

令和元年5月17日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15320

研究課題名(和文) スルメイカ神経系の新規アスパラギン酸ラセマーゼに関する生化学的研究

研究課題名(英文) Biochemical studies of novel aspartate racemase from

研究代表者

小山 寛喜 (Koyama, Hiroki)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：20746515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： スルメイカ視神経節におけるD,L-アスパラギン酸(Asp)含量を測定した結果、組織1gあたりのL-Asp含量は1.83 $\mu$ mol、D-Asp含量は1.57 $\mu$ molであり、全Aspの46.2%がD体であった。次に、視神経節から抽出した粗酵素液を用いて、L-AspからD-Asp方向へのアスパラギン酸ラセマーゼ(AspRase)活性を測定した結果、28nmol/mg $\cdot$ hであり、活性は低いことが明らかとなった。

さらに、発現クローニングによるAspRase遺伝子単離のため、cDNAライブラリーを作製したが、充分量のクローン数を得ることができず、今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系に存在するD-アスパラギン酸(D-Asp)は神経伝達物質としての働きが示唆されているが、生合成経路を含めその詳細については不明な点が多い。本研究ではスルメイカ視神経節において発現するD-Aspの生合成酵素であるアスパラギン酸ラセマーゼ(AspRase)遺伝子の単離を試みた。単離には成功しなかったが、視神経節由来の粗酵素液からはAspRase活性が検出されるなどの観点から、神経系のD-Asp機能解明にはスルメイカが試料として適していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)： The concentrations of L and D-aspartate (Asp) in optic ganglion of Japanese common squid were 1.83 $\mu$ mol/g tissue and 1.57 $\mu$ mol/g tissue, respectively. It indicated that the 46.2% of total Asp was D-form.

We also examined the aspartate racemase (AspRase) activity from L-Asp to D-Asp by using the crude enzyme extracted from optic ganglion. It was found that the AspRase activity was 28nmol/mg $\cdot$ h. This activity was weaker than that of ark shell AspRase.

In order to isolate the AspRase gene by expression cloning, we tried to construct cDNA library. However, we could not obtain the enough amount of clone number for expression cloning. Therefore, the construction of cDNA library for expression cloning is future work.

研究分野：水産化学

キーワード：D-アスパラギン酸 アスパラギン酸ラセマーゼ スルメイカ 視神経節

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸は、グリシンを除いて互いに決して重なり合わない一対の鏡像異性体をもっている。生体内に存在するアミノ酸の大部分は L 体であるが、その鏡像異性体である D 体も微量ながら存在し、生理的に重要な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。

本研究で着目した遊離 D-アスパラギン酸 (Asp) は、哺乳類や頭足類の神経系に存在し、神経伝達物質としての役割が示唆されているほか、哺乳類や爬虫類などの内分泌系にも存在し、ホルモン分泌への関与、さらにアカガイ *Anadara broughtonii* では筋肉中に存在し、エネルギー源としての利用が示唆されている。

生体内の D-アミノ酸は外的要因による変性を除いて、それぞれのアミノ酸に対応するラセマーゼと呼ばれる酵素によって L-アミノ酸から生合成されている。D-Asp はアスパラギン酸ラセマーゼ (AspRase) によって L-Asp から生合成されており、アカガイなどにおいてその遺伝子が同定されている。

しかしながら、哺乳類や頭足類においては AspRase 遺伝子の同定には至っていない。したがって、神経系における D-Asp の生理機能解明のためにも、AspRase 遺伝子の同定は必須であるといえる。

## 2. 研究の目的

本研究ではスルメイカ *Todarodes pacificus* を試料として用い、その視神経節に存在する D-Asp の生理機能および AspRase の酵素学的諸性質を明らかにすることを目的とする。

マウスなどの哺乳類では D-Asp 含量が極めて少ないことや、脳などの神経系をすり潰したホモジネートからは AspRase 活性が検出できないなど、D-Asp 研究においては困難な点が多い。それに対して本研究で対象としたスルメイカは哺乳類と同じく神経系に D-Asp が存在するのみならず、その存在量も哺乳類の数百倍に上ることやホモジネートに AspRase 活性があることにより、D-Asp 研究には最適といえる。さらに、スルメイカは他の頭足類と比較しても視神経節が発達しているため解剖が容易という利点もある。

したがって、はじめにスルメイカ視神経節における D, L-Asp 含量の測定および AspRase 活性測定を行った。次に、発現クローニングによる AspRase 遺伝子単離のため、スルメイカ視神経節由来の cDNA ライブラリー作製を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1)スルメイカ視神経節における D-Asp 含量測定

スルメイカから視神経節を摘出した後、過塩素酸を用いて遊離アミノ酸の抽出を行った。抽出した遊離アミノ酸は、N-(tert-butoxycarbonyl)-L-cysteine および o-phthalaldehyde により、ジアステレオマー化および蛍光誘導体化を行った。遊離アミノ酸中に含まれる D, L-Asp 含量は ODS カラムを装着した高速液体クロマトグラフィーにより測定を行った。

### (2)スルメイカ視神経節における AspRase 活性測定

スルメイカから視神経節を摘出した後、酵素抽出用緩衝液を加え、冷却しながらホモジナイズを行った。得られた懸濁液を冷却下で遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とした。次に、粗酵素液に基質として L-Asp および補酵素としてピリドキサル 5'-リン酸を加え、37 で 16 時間インキュベートした。16 時間後、過塩素酸を加えることで反応を停止させ、水酸化カリウムによる中和の後、得られた溶液中の D-Asp 含量を調べた。D-Asp 含量の測定は(1)と同様の方法を用いた。

### (3)スルメイカ視神経節由来の cDNA ライブラリー作製

PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)を用いた cDNA ライブラリー作製

ISOGEN II (Nippon Gene)を用いてスルメイカ視神経節から全 RNA を抽出した後、GenElute mRNA Miniprep Kit (Sigma)により mRNA の精製を行った。次に、PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit を用いて二本鎖 cDNA を合成した。合成した二本鎖 cDNA の 5'末端をリン酸化した後、両末端に *Bst*XI 配列を付加した。次に、1 % アガロースゲルで電気泳動し、DNA 回収用チップ RECOCHIP (Takara)を用いて 500 bp 以上のアダプター付き二本鎖 cDNA を回収した。

回収したアダプター付き二本鎖 cDNA を *Bst*XI 切断済のシャトルベクター pcDNA3.1 (Invitrogen)にライゲーションした後、大腸菌 DH5 $\alpha$ に導入し、LB 寒天培地に塗布した。37 で一晩インキュベート後、生じたコロニー数を計測し、ライブラリーサイズの測定を行った。

GeneRacer Kit (Invitrogen)を用いた cDNA ライブラリー作製

と同様の方法を用いてスルメイカ視神経節から全 RNA を抽出後、GeneRacer Kit により完全長 cDNA の合成を行った。次に、完全長 cDNA の両末端に付加したアダプター配列に特異的な 5'末端リン酸化プライマーを設計し、PCR を行うことで二本鎖 cDNA を合成した。さらに、

と同様にして *Bst*XI 配列付加、サイズセレクション、pcDNA3.1 へのライゲーションおよび DH5 $\alpha$ への導入を行い、生じたコロニー数の計測およびライブラリーサイズの測定を行った。

SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Takara)を用いた cDNA ライブラリー作製

と同様の方法を用いてスルメイカ視神経節から全 RNA を抽出後、SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit により cDNA の合成を行った。次に、cDNA の両末端に付加したアダプター配列に特異的な 5'末端リン酸化プライマーを設計し、PCR を行うことで二本鎖 cDNA を合成した。さらに、と同様の方法で *Bst*XI 配列付加、サイズセレクション、pcDNA3.1 へのライゲーションおよび DH5 $\alpha$ への導入を行い、生じたコロニー数の計測およびライブラリーサイズの測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)スルメイカ視神経節における D-Asp 含量測定

D, L-Asp 標準液の分析結果から検量線を作成した後、スルメイカ視神経節における D, L-Asp 含量を測定した。その結果、L-Asp 含量は組織 1 g 中 1.83  $\mu$ mol であり、D-Asp 含量は 1.57  $\mu$ mol であった。また、全 Asp 含量に対する D-Asp 含量は 46.3 % であった。スルメイカ視神経節に存在する D-Asp 含量は 2.0  $\mu$ mol/g tissue から 4.0  $\mu$ mol/g tissue との報告もあるので、今回得られた結果はやや低い値ではあるが、妥当な値であるといえる。

また、マダコ *Octopus vulgaris* の視神経節における D, L-Asp 含量を測定した予備実験においては、L-Asp 含量は 0.76  $\mu$ mol/g tissue および D-Asp 含量は 8.78  $\mu$ mol/g tissue であった。したがって、マダコ視神経節と比較するとスルメイカ視神経節の D-Asp 含量は少なく、その割合も低いことが明らかとなった。

##### (2)スルメイカ視神経節における AspRase 活性測定

過塩素酸を加え失活させた粗酵素液を用いて AspRase 活性測定を行った結果、溶出時間 35 分付近に L-Asp のピークが確認でき、溶出時間 37 分付近には微少な D-Asp のピークが確認できた(図 1A)。次に、粗酵素液を用いた反応液の分析を行ったところ、同じく溶出時間 35 分付近に L-Asp のピークが確認でき、溶出時間 37 分付近にはネガティブコントロールよりも大きなピークを確認することができた(図 1B)。それぞれのピーク面積をもとに D-Asp 生合成量を求めた結果、5.1  $\mu$ mol であった。タンパク質濃度測定より、粗酵素液のタンパク質濃度は 14.78 mg/mL であり、用いた酵素量は 496  $\mu$ L であったことから粗酵素液中のタンパク質量は 7.33 mg である。したがって粗酵素液の L-Asp から D-Asp への AspRase 活性は 28 nmol/mg  $\cdot$  h と求められた。

アカガイ *Anadara broughtonii* 足筋の粗酵素液活性 (L-Asp  $\rightarrow$  D-Asp) の値が 1.2  $\mu$ mol/mg  $\cdot$  h であることから(文献 1) スルメイカ視神経節由来の粗酵素液の AspRase 活性は、アカガイと比較して非常に低いことが明らかとなった。しかしながら、予備実験として行ったマダコ視神経節由来の粗酵素液における AspRase 活性測定では、D-Asp の生成は痕跡程度であったことから、スルメイカはマダコよりも活性が強いことも明らかとなった。したがって、AspRase 活性検出という観点からは、スルメイカの方がより適した試料であるといえる。

また、スルメイカ視神経節内においては AspRase 活性は高いが、粗酵素抽出の際に外部環境に曝されることで活性が大幅に低下する可能性も考えられる。

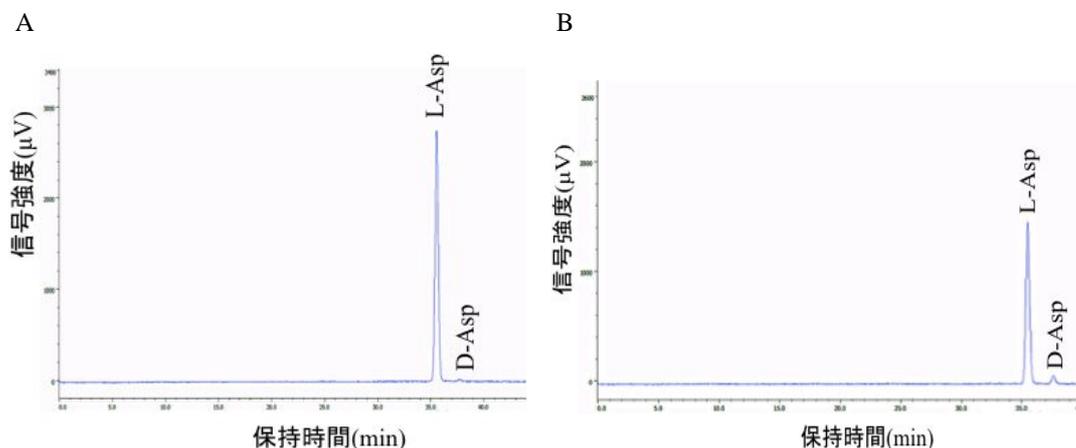


図 1. スルメイカ視神経節から抽出した粗酵素液の AspRase 活性

A, 失活させた粗酵素液による活性測定結果

B, 粗酵素液による活性測定結果

### (3)スルメイカ視神経節由来の cDNA ライブラリー作製

#### PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit を用いた cDNA ライブラリー作製

合成した二本鎖 cDNA を 1 % アガロースゲルにて電気泳動したが、合成産物は確認できなかった。しかしながら、形質転換後の大腸菌を塗布した寒天培地上ではコロニーを確認できた。計測の結果、ライブラリーサイズは 270 クローンであった。

この方法による二本鎖 cDNA 合成では PCR を行わないため、二本鎖 cDNA 量はスルメイカ視神経節から得られた mRNA 量に依存する。本研究で用いた mRNA 量が少なかったため、充分量の cDNA が合成されず、ライブラリーサイズも小さなものとなってしまった可能性がある。

#### GeneRacer Kit を用いた cDNA ライブラリー作製

合成した二本鎖 cDNA を 1 % アガロースゲルにて電気泳動したが、合成産物は確認できなかった。また、形質転換後の大腸菌を塗布した寒天培地においてもコロニーは確認できなかった。

この方法では、完全長 cDNA のみが PCR により二本鎖 cDNA として増幅される。したがって、完全長 cDNA 量が少なかったために充分量増幅されず、電気泳動でも確認できなかった可能性がある。また、*Bst*XI 配列をもつアダプターが二本鎖 cDNA の両末端に結合しなかったため、ベクターに二本鎖 cDNA が組み込まれずコロニーが確認できなかった可能性も考えられる。

#### SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit を用いた cDNA ライブラリー作製

合成した二本鎖 cDNA を 1 % アガロースゲルにて電気泳動を行った結果、様々なサイズの増幅産物を確認できた(図 2)。また、形質転換後の大腸菌を塗布した寒天培地においてもコロニーを確認することはできたが、ライブラリーサイズは 19 クローンであった。

この方法では少量の mRNA から大量の二本鎖 cDNA を合成することができるため、電気泳動においても増幅産物が確認できたものと考えられる。しかしながら、ライブラリーサイズは非常に小さなものとなってしまった。これは二本鎖 cDNA がベクターにほとんど組み込まれていないことが原因の一つであるので、ごく微量の二本鎖 cDNA の末端のみにしかアダプターが結合しなかった可能性が考えられる。したがって今後は、二本鎖 cDNA の 5'末端がリン酸化されているかやアダプターが正確に合成されているかなどを確認する必要がある。

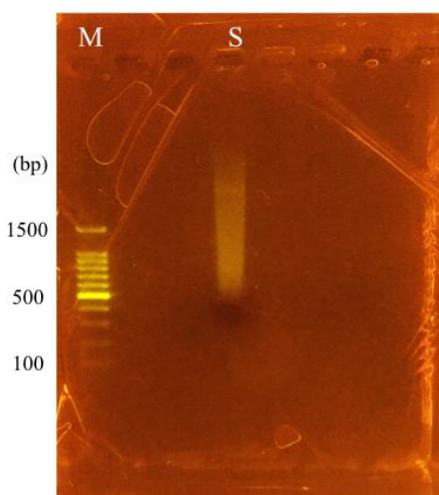


図 2. 二本鎖 cDNA の電気泳動結果  
M, 100 bp マーカー; S, 二本鎖 cDNA

先行研究により、スルメイカ視神経節由来の cDNA ライブラリーからアカガイ *AspRase* とアミノ酸同一率が 48 % のアカガイ *AspRase* ホモログの cDNA クローンが単離されている。大腸菌発現系を用いてこの遺伝子を発現させたところ、タンパク質は発現、可溶化しているものの *AspRase* 活性は得られなかった。発現させたタンパク質の N 末端アミノ酸配列も確認したが、目的のタンパク質であった。さらに、酵母および昆虫細胞ライセートを用いてのタンパク質発現も行ったが、両者ともアカガイ *AspRase* ホモログは発現、可溶化しているものの *AspRase* 活性は検出されなかった。次に、アカガイ *AspRase* ホモログ遺伝子の発現分布を調べた結果、*AspRase* 活性の検出されない部位においても発現していることが明らかとなった。このことから、アカガイ *AspRase* ホモログはスルメイカ *AspRase* ではないと結論付けられた。

したがって、スルメイカ *AspRase* 探索には新たな方法が必要と考え、発現クローニング(文献 2)を用いることにした。発現クローニングとは、cDNA ライブラリーを作製した後、動物細胞にライブラリー中のすべての遺伝子を発現させ、*AspRase* 活性を追うことで *AspRase* 遺伝子を単離する方法である。

この方法を用いるためには、はじめに cDNA ライブラリーを作製する必要があり、そのサイズは 1,000,000 クローン以上が望ましい。しかしながら、本研究ではそのサイズに達しなかったため、今後は充分なライブラリーサイズをもつ cDNA ライブラリーの構築を行う必要がある。スルメイカ視神経節から *AspRase* 遺伝子が単離された後は、その塩基配列の解析、リコンビナント *AspRase* の酵素学的諸性質等を調べる予定である。

### 参考文献

1. Shibata, K., Watanabe, T., Yoshikawa, H., Abe, K., Takahashi, S., Kera, Y and Yamada, R. (2002). Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 134 (2003): 307-314

2. Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-735.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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。