

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710169

研究課題名 (和文) 脂質代謝におけるD-プロリンおよびプロリンラセマーゼの機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of D-proline and proline racemase in lipid metabolism

研究代表者

吉川 尚子 (YOSHIKAWA NAOKO)

静岡理科大学・理工学部・講師

研究者番号：30392533

研究成果の概要 (和文)：マウスの諸組織中には、D-プロリン (Pro) が存在することが明らかにされているが、D-Pro の生合成酵素であるプロリンラセマーゼをコードすると思われる遺伝子 *MPR* が発現していることが明らかとなった。*MPR* は、脂肪組織に特異的に発現しており、脂肪組織ではタンパク質として翻訳されていることも確認された。さらに、高脂肪食を与えたマウスにおいては、発現量が低下するため、脂質代謝との関連性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：D-Proline (Pro) is found in several tissues of mice. The synthetic pathway of D-Pro in microorganisms is known to produce by racemase which catalyzes interconversion of D- or L-Pro. We detected proline racemase like gene expression (*MPR*) in mice. *MPR* was expressed in mice adipose tissues specificity, and translated into protein. Moreover, the expression level of *MPR* in adipose tissues was decreased in high fat dietary mice. It suggests that *MPR* is concerned to lipid metabolism in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質

1. 研究開始当初の背景

D 型アミノ酸は、細菌類の細胞壁を構成するペプチドグリカンの必須成分であり、その生合成酵素であるラセマーゼに関する研究は、抗生物質のターゲットとしてみなされ、古くから研究が行われてきている。一方、動物界においては、D 型アミノ酸は存在しないものと考えられてきていたが、近年、無脊椎動物から哺乳類に至るまで広く存在することが明らかになっている。特に、水生無脊椎動物では、諸組織中に多量の遊離 D-アラニン (Ala) が存在しており、これはアラニンラセマーゼによって合成されていることが明らかになっている。筆者は、D-Ala の蓄積メカニズムおよび生理機能を明らかにするために、動物界で初めてアラニンラセマーゼを同定し、その一次構造を明らかにし、機能解析を行った。

哺乳類では、マウスの脳に遊離 D-セリン (Ser) が存在し、これは NMDA 受容体のグリシンサイトの内在性アゴニストとして、神経伝達調節物質であることが明らかにされている。さらに、セリンラセマーゼが単離され、cDNA がクローニングされたことにより、D-Ser の生理機能に関する研究は、著しい発展を遂げるに至った。

D-Pro においても、マウスの脳および末梢組織において検出されているものの、その生合成経路は明らかにされていないが、細菌類や寄生虫ではプロリンラセマーゼが存在していることが明らかになっている。

動物では、D 型アミノ酸が検出されても生合成酵素が確認されなければ起源がわからないため、その生理機能を明らかにすることはできない。哺乳類においては、D-Ser, D-Asp, D-Ala, D-Pro および D-リシン (Lys) が検出されているが、生合成酵素が確認されているのは、マウス、ラットおよびヒトの脳中のセリンラセマーゼのみである。プロリンラセマーゼについても、その存在は確認されておらず、さらに、脂肪組織における D 型アミノ酸の研究に着手された例はなく、本研究が初めての試みである。したがって、本研究が国内外において哺乳類における新たなラセマーゼ研究の先駆けとなるとともに、D 型アミノ酸の未知の機能を解明する糸口となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、マウスのプロリンラセマーゼを同定し、その機能解析を行うことで、脂質代謝と本酵素および D-Pro の関連性を明らかにし、その生理機能を解明することを目的

とした。

まず、プロリンラセマーゼと相同性のある MPR 遺伝子がプロリンラセマーゼをコードするものであるかを確認するために、組換えタンパク質を作製してラセマーゼ活性を測定する。また、マウスの諸組織における MPR の発現分布を明らかにするとともに、免疫染色により脂肪組織における細胞内局在を明らかにすることで、その生理機能を推定するとともに、プロリンラセマーゼとタンパク質相互作用を示す分子を同定し、既知の脂質代謝経路上の分子であれば、その経路と本酵素との関連性を明らかにすることで、MPR の機能を予測することとした。

3. 研究の方法

(1) プロリンラセマーゼ活性の測定

プロリンラセマーゼ活性は、キラルカラムを用いた HPLC により行うこととした。酵素反応は、L-Pro を基質とし、生成物である D-Pro の生成量を酵素活性とした。また、D-Pro を高感度に検出するために、NBD 化による蛍光検出を行った。

(2) プロリンラセマーゼの組換えタンパク質の作製

マウス MPR の cDNA クローンを用いて、大腸菌発現系により組換えタンパク質を作製した。発現ベクターから、様々なコンピテントセルを用いて発現させたが、十分な発現量が得られなかったため、バキュロウィルス発現系により、組換えタンパク質を産生した。

(3) 抗 MPR 抗体の作製

MPR 遺伝子の演繹アミノ酸配列から、12 残基のペプチド配列を抗原とし、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作製した。

(4) MPR の組織分布

諸組織中の MPR の発現量は、ウェスタンブロットティングにより行った。マウスのマイクロアレイデータにおいて MPR の発現が見られた、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、副腎、腎臓および肝臓を用いてタンパク質溶液を調製し、抗 MPR 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

(5) マウス白色脂肪組織からの粗酵素液の精製

マウス白色脂肪組織を用いて粗酵素液を調製し、DEAE-Toyopearl および Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーで MPR の粗精製および濃縮を行った。

(6) MPR 遺伝子発現の解析

マウス諸組織中における MPR 遺伝子の発現分布を、Real-time PCR によって明らかにした。マウスの脳、肝臓、腎臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、心臓、副腎、精巣、卵巣、胸腺、骨髄および骨格筋から調製した RNA より 1st cDNA を合成し、TaqMan Probe を用いて検出を行った。リファレンス遺伝子としては、GAPDH を用いた。

4. 研究成果

(1) プロリンラセマーゼ活性測定法の確立

マウスにおけるプロリンラセマーゼと相同性を示す MPR の cDNA が、プロリンラセマーゼをコードするかどうかを確認するために、まず、プロリンラセマーゼ活性の測定法を確立することとした。酵素活性は、L-Pro を基質として酵素反応を行い、生成物である D-Pro 含量を測定することとした。

D-Pro の検出は、HPLC を用いて行うこととし、基質である過剰な L-Pro と生成物である微量な D-Pro の分離条件を検討した。酵素活性が非常に低いことも想定し、D-Pro は NBD 化し、蛍光検出による高感度な酵素活性測定法を確立した。

(2) プロリンラセマーゼの組換えタンパク質の作製および酵素活性の測定

MPR の酵素活性を測定するために、マウス cDNA クローンから、大腸菌を用いて組換えタンパク質を産生し、プロリンラセマーゼ活性を測定することとした。しかしながら、大腸菌を用いた発現系では、十分な組換えタンパク質を得ることができなかった。そこで、バキュロウィルス発現系により、組換えタンパク質を作製し、可溶化して様々な酵素反応条件において酵素活性を測定したが、活性は検出できなかった。したがって、MPR は、翻訳後修飾を受けることによりプロリンラセマーゼ活性を示す可能性が考えられたため、マウスの組織から粗酵素液を調製し、酵素活性を測定することとした。

(3) マウス諸組織中における MPR の発現分布

マウスの組織から、粗酵素液を調製するために、MPR の組織分布を明らかにし、最も MPR の発現量の高い組織を用いることとした。

そこで、まず、抗 MPR 抗体を作製し、ウェスタンブロッティングにより諸組織中における MPR 発現量を測定した。マウスの諸組織から、粗酵素液を調製し、ウェスタンブロッティングを行ったところ、諸組織中において、MPR がタンパク質レベルで発現していることが確認できた。特に、白色脂肪組織、卵巣、副腎および腎臓において MPR の発現量が高いことが明らかとなった。脂肪組織の粗酵素液では、夾雑タンパク質が少ないため、脂肪組織を用いて酵素活性を測定することとした。

ウェスタンブロッティングでは、ポジティブコントロールとしてバキュロウィルスによる組換えタンパク質を用いたが、諸組織の粗酵素液中においては、ポジティブコントロールと同じサイズのバンド以外にもう一つバンドが検出されていた。したがって、免疫染色による細胞内分布を明らかにすることはできなかった。この結果においても、翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

(4) マウス脂肪組織におけるプロリンラセマーゼ活性の測定

マウスの白色脂肪組織から粗酵素液を調製し、酵素活性を測定したが、ラセマーゼ活性は検出できなかった。動物におけるラセマーゼは、発現量が非常に少ないため、濃縮するために、各種カラムクロマトグラフィーを用いて粗精製を行った。しかしながら、粗精製酵素液を用いても、プロリンラセマーゼ活性は検出できなかった。本実験においては、プロリンラセマーゼ活性を測定するためのポジティブコントロールがないため、酵素反応あるいは酵素活性測定法に問題がある可能性も考えられる。今後、補酵素の存在の有無、および最適な酵素反応系について再度検討を行っていく。

また、MPR の遺伝子配列は寄生虫で報告されているプロリンラセマーゼと相同性を示しているが、寄生虫においては、構造解析により、活性部位が 2 つのシステイン残基であることが明らかにされている。MPR では、一つの Cys 残基が置換されているため、この変異により酵素活性が検出できないことも示唆される。したがって、MPR がプロリンラセマーゼ活性を示すものであるかについては、さらなる研究を要する。

(5) MPR 遺伝子発現の解析

MPR 遺伝子の発現レベルは、マイクロアレイのデータにおいては、白色脂肪組織に特異的に発現していた。さらに、Real-time PCR を用いてマウスの諸組織中の MPR の発現量の測定を行ったところ、精巣において高い発現量を示した。

また、高脂肪食を摂取したマウスの白色脂

肪組織では、普通食を摂取したマウスよりも *MPR* の発現量が低下していることが明らかとなった。したがって、*MPR* は脂質代謝と関連していることが示唆されたが、*MPR* と相互作用を示す分子の同定までには至らなかった。脂質代謝との関連性を明らかにするためには、今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 吉川尚子、マウス脂肪組織におけるプロリンラセマーゼの発現解析、第 83 回 日本生化学会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド(兵庫)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 尚子 (YOSHIKAWA NAOKO)
静岡理工科大学・理工学部・講師
研究者番号：30392533

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし