

# 軟体動物における N-メチルアミノ酸に関する研究

環境生物化学講座 垂井 淳子

指導教官 山田 良平

解良 芳夫

高橋 祥司

## < 研究の背景と目的 >

生物の発生した原始地球上において、アミノ酸はラセミ体で存在していたと考えられる。しかし、原始生物の進化の過程で、L-アミノ酸のみが選択的に合成されるようになり、長年 D-アミノ酸は生物体内に存在しないものと考えられていた。ところが、アミノ酸の分離測定技術の進歩に伴い、多くの生物で D-アミノ酸の存在が認められるようになってきた。それら D-アミノ酸のひとつである D-アスパラギン酸の誘導體、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)は、興奮性の神経伝達を誘導することができるアゴニストとして知られている人工的に作られた化合物である。NMDA は生物に存在しないものとされていたが、1987年に Sato *et al.* が、アカガイ *Scapharca broughtonii* からこの化合物を単離・同定したことで、その存在が明らかとなった。一方、当研究室では、NMDA が生物界及び生体内にどのように分布し、どのような機能を持っているのかを解明するための一つの手段として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた NMDA の微量分離定量法が確立され、これまで様々な二枚貝における NMDA の分布が調べられた。この様に、NMDA が天然の化合物であることが明らかとなり、現在 NMDA の生物界における分布、代謝機能に大変興味を持たれている。そこで私は、NMDA が生体内でどのように機能しているのかを解明するため、まずアカガイ *Scapharca broughtonii* における NMDA の合成経路の探索を行った。

また、研究を行う中で、アカガイ足抽出液を HPLC で分析すると NMDA ピークの近傍に全く未知の 2 つのピークが出現していることに気がついた。このピークは微量分離定量法の条件やクロマトグラム上での挙動から、NMDA と良く似た構造である N-メチル-D-グルタミン酸(NMDG)及び N-メチル-L-グルタミン酸(NMLG)のピークである可能性が考えられた。NMDG が生物に存在するという報告は今までなく、一方、NMLG の存在はある種の細菌以外の生物においては未だ知られていない。NMDG、NMLG が生体内に存在すれば、生体内でどのように機能しているのか大変興味を持たれる。そこで、この未知物質の同定を試みた。

幾つかの同定方法により、アカガイ足抽出液において、NMDG 及び NMLG の存在が確認され、NMDG は天然に存在することが初めて明らかとなった。一方 NMLG は真核細胞生物においてその存在が初めて明らかになった。これまで NMDG、NMLG の動物中での分布は全く調べられていない。そこで、アカガイと同類の軟体動物、及び様々な動物組織における NMDG、NMLG の分布を調べた。更に NMDG、NMLG と構造的に良く似た物質である酸性アミノ酸の D,L-グルタミン酸(D,L-Glu)、NMDA、NMLA、D,L-アスパラギン酸(D,L-Asp)の含有量も調べ、NMDG、NMLG と関連性があるかどうか調べた。

## < 研究内容 >

1. アカガイにおける NMDA 生合成経路の探索
2. アカガイ足組織における NMDG、NMLG を同定
3. 軟体動物及び各動物組織における NMDG、NMLG、D,L-Glu、NMD,LA、D,L-Asp の分布

## < 微量分離定量法の原理 >

### ○ 2 級アミノ酸(NMDG, NMLG, NMDA, NMLA)の分析

2 級アミノ酸を(+)-あるいは(-)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate ((+),(-)-FLEC) と反応させて蛍光誘導體にするとともにジアステレオマーに変え、HPLC で D 体と L 体の分離を行う。

### ○ 1 級アミノ酸(D-Glu, L-Glu, D-Asp, L-Asp)の分析

1 級アミノ酸を o-phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine (OPA-NAC) と反応させて蛍光誘導體にするとともにジアステレオマーに変え、HPLC で D 体と L 体の分離を行う。

## < 1. アカガイにおける NMDA 生合成経路の探索 >

アカガイにおける NMDA 生合成系路の探索を行った。最近、D-アスパラギン酸(D-Asp)へのメチル基転移反応により NMDA が生合成されているという報告がなされたことから、この報告をもとに、アカガイ足または中腸腺（肝臓）ホモジネートに D-Asp とメチル基供与体である S-アデノシル-L-メチオニンまたはメチルアミンを加えてインキュベーションし、NMDA 生成量を HPLC で定量した。しかし、アカガイ足または中腸腺において、D-Asp のメチル化による NMDA の生成は認められなかった。

## < 2. アカガイ足組織における NMDG、NMLG の同定 >

アカガイ足抽出液を分析している際に、クロマトグラム上の NMDA ピークの近辺に、全く未知の2つのピークが検出された。このピークは NMDA 微量分離定量法の条件やクロマトグラムの挙動から NMDG、NMLG のピークである可能性が考えられた。そこでこの未知物質の同定を試みた。

そのためには、以下の4つの方法を用いた。

- 1) キラリティーの異なる誘導体化試薬を用いた HPLC 挙動の検討
- 2) N-メチル-D,L-グルタミン酸(NMD,LG)標準品との Cochromatography による同定
- 3) ブタ腎臓 D-アスパラギン酸オキシダーゼ(DASPO)による NMDG 消失を利用した同定
- 4) 薄層クロマトグラフィーを併用した同定

### アカガイ足組織からの NMDG、NMLG 抽出法

アカガイ足組織を約 0.3g 取り、5 倍容の過塩素酸を加え、ホモジナイズし、遠心分離により変性タンパクを除去した後、中和した。その後、陰イオン交換カラムで中性及び塩基性アミノ酸を除き、酸性アミノ酸が含まれる画分を得た。これを遠心濃縮乾固し、100 mM Na borate buffer (pH 9.0)に再溶解して抽出液とした。

### NMDG、NMLG の誘導体化法

アカガイ足抽出液を OPA-NAC 誘導体化試薬と反応させ、1 級アミノ酸を除いた後、(+)-あるいは(-)-FLEC 誘導体化試薬と 2 級アミノ酸を反応させた。L-システイン酸を加え、過剰な FLEC 誘導体化試薬を反応させ、100 mM Na acetate buffer (pH 4.0)を添加し、反応停止した。

## < 2.1. キラリティーの異なる誘導体化試薬を用いた HPLC 挙動の検討 >

アカガイ足抽出液をキラリティーの異なる(+)-FLEC あるいは(-)-FLEC で誘導体化し、クロマトグラム上の NMDG、NMLG ピークの溶出位置の逆転を見る方法で同定を試みた。アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液を(+)-FLEC あるいは(-)-FLEC で誘導体化した時、NMDG および NMLG と思われるピークの溶出位置は逆転した。この挙動は、NMD,LG 標準品を分析した場合と同じ挙動であった。

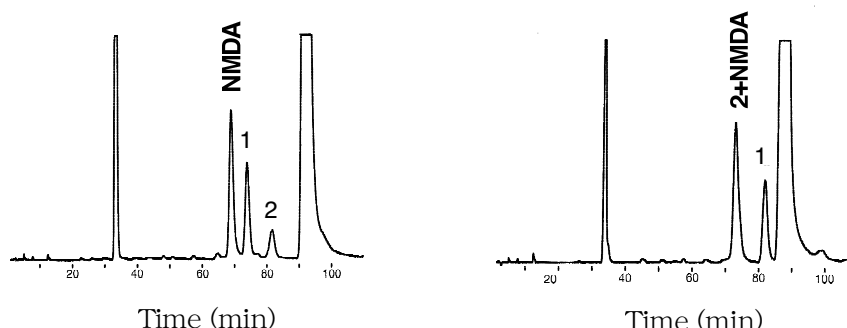
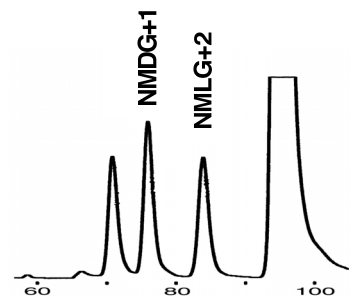


Fig. 1 キラリティーの異なる誘導体化試薬を用いてアカガイ足抽出液を誘導体化したときの HPLC クロマトグラム

※アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液を、(+)-FLEC で誘導体化(左)、または、(-)-FLEC で誘導体化(右)した後、HPLC で分析した。1,2 はそれぞれアカガイ足抽出液中の NMDG,NMLG と思われる物質のピークを示す。

### < 2.2. NMD,LG 標準品との Cochromatography による同定 >

次に Cochromatography による同定を試みた。NMDG、NMLG 標準品に、アカガイ足抽出液を加え、(+)-FLEC で誘導体化して分析すると、NMDG、NMLG 標準品のピーク面積が増加したのみで、付近に別のピークが出現することは無かった (Fig. 2)。



**Fig. 2** NMD,LG 標準品との Cochromatography を行ったときの HPLC クロマトグラム

※NMD,LG 標準品とアカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液を 1 : 1 で混合し、(+)-FLEC で誘導体化した後、HPLC で分析した。ピーク 1,2 はそれぞれ、アカガイ足抽出液中の NMDG,NMLG と思われる物質のピークを示す。

### < 2.3. ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼによる NMDG 消失を利用した同定 >

アカガイ足抽出液の NMDG と思われるピークについては、ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼで処理し、処理前後のピーク面積を比較することで同定を試みた。本酵素は以前当研究室の山田によりブタ腎臓ホモジネートから部分精製されたもので、D-Asp よりも NMDA を良い基質とすることが明らかになっているが、NMDG を基質とするかどうかは明らかになっていない。そこでまず始めに、NMD,LG 標準品を基質としたときの D-アスパラギン酸オキシダーゼ活性を測定し、NMDG がこの酵素の基質となり得るかどうか検討した。

#### < 2.3.1. ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質特異性 >

本酵素の活性測定は、基質である酸性 D-アミノ酸から酵素反応により生じる生成物  $\alpha$ -ケト酸を、2,4-dinitrophenylhydrazine と反応させ、生じたヒドラゾンの吸収を分光光度計(445 nm)により測定した。

その結果、NMD,LG 標準品を基質としたときの活性値と NMLG 標準品を基質としたときの活性値を比べると、NMD,LG 標準品を基質とした時の方が、酵素活性ははるかに高く、NMD,LG 標準品中の NMDG を基質として大部分の反応が起こっていると考えられたことから、ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼは NMDG をかなり良い基質とすることが明らかになった (Table 1)。

**Table 1** ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質特異性

	D-Asp	NMDA	NMDLG	D-Glu	NMLA	NMLG	L-Asp
酵素活性(nmol/min・ml)	7680	11100	1400	831	307	107	0
相対活性 (%)	100	157	19.8	11.8	4.35	1.51	0

※D-Asp に対する活性を 100 %としたときの酸性 D-アミノ酸に対する相対活性を示す。

#### < 2.3.2. HPLC を用いた NMDG 標準品の D-アスパラギン酸オキシダーゼ処理実験 >

ブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼは NMDG を基質とすることが明らかになったので、NMD,LG 標準品に含まれる NMDG が本酵素によって酸化され、HPLC で分析した時、HPLC クロマトグラムの NMDG ピークが消失するかどうか検討した。

その結果、NMDG 標準品ピークは、本酵素を加えた 4 hr のインキュベーションで完全に消失した。このことから、本酵素による処理は NMDG の同定に有効であることが示された (Fig. 3)。一方、NMLG ピークには、有意な変化は見られなかった。

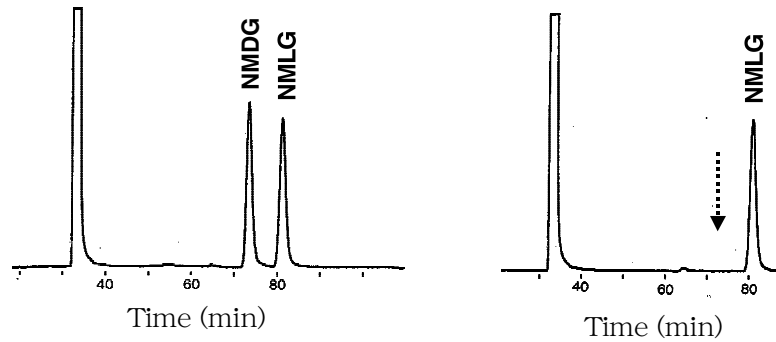


Fig. 3 NMD, LG 標準品をブタ腎臓 D-アスパラギン酸オキシダーゼで処理したときの HPLC クロマトグラム

※NMD, LG 標準品を(+)-FLEC で誘導体化した後、HPLC で分析したときのクロマトグラム (左)。NMD, LG 標準品に D-アスパラギン酸オキシダーゼを加え、37°C で 4 hr インキュベーションした後、(+)-FLEC で誘導体化し、HPLC で分析したときのクロマトグラム (右)。

< 2.3.3. HPLC を用いたアカガイ足抽出液の D-アスパラギン酸オキシダーゼ処理実験 >

HPLC クロマトグラムにおける NMDG 標準品ピークも本酵素によって完全に消失することが分かったので、アカガイ足抽出液をブタ腎臓由来 D-アスパラギン酸オキシダーゼで処理し、NMDG と思われるピークの変化を調べた。

その結果、NMDG 標準品と同一の挙動を示すピークは消失した (Fig. 4)。また、以前の報告で D-アスパラギン酸オキシダーゼは NMDA を最も良い基質とすることが明らかにされている。この酵素によってアカガイ足抽出液中の NMDA ピークが消失したのと同様に、NMDG と思われるピークも消失したことから、NMDG であることが強く示唆された。

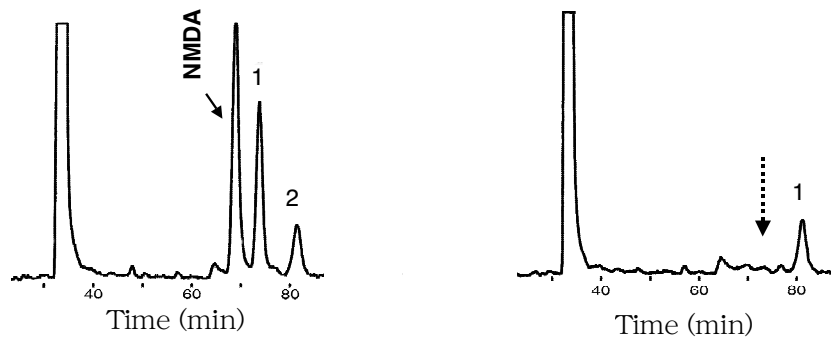


Fig. 4 アカガイ足抽出液をブタ腎臓 D-アスパラギン酸オキシダーゼで処理したときの HPLC クロマトグラム

※アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液を(+)-FLEC で誘導体化した後、分析した時の HPLC クロマトグラム (左)。アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液をに D-アスパラギン酸オキシダーゼを加え、37°C で 4 hr インキュベーションし、反応停止後、(+)-FLEC で誘導体化し、分析した時の HPLC クロマトグラム (右)。ピーク 1, 2 はそれぞれ、アカガイ足抽出液中の NMDG, NMLG と思われる物質のピークを示す。

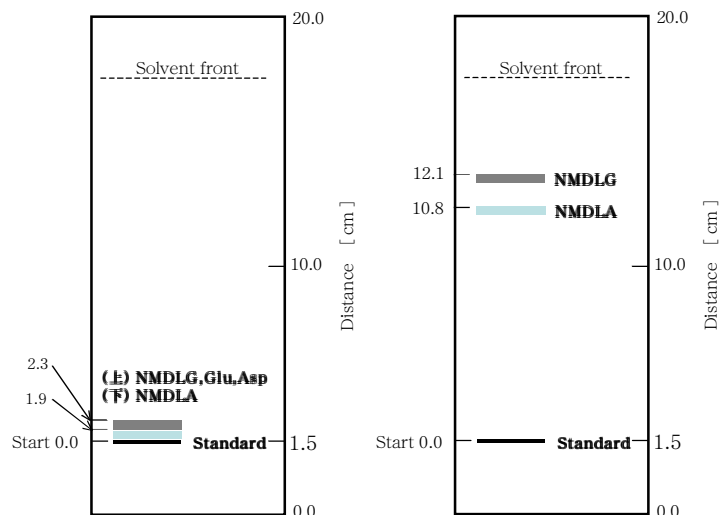
< 2.4. 薄層クロマトグラフィーを併用した同定 >

アカガイ抽出液中の NMDG, NMLG と思われるピークは、今まで陰イオン交換クロマトグラフィーと HPLC の 2 つの分離過程を経て検出していた。そこで他の化合物が抽出液中に存在する可能性を更に減らす

為、HPLC 分析に先立ち、薄層クロマトグラフィーによる NMD,LG の分離過程を加える方法を試みた。

### 実験操作

アカガイ足抽出液を、薄層クロマトグラフィープレートにガラス毛细管で塗布した。対照サンプルとして、25 mM NMD,LG 標準品を、プレートの両端から約 3 cm の場所にガラス毛细管で塗布した。展開溶媒には、*n*-butanol – water – acetic acid (3 : 1 : 1)を用いた。NMDA と NMD,LG は薄層クロマトグラフィーを 1 回展開しただけでは分離が悪かったため(Fig. 5 左)、これらのピークを完全に分離させるため、5 回展開した(Fig. 5 右)。5 回展開後、プレートを取り出し、乾燥させた。対照サンプルはニンヒドリン法により検出した。アカガイ抽出液を展開したレーンのプレートから、ニンヒドリン法により検出された標準 NMD,LG と同じ高さの部分で切り離し、ethanol – water (63 : 37)で画分を抽出した。これを遠心濃縮乾固し、残渣を 100 mM borate buffer (pH 9.0) 200  $\mu$ l に溶解し、誘導体化後、HPLC 分析した。



した。アカガイ抽出液を展開したレーンのプレートから、ニンヒドリン法により検出された標準 NMD,LG と同じ高さの部分で切り離し、ethanol – water (63 : 37)で画分を抽出した。これを遠心濃縮乾固し、残渣を 100 mM borate buffer (pH 9.0) 200  $\mu$ l に溶解し、誘導体化後、HPLC 分析した。

その結果アカガイ足抽出液に見られた NMDG,NMLG と思われるピークは NMD,LG 標準品と同一の挙動を示したことから、NMDG,NMLG でほぼ間違いないことが明らかになった。

Fig. 5 薄層クロマトグラフィーによる酸性アミノ酸標準品の展開位置の確認

※L-Asp 標準品、NMDA 標準品、L-Glu 標準品、 NMD,LG 標準品を薄層クロマトグラフィープレートにガラス毛细管で塗布し、*n*-butanol – water – acetic acid (3 : 1 : 1)展開溶媒で展開したところ、NMD,LG の展開位置はL-Asp、L-Glu とほぼ同じ展開位置だった (左)。

アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液中の NMD,LG と思われるピークと NMDA を完全に分離させるため、まず、NMD,LG 標準品と NMDA 標準品を薄層クロマトグラフィープレートにガラス毛细管で塗布し、5 回展開した時の展開位置を確認した (右)。

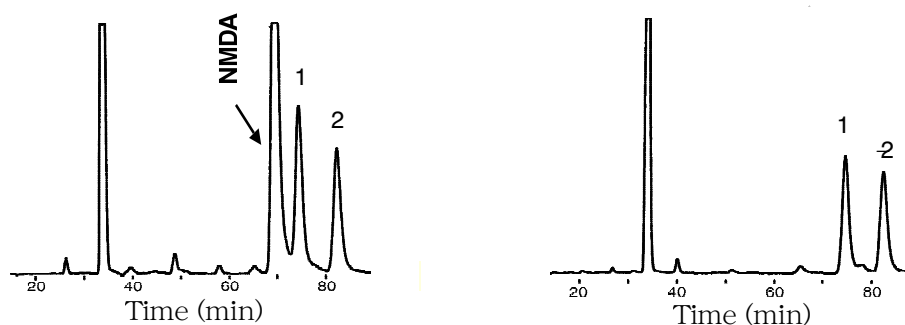


Fig . 6 薄層クロマトグラフィーで分離した NMDG、NMLG 画分の HPLC クロマトグラム

※アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液 3 ml のうち 20  $\mu$ l を(+)-FLEC で誘導体化し、分析した時の HPLC クロマトグラム (右)。アカガイ足から調製した酸性アミノ酸抽出液を薄層クロマトグラフィーで分離し、NMD,LG 標準品と同じ挙動を示す画分から得た抽出液を(+)-FLEC で誘導体化し、分析した時の HPLC クロマトグラム (左)。ピーク 1,2 はそれぞれ、アカガイ足抽出液中の NMDG,NMLG と思われる物質のピークを示す。

以上の4つの同定結果から、*N*-メチル-D-グルタミン酸及び *N*-メチル-L-グルタミン酸がアカガイ足組織に存在することが強く示唆された。

### < 3. 軟体動物及び各動物組織における NMDG、NMLG の分布 >

幾つかの同定方法により、アカガイ足組織において *N*-メチル-D-グルタミン酸及び *N*-メチル-L-グルタミン酸の存在が確認された。これまで、NMDG、NMLG の動物中での分布は全く調べられていない。そこで様々な動物組織における NMDG、NMLG の分布を調べた。更に NMDG、NMLG と構造的に良く似た物質である酸性アミノ酸の D,L-グルタミン酸(D,L-Glu)、*N*-メチル-D,L-アスパラギン酸(NMD,LA)、D,L-アスパラギン酸(D,L-Asp)の含有量も調べ、NMDG、NMLG と関連性があるかどうか調べた。

分布を調べた結果、アカガイ足以外の動物組織にも NMDG、NMLG が存在し、生物界に広く分布していることが明らかになった。NMD,LG は特に軟体動物組織に多く分布しており、その中でも鰓と外套膜において、高い NMLG 量を検出された。グルタミン酸、アスパラギン酸は、調べた全ての動物に検出された。アカガイ足(outside)の各個体における、NMDG と NMDA 含有量に統計的に有意な相関 (相関係数: 0.895  $p < 0.001$ ) が見られた。

### < 4. まとめ >

- D-Asp がメチル化されて NMDA が生成する経路がアカガイ足及び中腸腺組織に存在することを明確に示す実験結果は得られなかった。
- アカガイの足組織のクロマトグラム上に見られた2つの未知のピークについて調べたところ、*N*-メチル-D-グルタミン酸と *N*-メチル-L-グルタミン酸であることが確認され、NMDG は天然に存在することが世界で初めて明らかになり、また、NMLG は、ある種の細菌以外の生物体内において、初めてその存在が明らかになった。
- 様々な動物組織における NMDG、NMLG 分布を調べた結果、アカガイ足以外の動物組織にも NMDG、NMLG が存在し、生物界に広く分布していることが明らかになった。

### < 5. 今後の課題 >

NMDA、及び、NMDG、NMLG が生体内でどのように機能しているのか解明していくことが必要であると考えられる。

### < 6. 研究成果の公表 >

● Shibata, K., Tarui, A., Todoroki, N., Kawamoto, S., Takahashi, S., Kera, Y. and Yamada, R. (2001) Occurrence of *N*-methyl-L-aspartate in bivalves and its distribution compared with that of *N*-methyl-D-aspartate and D,L-aspartate  
Comp. Biochem. Physiol., 130B (2), 493-500.

● 垂井淳子, 柴田 公彦, 高橋祥司, 解良芳夫, 山田良平: アカガイ組織における *N*-メチル-D-グルタミン酸の存在 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月27日 生化学, 73巻, 8号, p901