

^{35}S によるアサクサノリ *Porphyra tenera* 及び アオサ *Ulva pertusa* の硫黄の吸収に関する研究

佐藤 孜郎・伊藤 啓二・松本文夫
(広島大学水畜産学部水産学科)

Studies on the Sulfur Uptake by *Porphyra tenera* and *Ulva pertusa*, using ^{35}S .

SHIRŌ SATŌ, KEIJI ITŌ and FUMIO MATSUMOTO

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama, Japan.

(Text-figs. 1-2, Tables 1-2)

緒 言

藻類の体成分中には種類による差異はあるが、かなりの量の硫黄の存在が知られ、特に粘質物構成糖中に存在するエステル型の硫黄については、その量も多く、寒天質、フノリ質の重要組成成分でもあるため研究も比較的よく進められている。^{1)~13)} また硫黄が、アサクサノリのように蛋白質を多量に含むものでは勿論、その他の藻類においても蛋白質構成アミノ酸内に存在することが考えられるが、^{16) 22)} 最近 LINDBERG,¹⁴⁾ WICKBERG,¹⁵⁾ 高木ら¹⁷⁾、栗山^{18) 19)} 伊藤²⁰⁾ らは紅藻、緑藻のある種のものには多量の taurine, cysteic acid, cysteinolic acid 及び rhodoic acid などが存在することを報告している。なお長谷ら^{24) 25) 26)} はクロレラで硫黄が細胞分裂に不可欠な役割を有すると指摘しており、またその同化機構についても中間代謝産物として APS, PAPS, S-containing peptide nucleotide などの存在が確認されている。^{27) 28) 29) 30)} しかし一般藻類では硫黄の生理的な役割についての研究は余り見当たらない。

^{35}S を用いるこの種の研究として、敦賀³¹⁾ はアサクサノリにおいて $^{35}\text{SO}_4$ を用い、硫黄の同化率が藻体の生理活力と相関関係にあることを見だし、 ^{35}S の同化率を活力測定の指標として工場廃液の影響を調べている。また齊藤ら³²⁾ はアサクサノリ、アオサその他の海藻について核分裂生成物の藻体内への転移を究明し、これと ^{35}S の転移を比較考察して、核分裂生成物の転移は、細胞内成分との物理化学的吸着であるのに対し、 ^{35}S の転移は明らかに生理的な吸収であることを報告している。

筆者らはアサクサノリその他の藻類における硫黄の吸収機構を明らかにしたいと考え、まず培養海水中に $^{35}\text{SO}_4$ を加えてアサクサノリ及びアオサを培養し、その吸収後の藻体内における分布状態を調べた。即ち熱水可溶及び不溶部分、また熱水可溶部分については更に80%アルコール可溶及び不溶部分に分割し、各 fraction における Total-S の含量及び ^{35}S -activity を測定した。またアルコール可溶部分については、イオン交換樹脂による分割をも試みた。それらの結果について報告する。

実験材料及び方法

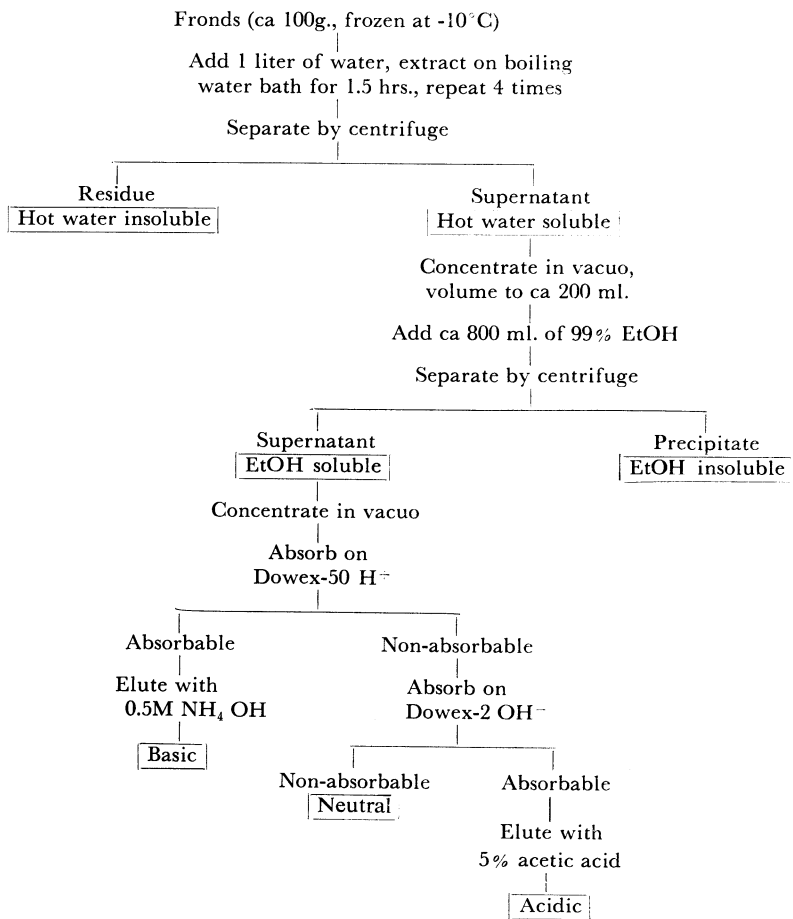
アサクサノリは福山市田尻町地先において養殖しているもの、アオサは同市箕島町地先の岩に着生しているものを用いた。いずれも体長 5~10cm 程度のものを採集し、大量の3%食塩水でよく洗滌して

約 2 ~ 3 cm に切り培養に供した。

培養は脱脂綿濾過海水に PROVASOLI 微量金属混液³³⁾ 5cc/l, NaNO₃ 0.1g/l, Na₂HPO₄·12H₂O 20mg/l 及び H₂³⁵SO₄ 0.2mc/l を添加した培養海水 10 l もしくは 2 l を, 15 l 容ガラス試薬瓶もしくは 2 l 容三角フラスコに入れ, これに前記の藻体を 10g/l 程度に浮遊させて行った。攪拌は 2 ~ 3 % 炭酸ガス混合空気を吹込んで行い, 照明は白色蛍光灯を用い 6,000 lx の照度とし, 培養温度は培養室温度を, アサカサノリでは 14 ~ 15 °C, アオサでは 18 ~ 20 °C の範囲に保つよう調節した。実験は培養時間の相異及び 48 時間後の吸収状態の比較の二種類行ったが, 所定時間培養後取り上げた藻体は -10 °C で凍結保存した。

藻体の抽出操作は Text-fig. 1 に示す方法によった。

Text-fig. 1. Separating procedure of fronds

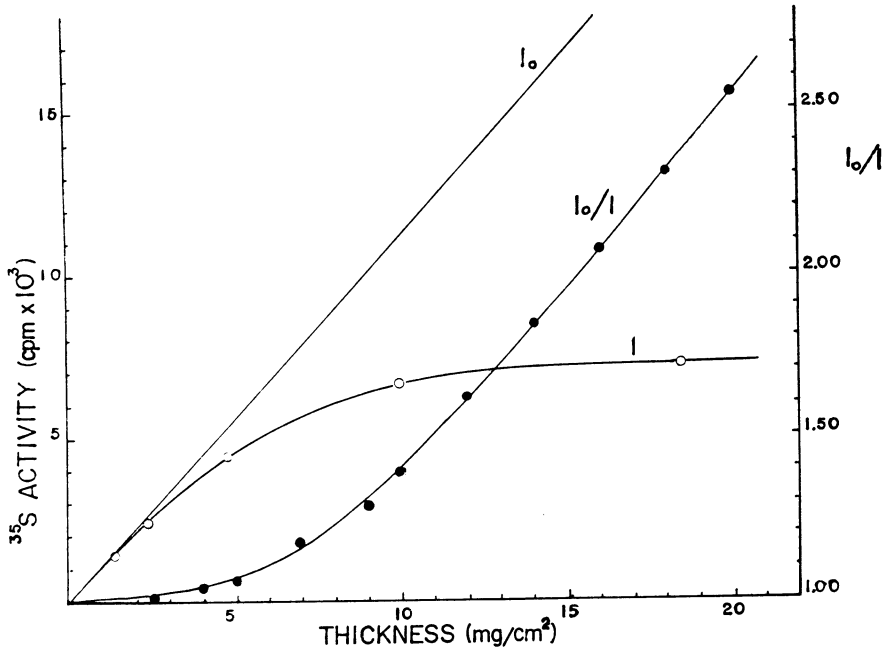


即ち凍結した藻体に, その約100倍量(乾物換算重量に対し)の水を加え, 沸騰湯煎中で1.5時間抽出し, 濾別後残渣を同様に3回処理した。各抽出液は合して約 1/20 になるまで減圧濃縮し, それに 99 % ethanol をアルコール濃度80%になるように加えて, 生じた沈澱を濾別し (ethanol insoluble), 濾液を減圧濃縮した (ethanol soluble)。

Ethanol soluble fraction を更にイオン交換樹脂で分割する場合には, 陽イオン交換樹脂としてDowex-50 X-8 H⁺ カラム (1.5×20cm) を用い, 吸着部を 0.5M NH₄OH にて溶出し (basic fraction), 非吸着部は更に陰イオン交換樹脂 Dowex-2 X-8 OH⁻ カラム (1.5×20cm) に吸着させ非吸着部 (neutral

fraction) と分け、吸着部は 5% 酢酸にて溶出した (acidic fraction).

上述のように分割した各 fraction についてそれぞれ Total-S 及び ^{35}S -activity を測定した。即ち Total-S は PIRIE の方法³⁴⁾にしたがって湿式酸化後 BaSO_4 として重量法で、 ^{35}S -activity は東芝 R6D100 G-M counter により測定した。なお ^{35}S -activity は Text-fig. 2 の自己吸収曲線から試料の自己吸収に対する補正係数を求め補正を行った。



Text-fig. 2. Self-absorption of ^{35}S -activities in BaSO_4

I_0 : values without self-absorption

I : values observed

結果及び考察

(1) アオサにおける ^{35}S 吸収の時間的变化

2 l 三角フラスコを用い、1, 6, 12, 24 及び 48 時間の培養を行った場合の藻体内各 fraction における Total-S 含量及び ^{35}S -activity は Table 1 に示す通りである。

Table 1. Changes in the Total-S contents and ^{35}S -activities
1) Whole fronds

Duration	Total-S*	^{35}S -activity*	$^{35}\text{S}/\text{S}^{**}$
hrs.	mg.	cpm.	
0	38.3	0	0
1	38.0	1,920	50.5
6	38.7	4,210	109.5
12	39.2	5,820	148.5
24	38.9	7,930	204.0
48	38.5	9,450	246.0

2) Hot water insoluble and soluble

Duration	Hot water insoluble			Hot water soluble		
	Total-S*	³⁵ S-activity*	³⁵ S/S**	Total-S*	³⁵ S-activity*	³⁵ S/S**
hrs.	mg.	cpm.		mg.	cpm.	
0	10.4	0	0	28.8	0	0
1	9.6	380	39.6	27.0	1,380	51.3
6	9.0	775	86.3	28.0	3,850	137.5
12	10.5	986	94.0	29.7	4,960	166.5
24	10.0	1,180	118.0	28.3	5,450	192.5
48	11.0	1,290	117.2	28.5	5,930	208.0

3) Ethanol insoluble and soluble

Duration	Ethanol insoluble			Ethanol soluble		
	Total-S*	³⁵ S-activity*	³⁵ S/S**	Total-S*	³⁵ S-activity*	³⁵ S/S**
hrs.	mg.	cpm.		mg.	cpm.	
0	22.2	0	0	6.1	0	0
1	22.0	1,060	48.3	6.0	139	23.2
6	22.5	1,350	60.0	6.3	326	51.8
12	21.4	2,950	138.0	6.1	262	43.0
24	21.6	4,250	197.0	6.8	474	69.7
48	23.1	4,660	202.0	6.3	1,010	160.7

* Values in per g., dry wt. of fronds

** Specific activity in cpm/mg-S

Total-S の時間経過による変化は、いずれの fraction においても、³⁵S-activity の変化ほど大きくはない。

全藻体における ³⁵S-activity は培養1時間後にはかなり強くなり、時間の経過と共にその増加の割合は減じ、48時間でほぼ平衡に達している。

全藻体を熱水抽出した場合には、熱水可溶部分に同様の傾向がみられ、また ³⁵S-activity の大半はこの fraction に移行する。熱水不溶部においては ³⁵S-activity は低く、培養期間を通じて増加は緩慢である。

次に熱水可溶部分を80%アルコールで抽出したものでは、³⁵S-activity の大半はアルコール不溶部に移行し熱水可溶部分と似た増加傾向がみられる。これに対しアルコール可溶部では ³⁵S-activity は低く、その増加は培養24時間後にもなお緩慢であるが48時間後にはかなり大きくなる。

アルコール不溶部は粘質物を主体とする fraction で、この硫黄は大部分がエステル型硫酸となっているものと考えられるが、この部分に比較的短時間に吸収が行われることは興味深い。

アルコール可溶部には含硫物質として methionine, cystine などの含硫アミノ酸、taurine, cysteic acid 或は cysteinolic acid などのアミノスルホン酸などの存在が考えられる。しかし従来からアオサその他一般海藻類には遊離の methionine, cystine は極めて微量か殆ど存在しないものと報告されており、¹⁶⁾²¹⁾²³⁾一方 taurine などのアミノスルホン酸はかなりの量含有するとされている²⁰⁾が、これの概要については次の実験でふれる。

なお specific activity の値を比較すると熱水可溶部の方が不溶部の方よりつねに大きく、熱水可溶部の中でも違いがあり80%アルコール不溶部の方が大きくでていることは今後の検討を要する問題である。またその違いの割合は培養長時間のものに限らず1時間後のものも似ているので、更に短時間の吸収状態を追究してみないと、どの部分に早く吸収されるものか確言はできない。

(2) アサクサノリ及びアオサにおける48時間後の³⁵Sの動向

アサクサノリ及びアオサについて、それぞれ15 l 容ガラス試薬瓶を用い、48時間の培養を行い、その Total-S 及び ³⁵S-activity を測定した結果は Table 2 の通りである。

Table 2. Total-S contents and ³⁵S-activities1) *Porphyra tenera*

Fractions	Yield g.	Total-S		³⁵ S-activity		³⁵ S/S**
		mg.*	%	cpm.*	%	
Whole fronds	6.98	15.4	100	18,900	100	975
Hot water insoluble	3.32	5.3	27.4	4,030	21.4	760
Hot water soluble	3.61	14.4	74.3	13,900	73.6	965
EtOH insoluble	2.94	11.5	59.3	12,300	65.1	1,070
EtOH soluble	0.61	1.8	9.3	664	3.6	370
Basic	—	trace	—	trace	—	—
Acidic	—	1.0	—	262	—	262
Neutral	—	0.2	—	0	—	0

2) *Ulva pertusa*

Fractions	Yield g.	Total-S		³⁵ S-activity		³⁵ S/S**
		mg.*	%	cpm.*	%	
Whole fronds	15.0	35.8	100	18,700	100	523
Hot water insoluble	7.87	6.2	17.3	2,760	14.8	445
Hot water soluble	7.00	30.9	86.3	15,000	80.3	486
EtOH insoluble	4.86	20.4	57.0	8,960	47.9	439
EtOH soluble	2.23	9.5	26.5	3,650	19.5	364
Basic	—	1.8	—	346	—	192
Acidic	—	1.6	—	510	—	319
Neutral	—	1.7	—	785	—	462

* Values in per g., dry wt. of fronds

** Specific activity in cpm/mg-S

これによれば全藻体 Total-S のうち、アサクサノリでは約74%、アオサでは約86%が熱水可溶部に存在し、更にその大部分がアルコール不溶部分に含まれていることを示している。即ちアサクサノリ、アオサいずれの場合も全藻体の60%程度がアルコール不溶部分に存在している。しかしアルコール可溶部ではその量は多くはないがアサクサノリとアオサの間に明らかに差異があり、アオサの方が Total-S 及び ³⁵S-activity とともに大きい。

この部分を更にイオン交換樹脂により分割してみると、硫黄の存在は basic でも neutral でも、アサクサノリでは trace もしくは0であるが、アオサではかなりな量の存在が認められる。acidic ではアサクサノリの方がやや少いが明らかに存在し ³⁵S-activity も測定される。

次にこれら各部分の ³⁵S-activity の所在物質の概要を知るためにペーパークロマトグラフィーによる検定を行い次のような結果を得た。

即ちアサクサノリの acidic fraction にはフェノールで展開すると、ニンヒドリンにより R_f 0.62, 0.43, 0.37の三ヶ所の spot が検出された。これらは taurine 或はそれに類似のアミノスルホン酸であろうと思われる。アオサでは R_f 0.43の spot が1ヶ検出されたが上記アサクサノリの場合のものと同じ

物質であろう。

アオサの basic fraction をフェノール及びブタノール・酢酸・水 (4:2:1) で2次元展開をするとアミノ酸が多数検出されたが、含硫アミノ酸としては、methionine と推定される spot が僅かに検出されたのみで cystine は認められなかった。しかしこの fraction には ^{35}S -activity がかなり検出されるのでアミノ酸以外の含硫物質の存在が考えられる。neutral fraction では糖と思われる spot が1ヶ検出されたが詳細は明らかにできなかった。これら 2 fraction の含硫物質については今後なお究明するつもりである。

なお ^{35}S -activity の所在確認のため、上記のペーパークロマトグラムによるラジオオートグラフィーを試みたが、いずれの fraction においても activity が低く成功しなかった。

要 約

アオサを $^{35}\text{SO}_4$ 添加海水で培養し熱水可溶、不溶、80%アルコール可溶、不溶の各成分への硫黄の移行を時間的に追究した。またアサクサノリ及びアオサを同様に48時間培養し、同じく各成分への硫黄の移行を調べ、更にアルコール可溶部分については、イオン交換樹脂を用い acidic, basic 及び neutral の 3 fraction に分割し、各 fraction における硫黄の動向について考察した。

① アオサでは硫黄の大部分は熱水可溶部及びその80%アルコール不溶部にかなり短時間に入り24時間乃至48時間後にはほぼ平衡に達する。

② 80%アルコール可溶の部分ではやや異なり、培養開始後24時間までは比較的緩慢であるが、その後はかなり大きく増加する。

③ アサクサノリ、アオサいずれも80%アルコール不溶の部分に多く吸収され、80%アルコール可溶の部分ではアサクサノリの方がアオサに比して少い。

④ この fraction には taurine, cysteic acid, cysteinolic acid などのようなアミノスルホン酸の存在が認められ、それらへの移行が考えられるが確認は出来なかった。

引 用 文 献

- 1) 荒木長次. 1937. 寒天の化学的研究, (第2報) 石花菜寒天質. 日化, 58, 1214~1234.
- 2) 柳川鉄之助. 1934. 緑藻類海藻の研究, (第1報) 一般成分並に硫酸の結合. 大工試, 15, 1~11.
- 3) 柳川鉄之助. 1941. 紅藻類粘液質の結合硫酸. 日水誌, 10, 163~165.
- 4) 森高次郎, 土屋靖彦. 1938. 紅藻の粘質物に関する研究, (第2報) ツノマタ粘質物の化学的性質について. 日農化, 14, 616~625.
- 5) 三輪知雄. 1937. 褐藻類細胞膜質としての多糖体硫酸エステル. 植物学雑誌, 51, 549~554.
- 6) 三宅捷, 林金雄. 1939. 海藻の多糖類の研究, (第6報) アオノリの水溶性多糖類. 熱農会誌, 11, 269~274.
- 7) 中村武彦. 1955. キリンサイ粘質物に関する研究, I. 処理による一般成分の変化. 日水誌, 20, 501~505.
- 8) 中村武彦. 1957. キリンサイ粘質物に関する研究, III. 粘質物の純粹分離. 日水誌, 22, 1053~1056.
- 9) 三田喜代. 1957. フノリの粘質物の研究, I. フノリの無機成分について. 日水誌, 22, 558~560.

- 10) 三田喜代. 1961. 緑藻類の生化学的研究, III. アオノリ, アオサおよびその粘質物の無機成分について. 日水誌, 27, 239~242.
- 11) MAESHIGE, S. 1962. Chemical studies on the green alga, *Monostroma nitidum*, I. Component of the mucilage. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 28, 326-334.
- 12) MAESHIGE, S. 1962. Chemical studies on the green alga, *Monostroma nitidum*, II. Low molecular carbohydrates in the alga. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 28, 606-609.
- 13) HASSID, W. Z. 1935. The structure of sodium sulfuric acid ester of galactan from *Irideae laminarioides*. J. Am. Chem. Soc., 57, 2046-2050.
- 14) LINDBERG, B. 1955. Methylated taurine sulfate in red algae. Acta Chem. Scand., 9, 1323-1334.
- 15) WICKBERG, B. 1957. Isolation of 2-L-amino-3-hydroxy-1-propanesulfonic acid from *Polysiphonia fastigiata*. Acta Chem. Scand., 11, 506-511.
- 16) TAKAGI, M. 1956. Chemical studies on marine algae. X. Free and combined amino acids in marine algae. Bull. Fac. Fish., Hokkaidō Univ., 7, 119-129.
- 17) TAKAGI, M. & KURIYAMA, M. 1959. Chemical studies on marine algae. XII. The free amino acids in several species of marine algae. Bull. Fac. Fish., Hokkaidō Univ., 10, 72-76.
- 18) KURIYAMA, M. 1961. Ninhydrin reactive substances in marine algae. II. On the non-absorbable fraction on strong cation ion-exchange resin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 27, 689-693.
- 19) KURIYAMA, M. 1961. Ninhydrin reactive substances in marine algae. III. On the chemical structure of "unknown A" isolated from red algae. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 27, 699-702.
- 20) ITO, K. 1963. Distribution of D-cysteinolic acid in marine algae. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 29, 771-775.
- 21) OGINO, C. 1955. Biochemical studies on the nitrogen compounds of algae. J. Tokyo Univ. Fish., 41, 108-152.
- 22) FUJIWARA, T. 1956. Chromoproteins in Japanese nori (*Porphyra tenera*). II. Amino acid compositions of phycoerythrin and phycocyanin. J. Biochem., 43, 195-203.
- 23) 土屋靖彦, 佐々木功. 1957. 浅草海苔の風味について, III. 浅草海苔の遊離アミノ酸の含量. 日水誌, 23, 230~233.
- 24) HASE, E., MORIMURA, Y., MIHARA, S. & TAMIYA, H. 1958. The role of sulfur in the cell division of *Chlorella*. Arch. Mikrobiol., 32, 87-95.
- 25) HASE, E., OTSUKA, H., MIHARA, S. & TAMIYA, H. 1959. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture. Biochim. Biophys. Acta, 35, 180-189.
- 26) HASE, E., MIHARA, S. & TAMIYA, H. 1960. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, with special reference to sulfur compounds appearing during the process of cell division. I. Plant & Cell Physiol., 1, 131-142.
- 27) LIPMANN, F. 1958. Biological sulfate activation and transfer. Science, 128, 575-580.
- 28) SCHIFF, J. A. 1959. Studies on sulfate utilization by *Chlorella pyrenoidosa*, using sulfur-³⁵S. The occurrence of S-adenosyl methionine. Plant Physiol., 34, 73-80.
- 29) SCHIFF, J. A. 1962. Physiology and Biochemistry of algae. pp. 239-246. Academ. Press, New York.
- 30) WEDDING, R. T. & BLACK, M. K. 1960. Uptake and metabolism of sulfate by *Chlorella*. I. Sulfate accumulation and active sulfate. Plant Physiol., 35, 72-80.
- 31) 敦賀花人. 1963. ノリの硫酸吸収におよぼす産業廃水の影響. 日水誌, 29, 307~312.
- 32) 齊藤 要, 鮫島宗雄, 田中 剛. 1958. ³⁵S の海藻への転移に関する研究, I. 鹿大水産紀要, 6, 153~158.
- 33) PROVASOLI, L., McLAUGHLIN, J. J. A. & DROOP, M. R. 1958. The development of artificial media for marine algae. Arch. für Mikrobiol., 25, 392-428.
- 34) PIRIE, N. W. 1932. Studies in the sulfur metabolism of the dog. XI. The metabolism of methionine and related sulphides. Biochem. J., 26, 2041-2045.

SUMMARY

The time-course of sulfur uptake and transferring to the fronds of *Ulva pertusa* was investigated, by means of culturing for 1, 6, 12, 24 and 48 hours in the media added $^{35}\text{SO}_4$. Distribution of sulfur and ^{35}S -activity in the fronds were looked over from the fractions separated under the procedure of Text-fig. 1.

And also the sulfur uptake of *Porphyra tenera* and of *Ulva pertusa* were compared, after the culturing for 48 hours with $^{35}\text{SO}_4$.

The results are as follows.

(1) ^{35}S was taken rapidly into each fraction from the outset by *Ulva pertusa* and poised after 48 hours (see Table 1).

(2) However, in the 80% ethanol soluble fraction, ^{35}S -activity increased slowly at the beginning of culture, but after 24 hours, became faster.

(3) Making a comparison between *Porphyra tenera* and *Ulva pertusa*, a good deal of ^{35}S was taken up into the 80% ethanol insoluble fractions of both, on the contrary, less activity was found in the 80% ethanol soluble fraction of *Porphyra tenera* than *Ulva pertusa* (see Table 2).

(4) In the latter fractions, there were found sulfonyl amino compounds such as taurine, cysteinolic acid or cysteic acid in either *Porphyra tenera* or *Ulva pertusa*. It is probable that ^{35}S -activity exists in these compounds.