

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24770068

研究課題名(和文) D-アミノ酸とその代謝酵素アミノ酸ラセマーゼの動物界における分布と機能

研究課題名(英文) Distribution and function of D-amino acid and amino acid racemase in animals

研究代表者

宇田 幸司 (Uda, Kouji)

高知大学・自然科学系・講師

研究者番号：10448392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年様々な動物に遊離型のD-アミノ酸が存在することが報告され、それらが生理機能をもつことが明らかになってきた。一方で、動物での遊離型D-アミノ酸の広範囲な分布とは異なり、D-アミノ酸の合成酵素であるアミノ酸ラセマーゼは、限られた生物種でしか発見されていなかった。我々は、アミノ酸ラセマーゼも動物界に広く分布して存在するのではないかと考え、その遺伝子の探索を進めた。その結果、セリンラセマーゼ、またはアスパラギン酸ラセマーゼが動物界に広く存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Free D-amino acids are widely distributed in living organisms, from bacteria to mammals, and play a key role in specific physiological functions. In invertebrates, D-Ser, D-Asp, D-Ala and D-Arg have been found in various phyla species, and play important physiological roles. In contrast to the wide distribution of D-amino acids, amino acid racemase genes have been identified in few invertebrate species. We searched the nucleotide, EST, and SRA databases, and found 11 serine racemase homologous genes from eight invertebrate phyla species. The cloned genes were identified based on their maximum activity as serine racemase (SerR) and aspartate racemase (AspR). Our results revealed that SerR and AspR are more widely distributed among invertebrates than previously thought.

研究分野：比較生化学

キーワード：D-アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

この10年間、D-アミノ酸関連の研究は急速に発展し、多くの研究者による研究が進んでいる。特に多くの動物門の生物の生体内に遊離のD-セリン、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸、D-アルギニンなどが高濃度で存在することが明らかとなってきた。そしてそれらが様々な生理機能をもつことも報告されている。例えば、D-セリンは、記憶や学習等に関与するN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして脳機能の調節に重要な役割を果たしている。また、遊離型のD-アスパラギン酸は、哺乳類の脳、網膜、松果体、下垂体、副腎、精巣に高濃度で存在することが報告され、これらの組織において、メラトニン合成の抑制、プロラクチン分泌の促進、バソプレシンおよびオキシトシンの産生調節、テストステロン産生の亢進といった生理活性を示すことが知られている。さらに、遊離のD-アラニンは海産の無脊椎動物に高濃度で存在しており、その機能が浸透圧調節であると考えられている。また、報告者は環形動物のケヤリに高濃度で遊離のD-アルギニンが存在することを発見した。さらに、D-アルギニンとATPからD-アルギニンリン酸を合成する酵素が存在することを発見し、D-アルギニンの生理機能がATPのリン酸基の貯蔵源であることを示した。

しかしながら、それらのD-アミノ酸を合成する酵素であるアミノ酸ラセマーゼは限られた生物種でしか見つかっていなかった。動物に存在するアミノ酸ラセマーゼとしては、軟体動物のアカガイ及びアメフラシのアスパラギン酸ラセマーゼ、節足動物のエビのアラニンラセマーゼ、哺乳類のセリンラセマーゼ遺伝子が単離されているのみであった。それ以外の生物種においてもアミノ酸ラセマーゼの存在が示唆されていたが、その遺伝子の単離には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究では様々な動物、特に既にD-アミノ酸の存在が確認されている生物種からD-アミノ酸の合成酵素であるアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の単離を試みた。さらに、それらの遺伝子のリコンビナント酵素を作製し、その酵素機能の確認を行った。これによって、アミノ酸ラセマーゼの動物界における分布とその機能を明らかにすることを目的とした。また、アミノ酸ラセマーゼ以外のD-アミノ酸代謝酵素の探索も試みた。

3. 研究の方法

(1)アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索と単離

NCBIで公開されている様々な動物種についてのEST、SRAデータ等をデータベースとして、既知のアミノ酸ラセマーゼと相同性の高い配列をBLAST検索によって探索した。見つかった多くの配列は短い断片配列であっ

たので、さらにこれらを組み合わせることで完全長の遺伝子配列を得た。

得られたアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の塩基配列情報を元にプライマーを作製し、生体から抽出したcDNAプールを鋳型としたPCR増幅によって、アミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の単離を行った。また、生物試料の入手が困難な生物種については、塩基配列情報を元に、鋳型を必要としない人工遺伝子合成手法によって、アミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の合成を行った。

(2)アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の機能解析

前項で得られた複数のアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子をpET30ベクターに組み込み、大腸菌を用いたリコンビナント酵素発現系を構築した。大量発現されたHisタグ融合リコンビナント酵素はNi-NTA樹脂を利用し精製した。精製したリコンビナント酵素を用いて、19種類のL-アミノ酸を基質とした時のアミノ酸ラセマーゼ反応を測定した。反応によって生じたL/D-アミノ酸の混合物をジアステレオマー化し、逆相HPLCによって定量することにより、アミノ酸ラセマーゼ活性の反応速度を測定した。さらに、主たる基質アミノ酸については、ラセマーゼ活性の酵素活性パラメータの測定も行った。

(3)アミノ酸ラセマーゼの系統解析

得られたアミノ酸ラセマーゼホモログについて、そのアミノ酸配列をアライメントし、分子系統樹を作製した。作製された分子系統樹からアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の進化について検討した。また、アミノ酸配列アライメント及び、立体構造予測から、アミノ酸ラセマーゼの基質認識部位の特定を進めた。

(4)D-アミノ酸代謝酵素の探索

アミノ酸ラセマーゼ以外のD-アミノ酸を基質とする酵素の探索を行った。特に、D-アルギニンを基質としてD-アルギニンリン酸を合成することが知られているD-アルギニンキナーゼのホモログ遺伝子を様々な生物種から単離した。単離された遺伝子については、アミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子同様に大腸菌による遺伝子発現系を構築し、リコンビナント酵素の発現精製を行った。得られたリコンビナント酵素について、L及びD-アルギニンに対する酵素活性を測定し、D-アルギニンを基質として利用できるかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1)アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の分布

本研究によって、セリンラセマーゼまたはアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子が刺胞動物ハイマツミドリイシ、軟体動物マガキ、節足動物ウシエビ、線形動物センチュウ、扁形動物プラナリア、緩歩動物オニクマムシ、環形動物ゴカイから単離された。そしてそれらのリコンビナント酵素に、セリン

またはアスパラギン酸ラセマーゼ活性があることが確認された。これによって、これまでに考えられてきたよりも広範囲の動物種にアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。また、単離されたセリンラセマーゼとアスパラギン酸ラセマーゼのアミノ酸配列を比較したところ、両者は共通の祖先遺伝子から進化したことが示唆された。さらに、マガキ、ハイマツミドリイシ、ウシエビにはアスパラギン酸ラセマーゼとセリンラセマーゼの両方の遺伝子が存在していることが明らかとなった。また、NCBIに登録されていたマガキの大規模なトランスクリプトーム解析データを利用して、セリンラセマーゼ及びアスパラギン酸ラセマーゼの発現部位と時期を確認した。その結果、マガキのセリンラセマーゼは発生の初期段階から常に発現しており、成体のどの組織においても同程度発現しているが、アスパラギン酸ラセマーゼは発生の後期段階から発現が開始され、唇弁で特異的に発現していることがわかった。

(2)D-アルギニンキナーゼ遺伝子の探索

環形動物のケヤリには通常生体内に存在するL-アルギニンに加えて、D-アルギニンをも基質として利用し、D-アルギニンリン酸を合成可能なD-アルギニンキナーゼが存在している。この酵素がケヤリ以外の生物にも存在するかどうかを明らかにするため、無脊椎動物の様々な生物種からケヤリ・D-アルギニンキナーゼと相同性の高いホモログ遺伝子を単離し、その酵素機能を確認した。しかしながら、ケヤリ以外から単離された全てのホモログ遺伝子はL-アルギニンのみをL-アルギニンリン酸へと変える通常のアルギニンキナーゼ活性しか示さなかった。このことより、ケヤリにおいて報告されているD-アルギニンキナーゼは他に例を見ない特殊な酵素であることが確認された。

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 8件)

Tokuhiro S, Nagataki M, Jarilla BR, Uda K, Suzuki T, Sugiura T, Agatsuma T, (2014), Phosphagen kinase in *Schistosoma japonicum*: II. Determination of amino acid residues essential for substrate catalysis using site-directed mutagenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 194: 56-63. 査読有
DOI:10.1016/j.molbiopara.2014.04.010.

Michibata J, Okazaki N, Motomura S, Uda K, Fujiwara S, Suzuki T, (2014), Two

arginine kinases of *Tetrahymena pyriformis*: characterization and localization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 171: 34-41. 査読有
DOI:10.1016/j.cbpb.2014.03.008.

Uda K, Hoshijima M, Suzuki T, (2013), Characterization and origin of bacterial arginine kinases. *Int J Biol Macromol.* 57C: 273-277. 査読有
DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.02.023.

Uda K, Komeda Y, Fujita T, Iwasaki N, Bavestrello G, Giovine M, Cattaneo-Vietti R, Suzuki T, (2013), Complete mitochondrial genomes of the Japanese pink coral (*Corallium elatius*) and the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum*): A reevaluation of the phylogeny of the family Coralliidae based on molecular data. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics.* 8: 209-219. 査読有
DOI:10.1016/j.cbd.2013.05.003.

Tokuhiro S, Uda K, Yano H, Nagataki M, Jarilla BR, Suzuki T, Agatsuma T, (2013), Phosphagen kinase in *Schistosoma japonicum*: Characterization of its enzymatic properties and determination of its gene structure. *Mol Biochem Parasitol.* 188: 91-98. 査読有
DOI:10.1016/j.molbiopara.2013.04.001.

Jarilla BR, Tokuhiro S, Nagataki M, Uda K, Suzuki T, Acosta LP, Agatsuma T, (2013), Gene structure of the two-domain taurocyamine kinase from *Paragonimus westermani*: Evidence for a distinct lineage of trematode phosphagen kinases. *FEBS Letters.* 567: 2278-2283. 査読有
DOI:10.1016/j.febslet.2013.05.061.

Jarilla BR, Tokuhiro S, Nagataki M, Uda K, Suzuki T, Acosta LP, Agatsuma T, (2013), The role of Y84 on domain 1 and Y87 on domain 2 of *Paragonimus westermani* taurocyamine kinase: Insights on the substrate binding mechanism of a trematode phosphagen kinase. *Exp Parasitol.* 135: 695-700. 査読有
DOI:10.1016/j.exppara.2013.10.008

Uda K, Ellington WR, Suzuki T, (2012), A diverse array of creatine kinase and arginine kinase isoform genes is present in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, a cnidarian model system for studying developmental evolution. *Gene.* 494: 214-227. 査読有

DOI:10.1016/j.gene.2012.01.036.

〔学会発表〕(計 5 件)

Koji UDA, Keita ABE, Yoko DEHARA, Kiriko MIZOBATA, Natsumi SOGAWA, Yuki AKAGI, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE AMINO ACID RACEMASE GENES FROM SEVERAL INVERTEBRATE SPECIES. The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 2014 年 09 月 02 日, 栃木県総合文化センター(栃木県)

安部啓太, 宇田幸司, ウシエビに存在するアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の単離と機能解析, 中国四国地区生物系三学会合同大会, 2014 年 05 月 10 日, 岡山理科大学(岡山県)

宇田幸司, 出原陽子, 安部啓太, 西願麻以, 曾川菜摘, 赤木勇貴, 溝端 キリコ, 山城由也, プラナリア・アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の単離と機能解析, 日本動物学会第 84 回大会, 2013 年 09 月 23 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山市)

山城由也, 西願麻以, 鈴木知彦, 宇田幸司, テトラヒメナに存在するセリンラセマーゼの酵素機能解析, 中国四国地区生物系三学会合同大会(徳島大会), 2013 年 05 月 11 日, 徳島大学常三島キャンパス(徳島県)

山城由也, 西願麻以, 鈴木知彦, 宇田幸司, テトラヒメナに存在するセリンラセマーゼホモログの酵素機能解析, 日本動物学会第 83 回大会, 2012 年 09 月 15 日, 大阪大学(大阪府)

6. 研究組織

(1) 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・講師

研究者番号: 10448392