

博士論文（要約）

深海性二枚貝におけるヒポタウリン生合成機構に関する研究
(Mechanisms of hypotaaurine biosynthesis in deep-sea bivalve)

2015

東京大学大学院 農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻
長崎 稔拓

指導教員 東京大学教授
井上 広滋

目次

Abbreviations	3
第 1 章 緒言.....	5
第 1 節 研究の背景.....	5
第 2 節 本研究の目的と概要.....	8
第 2 章 ヒポタウリン生合成に関わる遺伝子の解析.....	13
第 1 節 ヒポタウリン生合成に関わる遺伝子の単離.....	13
第 1 項 緒言.....	13
第 2 項 材料と方法.....	14
第 3 項 結果.....	17
第 4 項 考察.....	18
第 2 節 硫化物への曝露に対するヒポタウリン生合成関連遺伝子の発現応答.....	28
第 1 項 緒言.....	28
第 2 項 材料と方法.....	28
第 3 項 結果.....	30
第 4 項 考察.....	30
第 3 章 新規遊離アミノ酸分析法の検討と飼育実験個体における遊離アミノ酸分析.....	37
第 4 章 ヒポタウリン生合成に関わる酵素の特性.....	38
第 5 章 総合考察.....	39
第 1 節 深海性二枚貝の Hpt 生合成様式について.....	39
第 2 節 Hpt およびその生合成機構と環境適応の関係について.....	41
第 3 節 Hpt 生合成機構の特性の変遷の可能性.....	43
参考文献.....	46
謝辞.....	55

Abbreviations

ADO	Aminoethanethiol dioxygenase
β-Ala	beta-Alanine
BSA	Bovine serum albumin
CDO	Cysteine dioxygenase
CSA	Cysteine sulfinic acid
CSAD	Cysteine sulfinic acid decarboxylase
DTT	Dithiothreitol
GABA	Gamma-aminobutyric acid
Gly	Glycine
HPLC	High performance liquid chromatography
Hpt	Hypotaurine
L-Ala	L-Alanine
L-Arg	L-Arginine
L-Asn	L-Asparagine
L-Asp	L-Aspartic acid
L-CA	L-Cysteic acid
L-Cys	L-Cysteine
L-Glu	L-Glutamic acid
L-Gln	L-Glutamine
L-His	L-Histidine
L-Ile	L-Isoleucine
L-Leu	L-Leucine
L-Lys	L-Lysine
L-Met	L-Methionine
L-Phe	L-Phenylalanine
L-Pro	L-Proline
L-Ser	L-Serine
L-Thr	L-Threonine
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosine
L-Val	L-Valine

OPA	ortho-phthalaldehyde
PITC	Phenylisothiocyanate
PTC	phenylthiocarbamyl
PB	Phosphate buffer
PLP	Pyridoxal phosphate
SW	seawater
Tau	Taurine
TauT	Taurine transporter
Tht	Thiotaurine
TEA	Triethylamine

第1章 緒言

第1節 研究の背景

化学合成生態系の環境と生物群集について

深海のプレート拡大域および海底の沈み込み域付近には、太陽光の代わりに海底下から供給される硫化水素やメタン、水素といった還元的な化学物質をエネルギー源として利用する細菌が生産者の役割を担う化学合成生態系が存在している(Van Dover, 2000; 藤原, 2003)。その中でも、主に世界各地のプレートの沈み込み帯においては、深海底の周囲の海水温と同程度の低温の湧出水が湧き出る冷湧水生態系またはメタン湧出域生物群集と呼ばれる生態系が存在している。また、海嶺や背弧海盆などに分布する海底火山域などにおいては 300°C を超える高温の熱水が噴出する環境の周辺に生物群集が形成されており、それらは熱水噴出孔生物群集と呼ばれている(Van Dover et al., 2002; 藤倉, 2004)。日本の周辺の化学合成生物群集は、プレート境界域に沿って分布しており、千島・日本海溝域、相模湾、駿河湾、南海トラフ、南西諸島海溝域といったプレート収斂域や、伊豆・小笠原諸島海域、沖縄トラフ背弧海盆などで存在が知られている(小島ら, 2009; 藤倉ら, 2008)。また深海熱水域の環境の特徴として、環境の形成から消滅まで基本的に地殻活動と密接に関係していると考えられるため、物理化学的に不安定な環境であると言える。

このような化学合成生態系において、シロウリガイ類やシンカイヒバリガイ類といった大型二枚貝類やハオリムシ類、フジツボ類、オハラエビ類、コシオリエビ類などといった軟体動物、環形動物、節足動物などに属する多様な分類群の生物が高密度に生息し、群集を形成している(小島ら, 2009; 藤倉ら, 2008)。これらの生物は、環境中のメタンや硫化水素の酸化により得られるエネルギーを炭酸固定に利用するメタン酸化細菌や硫黄酸化細菌といった化学合成細菌を細胞内・外に共生させることで、化学合成細菌の生産する物質を栄養源として得ている(Felbeck et al., 1981)。

このことから、とくに熱水噴出域周辺に生息し、細胞内に硫黄酸化細菌を共生させる無脊椎動物においては、共生細菌への硫化物の供給のために環境中の硫化水素に曝される必要がある。しかしながら、硫化水素は好気呼吸の電子伝達系の反応に関わるシトクロム c 酸化酵素のヘム部分に結合することでその機能を阻害するため、生物にとって強い毒性を示すことが知られている(Smith et al., 1977; Torrans and Clemens, 1982; 玉井, 1994)。したがって、深海熱水噴出域周辺に生息する生物にとっては、これら硫化水素による生体への毒性を回避しながら、同時に細胞内に共生する硫黄酸化細菌へと硫化水素を供給するために細胞内に安全に硫化物を取り込む機構が必要であると考えられる。

硫化水素の無毒化メカニズムについて

これまでに、深海熱水噴出域や冷湧水域に生息する生物を対象とした研究から、物理的および化学的に環境中の硫化水素を無毒化する幾つかのメカニズムについて明らかにされている。特に生化学的に無毒化を可能にする方法として、特殊なタンパク質に結合させる方法、および酸化することで無毒な物質に変換する方法などが明らかになっている。特殊なタンパク質へ結合させる方法については、シロウリガイなどの幾つかの二枚貝類やハオリムシ類において見られ、硫化水素をヘモグロビンや亜鉛含有リポタンパク質に結合させることによって毒性を回避させている(Alyakrinskaya, 2003; ARP et al., 1987; Childress et al., 1984, 1993; Doeller et al., 1988)。もう一方の硫化水素を酸化させる方法については、生物の体表において部位特異的ではあるが酸化活性を発揮することで侵入を防いでいるとされる(Nelson et al., 1995; Powell and Somero, 1986)。もしくは体内に侵入してきた硫化水素については、特定の器官において直ちにチオ硫酸や硫酸などに変換することで無毒化を行っていると考えられている(Powell and Somero, 1986; Vetter et al., 1987)。

上記以外の方法として、ヒポタウリン (Hpt: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{H}$) および、チオタウリン (Tht: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{SH}$) を用いた無毒化の方法が近年提案されている。これら 2 つの特殊な含硫アミノ酸については、深海熱水噴出域や冷湧水域に生息する多くの無脊椎動物の組織中に特異的に蓄積されていることがこれまでに報告されている(Alberic and Boulegue, 1990; Joyner et al., 2003; Pranal et al., 1995; Pruski et al., 2001; Rosenberg et al., 2006; Yancey, 2004)。また、とくに Tht については共生菌が存在する組織(二枚貝類のシンカイヒバリガイ類では鰓)において際立った蓄積が見られること(Pruski and Fiala-Médioni, 2003)、および多毛類を対象とした飼育実験において、硫化物の濃度に応じて Tht 量が増加すること(Yancey et al., 2009)や、深海性二枚貝類やハオリムシ類の組織摩砕液に硫化物を添加することで Tht が増加すること(Pruski and Fiala-Médioni, 2003)などから、Hpt を前駆体として有害な硫化水素と反応することで無毒な Tht の状態にして毒性を回避していることが示唆される。同時にこの反応は可逆的と考えられており、共生する硫黄酸化細菌へ Tht から Hpt への無毒化とは逆の反応により生じてくる硫化物を供給している可能性についても示唆されている(Alberic and Boulegue, 1990; Pruski and Fiala-Médioni, 2003)。また、硫化水素と結合する特殊なタンパク質による無毒化機構を持つシロウリガイ類やハオリムシ類においても、共生菌が存在するバクテリオサイト中へ硫化物源を輸送するためには結合タンパク質では分子量が大きいため、細胞内の共生菌と血リンパ中に存在する結合タンパク質間の硫化物の輸送を Tht が担っている可能性も考えられている。このことから Hpt および Tht を用いた硫化物に富む環境への適応機構は、特殊なタンパク質の所有の有無などに関わらず、広く化学合成生態系に生息する生物にとって重要であることが考えられる。

Hpt の生合成について

Hpt および Tht が上記で示したような機能を生体内で発揮するためには、特に前駆体である Hpt をあらかじめ組織中に蓄積させておくことが必要であると考えられる。この Hpt を組織中に蓄積させておく方法として、細胞内に取り込む、または細胞内で合成するという 2 つの方法があると考えられる。

細胞内への Hpt の取り込みのためには、細胞膜上に存在する特定の輸送体の存在が必要である。この機能を担うものとして、タウリン輸送体 (Taurine Transporter: TauT) が同定されている。この TauT は、これまでに脊椎動物や幾つかの無脊椎動物において単離されており、深海性二枚貝類のシチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdiarum*) においても、TauT 遺伝子が共生菌の存在する鰓において最も高い発現量を示すこと、また、アフリカツメガエルの卵母細胞発現系を用いた機能解析から、タウリン (Tau) のみならず Tht とその前駆体と考えられる Hpt についても輸送する機能を持つことが示されている(Inoue et al., 2008)。

一方で Hpt の生合成については、これまでにヒトをはじめとしてラット、マウスといった哺乳類を中心として生合成経路に関わる酵素群の遺伝子配列や活性について、またそれらに影響を与える要因や調節機構についてなど詳細な研究が行われている(Dominy et al., 2004; Tappaz, 2004; Vitvitsky et al., 2011; 山口, 1989)。また、魚類においてはタウリン生合成に関わる酵素活性の測定が行われており、魚種ごとに異なる活性を示すことや、発生の段階で遺伝子発現量や活性に変化が生じることなどが示されている(Wang et al., 2015; 後藤ら, 2002)。これまでに知られている Hpt 生合成経路の概要について Fig.1-1 に示した。基本的に生合成は L-システインが起点と考えられており、この L-システインから最終的に Tau へと至る過程でどの生合成中間体を経由するかにより、システインスルフィン酸 (CSA) 経路、システイン酸経路、システアミン経路の主として 3 つの経路が存在するとされている。CSA 経路は、L-システインからシステインジオキシゲナーゼ (CDO, EC 1.13.11.20) により L-CSA へと変換される。この L-CSA はシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD, EC 4.1.1.29) により脱炭酸されて Hpt となり、最終的に Tau となる。また、システイン酸経路については、L-CSA を脱炭酸する酵素でもある CSAD により L-システイン酸が脱炭酸されて Tau へと至る。この基質である L-システイン酸については、L-システインからシステインリアーゼ (CL, EC 4.4.1.10) による触媒で生成する経路のほか、活性硫酸 (PAPS) と α アミノアクリル酸が縮合することにより生じる経路も存在するとされている。L-CSA の酸化により生じる可能性も考えられるが、これまでにこの反応に関わる酵素など詳細については明らかにされていない。システアミン経路については、L-システインからシステアミンまではパントテン酸の関わる CoA 合成経路と一致しており、L-システインが脱炭酸されることで直接システアミンに変換されるわけではない。このシステアミンへと至る経路の概要を Fig.1-2 に示した。最終的にパンテテインを基質としてパンテテインヒドロラーゼ (EC 3.5.1.92)

の触媒により、パントテン酸とともにシステアミンが生成する。このシステアミンがシステアミンジオキシゲナーゼ(もしくは、アミノエタンチオールジオキシゲナーゼ)(ADO、EC 1.13.11.19)の触媒により Hpt へと代謝され、最終的に Tau へと至る。Hpt から Tau への反応についてはヒポタウリンデヒドロゲナーゼ (Hypotaurine dehydrogenase, EC 1.8.1.3) といった酸化酵素の存在が示唆されているが(Sumizu, 1962)、非酵素的に酸化される場合もあると考えられ、その詳細については未だ明確になっていない。Tau 類縁体および Hpt 生合成経路における中間体の構造について Fig.1-3 に示した。

哺乳類や魚類といった脊椎動物を中心として上記のような生合成機構が明らかにされている一方で、海産二枚貝類においては、これまでの研究から組織中に高濃度の Tau を含んでおり、またそれらの Tau が組織中の細胞内浸透圧調節にも関わっていることが知られているなど重要な機能を担っているにもかかわらず、その生合成機構に関する研究は殆ど行われていない。

第2節 本研究の目的と概要

第1節に示した背景を踏まえ、本研究では、深海の熱水噴出域に固有な二枚貝類における Hpt 生合成経路とその特性を解析し、硫化物に富む環境への二枚貝類の進出過程の分子基盤を解明することを目的とした。

研究材料として、シンカイヒバリガイ類の一種であるシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdiarum*)を選んだ。本種は伊豆小笠原弧の熱水噴出域の優占種であり (Desbruyères et al., 2006; 藤倉ら, 2008)、鰓に硫黄酸化細菌を共生させているうえ、常圧水槽で長期飼育が可能であるため、研究対象として好適といえる。

まず、Hpt 生合成経路に関わる各酵素の遺伝子について探索を行い (第2章)、その結果をこれまでに明らかにされている脊椎動物の結果と比較検討することで、深海性二枚貝類の組織中においてどのように Hpt の生合成を行われているのか考察した。本研究は、これまでに Tau が豊富に蓄積していることが分かっている軟体動物における、Tau および Hpt 生合成酵素 cDNA の初の単離例となる。さらに、実験的に硫化物添加海水へ曝露した個体における遺伝子発現の変動についても検討を行った。

生合成経路に関わる遺伝子についての検討に続いて、第3章第1節では Hpt の生合成中間体を含む遊離アミノ酸とその関連物質を安定的に測定することのできる分析系を構築し、第3章第2節では構築した分析系を用いて硫化物濃度等を変化させた環境へ曝露した個体について組織中の遊離アミノ酸量の変動について解析を行った。また、第3章第3節では環境浸透圧の影響についても検討を行った。さらに第4章では、組織中の Hpt 生合成に関わる各酵素の活性

(CSAD および ADO 活性) の解析方法について検討を行い、組織抽出物を用いる実験系を確立して、生合成経路の実証を行った。これらの結果から第 5 章において、Hpt 生合成機構が硫化物に富む環境への適応とどのように関係していることが考えられるのか、また、Hpt 生合成機構の特性が熱水噴出域というニッチを獲得するに際して、どのように変遷してきた可能性が考えられるかについて考察を試みた。

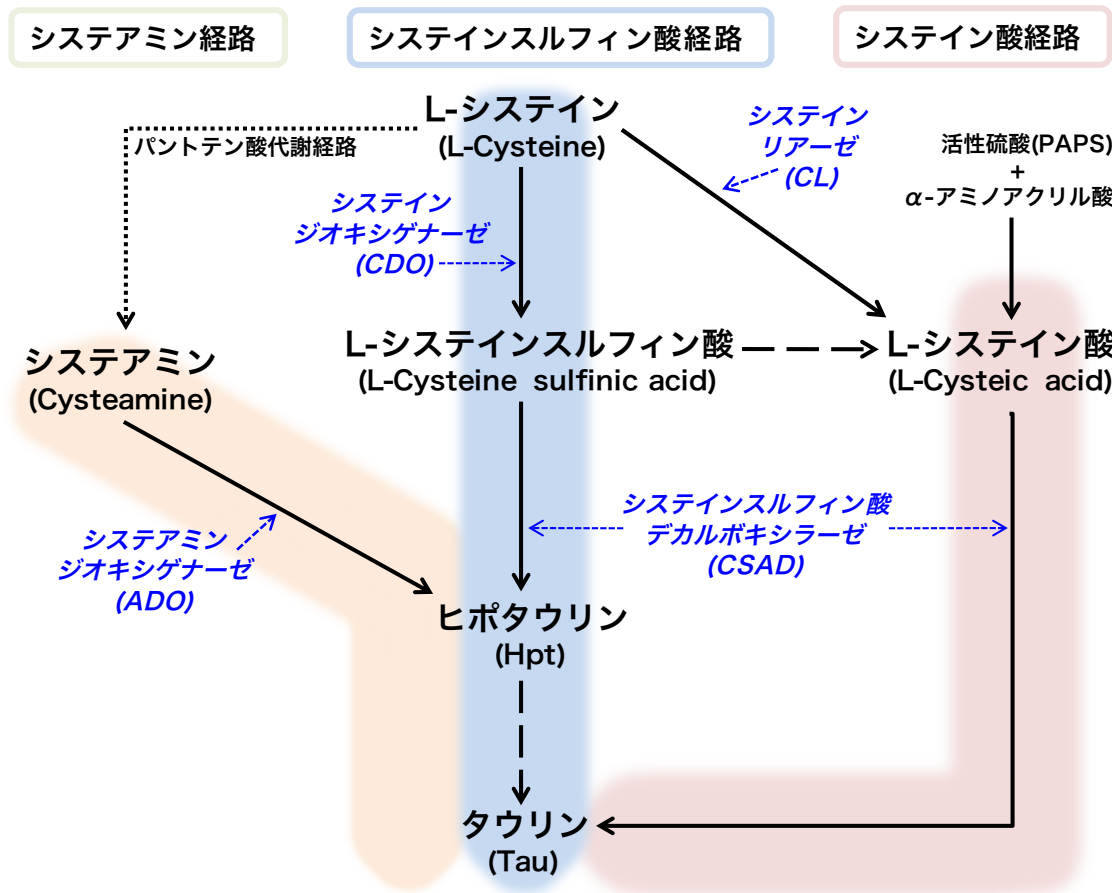


Fig.1-1 脊椎動物を対象とした研究により明らかにされているタウリン生合成経路図

CDO:Cysteine dioxygenase, CSAD:Cysteine sulfinic acid decarboxylase, ADO:Aminoethanethiol (Cysteamine) dioxygenase, CL:Cysteine Lyase

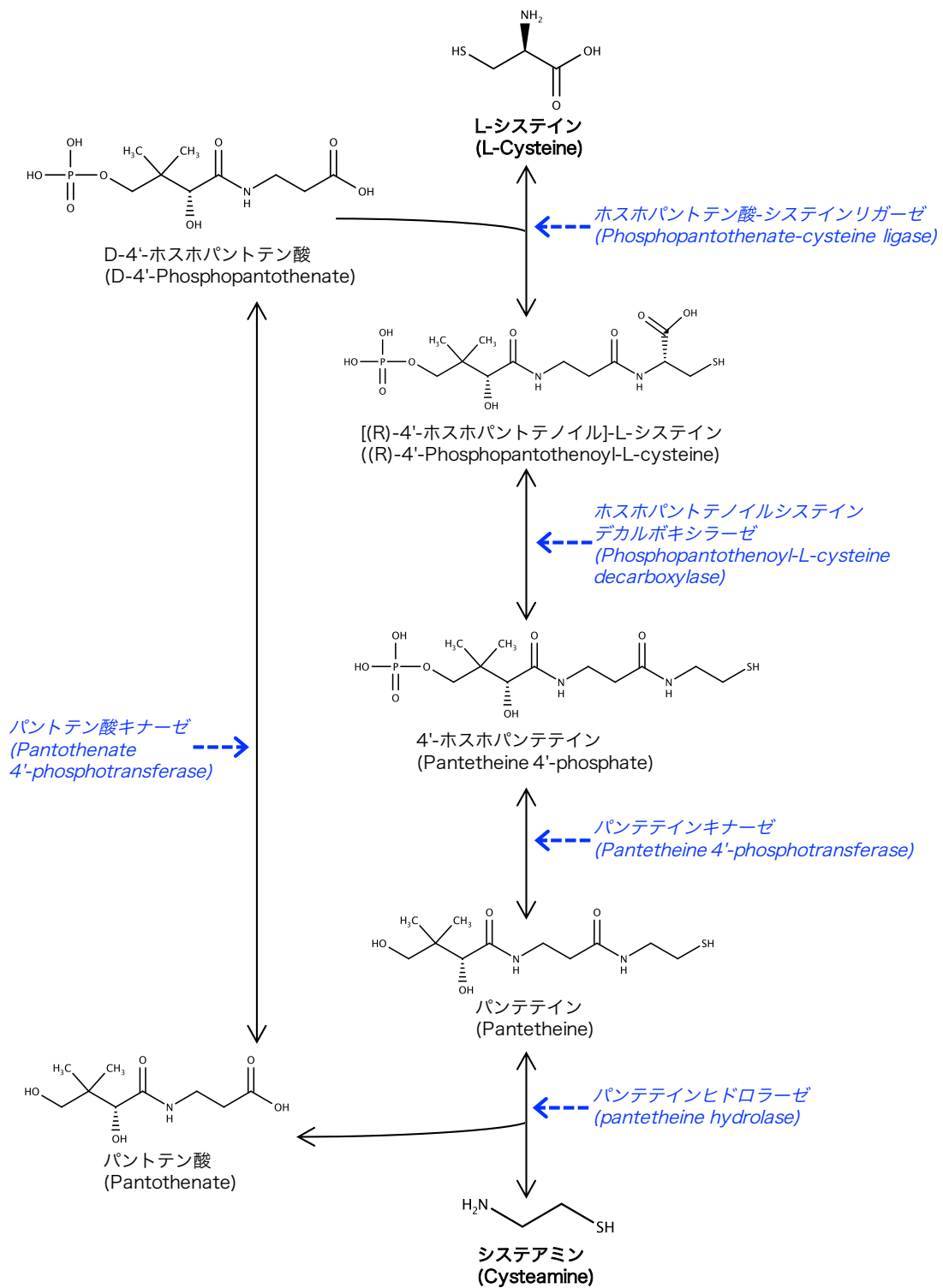


Fig.1-2 システインからシステアミンへと至る代謝経路図。(パントテン酸代謝経路の一部)

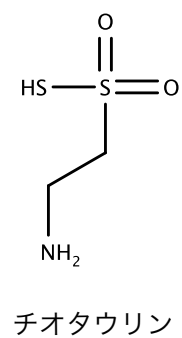
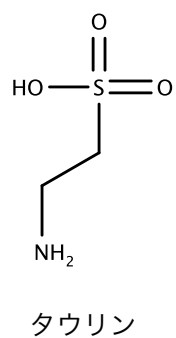
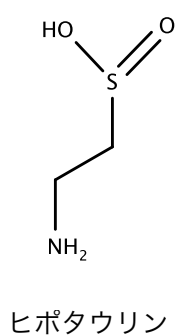
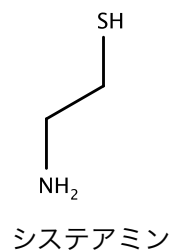
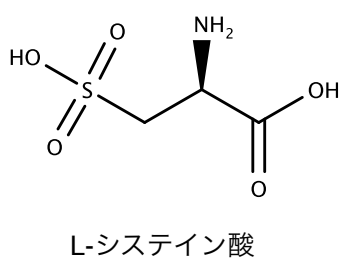
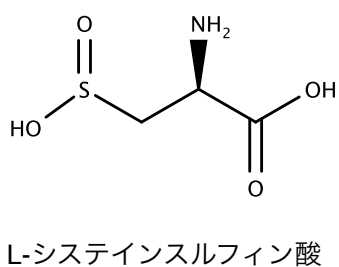
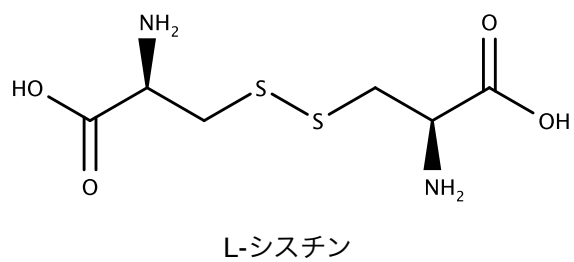
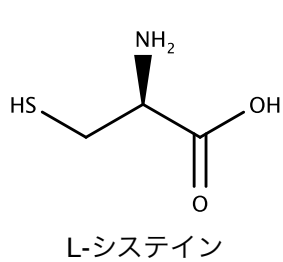
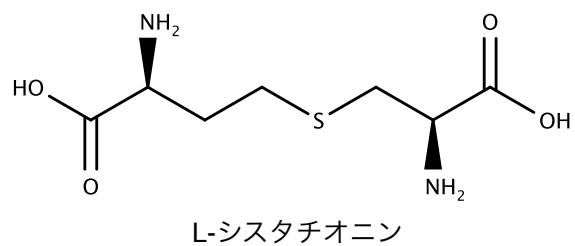


Fig.1-3 タウリン類縁化合物および生合成経路における中間体の構造式

第2章 ヒポタウリン生合成に関わる遺伝子の解析

第1節 ヒポタウリン生合成に関わる遺伝子の単離

第1項 緒言

含硫アミノ酸の一種であるタウリン (Tau) の生合成経路については、これまでに哺乳類を中心として解析が取り組まれており、組織中においては基本的に L-システインから生合成が行われることが分かっている (Bagley et al., 1995; Ubuka et al., 2008)。どの中間体を経るかによってシステインスルフィン酸経路、システイン酸経路、システアミン経路の3つが存在しているとされており (山口, 1989)、これら3つの経路において基質の触媒を担う鍵となる酵素として、システインジオキシゲナーゼ (cysteine dioxygenase : CDO, EC 1.13.11.20)、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (cysteine sulfinic acid decarboxylase : CSAD, EC 4.1.1.29)、システアミンジオキシゲナーゼ (aminoethanthiol (cysteamine) dioxygenase : ADO, EC 1.13.11.19) の3種が挙げられる (山口, 1989)。CDO は L-システインを酸化して L-システインスルフィン酸 (CSA) への反応を触媒する。CSAD は L-CSA もしくは L-システイン酸を脱炭酸する反応に関わり、それぞれヒポタウリン (Hpt) もしくは Tau を生成させる。ADO はシステアミンを酸化して Hpt を生成する (Fig.1-1)。

二枚貝類において、これらの Hpt および Tau の生合成に関わる酵素については、組織の磨砕液から調整した粗酵素抽出液を用いて活性を測定するといった酵素学的な研究が行われているのみであり (堺ら, 2003; 村瀬ら, 2005)、それら酵素タンパク質をコードする遺伝子を対象とした詳細な研究を行っている例は二枚貝類のみならず、軟体動物においてもほとんど存在していない。これまでに Tau および Hpt が海産の軟体動物を含めて多くの海産無脊椎動物において組織中に含まれていることが確認されており、また様々な生物で Tau が多様な生理活性作用を有していることが報告されている (Schaffer et al., 2003; Takeuchi et al., 2000)。このような Hpt と Tau について、深海性二枚貝のシチヨウシンカイヒバリガイにおいてどのような機構により生合成され蓄積しているのか興味を持たれる。また、これまでに報告されている哺乳類と同様の機構が存在しているのかについて明らかにすることができれば、より深海性二枚貝の生理的システムと、それを生じた環境適応との関係について理解が深められることが期待される。

以上のようなことから、イガイ科に属する深海性二枚貝類の一種であるシチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdierum*) を対象として Tau および Hpt 生合成に関与する遺伝子の cDNA 配列の単離を試み、生合成経路における遺伝的な分子基盤の解明を試みた。

第2項 材料と方法

ゲノムおよびEST データベースからのヒポタウリン生合成酵素遺伝子の探索

公開されているゲノムデータベース (KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/genes.html> および NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から、哺乳類 1 種 (ハツカネズミ *Mus musculus*, BC013638) と節足動物 2 種 (キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*, NM001259480、ネッタイエカ *Culex quinquefasciatus*, XM001870295) のシステインジオキシゲナーゼ (CDO, EC:1.13.11.20) の配列を取得した。また同様に、哺乳類 1 種 (*M. musculus*, NP659191) と節足動物 2 種類 (*D. melanogaster*, NP611348、*C. quinquefasciatus*, XP001861778) のシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD, EC:4.1.1.29)、および脊索動物 1 種 (ナメクジウオの一種 *Branchiostoma floridae*, XP002603844)、節足動物 1 種 (ウスグロショウジョウバエ *Drosophila pseudoobscura*, XP001354262) のシステアミンジオキシゲナーゼ (ADO, EC 1.13.11.19) の配列を取得した。また、モチーフ領域のアラインメント解析のため、公開されているゲノムデータベースより、上記に加えてヒト *Homo sapiens*、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、線虫 *Caenorhabditis elegans*、キイロタマホコロカビ *Dictyostelium discoideum*、アゾトバクタービネランジー (自由生活好気性窒素固定菌) *Azotobacter vinelandii*、セレウス菌 *Bacillus cereus* の CDO 配列を取得し、また同様に *D. rerio*、アフリカツメガエル *Xenopus tropicalis*、*H. sapiens*、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* の CSAD 配列を取得した。

これらの配列をもとに、共同研究者により進められたシチヨウシンカイヒバリガイの EST データベース、および既に公開されている近縁種の *B. azoricus* における EST データベース (<http://transcriptomics.biocant.pt:8080/deepSeaVent>)、及びムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) の EST データベース (<http://mussel.cribi.unipd.it/>)、浅海性腹足類 *Lottia gigantea* のゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/Lotgi1/Lotgi1.home.html>) において Hpt の生合成に関わる酵素群の遺伝子の Blast 検索を行った。

探索により得られたシチヨウシンカイヒバリガイの配列をもとに、CDO と CSAD の 2 遺伝子について Table2-1 に示す各種プライマーを設計し、完全長 cDNA 配列取得のためのクローニングを行った。CSAD については CSAD-F3、-F4 および CSAD-5GSP2、-5GSP3 の 4 種をはじめに作成し、他のプライマーについては 3'-RACE の過程で長い断片が得られた場合にその都度作成した。各プライマーの設計および特性の確認には primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いた。

シチヨウシンカイヒバリガイ鰓由来 cDNA ライブラリーからの CDO、CSAD 遺伝子のクローニングとシーケンス

作成したプライマーを用いて、シチヨウシンカイヒバリガイ鰓由来 cDNA を鋳型として PCR 反応により各遺伝子のクローニングを行った。PCR 溶液の組成は、1 サンプル当たり DW:18.75 μ L, 10 \times PCR Buffer:2.5 μ L, dNTP:2 μ L, 鰓由来 cDNA:0.5 μ L, ExTaq HS DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ(株)) :0.25 μ L, Forward / Reverse プライマー:各 0.5 μ L (total:25 μ L) で実施した。

PCR条件について、CDO配列の増幅は、initial denaturation: 96 $^{\circ}$ C,5分、denaturation: 96 $^{\circ}$ C,30秒、annealing: 56 $^{\circ}$ C,30秒、extension: 72 $^{\circ}$ C,60秒、final extension: 72 $^{\circ}$ C,10分であり、denaturationからextensionまでを35サイクル行った。

また、CSADにおいては、最初にCSAD-F3とCSAD-5GSP3のプライマーセットによりESTデータ中に見られた配列がcDNAライブラリー中に含まれることを確認した。その後、CSAD-F4およびRACE取得用キット (Clontech Laboratories, Inc.) に付属するReverseプライマーであるCDS-IIIプライマーを用いてinitial denaturation: 96 $^{\circ}$ C,5分、denaturation: 96 $^{\circ}$ C,30秒、annealing: 56 $^{\circ}$ C,30秒、extension: 72 $^{\circ}$ C,90秒、final extension: 72 $^{\circ}$ C,10分の設定で、denaturationからextensionまでを35サイクルの条件でPCRを実施した。そのPCRにより得られた3'方向に部分的に伸長した配列をシークエンスして配列の決定を行った。さらに得られた結果から再度Forwardプライマー

(CSAD-F5,-F6,-F7,-F8) を順次作成し、同様にCDS-IIIプライマーを用いて3'RACE PCR反応を行う操作を繰り返した。その際のPCR条件としては、extensionの時間のみCSAD-F6の場合100秒、-F7の場合80秒とし、それ以外の条件は上記と同一の方法により実施した。また、ReverseプライマーであるCSAD-5GSP4を作成し、部分的に伸長した配列が接続しているか確認した。

5'側のRACEにおいては、ReverseプライマーであるCSAD-5GSP2とRACE取得用キット

(Clontech Laboratories, Inc.) に付属するForwardプライマーであるSMART IV Oligonucleotideプライマーを用いて、initial denaturation: 96 $^{\circ}$ C,5分、denaturation: 96 $^{\circ}$ C,30秒、annealing: 56 $^{\circ}$ C,30秒、extension: 72 $^{\circ}$ C,80秒、final extension: 72 $^{\circ}$ C,10分の設定で、denaturationからextensionまでを35サイクルの条件でPCRを実施した。

DNA断片のシークエンスを行うにあたり、まずアガロースゲル電気泳動により目的とする産物と思われるバンドが確認された場合に、そのバンドを含むゲルを切り出し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製した。精製後のDNA断片は、pGEM-T Easy Vector (Promega) ヘライゲーションした後、コンピテントセルDH-5 α (TOYOBO) に導入して形質転換株のクローニングを行った。形質転換させた複数の大腸菌株についてインサートチェックPCRを行った後、目的とするDNA断片を増幅しているサンプルに関してExoSAP-IT (USB Corporation) での処理を行いPCR産物の精製を行った。このサンプルをBig Dye (Applied

Biosystems) を用いたダイターミネーター法によりシーケンスサンプルとして調整した。遺伝子配列は、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定した。

CDO、CSAD 遺伝子の組織別発現量解析

CDO と CSAD の 2 遺伝子について、Gonad (生殖腺)、Adductor muscle (閉殻筋)、Byssus retractor muscle (足糸牽引筋)、Foot (足)、Mantle (外套膜)、Gill (鰓) の 6 組織について各遺伝子の発現量の比較のため、RT-PCR を実施した。これらの組織は平成 16 年研究航海なつしま NT05-06 において採取されたシチヨウシンカイヒバリガイから採取されたものである。組織の採取後、直ちに液体窒素により凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。Total RNA の抽出には ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いた。抽出された total RNA から SMART cDNA Library Construction Kit (クロンテック社) を用いて cDNA ライブラリーを作成した。

CDO の解析においては CDO-cdsF1 (Forward プライマー) と CDO-cdsR1 (Reverse プライマー) のセット (各プライマーの配列は Table2-1) を使用した。また、CSAD については、CSAD-F3 (Forward プライマー) と CSAD-5GSP2 (Reverse プライマー) のセットを使用した。PCR 条件は、CDO については initial denaturation: 94°C,5 分、denaturation: 94°C,30 秒、annealing: 55°C,30 秒、extension: 72°C,40 秒、final extension: 72°C,10 分であり、denaturation から extension までを 31 サイクル行った。CSAD については initial denaturation: 94°C,5 分、denaturation: 94°C,30 秒、annealing: 55°C,30 秒、extension: 72°C,60 秒、final extension: 72°C,10 分であり、denaturation から extension までを 30 サイクル行った。また、本実験においては、18S rRNA を内部標準として用いた。18S rRNA についての PCR 条件は initial denaturation: 94°C,5 分、denaturation: 94°C,30 秒、annealing: 55°C,30 秒、extension: 72°C,50 秒、final extension: 72°C,10 分であり、denaturation から extension までを 25 サイクル実施した。

BsCDO、BsCSAD 遺伝子の分子系統解析

cDNA ライブラリーからのクローニングにより得られたシチヨウシンカイヒバリガイにおける配列、およびデータベース上から取得した各生物種の配列を用いて MEGA (ver.5.1) により分子系統解析を行った。分析にはアミノ酸配列を用いて最尤法により作成した。ブートストラップサンプリングは 1000 回とした。データベース上から取得し、CDO の系統樹作成に使用した各生物種の配列のアクセッション番号は以下の通り。 *Homo sapiens* (human):NP001792, *Bos taurus* (cow):NP001029637, *Mus musculus* (mouse):NP149026, *Gallus gallus* (chicken):XP424964, *Danio rerio* (zebrafish):NP957035, *Takifugu rubripes* (torafugu):XP003974653, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP781446, *Lottia gigantea* (owl limpet):XP009062803, *Bathymodiolus*

azoricus (deep-sea mussels):mussel_c30808, *Capitella teleta* (polychaete worm):R7UTQ0, *Perionyx excavates* (earthworm):BP998823, *Drosophila melanogaster* (fruit fly):NP001246409, *Anopheles gambiae* (mosquito):XP001688508, *Culex quinquefasciatus* (southern house mosquito):XP001870330, *Caenorhabditis elegans* (nematode):NP508168

また、CSAD の解析に使用した配列のアクセッション番号については以下の通り。*Culex quinquefasciatus* (southern house mosquito):XP001861778, *Pediculus humanus corporis* (body louse):XP002428040, *Drosophila melanogaster* (fruit fly):AY061560, *Nasonia vitripennis* (jewel wasp):XP001600163, *Lottia gigantea* (owl limpet):XP009061653, *Pinctada fucata martensii* (pearl oyster):pflu_aug1.0_5096.1_52451.t1, *Gallus gallus* (chicken):XP423847, *Anolis carolinensis* (green anole):XP003216712, *Mus musculus* (mouse):NP659191, *Homo sapiens* (human):NP001231634, *Bos taurus* (cow):XP001788403, *Saccoglossus kowalevskii* (Acorn worms):XP002734261, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP780979, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP791030, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Gammaproteobacteria):YP005431365, *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Gammaproteobacteria):YP340791

第3項 結果

CDO、CSAD 遺伝子のクローニング

各データベース検索の結果、参考にした他生物種における CDO および CSAD 配列と相同性を持つ配列が取得された。一方で ADO と考えられる配列については得ることができなかった。

EST データベースにおける配列の検索により得られた CDO、CSAD 様配列を元に各種プライマーを設計し、シチヨウシンカイヒバリガイ鰓由来の cDNA ライブラリーからのクローニング、および得られた断片に対する 3',5'-RACE PCR 法による cDNA 全長配列の取得を試みた。その結果、翻訳領域が 651bp からなる CDO 様配列、および 1551bp からなる CSAD 様配列と思われる cDNA の完全長配列が得られた (Fig.2-1、2-2)。また、CDO、CSAD の各演繹アミノ酸配列におけるモチーフ配列について、他生物種においてすでに報告されている結果に加えて比較した結果、CDO では cupin motif 1 および 2 が確認された (Fig.2-3)。また CSAD においては補酵素であるピリドキサルリン酸 (PLP) の結合に関与する領域が保存されており、PLP 依存型の特徴を持つものであることが示された (Fig.2-4)。

CDO、CSAD 遺伝子の分子系統解析

分子系統解析の結果、本実験でシチヨウシンカイヒバリガイからクローニングされた CDO および CSAD 様遺伝子の配列は、他の生物種の CDO および CSAD により構成される系統樹のクレードの中に含まれ、また同時に軟体動物における配列同士で一つのクレードを形成した。この

ことから、本章の実験により得られた配列はシチヨウシンカイヒバリガイにおける CDO および CSAD であることが示された (Fig.2-5、2-6)。

CDO、CSAD 遺伝子の組織別発現量解析

CDO と CSAD の 2 遺伝子について、Gonad (生殖腺)、Adductor muscle (閉殻筋)、Byssus retractor muscle (足糸牽引筋)、Foot (足)、Mantle (外套膜)、Gill (鰓) の 6 組織について各遺伝子の組織間での発現量の比較を行った。その結果、CDO および CSAD の両遺伝子ともに鰓において最も高い発現量を示す特徴を示した (Fig.2-7)。CDO については、鰓に次いで外套膜、生殖腺で発現が確認された一方で、足と閉殻筋での発現は鰓と比較すると非常に低いものであった。足糸牽引筋においてはほとんど発現がみられなかった。

CSAD においては、鰓に次いで生殖腺で高い発現が確認され、足と外套膜でも発現していることが確認された。閉殻筋における発現は鰓の結果と比較すると非常に低く、また、CDO と同様に足糸牽引筋では CSAD についてもほとんど発現は確認されなかった。

第4項 考察

本実験におけるクローニングにより、651bp からなる CDO 様 cDNA の配列と、1551bp からなる CSAD 様 cDNA の完全長配列が得られた。そのそれぞれの配列について、他生物種の配列を含めた分子系統解析を行った結果、CDO、CSAD ともに軟体動物間でクレードを形成したことから、クローニングにより取得された配列が、それぞれシチヨウシンカイヒバリガイにおける CDO および CSAD 配列であることが示された。このことから、少なくともシチヨウシンカイヒバリガイにおいては CSA 経路が存在しており、CDO および CSAD により触媒される経路を介した Hpt 生合成が行なわれていることが示唆された。

また、これら Hpt 生合成に関わる遺伝子について、CDO および CSAD の両遺伝子ともに鰓における発現が最も高いという結果を示した。このことについて、鰓は外部環境と最もよく接する組織の一つであると考えられ、海水中に含まれる硫化物への無毒化といった適応のために十分な Hpt を確保し蓄積する目的として、このような組織別の発現パターンを示した可能性が考えられる。

これまでに CDO のモチーフ領域を検討した論文 (Joseph and Maroney, 2007) を参考に、シチヨウシンカイヒバリガイ CDO における活性部位付近のアミノ酸配列をアラインメントし、比較を行った。その結果、重要であると考えられるアミノ酸残基の多くがシチヨウシンカイヒバリガイにおいても保存されている一方で、これまでに CDO の配列が分かっている細菌から哺乳類に至るまでの生物では見られなかった変異が生じている結果を示した。CDO は cupin superfamily に

属する酵素の一種であるが、このファミリーに属するタンパク質の特徴として全体的に非常に低い相同性を示す一方で、活性部位付近に 2 箇所の部分的に保存された配列が存在していることが分かっている(Stipanuk et al., 2011)。そのアミノ酸配列を一般的に示した場合、 $Gx_5H(D/N)Hx_3-6(C/G)x_6G$ (cupin motif 1) / $Gx_{5-7}PxGx_2Hx_3N$ (cupin motif 2)とされている (x: 任意のアミノ酸、数字はアミノ酸の個数)。今回得られたシチヨウシンカイヒバリガイの CDO では、cupin motif 1 が $Ax_5HSHx_{3-6}Cx_6G$ という配列を示した (Fig.2-3)。EST の配列データが利用できる近縁種である *B. azoricus*、および浅海性腹足類の *Lottia gigantea* においてもシチヨウシンカイヒバリガイと同様の変異が確認された。浅海に生息する腹足類においても同様のアミノ酸残基の置換が確認されたことから、この変異は軟体動物において広く見られるものである可能性が示唆される。

CSAD に関しては、演繹アミノ酸配列のモチーフの検索を行ったところ、ピリドキサル結合ドメイン (PLP-Binding site) が確認された。他生物種の CSAD アミノ酸配列とのアラインメントを作成したところ、その部分のアミノ酸配列は完全な一致が見られた。

本節における実験により、シチヨウシンカイヒバリガイにおける CDO および CSAD の存在が明らかとなった。このことから、これらの遺伝子が環境の変化に対してどのような変動を示すのか明らかにする必要があると考えられる。また、得られた遺伝子に相当する活性、すなわち L-システインの酸化酵素活性と L-CSA に対する脱炭酸活性が組織中に存在しているのか検討することにより、本対象種における Hpt 生合成経路の存在を明確にできると考えられる。その際に、CSAD は L-CSA および L-システイン酸の少なくとも 2 つの基質を触媒するとされており、そういった基質特異性や活性の反応速度などについても明らかにできれば、深海熱水噴出域環境への適応を可能にした要因についても迫ることができると思われる。また、本実験において EST データの探索の段階で取得することができなかった ADO 遺伝子について、組織中において ADO に相当する酵素活性を測定することで、もともと本対象種には存在していないのか、それとも活性は有するが異なる酵素が反応を担うために遺伝子配列を取得できないのか、などといったことについても明らかにできる可能性があると考えられる。

Table2-1 タウリン生合成関連遺伝子のクローニング、および組織別発現量解析に使用したプライマー情報。

Name of primer	Sequence	Target	Direction
CDO-utrF1	CAATTCAGAGATGTCAAAATGT	CDO	Forward primer
CDO-cdsF1	ATAGACTACGTGAAAACCTTAATGAC		Forward primer
CDO-utrR1	CTTTCCATTGCTCTTCTTTTAT		Reverse primer
CDO-cdsR1	TGCTCCAGAACGTAACCTTG		Reverse primer
CSAD-F3	GCACACGTACATACGCTAACAG	CSAD	Forward primer
CSAD-F4	AAATACAGCGTGAAAACAGGTC		Forward primer
CSAD-F5	ATGTACGCCCTTAATGTTGCTC		Forward primer
CSAD-F6	TTCAGAGAAGGGTCATTACTIONG		Forward primer
CSAD-F7	GTTGATGCTCTAAAGGTGTGG		Forward primer
CSAD-F8	GCTGCAGACATTGATAATTTG		Forward primer
CSAD-F9	AATATGGCCGTCACAAAGAGT		Forward primer
CSAD-5GSP2	GGAAATGATGTGACGATTCTGGAC		Reverse primer
CSAD-5GSP3	ATCAGAATAAACACTGGGgCAACC		Reverse primer
CSAD-5GSP4	GGAGCTTCATGTACAATCTGC		Reverse primer
18S F-1	TACCGTCGTAGTTCTGACCATAAAC	18S rRNA	Forward primer
18S R-1	GAATTAACCAGACAAATCGCTCCAC		Reverse primer

```

1 TTTTATATTACCGAGCTTCACTAATAGGGGGCGGAATTTGGGGCCCGACGTTCCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGTGGGGGAATTTTCGATTCAAT 100
101 TCCAGAGATGTCAAATGTATGGAAACCATGGAAACGGACAGTTGTTGTGGGAATTTCTGAAATGGATGCTTACCACAAAACAGACACTATCACACCTCCA 200
    M E T M E T D S C C G N S E M D A Y H K T D T I T P P
201 AAAAATTTAGATGAATTGATACGGGAATTACATAAAGTATTTGCCTCAGATAAAGTAAACATAGATTACGTGAAAACTTTAATGACACTGTATAAAAAGTA 300
    K N L D E L I R E L H K V F A S D K V N I D Y V K T L M T L Y K S N
301 ATCCTAAAGAATGGAAAAAGTTTGCTAAGTTTGACCCTCACAGATACACGAGAAAATTTAGTCGATTTAGGAAATGGCAAGTTTAACCTAATGATATTATG 400
    P K E W K K F A K F D P H R Y T R N L V D L G N G K F N L M I L C
401 CTGGAACACGGCGCAGGCTAGTAGCAGTACACTCCCATGCTAATTCCTCACTGTTTTATGAAGATATTGGACGGAGGTGTAATGAAGAGCTGTTTGAATGG 500
    W N T A Q A S T I H S H A N S H C F M K I L D G G V N E E L F E W
501 CCAGAAAATGAAGAAGTCAAGGAAATGACACCGCGGAAAAAATACTTACGAGAAAGATCAAACCGCTTATATCTCTGACGAGATTGGTTTGCATCGTA 600
    P E N E E V K E M T P R E K N T Y E K D Q T A Y I S D E I G L H R I
601 TTGAGAAATCAAGCCACACAGATTATGCTGTGCTTACATTTATATTCACCACCATTTGATGAATGTAAGTGTGTTTGTATCAGTATACAGGCCATGTAAC 700
    E N P S H T D Y A V S L H L Y S P P F D E C K C F D Q Y T G H V T
701 AAATGCCAAGGTTACGTTCTGGAGCAAGTTCGGCAAACGACCCCTTCGAAAAGGACAACAATAAGAAAGAAAGTGTAGATACAGACTCTAGATGA 800
    N A K V T F W S K F G K R T P F G K G Q T K *
801 TTGGTCGAAAATCAATTTTTTATAAAAAGAAGCAATGGGAAAG 844

```

Fig.2-1 シチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdierum*)におけるシステインジオキシゲナーゼ (CDO) 遺伝子の塩基配列と ORF における演繹アミノ酸配列。

```

1 TAGTGGTATCAACGCGAGTGGCCATTACGGCCGGGACACACGTGGGTTTTATACTAAACGGCTGGGCACACGTACATACGCTAACAGAAATTTGCA 100
101 ATTTTCATCATGGAAAACGGTACAGTGTTCAAATGGCATTACTAACGGACATGCAATCAAAAAGAAGAAAATGGTCATGTCAAAATGGCGC 200
    M E N G H S V S N G I T N G H A I K K K K E N G H V I T N G A
201 TAATGGAACCAATGGCAACTGTCCAGAATCGTCACATCATTTTCTTACTCAGTATTTTGAGACCATGGTGTCTGAAGGAATTGACAAAGCAATGACAGA 300
    N G T N G N C P E S S H H F L T Q L F E T M V S E G I D K A N D R
301 AAGAACAAAATTTGGAAATTAAGCATCCGAAAAGAAATGGAGCAGATACTTGATCTTGATCTGAAAGATGCAACTTCCGATGATCGTCTTCTATCTATTT 400
    K N K I V E F K H P K E L E Q I L D L D L K D A T S D D R L L S I C
401 GTAGTGACGCTCATTAAATACAGCGTAAAAACAGGTCACCCAGATTTTTTAATCAACTGTTGGCGGACTGGATGAGTATACACTTGGCGGTTCTTGGCT 500
    S D V I K Y S V K T G H P R F F N Q L F G G L D E Y T L G G S W L
501 TACAGAAACCTTAAATACTAGTCAATACACATTTGAGGTTGCCCCAGTGTATTCTGATTGAGCAATGTGTCATAAAGAAAATGCTTGGACTGGCAGGA 600
    T E T L N T S Q Y T F E V A P V F I L I E Q C V I K K M L G L A G
601 TTTGACGATGGCGATGGAATATTCTGCCAGGCGTTCCATATCCAACATGTACGCCCTTAATGTTGCTCGGTACCAACGGTCCAGATGTCAAATGGA 700
    F D D G D G I F C P G G S I S N M Y A L N V A R Y Q R F P D V K L K
701 AGGGGATGCACGCCCTACATAAAATATGTGTTTTAACTTACAGAGAAGGGTCACTTACTCGATTAAAAAGGGAGCAGCATTCTTGAATTTGGGATGAAAA 800
    G M H A L P K I C V L T S E K G H Y S I K K G A A F L G I G M E N
801 TGAATACCCGTAAGAACTGACAACCAAGGCCAATGTACCCACGGCCTTAGAAACAGCAATTCAGAATGTCAGAGAAGGAAATGGTACCATACCTA 900
    V I P V K T D N Q G R H S P T A L E T A I Q E C Q R K E H V P Y L
901 GTGAATGCCACGGAGGGTCTACAGTACTGGGAGCTTATGATCCTCTAGACGAAATAGCCACCATATGTCAGAAGTATGGAATATGGCTACATGTAGATG 1000
    V N A T G G S T V L G A Y D P L D E I A T I C Q K Y G I W L H V D G
1001 GTGCTTGGGGAGCTTCAGTTTTGTTGTCTAAAAATCACAAGGATTGATGAAGGGCATTGAAAGGGCAGACTCGTTGACATGGAACCTCACAAGATGAT 1100
    A W G A S V L L S K N H K G L M K G I E R A D S L T W N P H K M M
1101 GGGTGCATCTACAAGCTTCAGTATTTCTGACAAGCACAAGTCCGTGTTATTAGATGCCCATGCAGCAACGCCAAGTATTTGTTCCAACAGACAAG 1200
    G A N L Q A S V F L T K H K S V L L D A H A A N A K Y L F Q Q D K
1201 TTTTATGACGTTTTCTTATGACACGGGAGATAAGTCAGTCCAGTGTGGCAGGAAGGTTGATGCTCAAAGGTGGACCATGTGGAAGCAAGGGGGATA 1300
    F Y D V S Y D T G D K S V Q C G R K V D A L K V W T M W K A K G D T
1301 CCGAATGGTGCAGACATTGATAATTTGTTTACTTGTCAAATACTTAGCACAGTTAGTTACTTCTACAGAAGGATTTAGACTTGTACAAGGCCACA 1400
    G M A A D I D N L F T C S K Y L A Q L V T S T E G F R L V Q E P Q
1401 GTGTAATAATGATGTTTTGGTACATACCCAAACGATTTAGAGGAAAGGAAGAAACACAGGAATGGTGGCAGGAGTTAGGGAAGGTCGCTCCAGAGATC 1500
    C T N V C F W Y I P K R F R G K E E T Q E W W Q E L G K V A P E I
1501 AAGAAGAAAATGGTGAAGAGGAACACTGTTGATCGGTTACCAACCTGATGGAGATCTTGCAACTTTTTCAGAATGGTCTATCCAATATGGCGTCA 1600
    K K K M V E R G T L L I G Y Q P D G D L V N F F R M V L S N M A V T
1601 CAAAGAGTGATATGAACCTTTGTTGTAGAAGAAATGCAAGATTAGGGTCAGACTTGTGATAATGGAATAAGCAATTGATAAACCAATGGTGGTAGATC 1700
    K S D M N F V V E E I A R L G S D L *
1701 TACTGATAGCTGCAGATTGTACATGAAGCTCCCTCTATCCACTTCCGTATTTTTGTATTTGTAGTACTGTAGCAACTATTTTATAATGTAATTTT 1800
1801 ACAACAATCTGTGAGAAAACCAAAAAGGGGAGACAACCTGGCCTGATGTTATTGTACATGTATATTACCTTGTAGTATTTTTACATGTATGTTAATTA 1900
1901 CATATGTACATGTACTATTTATATTTTATACATTTTTTTGTTGAATACATAAGTATGTAGACCATTCTCTTGTGATTACTTTGTTTATGTTAAATTTA 2000
2001 GAATTGATGGCAACCATGTCCATGATTTTCAATAAAAATAAATAAAAAAANAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2075

```

Fig.2-2 シチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdirum*)におけるシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) 遺伝子の塩基配列と ORF における演繹アミノ酸配列。

<i>D. rerio</i>	KRIADICERNGMWVHDAAWGGSVLFSSKRRHLVAGIERANSVTWNP ^{HL} KMLLTGLQCSVI
<i>X. tropicalis</i>	AEIADVCEQHGLWLHVDAAFGGSALLSNKRRHLLNGIERANSVTWNP ^{HL} KMLGVGLQCSAF
<i>H. sapiens</i>	EAIADVCRHGLWLHVDAAWGGSVLLSQTHRHLLDGIQRADSVAWNPHKLLAAGLQCSAL
<i>M. musculus</i>	DAIADVCRHGLWFHVDAAWGGSVLLSRTHRHLLDGIQRADSVAWNPHKLLAAGLQCSAL
<i>C. intestinalis</i>	EKIADICEDKKLWLHVDAAWGGVLFSSKYRQLCKGIHRSDSVAWNPHKMLMAPLQCCVF
<i>B. septemdiarium</i>	DEIATICQKYGIWLHVDGAWGASVLLSKNHKGLMKGIERADSLTWNPHKMMGANLQASVF
<i>D. melanogaster</i>	NGAADVTERHGLWLHVDAACLGGAALLSAKNRSLIAGLERANSF ^{SW} NPHKTIGAPLQCSLF
	* : : :*:***.. *...*:* . : * *:.*:*:*.***** : . **.. :

Fig.2-4 CSAD の PLP binding site 付近のアミノ酸アラインメント結果。用いた各生物種の配列データの Accession No.は以下の通り。PLP の結合に関わる領域を青い背景で示した。

Danio rerio ; NP001007349、*Xenopus tropicalis* ; XM002936641、*Homo sapiens* ; NP001231634、*Mus musculus* ; NP659191、*Ciona intestinalis* ; NP001027786、*Drosophila melanogaster* ; AY061560

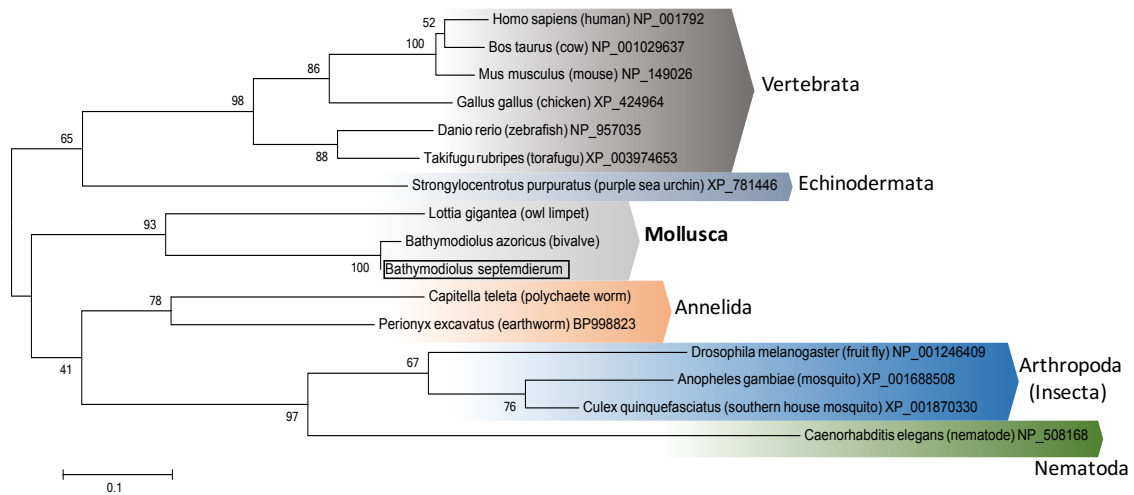


Fig.2-5 シチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdierum*)におけるシステインジオキシゲナーゼ (CDO) の分子系統解析の結果。分子系統樹はアミノ酸配列データを用いて最尤法により構築した。ブートストラップサンプリングは1000回実施した。解析に用いた配列のAccession No.等については以下の通り。*Homo sapiens* (human):NP001792, *Bos taurus* (cow):NP001029637, *Mus musculus* (mouse):NP149026, *Gallus gallus* (chicken):XP424964, *Danio rerio* (zebrafish):NP957035, *Takifugu rubripes* (torafugu):XP003974653, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP781446, *Lottia gigantea* (owl limpet):XP009062803, *Bathymodiolus azoricus* (deep-sea mussels):mussel_c30808, *Capitella teleta* (polychaete worm):R7UTQ0, *Perionyx excavates* (earthworm):BP998823, *Drosophila melanogaster* (fruit fly):NP001246409, *Anopheles gambiae* (mosquito):XP001688508, *Culex quinquefasciatus* (southern house mosquito):XP001870330, *Caenorhabditis elegans* (nematode):NP508168

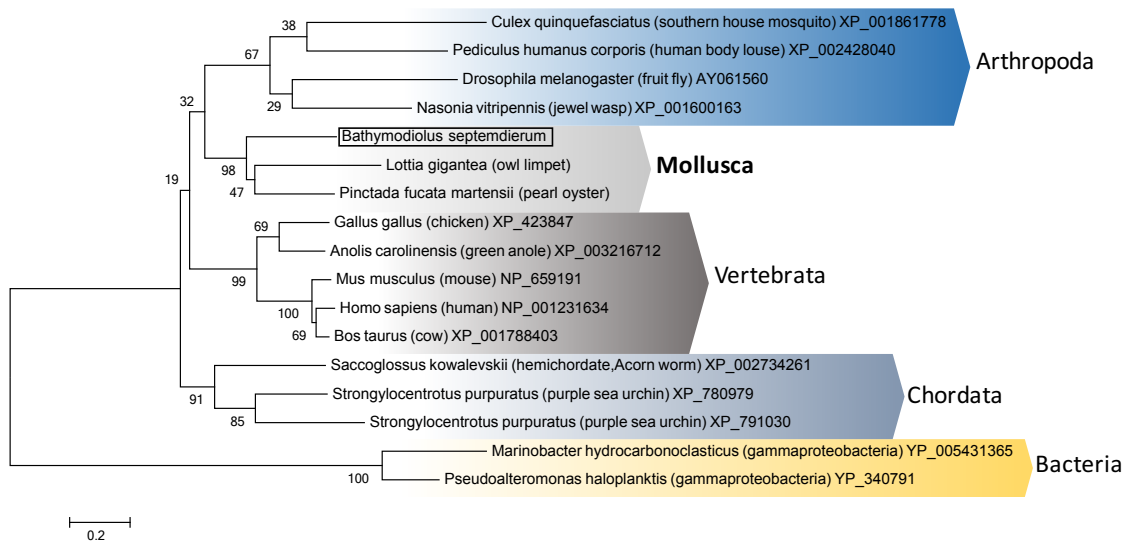


Fig.2-6 シチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdiarium*)におけるシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) の分子系統解析結果。分子系統樹はアミノ酸配列データを用いて最尤法により構築した。ブートストラップサンプリングは 1000 回実施した。解析に用いた配列の Accession No.および Gene Model ID については以下の通り。 *Culex quinquefasciatus* (southern house mosquito):XP001861778, *Pediculus humanus corporis* (body louse):XP002428040, *Drosophila melanogaster* (fruit fly):AY061560, *Nasonia vitripennis* (jewel wasp):XP001600163, *Lottia gigantea* (owl limpet):XP009061653, *Pinctada fucata martensii* (pearl oyster):pfu_aug1.0_5096.1_52451.t1, *Gallus gallus* (chicken):XP423847, *Anolis carolinensis* (green anole):XP003216712, *Mus musculus* (mouse):NP659191, *Homo sapiens* (human):NP001231634, *Bos taurus* (cow):XP001788403, *Saccoglossus kowalevskii* (Acorn worms):XP002734261, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP780979, *Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin):XP791030, *Marinobacter*

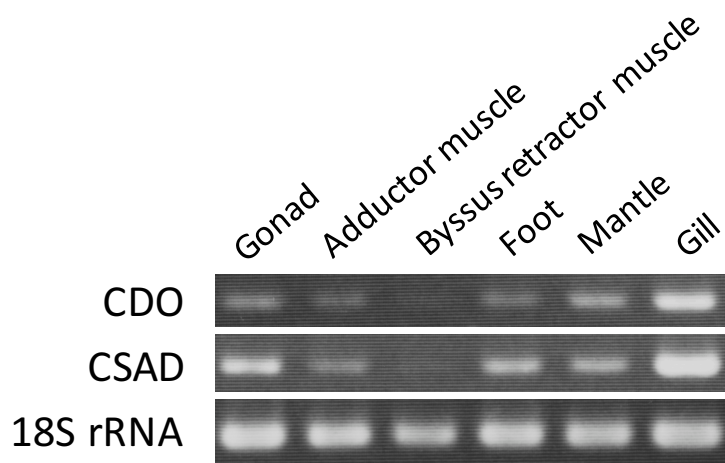


Fig.2-7 シチヨウシンカイヒバリガイ(*B. septemdirum*)におけるシステインジオキシゲナーゼ (CDO) およびシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) の組織別発現量解析の結果。18S rRNA を内部標準として用いた。Gonad:生殖腺、Adductor muscle:閉殻筋、Byssus retractor muscle:足糸牽引筋、Foot:足、Mantle:外套膜、Gill:鰓。

第2節 硫化物への曝露に対するヒポタウリン生合成関連遺伝子の発現応答

第1項 緒言

第2章第1節の解析から、シチヨウシンカイヒバリガイにおいては、システインジオキシゲナーゼ (CDO) およびシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) の2遺伝子が単離されたことから、少なくとも CSA 経路を介したヒポタウリン (Hpt) 生合成を行っていることが示唆された。また同時に、組織別発現量の解析では検討した6組織の中で鰓が最も高い発現量を示していた。鰓は海水への接触面積が大きいため最も外部環境と接する組織であると考えられると同時に、様々な物質のやり取りを行う必要があるために、その機能を遮るような物理的な障壁を設けることができない等といった組織としての特性をもつと考えられる。この点も合わせて考えると、Hpt およびその生合成機構が環境の変化、特に環境中の硫化物への適応に関与している可能性が考えられる。Hpt 及びチオタウリン (Tht) が硫化物の無毒化機構の一端を担っているとすると、硫化物の無毒化に必要な Hpt は環境中の硫化物濃度が高くなると、それに伴って組織中の蓄積量を高くする必要があると想定され、そのため環境硫化物濃度に伴って生合成酵素をコードする遺伝子の発現量も増加する可能性が考えられる。

このようなことから、深海研究航海において採集されたシチヨウシンカイヒバリガイに対して硫化物を添加した海水へ曝露する飼育実験を行い、それらの供試個体の鰓組織中における CDO と CSAD 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって測定した。硫化物への曝露飼育実験ではいくつかの濃度や曝露時間を設定し、それらの解析で得られる発現量の変動結果から、Hpt 生合成機構と環境中の硫化物への適応について検討することを試みた。

第2項 材料と方法

曝露飼育実験に供した生物試料について

飼育実験に用いた生物試料はシチヨウシンカイヒバリガイであり、平成22年度研究船なつしま航海 NT10-08 において伊豆小笠原海域における明神海丘 (#1126 潜航、水深 1230m 付近)、および平成23年度研究船なつしま航海 NT11-09 の水曜海山 (#1258 潜航、水深 1380m 付近) において、無人探査機ハイパードルフィンにより採集されたものを用いた。

硫化物への曝露飼育実験

シチヨウシンカイヒバリガイの硫化物への曝露飼育実験は、生物サンプル採取後すぐに船上で行った。1実験区あたりの個体数を8個体とし、飼育温度は生息していた深海環境を考慮して4℃に設定した。飼育に用いる海水は採集現場の表層から採取し、曝露飼育実験までに飼育温度

である4°Cに冷却して用いた。NT10-08 航海では、これまでに測定された熱水噴出孔からの噴出水中から検出される硫化水素濃度等の結果を参考にして、10L の飼育海水当たり 2mg の硫化ナトリウム・九水和物($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)を 12 時間おきに添加する方法で行った。曝露開始からそれぞれ 8 時間後および 24 時間後に各組織のサンプリングを行った。 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ は、毒性の強い硫化水素の代わりに硫化物源として実験に使用されている。また同時に、深海性二枚貝を採集した海域における採取直後の表層海水を 100%海水とした時に、110%および 90%となるように人工海水粉末 (アクアザルツ; 日成産業) または脱イオン水を添加した海水を用いて、高浸透圧および低浸透圧環境への曝露飼育実験も行った。

NT11-09 航海では、NT10-08 での結果を踏まえて 10L 飼育海水当たりの $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ の添加量を、1mg と 10mg の 2 区を設けて、それらを 8 時間おきに添加して 24 時間および 48 時間後に各組織のサンプリングを実施するという方法で行った。また、 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ に替えてチオ硫酸ナトリウム・五水和物($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)を飼育海水 10L 当たり 10mg 添加する曝露飼育実験も実施した。いずれの飼育実験においても曝露飼育実験の終了時には直ちに解剖し鰓をはじめとする各組織のサンプリングを行い、速やかに液体窒素により凍結させて発現量の解析まで-80°Cで保存した。Total RNA の抽出には Trizol (Life Technologies) を用いた。抽出された total RNA から first-strand cDNA の合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) 用いて実施した。

リアルタイム PCR による発現量解析について

CDO 及び CSAD 遺伝子の発現解析に用いたリアルタイム PCR 用プライマーとプローブを Table2-2 に示した。プローブおよびプライマーは、Applied Biosystems に合成を依頼した。リアルタイム PCR は、7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った。反応溶液の組成は、CDO 及び CSAD 測定サンプルにおいては、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 5 μl 、Fwd Primer 0.2 μl 、Rev Primer 0.2 μl 、probe 0.2 μl 、DW 2.9 μl 、cDNA 1.5 μl (total:10 μl)である。18S rRNA の測定サンプルに関しては、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 5 μl 、18S primer probe mix (Applied Biosystems) 0.5 μl 、DW 3 μl 、cDNA 1.5 μl とした。PCR サイクルの条件は、Stage 1: 50°C, 2 分、Stage 2: 95°C, 10 分、Stage 3: 95°C, 15 秒+60°C, 1 分とし、Stage 3 を 40 サイクル行った。また本解析においては、シチヨウシンカイヒバリガイの 18S rRNA 遺伝子を内部標準として用いた。得られた結果についての統計処理は、StatPlus (AnalystSoft Inc) を用いて実施し、一元配置分散分析 (ANOVA) および Bonfferoni test を用いて行った。

第3項 結果

NT10-08 航海において実施した硫化ナトリウム添加海水および低浸透圧海水（90%SW）、高浸透圧海水（110%SW）へ曝露飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓における CDO の mRNA 発現量のリアルタイム PCR による定量結果を Fig.2-8 に示した。8 時間後においては、硫化物添加、低浸透および高浸透圧の全ての区でコントロール区の値と比較してやや低い値を示した。24 時間後においては、低浸透圧区と硫化物添加区はコントロール区と差が見られなかったが、高浸透圧でのみやや高い値を示した。しかしながら、統計的にはいずれの実験区においても有意な差は見られなかった ($p < 0.05$)。

また、NT10-08 航海における CSAD の mRNA の発現量の定量結果について Fig.2-9 に示した。CSAD においても CDO 同様に、8 時間後には全ての実験区においてコントロール区の結果と比較して低い値を示した。24 時間後においては、コントロール区と比較して高浸透圧区でやや高い値を示した。しかしながら、CSAD においても CDO 同様個体間の変動が大きく、統計的に有意な変化は見られなかった ($p < 0.05$)。

NT11-09 航海において実施した硫化ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウム添加海水へ曝露したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓における CDO の mRNA 発現量のリアルタイム PCR による定量結果を Fig.2-10 に示した。24 時間後においては、硫化ナトリウム 1mg/L の添加量の実験区においてコントロール区の値と比較してやや高い値を示した。48 時間後においても各実験区間で 24 時間後の結果と同様な傾向の発現量を示したが、コントロール区の値が最も高い値を示し、全実験区間において統計的に有意な変化は確認されなかった ($p < 0.05$)。

また、NT11-09 航海における CSAD の mRNA の発現量の定量結果を Fig.2-11 に示した。24 時間後においては硫化ナトリウム 1mg/L の添加区でやや高い値を示した。48 時間後においては、硫化物を添加している 3 実験区での差は小さくなり、コントロール区が高い値を示した。硫化ナトリウムに変えてチオ硫酸ナトリウムを添加した区の結果については、いずれの曝露時間に関わらず発現量の値に変化は見られなかった。また、この CSAD においても統計的な有意差は見られなかった ($p < 0.05$)。

第4項 考察

第 2 章第 1 節の結果から、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて Hpt 生合成に関わる酵素である CDO と CSAD の 2 種の遺伝子が単離されたことから、これら遺伝子の環境変化への適応との関係を明らかにするため、深海研究航海において採集されたシチヨウシンカイヒバリガイに対して浸透圧を変化させた海水および各種硫化物を添加した海水への曝露飼育実験を実施し、

リアルタイム PCR による発現量の解析を実施した。その結果、CDO および CSAD の各遺伝子について、いずれの硫化物濃度および曝露時間においても統計的に有意な変化は認められなかった。この点について、外部環境の影響を受けずにどの個体も常に一定の発現量の値を示したためというよりも、それぞれの実験区における各個体が示す値のばらつきが大きかったことが要因と考えられる。このことから、まず二枚貝の殻などにより外套腔内に侵入してくる硫化物を防いでいた個体も存在していた可能性が考えられる。また、鰓を発現量の測定対象として解析を進めたが、第 2 章第 1 節の結果から生殖腺、閉殻筋、足糸牽引筋、足、外套膜、鰓の 6 組織の中で鰓が最も高い発現を示しており、このことからシチヨウシンカイヒバリガイ鰓においては外部環境の状態によらずに常に高い発現量の値を維持する体制である可能性が示唆される。一方で、他の組織においては鰓ほど生合成関連遺伝子について高い発現が見られていないが、鰓での Hpt 生合成の不足を補うために、外部環境の変化に応答して発現量の上昇が生じている可能性も考えられる。このため、今後、鰓以外の組織についても発現量変動の解析を進める必要があると考えられる。

硫化物の添加により飼育海水中の pH に変化が生じている可能性も考えられる。しかしながら、本研究においては Hpt 生合成関連遺伝子の発現量に有意な変動が認められないことから、pH の変化が二枚貝へ影響を与えている可能性は低いことが考えられる。しかしながら一方で、pH の変化が個体間の結果のばらつきの要因となっている可能性も想定されるため、今後 pH の測定をはじめ酸化還元電位やイオン強度などの化学的なパラメーターにも注目し、飼育海水および生物サンプルとして二枚貝が採取された深海環境の状態の解析を行っていく必要もあると思われる。

発現量に有意な変動が見られなかった他の要因として、組織中に蓄積していた Hpt 量が外部環境の変化への適応のために十分であったという可能性が考えられる。このためには曝露飼育実験に供した個体について遺伝子発現量のみならず、組織中における Hpt や Tht をはじめとした遊離アミノ酸量の分析を行うことが必要である。また、仮に鰓における Hpt 量が減少した場合に、各組織間で血リンパを介するなどして二枚貝全体として遊離アミノ酸の不足を補うような働きをしている可能性も考えられるため、鰓のみならず他の組織を対象とした遊離アミノ酸分析を行うことも必要であると考えられる。それらの検討を行うことで、生合成関連遺伝子の発現量と組織中に蓄積する遊離アミノ酸量 (特に Hpt および Tht について) の関係について把握することも重要であると考えられる。

Table2-2 リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびプローブ

CDO : Cysteine Dioxygenase, CSAD : Cysteine Sulfinic acid Decarboxylase, FAM : 6-carboxyfluorescein (蛍光色素の一種) , MGB : Minor Groove Binder (Tm enhancer)

Name of primer,probe	Sequence	Usage
BsCDO-F	GGCGCAGGCTAGTACGATACA	Forward primer
BsCDO-R	TCCGTCCAATATCTTCATAAAACAGT	Reverse primer
BsCDO-MGB	(FAM)-TCCCATGCTAATTCT-(MGB)	Probe
BsCSAD2-F	GGCAGGAAGGTTGATGCTCTAA	Forward primer
BsCSAD2-R	GTCTGCAGCCATTCCGGTAT	Reverse primer
BsCSAD2-MGB	(FAM)-CATGTGGAAGCAAAGG-(MGB)	Probe

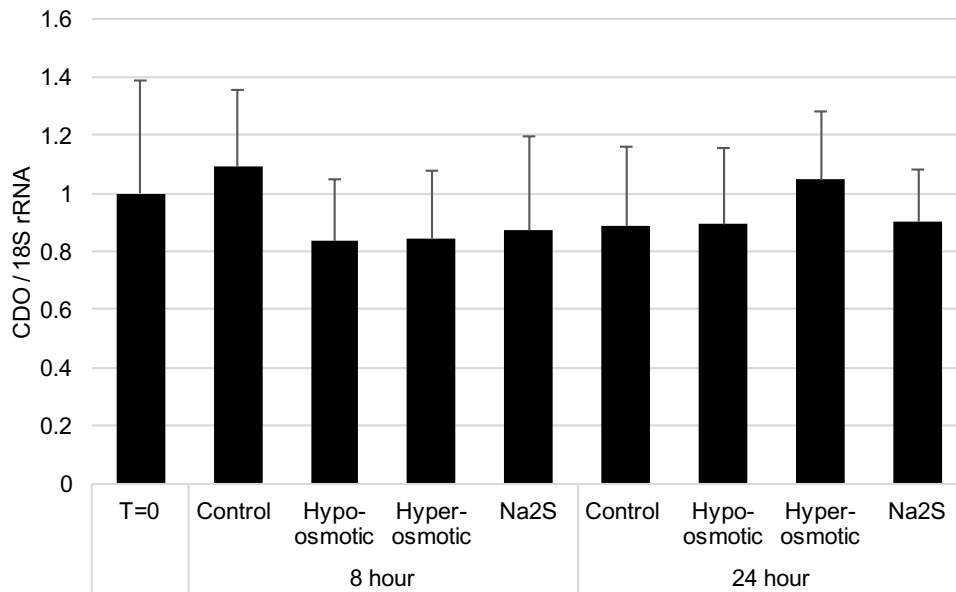


Fig.2-8 硫化ナトリウム添加海水および低浸透圧海水（90%SW）、高浸透圧海水（110%SW）へ曝露飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓におけるシステインジオキシゲナーゼ（CDO）mRNA のリアルタイム PCR による定量結果。値は mean±SD (n=8,Na2S 添加の 24 時間後のみ n=7) を示す。また T=0 は飼育実験開始時を示す。縦軸は 18S rRNA に対する CDOmRNA の相対的な発現量の値を示し、T=0 の時点の発現量が 1 となるように全ての実験区の値を換算した。（NT10-08 航海において実施）

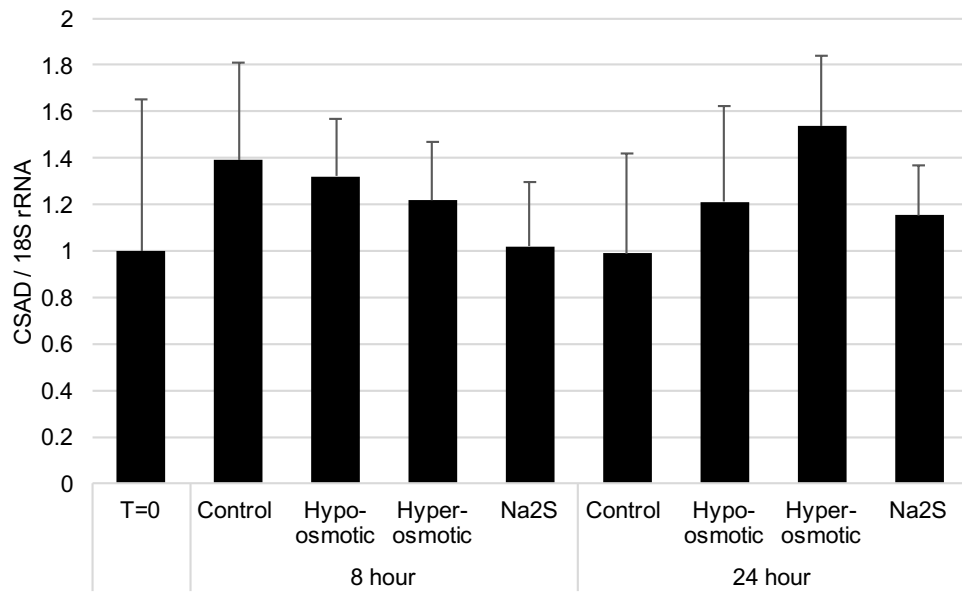


Fig.2-9 硫化ナトリウム添加海水および低浸透圧海水（90%SW）、高浸透圧海水（110%SW）へ曝露飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓におけるシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ（CSAD） mRNA のリアルタイム PCR による定量結果。値は mean±SD (n=8,Na2S 添加の 24 時間後のみ n=7)を示す。また T=0 は飼育実験開始時を示す。縦軸は 18S rRNA に対する CSADmRNA の相対的な発現量の値を示し、T=0 の時点の発現量が 1 となるように全ての実験区の値を換算した。（NT10-08 航海において実施）

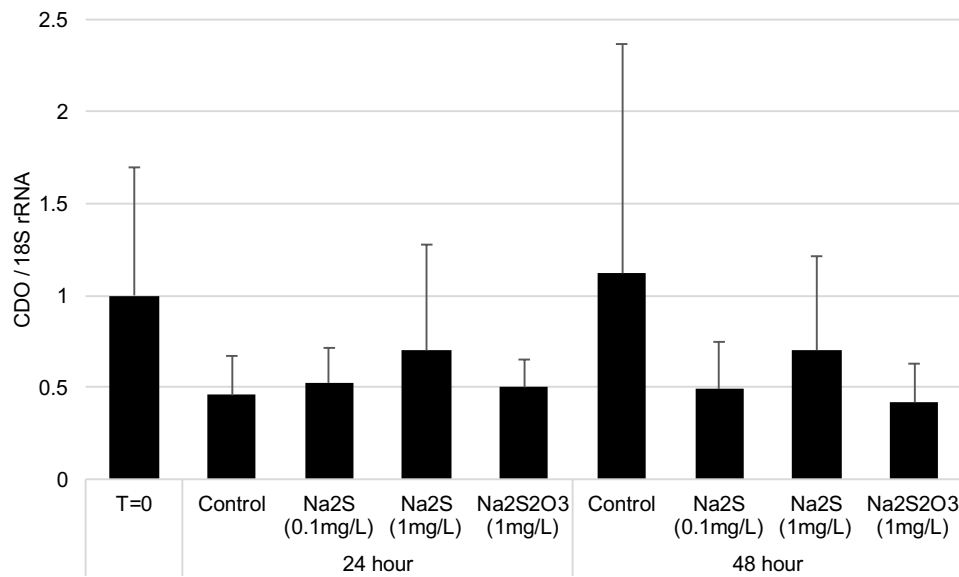


Fig.2-10 硫化ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウム添加海水への曝露飼育を実施したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓におけるシステインジオキシゲナーゼ (CDO) mRNA のリアルタイムPCRによる定量結果。値は mean±SD (n=8)を示す。また T=0 は飼育実験開始時を示す。縦軸は18S rRNA に対する CDO mRNA の相対値を示し、T=0 の時点の発現量が 1 となるように全ての実験区の値を換算した。(NT11-09 航海において実施)

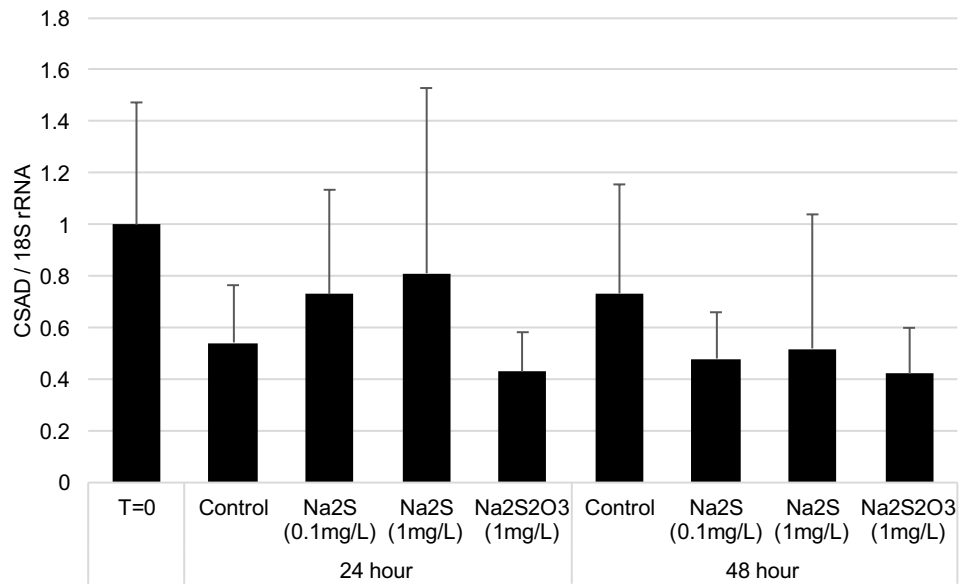


Fig.2-11 硫化ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウム添加海水への曝露飼育を実施したシチヨウシンカイヒバリガイの鰓におけるシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) mRNA のリアルタイム PCR による定量結果。値は mean±SD (n=8)を示す。また T=0 は飼育実験開始時を示す。縦軸は 18S rRNA に対する CSADmRNA の相対値を示し、T=0 の時点の発現量が 1 となるように全ての実験区の値を換算した。(NT11-09 航海において実施)

第3章 新規遊離アミノ酸分析法の検討と飼育実験個体における遊離アミノ酸分析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第4章 ヒポタウリン生合成に関わる酵素の特性

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 総合考察

本研究においては、深海性二枚貝であるシチヨウシンカイヒバリガイにおけるヒポタウリン (Hpt) 生合成機構に注目し、その詳細について解明することを試みた。Hptの酸化物でもあるタウリン (Tau) は、非常に多様な機能を持つ低分子化合物として知られている。近年では深海熱水噴出域周辺に生息する無脊椎動物において、Tauの類縁化合物であるチオタウリン (Tht) などの含硫アミノ酸を利用して硫化水素に富む環境に適応している可能性が報告されている。このThtはTauの前駆体でもあるHptから生合成されると考えられる。このため、この深海熱水域における硫化水素への適応機構の解明のためには、組織中に蓄積しているTauおよびTht両アミノ酸の前駆体であるHptがどのようにして組織中で生合成されるのかというHpt生合成機構について理解することが重要と考えられる。

しかしながら、HptおよびTau生合成機構に関しては、脊椎動物とくに哺乳類において研究が進められているが、とくに二枚貝類においてTauを多量に組織中に蓄積しており、浸透圧の変化への適応のために利用していることなどが報告されているにも関わらず、二枚貝類をはじめ海産無脊椎動物についての知見はほとんど存在していなかった。

以上のようなことから、深海熱水噴出域の代表種であるシチヨウシンカイヒバリガイ (*B. septemdiarum*) においてどのようにHpt生合成が行われているのか、また深海性二枚貝には哺乳類と同様の生合成機構が存在しているのか、さらにはその生合成機構がどのように深海熱水噴出域という過酷な環境への適応のために関わっているのかという点について検討することを目的として本研究を行った。

まず本章の第1節では、深海性二枚貝のシチヨウシンカイヒバリガイにおいてどのようにHpt生合成が行われているのかというHpt生合成様式について、得られた結果を概観するとともに考察を行う。また、第2節においては深海性二枚貝において本研究で明らかになったHpt生合成機構、および遊離アミノ酸としてのHptをどのように利用して環境適応を行っているかという、Hptおよびその生合成機構と環境適応との関係について考察を行う。さらに、この深海性二枚貝が有するHpt生合成機構の特性がどのように変遷してきた可能性が考えられるかというHpt生合成機構の進化について第3節で考察を行う。

第1節 深海性二枚貝のHpt生合成様式について

最初に、HptおよびTau生合成経路においてCSA経路に関わる酵素2種の遺伝子 (CDO、CSAD) が単離され、両遺伝子とも検討した6組織 (生殖腺、閉殻筋、足糸牽引筋、足、外套膜、鰓) の中では鰓において最も高い発現を示していることを明らかにした (第2章)。この結果から、少なくともCSA経路を介したHpt生合成が行われている可能性が示された。また外部

環境と最も接していると考えられる鰓において他の組織と比較して高い発現を示すことから、Hpt生合成が環境適応に関わっている可能性についても示唆された。

次いで、組織中におけるHpt、Thtをはじめ、L-CSAやL-シスタチオニンといったHptの生合成に関与すると考えられる化合物を安定的に分析できるHPLC分析系を確立した（第3章第1節）。これによりこれまで安定的に、また他のアミノ酸と同時といったように効率的に分析することができなかった遊離アミノ酸についても分析対象として検討することが可能となった。

この第3章第1節で確立したHPLCによる遊離アミノ酸分析法を用いて、Hpt生合成酵素活性の測定方法の検討、さらに確立した酵素活性の測定法によるシチヨウシンカイヒバリガイ各組織におけるHpt生合成能について検討を実施した。その結果、鰓および消化盲嚢でCSADおよびADOに相当する活性が存在していることが明らかとなった。さらにL-システイン酸に対する脱炭酸活性よりL-CSAに対する方がより高い値を示すという、これまでに浅海性二枚貝における先行研究で報告されていた結果とは真逆となる性質を示すことが明らかとなった（第4章）。

システアミンを基質とするADO活性においては、第2章の遺伝子探索およびクローニングではその塩基配列が得られていない一方で、該当する活性が鰓および消化盲嚢の両組織において、CSAD活性に次ぐ高さで検出された。このことから、その酵素をコードする遺伝子についても存在していることが示唆される。またその遺伝子配列についてはADO活性を保持しながらも、これまでに分かっているADO遺伝子の配列とは異なっている可能性も示唆される。

このHpt生合成酵素活性の測定においては、Thtも同時に生成してることが本研究により新たに分かった。このため、HptおよびTau生合成酵素活性の測定においてはThtを生成物として考慮する必要があるが、これまでのタウリン生合成酵素活性の測定法においてはThtが酵素反応の生成物として含まれていないため、分析対象となった各種生物の示すHptおよびTau生合成能が実際より過小に見積もられている可能性が考えられる。特にADO活性の測定では、補酵素として添加している Na_2S が、生成するHptと反応することでThtとなってしまう状況となっていることが考えられるため、このADO活性の測定ではThtの検出の有無はADOが関与するHpt生合成酵素活性を測定する上で非常に重要であると言える。本研究により確立できた酵素活性測定法およびHPLCによる遊離アミノ酸分析法により、二枚貝を含む各種生物におけるHptおよびTau生合成能に関するより正確な知見が得られることが期待される。

以上の遺伝子および酵素活性についての解析から、シチヨウシンカイヒバリガイにおけるHptおよびTau生合成系は、CSA、システイン酸、システアミン経路の3経路全てが存在しており、CSA経路が主要な経路であるとともに、同様にHptを経由するシステアミン経路がCSA経路に次ぐ活性の高さで存在していた。一方、CSADのL-システイン酸に対する脱炭酸活性は低いため、Hptを経由せず直接Tauへと至るシステイン酸経路の寄与は低い可能性が高い。CSAおよ

びシステアミン経路の両方ともHptを中間体として経る経路であり、それらがともに比較的高い活性の値を示し、なおかつHptを経ずにTauを合成するシステイン酸経路の活性が低いことより、シチヨウシンカイヒバリガイ個体としてTauではなくHpt生合成に重点をおいた生合成システムとなっていることが考えられる。

一方で、Tauの生合成について酵素活性の値としては低いものであったが、生合成経路としては存在しており機能していることが確かめられた。また、組織中における遊離アミノ酸量に注目した場合 Hpt より Tau の方が多く、酵素活性の結果がそのまま反映しているわけではない。このことから直接 Tau へと至る生合成は僅かであるが、Tau の生成もしくは Tau 自体が不必要というわけではなく、Hpt を経由させてもなお最終的には Tau が蓄積する機構となっているとも考えられる。このため、Tau の生合成機構の詳細や制御についても知見を集積させることが重要であり、特にシステイン酸経路において基質となるシステイン酸がどのように生成してきているのかという、さらに上流の代謝経路についても検討する必要があると考えられる。

第2節 Hpt およびその生合成機構と環境適応の関係について

本研究において、Hpt生合成酵素の遺伝子2種（CDO、CSAD）が比較分析の対象とした6組織の中では共に外部環境と最も接すると考えられる鰓において高い発現を示しており、また生合成経路の特性が二枚貝で初めてHptの生合成に特化したものであると確認されるなどの特徴から、外部環境と密接に関わる鰓において硫化水素への適応のためにHptを用いた環境適応が行なわれている可能性が示唆された。

そこで、第2章第1節の遺伝子探索およびクローニングにより得られたCDO、CSADの両遺伝子配列を元にリアルタイムPCR用プライマーおよびプローブを設計し、硫化物を添加した海水への曝露飼育したシチヨウシンカイヒバリガイ個体について、2遺伝子の発現量の変動について検討を行った。その結果、鰓におけるCDO、CSAD遺伝子の発現量に有意な変動は見られなかった。（第2章第2節）

また、リアルタイムPCRにより遺伝子発現量について解析した個体について、第3章第1節で確立したHPLCによる遊離アミノ酸分析法を用いて、組織中の遊離アミノ酸組成についても検討を行った。分析対象とした組織については鰓に加えて、外部環境との接触の機会が鰓に多いことが考えられる足と外套膜についても分析した。その結果、いずれの組織においてもHptおよびTht量に有意な変動は見られないことが明らかとなった。（第3章第2節）

これらの結果に関して、Hpt生合成酵素の遺伝子の発現量変動の解析について鰓を対象として実施したが、Hpt生合成に関わる2遺伝子（CDOとCSAD）ともに組織別の発現量解析の結果から、対象とした組織の中では鰓が最も高い発現量を示していることも本研究で明らかとなっ

ている。このことから、鰓においては二枚貝を構成する各組織の中では常に比較的高い発現が維持されており、外部環境の変化に対しても、それに合わせて細かく発現量の増減を調節するのではなく、常に一定の発現を示していることが示唆される。

同様に、曝露飼育実験個体に対する遊離アミノ酸分析の結果では、Hpt量の減少とTht量の増加などといった想定される変動は見られなかった。このことは、硫化水素への適応においてHpt量を環境に合わせてきめ細かく調節するのではなく、長期的な適応のために一定量を維持している可能性が示唆される。また、本研究において対象としているシチヨウシンカイヒバリガイと同様に硫黄酸化細菌を細胞内へ共生させている二枚貝においては、硫黄酸化細菌ではなくメタン酸化細菌を共生させている、つまり硫化物への曝露の度合いが低いと考えられる二枚貝や共生菌を持たない浅海性の二枚貝よりも、HptとTht量について絶対量および全遊離アミノ酸に対する比率ともに高い値を示すことが分かっている(Pruski et al., 1997, 2000)。このため、アミノ酸量においてもHpt生成関連遺伝子同様に、硫黄酸化細菌を共生させている二枚貝においては比較的高い値を維持することで、環境の変化を感知してから適応を開始するのではなく、環境の変化からの影響を受けて大きな変動が生じないようにしている可能性が示唆される。

すなわち、とくに鰓に蓄積しているHpt量、およびその生合成に関わる酵素の遺伝子の発現量の両方ともに比較的高い値が維持されており、本研究で検討した最長48時間後までは当初想定されたような外部環境の変化に対して鋭く反応することでその都度調節を行っているという訳ではなく、常に一定の値を維持することで多少の環境の変化にも影響を受けないようにしている可能性があることを本研究により明らかにできたと考えられる。ただし、本研究の曝露飼育実験で設定した最長48時間より長期にわたる環境の変化に対しては、遺伝子発現量や組織中の遊離アミノ酸量が変動する可能性が考えられる。また、遺伝子発現量および遊離アミノ酸量のいずれにおいても有意な変動が生じていない要因として、硫化物への曝露飼育実験で設定した硫化物添加量が少なく、二枚貝に対して変動を誘起させるほどの変化にはならなかったためという可能性も考えられる。しかしながら、本研究において設定した硫化物の添加量について、とくに10Lの飼育海水に対して10mgの硫化ナトリウムを添加した実験区においては、これまでの研究から実際の深海性二枚貝が生息する熱水噴出孔周辺環境での濃度と同等かそれを上回ると考えられるため、硫化物の添加量が十分ではなかったという可能性は低いと考えられる。遺伝子、およびアミノ酸量の結果から見ても、外部環境から全く影響を受けずコントロール区の結果と極めて同等の値を示していたために有意な変化が見られなかったというよりも、各個体が示す値のばらつきが大きいことが有意な変化が見られない要因であったといえる。深海性二枚貝の示す遊離アミノ酸量については、個体ごとの測定値のばらつきが大きいことについて言及している報告も存在している(Pruski et al., 1997)。このため、個体ごとにそれぞれ個別

に外部環境から影響を受けていることが考えられ、今後、個体ごとに示す値がそれぞれ異なっている要因について検討する必要があると考えられる。

ここまで各組織の解析結果から環境適応との関係について考察を試みたが、二枚貝個体全体として、すなわち各組織が連携することにより環境の変化に対して適応を行っている可能性も考えられる。特に閉殻筋においては、Hpt 生合成関連の遺伝子である CDO、CSAD、および Hpt などの輸送に関わる Tau 輸送体の遺伝子が発現してはいるものの鰓のように高い値を示してはいない(Inoue et al., 2008)。その一方で、遊離アミノ酸分析の結果では、最も高い遺伝子発現量を示す鰓に匹敵する Hpt 量を示すことが予備実験における分析から明らかになっている。また、閉殻筋には血リンパ液の蓄積する血洞部が存在しているとされており、実際に本研究においても血リンパ液の採取や基質アミノ酸溶液の投与の際に利用している。このことから、鰓組織を中心として高い Hpt 生合成を行いながら、同時に閉殻筋を Hpt の貯蔵組織として血リンパを介した組織間の蓄積量の調節が行なわれている可能性も考えられる。環境適応機構の解析のための組織としてこれまで閉殻筋は注目されていないため、今後、閉殻筋を分析対象の組織として含めて遊離アミノ酸量および組成の変動について解析を行うことで、深海性二枚貝における個体レベルでの環境適応機構について理解が進む可能性が考えられる。

第3節 Hpt 生合成機構の特性の変遷の可能性

第5章第2節ではHptおよびThtによる硫化水素の無毒化機構について注目して検討を行ってきた。硫化水素への適応機構に着目し、その詳細について理解することは、マングローブ域のような深海以外の硫化物に富む環境に適応する生物の理解にもつながる可能性があるという点で重要であると考えられる。一方で、Hptは浸透圧の変化への適応のために働くと考えられるTauの前駆体でもあることから、そこから得られる知見は深海に限らず浅海域などに生息する二枚貝類が生息環境の浸透圧の変化に対してどのようにTau関連化合物を利用しているかについて示唆を与える結果をもたらす可能性も考えられる。このようなことから本研究においては硫化物への曝露飼育実験の他に、浸透圧を変化させた海水への曝露飼育実験についても実施した。

高低浸透圧海水へ曝露した個体の遊離アミノ酸分析の結果、オスモライトと考えられるTauについて、低浸透圧環境においては細胞内の蓄積量を低下させる、また逆に高浸透圧環境に対しては細胞内の蓄積量を高めるといったこれまで報告されているような知見と一致するような変動は生じていないことが明らかとなった（第3章第3節）。このことからシチヨウシンカイヒバリガイにおいてはHptおよびTauは単純なオスモライトとしては機能していない可能性が示唆された。

その一方で、低浸透圧条件下において鰓組織ではHpt量が曝露48時間後に増加するという結果が見られた。低浸透圧環境へ適応する場合、一般的に組織中の低分子有機化合物量を低下させる必要がある。しかしながら、低浸透圧条件にもかかわらず組織中の蓄積量が有意に増加したことから、Hptはオスモライトとして直接的に細胞内浸透圧の調節に寄与するのではなく、別の役割を持つ可能性が示唆された。深海熱水噴出口から噴出する熱水は周辺の海水よりもやや低張であるため、硫化水素への適応のための刺激として低張という浸透圧の変化を利用して可能性が考えられる。しかしながら、深海性二枚貝の示す遊離アミノ酸量の値は個体間でのばらつきが大きいいため、より明確な結論を得るためには個体数を増やすなど、さらなる検討が必要と考えられる。

このようなことから、深海性二枚貝の生息環境における浸透圧の変化に対して、Hpt生合成関連遺伝子の発現量も、オスモライトと考えられる組織中Tau量についても変動がみられないことから、シチヨウシンカイヒバリガイにおいては遊離アミノ酸以外の低分子有機化合物が浸透圧の変化に関わっている可能性が考えられる。もともと海産二枚貝類は外部環境の浸透圧の変化への適応のためにTauやGly等を浸透圧調節物質として用いていたが、熱水噴出域への進出の過程で、CSADの基質特異性がL-システイン酸からL-CSAにより高いものになるなどの変化が生じることでTauのみならずHptも蓄積させやすくなり、環境中硫化物への適応が有利になったと考えられる。しかしながら、Hptに硫化水素の無毒化と細胞内浸透圧の調節という複数の機能を担わせた状態では、Hpt量を減少させる必要がある低浸透圧条件である一方でHptの蓄積が重要となる硫化水素が多い状況などといった、細胞内有機化合物量の調節に矛盾が生じてしまうような環境の変化が同時に存在するような状況に対して、どのような適応をするべきかという問題が生じる。そのためシチヨウシンカイヒバリガイは浸透圧への応答、特に細胞内浸透圧の調節の機能をHptやTauではなく他の低分子有機化合物に担わせることによって、Hptは硫化物への適応の機能に専念させるようになった可能性が考えられる。Hpt（またはTau）が浸透圧調節物質としての機能を担わなくなったことによって、急激な大きい変動をさせる必要がなくなり、多少の外部環境の変化に対しても影響を受けないような、継続的に比較的高い生合成機構を維持するという様式に変遷してきた可能性が考えられる。

すなわち、浸透圧の変化への適応の場合には細胞内の物質のモル数が重要と考えられ、量的な問題として解決しなければならない。一方で、同じくHpt（およびTht）のよる硫化物の無毒化という環境適応においては、Hptを予め細胞内に蓄積させておいた場合にこのHptを用いてThtに変化させることで適応を可能にすると考えられるが、この際には細胞内の低分子有機化合物の構成比率が変わるという主として質的な変化が生じることが考えられる。このような浸透圧

と硫化物に対する適応メカニズムの特徴の違いから、継続的に生合成を続ける様式へと変化した可能性が考えられる。

また、このような点に加えて浸透圧の変化への適応においては、細胞レベルと個体レベルの適応が存在しているとされている。細胞レベルでは環境の変化に対して細胞内有機化合物量を変化させることで適応を可能にする。一方で、個体レベルの適応においては、外部環境の変化を感じた場合に二枚貝殻を閉じるなどして、環境の変化自体を極力遮断して細胞レベルで大きな変化に対応する必要性を低下させるようにする適応であると考えられる。Hpt を用いた硫化物への適応機構がもともと浸透圧の変化に対応するための Tau 生合成機構から派生した可能性が示唆されることを考慮すると、硫化物への適応においても浸透圧への適応同様に細胞および個体レベルでの適応が存在している可能性が考えられる。このような理由から、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の変動解析や HPLC による遊離アミノ酸組成の分析において有意な変化が見られないという結果と関係している可能性も考えられる。付着性貝類の殻の動きなどの行動は外見からはわかりにくいため、殻の微妙な開閉や、呼吸量、心拍数などを計測する方法についても今後検討していく必要があると考えられる。

参考文献

- Alberic, P., and Boulegue, J. (1990). Unusual amino compounds in the tissues of *Calyptogena phaseoliformis* (Japan Trench): possible link to symbiosis. *Progress in Oceanography* 24, 89–101.
- Allen, J.A., and Garrett, M.R. (1972). Studies on taurine in the euryhaline bivalve *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 41, 307–317.
- Alyakrinskaya, I.O. (2003). Tissue hemoglobins in bivalvia (Mollusca). *Biology Bulletin* 30, 617–626.
- Apyari, V.V., Dmitrienko, S.G., Arkhipova, V.V., Atagulov, A.G., and Zolotov, Y.A. (2012). Determination of cysteamine using label-free gold nanoparticles. *Analytical Methods* 4, 3193–3199.
- ARP, A.J., CHILDRESS, J.J., and VETTER, R.D. (1987). The sulphide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *Journal of Experimental Biology* 128, 139–158.
- Babu, S.S., Shareef, M.M., Shetty, A.P.K., and Shetty, K.T. (2002). HPLC method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 17, 7–26.
- Bagley, P.J., Hirschberger, L.L., and Stipanuk, M.H. (1995). Evaluation and modification of an assay procedure for cysteine dioxygenase activity: high-performance liquid chromatography method for measurement of cysteine sulfinic acid and demonstration of physiological relevance of cysteine dioxygenase activity in cysteine catabolism. *Analytical Biochemistry* 227, 40–48.
- Battaglia, A., Bertoluzza, A., Calbucci, F., Eusebi, V., Giorgianni, P., Ricci, R., Tosi, R., and Tugnoli, V. (1999). High-performance liquid chromatographic analysis of physiological amino acids in human brain tumors by pre-column derivatization with phenylisothiocyanate. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 730, 81–93.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., and Tarvin, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 336, 93–104.
- Brait, M., Ling, S., Nagpal, J.K., Chang, X., Park, H.L., Lee, J., Okamura, J., Yamashita, K., Sidransky, D., and Kim, M.S. (2012). Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers.
- Bridges, R.J., Natale, N.R., and Patel, S.A. (2012). System xc-cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British Journal of Pharmacology* 165, 20–34.
- Callan, J.F., Mulrooney, R.C., Kamila, S., and McCaughan, B. (2008). Anion sensing with luminescent

- quantum dots—a modular approach based on the photoinduced electron transfer (PET) mechanism. *Journal of Fluorescence* 18, 527–532.
- Chao-Yuh, Y., and Sepulveda, F.I. (1985). Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by high-performance liquid chromatography on spherisorb octadecylsilane columns. *Journal of Chromatography A* 346, 413–416.
- Childress, J.J., Arp, A.J., and Fisher Jr, C.R. (1984). Metabolic and blood characteristics of the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*. *Marine Biology* 83, 109–124.
- Childress, J.J., Fisher, C.R., Favuzzi, J.A., Arp, A.J., and Oros, D.R. (1993). The role of a zinc-based, serum-borne sulphide-binding component in the uptake and transport of dissolved sulphide by the chemoautotrophic symbiont-containing clam *Calyptogena elongata*. *Journal of Experimental Biology* 179, 131–158.
- Cohen, S.A., and Strydom, D.J. (1988). Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Analytical Biochemistry* 174, 1–16.
- Conrad, M., and Sato, H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x c⁻: cystine supplier and beyond. *Amino Acids* 42, 231–246.
- Desbruyères, D., Hashimoto, J., and Fabri, M.-C. (2006). Composition and biogeography of hydrothermal vent communities in western pacific back-arc basins. In *Back-Arc Spreading Systems: Geological, Biological, Chemical, and Physical Interactions*, D.M. Christie, C.R. Fisher, S.-M. Lee, and S. Givens, eds. (American Geophysical Union), pp. 215–234.
- Doeller, J.E., Kraus, D.W., Colacino, J.M., and Wittenberg, J.B. (1988). Gill hemoglobin may deliver sulfide to bacterial symbionts of *Solemya velum* (Bivalvia, Mollusca). *Biol Bull* 175, 388–396.
- Dominy, J., Eller, S., and Jr, R.D. (2004). Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis. *Neurochem Res* 29, 97–103.
- Ebert, R.F. (1986). Amino acid analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives. *Analytical Biochemistry* 154, 431–435.
- Ercal, N., Yang, P., and Aykin, N. (2001). Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753, 287–292.
- Ewetz, L., and Sörbo, B. (1966). Characteristics of the cysteinesulfinic acid-forming enzyme system in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation* 128, 296–305.
- Felbeck, H., Childress, J.J., and Somero, G.N. (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats.

- Goto, T., Tiba, K., Sakurada, Y., and Takagi, S. (2001a). Determination of hepatic cysteinesulfinatase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Fisheries Science* 67, 553–555.
- Goto, T., Matsumoto, T., and Takagi, S. (2001b). Distribution of the hepatic cysteamine dioxygenase activities in fish. *Fisheries Science* 67, 1187–1189.
- Goto, T., Matsumoto, T., Murakami, S., Takagi, S., and Hasumi, F. (2003). Conversion of cysteate into taurine in liver of fish. *Fisheries Science* 69, 216–218.
- Gunawan, S., Walton, N.Y., and Treiman, D.M. (1990). High-performance liquid chromatographic determination of selected amino acids in rat brain by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Journal of Chromatography A* 503, 177–187.
- Heinelt, U., Schultheis, D., Jäger, S., Lindenmaier, M., Pollex, A., and Beckmann, H.S. (2004). A convenient method for the synthesis of 2-amino substituted aza-heterocycles from N, N'-disubstituted thioureas using TsCl/NaOH. *Tetrahedron* 60, 9883–9888.
- Heinrikson, R.L., and Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* 136, 65–74.
- Honjoh, K., Matsuura, K., Machida, T., Nishi, K., Nakao, M., Yano, T., Miyamoto, T., and Iio, M. (2010). Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from *Cyprinus carpio*, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinatase decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Amino Acids* 38, 1173–1183.
- Ichinose, S., Nakamura, M., Maeda, M., Ikeda, R., Wada, M., Nakazato, M., Ohba, Y., Takamura, N., Maeda, T., Aoyagi, K., et al. (2009). A validated HPLC-fluorescence method with a semi-micro column for routine determination of homocysteine, cysteine and cysteamine, and the relation between the thiol derivatives in normal human plasma. *Biomedical Chromatography* 23, 935–939.
- Ida, S., and Kuriyama, K. (1983). Simultaneous determination of cysteine sulfinic acid and cysteic acid in rat brain by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 130, 95–101.
- Inoue, K., Tsukuda, K., Koito, T., Miyazaki, Y., Hosoi, M., Kado, R., Miyazaki, N., and Toyohara, H. (2008). Possible role of a taurine transporter in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdiemum* in adaptation to hydrothermal vents. *FEBS Letters* 582, 1542–1546.
- Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2009). A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Immunology* 46, 1768–1774.

- Jacobsen, D.W. (1998). Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* *44*, 1833–1843.
- Jeremiah, S., McCann, K.P., Williams, A.C., Ramsden, D.B., Pilz, A.J., Fox, M.F., and Povey, S. (1996). Chromosomal localisation of genes coding for human and mouse liver cytosolic cysteine dioxygenase. *Annals of Human Genetics* *60*, 29–33.
- Joseph, C.A., and Maroney, M.J. (2007). Cysteine dioxygenase: structure and mechanism. *Chemical Communications* 3338–3349.
- Joyner, J.L., Peyer, S.M., and Lee, R.W. (2003). Possible roles of sulfur-containing amino acids in a chemoautotrophic bacterium-mollusc symbiosis. *Biol Bull* *205*, 331–338.
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., and Oefner, P.J. (2009). Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *393*, 445–452.
- Kataoka, H., Imamura, Y., Tanaka, H., and Makita, M. (1993). Determination of cysteamine and cystamine by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* *11*, 963–969.
- Kataoka, H., Tanaka, H., and Makita, M. (1994). Determination of total cysteamine in urine and plasma samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* *657*, 9–13.
- Kelly, M.J., Perrett, D., and Rudge, S.R. (1987). The determination of cysteamine in physiological fluids by HPLC with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* *2*, 216–220.
- Kobayashi, S., Sato, M., Kasakoshi, T., Tsutsui, T., Sugimoto, M., Osaki, M., Okada, F., Igarashi, K., Hiratake, J., Homma, T., et al. (2015). Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate transporter :implications for immune function. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 8778–8788.
- Kuriyama, K., and Tanaka, Y. (1986). Cysteinesulfinic acid and cysteic acid: high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* *143*, 164–166.
- Kuśmierk, K., and Bald, E. (2008). Measurement of reduced and total mercaptamine in urine using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography* *22*, 441–445.
- Kuśmierk, K., Głowacki, R., and Bald, E. (2005). Determination of total cysteamine in human plasma in the form of its 2-S-quinolinium derivative by high performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *382*, 231–233.
- Kuśmierk, K., Chwatko, G., Głowacki, R., and Bald, E. (2009). Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* *877*, 3300–3308.
- Lee, K.S., and Drescher, D.G. (1979). Derivatization of cysteine and cystine for fluorescence amino acid

- analysis with the o-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol reagent. *Journal of Biological Chemistry* *254*, 6248–6251.
- Lindroth, P., and Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* *51*, 1667–1674.
- Lo, M., Wang, Y.-Z., and Gout, P.W. (2008). The x c- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *Journal of Cellular Physiology* *215*, 593–602.
- Lochman, P., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., and Škopková, Z. (2003). High-throughput capillary electrophoretic method for determination of total aminothiols in plasma and urine. *Electrophoresis* *24*, 1200–1207.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 宗森信, and 佐藤寿邦 (2004). データのとり方とまとめ方: 分析化学のための統計学とケモメトリックス (共立出版).
- Misra, C.H., and Olney, J.W. (1975). Cysteine oxidase in brain. *Brain Research* *97*, 117–126.
- Nakamura, H., Yatsuki, J., and Ubuka, T. (2006). Production of hypotaurine, taurine and sulfate in rats and mice injected with L-cysteinesulfinate. *Amino Acids* *31*, 27–33.
- Nelson, D.C., Hagen, K.D., and Edwards, D.B. (1995). The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Marine Biology* *121*, 487–495.
- Newton, G.L., Dorian, R., and Fahey, R.C. (1981). Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* *114*, 383–387.
- Ogony, J., Mare, S., Wu, W., and Ercal, N. (2006). High performance liquid chromatography analysis of 2-mercaptoethylamine (cysteamine) in biological samples by derivatization with N-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) using fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* *843*, 57–62.
- Pastore, A., Massoud, R., Motti, C., Russo, A.L., Fucci, G., Cortese, C., and Federici, G. (1998). Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopyrionylglycine in plasma and urine. *Clinical Chemistry* *44*, 825–832.
- Powell, M.A., and Somero, G.N. (1986). Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *Biol Bull* *171*, 274–290.
- Pranal, V., Fiala-Medioni, A., and Colomines, J.C. (1995). Amino acid and related compound composition in two symbiotic mytilid species from hydrothermal vents. *Oceanographic Literature Review* *10*, 883.
- Pruski, A.M., and Fiala-Médioni, A. (2003a). Stimulatory effect of sulphide on thiotaurine synthesis in

- three hydrothermal-vent species from the East Pacific Rise. *Journal of Experimental Biology* *206*, 2923–2930.
- Pruski, A.M., and Fiala-Médioni, A. (2003b). Stimulatory effect of sulphide on thiotaurine synthesis in three hydrothermal-vent species from the East Pacific Rise. *Journal of Experimental Biology* *206*, 2923–2930.
- Pruski, A.M., Fiala-Médioni, A., and Colomines, J.-C. (1997). High amounts of sulphur-amino acids in three symbiotic mytilid bivalves from deep benthic communities. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences-Series III-Sciences de La Vie* *320*, 791–796.
- Pruski, A.M., Médioni, A.F., Prodon, R., and Colomines, J.C. (2000a). Thiotaurine is a biomarker of sulfide-based symbiosis in deep-sea bivalves. *Limnology and Oceanography* *45*, 1860–1867.
- Pruski, A.M., Fiala-Médioni, A., Fisher, C.R., and Colomines, J.C. (2000b). Composition of free amino acids and related compounds in invertebrates with symbiotic bacteria at hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Marine Biology* *136*, 411–420.
- Pruski, A.M., Wit, R.D., and Fiala-Médioni, A. (2001). Carrier of reduced sulfur is a possible role for thiotaurine in symbiotic species from hydrothermal vents with thiotrophic symbionts. *Hydrobiologia* *461*, 15–23.
- Rosenberg, N.K., Lee, R.W., and Yancey, P.H. (2006). High contents of hypotaurine and thiotaurine in hydrothermal-vent gastropods without thiotrophic endosymbionts. *J. Exp. Zool.* *305A*, 655–662.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 11455–11458.
- Sato, K., Tsukamasa, Y., Imai, C., Ohtsuki, K., Shimizu, Y., and Kawabata, M. (1992). Improved method for identification and determination of epsilon-(gamma-glutamyl) lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *40*, 806–810.
- Schaffer, S., Azuma, J., Takahashi, K., and Mozaffari, M. (2003). Why is taurine cytoprotective? In *Taurine* *5*, (Springer), pp. 307–321.
- Simmons, C.R., Hirschberger, L.L., Machi, M.S., and Stipanuk, M.H. (2006). Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant rat cysteine dioxygenase, a non-heme metalloenzyme necessary for regulation of cellular cysteine levels. *Protein Expression and Purification* *47*, 74–81.
- Smith, B.R., Miller, G.C., Mead, R.W., and Taylor, R.E. (1987). Biosynthesis of asparagine and taurine

- in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De man). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* *87*, 827–831.
- Smith, L., Kruszyna, H., and Smith, R.P. (1977). The effect of methemoglobin on the inhibition of cytochrome c oxidase by cyanide, sulfide or azide. *Biochemical Pharmacology* *26*, 2247–2250.
- Stachowicz, M., Lehmann, B., Tibi, A., Prognon, P., Daurat, V., and Pradeau, D. (1998). Determination of total cysteamine in human serum by a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* *17*, 767–773.
- Stipanuk, M.H., and Ueki, I. (2011). Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *Journal of Inherited Metabolic Disease* *34*, 17–32.
- Stipanuk, M.H., Simmons, C.R., Karplus, P.A., and Dominy Jr, J.E. (2011). Thiol dioxygenases: unique families of cupin proteins. *Amino Acids* *41*, 91–102.
- Sumizu, K. (1962). Oxidation of hypotaurine in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* *63*, 210–212.
- Takeuchi, K., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (2000). A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na⁺-and Cl⁻-dependent high affinity taurine transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* *1464*, 219–230.
- Tappaz, M.L. (2004a). Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochemical Research* *29*, 83–96.
- Tappaz, M.L. (2004b). Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochemical Research* *29*, 83–96.
- Tappaz, M., Almarghini, K., Legay, F., and Remy, A. (1992). Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochemical Research* *17*, 849–859.
- Torrans, E.L., and Clemens, H.P. (1982). Physiological and biochemical effects of acute exposure of fish to hydrogen sulfide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* *71*, 183–190.
- Turnell, D.C., and Cooper, J.D. (1982). Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clinical Chemistry* *28*, 527–531.
- Ubuka, T., Okada, A., and Nakamura, H. (2008). Production of hypotaurine from L-cysteinesulfinate by rat liver mitochondria. *Amino Acids* *35*, 53–58.
- Van Dover, C. (2000). *The ecology of deep-sea hydrothermal vents* (Princeton University Press).
- Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., and Vrijenhoek, R.C. (2002). Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science* *295*, 1253–1257.
- Venta, R. (2001). Year-long validation study and reference values for urinary amino acids using a

- reversed-phase HPLC method. *Clinical Chemistry* 47, 575–583.
- Vetter, R.D., Wells, M.E., Kurtsman, A.L., and Somero, G.N. (1987). Sulfide detoxification by the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron* and other decapod crustaceans. *Physiological Zoology* 60, 121–137.
- Vitvitsky, V., Garg, S.K., and Banerjee, R. (2011). Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 32002–32010.
- Walker, V., and Mills, G.A. (1995). Quantitative methods for amino acid analysis in biological fluids. *Annals of Clinical Biochemistry* 32, 28–57.
- Wang, X., He, G., Mai, K., Xu, W., and Zhou, H. (2015). Ontogenetic taurine biosynthesis ability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 185, 10–15.
- Xia, J., Sinelnikov, I.V., Han, B., and Wishart, D.S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research* gkv380.
- Yancey, P.H. (2004). Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Science Progress* 87, 1–24.
- Yancey, P.H., Ishikawa, J., Meyer, B., Girguis, P.R., and Lee, R.W. (2009). Thiotaurine and hypotaurine contents in hydrothermal-vent polychaetes without thiotrophic endosymbionts: correlation with sulfide exposure. *J. Exp. Zool.* 311A, 439–447.
- Yin, M., Palmer, H.R., Fyfe-Johnson, A.L., Bedford, J.J., Smith, R.A., and Yancey, P.H. (2000). Hypotaurine, N-methyltaurine, taurine, and glycine betaine as dominant osmolytes of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold seeps. *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 629–637.
- 小島茂明, 渡部裕美, and 藤倉克則 (2009). 化学合成生物群集の進化生態に基づく熱水活動史の推定. *地学雑誌* 118, 1174–1185.
- 後藤孝信, 望月明彦, and 蓮實文彦 (2002). Distribution and activities of enzymes involved in taurine biosynthesis in the liver of fish. *水産増殖* 50, 443–449.
- 堺博成, 瀬田敦, 宮内晋, and 笠井孝正 (2003). 二枚貝におけるタウリン生合成経路. *日本水産学会北海道支部大会講演要旨集* 2003.
- 田邊信三 (2008). 生体内含硫無機化合物の定量法並びにイオウ転移酵素の測定法の開発と, 結合型イオウの生理学的機能評価. *薬学雑誌*. 乙号 128, 881–900.
- 玉井恭一 (1994). シズクガイの硫化水素耐性. *日本ベントス学会誌* 1994, 41–48.
- 藤倉克則 (2004). 潜水調査船が暴いた深海生物の生態. *Sessile Organisms* 21, 85–90.
- 藤倉克則, 丸山正, and 奥谷喬司 (2008). 潜水調査船が観た深海生物—深海生物研究の現在

(Hadano-shi: 東海大学出版会).

藤原義弘 (2003). 化学合成共生システムの大深度への適応. 地學雜誌 112, 302–308.

堀内司, 高野淑識, 小林憲正, 石橋純一郎, and 浦辺徹郎 (2003). 深海熱水噴出孔から採取された熱水試料のアミノ酸分布の特徴. *Viva Origino* 31, 37.

村瀬佳代, 海老沢優子, 宮地竜郎, 笠井孝正, and 境博成 (2005). ホタテガイ中腸腺システインスルフィン酸脱炭酸酵素の精製とその諸性質. 日本水産学会北海道支部大会講演要旨集 2005.

森本晋一郎 (2009). シチヨウシンカイヒバリガイの遊離アミノ酸分析. 卒業論文, 京都大学.

山口賢次 (1989). 含硫アミノ酸とくにシステインの代謝と栄養. 日本栄養・食糧学会誌 42, 207–215.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始適切な御助言をくださり、本論文の作成に関して御指導いただきました東京大学大気海洋研究所海洋生命科学部門分子海洋生物学分野の井上広滋教授に心から感謝申し上げます。

東京大学農学生命科学研究科水圏生物科学専攻水産化学研究室の潮秀樹教授には本論文の審査をしていただいた上にアミノ酸分析装置の使用方法に関する数多くの貴重なご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所海洋生態系動態部門底生生物分野の小島茂明教授には本論文の審査をしていただくと同時に深海生物の研究に対する貴重なご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所海洋生命科学部門生理学分野の兵藤晋准教授ならびに東京大学大気海洋研究所海洋生態系動態部門微生物分野の濱崎恒二准教授には本論文の審査をしていただきご助言も多く賜りましたことを深く感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所海洋生命科学部門分子海洋生物学分野の馬淵浩司助教には研究に対しての貴重なご助言を数多く賜りましたことを厚く感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋生物機能化学研究室の豊原治彦准教授には研究航海での船上で実験に関するご指導をいただいたほか、アミノ酸分析に関するご助言を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所海洋生命科学部門分子海洋生物学分野の日下部郁美博士にはmRNAのリアルタイムPCRによる測定法についてのご指導を賜りましたこと、ならびに研究に対する数々の貴重なご助言を賜りましたことを厚く感謝申し上げます。

日本大学生物資源科学部海洋資源科学科海洋環境学研究室の小糸智子助教には、研究航海をはじめ様々な場面で研究に対する数多くのご助言をいただきましたことに感謝いたします。

本研究は、研究航海によるシチヨウシンカイヒバリガイの採集および飼育が可能であったからこそ成し遂げることができました。そのような機会を与えていただいた研究船なつしま航海NT10-08、NT11-09、NT13-05、NT14-06の首席研究者ならびに乗船研究者の皆様に深く感謝いたします。

また、本研究は本当に多くの方々のご助言とご協力のおかげで進めて参ることができました。ここに深く感謝いたします。

最後に、いついかなる時でも味方となり自分の進む道に理解を示してくれると同時に、常に応援してくれた祖父、祖母、父、母そして兄の家族全員に心から感謝いたします。