

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

氏 名 吉川 尚子

指導教官名 阿部 宏喜

論文題名 Studies on alanine racemase in crustaceans

(甲殻類におけるアラニンラセマーゼに関する研究)

D 型アミノ酸は、細菌類の細胞壁を構成するペプチドグリカンの構成成分として古くから知られており、細菌類に特有なものであると考えられてきたが、近年動物においても無脊椎動物から哺乳類に至るまで広く存在することが明らかにされている。特に、甲殻類や二枚貝類等の水生無脊椎動物の諸組織中には、多量の遊離 D-アラニン (Ala) が検出されており、この D-Ala は L-Ala とともに高浸透環境下で蓄積されるため、細胞内等浸透圧調節の有効なオスモライトであると考えられている。さらに、これら甲殻類や二枚貝類では、動物界において唯一 D-, L-Ala の相互変換を触媒するアラニンラセマーゼ活性が確認され、D-Ala は L-Ala から生合成されることが明らかとなった。したがって、D-Ala の蓄積メカニズム、代謝および生理的役割を解明するためには、アラニンラセマーゼの解析が必要である。しかしながら、これら甲殻類や二枚貝類に存在するアラニンラセマーゼは、細菌類の酵素とは異なり、非常に微量で不安定であるため、これまで 3 種から精製されたにとどまり、その構造および機能解析には至っていない。

本研究では、このような背景の下、甲殻類の中でも特にアラニンラセマーゼ活性の高い、ウシエビ *Penaeus monodon* およびクルマエビ *P. japonicus* の筋肉および肝臓を用いて、本酵素の一次構造解析を行い、その生理機能について検討を行ったもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. ウシエビ筋肉アラニンラセマーゼの単離とその性質および部分アミノ酸配列の決定

甲殻類のアラニンラセマーゼの一次構造を解析するために、ウシエビ筋肉を用いてアラニンラセマーゼの単離を行った。まず、ウシエビ筋肉 800g より粗酵素液を調製し、硫酸 30-70 %飽和沈殿画分について DEAE-Toyopearl, Butyl-Toyopearl, Phenyl-Sepharose, Ceramic Hydroxyapatite Type I および Superdex 200 の各カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、回収率 16%で精製度 127,592 倍、比活性 2,807 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ の単離酵素が 57 μg 得られた。分子質量は SDS-PAGE により 44kDa、ゲル濾過により 90kDa を示し、二量体であると考えられた。

次に、単離酵素の酵素学的性質について検討を行った。まず、基質特異性については、D-, L-Ala にのみ高い特異性を示し、他のアミノ酸には作用しなかった。Km 値は D-, L-Ala に対してそれぞれ 167 および 179 mM と細菌類の酵素に比べて非常に高い値を示したが、D \rightarrow L、L \rightarrow D 方向それぞれに対する Vmax は 3,155 および 3,502 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 、Kcat は 2,314 および 2,568 s^{-1} と両方向ともにきわめて高く、触媒効率率は両方向に対してほとんど同じ高い値を示した。また、平衡定数は 0.84 であり、ラセマーゼ反応の理論値に近い値であった。最適 pH は D \rightarrow L 方向の反応では pH 10、L \rightarrow D 方向では pH 9.5 を示し、これは他の真核生物の酵母および真菌類で報告されているものとほぼ一致していた。

また、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 要求性については、20 μM PLP の添加により僅かに活性化がみられたが、PLP 非存在下でも活性は消失しなかった。またシッフ塩基-PLP 複合体特有の 420 nm の吸収は、精製時において Superdex 200 カラムを用いたクロマトグラムでは確認されたが、活性画分を回収した際には希釈されたためか、認められなかった。しかしながら、PLP 要求性酵素の阻害剤であるヒドロキシルアミンやアミノオキシ酢酸の添加により著しく阻害された。したがって、PLP はもともと強力に本酵素に結合しているものと考えられ、本酵素も細菌類の酵素と同様に PLP 要求性酵素であることが示唆された。

さらに、単離酵素の部分アミノ酸配列決定を行った。すなわち、単離酵素を還元ピリジルエチル化し、臭化シアンあるいは *Achromobacter* protease I を用いて断片化を行った。得られたペプチド断片は逆相 HPLC で分取して、アミノ酸シークエンサーによってアミノ酸配列を決定した。その結果、7つのペプチド断片の配列が明らかとなり、その中の3つの配列は、Blast search により細菌類のアラニンラセマーゼと相同性がみられた。その1つは、細菌類の酵素の活性部位を含む領域であることが示され、さらに、細菌類の C 末端領域に相同性を示す配列も得られた。本酵素の N 末端配列分析は、ウェスタンブロットニングによって PVDF 膜に転写したものについて行ったが、N 末端残基の同定はできなかった。これにより得られた配列は、断片化によって得られた部分アミノ酸配列と重複している箇所を含んでおり、これらは N 末端に近い領域に位置するものと考えられた。

2. アラニンラセマーゼ抗ペプチド抗体の作製

前項で得られた部分アミノ酸配列の 1 つは、細菌類のアラニンラセマーゼの活性部位の一部で、L-Ala 結合部位とされるチロシン (Tyr) 残基を含む領域と相同性がみられたため、この領域から抗原ペプチドを設計し、アラニンラセマーゼを認識する抗体を作製した。抗原ペプチドはキャリアタンパク質として keyhole limpet hemocyanin (KLH) にコンジュゲートさせ、ウサギに免疫した。得られた抗血清の抗体価は抗原ペプチドに対して ELISA により測定し、イムノブロットィングによって、ウシエビ筋肉アラニンラセマーゼ単離標品を認識することを確認した。しかしながら、イムノブロットィングにおいては粗酵素液では反応がみられなかったため、抗原ペプチドをリガンドとしたアフィニティーカラムにより抗血清を精製し、ELISA を行うことで抗体の反応性を検討した。その結果、ウシエビ肝臓、クルマエビ筋肉および肝臓の酵素も同様に認識することが確認されたため、これらに存在するアラニンラセマーゼの構造は類似しているものと考えられた。

さらに、抗ペプチド抗血清による L→D 方向の反応の阻害活性について調べた。すなわち、酵素と抗ペプチド抗血清を反応させたものについて活性を測定したところ、L→D 方向の反応では僅かに阻害されたが、D→L 方向ではやや活性化がみられた。したがって、この抗ペプチド抗原を含む領域は、L→D 方向の反応に関与することが示唆された。しかしながら、このエピトープが Tyr 残基を含むかどうかは明らかではないが、L→D 方向の酵素反応に及ぼす影響は僅かであった。

3. クルマエビ筋肉および肝臓アラニンラセマーゼ活性に及ぼす生理的要因

まず、クルマエビを異なる塩濃度に順応させ、順応過程における酵素活性の変化について検討した。その結果、肝臓では 100→150 %海水に順応させたところ、D→L、L→D の両方向ともに時間の経過に伴い僅かに活性の上昇がみられた。一方、100→50 %海水順応においては、両方向ともに著しい活性の低下が認められた。しかしながら、筋肉においては、いずれもほとんど変化はみられなかった。したがって、海水順応過程においては、本酵素の著しい活性化は認められず、環境の塩濃度の変動は本酵素を直接的に活性化させる因子にはなり得ないと考えられた。一方、脱皮直後の個体について活性測定を行ったところ、筋肉、肝臓ともに高い活性が認められた。すなわち、甲殻類における本酵素活性は脱皮にともなう生体内の生理的变化に関与していることが示唆された。

4. クルマエビ筋肉および肝臓アラニンラセマーゼの cDNA クローニング

クルマエビ筋肉および肝臓から常法により全 RNA を調製し、mRNA を精製したものを鋳型とし、精製酵素から得られた部分アミノ酸配列に基づいて、イノシンを含む縮合プライマーを作成し、PCR を行った。その結果得られたクローンの塩基配列から演繹されたア

ミノ酸配列は、ウシエビ筋肉精製酵素から決定した部分アミノ酸配列と一致し、細菌類のアラニンラセマーゼとの相同性もみられた。次に、新たに決定した塩基配列をプライマーに3'および5'RACEを行った結果、最終的に421残基のコード領域を含む1,798 bpの塩基配列が決定された。これは、細菌類のアラニンラセマーゼと約30%程度の相同性を示した。また、細菌類の酵素においてPLPとシッフ塩基を形成することが知られているリシン残基およびその周辺の領域においても相同性が認められた。したがって、本酵素は生物進化の過程で細菌類から保存されたものであることが示唆された。次に、SMARTによりモチーフ検索を行ったところ、N末端に、細菌類のアラニンラセマーゼにはみられない、32残基のシグナルペプチドを有することが示された。

以上本研究では、甲殻類からアラニンラセマーゼを単離し、その部分アミノ酸配列を決定するとともに、動物界においては初めてアラニンラセマーゼのcDNAクローニングを行い、その一次構造を明らかにした。したがって、今後は今まで着手できなかった分子レベルからの研究が可能になるため、水生無脊椎動物に存在するアラニンラセマーゼはもとよりD-Alaに関するさらなる研究の進展が期待できる。以上のように本研究は、甲殻類のアラニンラセマーゼの構造解析を通じてその機能の一端を明らかにしようとしたもので、これらの成果は分子生物学および比較生化学上に資するところが大きいものと考えられる。