

海産渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* における ジメチルスルフォニオプロピオン酸の生合成に関する研究

北口 博隆*

Studies on the Biosynthesis of Dimethylsulfoniopropionate in the Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*

Hiroataka Kitaguchi*

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (11), 1-57 (2000)

Dimethylsulfide (DMS) is the major sulfur compound released from ocean to the atmosphere. As 80 % of biogenic sulfur emitted from ocean is DMS, it has significance for the global sulfur cycle. However, the conversion of sulfate to DMS was the missing link in the global sulfur cycle. Emitted DMS is oxidized to sulfate which plays an important role in cloud formation, thereby it may commit to the acid precipitation and the climate regulation. It is generally thought that the precursor of DMS is dimethylsulfoniopropionate (DMSP), which is cleaved enzymatically or in alkaline condition to produce DMS and acrylate. DMSP is a growth promotive compound for fish, and acts as an anti ulcer agent in rat. The primary DMSP producers are marine macro- and microalgae, and the possible biological function of DMSP in algae is osmolyte. But the mechanism controlling DMSP pool is still unknown. Investigation of the DMSP biosynthesis has significance in understanding the missing link in global sulfur cycle and the osmoregulation mechanism, however the biosynthetic pathway of DMSP has been little known. Recently, two pathways were reported. One of them was found in a flowering plant *Wollastonia biflora* which produce DMSP from S-methylmethionine (SMM) and the other was found in a green alga *Enteromorpha intestinalis* which produce DMSP via 4-methylthio-2-oxobutylate (MTOB). These results suggest that the several pathways exist in DMSP biosynthesis.

* 海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

In this study, the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, the producer of a large amount of DMSP, was used for investigating the biosynthesis of DMSP. The results obtained in this study are described below:

(1) The incorporation of L-methionine into DMSP was examined by the *in vivo* radiotracer experiments. In two hour incubation, the methyl, C3, and C4 carbons, and the sulfur atom of L-methionine were effectively incorporated into DMSP. But the C1 carbon of L-methionine was not incorporated into DMSP. These results suggest that L-methionine is the close precursor of DMSP and the synthetic pathway is consistent of decarboxylation, deamination followed by oxidation, and methylation.

(2) The dilution effects of SMM, MTOB, and 3-methylthiopropionate (MTP) to the incorporation of L-methionine into DMSP was examined. SMM and MTOB did not affect the incorporation of L-methionine into DMSP. But MTP strongly inhibited the incorporation of L-methionine into DMSP. These results suggest that the pathway is the conversion of L-methionine into DMSP by decarboxylation (the putative product is 3-methylthiopropylamine (MTPA)), deamination followed by oxidation (the putative product is MTP), and methylation (the putative product is DMSP) in this order.

(3) The enzymatic activities of decarboxylation of L-methionine, deamination followed by oxidation of MTPA, and methylation of MTP were detected in the crude extract of *C. cohnii*. These results confirm the evidence of this pathway in *C. cohnii*.

(4) L-Methionine decarboxylase [EC 4.1.1.57], which should be the key enzyme in DMSP biosynthesis from L-methionine, was purified from *C. cohnii*. After four purification steps including anion exchange chromatography and size-exclusion chromatography, the enzyme was purified 215-fold and the yield was 0.1%. The purified enzyme showed a single protein band on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The molecular weight of the enzyme estimated by gel filtration was 204,000 and that estimated by SDS-PAGE was 100,000. The optimum pH of the enzyme was pH7.3. The optimum temperature of the enzyme was 30 °C. The enzyme was pyridoxal 5'-phosphate dependent decarboxylase. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Ala-Leu-Cys-Trp-Ser-Asp-Ile-Ser-Pro. The decarboxylated product of L-methionine by the enzyme was MTPA.

(5) To investigate the physiological role of DMSP in *C. cohnii*, the effects of salinity changes on intracellular DMSP content and L-methionine decarboxylase activity were determined. The salinity upshift resulted the accumulation of DMSP in cells. The methionine decarboxylase activity was also stimulated by the salinity upshift. These results suggest that the high osmolarity stimulates the production of DMSP and DMSP acts as the osmoprotectant in *C. cohnii*. But the evidence that the accumulation of DMSP occurred rapidly in high salinity than in *E. intestinalis* suggests the regulation

渦鞭毛藻の含硫化合物生合成に関する研究

mechanisms of these organisms are different. It may be due to the difference of DMSP biosynthetic pathway.

Key words: biosynthesis, compatible solute, *Cryptothecodinium cohnii*, decarboxylase, dimethyl sulfide, dimethylsulfoniopropionate, dinoflagellate, L-methionine, osmoprotectant

キーワード: 生合成, 二面性溶質, 脱炭酸酵素, 硫化ジメチル, ジメチルスルフォニオプロピオン酸, 渦鞭毛藻, メチオニン, 浸透圧調節

第一章 序 論

揮発性有機硫黄化合物である硫化ジメチル (dimethylsulfide: DMS) ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$) は、緑茶¹⁾、トマト²⁾、スウィートコーン³⁾、ビール⁴⁾、マッシュルーム⁵⁾などの製造、加工過程で発生する香気および臭気成分として報告されている。また、DMS は海洋における独特の匂い、いわゆる「磯の香」の主成分でもあり、ノリなどの海藻⁶⁻⁸⁾、またオキアミ、エビ、カワハギなどの海産物中^{9,10)}に検出され、海産物特有の香気成分となることが知られている。

最近、この DMS が、地球規模の硫黄循環にとって重要な役割を担っていることが明らかになってきた¹¹⁻¹⁴⁾。地球上での硫黄の循環を理解するためには、何らかの形態での硫黄の海洋から陸上への輸送経路の存在を考えなければならないが、1970 年代までは、水圏から気圏への硫黄の輸送に大きく寄与しているとされていたのは海洋であり、特に潮間帯で硫酸還元菌の作用によって生じる硫化水素の放出が高く見積もられていた^{15, 16)}。しかし、海洋の大部分は酸化環境であり、硫酸還元菌の生息場所は広い海洋のごく一部に過ぎず、海洋において検出される硫化水素の実測値のデータが蓄積されるにともなうて、沿岸域での硫化水素の測定値をそのまま全海洋表面に当てはめることの妥当性が疑問視されるようになった。Lovelock ら¹⁷⁾による海洋表面からの DMS の発見によって、硫化水素にかわる海洋における気体状硫黄の供給源として揮発性有機硫黄化合物が注目されることとなり、海洋大気中での DMS など生物起源の硫黄化合物の測定が本格的に行われるようになった。その結果、生物起源の気体状硫黄化合物の排出量は 98 TgS/year と化石燃料の燃焼など人為起源の排出量に匹敵すると見積もられ、そのうち海洋起源の気体状硫黄は 50 TgS/year であった。DMS は 40 TgS/year であり、生物起源全体でも 40 %、海洋起源に限ってみれば 80 % と大きな割合を占め、地球規模の硫黄循環に重要な物質であることが明確となった¹³⁾。

海洋表層において DMS は一次生産力の高い海域に多いとされ¹⁸⁾、また、DMS の垂直分布はクロロフィル a の垂直分布と相関があるという報告がある¹⁹⁾。また、沿岸部および海岸付近にある塩沼は DMS 生産力が高く、硫黄循環に大きく関与していると言われており^{11, 20)}、塩沼に生育する顕花植物がその生産者であるとされている²¹⁾。海洋における DMS の生産者については、Haas²²⁾が、紅藻類を空气中に放置すると DMS が生成することを報告して以後、緑藻などの大型藻類^{6, 8, 23)}、あるいは渦鞭毛藻²⁴⁾やハプト藻^{18, 25)}などの微細藻類が DMS を生産することが報告されている。藻類における DMS の前駆物質は、Challenger and Simpson²⁶⁾によって紅藻 *Polysiphonia fastigiata* に存在することが明らかにされたジメチルスルフォニオプロピオン酸 (dimethylsulfoniopropionate: DMSP) である^{8, 27, 28)}。DMS は、DMSP の酵素的分解によりアクリル酸とともに生成されるが、この反応を触媒する酵素である DMSP リアーゼは、DMSP 生産者である藻類にも、分解者である細菌にも存在することが報告されている²⁹⁻³⁸⁾。

これらのことから、海洋における硫黄循環には以下に述べるような経路を考えることができる (Fig. 1-1)。海水中に豊富に存在する硫酸を藻類が取り込み、DMSP その他の含硫化合物を合成する。DMSP は、藻体自身によって DMS に分解され細胞外に放出されるか、あるいは細胞外に放出された後細菌などによって DMS に分解される。DMS の一部は揮発せずに海水中で humic acid のような光感剤の存在下で酸化されてジメチルスルフォキサイド (dimethylsulfoxide: DMSO) になり、さらに酸化されてジメ

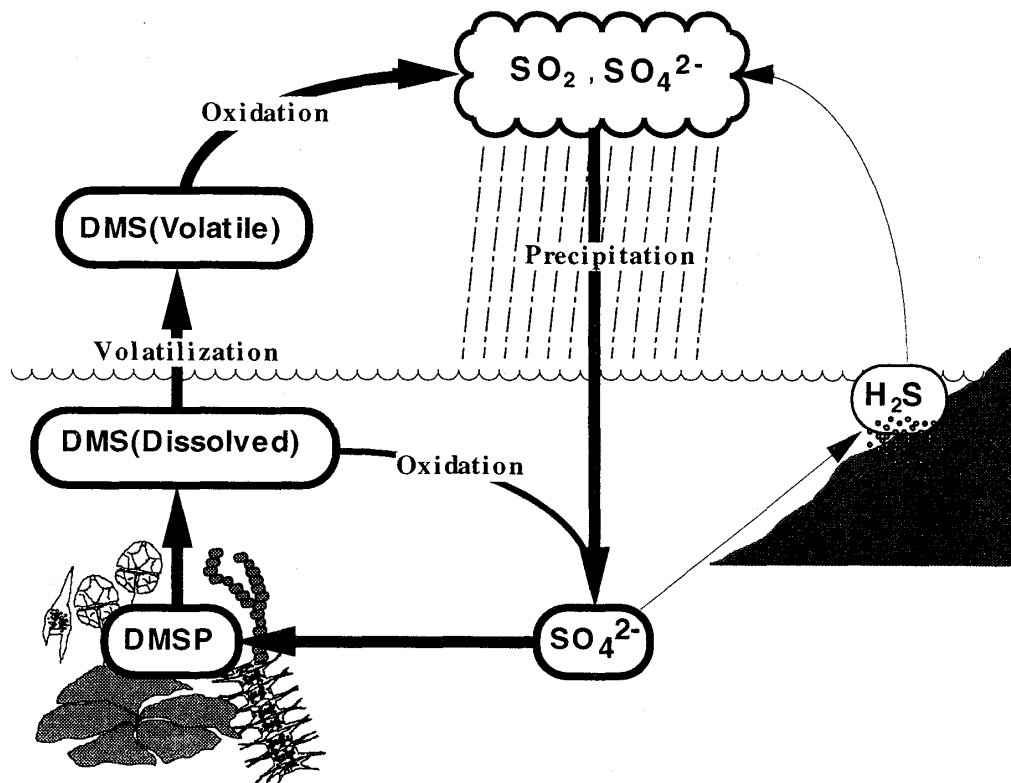


Fig. 1-1. Possible diagram of marine sulfur cycle.
DMS, dimethylsulfide; DMSP, dimethylsulfoniopropionate.

チルスルフォン (dimethylsulfone: DMSO_2) となり、最終的に硫酸にまで酸化される。揮発した DMS は大気中で水酸基ラジカルによる光化学的酸化反応を受け、二酸化硫黄 (SO_2)、メタンスルホン酸 (methanesulfonic acid: MSA)、硫酸になり、 SO_2 と MSA も最終的には硫酸にまで酸化される。硫酸は大気中で粒子として存在し、強い吸湿性を持つことから雲凝結核 (cloud condensation nuclei: CCN) として作用し、雲粒を形成して雨となって降り注いで陸上から海洋に還る。これらの経路によって、海洋に硫酸が再び供給されると考えられる。

DMS の主たる起源は海洋における一次生産者である藻類で、DMS は硫酸まで酸化されて CCN となって日照や太陽光の反射率であるアルベドに影響することから、地球規模の気候調節に関わっているともいわれている³⁹⁾。日照が増大すると一次生産が増大し、それによっても DMS の生産量も増大する。DMS が大量に放出されると日照が減少し一次生産力も減少する。すると DMS の生産量も減少し雲が減り、日照が増大する。この繰り返しが気候の変動の一端を担っている可能性がある。また、藻類は、 CO_2 固定によって温室効果ガスを減少させるとともに、DMS の放出によるアルベドの増大によって地表の温度上昇を押さえ、温室効果による気温上昇を押さえているのではないかと考えられる。その他に、氷期への移行時に正のフィードバック機構として、海洋における一次生産の増大によっても DMS の放出がアルベドの増大による地表温度の低下をもたらす可能性が指摘されている⁴⁰⁾。

DMS の前駆物質である DMSP は、海洋生物が生産する生理活性物質として注目されている。DMSP

は、魚類に対して摂餌誘因効果を持つことが報告され⁴¹⁾、さらに魚類飼料に DMSP を混ぜて飼育した場合には混ぜなかった場合に比べ成長が良好であることが認められている^{42, 43)}。また、DMSP の分子構造が胃腸薬として用いられている S-メチルメチオニンに類似していることから、S-メチルメチオニンの持つ抗胃潰瘍作用の有無についてラットを用いて調べたところ、DMSP にも抗胃潰瘍作用があることが確認された^{44, 45)}。その他、DMS はノリやウニなどの香気成分であり、香料としての利用が考えられる。DMS の前駆物質である DMSP をシクロデキストリンにより保持することで、DMS の独特の香気を食品に持たせることも試みられている⁴⁶⁾。

DMS, DMSP, およびアクリル酸の藻類における機能については以下の仮説がある。DMS については、還元型硫黄化合物は捕食に対する防御効果がある⁴⁷⁾、DMS を生産することで重い硫酸塩を減らし浮力を調節している⁴⁸⁾、といった説である。アクリル酸は、細菌の攻撃を防ぐ⁴⁸⁾、藻類の粘液の構成成分であり抗菌作用がある⁴⁹⁾、といったことが報告されている。しかし、これらはいずれも実験的に確かめられたものではない。DMSP は、動物や微細藻類において、S-アデノシルメチオニンや S-メチルメチオニンなどと同様にメチル基供与体として作用することが報告されている⁵⁰⁾。また、淡水産藻類は海産藻類に比べて DMS の生産量が少ない、という報告があり⁵¹⁾、DMSP を生産する生物には、潮間帯や汽水域に生息する藻類、また塩沼に生育する顕花植物など浸透圧変化の大きい環境に生育するものが多いことから、これらの生物において浸透圧調節物質として機能しているのではないかと研究が進んできた。環境中の浸透圧の上昇にともなって細胞内に蓄積され、細胞の活動に影響を与えない物質を二面性溶質 (compatible solute) と呼び⁵²⁾、ベタイン類やグリセロール、トレハロースなどが知られている。*Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis*, *Blidingia minima* などの緑藻類^{32, 53-55)}, *Hymenomonas carterae*, *Tetraselmis subcordiformes* などの微細藻類^{25, 56-58)}, *Spartina alterniflora*, *S. foliosa*, *Wollastonia biflora* といった顕花植物^{21, 59-61)} において、塩濃度の上昇にともなって DMSP が蓄積されることが報告された。また、DMSP は生体内に存在する程度の濃度で *T. subcordiformes* 由来のリンゴ酸脱水素酵素などの活性を阻害しないことが示された⁶²⁾。以上のことから、藻類において DMSP は、浸透圧の上昇に伴って細胞内に蓄積し代謝系に影響しないことから二面性溶質として浸透圧調節に関与しているものと考えられるが、DMSP 生合成の調節機構などはいまだ不明である。また、南極域に生息する *Phaeocystis pouchetii* などの藻類に DMSP を多く含む種が存在し、DMSP はこれらの種において抗凍結物質としての機能をもつと考えられている⁶³⁾。

DMSP は、その構造がメチオニンに類似しており、メチオニンおよびその誘導体から生合成されると考えられる。メチオニンの代謝経路に関しては、哺乳動物においては、S-アデノシルメチオニン、ホモシステインを経てシスタチオニン、システインに至るメチル基転移経路によって代謝されることはよく知られている⁶⁴⁾ が、アミノ基転移経路によって代謝されるという報告もある。この経路は、メチオニンがアミノ基転移反応により 4-メチルチオ 2-オキソ酪酸 (4-methylthio-2-oxobutylate: MTOB) となり、さらに脱炭酸されて 3-メチルチオプロピオン酸 (3-methylthiopropionate: MTP) となつて、さらにメタンチオールや DMS が合成されるというものである⁶⁵⁾。微生物におけるメチオニン代謝は、上記のメチル基転移経路、アミノ基転移経路に加えて、オキシブチル酸を生じる脱チオメチル基反応、3-メチルチオプロパンアミン (3-methylthiopropylamine: MTPA) を生じる脱炭酸反応などが知られている⁶⁶⁾。メチオニンの誘導体としては、Cantoni⁶⁷⁾ によって「活性メチオニン」として同定された S-アデ

ノシルメチオニンが有名であるが、上記したようにメチル基供与体として機能する以外にポリアミン合成におけるアミノプロピル基供与体となることも知られている。ポリアミン（プトレシン、スペルミジン、スペルミン）は、細胞内酸性成分（核酸、リン脂質、ATP）に結合して、特定のタンパク質の合成を促進し、細胞の増殖や分化の調節に関わるとされる物質である⁶⁸。ポリアミン合成は、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素やオルニチン脱炭酸酵素によって調節されていると考えられ、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の調節機構は多くの研究がなされている^{69, 70}。渦鞭毛藻 *Gonyaulax polyedra* より抽出、精製されたゴニオリンも、メチオニンから合成されると考えられている^{71, 72}。ゴニオリンは、*G. polyedra* が示す周期的な発光現象の周期を短縮させる作用があり、概日性 (circadian) リズムをコントロールする物質として興味深い。

一方、DMSP の代謝については、DMS とアクリル酸への分解が最もよく研究されている。塩沼の底泥、沿岸海水、海底の微生物マットには DMSP を分解して DMS を生じる活性があることが報告され^{33, 73, 74}、これらの環境から DMSP 分解菌が分離されている^{35, 75, 76}。この反応を触媒する DMSP リアーゼは、緑藻 *Ulva conglobata*⁸、*U. curvata*³⁸、*Enteromorpha clathrata*⁷⁷、紅藻 *Porysiphonia* sp.^{29, 78}、渦鞭毛藻 *Gyrodinium* (現在は *Crypthecodinium*) *cohnii*³¹、ナンキョクオキアミ *Euphausia superba*、マガキ *Crassostrea gigas*¹⁰、*Alcaligenes-like* marine isolate³⁶、*Pseudomonas doudoroffii*³⁷ など報告されている。DMSP リアーゼは、ナンキョクオキアミで分子量 58,000 のサブユニット 2 個からなる分子量約 120,000 の二量体であると報告されている¹⁰。また、*U. curvata*³⁸、*Alcaligenes-like* marine isolate³⁶、*P. doudoroffii*³⁷ では、完全精製され、すべて単量体であると報告されている。その他の DMSP の代謝経路としては、脱メチル化産物である 3-メチルチオプロピオン酸をへて 3-メルカプトプロピオン酸あるいはメタンチオールを生成する経路⁷⁹ が報告され、関与する細菌が単離されている⁸⁰。

DMSP は、DMS の前駆物質として地球規模の硫黄循環を考える上で重要な物質であり、DMSP の主な生産者である藻類における DMSP 生合成経路を解明することは硫黄循環のミッシング-リンクを解明するということにつながると考えられる。また、DMSP の生理機能や生理活性物質としての DMSP の応用面を考える上でも DMSP 生合成経路の解明が重要であると考えられる。DMSP の生合成経路に関する最初の報告は、Greene⁸¹ が緑藻 *Ulva lactuca* においてメチオニンに近い前駆体であり、メチオニンの硫黄とメチル基は DMSP に移行することを示したものである。また、Kahn⁸² は、グリシンが DMSP 生合成のメチル基供与体になることを報告した。しかし、その後 DMSP 生合成経路については長い間研究は進展していなかった。それから 20 年を経て、Vairavamurthy ら²⁵ は、ハプト藻 *H. carterae* が硫酸塩、亜硫酸塩、チオ硫酸塩、システインを硫黄源として DMS を合成することから、硫酸塩からシステインを経て DMSP を合成すると考察したが、その間の反応および中間体などは未知のままであった。その後、1990 年代に入って、顕花植物 *W. biflora* および緑藻 *E. intestinalis* における DMSP 生合成経路について報告がなされた⁸³⁻⁸⁵。*W. biflora* では、DMSP は S-メチルメチオニンから脱アミノ反応、脱炭酸反応を経て合成され、*E. intestinalis* においてはメチオニンから脱アミノ反応、メチル基付加反応、および脱炭酸反応を経て合成されるとされている。このように、メチオニンから DMSP を合成する経路は生物種間で異なること、またその生理機能、合成の調節機構も多様性があることが示唆されている。

そこで本研究では、汽水域の貯木場などに生育し DMSP を大量に生産する従属栄養性の渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* を用いて DMSP 生合成経路の解明を試みた。渦鞭毛藻は、真核生物でありながらヒストンを持たないなどの特徴を持つことから進化的にも興味深い生物であり、また本種以外にも *Gymnodinium mikimotoi* など赤潮を形成する藻類に DMSP 産生種があり、特に沿岸域における DMSP の産生に大きく関与していると考えられる。まず、第二章では、RI 標識メチオニンを用いた *in vivo* トレーサー実験によってメチオニンが DMSP の近い前駆物質であるかを検討し、DMSP 生合成の中間体と予想される未標識化合物による希釈効果によって DMSP 生合成経路を推測した。さらに、*C. cohnii* 粗酵素液中に DMSP 生合成経路を触媒する酵素群の活性を検索した。第三章では、*C. cohnii* における DMSP 生合成経路の第一段階を触媒するメチオニン脱炭酸酵素の精製、諸性質の検討、反応産物の特定を試みた。第四章では、塩濃度の変化に対する *C. cohnii* 細胞内 DMSP 量の変動、DMSP 生合成経路の鍵酵素と考えられるメチオニン脱炭酸酵素の比活性の変動について検討し、*C. cohnii* における DMSP の生理機能を考察した。

第二章 海産渦鞭毛藻 *Cryptothecodinium cohnii* の DMSP 生合成経路

第一節 *in vivo* トレーサー実験による DMSP 生合成経路の解明

緒 言

DMSP の生合成経路については、Greene⁸¹⁾ が緑藻 *Ulva lactuca* においてメチオニンが近い前駆体であることを報告したが、メチオニンから DMSP への経路の中間体は不明であった。ごく最近になって、顕花植物 *W. biflora* および緑藻 *E. intestinalis* における DMSP 生合成経路について研究がなされ、*W. biflora* では、DMSP は S-メチルメチオニンから脱アミノ反応、脱炭酸反応を経て合成され、*E. intestinalis* においてはメチオニンから脱アミノ反応、メチル基付加反応、および脱炭酸反応を経て合成されると報告されている⁸³⁻⁸⁵⁾。このように、DMSP はメチオニンおよびその誘導体から生合成されることが明らかとなってきたが、この経路は生物によって異なる点が興味深い。このことから、DMSP を産生する生物は、その系統分類上の位置、また生育環境などによって異なる DMSP 生合成経路を持ち、またそれらの生物における DMSP の生理機能についても異なる可能性が示唆される。本研究では、巨大な核を持ちながら真核生物の核構造に必須のヒストンを持たないなど進化的に興味深く、またその細胞内に大量の DMSP を蓄積する渦鞭毛藻 *C. cohnii* を用いて DMSP 生合成経路の解明を試みた。

本節では、まず、*C. cohnii* においてもメチオニンが近い前駆物質であるかを *in vivo* トレーサー実験によって検討した。RI 標識メチオニンを *C. cohnii* に取り込ませ、経時的にサンプリングした藻体内の低分子化合物中の RI 標識化合物を同定した。メチオニンが DMSP の近い前駆物質であれば、RI 標識メチオニンは速やかに DMSP に代謝され、RI 標識 DMSP が観察されることが考えられる。また、メチオニンのどの部分が DMSP 生合成に利用されるのかを明らかにするため、標識部位の異なるメチオニンを *C. cohnii* に取り込ませてそれぞれの標識部位が DMSP に移行するかを検討した。さらに、メチオニンと DMSP の構造を比較することにより、DMSP はメチオニンから脱炭酸反応、脱アミノ反応、およびメチル基付加の三反応によって合成されると予想されるため、それらの反応がどのような順序で起こるのかを検討した。RI 標識メチオニンとともに、すでに報告されている DMSP 生合成経路の中間体とされている S-メチルメチオニン (S-methylmethionine: SMM), 4-メチルチオ-2-オキシ酪酸 (4-methylthio-2-oxobutylate: MTOB), および異なる経路を持つ場合に中間体と予想される 3-メチルチオプロピオン酸 (3-methylthiopropionate: MTP) をそれぞれ培地中に加えて RI 標識メチオニンの代謝産物を分析した。加えた未標識の化合物が中間体であれば標識メチオニンが DMSP になる割合が減少する希釈効果が観察されることが考えられる。

材料および方法

実験に用いた藻類とその培養 本実験には、*C. cohnii* ATCCe32001 株を用いた。本藻は、汽水域の貯木場などに生息し、高い DMSP 含量を持つ従属栄養性の渦鞭毛藻である。本藻を ESW 培地（濾過海水に 2 % D-(+)-グルコースと 0.2 % 乾燥酵母エキス (Difco 社製) を添加）で 25 °C、暗所で静置

培養した。

取り込み実験 4日間静置培養した *C. cohnii* の培養液を滅菌したガラスバイアルに各 6ml 分注した。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン (比活性 40 TBq/mmol, ARC 社製), $[3,4\text{-}^{14}\text{C}]$ メチオニン (比活性 2.2 GBq/mmol, ARC 社製), $[\text{methyl-}^{14}\text{C}]$ メチオニン (比活性 1.7 GBq/mmol, ARC 社製), $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ メチオニン (比活性 2.0 GBq/mmol, ARC 社製) 各 444 kBq をそれぞれ添加し, 培養と同条件でインキュベートした。0, 15, 30, 60, 120 分後に培養より 1 ml ずつエッペンドルフチューブに採取し, 遠心分離 (1600 x g, 5 min) により藻体を集めた後 ESW 培地で 2 回洗浄し細胞表面の標識化合物を除いた。培地を除いた沈澱に 4 % 過塩素酸 0.5 ml を加えて低分子画分を抽出し, 遠心分離して細胞壁やタンパク質などの高分子画分を除いた。上清を 5 N KOH で中和し, 析出したカリウム塩を除いて細胞内低分子画分試料とした。

メチオニンから DMSP への生合成の中間体の検討 取り込み実験と同様に分注した *C. cohnii* 培養液に, $[^{35}\text{S}]$ メチオニン (比活性 40 TBq/mmol, ARC 社製) 444 kBq と未標識の SMM, MTOB および MTP をそれぞれ 1 mM 添加し, 培養と同条件でインキュベートした。0, 15, 30, 60, 120 分後に培養より 1 ml 採取し, 上記と同様に低分子画分試料を調製した。

二次元薄層クロマトグラフィー 調製した *C. cohnii* 細胞内低分子画分試料は, 二次元薄層クロマトグラフィー (2D-TLC) で分析した。展開相には DC-Fertigplatten Cellulose 200 x 200 mm (Merck 社製) の固定相を用いた。展開溶媒には, *n*-ブタノール:酢酸:水 = 4:1:1, およびフェノール:水 = 7:3 の 2 種を用いた。展開, 乾燥後, 2D-TLC プレート上の放射活性分布をラジオクロマナイザー JTC-501 (Aloka 社製) で測定した。観測されたスポットの位置はオーセンティックな含硫化合物の位置と比較して化合物を特定した。総放射活性に対する各化合物の放射活性の割合を算出し, メチオニンの代謝産物の経時変化を検討した。

結 果

標識メチオニンの代謝産物 取り込み実験において, 低分子画分試料の調製に 15 分かかるため, 試料を採取するまでの時間に 15 分を加えてインキュベート時間とした。*C. cohnii* に, $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを取り込ませ, RI 標識化合物を経時的に 2D-TLC 分析した結果を Fig. 2-1A に示す。インキュベート時間 15 分 から DMSP と一致する位置にスポットが現われ, 時間とともに全標識化合物に占める DMSP の割合は増加し, 135 分では標識された低分子化合物の約 90 % が DMSP となった。また, *C. cohnii* に $[3,4\text{-}^{14}\text{C}]$ メチオニンを取り込ませて, RI 標識化合物を経時的に 2D-TLC 分析した結果を Fig. 2-1B に示す。インキュベート時間 1 時間以内に全標識低分子化合物の 90 % が DMSP となった。次に, $[\text{methyl-}^{14}\text{C}]$ メチオニンを *C. cohnii* に取り込ませ RI 標識化合物を経時的に 2D-TLC 分析した結果を Fig. 2-1C に示す。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[3,4\text{-}^{14}\text{C}]$ メチオニンよりも速やかに全標識化合物に占める DMSP の割合は増加した。一方, $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ メチオニンを取り込ませ, RI 標識化合物を 2D-TLC 分析したところ, 2 時間後にも DMSP に相当する位置には検出されず, ほとんどがメチオニンおよびメチオニンスルフォキサイドであった (Fig. 2-1D)。

中間体と予想される化合物による希釈効果 *C. cohnii* に $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを添加した短時間培養系において SMM, MTOB, および MTP を過剰に加えてそれらの化合物がメチオニンから DMSP の生合

成に与える影響を検討した結果を Fig. 2-2 に示す。SMM では、75 分後には検出される標識化合物の 75 % が DMSP であり希釈効果は見られず、無添加の場合よりメチオニンから DMSP への移行が促進される傾向が見られた (Fig. 2-2A)。MTOB では、各標識化合物の割合の経時変化は無添加の場合とほぼ同じ挙動を示し、希釈効果は見られなかった (Fig. 2-2B)。MTP を加えた場合には、135 分後にも検出される標識化合物の 90 % 以上はメチオニンおよびメチオニンスルフォキサイドであり、DMSP は検出されなかった (Fig. 2-2C)。

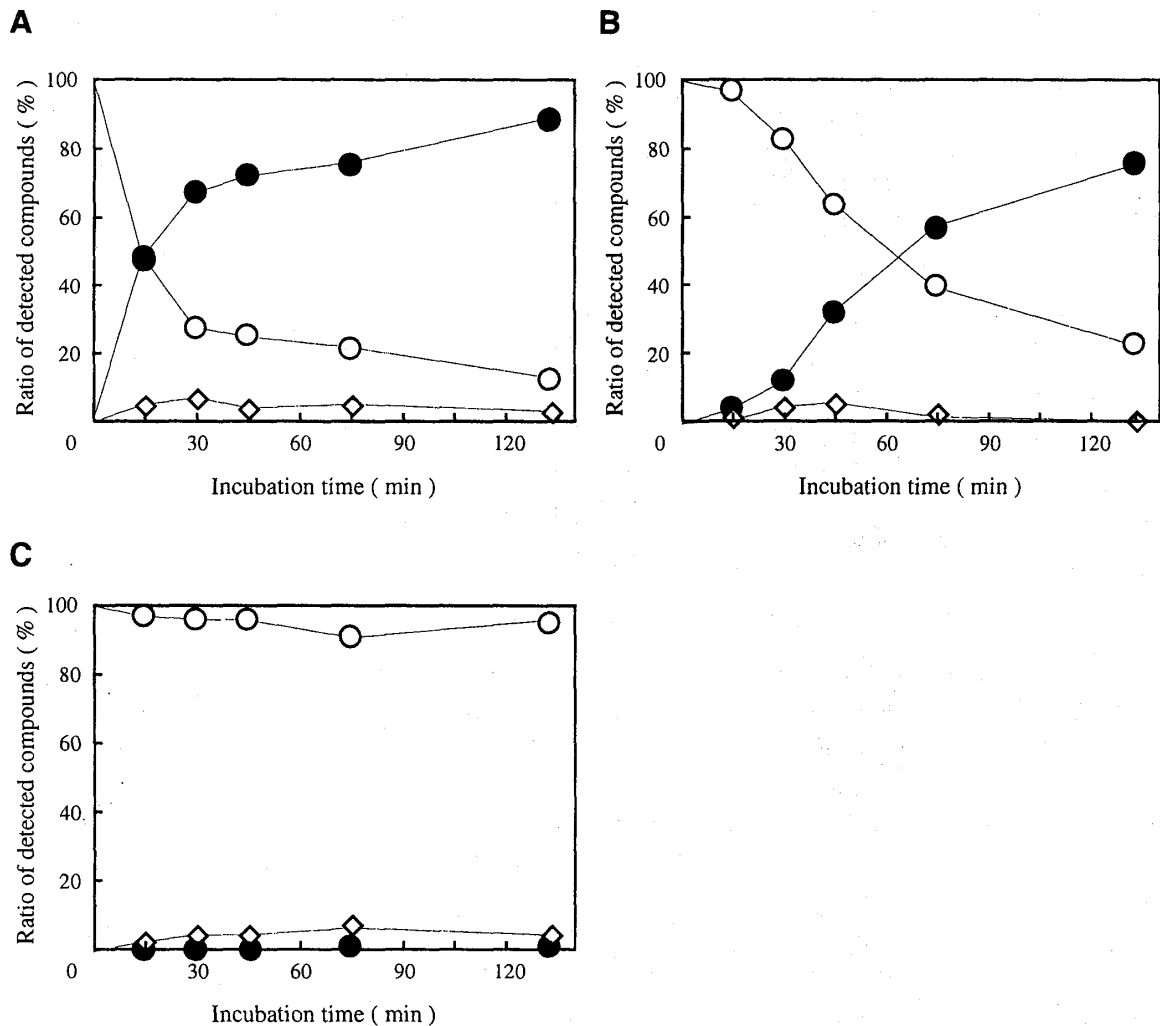


Fig. 2-2. Ratio of detected compounds in PCA soluble fraction of *C. cohnii* incubated with [35 S] methionine and SMM (A), [35 S] methionine and MTOB (B), and [35 S] methionine and MTP (C).
○, methionine and methionine sulfoxide; ●, DMSP; ◇, others.

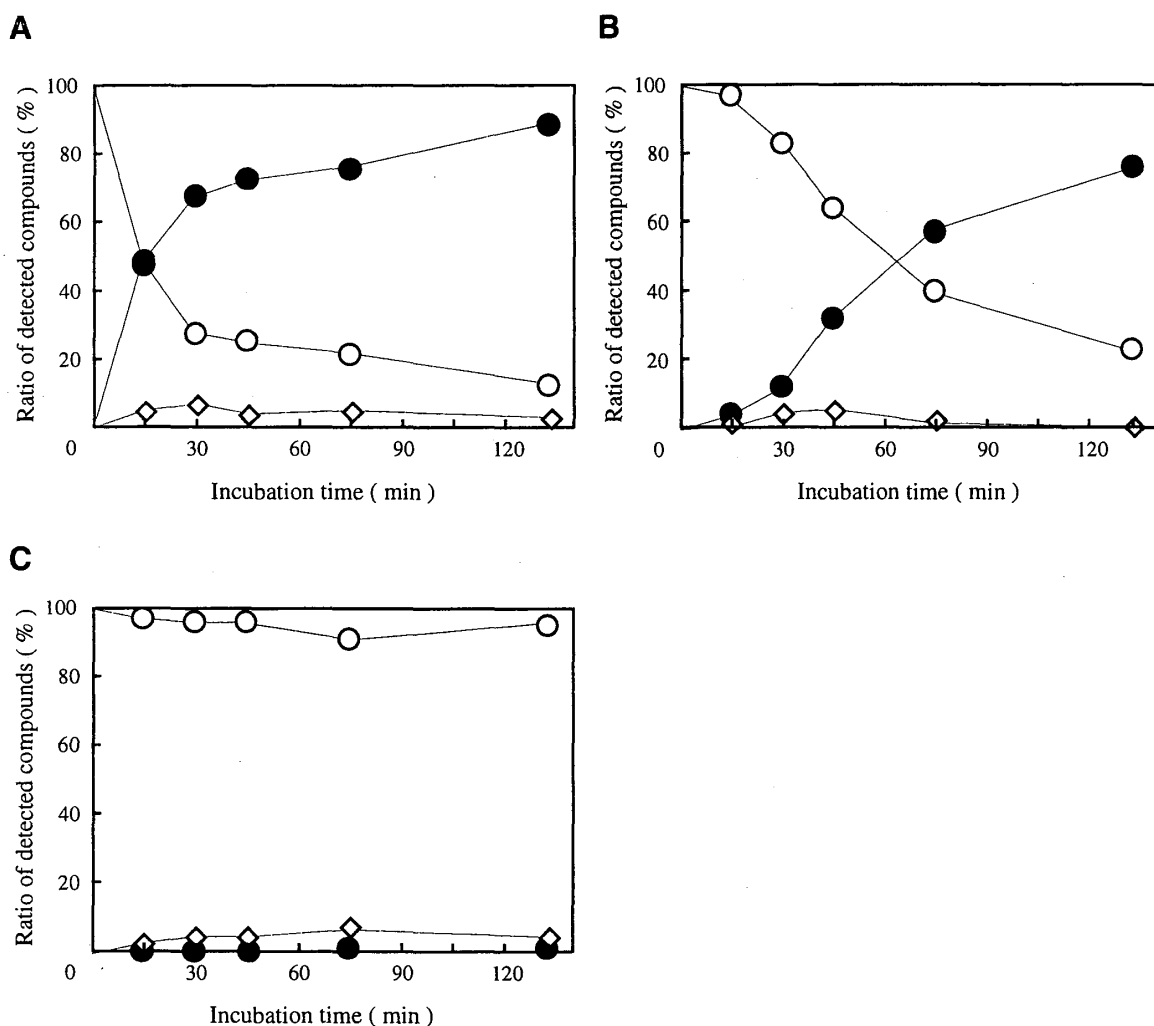


Fig. 2-2. Ratio of detected compounds in PCA soluble fraction of *C. cohnii* incubated with [35 S] methionine and SMM (A), [35 S] methionine and MTOB (B), and [35 S] methionine and MTP (C).
○ methionine and methionine sulfoxide; ● DMSP; ◇ others.

考 察

標識メチオニンの取り込み実験で、メチオニンのメチル基、硫黄、および 3, 4 位の炭素は 15 分以内という短時間で DMSP に代謝されることから、*C. cohnii* においてメチオニンが DMSP の近い前駆物質であることが明らかとなった。また、カルボキシル基の炭素は DMSP に移行しないことから、メチオニンからの DMSP 生合成経路には脱炭酸反応が含まれると予想され、DMSP のカルボキシル基の炭素原子はメチオニンの 2 位の炭素原子由来であることが示唆された。メチオニンの硫黄および 3, 4 位の炭素よりもメチル基の炭素が速やかに DMSP に移行したことから、メチオニンの一部は S-アデノシルメチオニン、S-メチルメチオニンなどのメチル基供与体となり、DMSP 生合成において付加されるメチル基の供給源として利用されている可能性がある。

C. cohnii は、取り込んだメチオニンを速やかに DMSP に代謝し、低分子画分の大部分は DMSP となる。このことより、*C. cohnii* は取り込んだ硫黄化合物のうち余剰分を DMSP の形にして蓄えてお

り、DMSP を硫黄の貯蔵体としている可能性が示された。しかし、今回、高分子画分については検討しておらず、取り込まれたメチオニンのうち、タンパク質合成などに利用された高分子画分と DMSP などに代謝された低分子画分の比は明らかではない。また、細胞内のメチオニンプールやその生合成および代謝の速度などについては検討していないことから DMSP を硫黄の貯蔵体としているかについてはさらに検討が必要であると考えられる。

メチオニンと DMSP の構造を比較すると、(1) DMSP はメチオニンに CH_3^- が一つ付加している、(2) DMSP の炭素骨格はメチオニンの炭素骨格より炭素数が一個少ない、(3) メチオニンには存在するアミノ基が DMSP にはない、ということがわかる (Fig. 2-3)。したがって、RI 標識メチオニンの取り込み実験の結果とあわせて考えると、メチオニンからの DMSP 生合成経路は、メチル基付加、脱炭酸、酸化的脱アミノという三反応からなると予想される。そこで、これらの反応の順序を明らかにするために、標識メチオニンとともに中間体と予想される化合物 (SMM, MTOB, MTP) を取り込ませ、それらの物質による希釈効果を検討した。

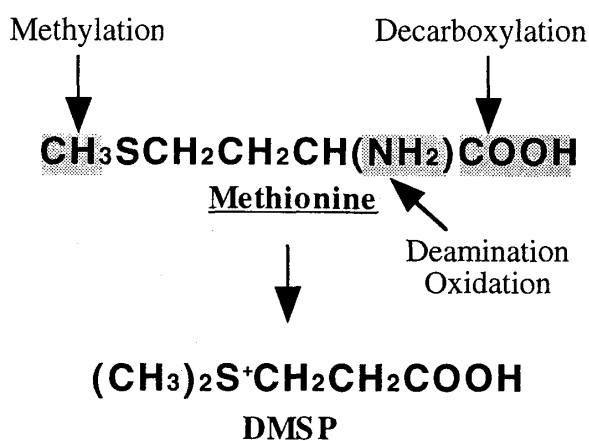


Fig. 2-3. Comparison of the structures of methionine and DMSP.

顕花植物 *W. biflora* では、メチオニンのメチル化産物である SMM から DMSP が生合成されることが報告されている (Fig. 2-4 B)⁸³⁾。しかし、*C. cohnii* では SMM は希釈効果を示さず、メチル化は第一段階ではないと予想された。また、SMM 添加により DMSP 合成の速度が速くなる傾向が見られたことから、SMM は中間体ではないが DMSP 生合成経路のメチル基供与体である可能性が示された。

メチオニンの脱

炭酸および脱アミノ産物であり、DMSP と構造を比較すると CH_3^- が 1 個不足している MTP には希釈効果が認められた。このことより、メチル化はこの経路の最終反応であると考えられた。これは、*C. cohnii* には *W. biflora* とは全く異なる DMSP 生合成経路が存在することを示唆している。

緑藻 *E. intestinalis* ではメチオニンの脱アミノ産物である MTOB を経てメチオニンが生合成される

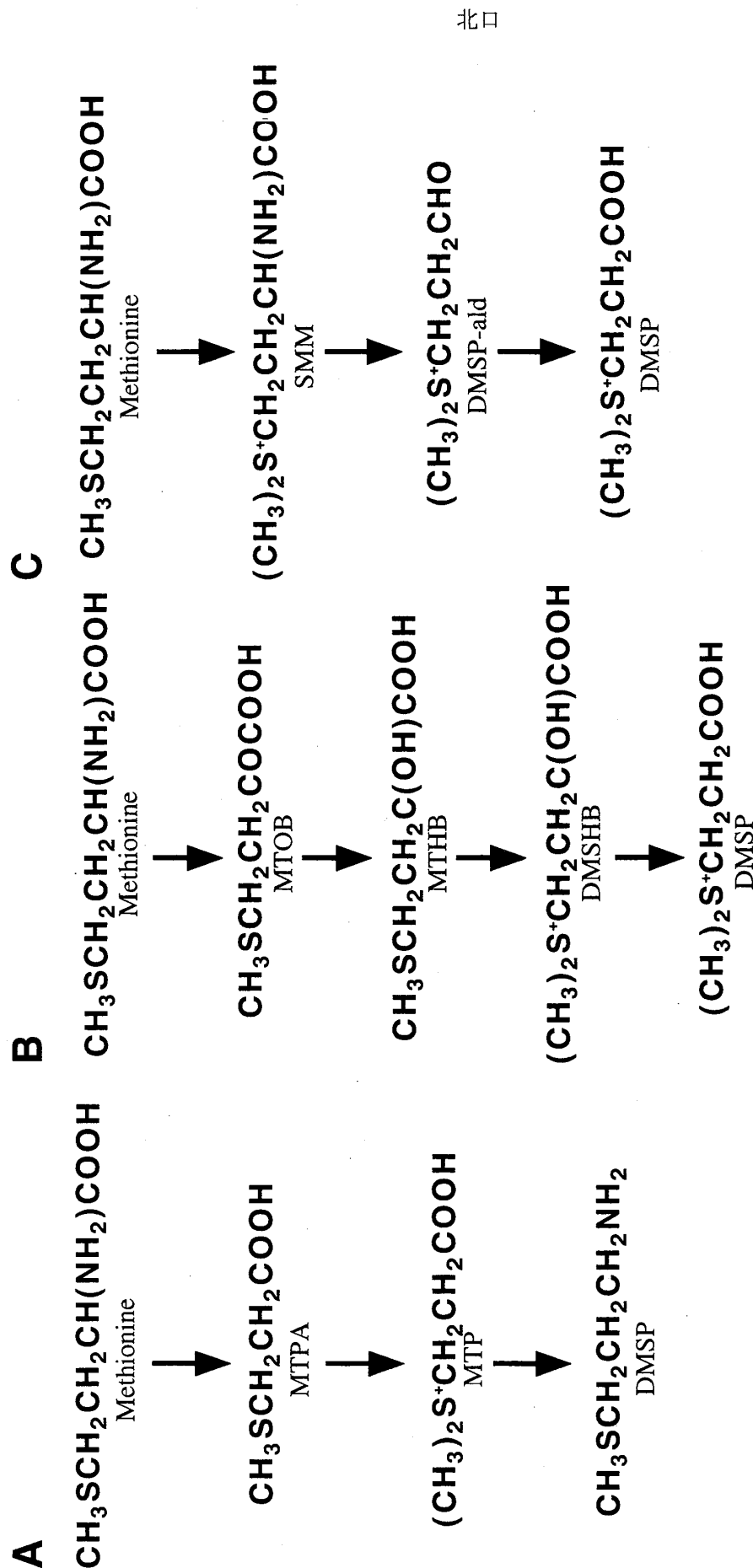


Fig. 2-4. Three different pathways of DMSP biosynthesis.

A: *C.ohnii*. B: *W. biflora*. C: *E. intestinalis*.

MTPA, 3-methylthiopropylamine; MTP, 3-methylthiopropionate; MTOB, 4-methylthio-2-oxobutylate; MTHB, 4-methylthio-2-hydroxybutylate; DMSHB, 4-dimethyl/sulfonio-2-hydroxybutylate; SMM, S-methylmethionine;

DMSP-ald, 3-dimethyl/sulfoniopropionaldehyde.

と報告されている (Fig. 2-4 C) ⁸⁵⁾ が, *C. cohnii* では MTOB による希釈効果は見られず, 脱アミノ反応も DMSP 生合成経路の第一段階ではないと考えられた。このことから, *C. cohnii* は *E. intestinalis* と異なる DMSP 生合成経路を持つと考えられた。

以上の結果を総合すると, 渦鞭毛藻 *C. cohnii* においてメチオニン DMSP の近い前駆物質であり, メチオニンから DMSP が合成される経路は, メチオニンがまず脱炭酸され, 続いて脱アミノ化, 水酸化されることにより合成される MTP を経て, 最後にメチル基が付加されることにより DMSP が合成されるものであると考えられた (Fig. 2-4 A)。

生物種によって異なる DMSP 生合成経路を持つことは, DMSP の細胞内での生理機能, 調節機構に違いがあることを示唆する。メチオニンから DMSP を生合成するという結果は同じであっても, その経路に関与する酵素群が異なるのであれば, その経路を獲得した過程や調節機構は異なる可能性がある。現在までに研究された DMSP 生合成経路は単細胞生物である渦鞭毛藻, 多細胞生物である緑藻, 顕花植物のものであり, それぞれが別の経路を持つことが強く示唆される。顕花植物 *W. biflora* では, この経路は葉緑体に存在すると報告されており ⁸⁶⁾, *C. cohnii* は葉緑体を持たないことから獲得した過程が異なることが想像される。これらの藻類, 植物では DMSP は浸透圧調節に関わっているのではないかと考えられているが, 細胞外の塩濃度変化に直接曝される単細胞の藻類と, 一部の器官だけが高塩環境に曝される高等植物では, 生育環境の違いから浸透圧変化の感知, 調節に関する機構は異なる可能性があり, さらに研究が進むことが期待される。

第二節 *Cryptocodinium cohnii* 粗抽出液中における関連酵素の検索

緒 言

細胞における化合物の生合成経路を解明するためには、その生物が生合成を触媒する酵素群を持つことを明らかにすることが不可欠である。顕花植物 *W. biflora* では DMSP 生合成経路の第一反応と最終反応をそれぞれ触媒すると考えられる酵素 (S-アデノシルメチオニン-メチオニン メチル基転移酵素, ジメチルスルフォプロピオンアルデヒド脱水素酵素), 緑藻 *E. intestinalis* では最初の3反応を触媒すると考えられる酵素 (メチオニンオキシダーゼ, 4-メチルチオ 2-オキシ酪酸レダクターゼ, 4-メチルチオ 2-ヒドロキシ酪酸メチル基転位酵素) の存在が報告されている^{84, 86, 87}。前節の結果より, 渦鞭毛藻 *C. cohnii* においてメチオニンから DMSP を生合成する経路は, (1). メチオニンの脱炭酸反応

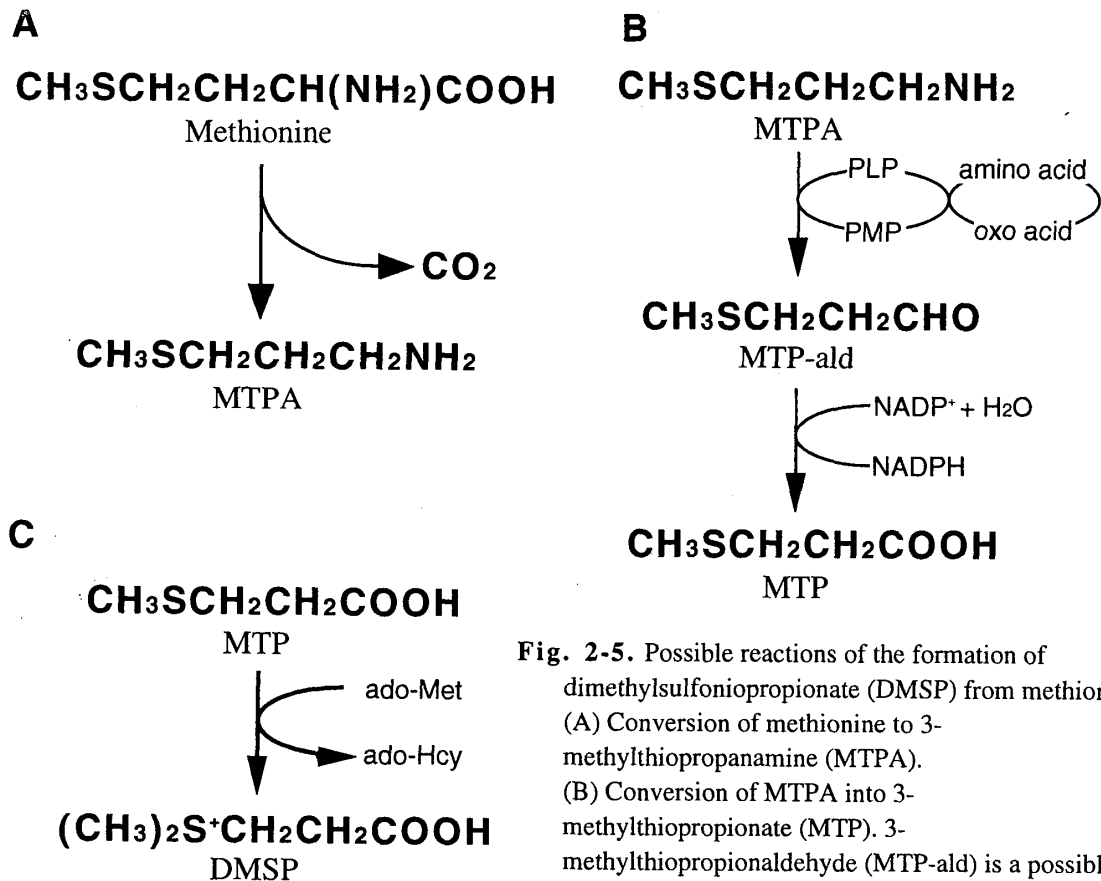


Fig. 2-5. Possible reactions of the formation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) from methionine. (A) Conversion of methionine to 3-methylthiopropylamine (MTPA). (B) Conversion of MTPA into 3-methylthiopropionate (MTP). 3-methylthiopropionaldehyde (MTP-ald) is a possible intermediate. (C) Conversion of MTP into DMSP. ado-Met, S-adenosylmethionine; ado-Hcy, S-adenosylhomocysteine.

(Fig. 2-5A), (2). (1) の反応産物と予想される 3-メチルチオプロパンアミン (3-methylthio-propanamine: MTPA) の酸化的脱アミノ反応 (Fig. 2-5B), (3). (2) の結果生じる 3-メチルチオプロピオン酸 (MTP) のメチル基付加反応 (Fig. 2-5C), の三反応からなると考えられた。そこで, (1) を触媒するメチオニン脱炭酸酵素, (2) を触媒する MTPA アミノ基転移酵素, (3) を触媒する MTP メチル基転移酵素の三酵素活性が *C. cohnii* 粗酵素液中に存在するかを検討した。他生物においては, このような生合成経路の報告はない。また, メチオニン脱炭酸酵素以外の酵素は, その存在が現在までに報告されていない酵素である。

材料および方法

粗酵素液の調製 ESW 培地で培養した対数増殖後期の *C. cohnii* ATCCe32001 を遠心分離 (1600 x g, 5 min) により集藻し, 10 倍量の緩衝液 A (0.05 M リン酸一カリウム・リン酸二カリウム, pH 7.2) に懸濁した。懸濁液を超音波破砕機 UR-200P (Tomy 社製) を用いて 5 分間破砕し, 遠心分離 (25,000 x g, 30 min) して細胞残滓を除いた。上清に 80 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 1 時間攪拌した後, 遠心分離 (25,000 x g, 30 min) して上清と油層を除き, 少量の緩衝液 A に再懸濁し 100 倍量の緩衝液 A に対して 2 回透析を行った。これを遠心分離 (25,000 x g, 30 min) して沈澱を除き粗酵素液とした。これらの操作は全て氷上あるいは 4 °C で行った。

メチオニン脱炭酸反応の検索 メチオニン脱炭酸酵素活性は, Mazelis⁸⁸⁾ および Dixon and Benevenga⁸⁹⁾ の方法を改良し, [1-¹⁴C]メチオニンを基質として用いて, 反応後放出される ¹⁴CO₂ を捕集してその放射活性を測定することにより検出した。φ 18 mm 試験管に反応液として粗酵素液 700 μl (1 mg protein), 1 mM ピリドキサルリン酸 (pyridoxal 5'-phosphate: PLP) 100 μl を入れ 30 °C の水浴中で保温後, 200 mM メチオニン 100 μl および [1-¹⁴C] メチオニン 100 μl (37 kBq, 比活性 2.0 GBq/mmol, ARC 社製) を加えて反応を開始し, 速やかにブチルゴム栓で試験管の口を閉じ, 緩やかに振盪しながらインキュベートした。30 分後, 50 % トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid: TCA) 100 μl を反応液に加え反応を停止し, 溶液中の CO₂ を放出させた。放出された CO₂ は, 試験管をバブリングすることによりトラップバイアル中のトラップ液 (2-アミノエタノール : 2-メトキシエタノール : アクアゾル II = 1 : 1.5 : 7.5) に吸収させて, 液体シンチレーションカウンター LSC-3050 (Aloka 社製) でその放射活性を測定した。

MTPA アミノ基転移反応の検索 メチオニンの脱炭酸反応産物である MTPA の脱アミノ基反応は, アミノ基転移酵素とアルデヒド脱水素酵素との共役反応として検出を試みた。エッペンドルフチューブに粗酵素液 (1 mg protein), 10 mM MTPA, 1 mM PLP, 1 mM 2-オキシグルタル酸, 1 mM NADP⁺, 1 mM ジチオスレイトールを, 全量 1 ml となるように混合して入れ, 30 °C で 60 分インキュベートした後 50 % TCA 100 μl で反応を停止した。遠心分離により沈澱を除き, 上清中の反応産物を高速液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムには逆相カラム IRICA QC Pack C18 を用い, 展開溶媒として水 (pH 3.0) : アセトニトリル = 9 : 1 を用いて流速 0.8 ml/min で展開し, 波長 210 nm の吸光度を測定することによって化合物を分析した。

MTP メチル基付加反応の検索 MTPA のアミノ基転位, 水酸化共役反応の産物である MTP にメチ

ル基を付加する反応は、メチル基供与体として S-アデノシルメチオニンを用いて検討した。反応液として粗酵素液 (1 mg protein), [methyl- ^{14}C] S-アデノシルメチオニン (37 kBq, 比活性 2.1 GBq/mmol, ARC 社製), 20 mM MTP を混合して全量を 1 ml としてエッペンドルフチューブに入れ, 30 °C で 1 時間インキュベートした。50 % TCA 100 μl を加えて反応を停止し, 遠心分離した上清を 5 N KOH で中和し, 第一節に示した条件で 2D-TLC を行った。TLC プレート上の放射活性は, BAS-2000 バイオイメージングアナライザー (Fuji Film 社製)を用いて検出した。

結 果

メチオニン脱炭酸反応 *C. cohnii* 粗酵素液中のメチオニン脱炭酸酵素活性を検索した結果を Table 2-1 に示す。補因子として PLP を加えた系で [1- ^{14}C] メチオニンからの $^{14}\text{CO}_2$ の放出が確認され, *C. cohnii* がメチオニン脱炭酸酵素を持つことが強く示唆された。

Table 2-1. Detection of L-methionine decarboxylase activity in the crude extract of *C. cohnii*

System	Released $^{14}\text{CO}_2$ (dpm)
Complete	2333
Without PLP	1299
Without crude extract	34

Release of $^{14}\text{CO}_2$ from [1- ^{14}C] methionine was determined.

Table 2-2. Factors required for the conversion of MTPA to MTP

Ingredient	System				
MTPA	+	+	+	+	+
PLP	+	+	+	-	+
NADP ⁺	+	+	+	+	-
2-Oxoglutarate	+	+	+	+	+
DTT	+	+	+	+	+
Crude extract	+	-	+	+	+
Detection of MTP	+	-	-	-	-

The systems were incubated for one hour and the production of MTP was analyzed by HPLC.

* Heat treated.

MTPA アミノ基転移反応 *C. cohnii* 粗酵素液を、基質である MTPA, アミノ基転移酵素の補酵素である PLP, アルデヒド脱水素酵素の補酵素である NADP⁺ とともに 60 分インキュベートしたのち、HPLC 分析したところ、0 分では見られなかったピークが見られ、これがオーセンティックな MTP のピークと一致した (Fig. 2-6)。また、このピークは反応液のどの成分を欠いても検出されず、また、粗酵素液を熱処理したのち反応させても検出されなかった (Table 2-2)。

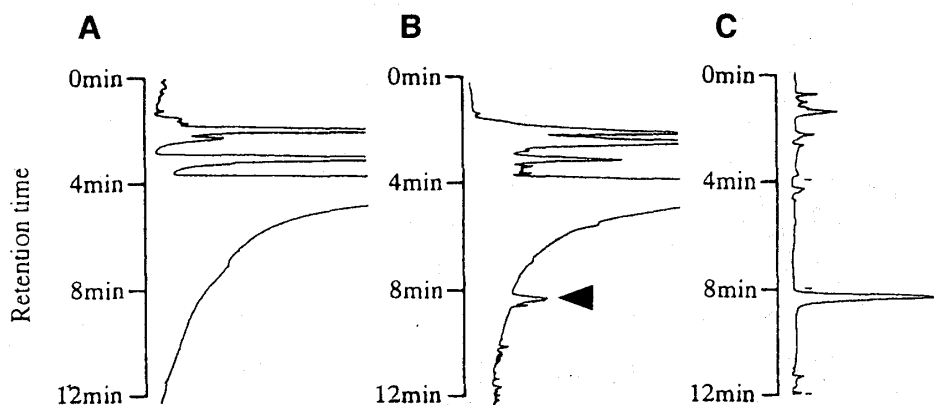


Fig. 2-6. HPLC chromatograms of the transamination products from 3-methylthiopropylamine by the crude extract of *C. cohnii*.

(A) Chromatogram of the reaction mixture incubated for 0 min. (B) Chromatogram of the reaction mixture incubated for one hour. (C) Authentic 3-methylthiopropionate.

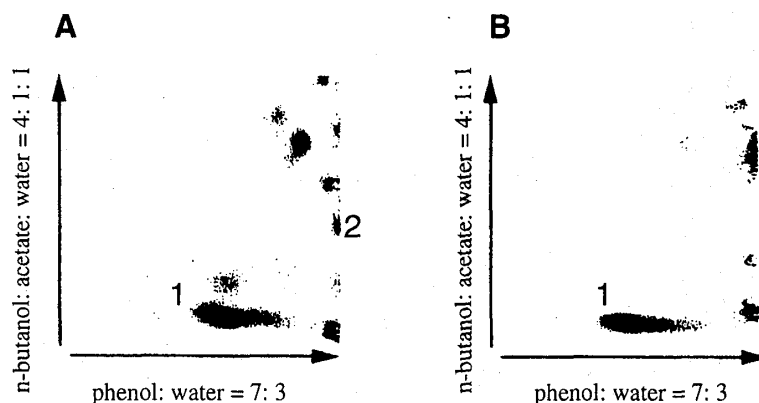


Fig. 2-7. BAS-2000 images of ¹⁴C labeled compounds developed by 2D-TLC.

(A) Chromatogram of the transmethylation product. Reaction mixture (see text) was incubated for one hour and then developed with two solvent system. (B) Chromatogram of control (without enzyme). Reaction mixture without enzyme was incubated for one hour and then developed. 1, S-adenosylmethionine; 2, DMSP. Other spots are unidentified.

MTP メチル基付加反応 基質として MTP, メチル基供与体として [methyl- ^{14}C] S-アデノシルメチオニンをを用いて合成される ^{14}C 標識 DMSP の検出を試みた結果を Fig. 2-7 に示す。粗酵素液を加えた系では 2D-TLC 上の放射活性分布に DMSP に相当するスポットが検出されたが、粗酵素液を加えなかった系では検出されなかった。また、粗酵素液を加熱処理した場合も DMSP に相当するスポットは検出されなかったため、この反応は酵素によるものであると考えられた。

考 察

C. cohnii では、メチオニンから DMSP を生合成する経路の第一段階は、第一節の結果よりメチオニンの脱炭酸反応であることが強く示唆されている。そこで、*C. cohnii* 粗酵素液中にメチオニンの脱炭酸活性が存在するかを検討した結果、メチオニンからの CO_2 の放出が観察され、これは酵素反応であると考えられた。メチオニンの脱炭酸反応は、horseradish peroxidase による酸化的脱炭酸反応⁹⁰⁾、PLP 酵素による脱炭酸反応⁹¹⁻⁹³⁾ の 2 つが知られている。*C. cohnii* では、アミノ酸脱炭酸酵素の代表的な補酵素である PLP の添加により著しい活性の上昇が見られ、horseradish peroxidase による酸化的脱炭酸反応に必須の Mn^{2+} を添加しなくても脱炭酸活性が見られたことより PLP 依存性メチオニン脱炭酸酵素を持つと考えられた。

メチオニン脱炭酸酵素による反応産物は MTPA であるという報告がある⁹³⁾。また、*in vivo* トレーサー実験の結果より MTP が中間体であると予想されるため、DMSP 生合成の第二段階は MTPA を脱アミノすることにより MTP を生じる反応であると考えられた。そこで、補酵素として NAD^+ および NADP^+ 、アミノ基受容体としてピルビン酸、2-オキシグルタル酸などを用いて脱アミノ酵素活性を検索したが活性は見られなかった。そこで、PLP を補酵素とするアミノ基転移反応と、それによって生じる 3-メチルチオプロピオンアルデヒドを NADP^+ を補酵素として MTP に変換するアルデヒド脱水素酵素の共役反応 (Fig. 2-5B) を想定して反応液を調製したところ、少量ながら MTP の生成を観察することができた。アルデヒド脱水素酵素は、基質特異性の高いものと低いものが存在するが、この実験で活性を示した酵素が、この生合成経路において特異的に働く基質特異性の高いものであるのかどうかについては現在のところ不明である。

MTP の硫黄原子にメチル基が付加されると DMSP となる。この反応を検索するために基質として MTP, メチル基供与体として S-アデノシルメチオニンをを用いて粗酵素液中で反応させたところ、2D-TLC 上に DMSP と一致するスポットが観察された。このことより、*C. cohnii* 粗酵素液中には MTP メチル基転移酵素が存在することが示唆された。2D-TLC 上には、基質、DMSP 以外にも不明スポットがいくつか検出された。粗酵素液は、透析を行って低分子化合物は除いたが、夾雑物がまだ残っており、それがメチル化された可能性がある。

以上より、*C. cohnii* は、第一節で予想された DMSP 生合成経路に関与する酵素活性を全て持つことが強く示唆された。*C. cohnii* における DMSP 生合成経路は、Fig. 2-8 に示す経路であると考えられる。これは、すでに報告されている顕花植物 *W. biflora*, 緑藻 *E. intestinalis* とは異なる経路であり、DMSP 生合成には少なくとも三種の経路が存在することが明らかとなった。他生物においてこれらの酵素活性が存在するかを検討することにより、生物種間における DMSP 生合成経路の分布やその獲得過程に関

して興味深い知見が得られるものと期待される。

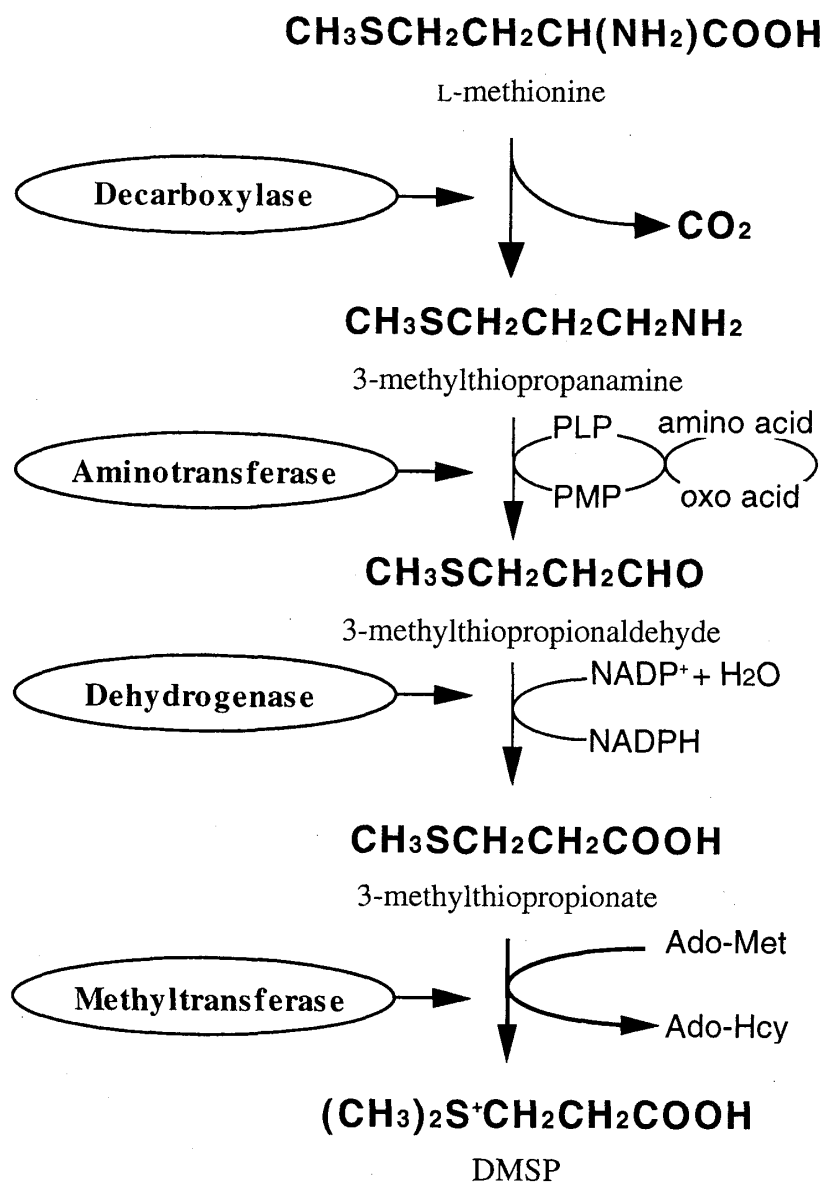


Fig. 2-8. Synthetic pathway from L-methionine to DMSP in *C. cohnii*.

摘 要

海産渦鞭毛藻 *C. cohnii* における DMSP 生合成経路を, *in vivo* トレーサー実験によって検討した結果, メチオニンが近い前駆物質であり, メチオニンの一位の炭素以外の炭素原子および硫黄原子は DMSP 合成に利用されることを明らかにした。この結果とメチオニンと DMSP の構造の比較から, メチオニンから DMSP を合成する経路は, 脱炭酸反応, 脱アミノ反応, メチル基付加反応の三反応からなることが予想された。そこで, *in vivo* トレーサー実験における, 中間体と予想される化合物の希釈効果を

検討したところ、他生物の DMSP 生合成経路の中間体は希釈効果を示さず、新奇な生合成経路の存在が強く示唆された。それは、メチオニンの脱炭酸反応により 3-メチルチオプロパンアミンを生じ、続いてアミノ基転移反応によって生じる 3-メチルチオプロピオン酸を経てメチル基付加反応を最終反応として DMSP が合成されるという経路である。この経路の存在を明らかにするため、*C. cohnii* 粗酵素液中にこれらの酵素活性の存在を検索したところ、メチオニン脱炭酸酵素、3-メチルチオプロパンアミンアミノ基転移酵素、3-メチルチオプロピオン酸メチル基転移酵素活性がすべて存在し、*C. cohnii* はこの経路によって DMSP を生合成することが強く示唆された。

第三章 *C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素の精製とその諸性質

第一節 メチオニン脱炭酸酵素の精製

緒 言

C. cohnii の生体内における DMSP の生理機能を研究するうえで、浸透圧、温度、光条件などどのような環境条件の変化によって DMSP の合成量、代謝量が変動するのかを明らかにすることが必要である。生理条件の変化に伴う DMSP の存在量の変化を検討することによりある程度は代謝の変化を把握して調節機能を推測することが可能であるが、生合成経路に関連する酵素群の転写、発現調節機構を解明することによって、さらに詳細に調節機構を明らかにすることができる。DMSP の生合成に関連する酵素については、顕花植物 *W. biflora* において、生合成経路の第一段階を触媒する S-アデノシルメチオニン・メチオニン メチル基転移酵素が精製されている (94)。しかしこの酵素は、DMSP を生産しない植物においても普遍的に存在する酵素であり DMSP 生合成系の鍵酵素であるかは疑問である。

前章の結果より、*C. cohnii* において DMSP はメチオニンを前駆体として生合成され、その生合成経路の第一段階はメチオニンの脱炭酸反応であることが強く示唆された。第二章第二節の結果より、*C. cohnii* をリン酸緩衝液中で破碎して調製した細胞粗抽出液中に PLP を補酵素とするメチオニン脱炭酸酵素の存在が認められた。そこで、本節では、*C. cohnii* よりメチオニン脱炭酸酵素の完全精製を試みた。精製した酵素を用いることで反応を *in vitro* で再現し、反応産物を明らかにして続いて起こる反応の基質を特定することができる。また、精製した酵素を用いて一次構造を解析することにより DMSP 生合成経路の鍵酵素と考えられる本酵素遺伝子の解析を行う基礎となる情報を得られることが期待される。

材料および方法

実験に用いた藻類およびその培養 実験には、第二章と同じく *C. cohnii* ATCCe32001 株を用いた。ESW 培地、25℃暗条件下で前培養した対数増殖後期の細胞を 2l 駒形フラスコの ESW 培地に接種し、同条件下で 4 日間培養した細胞を集藻して以下の実験に用いた。以下に示す精製手順は、すべて 4℃で行った。

粗酵素液の調製 ESW 培地で培養した対数増殖後期の *C. cohnii* を遠心分離 (1600 x g, 5 min) により集藻し、20 倍量の冷アセトン (-18℃) を加えホモジナイズした。ブフナー漏斗にフィルターペーパー No.2 (Millipore 社製) を装着しホモジェネートを速やかに吸引濾過しアセトンを除いた。フィルター上のアセトン不溶画分をジエチルエーテルで洗浄して減圧乾燥し、アセトンパウダーを調製した。アセトンパウダーを 20 倍量の緩衝液 A に超音波破碎機 UR-200P (Tomy 社製) を用いて懸濁し一晚攪拌した。それを遠心分離 (25,000 x g, 30 min) し、上清に 80 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。1 時間攪拌したのち遠心分離 (25,000 x g, 30 min) して上清を除き、少量の緩衝液 A に再懸濁し 100 倍量の緩衝液 A に対して 2 回透析を行った。これを遠心分離 (25,000 x g, 30 min) して沈澱を除き、粗酵素液とし、カラムクロマトグラフィーによる精製の試料とした (Fig. 3-1)

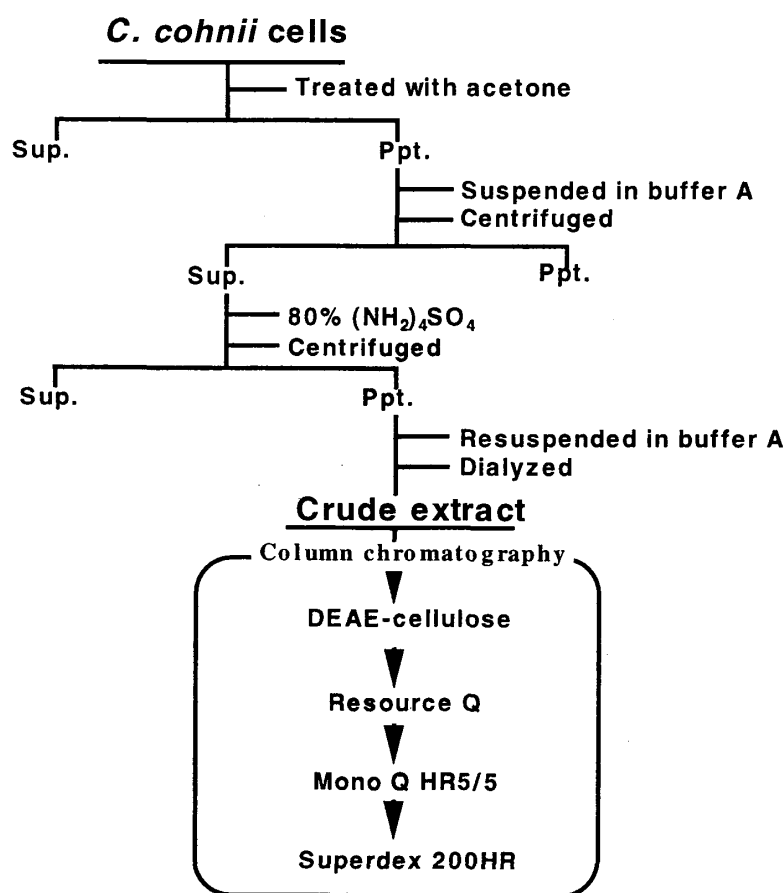


Fig. 3-1. Purification procedure of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*.

DEAE-cellulose 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー DEAE-cellulose DE-52 (Whatman 社製) を XK 26 カラム (Pharmacia 社製) に充填 (25 x 200 mm) し、緩衝液 A で平衡化した。このカラムに粗酵素液を流速 1.5 ml/min で添加し、緩衝液 A で洗浄した。その後、カラムに保持されたタンパク質を 0~0.6 M NaCl 直線濃度勾配 (400 ml) により溶出させた。溶出液をフラクションコレクター Retriever II (Isco 社製) を用いて 10 ml を 1 画分として分画した。タンパク質量は UV モニター UA-5 (Isco 社製) で波長 280 nm での吸収を測定して記録した。各画分の活性を測定し、活性画分を集めて 80 % 硫酸アンモニウム分画によりタンパク質を濃縮し、緩衝液 A に対して透析して次のカラムクロマトグラフィーの試料とした。

Resource-Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー FPLC システム (Pharmacia 社製) に、Resource-Q (Pharmacia 社製) 陰イオン交換カラムを装着し、緩衝液 A で平衡化した。試料を流速 2.0 ml/min で添加し、緩衝液で洗浄した後保持されたタンパク質を 0~0.5 M NaCl 直線濃度勾配 (20 ml) により溶出した。溶出液は 1 ml を 1 画分として分画し、各画分の活性を測定し、活性画分を集めて 80 % 硫酸アンモニウム分画によりタンパク質を濃縮し、緩衝液 B (0.05 M リン酸一カリウム・リン酸二カリウム, 0.2 M NaCl, pH 7.2) に対して透析して次のカラムクロマトグラフィーの試料とした。

Mono-Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー FPLC システム (Pharmacia 社製) に、Mono-Q

HR5/5 (Pharmacia 社製) 陰イオン交換カラムを装着し、緩衝液 B で平衡化した。試料を流速 0.5 ml/min で添加し、緩衝液 B で洗浄した後保持されたタンパク質を 0.2~0.4 M NaCl 直線濃度勾配 (20 ml) により溶出した。溶出液は 1 ml を 1 画分として分画し、各画分の活性を測定した。活性画分を集めて緩衝液 C (0.2 M リン酸一カリウム・リン酸二カリウム, pH 7.2) に対して透析し、緩衝液を置換した試料をウルトラフリー・MC (Millipore 社製) を用いて 200 μ l に濃縮し、次のカラムクロマトグラフィーの試料とした。

Superdex 200HR ゲル濾過カラムクロマトグラフィー FPLC システムに Superdex 200HR ゲル濾過カラムを装着し、緩衝液 C で平衡化した。試料を流速 0.5 ml/min で添加し、流速 0.5 ml/min の緩衝液 C でゲル濾過を行い、1 ml を 1 画分として分画した。各画分の活性を測定し、活性が認められた画分の精製度を電気泳動により確認した。また、標準タンパク質 (blue dextran, 2,000,000; thyroglobulin, 669,000; ferritin, 440,000; catalase, 232,000; aldolase, 158,000; bovine serum albumin (BSA), 67,000) をゲル濾過し、本カラムによる分子量測定の標準曲線を作成し、活性画分の溶出体積より本酵素の分子量を計算した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE) 電気泳動は、Laemmli⁹⁵⁾ の方法に基づいて行った。

精製度の検定には活性の回収が可能な 7.5 % native-PAGE を用いた。試料を濃縮して二列のサンプルウェルに添加し、20 mA 定電流で泳動した。ゲルの温度上昇を抑えるため、泳動は 5 °C で行った。ゲルの一列は 2 mm 間隔で切りだして緩衝液 A に浸潤し、ゲル中のタンパク質を溶出させたのちそれぞれの画分の活性を測定した。もう一列のゲル上のタンパク質は銀染色 (Silver Stain Plus, Bio-Rad Labs.) により検出した。

また、分子量測定、サブユニット構造の検討には 7.5% SDS-PAGE を用いた。試料を SDS 試料液に懸濁濃縮したのち 95°C 3 分の熱処理を行い、タンパク質を変性させた。これを 7.5% SDS-PAGE に供し、40 mA 定電流で泳動した。ゲル上のタンパク質は Coomassie Brilliant Blue R-250 染色により検出した。標準タンパク質 (myosin, 212,000; α -macroglobulin, 170,000; β -galactosidase, 116,000; transferrin, 76,000; glutamic acid dehydrogenase, 53,000) の移動度から分子量測定の標準曲線を作成し、精製タンパク質の移動度から分子量を計算した。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は、Bradford⁹⁶⁾ の方法に基づき、プロテインアッセイキット (Bio-Rad Labs.) を用いて波長 595 nm での吸光度を測定することにより行った。標準タンパク質として BSA を用いて作成した検量線をもとに試料のタンパク質量を算出した。

活性測定 活性は、第二章に示した方法で測定した。反応液は、適当に希釈して全量を 700 μ l にした酵素試料, 1 mM PLP 100 μ l, 200 mM メチオニン 100 μ l, [1-¹⁴C] メチオニン 100 μ l (37 kBq, 比活性 2.0 GBq/mmol, ARC 社製) で全量を 1 ml とした。

結 果

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを Fig. 3-2 に示す。NaCl 濃度 0.4 M 付近に本酵素活性が溶出し、粗酵素液からの精製度は 1.67 であった。この活性画分を 80 % 硫酸アンモ

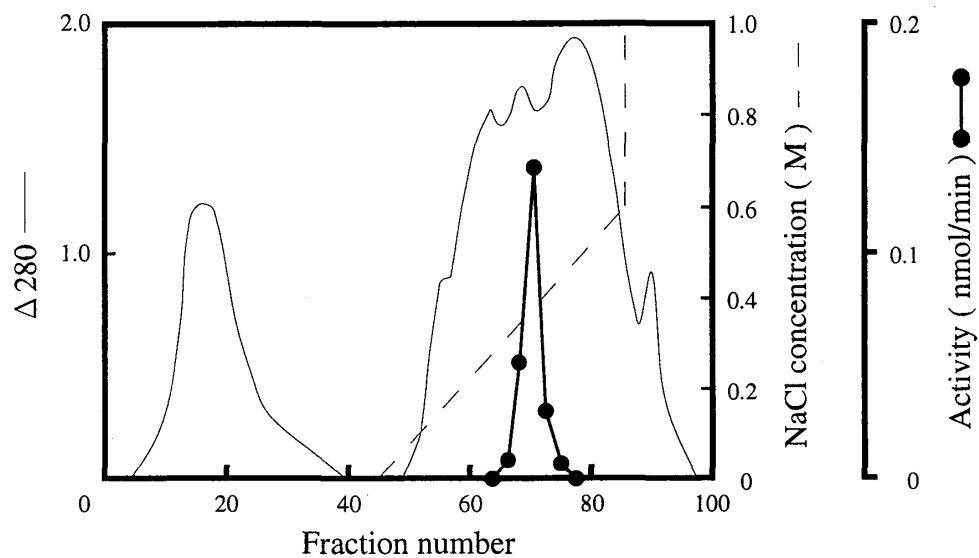


Fig. 3-2. DEAE-cellulose column chromatogram of L-methionine decarboxylase from *C.ohnii*. The crude extract was applied to a DEAE-cellulose column equilibrated with buffer A. The retained proteins were eluted with a linear gradient of 0–0.6 M NaCl in buffer A.

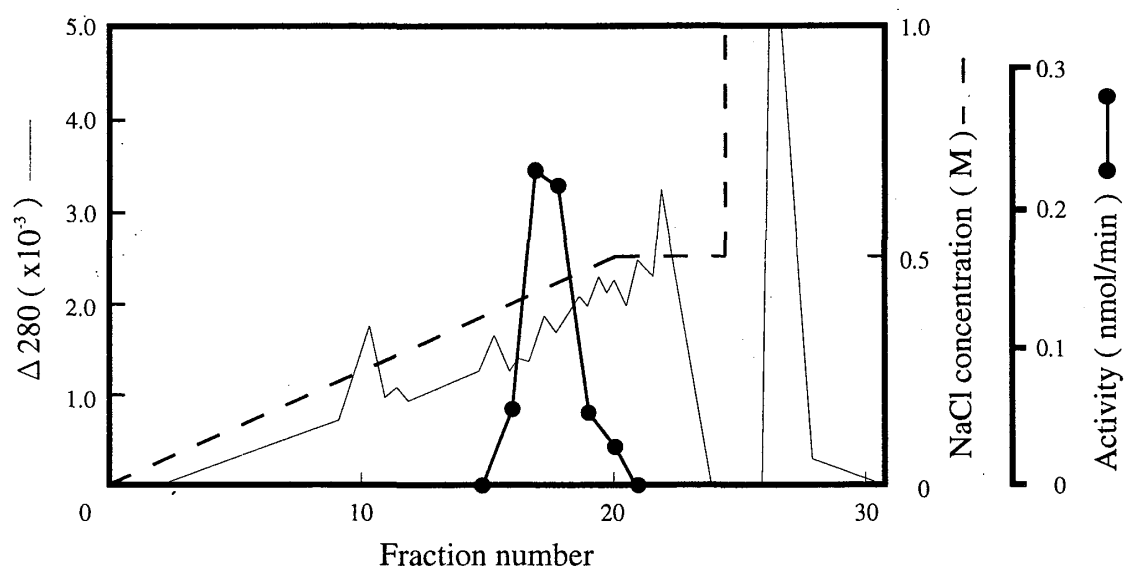


Fig. 3-3. Resource-Q column chromatogram of L-methionine decarboxylase from *C.ohnii*. The active fractions from DEAE-cellulose column were applied to a Resource-Q column equilibrated with buffer A. The retained proteins were eluted with a linear gradient of 0–0.5 M NaCl in buffer A.

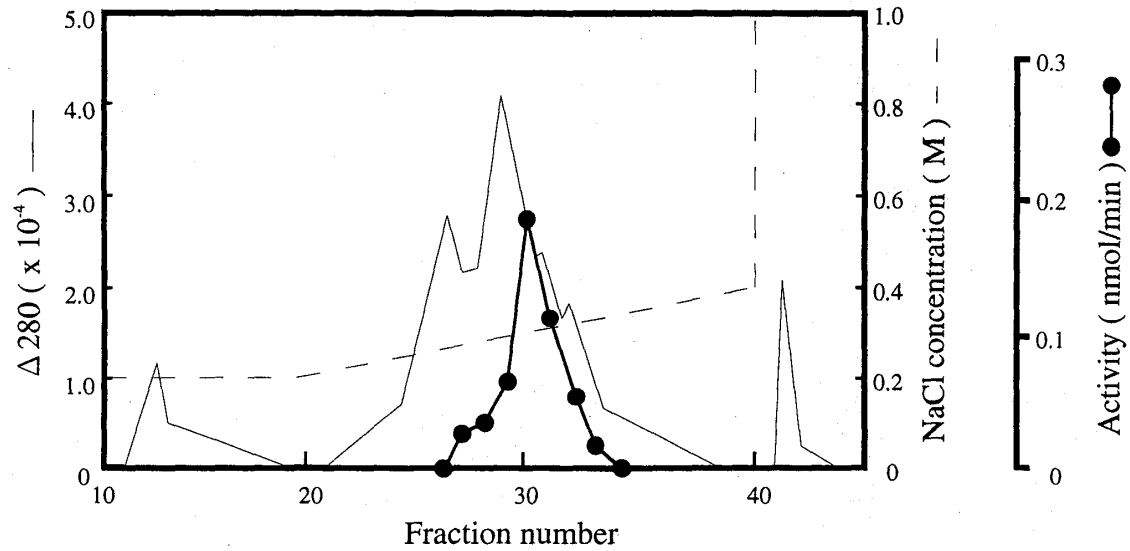


Fig. 3-4. Mono-Q column chromatogram of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*. The active fractions from Resource-Q column dialyzed against buffer A containing 0.2 M NaCl (buffer B) were applied to a Mono-Q column equilibrated with buffer B. The retained proteins were eluted with a linear gradient of 0.2–0.4 M NaCl in buffer A.

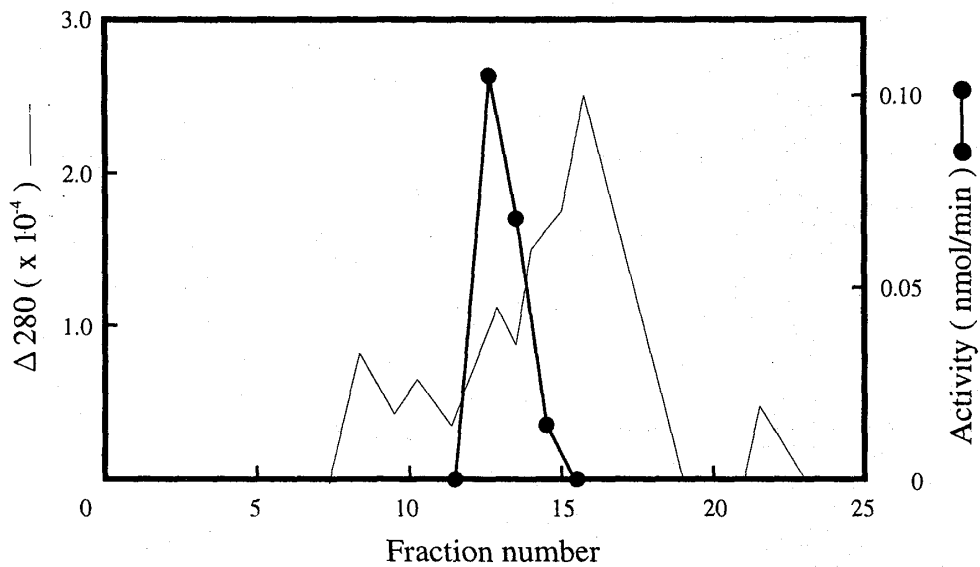


Fig. 3-5. Superdex 200HR column chromatogram of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*. The active fractions from Mono-Q column were concentrated and applied to a Superdex 200HR column equilibrated with buffer C.

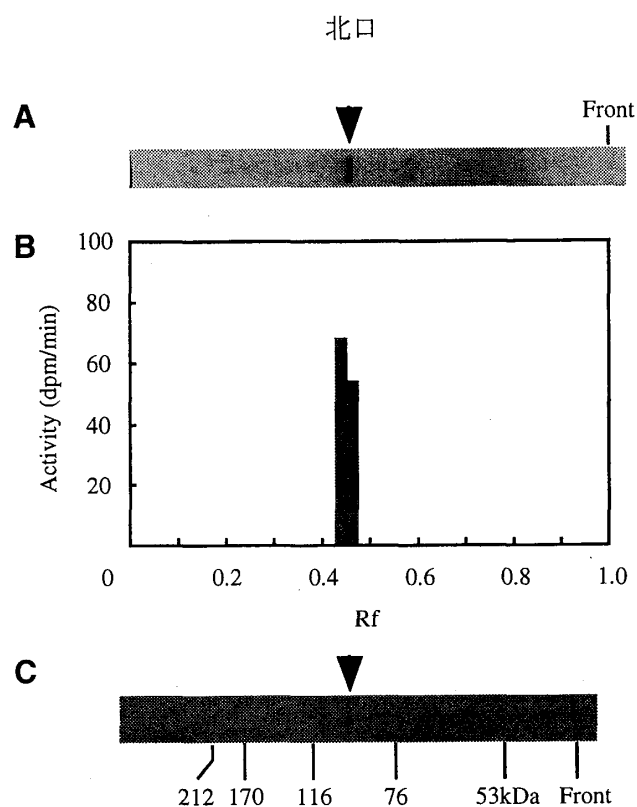


Fig. 3-6. (A) Native polyacrylamide gel electrogram of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*. The enzyme was subjected to 7.5 % native-PAGE and stained with Silver Stain Plus (Bio-Rad). (B) Gel sliced assay of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*. After purified enzyme was subjected to 7.5% native PAGE, the gel was sliced every 2 mm and the activities were measured. (C) SDS polyacrylamide gel electrogram of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*. The enzyme was denatured and subjected to 7.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

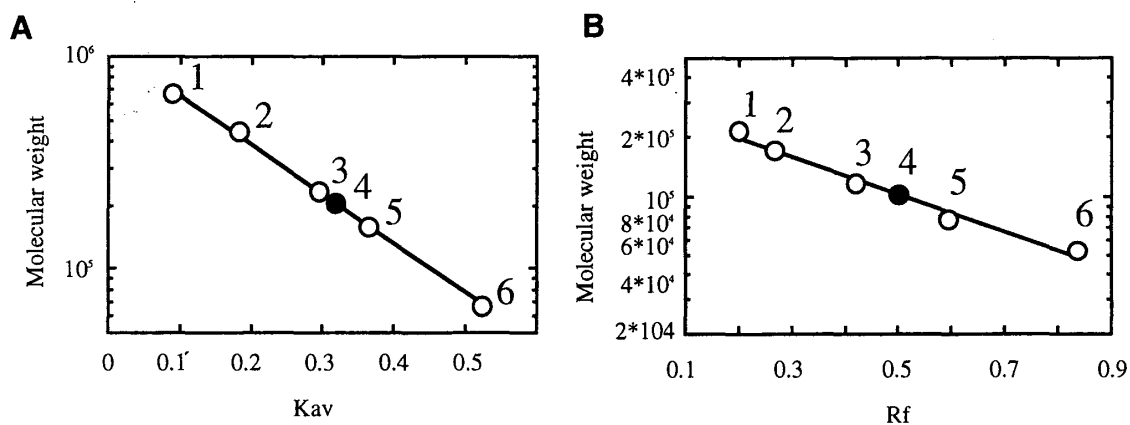


Fig. 3-7. Molecular weight determination of L-methionine decarboxylase. (A) Determined by Superdex 200HR gel filtration. 1, thyroglobulin (Mr; 669,000); 2, ferritin (Mr; 440,000); 3, catalase (Mr; 232,000); 4, MetDC; 5, aldolase (Mr; 158,000); 6, BSA (Mr; 67,000). (B) Determined by SDS-PAGE. 1, myosin (Mr; 212,000); 2, α -macroglobulin (Mr; 170,000); 3, β -galactosidase (Mr; 116,000); 4, MetDC; 5, transferrin (Mr; 76,000); 6, glutamic acid dehydrogenase (Mr; 53,000).

ニウム分画によって濃縮し, Resource-Q カラムによって分画した溶出パターンを Fig. 3-3 に示す。NaCl 濃度 0.4 M 付近に本酵素活性が溶出し, 粗酵素液からの精製度は 2.85 であった。活性画分を 80 % 硫酸アンモニウム分画によって濃縮し, Mono-Q カラムによって分画した溶出パターンを Fig. 3-4 に示す。NaCl 濃度 0.3 M 付近に本酵素活性が溶出し, 粗酵素液からの精製度は 20.8 であった。活性画分を濃縮し, Superdex 200HR カラムによって分画した。本酵素活性は $K_{av}=0.3$ 付近に溶出し, タンパク質のメインピークと異なる位置に活性ピークが見られた (Fig. 3-5)。Superdex 200HR カラム後, 粗酵素液からの精製度は約 215 であり収率は 0.1 % であった。この活性画分の純度を 7.5% native-PAGE によって確認したところ, 銀染色によって単一のバンドが確認された (Fig. 3-6 A)。また, 電気泳動したゲルを 2 mm 間隔で切断し, 緩衝液 A に浸潤してタンパク質を溶出させてその活性を測定したところ, 銀染色で観察されたバンドの位置と一致する部分に本酵素活性が見られた (Fig. 3-6 B)。これらのことより, 本酵素の精製が完了したと判断した。代表的な精製手順を Table 3-1 に示す。

本酵素は, ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果から予想される分子量は 204,000 であり, SDS-PAGE の結果から予想される分子量は 100,000 であった (Fig. 3-7)。

Table 3-1. Summary of purification of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit [*])	Specific activity (unit mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude extract	650	13.5	0.021	100	—
DEAE-cellulose	50.2	1.73	0.035	12.9	1.67
Resource-Q	2.34	0.138	0.059	1.03	2.85
Mono-Q	0.140	0.060	0.431	0.45	20.8
Superdex 200HR	0.005	0.0223	4.45	0.17	215

* One unit of activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of CO₂ per min under the reaction conditions described in the text.

考 察

C. cohnii は細胞内に油分を多く含むため, 藻体を, 液体窒素を用いた凍結融解法, あるいは緩衝液に懸濁してフレンチプレスまたは超音波処理によって細胞を破碎した場合, 破碎液に油分が混入して除くことが困難であった。そこで, *C. cohnii* 粗酵素液を調製する際, 藻体をアセトン処理して油分を除いたアセトンパウダーを調製したのち緩衝液に懸濁して破碎する方法を用いた。藻体をアセトンパウダーにして保存した場合, メチオニン脱炭酸酵素活性は冷暗所で数カ月安定であった。

Mono-Q カラムクロマトグラフィーは緩やかなグラジエントを用いて分離能をあげるために用いた。今回用いたカラムのうち、Superdex200-HR カラムを用いたとき収率は下がるがもっとも精製度があがり、有効なカラムであると考えられた。カラムは、今回用いたものの他に、ハイドロキシルアパタイト (Pentax 社製) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Sephacryl-200HR ゲル濾過クロマトグラフィー、Phenyl-SepharoseCL4B 疎水性樹脂カラムクロマトグラフィー、そして Phenyl-Superlose (FPLC) 疎水性カラムクロマトグラフィーを検討した。ハイドロキシルアパタイトカラムは陰イオン交換カラムであるが DEAE-cellulose カラムとは異なるタンパク質分離能を持つと期待したが、目的酵素を含むほとんど全てのタンパク質がスルー画分に溶出したため分離に有効ではないと判断した。Sephacryl-200HR カラムは目的酵素がタンパク質のメインピークと同じくヴォイドヴォリューム付近に溶出したこと、サンプルを添加するためにアミコン限外濾過による濃縮が必要であり、その操作の際に濾過膜にタンパク質が吸着するために損失が大きくなること、などの理由から使用しないこととした。疎水性樹脂カラムは二種類試みたが、タンパク質ピークはスルー画分にしかみられなかった。また、各溶出画分を透析した後活性測定を行ったところ活性がみられなかった。これは、タンパク質の疎水性を高めるため硫酸アンモニウムを加える、溶出時にエチレングリコールを加えるなどの操作により酵素が失活した、あるいは本酵素が非常に疎水性が強いためにレジンに強固に吸着した、などの理由が考えられる。タンパク質ピークがスルー画分にしかみられなかったこと、活性を追跡出来なかったことから、今回検討した疎水性樹脂カラムは分離に有効ではないと判断した。

本酵素の精製を行う上で、活性の減少が大きな問題となった。この原因としては、本酵素は生理機能を持つ物質の生合成に関わる酵素であるために半減期が短いといったことが考えられる。これを防ぐため、2-メルカプトエタノール、グリセロール、PLP を緩衝液に加えて活性の減少が押さえられるかを検討したが、有効ではなかった。

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果から予想される分子量は SDS-PAGE の結果から予想される分子量の約二倍であった。また、SDS-PAGE で観察されるタンパク質のバンドが 1 本であることにより (Fig. 3-6 C), 本酵素が単一のサブユニットからなることが示唆された。したがって、本酵素は分子量約 100,000 のサブユニット二つからなる分子量 204,000 のホモ二量体であると推測された。*Dryopteris filix-mas*⁹²⁾, *Streptomyces*^{91, 93)} のメチオニン脱炭酸酵素もホモ二量体であると報告されているが、これらのサブユニットの分子量はそれぞれ 57,000, 59,000 であり、*C. cohnii* の本酵素はそれらのよりもかなり大きい。

D. filix-mas メチオニン脱炭酸酵素は膜結合型のタンパク質であると報告されている⁹²⁾ が、*C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素は、第二章に示したようにアセトンや界面活性剤を使用するなどの特別な処理を行わなくても可溶化することができたため、細胞質に存在する酵素であると考えられた。

第二節 メチオニン脱炭酸酵素の諸性質

緒 言

本研究では、渦鞭毛藻から初めてメチオニン脱炭酸酵素を完全精製した。本酵素は、分子量から判断しても以前報告された酵素とは異なる性質を持つと考えられたので、いくつかの酵素化学的性質について検討した。

C. cohnii のメチオニン脱炭酸酵素は PLP 酵素であると考えられるが、PLP 酵素は一つの補酵素でいくつもの異なる反応を触媒する酵素群として注目され、その構造、触媒機構に関する研究が盛んに行なわれている^{97, 98)}。ある酵素を酵素学的に検討する、あるいは三次元構造解析のために結晶化を行うためには、純粋な試料が大量に必要である。本酵素のように大量に精製することが困難な酵素では、その酵素をコードする遺伝子をクローニングして大量発現系を構築することは有効であると考えられる。また、クローニングを行ないその遺伝子配列を決定することにより、特定のアミノ酸へ点突然変異を導入することにより機能解析を行なったり、フランクング領域を解析して、その酵素の調節機構に関する知見を得ることが可能になる。遺伝子がよく解析され、保存性の高い領域があることがわかっている酵素の場合には、保存性の高い領域の配列をもとにプローブを作成して遺伝子の検索を行うことができるが、情報が少ない場合には、その酵素のアミノ酸配列をもとに検索を行わなければならない。タンパク質のアミノ酸配列決定法で、現在最もよく行なわれているのは、エドマン分解による N 末端アミノ酸配列決定法である⁹⁹⁾。ここでは、エドマン法を用いて *C. cohnii* のメチオニン脱炭酸酵素の N 末端アミノ酸配列の決定を試みた。

さらに、本酵素はメチオニンから DMSP の生合成経路の鍵酵素であると考えられ、生合成経路の解明のためには本酵素の反応産物を明らかにし、次の反応の基質を特定することが重要であると考えられる。PLP を補酵素とする脱炭酸酵素は、産物としてアミンのほかにアミノ基転移反応を同時に行うことでアルデヒドを生じる場合がある⁹²⁾。精製したメチオニン脱炭酸酵素を用いることにより、*in vitro* で本酵素を基質と反応させその産物を分析することが可能であると考え、^[35S]メチオニンを基質に用い、2D-TLC 分析することによって本酵素の反応産物の同定を試みた。

材料および方法

メチオニン脱炭酸酵素 諸性質の検討には、第一節の方法で *C. cohnii* より精製したメチオニン脱炭酸酵素を用いた。

最適活性 pH 標準的な活性測定条件のうち、緩衝液 A の代わりに pH 4~9 の範囲で以下の緩衝液を用いて反応液の pH を調節して活性を測定した。用いた緩衝液は、pH 4~6 は 50 mM クエン酸緩衝液、pH 6~8 は 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.7~9 は 50 mM Tris-HCl 緩衝液である。

最適活性温度 最適活性温度は、標準的な反応液を 15~55 °C の間で 5 °C 間隔で検討した。反応液を各温度で 10 分間反応させて放出される ¹⁴CO₂ の放射活性を測定し、各温度での酵素液を加えないコントロールで放出される ¹⁴CO₂ の放射活性との差からその温度での酵素活性を計算した。

PLP 要求性 脱炭酸酵素は、補酵素として PLP を要求するグループと活性中心にピルボイル基をもつグループに大別される^{98, 100)}。本酵素が PLP 酵素であれば、PLP 存在によって活性が上昇すると考えられる。そこで、PLP 濃度を 0~1 mM の範囲で変化させて活性を測定し、PLP 要求性を検討した。また、反応液に PLP 酵素の阻害剤である phenylhydrazine, semicarbazide hydrochloride, carboxymethyl hemihydrochloride, hydroxylamine をそれぞれ 1 mM 添加して活性を測定し、阻害効果を検討した。

金属イオンの影響 金属イオンが活性に及ぼす影響を検討するため、緩衝液に Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} (全て Cl⁻ 塩) をそれぞれ 1 mM になるように加えて、その活性を金属イオン非存在下での活性と比較した。

基質特異性 本酵素の基質特異性を調べるため、まず、アミノ酸による希釈効果を検討した。メチオニンよりも基質親和性の高い基質を反応液に加えれば、メチオニン脱炭酸反応は阻害されると予想される。反応液に、各 20 mM となるようにメチオニン以外の 12 種のアミノ酸をそれぞれ加え、メチオニンのみを加えたコントロールとの活性の比を求めた。また、本酵素が S-アデノシルメチオニン脱炭酸活性を持つかについても検討した。標準的な活性測定条件のうち、20 mM メチオニンを 20 mM S-アデノシルメチオニン、37 kBq [1-¹⁴C] メチオニンを 37 kBq [1-¹⁴C] S-アデノシルメチオニン (比活性 2.0 GBq/mmol, ARC 社製) に置き換えて活性を測定した。

N 末端アミノ酸配列の解析 精製したメチオニン脱炭酸酵素を全量が 50 μ l になるように濃縮し、終濃度 0.1 % になるように SDS を加えて 95 °C 3 分熱処理した。試料を SDS-PAGE (140 x 140 x 2 mm) のウェルに添加し、40 mA 定電流で電気泳動を行った。泳動後、Nova-Blot (Pharmacia 社製) を用いて 0.8 mA/cm² 定電流、1.5 時間の条件で PVDF 膜 Immobilon (Millipore 社製) にブロッティングした。PVDF 膜は超純水で洗浄後 Coomassie Brilliant Blue 染色を行い、脱色後超純水で洗浄して風乾した。PVDF 膜上のメチオニン脱炭酸酵素を切りだし、ペプチドシーケンサー (ABI 477A/120A, ABI 社製) のサンプルチャンバーに添加し、エドマン法により N 末端アミノ酸配列の解析を行った。

反応産物の分析 メチオニン脱炭酸酵素の反応産物は、[³⁵S] メチオニンを基質として精製したメチオニン脱炭酸酵素と反応させて、生じた反応産物を 2D-TLC で分析することにより同定した。反応液は、1 μ g の精製メチオニン脱炭酸酵素、1 mM PLP, [³⁵S] メチオニン (37 MBq, 比活性 40 TBq/mmol, ARC 社製) を混合して全量を 1 ml とした。これをエッペンドルフチューブ中で 30 °C で 30 分反応させた後 50% TCA 100 μ l を加えて反応を停止し、遠心分離により高分子画分を除いた上清を 5 N KOH で中和した。これを反応産物試料として、第二章第二節に示した方法で 2D-TLC 分析を行い、酵素を加えないコントロールと比較して反応産物を同定した。

結 果

本酵素の活性に及ぼす pH の影響を、pH 4~9 の範囲で検討した結果を Fig. 3-8 に示す。本酵素の最適活性 pH は 7 付近であった。

本酵素の活性に及ぼす温度の影響を 15~55 °C の範囲で検討した結果を Fig. 3-9 に示す。本酵素は 30 °C 付近で最も高い活性を示した。

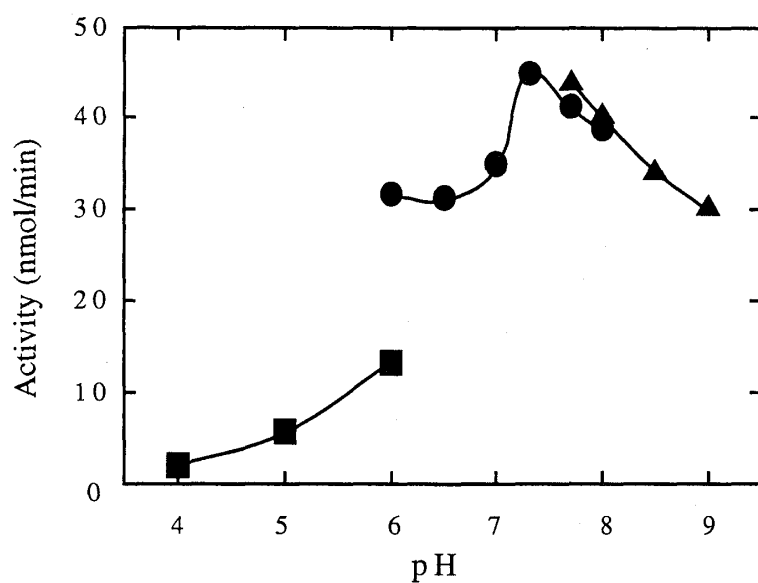


Fig. 3-8. Effect of pH on L-methionine decarboxylase activity.
The activity was determined with following buffers (final concentration of 50 mM): ■, potassium citrate-NaOH buffer; ●, potassium phosphate buffer; ▲, Tris-HCl buffer.

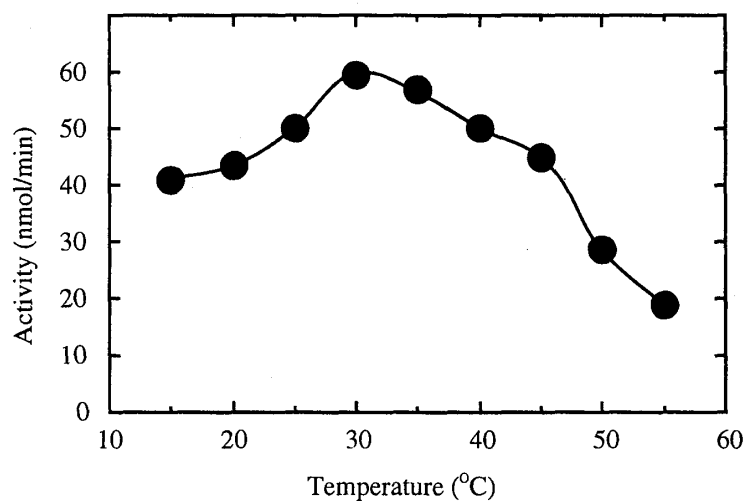


Fig. 3-9. Effect of temperature on L-methionine decarboxylase activity.

Table 3-2. Effect of PLP concentration on L-methionine decarboxylase activity

PLP concentration (M)	Relative activity (%)
10^{-3}	100
10^{-4}	56.7
10^{-5}	50.4
10^{-6}	33.6
10^{-7}	30.4
0	22.7

Table 3-3. Effect of inhibitors on PLP dependent enzymes.

Inhibitor (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
Phenylhydrazine	29.0
Semicarbazide hydrochloride	21.6
Carboxymethoxylamine hemihydrochloride	38.9
hydroxylamine	1.56

After preincubation of the reaction mixture containing each inhibitor for 10 min, L-methionine was added to start reaction.

Table 3-4. Effect of cations on L-methionine decarboxylase activity

Cation (1 mM)	Relative activity (%)
None	100.0
Ca^{2+}	74.3
Co^{2+}	102.5
Cu^{2+}	65.9
Fe^{3+}	62.4
Mg^{2+}	109.2
Mn^{2+}	68.5
Zn^{2+}	24.5

Table 3-5. Effect of various amino acids on L-methionine decarboxylase activity

Amino acid (20 mM)	Relative activity (%)
None	100.0
Ala	43.4
Cys	72.2
Gln	97.7
Glu	101.8
Gly	75.4
His	68.8
Leu	101.8
Lys	58.7
Phe	112.6
Ser	100.5
Thr	103.3
Val	108.1

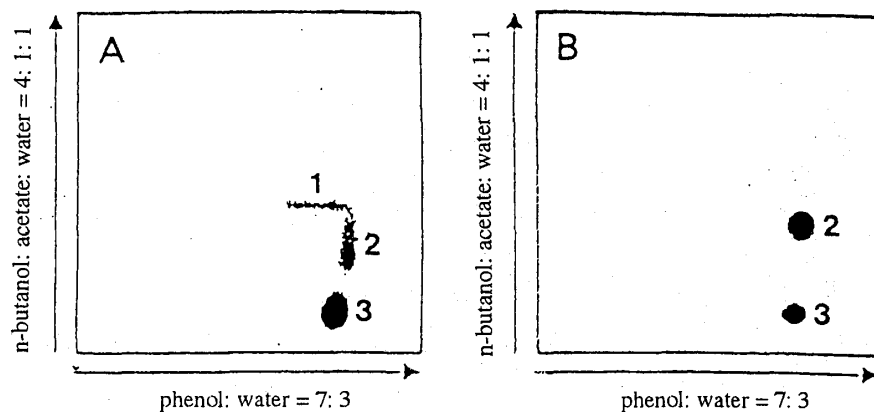


Fig. 3-10. BAS-2000 images of ^{35}S labeled compounds developed by 2D-TLC.

(A) Chromatogram of L-methionine decarboxylase product. Reaction mixture (see text) was incubated for one hour and then developed with two solvent systems.

(B) Chromatogram of control (without enzyme). Reaction mixture without enzyme was incubated for one hour and then developed.

1, MTPA; 2, L-methionine; 3, L-methionine sulfoxide.

本酵素が、補酵素として PLP を要求するかを検討した。PLP 非存在下および $0.1\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 存在下での本酵素の活性を検討したところ、PLP 濃度と活性には正の相関が見られた (Table 3-2)。また、脱炭酸酵素の阻害剤である phenylhydrazine, semicarbazide hydrochloride, carboxymethyl hemihydrochloride, hydroxylamine はいずれも阻害効果を示した (Table 3-3)。

金属イオンが本酵素活性に及ぼす影響を Table 3-4 に示す。各金属イオン存在下での活性は、金属イオン非存在下での活性を 100 とした相対値で示した。本酵素は、 Mg^{2+} によってやや活性化され、 Zn^{2+} によって顕著に阻害された。

本酵素の基質特異性を検討するため、メチオニンとともに各アミノ酸を反応液に加えたときの希釈効果を検討した結果を Table 3-5 に示す。アラニン、ヒスチジン、リジンがやや阻害効果を示したが、メチオニン脱炭酸反応を完全に阻害するアミノ酸は存在しなかった。また、基質として $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ S-アデノシルメチオニンを用いて放出される $^{14}\text{CO}_2$ を測定することにより、本酵素がメチオニンの誘導体である S-アデノシルメチオニンを脱炭酸するかを検討したが、本酵素による S-アデノシルメチオニンからの CO_2 の放出は検出されなかった。

エドマン法によって本酵素の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、9 残基まで解析可能であった。その配列は、Ala- Leu- Cys- Trp- Ser- Asp- Ile- Ser- Pro であった。

本酵素の反応産物を 2D-TLC 分析した結果を Fig. 3-10 に示す。酵素反応を一時間行った系では、MTPA に相当するスポットが検出されたが、酵素を加えない系、酵素を熱処理した系ではそのスポットは観察されなかった。

考 察

本酵素の最適活性 pH は 7 付近であった。この値は、*D. filix-mas*⁹²⁾ で報告された pH 5.0 より *Streptomyces*⁹³⁾ で報告された pH 6.9 に近い値であった。

本酵素の最適活性温度は $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ であった。*C. cohnii* は、至適増殖温度が $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近であり、本酵素は、*C. cohnii* の生育温度付近で高い活性を持つことが示された。

PLP が活性に与える影響を検討した結果 1mM PLP 添加により PLP 非存在に比べて約 5 倍の活性化が認められ、本酵素が PLP を要求することが示唆された。PLP 無添加においても本酵素活性が残存していたのは、本酵素が保持していた PLP の持ち込みがあったためではないかと考えられる。また、PLP 酵素の阻害剤によって本酵素活性が阻害されたことから、本酵素が PLP 要求性であると考えられた。

金属イオンが本酵素の活性に及ぼす影響を検討した結果、本酵素は、 Zn^{2+} によって顕著に阻害された。しかし、今回検討した金属イオンには本酵素を活性化するものではなく、本酵素は活性に金属イオンを要求しないことが示唆された。

メチオニン脱炭酸酵素の基質特異性については、*D. filix-mas* や *Streptomyces* では、S-エチルシステイン、ノルバリン、ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリンなども基質という報告があり^{92, 93)}、疎水性の側鎖を持つものが基質となりやすいと考えられる。*C. cohnii* のメチオニン脱炭酸酵素活性は、アラニン、ヒスチジン、リジンなど一部のアミノ酸によってやや阻害されたが、阻害効

果を示したアミノ酸の側鎖の構造に特徴は見られず、また、今回検討したアミノ酸の中にはメチオニンの脱炭酸を完全に阻害するような顕著な希釈効果を示すものはなかった。本酵素が、阻害効果を示したアミノ酸を脱炭酸することは確認していないため、これらのアミノ酸による阻害効果が競合阻害であるのかはさらに検討が必要であると思われる。メチオニンの誘導体の脱炭酸酵素として、ポリアミン合成系の鍵酵素として特に哺乳類でよく研究されている S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素がある^{69, 70)}。 *C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素は S-アデノシルメチオニン脱炭酸活性は持たなかった。これらの結果から、本酵素の基質特異性は比較的高く、本酵素はメチオニンからの DMSP 生合成経路に特異的に関与する鍵酵素ではないかと考えられた。

本酵素の性質をすでに報告されているメチオニン脱炭酸酵素と比較した (Table 3-6)。本酵素は、ホモ二量体である、PLP を補酵素とする点など共通点もあるが、分子量が他の酵素よりもかなり大きく、最適活性 pH が pH 7 よりやや上であることなどの相違点があった。PLP は多種多様な酵素反応の補酵素となる点できわめてユニークであり、そのため、PLP 酵素の分子進化はその反応機構とともに興味を持たれる。*D. filix-mas* や *Streptomyces* は DMSP を大量に生産するという報告はなく、これらの生物でのメチオニン脱炭酸酵素の役割はまったく検討されていないため、*C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素と他のメチオニン脱炭酸酵素との近縁さは判断できない。これらの酵素反応の分子機構の詳細が明らかになれば、立体化学的な統一性がある近縁な酵素であるかが明らかになるかもしれない。

Table 3-6. Comparison of L-methionine decarboxylases

	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>
M.W.	204,000	100,000	100,000	130,000
Subunit	100,000 (homodimeric)	57,000 (homodimeric)	59,000 (homodimeric)	-
opt.pH	7.3	5.0	6.9	6.4
Coenzyme	PLP	PLP	PLP	PLP
Inhibitory cation	Zn ²⁺ (Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺)			Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺
Reference	This study	Stevenson <i>et al.</i> ⁹²⁾	Stevenson <i>et al.</i> ⁹³⁾	Misono <i>et al.</i> ⁹¹⁾

本酵素の N 末端アミノ酸配列の決定に際しては、PVDF 膜にブロッティングしたのちペプチドシーケンサーに供した。ブロッティング後染色されたタンパク質を切り出すことにより、クロマトグラフィーによる精製のみより純度の高い試料が得られる。ブロッティングに際して使用した Nova-Blot は、セミドライ式のブロッティングキットである。セミドライ方式はタンク式に比べ使用する液量が少ない

などの利点がある。プロッティングは 2 回行い、計 7 枚の試料を得たが、ペプチドシーケンサーのサンプルチャンバー容積の関係で、その中の 6 枚を添加して解析を行った。今回、N 末端から 9 残基の配列を決定することができた。N 末端がメチオニンではないことから本酵素は翻訳後スプライシングを受けていることが示唆された。この配列を元に、DNASIS-Mac Ver. 3.6 (日立ソフト) を用いてホモロジー検索を行ったが、9 残基と配列が短いことから予想されたが有意な相同性を有するアミノ酸配列を持つタンパク質は見つからなかった。

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ala	Leu	Cys	Trp	Ser	Asp	Ile	Ser	Pro
---	---	---	---	---	---	---	---	---
GCT	TTT	TGT	TGG	TCT	GAT	ATT	TCT	CCT
C	C C	C		AGC	C	C	AGC	C
A	A			A		A	A	A
G	G			G			G	G

Fig. 3-11. N-terminal amino acid sequence and its deduced DNA sequence of L-methionine decarboxylase from *C. cohnii*.

また、今回得た配列を塩基配列に翻訳すると揺らぎが大きく (Fig. 3-11)、クローニングなどを行うプローブを作成するには不適當であるので、さらに下流までアミノ酸配列を決定して揺らぎの少ない配列を検索する必要がある。今回添加した試料の量ではシグナルが弱いために 9 残基で解析が不可能となった。本酵素の N 末端は修飾されている可能性があり、本酵素のアミノ酸配列の解析には、現在の 10～100 倍の精製酵素が必要であると考えられる。

[³⁵S] メチオニンを基質として酵素反応を行い、反応後の低分子画分を 2D-TLC によって分析したところ、TLC プレート上には基質であるメチオニン以外にメチオニンスルフォキサイド (Met(O)) と 3-メチルチオプロパンアミン (MTPA) に相当する位置に放射活性が検出された (Fig. 3-10)。Met(O) は酵素を加えないコントロールにも検出され、メチオニンの非酵素的酸化産物であると考えられた。一方、MTPA はコントロールには検出されず、酵素による反応産物であると判断された。また、MTPA 以外に酵素反応による産物は検出されなかった。現在までに精製されたメチオニン脱炭酸酵素では、*D. filiformis* メチオニン脱炭酸酵素⁹²⁾ はアミノ基転移酵素活性を持ち、MTPA 以外に 3-メチルチオプロピオンアルデヒドを生じるが、*Streptomyces* メチオニン脱炭酸酵素⁹³⁾ にはアミノ基転移酵素活性はないと報告されている。*C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素はアミノ基転移酵素活性は持たない *Streptomyces* タイプであることが示唆された。

本酵素の反応産物が特定されたことにより、*C. cohnii* における DMSP 生合成経路の第一段階は解明されたと考えられる。すなわち、DMSP の前駆物質であるメチオニンから PLP を補酵素とする脱炭酸酵素の触媒作用によって MTPA が生成する反応である。第二章の *in vivo* における希釈効果の結果から、*C. cohnii* では 3-メチルチオプロピオン酸 (MTP) がこの経路の中間体であることが強く示唆されている。したがって、DMSP 生合成経路の第二段階は MTPA を MTP にするアミノ基転移反応であ

と考えられる。第二章で *C. cohnii* 粗酵素液中に PLP を補酵素とするアミノ基転移酵素の存在が確認されたが、*C. cohnii* メチオニン脱炭酸酵素はアミノ基転移反応を触媒しないことが示唆されており、この酵素とは別の PLP 依存性アミノ基転移酵素の存在が予想される。

摘 要

海産渦鞭毛藻 *C. cohnii* において DMSP 生合成経路の第一段階を触媒するメチオニン脱炭酸酵素を、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの計 4 カラム操作により電気泳動的に単一にまで精製した。本酵素は 215 倍にまで精製され、収率は 0.1% であった。本酵素は 100 kDa のサブユニット 2 つからなる 200 kDa のホモ二量体であった。本酵素は、補酵素として PLP を要求し、最適活性 pH は 7.3 , 最適活性温度は 30°C で、 Mg^{2+} によってやや活性化され、 Zn^{2+} によって顕著に阻害された。本酵素は基質特異性の高い酵素であることが示唆された。本酵素の N 末端アミノ酸配列は Ala- Leu- Cys- Trp- Ser- Asp- Ile- Ser- Pro であった。本酵素によるメチオニンの脱炭酸反応産物は 3-メチルチオプロパンアミンで、DMSP 生合成経路の第二段階は 3-メチルチオプロパンアミンを 3-メチルチオプロピオン酸にするアミノ基転移反応であると考えられた。

第四章 *Crypthecodinium cohnii* における DMSP の生理機能

塩濃度の変化に伴う細胞内 DMSP 量, メチオニン脱炭酸酵素活性の変化

緒 言

現在までに、大型藻類、微細藻類、陸上植物など多くの生物が DMSP を生産することが報告され^{6,8,18,22-25)}、これらの生物における DMSP の生理機能に興味をもたれてきた。DMSP を生産する生物には、潮間帯や汽水域に生息する藻類、また塩沼に生育する植物など浸透圧変化の大きい環境に生育するものが多く、DMSP は浸透圧調節物質として機能しているのではないかと考えられていた。実際に、緑藻 *Enteromorpha intestinalis* において、培地の塩濃度が上昇すると短時間ではプロリンやスクロースが蓄積し、長時間その状態が続くと DMSP が蓄積することが示され、steady state での浸透圧調節に DMSP が関与していることが示唆された⁵⁴⁾。しかし、これまでの研究は現象面を捕らえたものであり、これらの生物における浸透圧調節機構の詳細は、DMSP 量を調節する生合成、代謝の調節機構を研究することで解明されると期待される。

渦鞭毛藻 *C. cohnii* は、前章までに示したように DMSP 生合成経路が解明されたことから DMSP による浸透圧調節機構を研究するよいモデルとなると考えられる。本章では、浸透圧変化の要因として塩濃度変化を用いて、培地の浸透圧の変動にともなう *C. cohnii* 細胞内 DMSP 量の変動、また *C. cohnii* の DMSP 生合成経路の鍵酵素と考えられるメチオニン脱炭酸酵素の比活性の変動について検討した。

材料および方法

実験に用いた藻類およびその培養 実験には、渦鞭毛藻 *C. cohnii* ATCCe32001 株を用いた。培養には、完全合成培地 A2E6 培地 (Table 4-1) の NaCl 濃度を変えて、それぞれ 1.5, 2.4, 3.0, 3.5 % NaCl になるように調整した培地を用いた。培養は、2 l 駒形フラスコで行い、25 °C 暗所で静置培養した。増殖は、直接顕鏡と波長 660 nm の吸光度を併用して観察した。培養中に塩濃度を変化させる場合、藻体を遠心分離 (500 x g, 3 min) で集藻して、塩濃度の異なる新たな培地に接種した。このとき、同じ処理をしてもとの塩濃度と同じ塩濃度の培地に接種したものをコントロールとした。

細胞試料, 細胞外試料の調製 *C. cohnii* 培養液 1 ml をエッペンドルフチューブにとり、遠心分離 (1600 x g, 5 min) して上清を細胞外試料、沈殿を細胞試料とした。細胞試料は、培地を 1 ml 加え、超音波破砕機 UR-200P (Tomy 社製) を用いて氷上で細胞を破砕した。細胞試料、細胞外試料とも分析まで冷蔵保存した。

***C. cohnii* 粗酵素液の調製** *C. cohnii* 培養液 1 l を遠心分離 (1600 x g, 5 min) して集藻し、等量の緩衝液 A に懸濁して超音波破砕機 UR-200P (Tomy 社製) を用いて破砕し、遠心分離して細胞残渣を除いた。これを 30 ml にメスアップし、80 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて 1 時間攪拌して、遠心分離して上清と油分を除き、沈殿を緩衝液 A に再懸濁し、100 倍量の緩衝液 A に対して 2 回透析して粗酵素液を得た。これらの操作はすべて氷上あるいは 4 °C で行った。粗酵素液のタンパク質

渦鞭毛藻の含硫化合物生合成に関する研究

Table 4-1. Composition of A₂E₆ medium

NaCl	23.48	g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.63	g
Na ₂ SO ₄	3.92	g
CaCl ₂ (anhydrous)	1.11	g
KCl	0.66	g
NaHCO ₃	0.19	g
KBr	0.1	g
H ₃ BO ₃	0.03	g
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.04	g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.01	g
Na ₂ glycerophosphate	0.15	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.0	g
K ₂ HPO ₄	0.01	g
Glucose	3.0	g
Glutamic acid	1.5	g
Metal mixture *	3.0	ml
Vitamin solution **	1.0	ml
Distilled water	996	ml
Adjust pH to 6.4 - 6.6		

* Contained 1.0 g Na₂EDTA, 0.05 g FeCl₃ · 6H₂O, 1.0 g H₃BO₃, 0.15 g MnCl₂ · 4H₂O, 0.01 g ZnCl₂, and 0.005 g CoCl₂ · 6H₂O in 100 ml.

** Contained 0.003 g biotin and 1.0 g thiamine in 1000 ml.

量を Bradford ⁹⁶⁾ の方法に従って Bio Rad Protein Assay Kit で比色定量して 10 mg protein / ml になるように緩衝液 A で希釈した。

DMS, DMSP 量の測定 DMS 量の測定には、ガスクロマトグラフィーを用いた。試料液を適当に希釈し、臭気濃縮装置 VPC-1 (Shimadzu 社製) を用いてヘリウムガスをキャリアーとして 20 分間バブリングして揮発成分を濃縮管に吸着捕集した。濃縮管を硫黄検出器 (flame photometric detector : FPD) 付ガスクロマトグラフ GC-9A (Shimadzu 社製) に接続して Table 4-2 に示した条件で揮発性硫黄化合物を検出した。DMS 量は、相当するピークの面積から標準試料を用いて作成した検量線を用いて算出

した。DMSP 量は、試料を一度バブリングして DMS を除いた後、1 N NaOH を加えて DMSP を DMS とアクリル酸に分解し、DMS 量を上と同様に測定し、換算して求めた。

C. cohnii メチオニン脱炭酸酵素活性の測定 粗酵素液中のメチオニン脱炭酸酵素活性は、第二章に示したように、[1-¹⁴C] メチオニンを基質として用いて、反応後放出される ¹⁴CO₂ を捕集してその放射活性を測定することにより検出した。反応液は、0.1 ml 粗酵素液 (1 mg protein), 0.1 ml 200 mM メチオニン, 0.1 ml/[1-¹⁴C] メチオニン (37 kBq, 比活性 2.0 GBq / mmol, ARC 社製), 0.1 ml/10mM PLP, 0.6 ml 緩衝液 A で全量を 1 ml とした。

Table 4-2. Gas liquid chromatogram condition for DMS analysis

Gas liquid chromatograph	Shimadzu GC-9A
Column	3 ϕ x 3000 mm glass column packed with polyphenylether- 5 rings coated on 60/80 Shimalite TPA
Carrier gas	He
Flow rate	60 ml / min.
Oven condition	
Initial temp.	75 °C
Initial time	5.0 min.
Program rate	8.0 °C / min.
Final temp.	170 °C
Final time	40 min.
Injector temp.	175 °C
Detector	Shimadzu FPD
Detector temp.	200 °C
H ₂	0.6 kg / cm ²
Air	0.6 kg / cm ²
Vapor concentrator	Shimadzu VPC-1
Carrier gas	He
Flow rate	100 ml / min.
Brower temp.	30 °C
Sample tube	packed with PPE-5 rings
Bubbling time	20 min.
Flush sampler	Shimadzu FLS-1
Sample tube temp.	100 °C

結 果

各塩濃度での *C. cohnii* の増殖 *C. cohnii* を 1.5, 2.4, 3.0, 3.5 % NaCl の各培地で培養したときの増殖を 6 時間ごとに計数して作成した増殖曲線を Fig. 4-1 に示す。増殖率、終濃度とも 1.5 % NaCl が最も高く、培地の NaCl 濃度が高くなるほど減少した。

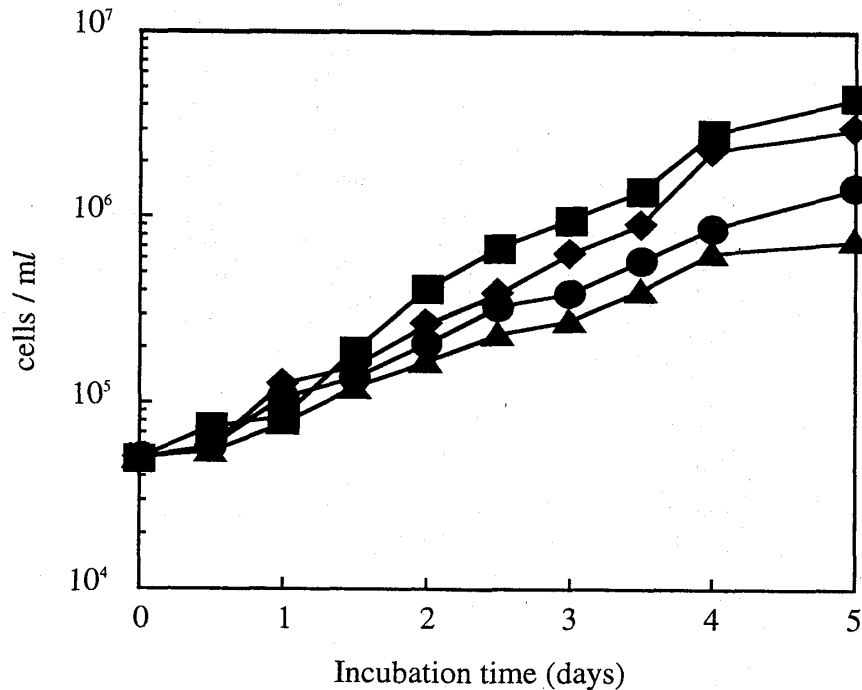


Fig. 4-1. Growth of *C. cohnii* in different salinity.

■, 1.5% NaCl; ◆, 2.4% NaCl; ●, 3.0% NaCl; ▲, 3.5% NaCl.

異なる塩濃度の培地で培養した *C. cohnii* の細胞内 DMSP 量とメチオニン脱炭酸酵素の比活性 *C. cohnii* を 1.5, 2.4, 3.0, 3.5 % NaCl の各培地で前培養した後、同じ濃度の培地に接種して 4 日間培養したときの細胞内 DMSP 量およびメチオニン脱炭酸酵素の比活性を測定した結果を Fig. 4-2 に示す。NaCl 濃度が高いほど細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は高いという傾向がみられた。

培地の塩濃度の変化にともなう *C. cohnii* 細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素活性、および細胞外 DMS 量の変化 1.5 % NaCl 培地で前培養した *C. cohnii* を 3.0 % NaCl 培地に、3.0 % NaCl 培地で前培養した *C. cohnii* を 1.5 % NaCl 培地にそれぞれ移して 6 時間後の細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性の変化を Fig. 4-3 に、細胞外 DMS 量の変化を Fig. 4-4 に示した。同じ NaCl 濃度の培地に移したコントロールでは細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は変化せず、集藻処理による物理的なストレスによる影響はないものと考えられた。1.5 % NaCl 培地で前培養した *C. cohnii* を 3.0 % NaCl 培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量は 2 倍以上に上昇し、メチオニン脱炭酸酵素の比活性も約 1.5 倍上昇した。3.0 % NaCl 培地で前培養した *C. cohnii* を 1.5%

NaCl 培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量, メチオニン脱炭酸酵素の比活性は約半分に減少し, 細胞外 DMS 濃度は 3 倍以上上昇した。

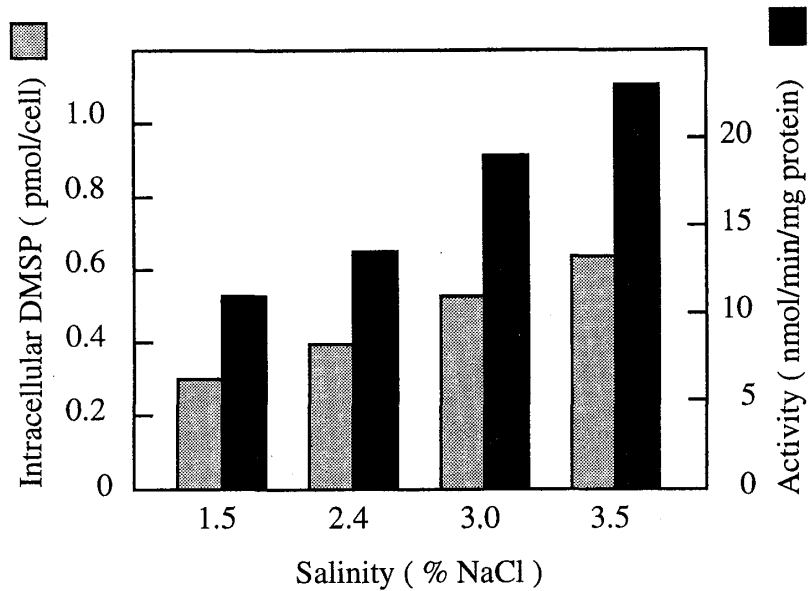


Fig. 4-2. Effect of salinity on DMSP content and L-methionine decarboxylase activity in *C. cohnii*. The cells were grown in each medium for 4 days.

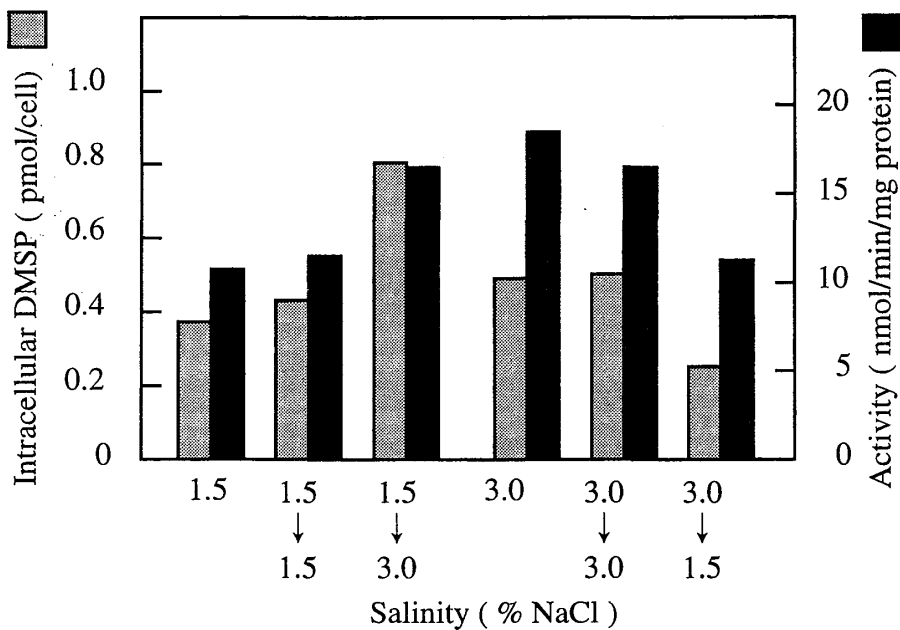


Fig. 4-3. Effect of salinity changes on DMSP content and L-methionine decarboxylase activity in *C. cohnii*. The 4 days culture was transferred to the indicated salinity and incubated for 6 hours.

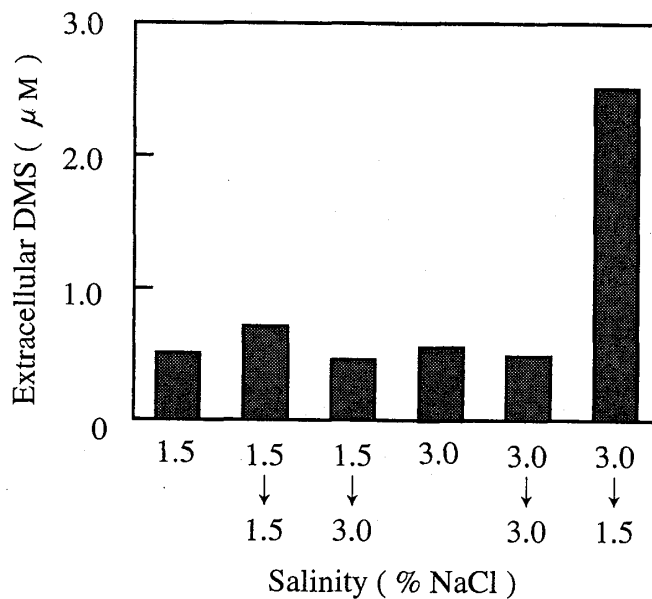


Fig. 4-4. Effects of salinity changes on extracellular DMS.

The 4 days culture was transferred to the indicated salinity and incubated for 6 hours.

考 察

C. cohnii は、1.5 % NaCl から 3.5 % NaCl の範囲で、塩濃度が低いほど良い増殖を示した。実験に用いた株は汽水域で分離された株であるため、海水の塩濃度よりも低い塩濃度で良好な増殖がみられる増殖特性を示すと考えられた。また、このような広い塩濃度で増殖が見られることは、塩濃度変化の大きい環境に生育するために適応しているためであると考えられ、*C. cohnii* が浸透圧変化に対して適応する機構を持つことが示唆された。

細胞が浸透圧変化に曝された時には、細胞サイズを変化させる、 $K^+ - Na^+$ ポンプなどによって細胞内のイオン濃度を調節する、細胞内の低分子有機化合物の量を調節するなどの機構によって新たな浸透圧条件に適応するとされている¹⁰¹⁾。その中で、浸透圧の上昇に伴って細胞内に蓄積され、細胞の機能に障害を与えない低分子有機化合物は二面性溶質と呼ばれ、高級アルコール（グリセロールなど）、アミノ酸類（プロリンなど）、ペタイン類（グリシンペタインなど）が知られている。二面性溶質による浸透圧調節機構は、出芽酵母 *Saccharomyces* におけるグリセロールの蓄積機構についてよく研究されている。*Saccharomyces* は、浸透圧の変化を感知するとタンパク質のリン酸化を介した情報伝達機構によってグリセロール合成系、分解系酵素の転写を制御して細胞内グリセロール量を調節することが明らかにされており、その詳細な機構が研究されている¹⁰²⁾。

DMSP は、二面性溶質として知られるペタインと構造が類似しており、浸透圧調節に関与している可能性があると考えられる。そこで、*C. cohnii* において、培地の塩濃度と細胞内 DMSP 量との関係を調べたところ、塩濃度の高い培地で培養した方が細胞内 DMSP 量が高くなる傾向が見られた。その細胞内 DMSP 量は、0.3 ~ 0.6 pmol / cell であり、この値は *C. cohnii* の細胞サイズを直径 2.0 μm の

球体と近似すると細胞の浸透圧にとって有意であると考えられた。このことから、*C. cohnii* は、細胞外の浸透圧変化を感知して細胞内 DMSP 量を変動させることによって適応していることが示唆された。また、培地の塩濃度が高いほど DMSP 生合成経路の第一段階を触媒するメチオニン脱炭酸酵素の比活性も高い傾向が見られ、細胞外の塩濃度の上昇によって DMSP 生合成経路が活性化していることが示唆された。このことから、高浸透圧条件では DMSP 量を能動的に高く維持して適応する機構が存在するのではないかと考えられた。

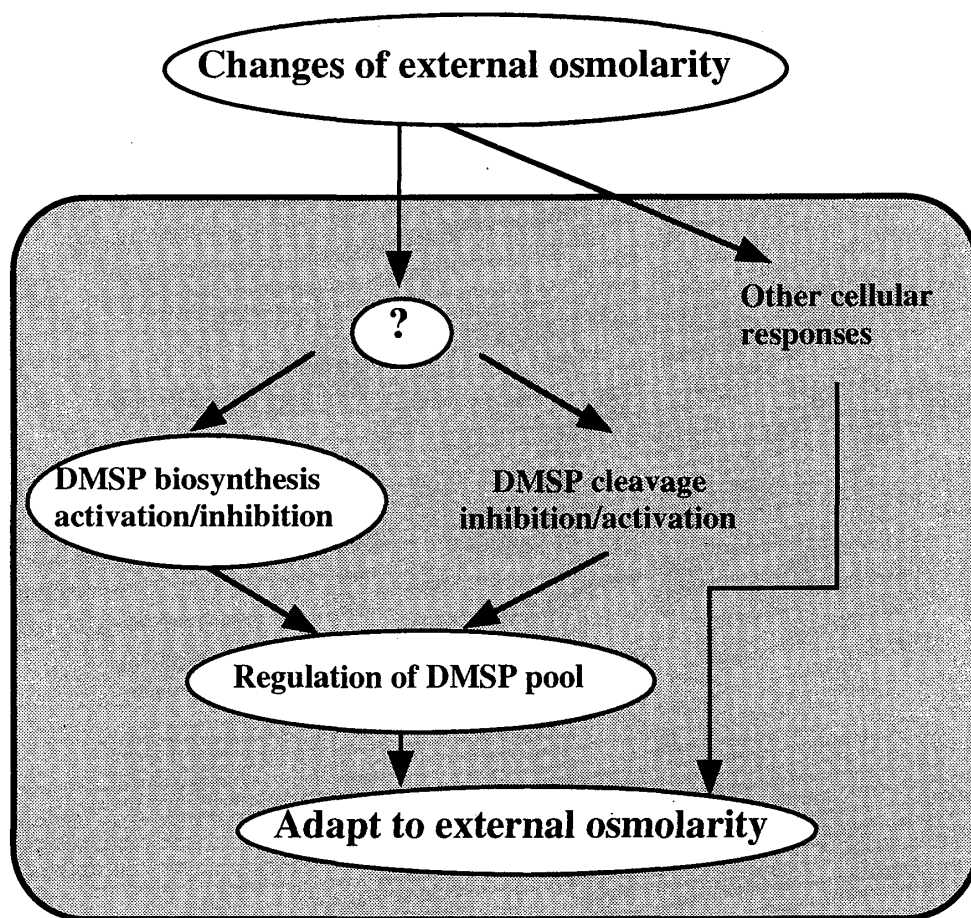


Fig. 4-5. Hypothetical mechanisms of osmoregulation in *C. cohnii*.

また、培地の塩濃度が変化してから 6 時間後の細胞内 DMSP 量、細胞外 DMS 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性の変動を検討したところ、塩濃度が上昇したときには細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性はともに上昇した。このことより、*C. cohnii* は細胞外の浸透圧の上昇にともなって 6 時間以内に DMSP 生合成系を活性化して DMSP を蓄積することにより浸透圧調節を行うことが示唆された。一方、塩濃度が減少したときには、細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性はともに減少し、細胞外 DMS 量が顕著に上昇することが観察された。このことから、*C. cohnii* は細胞

外の浸透圧の減少にともなう、6 時間以内に DMSP 生合成系を抑制するとともに DMSP を分解することによって細胞外に放出して細胞内 DMSP 量を減少させる機構を持つことが示唆された。これらの結果から、*C. cohnii* が細胞外の塩濃度の変化を感知し、細胞内の浸透圧を外界と一定に保つ機構の一つとして DMSP 量の調節機構があると考えられる。Fig. 4-5 は、この機構を模式的に示した図である。*C. cohnii* は、細胞外の浸透圧が上昇すると DMSP 合成系の活性化、分解系の抑制によって細胞内 DMSP 量を増加させて細胞内の浸透圧を高め、逆に細胞外の浸透圧が下がると DMSP 合成系の抑制、分解系の活性化により細胞内 DMSP 量を減少させることによって細胞内の浸透圧を下げて新たな浸透圧条件に適応するのではないかと考察した。

緑藻 *E. intestinalis* では、DMSP、プロリン、スクロースの三種の化合物が高浸透圧条件で蓄積することが報告されている⁵⁴⁾。浸透圧の上昇後 6 時間以内ではプロリンが蓄積し、12 時間以降にスクロース、さらに長い steady state では DMSP がそれぞれ蓄積することから、これらの化合物は高浸透圧条件に曝される期間によって使い分けられているとされている。*C. cohnii* において、培地の塩濃度を上昇させて 6 時間以内に細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性ともに上昇したことより、DMSP は、*C. cohnii* において *E. intestinalis* よりも短時間での浸透圧変化に対する適応機構に関与していることが示唆された。第二章の結果より、*C. cohnii* と *E. intestinalis* では DMSP 生合成経路が異なると考えられ、その生合成関連酵素群の転写、発現制御機構も異なる可能性がある。どちらの生物においても DMSP は浸透圧調節物質として機能していると考えられるが、その物質量を調節する機構は異なることが示唆され、これらの生物における DMSP 生合成経路の獲得は、それぞれ浸透圧に対する異なる適応の過程でもたらされたのかもしれない。

摘 要

DMSP の生理機能の一つは浸透圧調節であると考えられている。渦鞭毛藻 *C. cohnii* を用いて、浸透圧変化の要因として塩濃度の変動にともなう細胞内 DMSP 量の変動、また *C. cohnii* の DMSP 生合成経路の鍵酵素と考えられるメチオニン脱炭酸酵素の比活性の変動について検討した。

C. cohnii は、1.5 % NaCl から 3.5 % NaCl の範囲で、塩濃度が低いほど良い増殖を示した。これは *C. cohnii* が汽水域の貯木場などに生息する種であることを反映していると考えられた。また、塩濃度が高いほど細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は高いという傾向がみられ、高浸透圧条件では DMSP 量を能動的に高く維持して適応する機構が存在することが示唆された。

培地の塩濃度の変化にともなう *C. cohnii* 細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性、および細胞外 DMS 量の変化を検討したところ、低塩濃度から高塩濃度の培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は 2 倍程度上昇した。高塩濃度から低塩濃度の培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素活性は約半分に減少し、そのとき細胞外 DMS 濃度は 3 倍以上上昇した。これらの結果から、*C. cohnii* は、細胞外の浸透圧が上昇すると DMSP 合成系の活性化によって細胞内 DMSP 量を増加させて細胞内の浸透圧を高め、逆に細胞外の浸透圧が下がると DMSP 合成系の抑制、分解系の活性化により細胞内 DMSP 量を減少させて細胞内の浸透圧を下げて新たな浸透圧条件に適応するのではないかと考えられた。また、*C. cohnii* は浸透圧変化によ

って 6 時間以内に DMSP 量を変動させることから, *C. cohnii* において DMSP は, 緑藻 *E. intestinalis* における steady state での浸透圧調節機構とは異なる機構に関与していることが示唆された。

第五章 総 括

硫化ジメチル (DMS) は、海洋から大気中へ輸送される生物起源の硫黄の 80 % を占め、地球規模の硫黄循環を考える上で重要な物質である。また、放出された DMS は硫酸にまで酸化されて雲凝結核となることから、酸性雨への影響、アルベドの減少による地球温暖化の抑止効果などが指摘され、環境問題との関わりにおいても注目すべき物質である。海洋における DMS の前駆物質はジメチルスルフォニオプロピオン酸 (DMSP) であり、DMSP は酵素的分解により DMS とアクリル酸を生成する。しかし、藻類における DMSP の生合成については知見が少なく、硫黄循環のミッシング・リンクとなっていた。また DMSP の生理機能は、浸透圧調節物質であるとされているが、その調節機構など詳細は不明であった。DMSP は、魚類の摂餌誘因、成長促進物質であり、またラットにおいて抗胃潰瘍効果が認められたことから海産物由来の生理活性物質としてその応用が期待されている。海洋での DMSP の主な生産者である藻類における DMSP 生合成経路を解明することは硫黄循環のミッシング・リンクを解明することにつながり、DMSP の生理機能や生理活性物質としての DMSP の応用面を考える上でも重要であると考えられる。以前から、DMSP はメチオニンから合成されるとされていたが、その経路に含まれる反応の順序など、詳細は不明であった。ごく最近になって、顕花植物 *Wollastonia biflora*、緑藻 *Enteromorpha intestinalis* における DMSP 生合成経路について報告がなされたが、これらはそれぞれ別の経路であることから、メチオニンから DMSP を合成する経路は生物種間で異なることが示唆されている。

そこで本研究では、汽水域に生育し DMSP を大量に生産する従属栄養性の渦鞭毛藻 *C. cohnii* を用いて DMSP 生合成経路について検討した。渦鞭毛藻は、真核生物でありながらヒストンを持たないなどの特徴を持つことから進化的にも興味深い生物であり、また本種以外にも *Gymnodinium mikimotoi* など赤潮を形成する藻類に DMSP 産生種があり、特に沿岸域における DMSP の産生に大きく関与していると考えられる。まず、*C. cohnii* における DMSP 生合成経路を *in vivo* で検討し、次に酵素レベルで解明することを試みた。また、DMSP の生理機能として、浸透圧調節への関与についても検討した。以下に得られた成果の概要を示す。

(1) 海産渦鞭毛藻 *C. cohnii* における DMSP 生合成経路を、*in vivo* トレーサー実験によって検討した結果、メチオニンが近い前駆物質であり、メチオニンの一位の炭素以外の炭素原子および硫黄原子は DMSP 合成に利用されることを明らかにした。この結果とメチオニンと DMSP の構造の比較から、メチオニンから DMSP を合成する経路は、脱炭酸反応、脱アミノ反応、メチル基付加反応の三反応からなると考察した。

(2) 中間体と予想される化合物の希釈効果を検討したところ、他生物の DMSP 生合成経路の中間体は希釈効果を示さず、新奇な生合成経路の存在が強く示唆された。すなわち、メチオニンの脱炭酸反応により 3-メチルチオプロパンアミン (MTPA) を生じ、続いてアミノ基転移反応によって生じる 3-メチルチオプロピオン酸 (MTP) を経てメチル基付加反応を最終反応として DMSP が合成されるという経路である (Fig. 5-1)。

(3) *C. cohnii* 粗酵素液中に (2) の反応を触媒する酵素活性の存在を検索したところ、メチオニン脱炭酸酵素、MTPA アミノ基転移酵素、MTP メチル基転移酵素活性がすべて存在し、*C. cohnii* はこ

の経路によって DMSP を生合成することが強く示唆された。

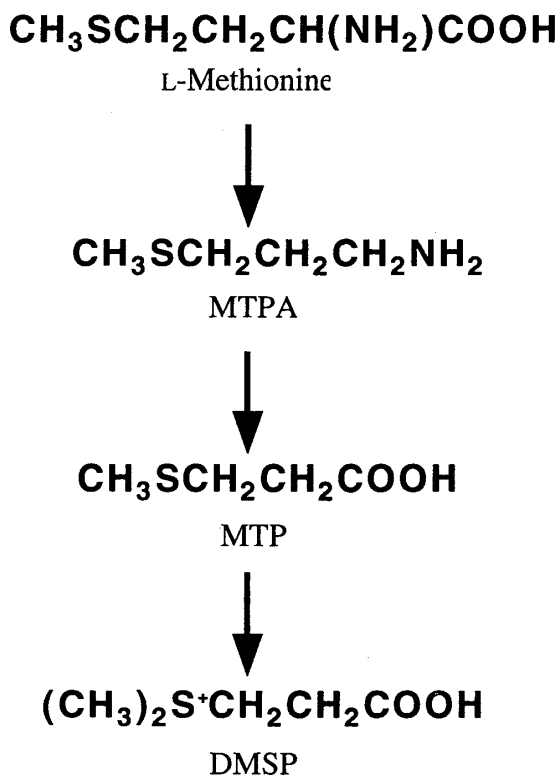


Fig. 5-1. Pathway from L-methionine to DMSP in *C. cohnii*.

MTPA, 3-methylthiopropylamine; MTP, 3-methylthiopropionate.

(4) *C. cohnii* における DMSP 生合成経路の第一段階を触媒するメチオニン脱炭酸酵素を電気泳動的に単一にまで精製し、諸性質を検討した。本酵素は分子量約 100,000 のサブユニット二個からなる分子量約 200,000 のホモ二量体であった。本酵素は、補酵素として PLP を要求し、最適活性 pH は 7 付近、最適活性温度は 30°C で、 Mg^{2+} によってやや活性化され、 Zn^{2+} によって顕著に阻害された。本酵素は基質特異性の高い酵素であることが示唆された。本酵素の N 末端アミノ酸配列は Ala- Leu- Cys- Trp- Ser- Asp- Ile- Ser- Pro- - であった。本酵素によるメチオニンの脱炭酸反応産物は MTPA で、DMSP 生合成経路の第二段階は MTPA を MTP にするアミノ基転移反応であると考察した。

(5) DMSP の生理機能の一つは浸透圧調節物質であると考えられている。浸透圧変化の要因として NaCl 濃度変化を用いて、細胞内 DMSP 量の変動、メチオニン脱炭酸酵素の比活性の変動を測定し、*C. cohnii* において DMSP が浸透圧調節物質である可能性について検討した。*C. cohnii* を 1.5 % NaCl

から 3.5 % NaCl の範囲で培養したところ、NaCl 濃度が高いほど細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は高いという傾向がみられ、高浸透圧条件では DMSP 量を能動的に高く維持して適応する機構が存在することが示唆された。また、低塩濃度から高塩濃度の培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は 2 倍程度上昇した。一方、高塩濃度から低塩濃度の培地に移して 6 時間後には細胞内 DMSP 量、メチオニン脱炭酸酵素の比活性は約半分に減少し、そのとき細胞外 DMS 濃度は 3 倍以上上昇した。これらの結果から、*C. cohnii* は、細胞外の浸透圧が上昇すると DMSP 合成系の活性化によって細胞内 DMSP 量を増加させて細胞内の浸透圧を高め、逆に細胞外の浸透圧が下がると DMSP 合成系の抑制、分解系の活性化により細胞内 DMSP 量を減少させて細胞内の浸透圧を下げて新たな浸透圧条件に適応するのではないかと考察した。

以上の得られた知見より、*C. cohnii* は現在までに報告された経路とは異なる新奇な DMSP 生合成経路を持つことが明らかとなり、その生合成は浸透圧によって調節を受けると考えられた。また、浸透圧の上昇にともなう DMSP の蓄積は緑藻より短時間で観察され、DMSP による浸透圧調節機構はこれらの生物間で異なることが示唆された。本研究で得られた成果をもとに DMSP 生合成経路関連酵素の遺伝子レベルでの解析を行うことにより、DMSP 生合成経路の生物種間での分布や生合成の調節機構が解明されることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なる御指導ならび御鞭撻を賜りました、京都大学大学院農学研究科教授 内田有恒先生に深く感謝の意を表します。

アミノ酸配列の解析の際にお世話になりました大阪医科大学物理学講座 和田明博士、DMSP の合成をしていただいた塩野香料 川合哲夫氏に心から御礼申し上げます。

また、多くの御助言と御協力をいただきました福山大学工学部教授 石田祐三郎先生、京都大学大学院農学研究科助教授 左子芳彦博士、同助手 吉永郁生博士、水産大学校製造学科助手 前田俊道博士に深く感謝いたします。

そして、本研究の遂行に御助力いただきました大栗智昭様、石田丈博様、北沢菜穂子様、中野江一郎様をはじめとする京都大学大学院農学研究科海洋分子微生物学研究室の皆様や諸先輩方に深く感謝し、御礼申し上げます。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（特別研究員奨励費）「海産渦鞭毛藻の揮発性有機硫黄化合物生合成経路に関する研究（受付番号 6371）」に拠りました。記して謝意を表します。

文 献

- 1) T. Kiribuchi and T. Yamanishi: Studies on flavor of green tea. *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 56-59 (1962).
- 2) J. C. Miers: Formation of volatile sulfur compounds in processed tomato products. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 421-423 (1966).
- 3) D. D. Bills and T. W. Keenen: Dimethyl sulfide and its precursor in sweetcorn. *J. Agric. Food Chem.*, **16**, 643-645 (1968).
- 4) C. J. Dickenson: Dimethyl sulphide in malting and brewing. *Chem. Ind.*, **15**, 896-898 (1979).
- 5) P. J. L. Derikx, F. H. M. Simons, H. J. M. O. P. den Camp, C. van der Drift, L. J. L. D. van Griensven, and G. D. Vogels: Evolution of volatile sulfur compounds during laboratory-scale incubation and indoor preparation of compost used as a substrate in mushroom cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 563-567 (1991).
- 6) R. H. White: Analysis of dimethyl sulfonium compounds in marine algae. *J. Mar. Res.*, **40**, 529-536 (1982).
- 7) S. Araki, T. Ogawa, T. Oohusa, M. Kayama, and A. Kobayashi: Flavor of dried laver "nori" at different water activities, with special reference to dimethyl sulfide production. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1717-1720 (1983).
- 8) H. Iida, K. Nakamura, and T. Tokunaga: Dimethylsulfide and dimethyl- β -propiothetin in sea algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1145-1150 (1985).
- 9) T. Tokunaga, H. Iida, and K. Nakamura: Formation of dimethyl sulfide in antarctic krill, *Euphausia superba*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 1209-1217 (1977).
- 10) H. Iida: Studies on the accumulation of dimethyl- β -propiothetin and the formation of dimethyl sulfide in aquatic organisms. *Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab.*, **124**, 35-111 (1988).
- 11) P. A. Steudler and B. J. Peterson: Contribution of gaseous sulphur from salt marshes to the global sulphur cycle. *Nature*, **311**, 455-457 (1984).
- 12) 内田有恒: 海洋におけるイオウサイクルと微生物. 海洋科学, **120**, 74-79 (1988).
- 13) M. O. Andreae: Ocean-atmosphere interactions in the global biogeochemical sulfur cycle. *Mar. Chem.*, **30**, 1-29 (1990).
- 14) J. A. E. Gibson, R. C. Garrick, H. R. Burton, and A. R. McTaggart: Dimethyl sulfide and the algae *Phaeocystis pouchetii* in antarctic coastal waters. *Mar. Biol.*, **104**, 339-346 (1990).
- 15) E. Eriksson: The yearly circulation of sulfur in nature. *J. Geophys. Res.*, **68**, 4001-4008 (1963).
- 16) W. W. Kellogg, R. D. Cadle, E. R. Allen, A. L. Lazrus, and E. A. Martell: The sulfur cycle. *Science*, **175**, 587-596 (1972).
- 17) J. E. Lovelock, R. J. Maggs, and R. A. Rasmussen: Atmospheric dimethylsulfide and the natural sulfur cycle. *Nature*, **237**, 452-453 (1972).
- 18) R. L. Iverson, F. L. Nearhoof, and M. O. Andreae: Production of dimethylsulfonium and dimethylsulfide by phytoplankton in estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, **34**, 53-67 (1989).
- 19) A. Uchida, T. Ooguri, and Y. Ishida: The distribution of dimethylsulphide in the waters off Japan and in the

- subtropical and tropical Pacific Ocean. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 261-265 (1992).
- 20) S. G. Wakeham, B. L. Howes, and J. W. H. Dacey: Dimethyl sulfide in a stratified coastal salt pond. *Nature*, **310**, 770-772 (1984):
 - 21) J. W. H. Dacey, G. M. King, and S. G. Wakeham: Factors controlling emission of dimethylsulfide from salt marshes. *Nature*, **330**, 643-645 (1987).
 - 22) P. Haas: The liberation of methyl sulphide by sea-weed. *Biochem. J.*, **29**, 1297-1299 (1935).
 - 23) U. Karsten, C. Wiencke, and G. O. Kirst: The β -dimethylsulphonioacetate (DMSP) content of macroalgae from Antarctica and Southern Chile. *Bot.Mar.*, **33**, 143-146 (1990).
 - 24) Y. Ishida and H. Kadota: Production of dimethyl sulfide from unicellular algae. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **33**, 782-787 (1967).
 - 25) A. Vairavamurthy, M. O. Andreae, and R. L. Iverson: Biosynthesis of dimethylsulfide and dimethylpropiothetin by *Hymenomonas carterae* in relation to sulfur source and salinity variations. *Limnol.Oceanogr.*, **30**, 59-70 (1985).
 - 26) F. Challenger and M. I. Simpson: Studies on biological methylation. Part XII. A precursor of the dimethyl sulfide evolved by *Polysiphonia fastigiata*. Dimethyl-2-carboxyethyl sulphonium hydroxide and its salts. *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1591-1597 (1948).
 - 27) R. G. Ackman, C. S. Tocher, and J. McLachlan: Occurrence of dimethyl- β -propiothetin in marine phytoplankton. *J. Fish Res. Bd. Canada*, **23**, 357-364 (1966).
 - 28) H. Kadota and Y. Ishida: Effect of salts on enzymatical production of dimethyl sulfide from *Gyrodinium cohnii*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **34**, 512-518 (1968).
 - 29) G. L. Cantoni and D. G. Anderson: Enzymatic cleavage of dimethylpropiothetin by *Polysiphonia lanosa*. *J. Biol. Chem.*, **222**, 171-177 (1956).
 - 30) C. S. Tocher, R. G. Ackman, and J. McLachlan: The identification of dimethylpropiothetin in the algae *Syracosphaera carterae* and *Ulva lactuca*. *Can. J. Biochem.*, **44**, 519 (1966).
 - 31) H. Kadota and Y. Ishida: Production of volatile sulfur compounds by microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 127-138 (1972).
 - 32) D. M. Dickson, R. G. Wyn Jones, and J. Davenport: Steady state osmotic adaption in *Ulva lactuca*. *Planta*, **150**, 158-165 (1980).
 - 33) R. P. Kiene: Dimethyl sulfide production from dimethylsulfonylpropionate in coastal seawater samples and bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3292-3297 (1990).
 - 34) J. Stefels and W. H. M. van Boekel: Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **97**, 11-18 (1993).
 - 35) M. R. Diaz, P. T. Visscher, and B. F. Taylor: Metabolism of dimethylsulfonylpropionate and glycine betaine by a marine bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**, 61-66 (1992).
 - 36) M.P. de Souza and D. C. Yoch: Purification and characterization of dimethylsulfonylpropionate lyase from an *Alcaligenes*-like dimethyl sulfide-producing marine isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 21-26 (1995).

- 37) M.P. de Souza and D. C. Yoch: Comparative physiology of dimethyl sulfide production of DMSP lyase in two marine strains *Pseudomonas doudoroffii* and *Alcaligenes* M3A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3986-3991 (1995).
- 38) M.P. de Souza and D. C. Yoch: Dimethylsulfoniopropionate lyase from the marine macroalga *Ulva curvata*, purification and characterization of the enzyme. *Planta*, **199**, 433-438 (1996).
- 39) R. J. Charlson, J. E. Lovelock, M. O. Andreae, and S. G. Warren: Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*, **326**, 655-661 (1987).
- 40) 河村公隆: 大気から海へ, 海から大気へ. 科学, **62**, 642-647 (1992).
- 41) K. Nakajima, A. Uchida, and Y. Ishida: A new feeding attractant, dimethyl- β -propiothetin, for freshwater fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 689-695 (1989).
- 42) K. Nakajima, A. Uchida, and Y. Ishida: Effect of supplemental dietary feeding attractant, dimethyl- β -propiothetin, on growth of goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1291 (1989).
- 43) K. Nakajima, A. Uchida, and Y. Ishida: Effect of a feeding attractant, dimethyl- β -propiothetin, on growth of marine fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1151-1154 (1990).
- 44) Y. Ishida, Y. Ogihara, and S. Okabe: Effects of a crude extract of a marine dinoflagellate, containing dimethyl- β -propiothetin, on HCl-ethanol-induced gastric lesions and gastric secretion in rats. *Japan J. Pharmacol.*, **54**, 333-338 (1990).
- 45) K. Nakajima: Dimethyl- β -propiothetin, new potent resistive-agent against stress-induced gastric ulcers in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 229-238 (1991).
- 46) T. Kawabe, T. Nagaoka, G. Nagahama, H. Morita, and A. Ohbayashi: Generation of dimethyl- β -propiothetin in an extract of green algae *Monostroma nitidum* and its retention by cyclodextrin. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2587-2591 (1989).
- 47) W. L. Chameides and D. D. Davis: Chemistry in the troposphere. *Chem. Eng. News*, **60**, 39-52 (1982).
- 48) W. R. Barnard, M. O. Andreae, and R. L. Iverson: Dymethylsulfide and *Paeocystis pouchetii* in the southeastern Bering Sea. *Cont. Shelf Res.*, **3**, 103-113 (1984).
- 49) J. M. Sieburth: Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiotics of polar marine animals. *J. Bacteriol.*, **82**, 72-79 (1961).
- 50) G. A. Maw and V. du Vigneaud: Compounds related to dimethylthetin as sources of labile methyl groups. *J. Biol. Chem.*, **176**, 1037-1045 (1979).
- 51) M. J. Bechard and W. R. Rayburn: Volatile organic sulfides from freshwater algae. *J. Phycol.*, **15**, 379-383 (1979).
- 52) A. D. Brown and J. R. Simpson: Water relations of sugartorerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 589-591 (1972).
- 53) R. H. Reed: Measurement and osmotic significance of β -dimethylsulfoniopropionate in marine macroalgae. *Mar. Biol. Lett.*, **4**, 173-181 (1983).
- 54) D. M. Edwards, R. H. Reed, and W. D. P. Stewart: Osmoacclimation in *Enteromorpha intestinalis*: long-term

- effects of osmotic stress on organic solute accumulation. *Mar. Biol.*, **98**, 467-476 (1988).
- 55) U. Karsten and G. O. Kirst: Intracellular solutes, photosynthesis and respiration of the green alga *Blidingia minima* in response to salinity stress. *Bot. Acta*, **102**, 123-128 (1989).
 - 56) D. M. Dickson and G. O. Kirst: The role of β -dimethylsulfoniopropionate, glycine, and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*. *Planta*, **167**, 536-543 (1986).
 - 57) D. M. J. Dickson and G. O. Kirst: Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae: the role of inorganic ions, quaternary ammonium, tertiary sulfonium and carbohydrate solutes: I. Diatoms and a rhodophyte. *New Phytol.*, **106**, 645-655 (1987).
 - 58) D. M. J. Dickson and G. O. Kirst: Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae: the role of inorganic ions, quaternary ammonium, tertiary sulfonium and carbohydrate solutes: II. Prasinophytes and haptophytes. *New Phytol.*, **106**, 657-666 (1987).
 - 59) T. W. M. Fan, T. D. Colmer, A. N. Lane, and R. M. Higashi: Determination of metabolites by ^1H NMR and GC: analysis for organic osmolytes in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.*, **214**, 260-271 (1993).
 - 60) M. L. Otte and J. T. Morris: Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in *Spartina alterniflora* Loisei. *Aquatic Bot.*, **48**, 239-259 (1994).
 - 61) R. Storey, J. Gorham, M. G. Pitman, A. D. Hanson, and D. Gage. Response of *Melanthera biflora* to salinity and water stress. *J. Exp. Bot.*, **44**, 1551-1560 (1993).
 - 62) T. Grøne and G. O. Kirst: Aspects of dimethylsulfoniopropionate effects on enzymes isolated from the marine phytoplankter *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). *J. Plant Physiol.*, **138**, 85-91 (1991).
 - 63) G. O. Kirst, C. Thiel, H. Wolff, J. Nothnagel, N. Wanzek, and R. Ulmke: Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in ice-algae and its possible biological role. *Mar. Chem.*, **35**, 381-388 (1991).
 - 64) J. D. Finkelstein, J. J. Martin, and B. J. Harris: Methionine metabolism in mammals. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11750-11754 (1988).
 - 65) H. J. Bolm, P. A. M. van den Elzen, S. H. Yap, and A. Tangerman: Methanethiol and dimethyl sulfide formation from 3-methylthiopropionate in human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **972**, 131-136 (1988).
 - 66) K. Soda: Microbial sulfur amino acids. *Method Enzymol.*, **143**, 453-459 (1987).
 - 67) G. L. Cantoni: S-Adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J. Biol. Chem.*, **204**, 403-406 (1953).
 - 68) 五十嵐一衛, 柏木敬子: 神秘の生命物質ポリアミン. 化学と生物, **35**, 442-450. (1997).
 - 69) R. Autelli, L. Stjernborg, A. R. Khomutov, and L. Persson: Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase in L1210 leukemia cells. *Eur. J. Biochem.*, **196**, 551-556 (1991).
 - 70) K. Nishimura, M. Liisanantti, Y. Muta, K. Kashiwagi, A. Shirahata, M. Janne, K. Kankare, O. A. Janne, and K. Igarashi: Structure and activity of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase gene promoters and properties of the encoded proteins. *Biochem. J.*, **332**, 651-659 (1998).
 - 71) 中村英士: 海洋微小藻の発光周期調節物質. 化学と生物, **29**, 278-279 (1991).
 - 72) T. Roennenberg, H. Nakamura, L. D. Cranmer, K. Ryan, Y. Kishi, and J. W. Hastings: Ganyaulin: a novel

- endogenous substance shortening the period of the circadian clock of a unicellular alga. *Experientia*, **47**, 103-106 (1991).
- 73) R. P. Kiene and D. G. Capone: Microbial transformations of methylated sulfur compounds in anoxic salt marsh sediments. *Microbial Ecol.*, **15**, 275-291 (1988).
 - 74) P. T. Vischer and H. van Gernerden: Production and consumption of dimethylsulfoniopropionate in marine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3237-3242 (1991).
 - 75) K. M. Ledyard, E. F. DeLong, and J. W. H. Dacey: Characterization of a DMSP-degrading bacterial isolate from the Sargasso Sea. *Arch. Microbiol.*, **160**, 312-318 (1993).
 - 76) K. M. Ledyard and J. W. H. Dacey: Dimethylsulfide production from dimethylsulfoniopropionate by a marine bacterium, *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **110**, 95-103 (1994).
 - 77) M. Steinke, C. Daniel, and G. O. Kirst: DMSP lyase in marine macro- and microalgae, in "Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds" (ed. by R. P. Kiene, P. T. Visscher, M. D. Keller, and G. O. Kirst), Plenum Press, New York, 1996, pp. 317-326.
 - 78) M. K. Nishiguchi and L. J. Goff: Isolation, purification, and characterization of DMSP lyase (dimethylpropiothetin dethiomethylase (4.4.1.3)) from the red alga *Polysiphonia paniculata*. *J. Phycol.*, **31**, 567-574 (1995).
 - 79) B. F. Taylor and D. C. Gilchrist: New routes for the aerobic biodegradation of dimethylsulfoniopropionate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3581-3584 (1991).
 - 80) P. T. Visscher, R. P. Kiene, and B. F. Taylor: Demethylation and consumption of dimethylsulfoniopropionate in marine intertidal sediments. *FEMS Microbial. Ecol.*, **14**, 179-190 (1994).
 - 81) R. C. Greene: Biosynthesis of dimethyl- β -propiothetin. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2251-2254 (1962).
 - 82) V. Kahn: Glycine as a methyl donor in dimethyl- β -propiothetin synthesis. *J. Exp. Bot.*, **15**, 225-231 (1964).
 - 83) A. D. Hanson, J. Rivoal, L. Paquet, and D. A. Gage: Biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia biflora* (L.) DC. Evidence that S-methylmethionine is an intermediate. *Plant Physiol.*, **105**, 103-110 (1994).
 - 84) F. James, L. Paquet, S. A. Sparace, D. A. Gage, and A. D. Hanson: Evidence implicating dimethylsulfoniopropionaldehyde as an intermediate in dimethylsulfoniopropionate biosynthesis. *Plant Physiol.*, **108**, 1439-1448 (1995).
 - 85) D. A. Gage, D. Rhodes, K. D. Norte, W. A. Hicks, T. Leustek, A. J. Cooper, and A. D. Hanson: A new route for synthesis of dimethylsulphoniopropionate in marine algae. *Nature*, **387**, 891-894 (1997).
 - 86) C. Trossat, K. D. Nolte, and A. D. Hanson: Evidence that the pathway of dimethylsulfoniopropionate biosynthesis begins in the cytosol and ends in the chloroplast. *Plant Physiol.*, **111**, 965-973 (1996).
 - 87) P. S. Summers, K. D. Nolte, A. J. L. Cooper, H. Borgeas, T. Leustek, D. Rhodes, and A. D. Hanson: Identification and stereospecificity of the first three enzymes of 3-dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in a chlorophyte alga. *Plant Physiol.*, **116**, 369-378 (1998).
 - 88) M. Mazelis: Decarboxylation of methionine by an enzyme system from cabbage leaf. *Biochem. Biophys. Res.*

Comm., **1**, 59-63 (1959).

- 89) J. L. Dixon and N. J. Benevenga: The decarboxylation of α -keto- γ -methiolbutylate. *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 939-946 (1980).
- 90) M. Mazelis: The pyridoxal phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 104 (1962).
- 91) H. Misono, Y. Kawabata, M. Toyosato, T. Yamamoto, and K. Soda: Purification and properties of L-methionine decarboxylase of *Streptomyces* sp. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, **58**, 323-333 (1980).
- 92) D. E. Stevenson, M. Akhtar, and D. Gani: L-methionine decarboxylase from *Dryopteris filix-mas*: purification, characterization, substrate specificity, abortive transamination of the coenzyme, and stereochemical courses of substrate decarboxylation and coenzyme transamination. *Biochem.*, **29**, 7631-7647 (1990).
- 93) D. E. Stevenson, M. Akhtar, and D. Gani: *Streptomyces* L-methionine decarboxylase: purification and properties of the enzyme and stereochemical course of substrate decarboxylation. *Biochem.*, **29**, 7660-7666 (1990).
- 94) F. James, K. D. Nolte, and A. D. Hanson: Purification and properties of S-adenosyl-L-methionone: L-methionine S-methyltransferase from *Wollastonia biflora* leaves. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22344-22350 (1995).
- 95) U. K. Laemmli: Creavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 96) M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 97) 谷沢克行: ピリドキサル酵素反応の立体化学と分子機構. 生化学, **60**, 499-516 (1988).
- 98) R. A. John: Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81-96 (1995).
- 99) P. Edman: A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.*, **22**, 475-476 (1949).
- 100) P.A. Recsei and E. E. Snell: Pyruvoyl enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 357-387 (1984).
- 101) W. H. Mager and J. C. S. Varela: Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, **10**, 253-258 (1993).
- 102) T. Maeda, S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito: A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245 (1994).