

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：頭足類におけるタウリン生合成経路の解明	
研究代表者：地域創生学部地域創生学科（健康科学コース）准教授 松本拓也	連絡先：takuya62@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
<p>【研究概要】</p> <p>頭足類は、墨や筋肉のエキス成分として、非タンパク質性の遊離アミノ酸であるタウリンを豊富に含んでいるが、体内で生合成できるのかどうかは不明である。本研究では、ヤリイカとケンサキイカの肝臓のタウリン生合成酵素活性を調べた。ヤリイカ肝臓では、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ（CSD）活性とシステイン酸デカルボキシラーゼ（CAD）活性が同程度認められたが、システアミンジオキシゲナーゼ（CAO）活性はほとんどなかった。ケンサキイカ肝臓では、CSD活性に次いでCAD活性が認められたが、CAO活性は低かった。</p>	

【研究内容・成果】

1. 目的

タウリンは、非タンパク質性のアミノ酸で、抱合胆汁塩の解毒作用、抗酸化作用および神経伝達物質様作用など、その生理機能は多岐にわたる。成人は、生体内である程度タウリンを生合成できるが、乳幼児はタウリンの生合成能が発達しておらず、食事からのタウリン摂取が必要である (Sturman, 1988)。ラットやマウスはタウリン生合成活性を有するが、ネコは、その活性が認められず、タウリン不含の餌で飼育されると網膜に重篤な障害が生じて失明する (Hayesら, 1975)。脊椎動物におけるタウリンの生合成経路は、図1に示すように、①システインから生じたシステインスルフィン酸がシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSD) によってヒポタウリンに変換され、ヒポタウリンが非酵素的にタウリンを生じる経路、②活性硫酸と脱水セリンから生じたシステイン酸がシステイン酸デカルボキシラーゼ (CAD) によってタウリンに変換される経路、③4-ホスホパンテテインから生じたシステアミンがシステアミンジオキシゲナーゼ (CAO) によりヒポタウリンに変換され、ヒポタウリンが非酵素的にタウリンを生じる経路の3つが存在する。

研究代表者らは、これまでに魚類のタウリン生合成酵素活性を調べ、ブルーギル、ニジマス、マダイおよびアユでは3つの経路のいずれかに高い活性が認められたが、ブリ、ヒラメおよびコイでは、肝臓中酵素活性が総じて低いことを明らかにした (Gotoら, 2001a; 2001b; 2003)。一方、頭足類は、タコ墨やイカ墨 (山中ら, 1998) および筋肉のエキス成分 (飯田ら, 1992) としてタウリンを豊富に含有することから体内での生合成経路の存在が予想されるが、タウリン生合成酵素活性の分布は不明である。そこで、本研究では、頭足類におけるタウリン生合成酵素活性を調べた。

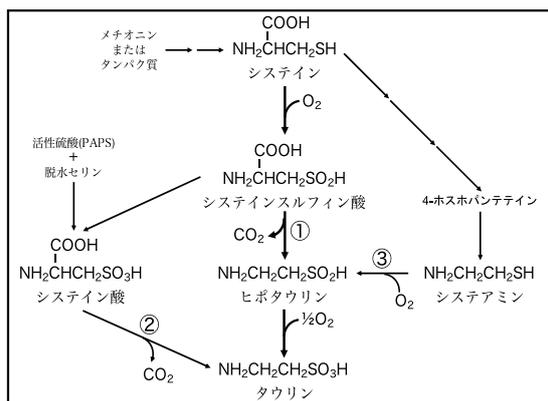


図1 脊椎動物におけるタウリンの生合成経路と関連酵素  
 ①システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSD)  
 ②システイン酸デカルボキシラーゼ (CAD)  
 ③システアミンジオキシゲナーゼ (CAO)

2. 方法

2-1 試料および粗酵素液の調製

北海道産ヤリイカ *Heterololigo bleekeri* および佐賀県産ケンサキイカ *Uroteuthis edulis* は活魚で購入した。各個体は、体重測定後、内臓を取り出し、肝臓を採取した。摘出した肝臓は、重量測定後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。冷凍保存した肝臓 1g を計りとり、重量に対して 5 倍量の 0.25M スクロース-10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) を加え、ガラス製ポッター型ホモジナイザーにて、2,000rpm で 2 分間ホモジナイズした。この肝臓ホモジネートを、4°C 以下、3,000rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を分画分子量 12,000 の透析チューブに密封し、4°C 以下に冷却した 1 L の 10mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で 5 時間透析した。透析外液は 1 時間毎に交換した。透析終了後、粗酵素液を 1.5mL チューブに 1mL ずつ分注し、-80°C で保存した。粗酵素液のタンパク

## 【研究区分：先端的研究】

質濃度は、ウシ血漿アルブミンを検量線に用いた Lowry 法で測定した。

### 2-2 システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ(CSD)活性の酵素反応

酵素反応は、Gotoら(2001a)に従った。即ち、1.5mL チューブに、補酵素としてピリドキサール-5'-リン酸 100 $\mu$ L (0.2 $\mu$ mol)、補因子として 2-メルカプトエタノール 100 $\mu$ L (4.0 $\mu$ mol)、0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.2) 500 $\mu$ L (100 $\mu$ mol)を加え、タンパク質にして 1mg 相当の粗酵素液を加え、全量が 900 $\mu$ L になるように蒸留水を加えて、35°C で 5 分間プレインキュベートした。これに、基質としてシステインスルフィン酸溶液 100 $\mu$ L (1.0 $\mu$ mol)を加え、35°C で 60 分間インキュベートした。100°C の温浴に 3 分間浸して酵素反応を停止させた。これに内部標準物質として  $\beta$ -アラニン 100 $\mu$ L (0.2 $\mu$ mol)を加え、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間の遠心分離後、得られた上清を回収し、アミノ酸分析用試料とした。

### 2-3 システイン酸デカルボキシラーゼ(CAD)活性の酵素反応

酵素反応は Goto and Matsumotoら(2003)に従った。即ち、1.5mL チューブに、補酵素としてピリドキサール-5'-リン酸 100 $\mu$ L (0.2 $\mu$ mol)、補因子として 2-メルカプトエタノール 100 $\mu$ L (4.0 $\mu$ mol)、0.2M リン酸緩衝液 (pH7.2) 500 $\mu$ L (100 $\mu$ mol)を加え、タンパク質にして 1mg 相当の粗酵素液を加え、全量が 900 $\mu$ L になるように蒸留水を加えて、35°C で 5 分間プレインキュベートした。これに、システイン酸 100 $\mu$ L (1.0 $\mu$ mol)を加え、以降は 2-2 と同様に操作した。

### 2-4 システアミンジオキシゲナーゼ(CAO)活性の酵素反応

酵素反応は Goto and Matsumotoら(2001b)に従った。即ち、1.5mL チューブに、硫化ナトリウム溶液 100 $\mu$ L (2.0 $\mu$ mol)、0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.2) 500 $\mu$ L (100 $\mu$ mol)を加え、タンパク質にして 1mg 相当の粗酵素液を加え、全量が 900 $\mu$ L になるように蒸留水を加えて、35°C で 5 分間プレインキュベートした。これに、基質としてシステアミン 100 $\mu$ L (1.0 $\mu$ mol)を加え、以降は 2-2 と同様に操作した。

### 2-5 プレラベル OPA アミノ酸蛍光誘導体化 HPLC 分析によるタウリンの定量

アミノ酸分析用試料 20 $\mu$ L に OPA 蛍光誘導体化試薬 30 $\mu$ L を加えて混合し、直ちに室温にて 1,000rpm で遠心分離し、このうち 5~20 $\mu$ L を試薬添加後 60 秒で HPLC に注入した。HPLC システムは、カラムには Wakopak Wakosil 5C18 (内径 4.6 $\times$ 長さ 150mm, 粒子径 5 $\mu$ m, 和光純薬)を用い、カラムオープンで 20°C を維持した。移動相には 10mM リン酸二水素ナトリウム溶液:メタノール:テトラヒドロフラン (60:38:2, v/v)を用い、HPLC ポンプ (PU-4580 型, 日本分光)にて流速 1mL/min で送液した。酵素反応で生じたタウリンとヒポタウリンおよび内部標準物質  $\beta$ -アラニンの OPA 蛍光誘導体は、励起波長 340nm, 蛍光波長 455nm にて、蛍光検出器 (FP-4025 型, 日本分光)で検出した。検出シグナルは PC ソフトウェア (ChromNAV Lite, 日本分光)で解析した。

## 3. 結果および考察

### 3-1 ケンサキイカ肝臓のタウリン生合成酵素活性

ケンサキイカ肝臓のタウリン生合成酵素活性は、CSD 活性 ( $0.57 \pm 0.05$  nmol/min/mg, n=3) が 3 つの酵素活性が最も高かった。CAD 活性 ( $0.32 \pm 0.04$  nmol/min/mg, n=3)は、CSD 活性に次いで高かった。CAO 活性 ( $0.16 \pm 0.06$  nmol/min/mg, n=3)は、3 つの経路の中で最も低くかった。ケンサキイカの肝臓では、すべての代謝経路でタウリンまたはヒポタウリンを生合成できることがわかった。

### 3-2 ヤリイカ肝臓のタウリン生合成酵素活性

ヤリイカ肝臓におけるタウリン生合成酵素活性は、CSD 活性 ( $1.49 \pm 0.25$  nmol/min/mg, n=3) が 3 つの酵素活性で最も最も高かった。CAD 活性 ( $0.79 \pm 0.11$  nmol/min/mg, n=3)は、CSD 活性に次いで高かった。一方、CAO 活性 (ND)は全く認められなかった。ヤリイカ肝臓では、システインスルフィン酸からヒポタウリンが生じる CSD 経路とシステイン酸から直接タウリンを生じる CAD 経路でタウリンを生合成していることがわかった。

## 4.参考文献

- 1) Sturman J.A.: Taurine in development. *J. Nutr.*, 118(10), 1169-1176 (1988).
- 2) Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science*, 188(4191), 949-951 (1975).
- 3) Goto T., Tiba K., Sakurada Y., Takagi S.: Determination of hepatic cysteinesulfinate decarboxylase activity in fish by means of OPA prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Fish. Sci.* 67, 553-555 (2001a).
- 4) Goto T., Matsumoto T., Takagi S.: Distribution of the hepatic cysteamine dioxygenase activities in fish. *Fish. Sci.* 67, 1187-1189 (2001b).
- 5) Goto T., Matsumoto T., Murakami S., Takagi S., Hasumi F.: Conversion of cysteate into taurine in liver of fish. *Fish. Sci.* 69, 216-218 (2003).
- 6) 山中英明, 河島泰子, 潮秀樹, 大島敏明.: イカ墨, タコ墨のエキス成分ならびに抗菌性に関する研究. *日本調理科学会誌* 31(3), 206-213 (1998).
- 7) 飯田遙, 中村弘二, 徳永 俊夫.: 外洋性頭足類筋肉エキスの含窒素化合物組成. *日本水産学会誌* 58 (12), 2383-2390 (1992).