

令和元年5月27日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07152

研究課題名(和文) アミノ酸要求性大腸菌株を用いたアミノ酸ラセマーゼの新規スクリーニング法の構築

研究課題名(英文) Construction of the new method for amino acid racemase screening using amino acid auxotrophic E. coli

研究代表者

宇田 幸司 (uda, kouji)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・講師

研究者番号：10448392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多くの動物にD-アミノ酸が存在し、様々な生理機能を持つことが明らかとなってきた。また、生体内のD-アミノ酸はアミノ酸ラセマーゼという酵素によって合成されると考えられている。本研究では、アミノ酸要求性大腸菌を用いた新規アミノ酸ラセマーゼ遺伝子のスクリーニングと、各種塩基配列データベースからのアミノ酸ラセマーゼ相同遺伝子の探索を行った。次いで、発見されたアミノ酸ラセマーゼ遺伝子について、リコンビナント酵素を用いた酵素活性の確認を行った。これらの研究により、動物界において、セリンラセマーゼ及びアスパラギン酸ラセマーゼが広範囲に分布することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、哺乳類において、D-アミノ酸が様々な生理機能をもつことが明らかとなってきたが、それ以外の動物における生理機能は殆ど明らかになっていない。本研究では、動物界の主要な動物門全てにおいて、セリンラセマーゼ及びアスパラギン酸ラセマーゼが存在することを示した。このことは、動物界においてD-セリンやD-アスパラギン酸が広く合成され、動物において重要かつ普遍的な生理機能を持つことを示唆した。今後はD-アミノ酸の普遍的な生理機能に関する研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that D-amino acids were found in many animals and have various physiological functions. Additionally, D-amino acids are known to be synthesized by the amino acid racemase. In this study, we isolated the amino acid racemases by novel screening method using the amino acid auxotrophic E. coli. Furthermore, we searched homologues of amino acid racemase from GenBank DNA sequence databases. Subsequently, the enzyme activity of these amino acid racemase genes was confirmed using a recombinant enzymes. This study revealed that serine racemase and aspartate racemase are widely distributed in the animal kingdom.

研究分野：比較生化学

キーワード：D-アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸には、L体とD体の二種類の鏡像異性体が存在しているが、生体内にはL-アミノ酸のみ存在し、D-アミノ酸は非生体型のアミノ酸であると長い間考えられてきた。しかし、1990年代以降の光学分割技術の発達により、様々な動物の生体内に遊離のD-アミノ酸が存在することが明らかになり、その存在と、生理機能について多くの研究が行われるようになった(表1)。また、生体内の幾つかのD-アミノ酸は対応するL-アミノ酸からアミノ酸ラセマーゼによって生合成されていることも報告されてきた(図1)。しかし、D-アミノ酸が動物界において広く分布するにもかかわらず、D-アミノ酸の合成酵素であるアミノ酸ラセマーゼは非常に限られた動物からしか報告されていなかった。

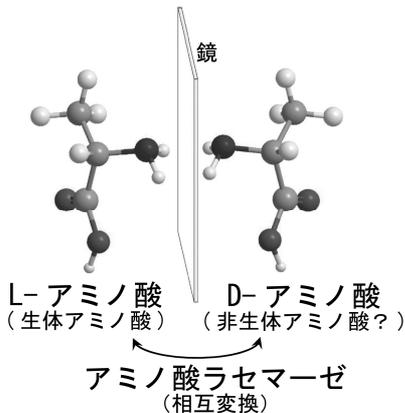


図1 アミノ酸の光学異性体とアミノ酸ラセマーゼ

表1 動物に存在するD-アミノ酸とその機能

動物門	生物種	D-アミノ酸	生理機能
脊索動物	マウス, ヒト	D-Ser	神経伝達
		D-Asp	内分泌活動の調整
		D-Asp	不明
棘皮動物	ホヤ, カエル	D-Ala他	胚発生に関与
軟体動物	アメフラシ	D-Asp	神経伝達
	マガキ	D-Ala他	浸透圧調整
節足動物	カイコ	D-Ser	蛹化に関与
	エビ	D-Ala他	浸透圧調整
線形動物	線虫	D-Ser	変態に関与
緩歩動物	オニクマムシ	不明	不明
扁形動物	プラナリア	D-Trp他	有性化因子
環形動物	ゴカイ	不明	不明
	ケヤリ	D-Arg	ATPの貯蔵源
刺胞動物	サンゴ	D-Asp他	不明

2. 研究の目的

限られた種でのみ報告されていたアミノ酸ラセマーゼの動物界全体における分布を確認することを本研究の目的とした。まず、様々な動物から既知のアミノ酸ラセマーゼの相同遺伝子を単離し、そのリコンビナント酵素を作製して、その酵素機能を明らかにすることにした。また、既知のアミノ酸ラセマーゼと相同性を示さない新規アミノ酸ラセマーゼについては、アミノ酸要求性の大腸菌を用いたアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の新規スクリーニング手法を開発し、その単離を試みた。また、幾つかのアミノ酸ラセマーゼは共通の祖先遺伝子から進化したと考えられており、それらが進化の過程でどのようにして基質特異性を変化させたかを明らかにすることも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種塩基配列データベースからのアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索

GenBankにおいて公開されている動物のゲノム配列や Transcriptome Shotgun Assembly Sequence (TSA) から既知のアミノ酸ラセマーゼの相同遺伝子の探索を行った。また、GenBankに登録されている RNA-Seq データを独自にアセンブリし、そのアセンブリデータからも相同遺伝子の探索を行った。

(2) アミノ酸要求性大腸菌を用いたアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索

(1)の方法でアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が特定できなかった動物種については、アミノ酸要求

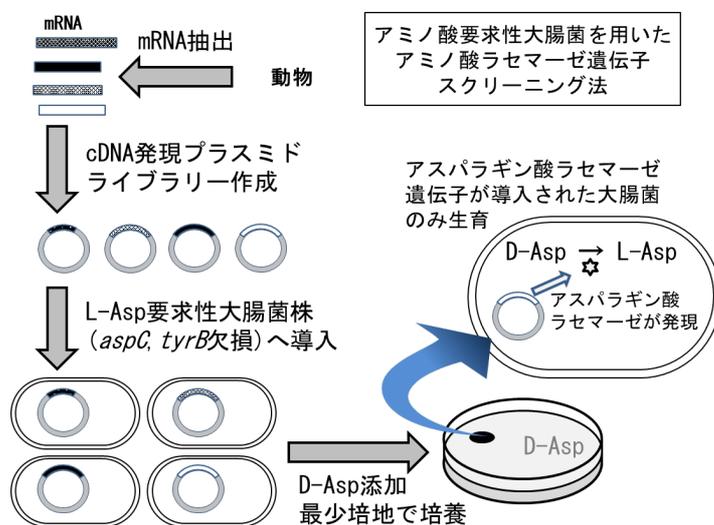


図2

性大腸菌を用いたスクリーニング法によって、新規アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索を行った。この方法は図2のように、まず対象とする動物から抽出した mRNA から、大腸菌でタンパク質発現が可能な cDNA プラスミドライブラリーを作成する。次いで、L-アスパラギン酸要求性大腸菌株へこのプラスミドライブラリーを導入する。この大腸菌を D-アスパラギン酸を含む最少培地で培養すると、D-アスパラギン酸を L-アスパラギン酸に変えることができるアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子が組み込まれたプラスミドが導入された大

腸菌のみがコロニーを形成する。これによりアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の単離が可能になる。図2ではアスパラギン酸要求性大腸菌を用いて、アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の単離を行っているが、その他のアミノ酸要求性大腸菌を用いることで、その他のアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の単離が可能となる。

### (3) アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の酵素機能の確認

(1)及び(2)の方法で特定されたアミノ酸ラセマーゼ遺伝子について、生体からの遺伝子の単離、または、鋳型を必要としない人工遺伝子合成によって、その完全長 cDNA 配列をクローニングした。さらにアミノ酸ラセマーゼ遺伝子を pET30b ベクターにサブクローニングし、His タグ融合タンパク質としてリコンビナント酵素発現系を構築した。得られたリコンビナント酵素について、各種アミノ酸に対するラセマーゼ活性及びデヒドラターゼ活性を確認し、その酵素活性の確認を行った。

### (4) アミノ酸ラセマーゼ基質認識機構の解明

(3)で単離されたアミノ酸ラセマーゼ遺伝子のうち、幾つかについて、その立体構造予測を行い、予想される基質認識部位周辺のアミノ酸残基に対するアミノ酸置換変異体を作製した。アミノ酸置換変異体酵素と野生型酵素の酵素機能違いを詳細に検討し、アミノ酸ラセマーゼにおける基質認識部位の特定を進めた。また、進化の過程で、どのようにしてアミノ酸ラセマーゼの基質特異性の変化が起こったかについても検討した。

## 4. 研究成果

本研究の取組によって、動物界の主要な 10 の動物門（海綿動物、刺胞動物、軟体動物、環形動物、緩歩動物、線形動物、扁形動物、半索動物、棘皮動物、脊椎動物）の生物から多数のアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が単離された。リコンビナント酵素の活性から、それらの遺伝子はセリンラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼまたはアスパラギンラセマーゼとして機能することが確認された。特にセリンラセマーゼとアスパラギン酸ラセマーゼは動物界に広く分布することが明らかとなった。また、殆どのアスパラギン酸ラセマーゼはセリンラセマーゼの数十倍から数百倍の触媒効率を示すことや、全てのセリンラセマーゼがセリンデヒドラターゼ活性を持つことといった酵素学的な知見も得られた。

アミノ酸ラセマーゼの基質認識部位に関する研究においては、セリンラセマーゼの 150-152 位のアミノ酸残基（アミノ酸残基番号は分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）のセリンラセマーゼに従っている）が基質認識に関与することを明らかにした。この 150-152 位のアミノ酸残基が置換することで、セリンラセマーゼが容易にアスパラギン酸ラセマーゼへと酵素機能を変化させることを、アミノ酸置換変異体酵素を用いた実験によって証明した。そして、動物に進化の過程において、セリンラセマーゼ遺伝子からアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子への進化が複数回、独立して起こったことを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Uda K, Ishizuka N, Edashige Y, Kikuchi A, Radkov AD, Moe LA  
Cloning and characterization of a novel aspartate/glutamate racemase from the acorn worm *Saccoglossus kowalevskii*.  
Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology 232  
87-92 2019 年 3 月 [査読有り]  
DOI: 10.1016/j.cbpb.2019.03.006

Uda K, Abe K, Dehara Y, Mizobata K, Edashige Y, Nishimura R, Radkov AD, Moe LA  
Triple serine loop region regulates the aspartate racemase activity of the serine/aspartate racemase family.  
Amino acids 49(10) 1743-1754 2017 年 10 月 [査読有り]  
DOI: 10.1007/s00726-017-2472-8

Katane M, Saitoh Y, Uchiyama K, Nakayama K, Saitoh Y, Miyamoto T, Sekine M, Uda K, Homma H  
Characterization of a homologue of mammalian serine racemase from *Caenorhabditis elegans*: the enzyme is not critical for the metabolism of serine in vivo.  
Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 21(9) 966-977 2016 年 9 月 [査読有り]  
DOI: 10.1111/gtc.12398

宇田 幸司  
セリン/アスパラギン酸ラセマーゼの構造と機能の進化  
比較生理生化学 = Comparative physiology and biochemistry 33(2) 68-76 2016 年 [査

読有り]

DOI: 10.3330/hikakuseiriseika.33.68

Radkov AD., McNeill K, Uda K, Moe LA.  
D-Amino Acid Catabolism Is Common Among Soil-Dwelling Bacteria  
MICROBES AND ENVIRONMENTS 31(2) 165-168 2016年6月 [査読有り]  
DOI: 10.1264/jsme2.ME15126

Uda K, Abe K, Dehara Y, Mizobata K, Sogawa N, Akagi Y, Saigan M, Radkov AD, Moe LA  
Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates.  
Amino acids 48(2) 387-402 2016年2月 [査読有り]  
DOI: 10.1007/s00726-015-2092-0

〔学会発表〕(計 8 件)

西村理恵, 宇田幸司, 細菌に存在する新規アルギニンラセマーゼ, 第14回D-アミノ酸学会学術講演会, 2018年

枝重裕美香, 中嶋幹太, 早稲田なな, 宇田幸司, 次世代シーケンサーデータを用いた環形動物アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の単離と機能解析, 第14回D-アミノ酸学会学術講演会, 2018年

Kouji Uda, Yumika Edashige, Naoki Ishizuka, Toshie Sadakata, Substrate specificities of the serine/aspartate racemases. The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research, 2017年

Rie Nishimura, Atanas D. Radkov, Luke A. Moe, Kouji Uda, Molecular cloning and characterization of eukaryotic serine racemase homologs in bacteria. The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research, 2017年

Yumika Edashige, Rie Nishimura, Yuuna Shikano, Toru Matsui, Kouji Uda, Characterization of the serine/aspartate racemases in plants. The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research, 2017年

宇田幸司, 枝重裕美香, ナス科植物に存在するアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索, 日本農芸化学会中四国支部大会, 2016年09月

宇田幸司, 枝重裕美香, 鹿野祐奈, 西村理恵, 松井透, 植物におけるセリン/アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の分布と進化, 第12回D-アミノ酸学会学術講演会, 2016年09月

宇田幸司, 動物におけるセリン/アスパラギン酸ラセマーゼの構造と機能の進化, 第12回D-アミノ酸学会学術講演会, 2016年09月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。