

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580307

研究課題名(和文) ヒジキD型アスパラギン酸の生理機能および代謝機構

研究課題名(英文) Physiological function and metabolism of D-aspartate in *Sargassum fusiforme*

## 研究代表者

横山 雄彦 (YOKOYAMA, TAKEHIKO)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：60296431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然界にはL-アミノ酸のみが存在しているものだと考えられていたが、分析技術の発展により海藻を含む様々な真核生物から遊離D-アミノ酸が存在していることが明らかにされてきた。海藻では特にヒジキに多量のD-アスパラギン酸が存在しているが、葉部では中心部に局在しており、環境の状況に応じて増減することが明らかになった。低酸素条件下およびその状態から通常の状態への回復条件下において、ヒジキアミノ酸の増減を調べたところ、D-およびL-アスパラギン酸のみが増減した。これらのことからヒジキD-アスパラギン酸は低酸素下でのエネルギー代謝と関係があることが予想された。

研究成果の概要(英文)：Although only L-amino acids were thought to occur naturally, recent advances in analytical techniques have led to the identification of various free D-amino acids in eukaryotic organisms, including seaweeds. We detected high levels of D-aspartate in *Sargassum fusiforme*, and the functional significance of this amino acid is supported by its specific localization in the medullary layer of blades and quantitative variation due to changes in environmental conditions. We examined changes in the contents of several amino acids, including D-aspartate, in the brown alga *S. fusiforme* under hypoxic stress as well as their subsequent recovery from the stress. Of the amino acids examined, only D- and L-aspartate showed changes in concentrations during hypoxia in a parallel manner. These observations suggest that aspartate in *S. fusiforme* may be involved in anaerobic energy metabolism during the initial stages of anoxia.

研究分野：水産化学

キーワード：D-アスパラギン酸 ヒジキ

## 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸はL-アミノ酸の鏡像異性体であり、細菌のペプチドグリカン層の構成成分として存在することは既に知られている。ところが真核生物では稀な物質とされてきたD-アミノ酸が細菌以外の生物にも存在し、種々の生理機能を持つことが徐々に明らかになりつつある。

申請者らは三陸周辺の様々な藻類におけるD-アミノ酸の分布について調べ、ヒジキには遊離D-Asp(以下全て遊離)が他の海藻の200倍以上含まれていることを明らかにし、また、D/(D+L)-Aspの割合はほとんどの海藻が1%以下であったのに対し、ヒジキには季節に関わらず50%程度存在しているという興味深い結果も得ている。ヒジキと同じ *Sargassum* 属であり、潮間帯というヒジキと同じような環境に生育している種でも、このような事象は認められず、多くの海藻の中でもこれはヒジキに特有の現象であると考えられた。

しかしながら、海藻を含む植物におけるD-Aspの生理機能および代謝機構は全く解明されておらず、特に、真核生物D-Aspの代謝酵素(合成系)は、アカガイでAspラセマーゼが報告されているのみであり、研究の進展が待たれる状況にある。ヒジキは本来なら真核生物が利用しないはずのD-Aspを蓄積している極めて稀な種であることから、植物におけるD-Aspの生理機能および代謝機構を研究するうえで極めて有利な実験材料と考えられた。

## 2. 研究の目的

### (1) ヒジキ D-Asp の生理機能の解明

申請者らはヒジキD-Aspの生理機能を明らかにする突破口にするため、D-Aspに特異的に反応するポリクローナル抗体を調製し、ヒジキにおける局在を調べた。その結果、D-Aspはヒジキを輪切りにした時の中心部に局在していることを明らかにした。海藻は陸上植物に比べ根、茎、葉の分化が進んでいないものの、ヒジキと同じ褐藻綱に属するマコンブでは髄層と呼ばれる中心部が維管束植物の師管の役割を持っており、光合成産物が生長点に向かって移動していることが報告されている。したがって、同じ褐藻綱に属するヒジキのD-Aspも老廃物として蓄積されたものではなく、活発に流動している物質であることが推測され、何らかの生理機能を持つことが予想される。以上のことをふまえて、D-Aspの生理機能の一端を明らかにするためには、ヒジキ葉部の先端付近にある生長点付近への流動を調べることが必須で、それによって生理機能解明の新たな知見を得られると考えている。

### (2) ヒジキ D-Asp の代謝機構の解明

申請者らはヒジキからD-Asp合成能力のあるアスパラギナーゼ活性を発見した。今のところヒジキエキスにその基質となるD-アスパラギン(Asn)の存在を証明できていないため、その代謝経路は謎のままである。しかしながら、予備的実験により、ヒジキアスパラギナーゼ反応では、D-Asnを基質とした場合D-Aspが生成され、L-Asnを基質とした場合はL-Aspが生成されることが明らかになった。

アスパラギナーゼが1つの酵素でD-およびL-Asnを基質にする可能性もあるが、それぞれが別々の酵素により生合成されていることも充分ありうる。したがって、一般に認められるL-アスパラギナーゼとは異なる“D-アスパラギナーゼと呼ぶべき酵素が存在している”という仮説も成り立つ。以上のことをふまえて、この仮説の検証を行うために、精製および前駆物質の探索を行い、代謝機構の一端を明らかにしたいと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒジキ D-Asp と L-Asp の局在の比較

抗D-Asp抗体を用いて局在を調べる一方で、抗L-Asp抗体を調製し、D-AspとL-Aspの局在を比較することによって、両者の働きの違いを明確にする。そうすることによって、生理機能のより核心に迫る結果を得られると考えている。L-Aspを染色する方法はD-Aspと同様の手法を用いる。抗L-Asp抗体の作製は業者に委託した。

### (2) D-Asp の生理機能の推察

Aspは低酸素に耐性を持つ二枚貝で、低酸素条件下の初期段階におけるエネルギー代謝物質として消費されることが知られている。特に、アカガイではL-Aspと同様にD-Aspも低酸素条件下の初期段階において消費されることが示されている。ヒジキは潮間帯に生息しており、秋から冬の間は干潮が夜になるためその間は空気中にさらされる。夜なので光合成ができないことと、海藻は水を介して呼吸をするため、水がなければ呼吸速度が著しく減少する。したがって、ヒジキは秋から冬の夜は低酸素条件下にさらされることになる。以上のことから、低酸素条件下におけるヒジキAspの増減を調べた。

### (3) D-Asp 合成経路の探索

アスパラギナーゼ活性の存在は既に確認済みであるが、D-Asp合成への関与の妥当性を証明するためには、前駆物質となるD-AsnまたはD-Asn合成酵素の存在を証明する必要がある。D-Asnは微量であるか光学分割が完全でないため存在を確認できない可能性が

あると考えている。したがって、現在行っている光学分割のためのアミノ酸誘導体化試薬とは別の試薬を用いるか、または、キラルカラムによる HPLC 光学分割検出を試みる。また、D-Asn を合成する可能性のある酵素は Asn ラセマーゼとアスパラギン-オキソ酸アミノトランスフェラーゼのみと考えられるため、これらの酵素活性の探索を行う。D-Asp 代謝関連酵素の検索方法は基本的に基質と酵素を反応させ、反応前後の物質の増減を HPLC による光学分割分析で検出する手法を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒジキ D-Asp と L-Asp の局在の比較

抗 D-Asp 抗体を用いて D-Asp の局在を調べたところ、ヒジキを輪切りにした時の中心部に局在していたのに対し、抗 L-Asp 抗体を用いて L-Asp の局在を調べたところ、中心部に局在している様子は認められなかった。ただし、細胞質に広く分布しているという点は同じであった。

##### (2) D-Asp の生理機能の推察

ヒジキを 10°C、暗条件下で、低酸素条件下においたところ、0-12h にかけて D-Asp は約 700 nmol/g (wet) (以下同様に表示)から 400 以下まで減少した。12-24h にかけてはそれ以上の減少は認められなかった。24h 後に低酸素条件下からエアレーションをして酸素がある条件に移すと、D-Asp は徐々に上昇することが認められた。なお、L-Asp も同様の変動を示したが、回復は D-Asp よりも L-Asp のほうが早かった。他のアミノ酸含量も測定したが、一定の傾向は認められなかった。以上のことより、ヒジキの D-Asp は L-Asp とともに低酸素条件下における初期のエネルギー源として利用されていることが示唆された。

##### (3) D-Asp 合成経路の探索

アスパラギナーゼ活性の存在は既に確認済みであると述べたが、D-Asp 合成への関与の妥当性を証明するためには、前駆物質となる D-Asn の存在を証明する必要があるため、HPLC によるアミノ酸の光学分割分析法の検討を行った。*N*-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine (Boc-L-Cys)という試薬と*o*-フタルアルデヒド (OPA)という試薬を用いたところ D-Asn と L-Asn を分離することができた。その結果、ヒジキからは D-Asn が検出されなかった。したがって、ヒジキに認められる D-Asp はアスパラギナーゼにより触媒されて生成している可能性は低いと予想された。

D-アミノ酸が海水にごく少量溶解していることは知られているが、ヒジキに存在している D-Asp は有意に高い。また、抗 D-Asp 抗体

による染色結果より、D-Asp は付着細菌由来するものではなくヒジキ自身に存在すると示唆される結果を得ている。ヒジキを低酸素条件下においたときの D-Asp の短時間の増減から、D-Asp を合成する何らかの酵素がヒジキに存在していると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Takehiko YOKOYAMA, Koji MIKAMI  
The Presence of Putative Serine Racemase/Dehydratase Genes in Seaweeds  
The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (Tochigi Prefectural Culture Center, Tochigi, Utsunomiya) 2014.09.03

横山雄彦・高田洸輔・難波信由(北里大海洋)・徳田雅治(水研セ増養殖研) 海藻 D-アスパラギン酸の分布 平成 26 年度日本水産学会春季大会 (北海道大学水産学部,北海道,函館) 2014.03.30

横山雄彦, 徳田雅治 低酸素条件下におけるヒジキ D-アスパラギン酸の変動 平成 25 年度日本水産学会秋季大会 (三重大学,三重,津) 2013.09.20

〔図書〕(計 1 件)

Takehiko Yokoyama, Koji Mikami  
Seaweeds: Agricultural Uses, Biological and Antioxidant Agents (Eds., Vitor H. Pomin)  
Nova Science Publishers, Inc (New York, USA)  
pp.135-155 (2014)  
Chapter 7) D-Amino acids and amino acid racemases in seaweeds.

〔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：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 雄彦 (YOKOYAMA, Takehiko)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：60296431

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし