

Award Accounts

第5回 D-アミノ酸学会奨励賞

セリン/アスパラギン酸ラセマーゼの
比較生化学的研究

宇田 幸司

高知大学 理学部

1. はじめに

かつては非天然型アミノ酸とされた D-アミノ酸が多く動物に存在し、種々の重要な生理機能をもつことが明らかになってきている¹⁾。特に遊離型 D-Ser は、哺乳類の脳や、線虫、ミミズ、カイコガでその存在が確認され、哺乳類では、記憶や学習等に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして脳機能の調節に重要な役割を果たすことが知られている^{1; 2)}。また、D-Asp は、哺乳類の脳、網膜、松果体、下垂体、副腎、精巣に高濃度で存在し、メラトニン合成の抑制、プロラクチン分泌の促進、バソプレシンおよびオキシトシンの産生調節、テストステロン産生の亢進、NMDA の前駆体といった生理活性をもつことが知られている³⁻⁵⁾。哺乳類以外でも、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、原索動物、軟体動物、節足動物の生物種において、D-Asp が検出され、様々な生理機能への関与が示唆されている¹⁾。また、D-Asp の誘導体である NMDA が哺乳類に加えて、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、原索動物、軟体動物、節足動物において発見されており、動物界において D-Asp が広く存在し、NMDA の前駆体として働くことが予想された^{6; 7)}。

D-Ser, D-Asp 以外にも、D-Ala が海産の無脊椎動物において、浸透圧調節物質 (オスモライト) として働くことがよく知られている⁸⁾。また、我々は環形動物ケヤリの筋肉中に多量の D-

Arg 及び D-アルギニンリン酸が存在し、D-Arg の生理機能が ATP の高エネルギーリン酸基の貯蔵源であることを報告した⁹⁾。

しかし、動物における遊離型 D-アミノ酸の広範囲な分布とは異なり、D-アミノ酸の合成酵素であるアミノ酸ラセマーゼは、非常に限られた生物種でしか発見されていなかった。我々は、D-アミノ酸の存在同様、アミノ酸ラセマーゼも動物界に広く存在するのではないかと考え、その遺伝子の探索を進めてきた。本稿ではこれまでに我々が単離したアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の比較生化学的研究の成果について紹介する。

2. アミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索

これまでに、動物のアミノ酸ラセマーゼ遺伝子として、節足動物クルマエビのアラニンラセマーゼ (AlaR)、哺乳類ヒト、マウス、ラットのセリンラセマーゼ (Ser)、軟体動物アカガイのアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR)、そして軟体動物アメフラシの D-Amino acid racemase 1 (DAR1) の遺伝子が報告されていた¹⁰⁻¹⁵⁾。クルマエビから単離された AlaR 遺伝子は、真正細菌の PLP 依存型 AlaR のホモログ遺伝子であったが、哺乳類から単離された SerR は、真正細菌に存在する PLP 依存型 SerR やクルマエビの AlaR とは大きくアミノ酸配列が異なり、PLP 依存型セリン/スレオニンデヒドラターゼと相同性を示した。そして、哺乳類の SerR は、Ser の

ラセミ化活性に加えて L-Ser または D-Ser をピルビン酸とアンモニアに分解するセリンデヒドラターゼ活性も有していた^{12; 15)}。また、哺乳類

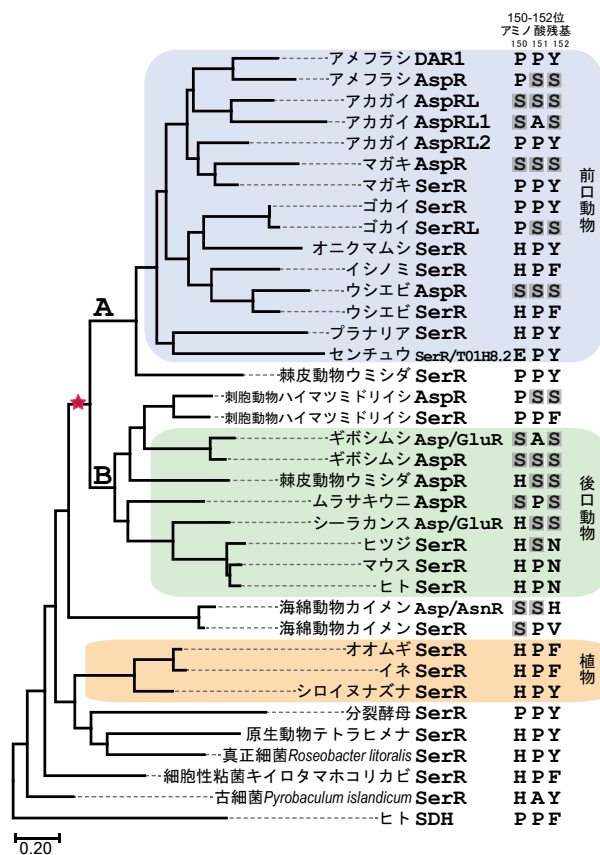


図1 SerR 及び AspR の分子系統樹と 150-152 番目のアミノ酸残基の比較

SerR 遺伝子のホモログが植物、細胞性粘菌、古細菌、及び分裂酵母からも単離され、いずれもセリンラセマーゼ活性とセリンデヒドラターゼ活性を持つことが確認されている¹⁶⁻²²⁾ (表1)。

アカガイ AspR は真正細菌の PLP 非依存型 AspR とは異なり、PLP 依存型酵素であり、かつ哺乳類の SerR と 43% 程度のアミノ酸一致率を示した。しかしながら、アカガイの AspR は Ser に対するラセマーゼ活性を持たず、Asp のみを基質とした。また、アメフラシ DAR1 は、アカガイ AspR と 55% のアミノ酸一致率を示し、Ser と Asp を共にラセミ化反応の基質とした¹¹⁾。

哺乳類 SerR とアカガイ AspR 及びアメフラシ DAR1 は、そのアミノ酸配列の相同性から共通の祖先遺伝子から進化したことが推測された。このことから、我々は動物界において広く SerR 遺伝子が存在しているのではないかと考えた。

そこで、我々は各種データベースからの BLAST 検索によって、動物界に存在する SerR ホモログ遺伝子の探索を行った。さらに、データベース上に SerR ホモログの完全長 cDNA 配列が存在しないものについては、生体試料からの RT-PCR によってその完全長 cDNA 配列の決定も行った。その結果、動物界の主要な 11 の動物門全てから SerR ホモログ遺伝子が発見され、我々の予想通り、動物界に広く SerR ホモログ遺伝子が存在することが明らかとなった²³⁾。

3. SerR と AspR はセリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーを形成する

新たに発見された SerR ホモログ及び、これまでに報告されている SerR と AspR のアミノ酸配列から分子系統樹を作製したところ、海綿動物以外の動物の SerR ホモログは大きく 2 つの系統 (クレード A 及び B) に分岐した (図1)。クレード A にはアカガイ AspR とアメフラシ DAR1 が、クレード B には哺乳類 SerR が存在しており、当初我々は前者が AspR クレード、後者が SerR クレードであると考えた。それを確かめるため、22 種類の SerR ホモログについて、リコンビナントタンパク質を用いたアミノ酸ラセマーゼ活性の確認を行った。

作製した全てのリコンビナントタンパク質は、Ser または Asp のどちらか、または両方に対するラセマーゼ活性を有していた。そこで、便宜的に両基質に対する比活性を比較して、Ser へのラセマーゼ活性がより強いものを SerR、Asp へのラセマーゼ活性がより強いものを AspR として区別した。そうすると、当初の予想とは異なり、クレード A、B どちらにおいても SerR と AspR が混在して存在することがわかった。つまり、分子系統樹上では、SerR と AspR はそれぞれが単系統とはならず、SerR と AspR はその酵素活性ではなく、生物種の系統関係にほぼ従った分岐を示した。そして、動物に存在する SerR と AspR は共通の祖先遺伝子から進化したセリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーを形成することが明らかとなった。

表1 SerR及びAspRの酵素活性と150-152位のアミノ酸残基

生物種	酵素	150-152位 アミノ酸残基	反応	引用	K_m [mM]	k_{cat} [10 ⁻³ s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [10 ⁻³ s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	K_{eq}
オニクマムシ (<i>Milnesium tardigradum</i>) プラナリア (<i>Dugesia japonica</i>)	SerR	HPY	L-Ser to D-Ser	23)	28.4 ± 4.2	17.5 ± 1.7	0.621 ± 0.046	1.211
			D-Ser to L-Ser	23)	19.0 ± 1.9	9.70 ± 0.88	0.513 ± 0.037	
	SerR	HPY	L-Ser to D-Ser	23)	11.2 ± 1.8	94.7 ± 10.2	8.51 ± 0.62	0.887
			D-Ser to L-Ser	23)	6.83 ± 0.40	65.5 ± 3.5	9.60 ± 0.06	
			L-Asp to D-Asp	23)	15.3 ± 3.3	5.37 ± 1.14	0.359 ± 0.077	
			D-Asp to L-Asp	23)	45.9 ± 12.8	15.3 ± 3.7	0.338 ± 0.051	1.064
センチュウ (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ウシエビ (<i>Penaeus monodon</i>)	SerR/ T01H8.2	EPY	L-Ser to Pyruvate	24)	6.12 ± 0.65	357 ± 33	58.3 ± 3.7	-
	AspR	SSS	L-Asp to D-Asp	23)	14.9 ± 1.6	33,000 ± 2,000	2,230 ± 170	0.795
			D-Asp to L-Asp	23)	9.86 ± 0.56	27,600 ± 1,000	2,810 ± 60	
			L-Ser to D-Ser	23)	17.0 ± 1.2	16.8 ± 0.5	0.991 ± 0.071	
				D-Ser to L-Ser	23)	86.8 ± 2.9	90.9 ± 7.8	1.05 ± 0.06
マガキ (<i>Crassostrea gigas</i>)	SerR	HPF	L-Ser to D-Ser	23)	146 ± 5	8.17 ± 0.56	0.0559 ± 0.0038	0.859
			D-Ser to L-Ser	23)	119 ± 16	7.72 ± 1.13	0.0651 ± 0.0012	
			L-Ser to Pyruvate	*	47.4 ± 3.4	48.9 ± 2.3	1.04 ± 0.09	
	AspR	SSS	L-Asp to D-Asp	23)	4.75 ± 0.48	8,650 ± 850	1,820 ± 60	0.860
			D-Asp to L-Asp	23)	6.21 ± 0.64	13,100 ± 700	2,120 ± 110	
L-Ser to D-Ser			23)	74.5 ± 6.7	91.1 ± 9.0	1.22 ± 0.01		
			D-Ser to L-Ser	23)	196 ± 23	252 ± 32	1.28 ± 0.02	0.954
ハイマツミドリイシ (<i>Acropora millepora</i>)	SerR	PPY	L-Ser to D-Ser	*	21.5 ± 0.6	1.78 ± 0.01	0.0827 ± 0.0022	1.14
			D-Ser to L-Ser	*	29.3 ± 4.6	2.11 ± 0.25	0.0728 ± 0.0047	
			L-Ser to Pyruvate	*	2.26 ± 0.69	29.1 ± 2.1	14.0 ± 3.9	
	AspR	PSS	L-Asp to D-Asp	23)	3.11 ± 0.34	57,700 ± 2,600	18,700 ± 1,200	1.01
			D-Asp to L-Asp	23)	1.37 ± 0.10	25,300 ± 1,800	18,400 ± 600	
L-Ser to D-Ser			23)	66.6 ± 4.0	121 ± 13	1.82 ± 0.17		
			D-Ser to L-Ser	23)	70.4 ± 4.5	184 ± 29	2.59 ± 0.11	0.703
			L-Ser to Pyruvate	*	18.3 ± 1.7	14.6 ± 0.7	0.804 ± 0.077	-
ムラサキウニ (<i>Strongylocentrotus purpuratu</i>) マウス (<i>Mus musculus</i>)	SerR	PPF	L-Ser to D-Ser	23)	7.71 ± 0.65	41.4 ± 2.5	5.38 ± 0.12	0.828
			D-Ser to L-Ser	23)	8.48 ± 0.19	55.1 ± 1.6	6.50 ± 0.09	
	AspR	SPS	L-Asp to D-Asp	23)	6.10 ± 0.15	15.1 ± 1.1	2.48 ± 0.24	1.08
			D-Asp to L-Asp	23)	13.6 ± 1.1	30.7 ± 4.3	2.29 ± 0.47	
		SerR	HPN	L-Ser to D-Ser	23)	14.9 ± 0.7	668 ± 36	44.7 ± 0.9
			D-Ser to L-Ser	23)	20.9 ± 0.7	840 ± 34	40.2 ± 0.5	
			L-Asp to D-Asp	23)	4.38 ± 0.71	4.57 ± 0.61	1.09 ± 0.28	0.909
			D-Asp to L-Asp	23)	15.3 ± 0.9	18.3 ± 1.9	1.20 ± 0.15	
			L-Ser to Pyruvate	*	4.79 ± 1.30	285 ± 28	62.1 ± 9.7	4.08
			D-Ser to Pyruvate	*	2.61 ± 0.30	39.5 ± 3.4	15.2 ± 0.9	
ラット (<i>Rattus norvegicus</i>)	SerR	HPN	L-Ser to D-Ser	12)	9.8	50	5.1	1.38
			D-Ser to L-Ser	12)	60	220	3.7	
ヒト (<i>Homo sapiens</i>)	SerR	HPN	L-Ser to D-Ser	15)	4.1 ± 0.2	691 ± 25	166 ± 13.3	1.27
D-Ser to L-Ser			15)	10.8 ± 0.8	1,415 ± 70	131 ± 15		
L-Ser to Pyruvate			15)	4.7 ± 0.4	1,660 ± 90	353 ± 45	26.1	
D-Ser to Pyruvate			15)	9.5 ± 0.6	128 ± 5	13.5 ± 1.5		
L-Asp to D-Asp			11)	8 ± 2	32.1 ± 7.8	4.01	4.91	
			D-Asp to L-Asp	11)	94 ± 30	76.8 ± 9.7	0.82	
			L-Ser to D-Ser	11)	15 ± 4	107 ± 15.6	7.13	0.78
			D-Ser to L-Ser	11)	16 ± 2	146 ± 29.2	9.11	
アカガイ (<i>Scapharca broughtonii</i>)	AspR	SSS	L-Asp to D-Asp	30)	60.4 ± 8.5	4,800	79.5	0.86
			D-Asp to L-Asp	30)	159 ± 27	14,700	92.5	
テトラヒメナ (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	SerR	HPY	L-Ser to D-Ser	*	42.1 ± 11.9	1,370 ± 160	32.6 ± 13.5	1.95
			D-Ser to L-Ser	*	60.6 ± 17.2	1,010 ± 130	16.7 ± 7.6	
			L-Ser to Pyruvate	*	35.4 ± 8.5	2,940 ± 280	83.1 ± 33.1	2.23
			D-Ser to Pyruvate	*	2.8 ± 0.6	102 ± 3.8	37.3 ± 6.1	
キイロタマホコリカビ (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	SerR	HPF	L-Ser to D-Ser	20)	30.4 ± 2.7	1,460 ± 60	47.6	1.40
D-Ser to L-Ser			20)	34.0 ± 5.2	1,160 ± 80	34		
L-Ser to Pyruvate			19)	6.7 ± 1.1	655 ± 25	97.7	30.8	
D-Ser to Pyruvate			19)	22.4 ± 3.8	71.8 ± 4.2	3.17		
イネ (<i>Oryza sativa</i>)	SerR	HPF	L-Ser to D-Ser	18)	10.0	310	31	1.41
			D-Ser to L-Ser	18)	8.9	200	22	
			L-Ser to Pyruvate	18)	18.0	360	20	1.11
			D-Ser to Pyruvate	18)	6.3	120	18	
			L-Ser to D-Ser	17)	2.5	2.9	1.17	1.40
			D-Ser to L-Ser	17)	0.77	0.64	0.83	
			L-Ser to Pyruvate	17)	20	140	7.0	2.3
			D-Ser to Pyruvate	17)	5.0	15	3.0	
オオムギ (<i>Hordeum vulgare</i>)	SerR	HPF	L-Ser to D-Ser	16)	2.6	12	4.6	0.16
			D-Ser to L-Ser	16)	9.0	265	29	
			L-Ser to Pyruvate	16)	2.7	1.7	0.63	0.054
			D-Ser to Pyruvate	16)	8.3	96	12	
			L-Ser to D-Ser	22)	32	18	0.56	1.30
			D-Ser to L-Ser	22)	9.6	4.1	0.43	
			L-Ser to Pyruvate	22)	36	510	14	4.7
			D-Ser to Pyruvate	22)	10	30	3.0	
古細菌 (<i>Pyrobaculum islandicum</i>)	SerR	HAY	L-Ser to D-Ser	21)	185	14,800	80	1.46
			D-Ser to L-Ser	21)	95.4	5,216	54.7	
			L-Ser to Pyruvate	21)	2.16	61,000	28,200	-
真正細菌 (<i>Roseobacter litoralis</i>)	SerR	HPY	L-Ser to D-Ser	29)	39.0 ± 3.1	2,040 ± 120	52.3 ± 1.67	0.867
			D-Ser to L-Ser	29)	36.8 ± 2.8	2,220 ± 120	60.3 ± 1.3	
			L-Ser to Pyruvate	29)	34.5 ± 6.3	53.8 ± 5.0	1.57 ± 0.17	
			D-Ser to Pyruvate	29)	29.1 ± 1.8	45.5 ± 3.3	1.57 ± 0.07	1.00

*: 宇田未発表

 $K_{eq} : (k_{cat}/K_m \text{ for L-isomer})/(k_{cat}/K_m \text{ for D-isomer})$.

4. セリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーの反応特性

AspR と SerR の酵素活性を比較すると、両者の K_m 値には大きな違いが見られないが、ほぼ全ての AspR は SerR よりも 2 桁程度高い k_{cat} 値を示した。また、殆どの SerR はセリンラセマーゼ活性と同程度、またはそれよりも高いセリンデヒドラターゼ活性を有していた (表 1)。なかでもセンチュウの SerR (T01H8.2) はセリンラセマーゼ活性の約 200 倍のセリンデヒドラターゼ活性と約 1 万倍の L-スレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ活性を持つことが報告されている²⁴⁾。そのため、本項で SerR とした酵素の中には、実際にはデヒドラターゼとして生体内で機能しているものもあると考えられた。

我々が単離した殆どの動物 SerR のリコンビナント酵素には、弱いながらも Asp に対する活性が確認できた。なかでも、プラナリア SerR 及びマウス SerR は、Ser に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) の 3%程度の触媒効率を Asp に対して示した (表 1)。これまで、哺乳類の SerR には Asp に対するラセマーゼ活性は存在しないと考えられていたが¹²⁾、マウス SerR にもアスパラギン酸ラセマーゼ活性が確認されたこと²³⁾、SerR のノックアウトマウスでは組織中の D-Asp 含量が低下し²⁵⁾、SerR 遺伝子を過剰発現させた PC12 細胞で D-Asp 濃度が上昇したことから²⁶⁾、哺乳類 SerR の D-Asp 合成への一定の関与が示唆されている。

また、半索動物ギボシムシ AspR のうちのひとつと、魚類シーラカンス AspR には Asp への触媒効率と同程度の高い触媒効率を Glu にも示したことから、これらの酵素はアスパラギン酸/グルタミン酸ラセマーゼ (Asp/GluR) であることが確認された。同様に、海綿動物カイメンの AspR も Asp へのラセマーゼ活性と同程度の活性を Asn に示し、アスパラギン酸/アスパラギンラセマーゼ (Asp/AsnR) であることがわかった。これらのことから、動物界においてセリン/アス

パラギン酸ラセマーゼファミリー酵素は、祖先型酵素である SerR から AspR, GluR そして AsnR, またはセリンデヒドラターゼや L-スレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼへと、その基質特異性や反応特異性を変化させてきたことが明らかとなった。

5. SerR と AspR の基質認識機構

分子系統樹上で SerR と AspR (Asp/GluR と Asp/AsnR を含む) はセリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーを形成し、複数の動物門で独立して SerR から AspR への進化が起こったと推測される。また、多くの SerR には弱いながらも Asp へのラセマーゼ活性があることから、SerR から AspR への酵素機能の変化は僅かなアミノ酸残基の置換で起こることが予想された。そこで、我々は、基質認識部位を特定するために、SerR と AspR のアミノ酸配列の比較を行った。まず、分裂酵母 SerR の結晶構造²⁷⁾において、基質 L-Ser と結合するアミノ酸残基 (Ser82, Arg133, Gly236, Gln238) について検討したが、これらのアミノ酸残基は SerR でも AspR でも同じように保存されていた。そこで、さらに検討を行ったところ、独立に進化したはずの全ての AspR において、150-152 位に 2 個または 3 個の Ser 残基が必ず存在する事を発見した。一方で、SerR においては、ごく僅かな例外を除いて、この 150-152 位に Ser 残基が存在する事は無かった。また、150-152 位のアミノ酸残基は SerR においても高度に保存されており、150 位は His 残基または Pro 残基が保存され、151 位は Pro 残基が保存されていた (図 1)。

これらのことから、我々は SerR 及び AspR において、150-152 位のアミノ酸残基が基質認識に関与するのではないかと考えた。また、150-152 位のアミノ酸残基は、分裂酵母 SerR の結晶構造²⁷⁾において、基質 L-Ser の結合ポケットの近傍でループ構造をとることから (図 2)、我々は特に AspR におけるこの領域を Triple serine loop 領域と呼ぶことにした²³⁾。

150-152 位のアミノ酸残基の基質認識への関与を確認するため、複数の SerR と AspR において、この領域へのアミノ酸置換変異体を作製した。その結果、AspR の Triple serine loop 領域の Ser 残基を SerR 型の H150-P151-N152 等に置換した場合、アスパラギン酸ラセマーゼ活性が消失した。逆に SerR に人工的に Triple serine loop 領域を導入すると、高いアスパラギン酸ラセマーゼ活性が獲得され、酵素機能が SerR から AspR へと変化した。また、151 位と 152 位の 2 つの Ser 残基が存在するだけで、セリンラセマーゼ活性よりも強いアスパラギン酸ラセマーゼ活性が生じることも確認された（宇田、未発表）。

ここで、これまでに単離されている SerR 及び AspR の 150-152 位のアミノ酸残基と実際の酵素活性について検討を行ってみることにした。これまでに単離されている動物 AspR は非常に大きな k_{cat} 値 ($4.8 \sim 57 \text{ s}^{-1}$) をもつが、ムラサキウニ AspR の k_{cat} 値は 0.03 s^{-1} 程度と例外的に小さい（表 1）。これは、ムラサキウニ AspR の 150-152 位のアミノ酸配列が S150-P151-S152 であり、Asp への強いラセマーゼ活性の獲得に重要な Ser151 を欠いていることが原因であると推測された。

また、アメフラシ DAR1 は Ser と Asp の両方を基質とし、抗 DAR1 抗体を用いた実験により DAR1 が D-Asp が高濃度で存在する神経節に局在することが確認されたことから、DAR1 は生体内 D-Asp の合成酵素であると考えられていた¹¹⁾。しかし、DAR1 の k_{cat}/K_m の値は、Ser を基質にしたときの方が、Asp を基質にしたときよりも約 2~10 倍高くなり、酵素機能としては AspR よりもむしろ SerR であるといえた（表 1）。そして、アメフラシの DAR1 の 150-152 位は P150-P151-Y152 となっており、Ser 残基が存在しないことから、この酵素は Triple serine loop 領域によらず、Asp へのラセマーゼ活性が強化された SerR であると考えられた。また、興味深いことに、アメフラシにはもう一種の SerR ホモログが存在しており、その 150-152 位が P150-S151-S52 となっていることから、こちら

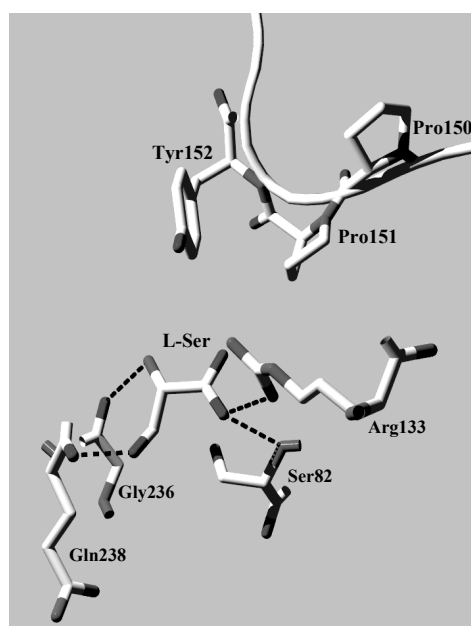


図 2 分裂酵母 SerR における基質結合部位と 150-152 位のアミノ酸残基

が AspR として機能することが予想された²³⁾（図 1）。この SerR ホモログのリコンビナント酵素を作製したところ、予想通り DAR1 の 500 倍のアスパラギン酸ラセマーゼ活性を示し、AspR であることが確認された（宇田、未発表）。アメフラシ DAR1 とアメフラシ AspR の間にはアミノ酸配列の高い相同性があることから、抗 DAR1 抗体を用いた実験で検出されたのは DAR1 ではなく AspR であった可能性もある。これらのことから、アメフラシの生体内で D-Asp を実際に合成しているのは、DAR1 ではなく AspR であると推測された。

5. セリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリー酵素の進化

アミノ酸置換実験から SerR から AspR への進化は、少なくとも 151 位と 152 位のアミノ酸残基が Ser 残基へと置換することで可能であることが示された。このことが、複数の動物門で独立して、頻繁に SerR から AspR への進化が起こった理由だと考えられた。また、興味深いことに、環形動物ゴカイ SerR のパラログであるゴカイ SerRL は、SerR とわずか 13 アミノ酸残基の違いしか無いにもかかわらず、151 位と 152 位が Ser 残基へと置換されていた。これは、ご

く最近、遺伝子重複とアミノ酸置換が起こって、Triple serine loop 領域が獲得されたことを示していた。残念ながら、ゴカイ SerRL のリコンビナントタンパク質は可溶化せず、その酵素活性を測定することができなかったが、おそらくは AspR として働いていることが予想された²³⁾。

軟体動物マガキには AspR と SerR の両方が存在し、アメフラシにも AspR とセリンラセマーゼ活性が優位な DAR1 の二種類が存在している。しかし、同じ軟体動物のアカガイからは AspR 遺伝子しか見つかっていない。そこで、最近公開されたアカガイの RNA-seq データ (NCBI accession no. SRX1959731) からアカガイ AspR のホモログを BLAST 検索したところ、新たに AspRL1 と AspRL2 の 2 種類の遺伝子が見つかった (図 1)。アカガイ AspRL2 の 150-152 位は P150-P151-Y152 となっており、典型的な SerR 型であった。一方で、アカガイ AspRL1 の 150-152 位は S150-A151-S152 となっており、この配列を持つのは他にはギボシムシ Asp/GluR だけであった (図 1)。おそらく、アカガイ AspRL2 はセリンラセマーゼ活性をもっており、AspRL1 はアスパラギン酸ラセマーゼ活性と共に他のアミノ酸に対する活性を持つ可能性がある。アカガイの組織には D-Asp 以外にも、D-Asn や D-Arg が存在することが確認されており²⁸⁾、アカガイ AspRL1 がこれらを合成できる可能性もある。

海綿動物を除く動物の (AspR も含む) SerR ホモログの分子系統樹では、前口動物の SerR ホモログがクレード A に、後口動物の SerR ホモログがクレード B に分岐した。これは、現在考えられている動物の系統関係 (図 3) に従っているように見えた。しかし、海綿動物に続いて分岐したはずの刺胞動物ハイマツミドリシの SerR 及び AspR がクレード B に存在する事、そして、後口動物の棘皮動物ウミシダの SerR ホモログが両方のクレードに分かれて存在すること事から、次のような仮説が考えられた (図 1)。すなわち、海綿動物が分岐した後の左右相称動物と刺胞動物の祖先種において、SerR 遺伝子が重複し (図 1 の星印)、2 種類の SerR 遺伝

子 (クレード A 型とクレード B 型) が生じた。しかし、前口動物ではクレード B 型の遺伝子を失い、一部の例外 (ウミシダ) を除いた後口動物と刺胞動物ではクレード A 型の遺伝子を失ったと考えられた。この仮説は、GenBank に存在するゲノムデータを用いた SerR ホモログのエキソン/イントロン構造の比較からも裏付けられた。クレード A の前口動物 SerR ホモログとウミシダ SerR には幾つかの共通するイントロン

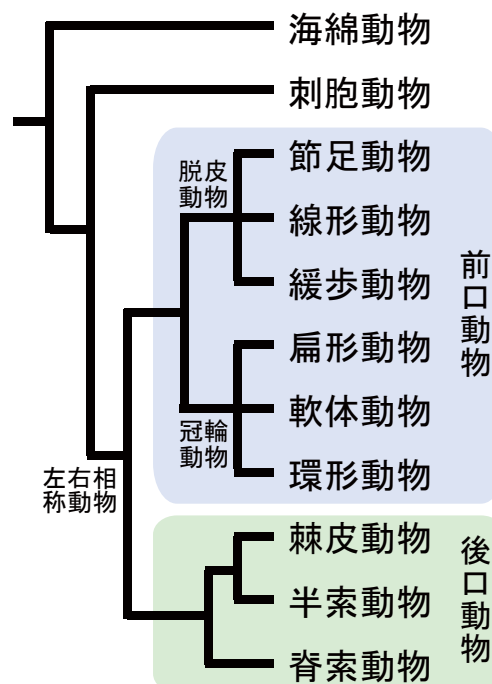


図 3 動物の系統関係

挿入位置が存在し、同様にクレード B の刺胞動物と後口動物 SerR ホモログの間にも共通する複数のイントロン挿入位置が存在した。一方で、クレード A とクレード B の両者に共通するイントロン挿入位置は僅か一つであった。

6. セリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリー酵素の分布

真核生物型 SerR は動物以外にも、植物 (オオムギ, イネ, シロイヌナズナ), 分裂酵母, 細胞性粘菌, 原生動物テトラヒメナでその存在が確認されていた^{16-20; 22)}。さらに、ごく最近、真正細菌の *Roseobacter litoralis* から真核生物型 SerR のホモログが発見され、そのリコンビナント酵素が他の真核生物型 SerR 同様、セリ

ンラセマーゼ活性とセリンデヒドラターゼ活性をもつことが報告された²⁹⁾。アミノ酸配列の相同性と系統樹解析から、これらの SerR と動物の SerR 及び AspR は共通祖先遺伝子から進化したことが推測された (図 1)。しかし、動物以外から報告されている SerR は、150-152 位にセリン残基を持たず、Asp へのラセマーゼ活性は確認されていなかった (図 1, 表 1)。それでは、動物においてのみ SerR から AspR への進化が起こったのだろうか? この疑問を確認するため、まず、植物の EST 及び SRA データベースから、BLAST 検索によって、100 を超える SerR ホモログを発見し、その 150-152 位のアミノ酸残基を確認した。その結果、トマト、ジャガイモ、キャッサバ、タルウマゴヤシ、ミズゴケ等の植物において、150-152 位に複数の Ser 残基を持つ、つまり Triple serine loop 領域をもつ SerR ホモログが見つかった。これらの SerR ホモログのリコンビナント酵素を作製したところ、予想通り全てのリコンビナント酵素は強いアスパラギン酸ラセマーゼ活性を持ち、AspR であることが確認できた (宇田, 未発表)。このことは、Triple serine loop 領域の獲得による SerR から AspR への進化が植物においても起こっていることを示し、動物だけでなく、植物においてもセリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーが形成されていることを示した。

また、真正細菌に存在する SerR ホモログ数百種についても 150-152 位のアミノ酸残基を確認したところ、数種類ではあるが Triple serine loop 領域を持つものが確認されており、真正細菌においても SerR から AspR への進化が起こった可能性が指摘された。現在、それらの遺伝子の単離と酵素活性の確認を進めている。

7. おわりに

これまで、限られた動物でのみ確認されていた SerR のホモログが多く動物や植物に存在し、さらには AspR, AsnR や GluR へと、その基質特異性を変化させてきたことが明らかとなった。しかしながら、これらのアミノ酸ラセマーゼが生体内でどのような機能を果たすかにつ

いては明らかとなっておらず、実際に D-アミノ酸の代謝に関与しているかどうかを確認することが今後の重要な課題である。また、生物界に広く分布するこれらの酵素が生体内で D-Ser や D-Asp 合成しているとするならば、従来考えられているのとは異なる普遍的な生理機能が D-Ser や D-Asp に備わっていることが期待される。

文 献

1. 宇田幸司. 2016. セリン/アスパラギン酸ラセマーゼの構造と機能の進化. *比較生理生化学* 33:68-76
2. 西川徹. 2010. D-セリンの脳機能への関与 (特集 D-アミノ酸の科学). *バイオインダストリー* 27:13-20
3. D'Aniello A. 2007. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res. Rev.* 53:215-234
4. Hashimoto A, Oka T. 1997. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog. Neurobiol.* 52:325-353
5. 片根真澄, 本間浩. 2010. 遊離型 D-アミノ酸の役割 (特集 D-アミノ酸の科学). *バイオインダストリー* 27:21-27
6. D'Aniello S, Fisher GH, Topo E, Ferrandino G, Garcia-Fernández J, D'Aniello A. 2007. N-Methyl-D-aspartic Acid (NMDA) in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *BMC Neurosci.* 8:1
7. Shibata K, Tarui A, Todoroki N, Kawamoto S, Takahashi S, et al. 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. B: Biochem. Mol. Biol.* 130:493-500
8. 阿部宏喜. 2008. 水生動物における遊離 D-アミノ酸の存在, 生合成および生理的意義. *生化学* 80:308-315
9. Uda K, Suzuki T. 2007. A novel arginine kinase with substrate specificity towards D-arginine. *The protein journal* 26:281-291
10. Abe K, Takahashi S, Muroki Y, Kera Y, Yamada

- R-h. 2006. Cloning and Expression of the Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Aspartate Racemase Gene from the Bivalve Mollusk *Scapharca broughtonii* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Journal of biochemistry* 139:235-244
11. Wang L, Ota N, Romanova EV, Sweedler JV. 2011. A novel pyridoxal 5'-phosphate-dependent amino acid racemase in the *Aplysia californica* central nervous system. *J. Biol. Chem.* 286:13765-13774
 12. Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet J-P, Brady RO, et al. 1999. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:721-725
 13. Yoshikawa N, Dhomae N, Takio K, Abe H. 2002. Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 133:445-453
 14. 吉村徹. 2008. アミノ酸ラセマーゼの構造と機能. *生化学* 80:324-330
 15. Hoffman HE, Jiraskova J, Ingr M, Zvelebil M, Konvalinka J. 2009. Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog. *Protein Expr Purif* 63:62-67
 16. Fujitani Y, Horiuchi T, Ito K, Sugimoto M. 2007. Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry* 68:1530-1536
 17. Fujitani Y, Nakajima N, Ishihara K, Oikawa T, Ito K, Sugimoto M. 2006. Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67:668-674
 18. Gogami Y, Kobayashi A, Ikeuchi T, Oikawa T. 2010. Site-directed mutagenesis of rice serine racemase: evidence that Glu219 and Asp225 mediate the effects of Mg²⁺ on the activity. *Chem. Biodivers.* 7:1579-1590
 19. Ito T, Maekawa M, Hayashi S, Goto M, Hemmi H, Yoshimura T. 2013. Catalytic mechanism of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino Acids* 44:1073-1084
 20. Ito T, Murase H, Maekawa M, Goto M, Hayashi S, et al. 2012. Metal ion dependency of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino Acids* 43:1567-1576
 21. Ohnishi M, Saito M, Wakabayashi S, Ishizuka M, Nishimura K, et al. 2008. Purification and characterization of serine racemase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*. *J. Bacteriol.* 190:1359-1365
 22. Yamauchi T, Goto M, Wu HY, Uo T, Yoshimura T, et al. 2009. Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. *J Biochem* 145:421-424
 23. Uda K, Abe K, Dehara Y, Mizobata K, Sogawa N, et al. 2015. Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. *Amino Acids*:1-16
 24. Katane M, Saitoh Y, Uchiyama K, Nakayama K, Saitoh Y, et al. 2016. Characterization of a homologue of mammalian serine racemase from *Caenorhabditis elegans*: the enzyme is not critical for the metabolism of serine in vivo. *Genes Cells* 21:966-977
 25. Horio M, Ishima T, Fujita Y, Inoue R, Mori H, Hashimoto K. 2013. Decreased levels of free D-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice. *Neurochem. Int.* 62:843-847
 26. Ito T, Hayashida M, Kobayashi S, Muto N, Hayashi A, et al. 2016. Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis. *Journal of Biochemistry*:mvw043
 27. Goto M, Yamauchi T, Kamiya N, Miyahara I, Yoshimura T, et al. 2009. Crystal structure of a homologue of mammalian serine racemase from

- Schizosaccharomyces pombe. *J. Biol. Chem.* 284:25944-25952
28. Okuma E, Watanabe K, Abe H. 1998. Distribution of Free D-Amino Acids in Bivalve Mollusks and the Effects of Physiological Conditions on the Levels of D-and L-Alanine in the Tissues of the Hard Clam, *Meretrix lusoria*. *Fish. Sci.* 64:606-611
29. Kubota T, Shimamura S, Kobayashi T, Nunoura T, Deguchi S. 2016. Distribution of eukaryotic serine racemases in the bacterial domain and characterization of a representative protein in *Roseobacter litoralis* Och 149. *Microbiology* 162:53-61
30. Shibata K, Watanabe T, Yoshikawa H, Abe K, Takahashi S, et al. 2003. Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 134:307-314



宇田 幸司（うだ こうじ）

略歴

- 2002-2005 高知大学大学院理学研究科（博士後期課程）修了 博士（理学）
- 2005-2006 日本学術振興会特別研究員 PD
- 2006-2007 高知大学理学部 助手
- 2007-2008 高知大学理学部 助教
- 2008-2012 高知大学教育研究部自然科学系理学部門 助教
- 2012-現在 高知大学教育研究部自然科学系理学部門 講師
- 2014-2015 University of Kentucky 植物・土壌学部 客員研究員