

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15911

研究課題名(和文) スルメイカ視神経節において発現するアスパラギン酸ラセマーゼに関する研究

研究課題名(英文) Studies on aspartate racemase in the optic ganglion of Japanese common squid

研究代表者

小山 寛喜 (Koyama, Hiroki)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：20746515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭足類の神経系には多量のD-アスパラギン酸(Asp)が蓄積し、神経伝達物質としての機能が示唆されているが、その生合成酵素であるアスパラギン酸ラセマーゼ(AspRase)をコードする遺伝子は同定されていなかった。そこで本研究では、スルメイカを試料として用い、その視神経節からAspRase遺伝子のクローニングを試みた。その結果、AspRase候補遺伝子がクローニングされた。大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として発現を行い、L-Aspを基質とした酵素反応を行った結果、D-Aspの生成が認められたため、新たにクローニングされた遺伝子はスルメイカのAspRase遺伝子であると結論付けられた。

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(Asp)は神経伝達物質としての機能のほかに神経疾患への関与も示唆されている重要なアミノ酸である。したがって、D-Aspの機能の詳細を調べるためにはその代謝経路を知ることが重要であるが、哺乳類や頭足類においては、その生合成に関与する酵素であるアスパラギン酸ラセマーゼが同定されていなかった。本研究によりAspRaseをコードする遺伝子がスルメイカからクローニングされたため、哺乳類のAspRase遺伝子も同定される可能性があり、D-Asp研究の更なる発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)： Although a large amount of D-aspartate (Asp) accumulates in the nervous system of cephalopods and has been suggested to function as a neurotransmitter, the gene encoding aspartate racemase (AspRase), an enzyme for its biosynthesis, has not yet been identified. In this study, we attempted to clone the AspRase gene from the optic ganglion of the Japanese common squid. As a result, AspRase candidate gene was cloned. Its gene was expressed as a recombinant protein using *E. coli*, and the enzymatic reaction using L-Asp as a substrate showed that D-Asp was biosynthesized, leading to the conclusion that the newly cloned gene is the AspRase gene.

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

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸に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が存在し、それらのうち一方を L 体、もう一方を D 体と呼んでいる。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。

とくに遊離型 D-アスパラギン酸 (Asp) は、哺乳類や頭足類などの神経系に存在し、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。D-Asp はアスパラギン酸ラセマーゼ (AspRase) と呼ばれる酵素によって 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。哺乳類や頭足類の神経系に存在する D-Asp も AspRase によって L-Asp から生合成されると考えられているものの、AspRase 遺伝子は未だに同定されていない。神経系の D-Asp は神経伝達物質としての機能のほか、神経疾患とも深く関わっていると考えられているため、その生合成に関与する AspRase をコードする遺伝子のクローニングは重要であるといえる。

2. 研究の目的

D-Asp は神経系や内分泌系に存在し、生理的に重要な機能を有するが、哺乳類および頭足類においては AspRase 遺伝子が同定されていない。神経系における D-Asp 含量に着目すると、哺乳類ではその含量が極めて少ないことが D-Asp 研究の難点となっている。一方、頭足類は神経系に存在する D-Asp 含量が哺乳類の数百倍であることや、神経節のホモジネートから AspRase 活性が容易に検出できる点から、D-Asp 研究には最適な試料であるといえる。さらにスルメイカ *Todarodes pacificus* は他の頭足類と比較して視神経節が発達していることや、入手しやすいことから本研究ではスルメイカを試料として用いることにした。本研究では頭足類の D-Asp 生合成経路解明のために、スルメイカから AspRase 遺伝子のクローニングを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

スルメイカの視神経節、筋肉および肝臓由来の粗酵素液を用いた AspRase 活性測定で、視神経節のみにおいて活性が検出されたことより、スルメイカでは AspRase 遺伝子が視神経節で特異的に発現していることが予想された。そこで、RNA-Seq 解析を行いスルメイカ視神経節で発現している遺伝子を網羅的に調べたところ、アカガイ AspRase とアミノ酸同一率が 48% である AspRase 様タンパク質 (aspartate racemase-like protein, ARLP) が同定された。ARLP を大腸菌によるリコンビナントタンパク質として発現させたところ、AspRase 活性は検出されなかった。酵母や昆虫細胞ライセートを用いた発現系においても AspRase 活性は検出されなかった。さらに、ARLP 遺伝子は AspRase 活性が認められない筋肉や肝臓においても発現していることが明らかとなったので、ARLP はスルメイカ AspRase ではないと結論付けられた。RNA-Seq 解析では ARLP 以外の AspRase 候補遺伝子はみつからなかったため、AspRase 遺伝子クローニングには新たな方法が必要であると考えられた。そこで、本研究では発現クローニングによるスルメイカ AspRase 遺伝子の単離を試みた。発現クローニング法とは、目的の組織で発現している遺伝子を網羅的にタンパク質発現させた後、酵素活性を追っていくことで目的の遺伝子を単離する方法である (図 1)。

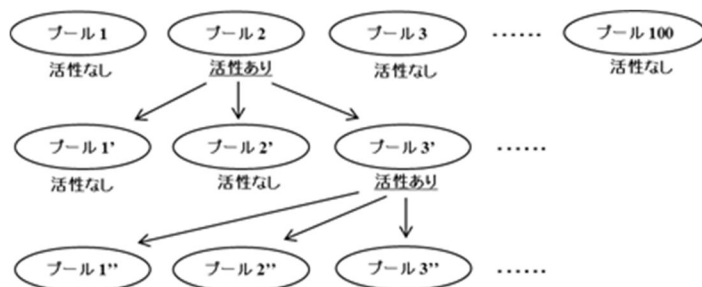


図 1. 発現クローニング法
AspRase 活性が検出されたプールを細分化し、最終的に単一クローンになるようにする。

(1) 発現クローニング法による AspRase 遺伝子単離

まず、スルメイカ神経系のなかで最も強い AspRase 活性のある視神経節から cDNA ライブラリーを作製した。大腸菌でライブラリーを増幅させた後、そのサイズを計測し、1 プールあたり 1,000 クローンとなるようにライブラリーを分割した。次に、大腸菌による分割したライブラリーの増幅を行い、各プールからベクターを回収した。それぞれのプール由来のベクターを用いて、*in vitro* 転写および小麦胚芽細胞抽出液による *in vitro* 翻訳を行うことでリコンビナントタンパク質を得た。

(2) 酵素活性測定

各プール由来のリコンビナントタンパク質溶液を酵素液として活性測定を行った。L-Asp に補酵素としてピリドキサル-5'-リン酸およびD-Asp 分解酵素阻害剤として酒石酸ナトリウムを加えた溶液を基質溶液とした。この基質溶液に酵素液を加え、pH8.0、37°C の条件下で 24 時間のインキュベートを行った。インキュベート後、*N-tert*-ブチルオキシカルボニル-L-システインおよび *o*-フタルジアルデヒドを用いて Asp をジアステレオマー化および蛍光誘導体化し、HPLC による分析に供した。

(3) RNA-Seq 解析

先行研究においては、視神経節のみを対象に RNA-Seq 解析を行ったため、本研究では視神経節、筋肉および肝臓の 3 組織で RNA-Seq 解析を行った。まず、各組織から全 RNA を抽出した後、mRNA の精製および cDNA ライブラリーの作製を行った。作製した cDNA ライブラリーは次世代シーケンサーによる解析に供した。次に、ARLP 遺伝子以外の AspRase 候補遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 発現クローニング法による AspRase 遺伝子単離

スルメイカ視神経節から作製した cDNA ライブラリーのサイズは約 36,000 クローンであった。次に、1,000 クローンずつにライブラリーを分割し、各プールにおける AspRase 活性を測定したが、すべてのプールにおいて AspRase 活性は検出されなかった。発現クローニングに用いるライブラリーサイズは 1,000,000 クローン以上が理想的であるが、本研究で作製したライブラリーサイズは小さかったため、AspRase 遺伝子がライブラリー中に含まれていなかった可能性がある。

(2) RNA-Seq 解析

視神経節で発現している遺伝子を網羅的に調べたが、先行研究と同様に ARLP 遺伝子以外の AspRase 候補遺伝子はみつからなかった。そこで、視神経節、筋肉および肝臓において発現量解析を行い、AspRase 活性をもつと考えられ、かつ視神経節に特異的に発現している遺伝子の探索を行った。その結果、新たな AspRase 候補遺伝子がみつかった。

(3) AspRase 活性測定

新たにみつかった AspRase 候補遺伝子を大腸菌によりリコンビナントタンパク質として発現させたところ、可溶化が確認された。このリコンビナントタンパク質を用いて HisTag による精製を行い、酵素活性測定に供した。L-Asp を基質とした活性測定結果、D-Asp の生成が確認された(図 2)。したがって、新たに発見された AspRase 候補遺伝子はスルメイカの AspRase 遺伝子であることが確認された。

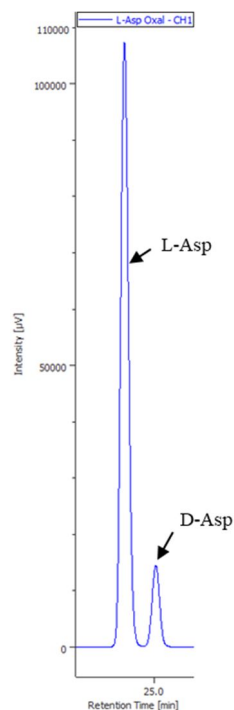


図 2. AspRase 活性測定結果

(4) 最適 pH および最適温度

pH5~7 については MES 緩衝液、pH7~9 については Tris-HCl 緩衝液、pH9 および 10 については CHES 緩衝液を用いて AspRase 活性測定を行った。L-Asp を基質としたところ、すべての pH において D-Asp の生成が確認された。用いた緩衝液の種類によって活性に差が認められたが、最適 pH は 6 付近であると考えられた。

次に、Tris-HCl 緩衝液を用いて pH7 の条件下で 15°C ~ 40°C の範囲において活性測定を行った結果、20°C で最大の活性が認められた。

これらの結果から、スルメイカ AspRase の最適 pH および最適温度はそれぞれ 6 および 20°C であることが明らかとなった。より詳細な最適 pH を求めるためには、同じ緩衝液を用いた活性測定を行う必要があると考えられる。

本研究から頭足類の AspRase 遺伝子をはじめて明らかとなった。これらの結果をもとに未だ同定されていない哺乳類の AspRase 遺伝子も明らかになる可能性があり、今後の研究課題であるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋由衣・真鳥燦・国吉久人・黒瀬光一・小山寛喜 |
| 2. 発表標題 スルメイカ <i>Todarodes pacificus</i> のD-アスパラギン酸生成酵素遺伝子クローニング |
| 3. 学会等名 令和4年度 日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|