

氏 名(本籍) 菅 野 信 弘

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 370 号

学位授与年月日 平 成 元 年 10 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 海藻の硫酸代謝に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 野村 正 教授 竹内 昌昭

教授 秦 正弘

# 論文内容要旨

## I. 序 論

海藻化学成分の特徴の一つは硫酸化多糖などとして多量の硫黄を含むことである。これらの硫黄は、量の多さおよび存在形態の多様さから、生理的にも海藻に特異な役割を果たしていると考えられている。海藻は、他の多くの生物と同様、硫黄源として無機硫酸を利用すると考えられているが、有機生体成分への取り込み機構はほとんど明らかにされていない。従って、海藻の硫酸代謝機構の解明は水産学上の基礎的知見としてのみならず、植物生理学、比較生化学的にも意義のあることと考えられる。

本研究では、海藻における無機硫酸からの硫酸化多糖および含硫アミノ酸の生合成過程を明らかにし、あわせて、硫酸化多糖の生物活性について検討を行なった。

## II. 海藻の硫黄含量

海藻19種27試料の硫黄含量を測定した。海藻の硫黄含量は陸上植物（ホウレンソウ、キャベツなど）のその約8倍に達するものもみられ、特に紅藻類に高硫黄含量を示す種が多数みられた。硫酸化多糖は海藻が生産する主要な含硫成分の一つであり、紅藻類が緑・褐藻にくらべ多量の硫酸化多糖を生産することが硫黄含量に反映しているものと考えられた。

## III. 海藻の生産する硫酸化多糖の生物活性

硫酸化多糖は抗腫瘍、抗凝血などの生物活性を示すことが知られている。本研究においては、13種の海藻より調製した硫酸化多糖を用い抗凝血活性発現と硫酸基量との相関を示す結果を得た（Fig. 1）。また、新たに褐藻ワカメ（*Undaria pinnatifida*）の硫酸化多糖が *in vitro* においてリンパ球分裂促進および血小板凝集活性を示すことを明らかにした。

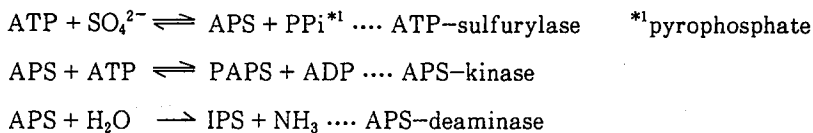
## IV. 海藻における活性硫酸の産生

硫酸代謝の初段階は化学的に安定な硫酸の酵素化学的な活性化、すなわち、硫酸活性化であるとされている。そして、硫酸の活性化された代謝中間体、すなわち、活性硫酸（active sulfate）として Adenosine-5'-phosphosulfate (APS) と 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) が知られている。本章では海藻における活性硫酸の酵素的産生を明らかにした。陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法および酵素反応生成物の単離・同定によって紅藻サビノリ（*Porphyra yezoensis*）における APS および PAPS の産生を確認した。また、紅藻フクロフノリ（*Gloiopeltis furcata*）においては新たな含硫ヌクレオチドの産生を観察した。酵

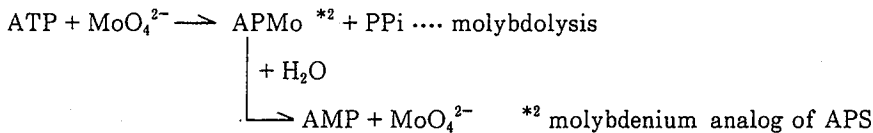
素反応液より本物質を単離し、その諸性状より **Inosine-5'-phosphosulfate (IPS)** と同定した (Fig. 2)。IPS は酵素的な APS の脱アミノ反応により産生され、APS および PAPS と同様、分子内に高エネルギー性の“リン酸-硫酸”結合を有することから活性硫酸として機能する可能性が考えられた。APS および PAPS の産生は他の多くの海藻種においても確認されたが、IPS の産生は紅藻にのみ認められた (Table 1)。

## V. 海藻の硫酸活性化酵素系

前章の結果は海藻における ATP-sulfurylase (ATP-S) と APS-kinase (APS-K) が関与する硫酸活性化機構の存在とともに、IPS が関与する新たな代謝機構の存在を示唆した。本章では硫酸活性化に関連する酵素の性状を調べ、活性硫酸の産生機作を明らかにした。



**ATP-sulfurylase** 海藻12種を材料として ATP-S 活性を検索し、全ての種にその存在を確認した。ササビノリより電気泳動的に均一に精製した酵素は分子量53,000の単量体であった。本酵素が APS の産生を触媒することを確認するとともに、 $\text{MoO}_4^{2-}$  を  $\text{SO}_4^{2-}$  の代替とする活性測定法 (molybdolysis) により性状を明らかにした。



至適 pH は 7.5-8.5 の範囲にみられた。 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 複合体が基質として有効であり、free-ATP は反応を阻害した。反応は sequential type であり、 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP,  $\text{MoO}_4^{2-}$ , APS, PPi に対する Km 値はそれぞれ 0.67 mM, 6.7 mM, 1.0 μM 以下, 33.0 μM の値が得られた (Table 2)。反応の平衡は ATP 生成方向に偏っていることが予想され、さらに、APS が著しい生成物阻害を示すことから、生成される APS はきわめて低濃度であると考えられた。

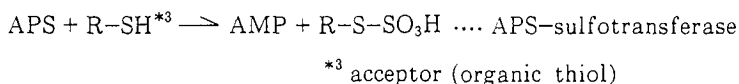
**APS-kinase** ササビノリより電気泳動的に均一な酵素標品を得た。本酵素は 31,000 の同一サブユニットよりなる 2 量体であった。至適 pH は 7.0、活性発現には divalent cation を必要とした。APS は著しい基質阻害を示し、その至適濃度は 3.0 μM であった。ATP および APS に対する Km 値はそれぞれ 0.46 mM および 0.45 μM を示した。APS-K はその APS に対する強い親和性により、ATP-S による熱力学的に不利な APS 産生を補って、PAPS の産生を成し遂げるものと考えられた。

**APS-deaminase** 紅藻フクロフノリより **APS-deaminase (APS-D)** を精製し、電気泳動的に均一な酵素標品を得た。70,000の同一サブユニットからなる4量体構造（一部は2量体および単量体としても存在した）を有する糖タンパク質であった。本酵素は広い基質特異性を示し、adenosine および5'-adenosine nucleotides の脱アミノ反応を触媒した。従って、**non-specific adenylate deaminase** と称されるべき酵素と考えられる。各基質に対する至適 pH は4.5-7.0の範囲にみられたが、Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 等のアルカリ土類金属イオンの共存下において pH 7.0-8.0 にシフトした。APS に対する K<sub>m</sub> 値は14.4μM であり AMP に次いで高い親和性を示した。これらの結果は生理的条件下における IPS の産生を強く示唆した。

## VI. 海藻の同化的硫酸還元および硫酸基転移機構

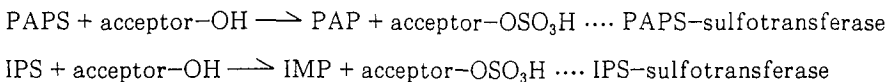
海藻における APS, PAPS および IPS の酵素的産生に続いて、これらの活性硫酸が如何なる生体反応に基質として利用されるかについて検討した。海藻が生産する主な含硫化合物のうち含硫アミノ酸と硫酸化多糖を取り上げ、それらの生合成機構、すなわち、同化的硫酸還元機構および硫酸基転移機構への各活性硫酸の関与を推察した。

**同化的硫酸還元機構** 一般に光合成生物は APS を同化的硫酸還元の基質とし、その初段階の反応は APS-sulfotransferase (APS-ST) によって触媒されるとされている。



スサビノリに本酵素活性を認め、部分精製した。分子量はゲルろ過での挙動より100-150 k と推定され、最大活性は pH 8.5 で観察された。本酵素は APS に特異的であり、IPS および PAPS は基質として機能しなかった。従って、海藻においても APS のみが含硫アミノ酸生合成に関与するものと考えられた。

**硫酸基転移機構** スサビノリおよびフクロフノリより酵素を調整し、PAPS および IPS を供与体基質とする硫酸基転移反応を受容体基質に依存した 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphate (PAP) および IMP の産生を指標として検索した。



受容体基質として各種単糖、少糖、多糖類を適用した結果、ワカメおよび紅藻サンゴ藻の一種 (*Corallina sp.*) 由来の多糖画分を基質としたときに酵素的な PAP または IMP の産生がみられ、両活性硫酸が硫酸化多糖生合成に関与していることが示唆された。

以上の結果を総合し、海藻の硫酸代謝経路を新たに提示した (Fig. 3)。すなわち、緑・褐藻においては活性硫酸 APS と PAPS が産生され、前者は含硫アミノ酸、後者は硫酸化多糖の生合成に関与するものと考えられた。紅藻においてはさらに IPS が関与する硫酸化多糖生合成機構の存在が示唆され、より複雑な代謝を営むものと考えられた。また、APS から分岐する代謝経路の調節機構の一つとして細胞内 pH による調節が、関連酵素の至適 pH より予想された。

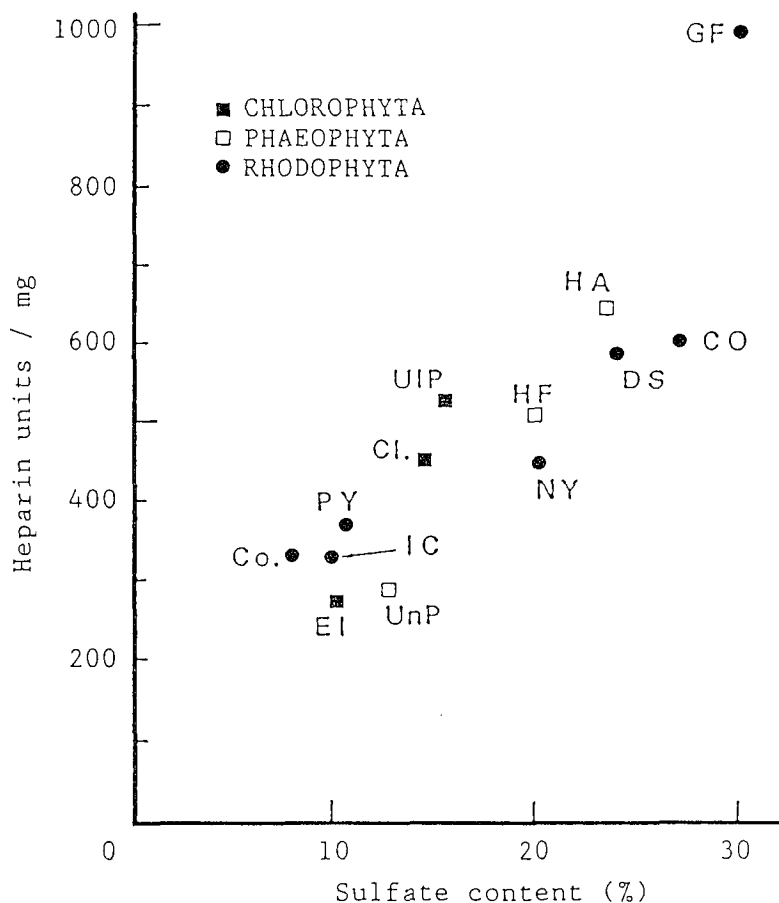


Fig. 1. Relation between the sulfate content and anti-thrombin activity of sulfated polysaccharides from marine algae. The anti-thrombin activity was determined by the heparin co-factor method. The origin of sulfated polysaccharides is presented using the abbreviation: UIP, Ulva pertusa; EI, Enteromorpha intestinalis; Cl., Cladophora sp.; HA, Heterochordaria abietina; HF, Hizikia fusiforme; UnP, Undaria pinnatifida; PY, Porphyra yezoensis; DS, Dumontia simplex; NY, Neodilsea yendoana; Co., Corallina sp.; GF, Gloiopeltis furcata; IC, Iridaea cornucopiae; CO, Chondrus ocellatus.

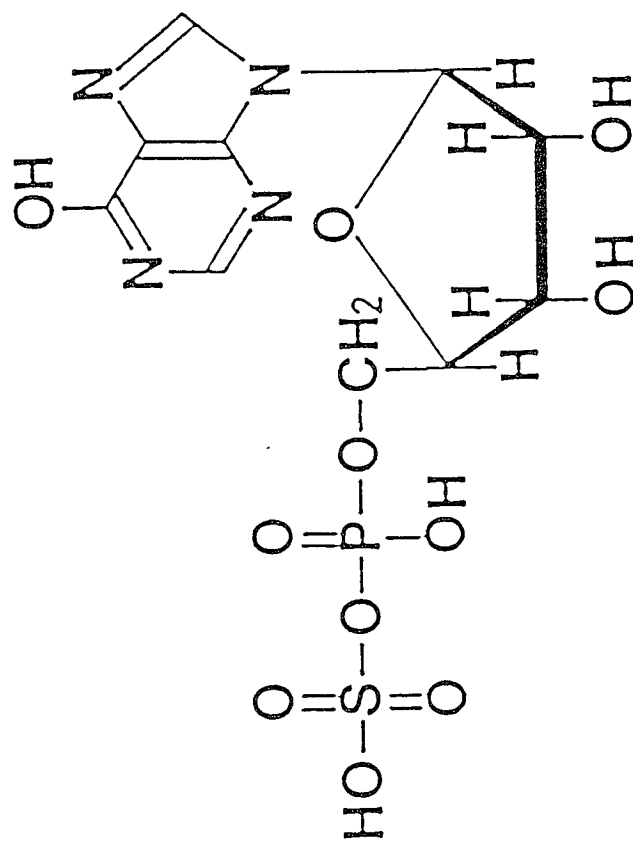


Fig. 2. Structural formula of Inosine-5'-phosphosulfate, the product of sulfate activation.

Table 1. APS, PAPS and IPS production by several marine algae

Species	( Sampling Date )	APS	PAPS	IPS
CHLOROPHYTA				
<u>Ulva pertusa</u>	( June 1987 )	++	+	-
<u>Enteromorpha intestinalis</u>	( June 1987 )	++	++	-
<u>Cladophora</u> sp.	( June 1987 )	++	+	-
<u>Chaetomorpha moniligera</u>	( June 1987 )	++	+	-
PHAEOPHYTA				
<u>Undaria pinnatifida</u>	( Apr. 1987, cultured )	-	-	-
<u>Hizikia fusiform</u>	( Apr. 1987 )	++	+	-
<u>Sargassum horneri</u>	( June 1987 )	++	-	-
RHODOPHYTA				
<u>Porphyra vezoensis</u>	( Dec. 1986, cultured )	+	++	-
	( Jan. 1987, cultured )	+	++	-
	( Feb. 1987 )	+	++	+
	( Apr. 1987 )	+	++	+
<u>Gloiopeltis furcata</u>	( Apr. 1987 )	-	-	++
<u>Chondria crassicaulis</u>	( June 1987 )	++	+	+
<u>Iridaea cornucopiae</u>	( June 1987 )	++	+	+
<u>Gelidium amansii</u>	( June 1987 )	+	++	-

APS, PAPS and IPS were determined by anion-exchange HPLC on HITACHI #3013-N column. Activity is presented by the following marks: ++, main products; +, minor products; -, not detected.



Table 2. Properties of enzymes related to sulfate metabolism

Name of Enzyme	M <sub>r</sub> <sup>*1</sup>	Optimal pH	K <sub>m</sub> (mM)	Remarks
ATP-sulfurylase ( <i>Porphyra yezoensis</i> ) <sup>*2</sup>	53 k (53 k) <sup>*3</sup>	7.5-8.5	Mg <sup>2+</sup> -ATP 0.67 MgO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 6.7 APS <0.001 PPI 0.033	Homogeneous on SDS/PAGE; monomer. APS exhibits potent product inhibition. Group VI oxyanions other than SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> also act as substrate, but without formation of stable AMP-5'-oxyanion anhydrides. PAPS and IPS have no effect.
APS-kinase ( <i>P. yezoensis</i> ) <sup>*2</sup>	61 k (31 k) <sup>*3</sup>	7.0	ATP 0.46 APS 0.00045	Homogeneous on SDS/PAGE; dimer. APS exhibits potent substrate inhibition. Optimum [APS] is 3.0 μM. Divalent cation is required for the activity. IPS has no effect.
APS-deaminase ( <i>Gloiopeltis furcata</i> ) <sup>*2</sup>	285 k (70 k) <sup>*3</sup>	4.5-7.0	APS 0.014 <sup>*4</sup> AMP 0.007 ADP 0.021 ATP 0.027 NAD 0.026 Adenosine 0.050	Homogeneous on SDS/PAGE; tetramer (dimer and monomer. ). Optimal pH is varied depending on the substrate, and shifts to 7.0-8.0 in the presence of alkaline earth ions. Activated by Ba <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , and Cl <sup>-</sup> . Inhibited by Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , F <sup>-</sup> , and HCOO <sup>-</sup> .
APS-sulfotransferase ( <i>P. yezoensis</i> ) <sup>*2</sup>	100- 150 k	8.5	-	Purified 180-fold. Stabilized by glycerol. IPS and PAPS do not act as the substrate. Glutathione, dithiothreitol, dithioerythritol, cysteine, and 2-mercaptoethanol act as the acceptor.

<sup>\*1</sup> Relative molecular mass determined by gel-filtration. <sup>\*2</sup> Origin of enzyme. <sup>\*3</sup> Subunit size determined by SDS/PAGE.

<sup>\*4</sup> Presented K<sub>m</sub> values for APS-deaminase were determined in the absence of divalent cation at optimal pH of each substrate.

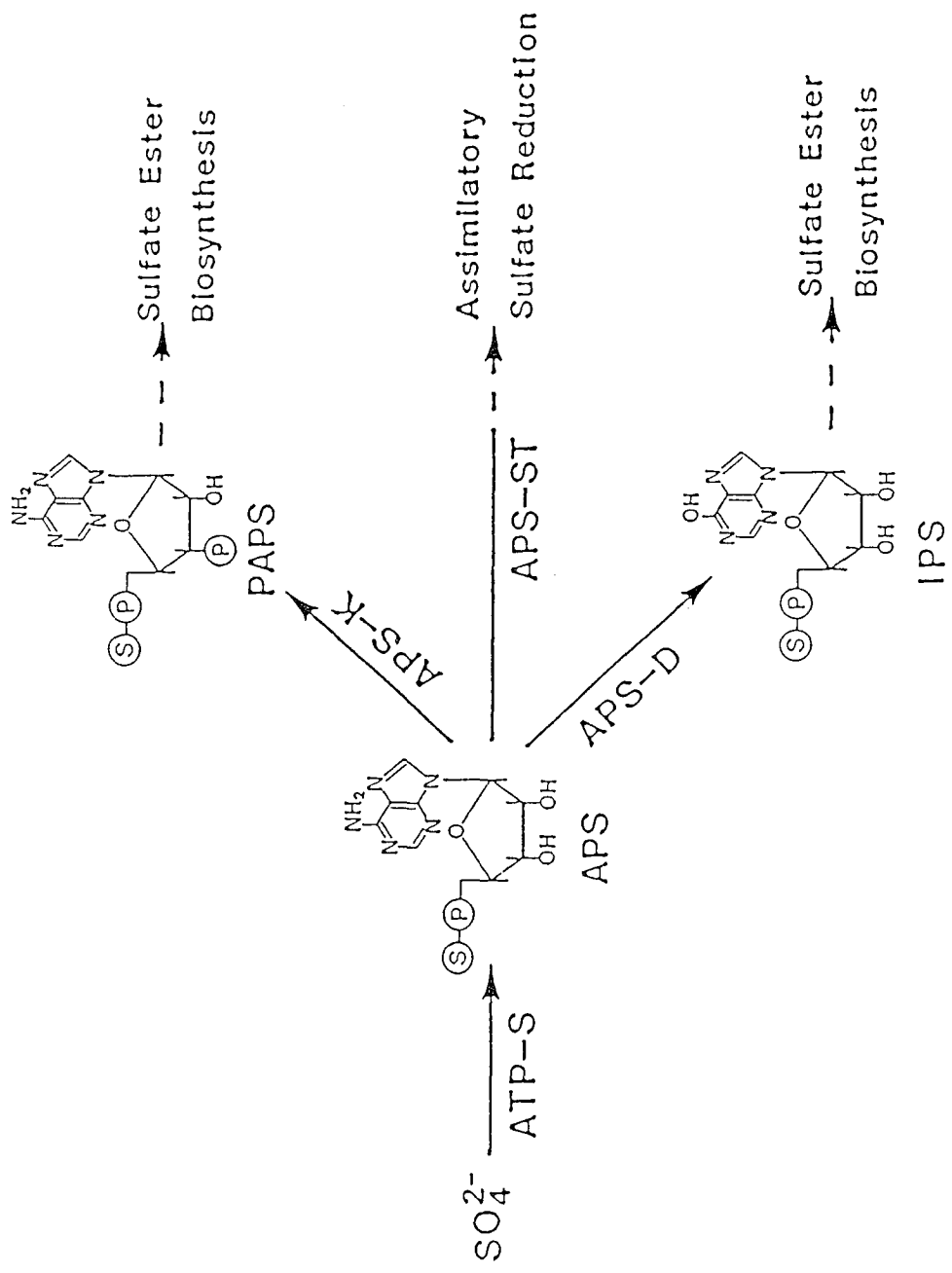


Fig. 3. Proposal sulfate activation and function of active sulfate in marine algae.

## 審査結果の要旨

本研究は大型海藻における硫酸化多糖および含硫アミノ酸にかかわる硫酸代謝，とくに海藻の活性硫酸生成機構とその関連酵素反応の特性の解明を行ったものである。

まず，多数種の海藻の硫酸含量を精査ののち，硫酸化多糖にみられる生物活性のうち，抗凝血活性につき検討，活性発現と硫酸基量との間に相関性を見出した。さらに褐藻ワカメの硫酸化多糖が *in vitro* でリンパ球分裂促進作用および血小板凝集活性を示すことをはじめて明らかにした。

硫酸代謝の初期段階は硫酸活性化であるが，海藻においても APS や PAPS の酵素的産生を証明し，フクロフノリを材料としては，新たに含硫ヌクレオチド IPS（イノシン-5'-フォスホサルフェート）を単離同定した。この IPS は活性硫酸として紅藻ではじめて認められたものである。

活性硫酸活性化酵素には ATP-スルフィラーゼや APS-キナーゼが関与する活性化系が存在することが知られているが，海藻数種につき，これらの酵素を精製し，活性化機構の一端を明らかにした。またフクロフノリから APS-デアミナーゼを電気泳動的に均一な標品として得て，分子量約 70,000 の単一サブユニットからなる 4 量体構造をとる糖たんぱくとした。

さらに，海藻における同化的硫酸還元と硫酸基転移機構の解明を計り，新知見を得ている。

以上の諸結果を総合し，海藻における硫酸化代謝経路を新たに提示したことは，海藻生化学上充分評価できるものである。

よって，本論文は農学博士の学位を授与するに値するものと判定する。