

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉川 尚子

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、3~50 $\mu\text{mol/g}$ におよぶ多量の遊離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には、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、代謝および生理的機能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種から単離されたにとどまり、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ある。

第一章では、ウシエビ筋肉を用いてアラニンラセマーゼの単離を行い、回収率16%で精製度127,592倍、比活性2,807 $\mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$ の単離酵素を57 $\mu\text{g}$ 得ている。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。

本酵素は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。 $K_m$ 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きわめて高い値を示したが、D $\rightarrow$ L、L $\rightarrow$ D方向それぞれに対する $V_{max}$ および $k_{cat}$ 値は両方向ともにきわめて高く、触媒効率は両方向に対して高い値を示した。また、ピリドキサル5'-リン酸(PLP)非存在下でも活性は消失せず、細菌類の酵素とは異なった。しかしながら、PLP要求性酵素の阻害剤により著しく阻害されることから、PLPは強固に本酵素に結合しているものと考えられ、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ている。その結果、7つのペプチド断片の配列が明らかとなり、そのうち3つの配列は細菌類のアラニンラセマーゼとの相同性が認められた。

第二章においては、これら部分アミノ酸配列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、ELISAによりウシエビおよびクルマエビの筋肉および肝臓の酵素を認識することを確認している。

第三章においては、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ている。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活性の上昇がみられ、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。一方、脱皮直後の個体では筋肉および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変化に関与することが示唆された。

第四章においては、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 を行っている。この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 残基のアミノ酸に相当するコード領域を含む 1,798 bp の塩基配列を決定した。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高い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。

以上本研究では、動物界においては初めてアラニンラセマーゼの一次構造を明らかにした。したがって、今後は分子レベルで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。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。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。