

# アカガイアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニング

環境生物化学研究室 阿部 勝正

指導教官 山田 良平、解良 芳夫、高橋 祥司

## [はじめに]

アミノ酸は生体に多量に存在するタンパク質の構成成分であり、グリシンを除きその立体構造により、D体とL体に分けられる。原始地球上においてアミノ酸はL体とD体が1:1で存在するラセミ混合物として存在していたと考えられているが、生物は進化過程においてD-アミノ酸を選択的に排除し、L-アミノ酸のみを利用するようになった。このような背景から、生物体内に存在しているアミノ酸はL体のみであり、D体は存在しない、という考えが常識的に受け入れられてきた。しかし近年、HPLCなどの微量分析技術の向上により微生物、海洋無脊椎動物、ザリガニなどの淡水生甲殻動物、植物、さらにはヒトを含む哺乳類など、あらゆる生物体内から、次々にD-アミノ酸の存在が確認され、その生物体内における生理機能と生合成経路に関しての関心が持たれるようになった。

これまで動物に発見されている主な遊離D-アミノ酸としては、D-セリン、D-アラニン、D-アスパラギン酸があげられる。

D-セリンは主に高等動物の脳で確認され、その分布がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸レセプターの分布と正の相関を示していることや、NMDA型グルタミン酸レセプターのグリシン部位のアゴニストとして働くことから、D-セリンは内在性の神経伝達物質として機能していることが強く示唆されており、近年では統合失調症、アルツハイマー病との関連も調べられている。

D-アラニンは主に二枚貝などの軟体動物や甲殻動物など、水生無脊椎動物で数多く発見され、淡水に棲む二枚貝の一種ヤマトシジミ、淡水生甲殻動物の一種アメリカザリガニを海水に順応させることで、そのD-アラニン量が顕著に増加したことから、浸透圧調節に関与しているのではないかと考えられている。

これらのうちでは唯一の酸性D-アミノ酸であるD-アスパラギン酸はラットなどの脳で確認され、NMDA型グルタミン酸レセプターのアゴニストとして働くということから神経伝達物質として働いている事が示唆されている。また、松果体や精巣中でも高濃度のD-アスパラギン酸が発見されメラトニン合成やテストステロン合成など内分泌系への関与も示唆されている。

これら、D-アミノ酸の生合成経路として、最近、ラット、マウス、ヒトの脳からD-セリンを生合成するセリンラセマーゼが均一にまで精製され、遺伝子が単離された。さらにその後、アメリカザリガニ、ウシエビからアラニンラセマーゼが均一にまで精製され、D-アラニン、D-セリンの動物体内における生合成経路の一つがラセマーゼによるものであることが示された。このように、動物体内におけるD-アミノ酸の生合成経路に関しては徐々に明らかになってきているが、その生理機能に関する研究と比較すると著しく遅れている。さらに、3つのD-アミノ酸のうち残るD-アスパラギン酸の動物体内における生合成経路に関してはこれまでのところ全く未知のままであった。

当研究室では、これまで二枚貝の一種であるアカガイ *Scapharca broughtonii* の足、外套膜に高濃度のD-アスパラギン酸、そしてアスパラギン酸に特異的なラセマーゼ活性が存在する事を示し、その後、この活性

を示す本体であるアスパラギン酸ラセマーゼの精製に成功し、動物体内における D-アスパラギン酸の生合成経路の一つがアスパラギン酸ラセマーゼによるものであることを示した。動物におけるアスパラギン酸ラセマーゼの精製に関する報告はこれまでのところなく、この研究成果が初めての報告となった。

本酵素の酵素学的特性解析を行ったところ、本酵素はピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存性であることが明らかになった。これまで、アスパラギン酸ラセマーゼは数種のバクテリアや古細菌から精製され、その遺伝子がクローニングされているが、それらは全て補酵素を必要とせず、代わりに活性に重要な二つのシステイン残基を有する酵素であった。このことから、本酵素は PLP 依存性アスパラギン酸ラセマーゼという点においても初めての報告となった。さらに、その後の研究において、本酵素は AMP により活性化され、ATP により阻害されるといった活性調節を受けるといふ、どのラセマーゼにもみられない特徴を有している事も明らかにされた。

上記のように、本酵素は既知のラセマーゼと全く異なった性質を有していることから、その構造に関心が寄せられるところである。しかし、本酵素の構造に関する知見はこれまでのところほとんどない。そこで本研究では本酵素の特性を構造面から明らかにするために本酵素遺伝子の単離を検討した。

## 【結果と考察】

まず、遺伝子クローニングを行うためのプライマーを設計するため、本酵素の内部アミノ酸を解析を行った。アカガイの足先端から、硫酸ナトリウム分画、Blue Sepharose カラム、AMP Sepharose カラム、ゲル濾過 Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィー、SDS-PAGE、ゲルからの抽出という精製過程を経て、均一なアスパラギン酸ラセマーゼを得た。次いで得られた精製酵素をリシルエンドペプチダーゼを用いて断片化し、得られたペプチドを逆送 HPLC で分離した後、それぞれのペプチド断片についてアミノ酸配列解析を行い、アカガイアスパラギン酸ラセマーゼ内部アミノ酸配列を決定した。

得られたアミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、PCR により本酵素の部分遺伝子断片を取得した後、RACE 法を用いて全長 cDNA 配列を明らかにした。本酵素遺伝子を大腸菌で発現させたところ、アスパラギン酸ラセマーゼ活性がその粗酵素抽出液に確認され、その比活性はアカガイの粗酵素抽出液の約 130 倍と非常に高い値を示した。

本研究は以上のように、動物のアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の構造を初めて明らかにし、さらに異種細胞における効率的な発現を実現したものである。

論文投稿前につき本稿では詳細な結果に関して示さない。



Fig. 1. アカガイ *Scapharca broughtonii*