

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06740

研究課題名（和文）L-グルタミン酸からはじまる哺乳類D-アミノ酸ワールド

研究課題名（英文）L-Glutamate as the Source of Mammalian D-Amino Acid Diversity

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理工学部門・准教授

研究者番号：10448392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、多くの動物からD-アミノ酸が発見され、その生理機能が明らかとなってきている。本研究では、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が脊椎動物、特に哺乳類においてどのように分布するかを明らかにした。幾つかの系統を除いて、魚類、両生類、爬虫類に広くアミノ酸ラセマーゼが分布しており、哺乳類では全ての系統においてセリンラセマーゼが存在が存在していた。これらの発見により、D-アミノ酸が脊椎動物においても普遍的に合成され、共通する生理機能を持つ可能性が指摘された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、D-アミノ酸が無脊椎動物に限らず脊椎動物にも広く存在し、普遍的にD-アミノ酸が合成されており、共通する生理機能をもつ可能性を示した。本研究で、多くの動物からアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が特定されたことにより、その発現量や、発現時期、酵素機能などの解析、また遺伝子のノックアウトなどによりアミノ酸ラセマーゼ及びD-アミノ酸の生理機能研究が進展することが期待される。また、D-アミノ酸は様々な疾患に関与することも指摘されており、本研究の成果は医療および薬学分野において新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, D-amino acids have been discovered in many animals, and their physiological functions have been elucidated. This study has revealed how the gene for the amino acid racemase, an enzyme that synthesizes D-amino acids, is distributed in vertebrates, particularly mammals. Except for a few lineages, amino acid racemase is widely distributed among fish, amphibians, and reptiles, and serine racemase was found in all mammalian lineages examined. These findings suggest that the synthesis of D-amino acids is a universal trait in vertebrates, potentially indicating a common physiological function.

研究分野：比較生化学

キーワード：D-アミノ酸

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

かつては生体内には存在しないとされていた D-アミノ酸が、分析技術の発達に伴い、多くの動物から検出されている。申請者は環形動物ケヤリに D-アルギニンが存在し、これが ATP のリン酸基の貯蔵源として機能することを示した。哺乳類からは多くの D-アミノ酸が検出され、特に D-アスパラギン酸はメラトニンやプロラクチンの分泌を調節し、D-セリンは統合失調症やアルツハイマー病に関与することが知られていた。さらに、最近の研究では、心不全状態になると D-グルタミン酸の細胞内濃度が大きく変化することが報告されており、これが心不全の病態にどのように影響を与えるのかについても興味を持たれている。

D-アミノ酸が動物に存在することが明らかになるにつれて、D-アミノ酸の生理機能を解明するために、その合成酵素の特定も進展し、多くの研究者によって詳細な解析が行われた。細菌では主にアミノ酸ラセマーゼという酵素によって、L-アミノ酸から D-アミノ酸が合成され、この合成酵素は基質となるアミノ酸の種類に応じて、アラニンラセマーゼやセリンラセマーゼなど、多くの異なる種類のアミノ酸ラセマーゼが報告されていた。動物においても、1999 年にマウスからセリンラセマーゼが単離され、各種条件下での遺伝子発現量の比較や、ノックアウトマウスの解析が行われた結果、D-セリンの生理機能に関する研究が飛躍的に進展し、その後の研究が大きく前進することとなった。

申請者は、無脊椎動物の 10 の動物門に属する生物からセリンラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼ、アスパラギンラセマーゼ及びグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を単離し、これらの酵素が動物界全体において普遍的に D-アミノ酸を合成する役割を果たしていることを明らかにした。申請者の研究により、無脊椎動物には広範囲にわたってアミノ酸ラセマーゼが分布していることが明らかになった。しかし、脊椎動物におけるアミノ酸ラセマーゼの分布についてはほとんど解明されておらず、現在のところ、哺乳類のマウス、ヒト、ラットからセリンラセマーゼが単離されているのみであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物、特に哺乳類におけるアミノ酸ラセマーゼの分布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と共に D-アミノ酸の合成酵素として知られる D-アミノ酸アミノ基転移酵素が哺乳類に存在するかどうかを解明することも目指した。

### 3. 研究の方法

脊椎動物には図 1 に示したような様々な系統が存在する。

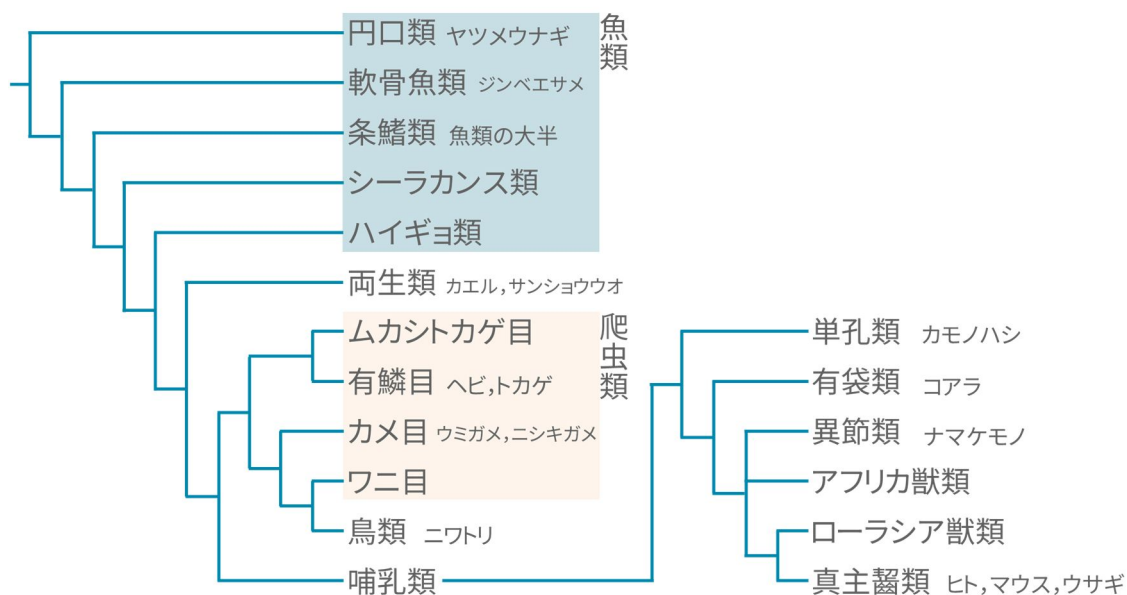


図 1 脊椎動物の分類

本研究では、まず魚類の円口類ヤツメウナギ、軟骨魚類ジンベエザメ、条鰭類ゼブラフィッシュ、シーラカンス類シーラカンス、ハイギョ類ハイギョ、両生類のカエル、サンショウウオ、爬虫類の有鱗目ヘビ、トカゲ、カメ目ウミガメ、ニシキガメ、ワニ目ワニ、鳥類のニワトリ、哺乳類の単孔類カモノハシ、有袋類コアラ、異節類ナマケモノ、新主齧類ウサギを研究対象とした。これらの脊椎動物の生物種は GenBank でゲノム配列が公開されている。そこで、そのゲノム配列中に存在するアミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素遺伝子の候補配列の探索を行った。他の動物や細菌で報告されているアミノ酸ラセマーゼ及び D-アミノ酸アミノ基転移酵素

のアミノ酸配列を Query として、これらの脊椎動物のゲノム配列をデータベースとした BLAST 検索によってその相同遺伝子の探索を行った。

次に、BLAST 検索によって発見された各生物のゲノム中に存在するアミノ酸ラセマーゼ及び D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子について、アミノ酸配列アライメントや分子系統解析を行い、実際にアミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素活性が期待できる遺伝子を選別した。

得られたアミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子について、それぞれのアミノ酸配列を元に、大腸菌発現用にコドン最適化した cDNA 配列を設計し、人工遺伝子合成によって、遺伝子の単離とクローニングを行った。さらに、大腸菌を利用したタンパク質発現ベクターに遺伝子をサブクローニングし、タンパク質発現系の構築を行った。また、タンパク質発現に関する様々な条件検討を行い、可溶性のリコンビナントタンパク質として、アミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子を発現させ、アフエニティークロマトグラフィーによる精製を行った。

精製されたアミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子のリコンビナントタンパク質を用いて、各種アミノ酸を基質としたラセマーゼ活性またはアミノ基転移活性の有無の確認を行った。酵素の活性の確認は、反応によって生じた L または D-アミノ酸を誘導体化し、逆相 HPLC によって検出、定量することで行った。酵素活性が確認された酵素と基質の組み合わせについては、さらに、基質濃度を変えて反応速度を測定することで、詳細な酵素活性パラメータの決定も行った。

#### 4. 研究成果

脊椎動物の核分類群の生物種のゲノムからアミノ酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子を探した結果、多くの動物からそれらの候補遺伝子が発見された。しかし、円口類ヤツメウナギ、条鰭類ゼブラフィッシュ、ハイギョ類ハイギョ、爬虫類の有鱗目ヘビ、トカゲ、ワニ目ワニのゲノム中からはアミノ酸ラセマーゼも D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子が発見することはできなかった。

また、いくつかの生物種で、D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子が発見したが、現在までに、それらの遺伝子がアミノ基転移活性を有していることを確認することはできていない。その原因としては、D-アミノ酸アミノ基転移酵素の候補遺伝子に実際にアミノ基転移活性がなく、その他の酵素機能を持つ遺伝子であった可能性、リコンビナントタンパク質の精製量が少なく、また酵素活性が微弱であるため検出できなかった可能性、リコンビナントタンパク質のフォールディングに問題があった可能性などが考えられた。これらの可能性の検討は今後の研究で行う必要がある。

一方で、軟骨魚類ジンベエザメ、シーラカンス類シーラカンス、両生類のカエル、サンショウウオ、哺乳類の単孔類カモノハシ、有袋類コアラ、異節類ナマケモノ、新主嚙類ウサギのゲノム中にはアミノ酸ラセマーゼの候補遺伝子が存在していた。そこで、これのアミノ酸ラセマーゼの候補遺伝子のリコンビナントタンパク質について各種アミノ酸に対するラセマーゼ活性を確認したところ、いずれの酵素タンパク質も 1 つから 3 つのアミノ酸に対するラセマーゼ活性を示した。そして、詳細な酵素活性パラメータの比較によって、本研究で単離されたアミノ酸ラセマーゼがセリンラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼ、またはグルタミン酸ラセマーゼであることが確認された。これにより、脊椎動物において、少なくとも三種類のアミノ酸ラセマーゼが存在し、広く分布していることが明らかになった。

哺乳類においては、全ての系統の生物種のゲノム中にアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が少なくとも 1 種類は存在し、これらが全てセリンラセマーゼとしての機能を持つことが明らかになった。また、原始的な哺乳類からヒトに至るまでの系統において、セリンラセマーゼの活性に大きな違いがあることも確認され、哺乳類の進化とセリンラセマーゼの活性の強弱に関連があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uda Kouji, Moe Luke A	4. 巻 172
2. 論文標題 Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. II. Frequent and widespread parallel evolution of aspartate racemase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 303～311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac067	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山 優斗, 枝重 裕美香, 宇田 幸司
2. 発表標題 環形動物に存在するアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の単離と機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下田瑛策, 宇田幸司
2. 発表標題 脊椎動物におけるセリンラセマーゼの分布
3. 学会等名 第16回 D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------