

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：33803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870858

研究課題名(和文) クルマエビにおけるD-グルタミン酸の生合成機構および生理機能の解明

研究課題名(英文) Biosynthesis and physiological function of D-glutamate in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*

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

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)：クルマエビの雄の生殖腺に存在するD-グルタミン酸の生理機能を明らかにするために、生殖腺を精巣、輸精管および生殖口に分けてD-グルタミン酸の分布を測定したところ、全ての組織にD-グルタミン酸は検出されたが、特に輸精管では全グルタミン酸の80%をD体が占めていた。さらに、動物組織で初めてグルタミン酸ラセマーゼ活性が検出されたことから、クルマエビに存在するD-グルタミン酸の生合成経路が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：D-Glutamate was specifically detected in male genital tissue of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. To reveal the physiological functions of D-glutamate, the distribution of D-glutamate was examined on these tissues of the prawn. D-Glutamate was found in the testis, vas deferens, and male genital aperture, respectively. The ratio of D-glutamate to total glutamate was over 80% in vas deferens. Moreover, the activity of glutamate racemase which catalyzes the interconversion of D- and L-glutamate was detected in these tissues. Thus, D-glutamate in the prawn is biosynthesized by glutamate racemase.

研究分野：生化学

キーワード：D-グルタミン酸 D-アミノ酸 クルマエビ

1. 研究開始当初の背景

D-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、D-アラニンの生合成酵素であるアラニンラセマーゼは抗生物質のターゲットとみなされ、古くから盛んに研究が行われてきている。一方、動物には D-アミノ酸は存在しないものと考えられてきていたが、近年の分析技術の向上にともない、無脊椎動物から哺乳類に至るまで広く存在していることが明らかになっていく。

特に水生無脊椎動物では、諸組織中に多量の遊離 D-アラニンが存在しており、これはアラニンラセマーゼによって生合成されていることが明らかとなっている。申請者はクルマエビから動物では初めてアラニンラセマーゼをコードする cDNA のクローニングに成功し、演繹アミノ酸配列を決定した。さらに、クルマエビの全ての組織における D-アミノ酸の分布を明らかにしたところ、オスの生殖腺においてのみ、D-グルタミン酸が存在することを発見し、全グルタミン酸に占める D 体の割合は、53%と L 体を上回る高い値を示した。これまで、動物組織においてこのような多量の D-グルタミン酸が検出された例はなく、クルマエビの各組織に存在する D-アラニンが全アラニンに占める割合を優に越えていることから、D-グルタミン酸はクルマエビの精巣で生合成され、生殖組織に重要な役割を果たしているものと考えられた。

そこで本研究では、クルマエビの雄の生殖腺に存在する代謝産物を網羅的に解析し、その生合成経路を明らかにすることで、D-グルタミン酸の蓄積メカニズムおよび生理機能を解明することとした。

2. 研究の目的

クルマエビの雄の生殖腺に存在する D-グルタミン酸の生理機能を解明するために、各生殖組織における D-グルタミン酸の分布を明らかにする。また、クルマエビを高塩濃度海水に順応させると、数種の組織では D-アラニンの増加が認められる。そこで、高塩濃度海水に順応させた際の各生殖組織における D-グルタミン酸含量の変動を明らかにするとともに、メタボロームおよびプロテオーム解析により高浸透圧環境下におけるクルマエビ生殖腺の代謝応答機構を明らかにする。

さらに、D-グルタミン酸は、他の動物ではほとんど検出されておらず、D-グルタミン酸の生合成酵素の存在も、真核生物では明らかにされていない。そこで、クルマエビの生殖腺を用いて D-グルタミン酸生合成酵素活性を測定することで、D-グルタミン酸生合成酵素を同定し、酵素の性質および機能解析を通じて D-グルタミン酸の生合成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)クルマエビ各生殖組織における D-グルタミン酸の分布および代謝産物の網羅的解析

クルマエビの雄の生殖腺を精巣、精管および生殖口に分け、D-グルタミン酸の分布を明らかにするとともに、成熟過程における D-グルタミン酸含量を測定する。さらに、交尾後の雌の生殖補助器には雄由来の精包が貯蔵されているため、交尾前後の雌の生殖補助器における D-グルタミン酸含量も測定することで、クルマエビの生殖機能と D-グルタミン酸の関連性を明らかにする。

D-グルタミン酸が検出された組織については、抗 D-グルタミン酸抗体を用いて免疫染色を行うことで細胞内分布を明らかにし、その機能を推定する。

高浸透圧環境下における D-グルタミン酸含量の変動を明らかにするために、クルマエビを 150%海水に順応させ、生殖腺の D-グルタミン酸含量の測定を行う。D-アラニンと同様に D-グルタミン酸の増加が認められた場合、メタボローム解析により代謝産物を網羅的に解析し、D-グルタミン酸生合成に関わる代謝経路を明らかにする。

(2)D-グルタミン酸生合成酵素の探索

D-グルタミン酸生合成酵素としては、D-、L-グルタミン酸の相互変換を触媒するグルタミン酸ラセマーゼによって L-グルタミン酸から生合成されるか、あるいは、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼによるアミノ基転移反応によって D-アラニンから生合成されている可能性が考えられる。そこで、クルマエビの雄の生殖腺を用いてそれぞれの酵素活性を測定する。

グルタミン酸ラセマーゼも D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼも酵素活性は、生成物である D-グルタミン酸の生成量を定量することで測定を行う。D-グルタミン酸の定量は、従来 D-、L-アミノ酸の測定で用いていたオルトフタルアルデヒドおよび Boc-L-Cys によりプレカラム誘導体化を行い、ODS カラムを用いた HPLC によって測定できるが、96 分と長い分析時間を要するため、短時間で D-グルタミン酸含量の測定を可能とするキラルカラムを用いた HPLC による酵素活性測定法を確立する。

4. 研究成果

(1)クルマエビ生殖腺における D-グルタミン酸の分布

クルマエビの雄の生殖腺を精巣、精管お

よび生殖口に分けて D-グルタミン酸含量の測定を行ったところ、いずれの組織においても D-グルタミン酸が検出され、特に精管において多量の D-グルタミン酸が存在することが明らかとなった。さらに、全グルタミン酸に占める D 体の割合も全ての組織で L 体を上回っており、精管ではおよそ 80%を D 体が占めていた。

生殖腺の成熟過程における D-グルタミン酸含量の変動を明らかにするために、18g、20g、30g および 40g のクルマエビを用いて各生殖組織における D-グルタミン酸含量の測定を行ったところ、精巣における D-グルタミン酸含量はほとんど違いが認められなかったが、精管および生殖口では 20g の個体が最も D-グルタミン酸含量が高い傾向が認められた。したがって、18g のクルマエビは生殖腺も小さく、未成熟であると考えられるが、20g 程度の個体が最も D-グルタミン酸の生産量が高いものと考えられた。

雌のクルマエビの生殖補助器には交尾後に交尾栓があることから、雄由来の精包が生殖補助器に貯蔵されているか判別することができる。そこで、交尾栓のあるものかないもの両方の雌の生殖補助器についても D-グルタミン酸含量の測定を行ったところ、交尾栓のある個体で D-グルタミン酸が検出されたことから、オスの精包に D-グルタミン酸が含まれているものと考えられた。一方、交尾栓のない個体においても D-グルタミン酸が検出されたものがみられた。雌は産卵をするまで雄由来の精包を生殖補助器に貯蔵しており、産卵の際に精包も同時に海水中に放出することで受精が行われる。したがって、産卵時期ではない雌が交尾をすると、産卵はせず脱皮の際に交尾栓が外れるが、その際に雄由来の精包の一部が残ってしまう場合があるのではないかと考えられた。

D-グルタミン酸が検出された雄の生殖組織である精巣、精管、生殖口および雌の生殖補助器を用いて抗 D-グルタミン酸抗体を用いた免疫染色により細胞内分布について検討を行った。その結果、精管および生殖口では精子細胞に D-グルタミン酸が発現していることが明らかとなった。また、精巣では、D-グルタミン酸は精細管の精祖細胞に特異的に発現していることが明らかとなった。雄の生殖腺には D-アラニンも存在していることから、抗 D-アラニン抗体を用いて同様に免疫染色を行ったところ、精巣では精祖細胞や精母細胞に D-アラニンの発現が認められたが、精子細胞には発現は認められなかったことから、D-グルタミン酸とは生理機能が異なることが示唆された。

さらに、雌の生殖補助器の貯精嚢には雄の精包に由来する精子細胞が多量に検出され、この精子細胞においても D-グルタミン酸の

発現が認められたことから、D-グルタミン酸はクルマエビの生殖機能において重要な役割を果たしているものと考えられた。

クルマエビを 150%の海水に順応させた際の生殖腺における D-グルタミン酸含量の測定を行ったところ、精巣では D-アラニンの増加は認められたが、D-グルタミン酸の増加は認められなかった。しかしながら、雄の各生殖組織に存在している D-グルタミン酸の生理機能を明らかにするために、各組織のメタボローム解析を行ったところ、各組織の代謝産物のパターンは大きく異なっており、各組織の果たす役割はそれぞれ大きく異なることが示唆された。高塩濃度海水順応では、D-グルタミン酸生合成は誘発されなかったが、D-グルタミン酸はクルマエビの生殖機能に重要な役割を担っていることが本研究で明らかとなったため、今後は生殖機能においてどのような働きを有するものであるか、詳細に検討を行っていく。

(2) グルタミン酸生合成酵素の探索

グルタミン酸生合成酵素反応の生成物である D-グルタミン酸を測定する酵素活性測定方法として、キラルカラムを用いた HPLC 測定法を確立した。キラルカラムは Sumichiral OA-6000 を用い、15 分で D-,L-グルタミン酸の分離定量を可能とした。

クルマエビの雄の生殖腺を用いてグルタミン酸生合成酵素として考えられるグルタミン酸ラセマーゼおよび D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性の測定を行った。グルタミン酸ラセマーゼは細菌類に存在することが明らかにされており、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは細菌類や植物に存在することが明らかにされているが、いずれも動物では検出された例はないため、様々な条件検討を行ったが、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性は検出されなかった。一方、グルタミン酸ラセマーゼ活性を動物で初めて検出することに成功した。

細菌類のグルタミン酸ラセマーゼの触媒残基はシステインであることが報告されているが、クルマエビのグルタミン酸ラセマーゼも酵素反応液中に 2-メルカプトエタノールを添加しないと活性が検出されないことから、システイン残基が酵素反応に重要であることが示唆された。また、他のアミノ酸ラセマーゼの補酵素として知られているピリドキサル 5-リン酸要求性は認められなかった。今後は、酵素の諸性質を明らかにするとともに、細菌類のグルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列および塩基配列をもとに、cDNA クローニングを行い、一次構造解析を行っていく。

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3件)

Naoko Yoshikawa, Masahumi

Yokoyama, Effects of high- salinity seawater acclimation on the levels of D-alanine in the muscle and hepatopancreas of kuruma prawn

Marsupenaeus japonicus, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 査読有, 2015 (in press)

DOI: 10.1016/j.jpba.2015.05.003

吉川 尚子, 甲殻類における遊離型 D-アミノ酸の生理機能, D-アミノ酸学会誌, 査読無, Vol.2, No.1, 2014, pp.7-11

吉川 尚子, クルマエビにおける D-アラニンの機能解析, Journal of the Society of Japanese Women Scientists, 査読無, Vol.14, 2014, pp.16-20

[学会発表](計2件)

吉川 尚子, 早坂 恵, 澤田 直美, クルマエビ生殖腺における D-グルタミン酸の分布, 第 87 回日本生化学会, 2014 年 10 月 17 日, 京都国際会議場 (京都府京都市)

吉川 尚子, 甲殻類における遊離型 D-アミノ酸の生理機能, 第 9 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 奨励賞受賞講演, 2013 年 9 月 6 日, 関西大学千里山キャンパス 100 周年記念会館 (大阪府吹田市)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:

国内外の別:

[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)
静岡理科大学・理工学部・講師
研究者番号: 30392533

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: