

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770080

研究課題名（和文） 動物界における D-アルギニンの分布と代謝に関する研究

研究課題名（英文） The distribution and metabolism of D-arginine in animals.

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・助教

研究者番号：10448392

研究成果の概要（和文）：

D 体のアミノ酸(D-アミノ酸)は生体内には存在しない非生体型のアミノ酸であると考えられてきたが、近年の研究から D-アミノ酸が様々な生物に存在し、重要な生理機能を果たすことが明らかとなってきた。本研究では動物界に存在する D-アルギニンとそれを基質とするアルギニンキナーゼの分布を確認した。また、ケヤリ・アルギニンキナーゼの基質認識機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Recent research has demonstrated that D-amino acids are widely distributed in living organisms, from bacteria to mammals, and play a key role in specific physiological functions, although the full picture is not yet known. In this study, we isolated D-arginine and arginine kinase from various animals. Furthermore, we propose a unique substrate-recognition system for *Sabellastarte* arginine kinase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：比較生化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：D-アミノ酸，アルギニンキナーゼ，D-アルギニン

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸には、L 体と D 体の二種類の鏡像異性体が存在しているが、動物の生体内には L 体のアミノ酸のみ存在し、D 体のアミノ酸(D-アミノ酸)は生体内には存在しない非生体型のアミノ酸であると考えられてきた。

しかし、1980 年代以降、光学分割技術の発達により、多くの動物に遊離の D-アミノ酸が存在することが明らかになり、その存在と、

生理的な役割の解明に多くの研究者が取り組むようになった。

申請者は環形動物類のケヤリ(*Sabellastarte indica*)において、生体内の遊離アルギニンのうち、実に 94%が D 体の D-アルギニンであること、そして遊離アルギニンリン酸の 92%が D 体(D-アルギニンリン酸)であることを確認し、D-アルギニン及びその誘導体が生体内に存在することを初めて報

告した。また、ATPのリン酸基をL体またはD体のアルギニンに転移し、L-またはD-アルギニンリン酸を合成することのできる特殊なアルギニンキナーゼ遺伝子をケヤリから単離することにも成功した。

これらのことにより、D-アルギニンがケヤリ生体内に存在し、その生理的機能がATPのリン酸基の貯蔵であることを明らかとした。

アルギニンキナーゼはフォスファゲンキナーゼファミリーの酵素であり、このファミリーの酵素は全て共通の祖先遺伝子から進化したとされている。ケヤリのアルギニンキナーゼも他のフォスファゲンキナーゼと40%程度のアミノ酸一致率を示し、共通祖先遺伝子からの進化を強く示唆していた。しかしながら、これまでアルギニンキナーゼはL-アルギニンのみを基質として利用し、D-アルギニンを基質として利用することができないとされてきた。実際に申請者が幾つかの無脊椎動物由来のアルギニンキナーゼでD-アルギニンに対する活性を調べたが、全く活性は示さず、今のところ、D-アルギニンに対する活性を示すのはケヤリ・アルギニンキナーゼのみであると考えられている。

2. 研究の目的

(1) 動物界における D-アルギニンの分布とその代謝経路の解明

様々な動物において D-アルギニンの有無を確認し、D-アルギニン及びその代謝酵素であるアルギニンキナーゼが動物界においてどのように分布して存在するかを明らかにする。

(2) 光学選択性を持たないアルギニンキナーゼの基質認識機構の解明と改変

ケヤリから単離されたアルギニンキナーゼは、光学異性体の関係にあるL-アルギニンとD-アルギニンの両者を基質として利用する非常に特異な酵素である。このケヤリ・アルギニンキナーゼがどのような基質認識機構によってL-アルギニンだけでなく、D-アルギニンをも基質として利用することができるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物界における D-アルギニンの分布とその代謝経路の解明

様々な動物門の生物について、生体サンプルからアルギニンを抽出し、その光学活性(D/L)の確認を行った。また、生体サンプルからmRNAを抽出しRT-PCRによってフォスファゲンキナーゼ遺伝子を単離した。さらにそのリコンビナント酵素を用いて酵素活性測定を行い、その酵素機能を明らかにした。

(2) 光学選択性を持たないアルギニンキナーゼの基質認識機構の解明と改変

ケヤリから単離された、L-及びD-アルギニンの両者に対して触媒活性を示すアルギニンキナーゼの、それぞれの基質に対する基質認識部位の特定を進めた。具体的な手法としては、既に発現ベクターに組み込まれているケヤリ・アルギニンキナーゼ遺伝子に対して、部位特異的突然変異導入法により、アミノ酸置換変異体を作製し、その詳細な酵素活性の比較により解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 動物界における D-アルギニンの分布とその代謝経路の解明

環形動物類のケヤリ (*Sabellastarte indica*)の生体内には高濃度で遊離 D-アルギニンと、そのリン酸化化合物である遊離 D-アルギニンリン酸が存在している。また、D-アルギニン及び L-アルギニンを共に基質として利用し、D-アルギニンリン酸及び L-アルギニンリン酸を合成することのできる特異なアルギニンキナーゼが存在している。本研究では、無脊椎動物全般からアルギニンキナーゼを含むフォスファゲンキナーゼファミリーの遺伝子を単離し、その進化的背景を明らかにすると共に、D-アルギニンを基質として利用できるアルギニンキナーゼがケヤリにのみ存在するのかどうかを確かめた。

本研究では、特に海洋無脊椎動物の内、棘皮動物と刺胞動物を対象を絞って研究を進めた。棘皮動物門から3種類のウニ類、9種類のウミシダ類、刺胞動物門からネマトステライソギンチャクを選び、フォスファゲンキナーゼファミリー遺伝子の単離を行った。その結果、3種のウミシダ類とネマトステライソギンチャクからフォスファゲンキナーゼ遺伝子を単離することに成功した。特に、ネマトステライソギンチャクから単離されたフォスファゲンキナーゼは、細胞質型のアルギニンキナーゼ、遺伝子重複と融合によって生じた2ドメインアルギニンキナーゼ及び3ドメインアルギニンキナーゼ、細胞質型クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア型クレアチンキナーゼが2つ、3ドメイン構造の鞭毛型クレアチンキナーゼと7種類に及ぶ多様なものであった。

さらに、これらのアルギニンキナーゼ遺伝子を pET30b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いたリコンビナントタンパク質発現系を構築した。そして、これらのフォスファゲンキナーゼのリコンビナント酵素を作成し、詳細な酵素活性の測定と比較を行った。

その結果、得られたフォスファゲンキナーゼは何れも D-アルギニンに対しての酵素活性を持たず、D-アルギニンを基質とするフォスファゲンキナーゼが環形動物のケヤリにのみ特異的に存在することが強く示唆され

た。一方で、ネマトステライソギンチャクから単離されたアルギニンキナーゼは非常に弱いアルギニンキナーゼ活性しか示さず、未知のグアニジノ化合物を基質とすることが強く示唆された。現在までに、フォスファゲンキナーゼファミリーの酵素として、アルギニンキナーゼ、クレアチンキナーゼ、グリコシアミンキナーゼ、タウロシアミンキナーゼ、ハイポタウロシアミンキナーゼ、オフェリンキナーゼ、サラセミンキナーゼの7種類が知られているが、本研究で発見されたネマトステライソギンチャクのフォスゲンキナーゼはこれら以外の新規フォスファゲンキナーゼの可能性もある。今後はこの酵素について、その酵素機能解析と、基質グアニジノ化合物の特定を早急に進める必要がある。

(2) 光学選択性を持たないアルギニンキナーゼの基質認識機構の解明と改変

環形動物類のケヤリ (*Sabellastarte indica*) の生体内にはD-アルギニン及びL-アルギニンから D-アルギニンリン酸及び L-アルギニンリン酸を合成することのできる特異なアルギニンキナーゼが存在している。

これまでの申請者の研究によって、ケヤリのアルギニンキナーゼでは L-アルギニン及びD-アルギニンの認識に 54, 64, 89, 320 位のアミノ酸残基が関与することが明らかになっていた。

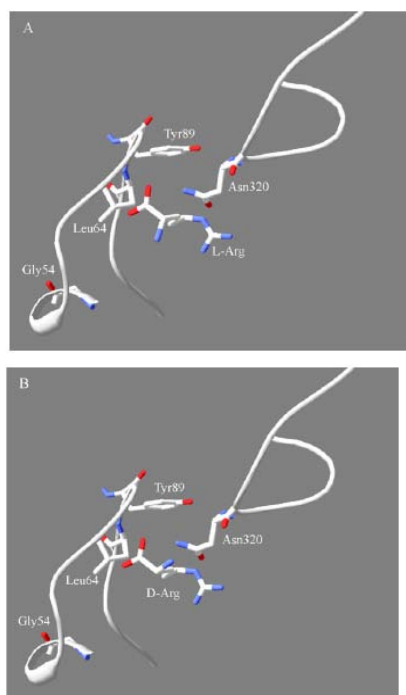


図1 ケヤリ・アルギニンキナーゼの立体構造予測とL-アルギニン(A)及びD-アルギニン(B)との結合部位予測

これらのアミノ酸残基はケヤリ・アルギニ

ンキナーゼの立体構造予測及び基質結合部位予測において、基質 D-アルギニンまたは L-アルギニンの近傍に位置することが示唆された(図1)。

本研究では、これらのアミノ酸残基を中心に数十のアミノ酸置換変異体を作成し、そのリコンビナント酵素を用いて詳細な酵素活性の測定と比較を行った(図2)。

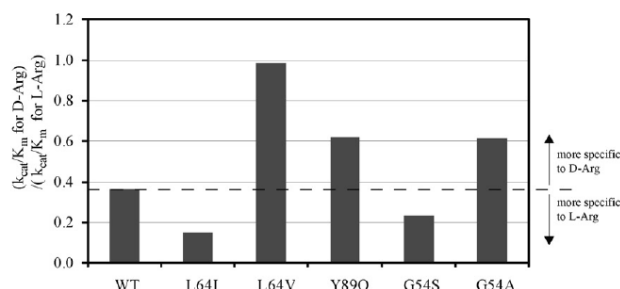


図2 ケヤリ・アルギニンキナーゼ野生型酵素とアミノ酸置換変異体の触媒効率の変化

その結果、これらのアミノ酸残基への様々なアミノ酸置換変異体が野生型酵素に比べL-アルギニン及びD-アルギニンへの基質特異性を大きく変化させることが確認された。特にL64I変異体は野生型酵素に比べL-アルギニンに対してより強く働くようになり、逆にL64V変異体はD-アルギニンに対してより強く働くようになった。一方で、これらの変異体酵素はもう一つの基質であるATPへの基質親和性をほとんど変化させないことも明らかとなった。

本研究で得られた結果をもとに、今後もケヤリ・アルギニンキナーゼにおけるL-及びD-アルギニンの両光学異性体の認識機構の解明を進める予定である。

また、それらの研究成果を踏まえて、光学選択性を持たないケヤリ・アルギニンキナーゼに対して人工的に光学選択性を持たせること、つまり、L-またはD-アルギニンのどちらかのみを基質として利用する変異体酵素の作製も試みる。

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6件)

- ① Uda K., Komeda Y., Koga K., Fujita T., Iwasaki N., Suzuki, T. (2011) Complete mitochondrial genomes of two Japanese precious corals, *Paracorallium japonicum* and *Corallium konojoi* (Cnidaria, Octocorallia, Coralliidae): Notable differences in gene arrangement. *Gene* 476: 27-37. 査読有.
- ② Uda K., Ishida M., Matsui T., Suzuki,

T (2010) Arginine kinase from the tardigrade, *Macrobiotus occidentalis*. Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. *Zoological Science* 27: 795-803. 査読有.

- ③ Uda K., Matumoto, A., Suzuki, T (2010) Identification of key amino acid residues distinguishing chiral guanidino substrates (D- and L-arginine) in *Sabellastarte* arginine kinase. *J. Molecular Catalysis* 64: 75-80. 査読有.

[学会発表] (計2件)

- ① 宇田幸司, ミダレウミシダのフォスファゲンキナーゼ遺伝子の単離とその酵素活性, 日本動物学会, 2011年9月22日, 大雪クリスタルホール(北海道)
- ② 宇田幸司, クマムシのアルギニンキナーゼ遺伝子の単離とその酵素活性, 日本動物学会, 2009年9月19日, 静岡グランシップ (静岡県)

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・助教

研究者番号: 10448392