は、合成および分解反応何れの場合においても最終液量1 mlとした。反応液には、TauOp合成反応では0.1 M PIPES/NaOH (pH 7.1), 0.1 M Taurine, 5 mM Pyruvate, 0.3 mM NADHを使用し、TauOp分解反応では0.5 M Tris/HCl (pH 8.5), 0.2 M TauOp, 3 mM NAD<sup>+</sup>を使用した。調製した反応液を30°Cで3 minブレインキュベート後、試験酵素液化を添加して反応を開始した。30°Cにおいて1 minあたり1 mmolのNAD(H)を酸化・還元する酵素量を1 unitと定義した。試料のタンパク質濃度はAdvanced Protein Assay Reagent

(Cytoskelton社製)を使用し測定した。検量線の作成には牛血清アルブミンを使用した。

#### 粗酵素液の抽出

附着した生物や砂利を除去したハリガネ4 kgをフードミキサーにて細断後、4倍量の20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (以下KP) /5 mM EDTA/30 mM 2-ME (pH 7.2) (bufferA)を加え、ディスペーザとライカイ機を用いて抽出した。遠心分離(7500 rpm, 4°C, 30 min)を行い得られた上清を粗酵素液とした。

#### ハリガネ TaDH の精製

粗酵素液を Toyopearl Phenyl 650M, Sephadex G75, Blue Sepharose Fast Flow, 1st Toyopearl DEAE 650S, Toyopearl HW50S, Macro Prep Ceramic Hydroxyapatite, 2nd Toyopearl DEAE 650S カラムクロマトグラフィーにより分画し精製した。

#### 電気泳動

SDS-PAGEはLaemliの方法に従って行なった。分子量マーカーにはBIO-RAD社製Precision Protein Standardを用い、泳動装置はAE6450 (Ato)を用いた。泳動用Bufferには0.1% SDSを含む25 mM Tris/192 mM Glycine (pH 8.3)を用い、100 V定電圧で泳動した。泳動後のゲルはCBB R-250により染色した。

IEF-PAGEには多用途電気泳動装置AE-3235型

(Ato 社製) を使用し, IEF-PAG plate (pH range 3.5–9.5; GE 社製) を用い, 方法はマニュアルに従った. pI マーカーには IEF Standards 4.45–9.6 (BIO-RAD 社製) を使用した. 泳動後のゲルは CBB R-250 により染色した. また, 活性染色は Kan-no らの方法によった.

### (2) Ahp-TaDH の触媒性状の解析

#### 材料

試薬および酵素活性の測定方法は, 「1) 海藻からのタウロピン脱水素酵素の精製」と同様に行なった. ハリガネからは, 2 タイプの TaDH の精製に成功したが, ここでは収量の高かった Ahp-TaDH1 を主な検討対象とした.

#### 至適 pH

合成反応および分解反応の至適 pH は緩衝域の異なる 5 種類の緩衝液を用いて測定した.

#### TaDH の基質特異性

TauOp 合成反応において, アミノ酸基質特異性,  $\alpha$ -ケト酸基質特異性, および補酵素基質特異性について検討した. また分解方向の反応系においては, オピン基質特異性および補酵素基質特異性について検討した.

#### 酵素活性に対する基質濃度の影響

各基質の  $K_m$  値を求めた. カイネティクスのデータ処理には Graph Pad Software 社の Graph Pad Prism (version 4.03) を用いた.

### (3) Ahp-TaDH の部分アミノ酸配列解析

#### 材料

「1) タウロピン脱水素酵素の精製」で調製した Ahp-TaDH1 (0.6 mg) および Ahp-TaDH2 (0.4 mg) を材料とした.

#### 試薬

消化酵素には Lysyl endopeptidase

(Sequencing grade; Wako) を用いた. タンパク質一次構造分析にはタンパク質一次構造分析装置用の試薬 (Wako) を用いた.

#### N末端アミノ酸配列の解析

5×8 mm の PVDF 膜 (Bio-Rad) を 100%メタノールに 20 sec 洗浄・浸漬後, 酵素試料中に 24 h 浸した. その後, PVDF 膜を取り出し, 80%メタノールで 3 回, Milli-Q 水で 3 回洗浄した. その後, デシケーター内で乾燥させ, 一次構造解析用試料とした. アミノ酸配列の解析は Shimadzu PPSQ21A または同 PPSQ31A によった.

#### Lysyl endopeptidase 消化

精製酵素タンパク質を 8 M 尿素/50 mM

Tris/HCl (pH 9.0) に溶解し, 同量の 50 mM Tris/HCl (pH 9.0) を加え, 尿素濃度を 4 M 以下にした後, 酵素/基質 (モル比) が 1/200 になるように Lysyl endopeptidase を加え, 35°C で 24 h 消化した. TFA を加え, 反応液を酸性とし反応を停止させた.

#### 断片ペプチドのアミノ酸配列解析

Lysyl endopeptidase 消化物は逆相 HPLC を用いて分画し, 手動分取した. 分画には TSK ODS120T カラム (4.6×250 mm) を用い, 0.1% TFA 中のアセトニトリル濃度の直線濃度勾配

(0–80%) により 1 ml/min で溶出した. HPLC 装置は Jasco 社製の 2 ポンプ高圧グラジエントシステムと 875UV (215 nm), および LKB 2-CHANNEL RECORDER で構成した. 手動分取した各画分は, 遠心エバポレータにより乾固し, 0.1% TFA で再溶解して PVDF 膜に添加し, 乾燥後アミノ酸配列分析試料とした.

### (4) cDNA クローニング

#### 材料

本実験で材料とした紅藻ハリガネは, 神奈川県横須賀市観音崎海岸 (2011 年 11 月, 2012 年 12 月), 千葉県銚子市外川 (2012 年 1 月) で採取した. 採取した藻体は研究室まで搬送後, 液体窒素で急速凍結し, 実験に使用するまで -80°C で凍結保存した.

#### 全 RNA の抽出と mRNA の調製

ハリガネ藻体からの全 RNA の抽出は, 酸性 guanidium thiocyanate-phenol-Chloroform 法の変法 (LiCl 沈殿操作を含む), RNeasy plant mini kit (QIAGEN), および ISOGEN (ニッポンジーン) の 3 方法によった. 全 RNA からの mRNA の調製には Oligotex-dT30 (Super) mRNA Purification Kit (From Total RNA, タカラバイオ社) を使用した.

#### First-Strand cDNA の合成

First-Strand cDNA の合成には Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen 社) を用いた. アダプタープライマーとして GGCCACGCGTCGACTACTAC を用いた. 全 RNA から逆転写したものと mRNA から逆転写した 2 タイプの 1st strand cDNA を調製した.

#### PCR 法による Ahp-TaDH・cDNA の増幅

「(3) Ahp-TaDH の部分アミノ酸配列解析」で得られた N 末端部分アミノ酸配列および Lysyl endopeptidase 消化断片のアミノ酸配列を基に縮重センスプライマーと縮重アンチセンスプライマーを設計した. PCR 酵素には ExTaq, Primestar GXL, Amplitaq Gold の 3 種類を使用した. PCR 反応は iCycler (BIO-RAD 社製) により行った. アガロースゲル電気泳動 (マーカー: Hyper Ladder 1) によって DNA の増幅を確認した.

### (5) 藻体部位, 成長段階, 季節による TauOp 含量の変動

#### 材料

ハリガネは岩手県大船渡市三陸町越喜来湾で採取した (2011 年~2012 年).

#### エキスの調製

藻体は選別, 洗浄し, 細断して凍結乾燥後, 乳鉢中で粉末とした. 2012 年以降の研究では液体窒素で凍結後, ボールミル型の粉砕機で

粉末化する方に切り替えた。粉末藻体 1.0–2.0 g に 5 ml の 80% エタノールを加え、常温で 24 h 放置した。遠心分離 (3000 rpm, 20 min) 後、上清を回収し、沈殿は、さらに 5 ml の 80% エタノールを加え、ディスペーザでホモジナイズした。常温で 2 h 放置後、遠心分離 (3000 rpm, 20 min) を行なった。上清を回収し、先に得た上清とまとめ、遠心エバポレータで乾固後、5 ml の Milli-Q 水で溶解した。ジエチルエーテルで完全に脱脂・脱色後、水層を遠心エバポレータで乾固し、Milli-Q 水で 5 ml に定容したものをエキス試料とした。

#### タウロピンの定量

シリンジフィルター (0.2 mm) で濾過したエキス (200 ml) に OPA 反応液 (100 ml) を加え攪拌後、静置 (2 min) した。反応させた試料溶液を Sep-Pak (C18) カートリッジにより、吸着部と非吸着部に分画した。非吸着部および水洗部 5 ml を回収し、遠心エバポレータ (3000 rpm, 30°C) で乾固後、Li-クエン酸 buffer (500 ml) で溶解したものを HPLC 分析用試料とした。オピンの定量は Jasco Guliver HPLC System (Jasco 社製 PU-980, AS-950, CO-965, FP-920) に分析カラムとして AECpak (Jasco) を装着し、NaClO<sub>4</sub>/o-phthalaldehyde/2-ME ポストカラム検出法により行った。データ解析には Jasco-Bowin プログラムを使用した。

#### (6) タウロピン資性化細菌

タウロピン資性化細菌のスクリーニングは、タウロピンを C・N 源として添加した平板寒天培地を用いて、コロニー抽出法により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) タウロピン脱水素酵素の精製

各種カラムクロマトグラフィーにより Ahp-TaDH を精製した。Ahp-TaDH は Blue Sepharose に対して非常に弱い親和性しか示さなかった。Toyopearl DEAE 650S カラムにより 2 成分のアイソフォーム (Ahp-TaDH1, Ahp-TaDH2) に分画された (図 1) ため、以降の精製は各成分ごとに行った。Macro Prep Ceramic Hydroxylapatite カラムでは活性成分が非吸着部に溶出された (図 2) が、高い精製効率を得られた。2nd Toyopearl DEAE 650S カラムの段階でほぼ精製されたものと判断し、SDS-PAGE, IEF-PAGE および活性染色による純度検定を行った (図 3, 4)。両電気泳動の結果より、単一のバンドが確認され、Ahp-TaDH1 および Ahp-TaDH2 が精製できたものと判断した。SDS-PAGE とゲル濾過カラムクロマトグラフィーの挙動よりハリガネ TaDH は両アイソフォームとも分子量約 43400 のモノマータンパク質であると推定された。

IEF-PAGE の結果より、Ahp-TaDH1 の等電点は 4.45 であると推定された。最終的にハリガネ 4 kg から Ahp-TaDH1 と Ahp-TaDH2 が、各々 0.6 mg, 0.4 mg 精製され、各々の回収率は 24.7%, 11.5%, 精製倍率は 3799.0 倍, 2601.5 倍であった (表 1)。

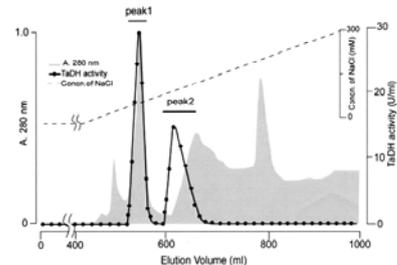


図 1. 1st Toyopearl DEAE カラムクロマトグラフィーによる Ahp-TaDH の精製。

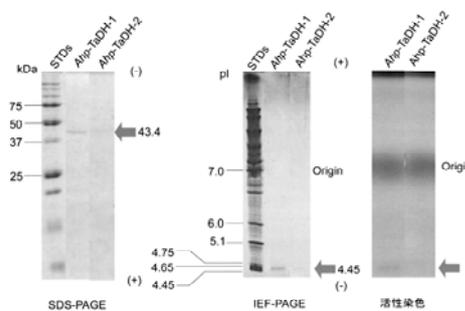


図 2. 精製 Ahp-TaDH1 および Ahp-TaDH2 の SDS-PAGE および IEF-PAGE による分析。

表 1. ハリガネ TaDH の精製結果

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude Enzyme	12465.7	1849.2	0.1	100	1.0
0.4% 塩析分離	9523.6	1334.4	0.1	72	1.0
TOYOPEARL Phenyl 650M eluate	182.4	1085.0	5.9	59	29.5
Sephadex G75 eluate	138.8	996.3	7.2	54	36.0
Blue Sepharose Fast Flow eluate	-	-	-	-	-
TOYOPEARL DEAE 650S eluate	-	-	-	-	-
peak1	21.4	629.4	29.4	34	147.0
TOYOPEARL HW50S eluate	16.1	560.5	34.2	30	171.0
Macro-Prep Ceramic Hydroxylapatite eluate	1.5	503.9	336.0	27	1660.0
TOYOPEARL DEAE 650S eluate	0.6	455.0	759.8	24	3799.0
peak2	16.8	371.9	22.1	20	110.5
TOYOPEARL HW50S eluate	11.8	237.6	20.1	13	100.5
Macro-Prep Ceramic Hydroxylapatite eluate	1.1	196.9	181.7	9	758.5
TOYOPEARL DEAE 650S eluate	0.4	212.1	520.3	11	2601.5

表 2. Ahp-TaDH1 の基質特異性と見かけの Km

Co-substrates	Substrate	Relative activity (%)	App. K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )
<b>Tauropine biosynthetic reaction</b>				
5 mM Pyruvate and 0.3 mM NADH	100 mM Taurine	100.0	10.00	36.10
	Hypotaurine	12.1	-	-
	Homotaurine	33.8	14.74	32.40
	Aminomethane sulfonic acid	0.3	-	-
	β-Alanine	1.0	-	-
	Glycine	0.4	-	-
100 mM Taurine and 0.3 mM NADH	5 mM Pyruvate	100.0	0.27	35.10
	Oxalacetate	18.2	-	-
	Glyoxylate	3.7	-	-
	2-Ketobutyrate	6.6	-	-
100 mM Taurine and 5 mM Pyruvate	0.3 mM NADH	100.0	0.07	42.11
	NADH	0.6	-	-
<b>Tauropine catabolic reaction</b>				
50 mM Tauropine	4 mM NAD <sup>+</sup>	-	0.25	52.93
	50 mM Tauropine	-	27.77	34.76

#### (2) Ahp-TaDH の触媒性状の解析

精製したハリガネ TaDH を用いて、触媒性状の解析を行なった。

**至適 pH**

Ahp-TaDH1 の至適 pH は合成反応で 7.0, Tau0p 分解反応で 8.8 であった.

**基質特異性および Km 値**

合成反応では, Taurine, Pyruvate, NaDH に比較的狭い基質特異性を示した. 唯一 Homotaurine で Taurine の 33%の活性が認められたにすぎなかった. アカバギンナンソウ TaDH では, L-Valine で若干の活性を認めている. イボツノマタやコトジツノマタ TaDH で Oxalacetate や 2-ketobutylate で比較的高い活性が認められている. これらと比較するとハリガネ TaDH の基質特異性はより厳密であると結論される (表 2).

**(3) Ahp-TaDH の部分アミノ酸配列解析**

Ahp-TaDH1 の N 末端アミノ酸配列解析を試みた結果, 32 残基の配列の解析に成功した.

PSQITHICVVGGNASQVLSPLYGHAFYK---

この配列を既知の海産無脊椎動物の OpDH および土壌細菌 OpDH の N 末端配列と比較したが, 高いアミノ酸同一率は認められなかった. 類似していなかった. しかし, 海産無脊椎動物 OpDH および土壌細菌 OcDH に共通して存在する NAD/NADP 依存型脱水素酵素に特有な GxGxxG/A モチーフが Ahp-TaDH の N 末端にも存在した (図 3). 得られた N 末端アミノ酸配列をホモロジー検索に付したところ, 2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase, 2-poly-prenyl-6-methoxyphenol hydroxylase, amide dohydrolase との類似性が認められた. しかしながら, これらのタンパク質と TaDH との間の機能的な類似性は不明である.

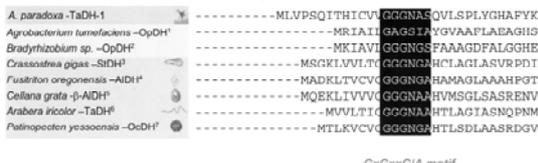


図 3. Ahp-TaDH1 の N-末端アミノ酸配列と微生物および海産無脊椎動物オピン脱水素酵素の N-末端アミノ酸配列の比較.

Ahp-TaDH1 および Ahp-TaDH2 の LEP 消化後の逆相 HPLC のチャートを図 4 および図 5 に示した. 手動分画した各ピークについてアミノ酸配列の解析を行った.

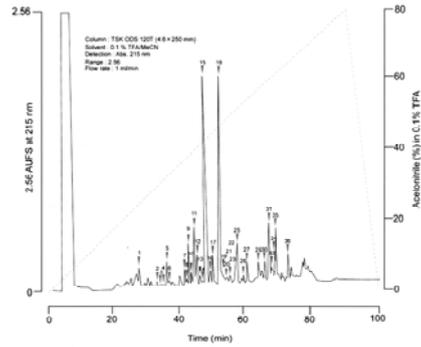


図 4. Ahp-TaDH1 の LEP 消化断片ペプチドの分画とアミノ酸配列分析結果.

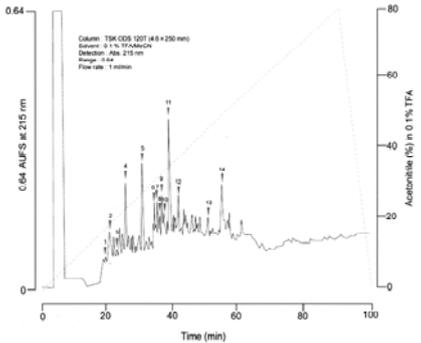


図 5. Ahp-TaDH2 の LEP 消化断片ペプチドの分画とアミノ酸配列分析結果.

**(4) cDNA クローニング**

(3) で得られた部分アミノ酸配列の情報をもとに縮重プライマーを設計し, Ahp-TaDH1 の cDNA クローニングを試みたが, 目的 DNA の増幅に至らなかった. 設計した縮重プライマーを表 4 に示す. 海藻からの RNA の抽出自体が粘性多糖類の存在によって妨害され低効率であることから各種の抽出法を試みたが, 何れの方法で調製した cDNA でも増幅は確認できなかった. 抽出手法上の問題がないことは他の実験系で確認されたこと, また, RNA が抽出されていることがアガロースゲル電気泳動で確認されたことから, 縮重プライマーの設計または材料のハリガネに問題があることが予想された. TaDH の精製と性状および部分アミノ酸配列の解析は岩手県大船渡沿岸のハリガネを材料として実施したものであるが, 平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災の影響により, 三陸沿岸の海藻類はハリガネを含め壊滅的な被害を被った. ハリガネについては地盤沈下の影響もあり, 現在も採集できる状況になっていない. また, 研究者自身も大船渡から相模原へ研究拠点を移さざるを得ない状況となり, cDNA のクローニングには千葉県および神奈川県沿岸のハリガネを材料とした. 神奈川県産のハリガネについてエキス中の Tau0p 含量を調べたところ, 前駆アミノ酸である Taurine の存在は確認されたものの, Tau0p は全く認められなかった. この結果は, 神奈川県産ハリガネの TaDH 活性

が極めて弱いか、ほとんどないことを示唆する。従って、本研究の継続のためには三陸沿岸でのハリガネの再生を待たねばならないだろう。一方、神奈川県産のハリガネに TauOp が認められないという事実は、TauOp の生理機能を考察するうえで極めて興味深い。すなわち、TauOp が海藻の生息環境（海水温等）と関係していることが推測できるからである。今後はより多くの海藻種を対象として三陸産と神奈川県産海藻の TauOp 含量の比較調査を行って見る必要がある。

表 4. PCR に用いた縮重プライマー

プライマー	Nucleotide sequence	塩基数
N-terminal	MLVFS-Q--I--T--H--I--X--VVGGNASQVLSFLYGHAFYK	
Ahp-TaDH-1-N1	5'-CARATHACNCAYGHTGYGT-3'	20
Ahp-TaDH-1-N2	5'-CARATHACNCAYGHTGYGT-3'	20
15	LIR-W--A--Q--Y--H--I--D-DG	
15-1	3'-RTCDATRTGNACCTGGGCCA-5'	21
15-2	3'-RTCDATRTGNACCTGGGCCA-5'	21
18	V-H--F--T--P--Q--Y--N--GLFYDMTK	
18-1	3'-CCCCARTAYTGGNGGTRAACAT-5'	23
18	VMFTPOYWL-F--Y--D--M--T--K-	
18-2	3'-YTTNGTCATRTCTARAA-5'	18

(5) 藻体部位, 成長段階, 季節による TauOp 含量の変動

#### 藻体部位

藻体を下部, 中部および上部に分別し, TauOp 含量を測定したところ, 上部 (80 nmol/g) で最も高く, 中部 (28 nmol/g) で最も低い含有量を示した (図 9)。

材料としたハリガネの大きさは約 20 cm で, 生長期であると考えられた。スギノリ目の海藻は一般に頂端生長する。ハリガネも頂端細胞をもち, 頂端生長する。ハリガネ藻体の上部に高い TauOp 含量が認められたのはこの頂端細胞との関係が考えられる。頂端部を含むさらに詳細な TauOp 含量の調査が必要である。

#### 日周変動

藻体を屋外水槽に収容し, TauOp 含量の日周変動を調査した。TauOp 含量は 49~118 nmol/g に渡って変動した (図 10)。光量の多い時間帯よりも日没に近い, 光量の少ない時間帯で TauOp が増加する傾向が認められた。紅藻の多くは少量の光で生活できる陰性植物的であることとの関連性も考えられるが, 水温がより支配的な要因である可能性も考えられる。

#### 季節変動

2010 年 1 月~11 月の各月に藻体を採取し, TauOp 含量および TaDH 活性を測定した。TauOp 含量は 6~236 nmol/g に渡って変動し, 2 月と 7 月に増加した。一方 TaDH 活性は, 0.02~0.51 units/g に渡って変動したが, TauOp 含量の変動との明確な関連性は見出せなかった (図 11)。藻体の部位, サンプルングのタイミングによっても TauOp 含量が変動するという結果が得られているため, 長期間の変動の傾向は明確になり難い。特に, 自然環境下での調査では変動要因が多すぎるため, 今

後は人為的にコントロールされた環境下における実験が必要であると考えられる。

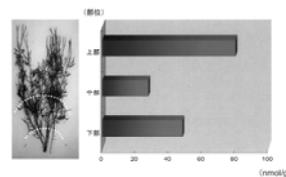


図 9. ハリガネの部位によるタウロピン含量の違い。

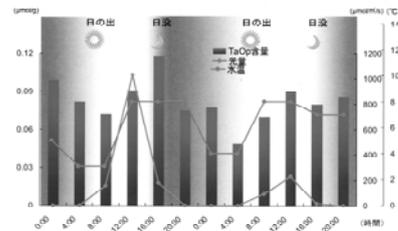


図 10. ハリガネのタウロピン含量の日周変動。

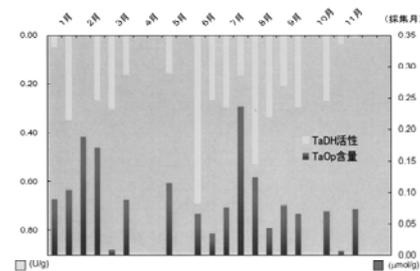


図 11. ハリガネのタウロピン含量およびタウロピン脱水素酵素活性の周年変動。

(6) タウロピン資性化細菌

2010 年度に三陸沿岸より採取したハリガネ, アカバギンナンソウ, ツノマタ等の海藻から付着海洋細菌を分離し, TauOp を C・N 源とする培地を用いて TauOp 資性化細菌 2 株を単離した。ハリガネ TaDH の cDNA クローニングの結果と合わせて, 細菌中に TaDH をコードする DNA の存在を検証する予定であったが, cDNA のクローニングが成功しなかったこと, 東日本大震災とその後のキャンパス移転等により単離細菌の管理ができなくなってしまったため廃棄処分とした。

#### 5. 主な発表論文等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菅野 信弘 (KAN-NO NOBUHIRO)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号: 40169800

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし