

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：  
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

## 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

阿部 宏喜

膨大な分類群を包含し、あらゆる水圏環境に適応放散している水生無脊椎動物の中には、種によって遊離の D-アミノ酸をもち、積極的に環境適応に利用しているものがあることが明らかになってきた。エビ・カニ類およびある種の二枚貝は多量の D-アラニンアラニンラセマーゼにより合成・蓄積し、浸透圧調節などに利用している。一方、イカ・タコ類などある種の軟体動物は神経系に遊離 D-アスパラギン酸をもち、アスパラギン酸ラセマーゼの存在が確認されている。最近では哺乳類にもこれらを含む数種の D-アミノ酸が見いだされ、これらの生理機能および関連酵素の分子進化過程には多大な興味をもたれる。この新たな「D-アミノ酸バイオシステム」は微生物からヒトにまで広がりをもつことが明らかになりつつある。本稿では水生無脊椎動物における遊離 D-アミノ酸研究の動向を紹介する。

### 1. はじめに

この発端は 1980 年代半ばに遡る。一人の卒論生に淡水から海水まで順応可能なエビのモデルを作成するというテーマを与えた。彼女はアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を選び、淡水から 50% 海水に移し、その後時間をかけて 100% 海水 (35ppt, 3.5%) にまで順応させ、その間の筋肉のエキス成分を分析した。海水順応に伴ってグリシンとアラニンが大きく増加し、これらがこの種の主要な浸透有効物質 (オスモライト: osmolyte) であることがわかった。水生無脊椎動物の浸透圧調節については、1950 年代からヨーロッパを中心に研究が行われ、主要な種について遊離の非必須アミノ酸やベタイン類あるいはトリメチルアミンオキシドなどのオスモライトの役割が明らかにされていた。アメリカザリガニでは余りにもアラニンの増加が大きく、他種とは異なっていたため、この半分が D 型だったら面白い展開になるね、と冗談まじりに話していた

が、そのままになっていた。その後 6, 7 年してから、残っていた抽出液について酵素法で調べてみたところ、実際にアラニンの半分が D 型であった。したがって、筆者らはアメリカザリガニのオスモライトとしての遊離 D-アラニンの生理機能から研究を開始したのである<sup>1)</sup>。

### 2. 水生無脊椎動物における遊離 D-アラニンの分布

水生無脊椎動物における遊離 D-アミノ酸の発見は意外に古く、1977 年にマダコの脳に D-アスパラギン酸が発見されたのが最初であり<sup>2)</sup>、1980 年には数種のエビ・カニ類に遊離 D-アラニンが見いだされている<sup>3)</sup>。1984 年にはヤマトシジミなどの二枚貝筋肉にも D-アラニンが発見され<sup>4)</sup>、散発的にはあるが、徐々にその存在が確認されつつあった。

筆者らはその後、アミノ酸を (+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロフォルメート (FLEC) で蛍光ラベルしてジアステレオマーとし、ODS カラムで生体液中のすべての D-, L-アミノ酸を分離定量する方法を開発し<sup>5)</sup>、水生無脊椎動物における D-アミノ酸の分布を調べた<sup>6,7)</sup>。FLEC はきわめて高価であるため、現在は *N*-*t*-ブチロキシカルボニル-L-システイン (Boc-L-Cys) と *o*-フタルジアルデヒド (OPA) でラベルし、主要な D-アミノ酸のみを分離定量する方法

〒167-0023 東京都杉並区上井草 3-23-20-205

Distribution of free D-amino acids and their biosyntheses and physiological roles in aquatic animals

Hiroki Abe (3-23-20 Kami-Igusa #205, Suginami, Tokyo 167-0023, Japan)

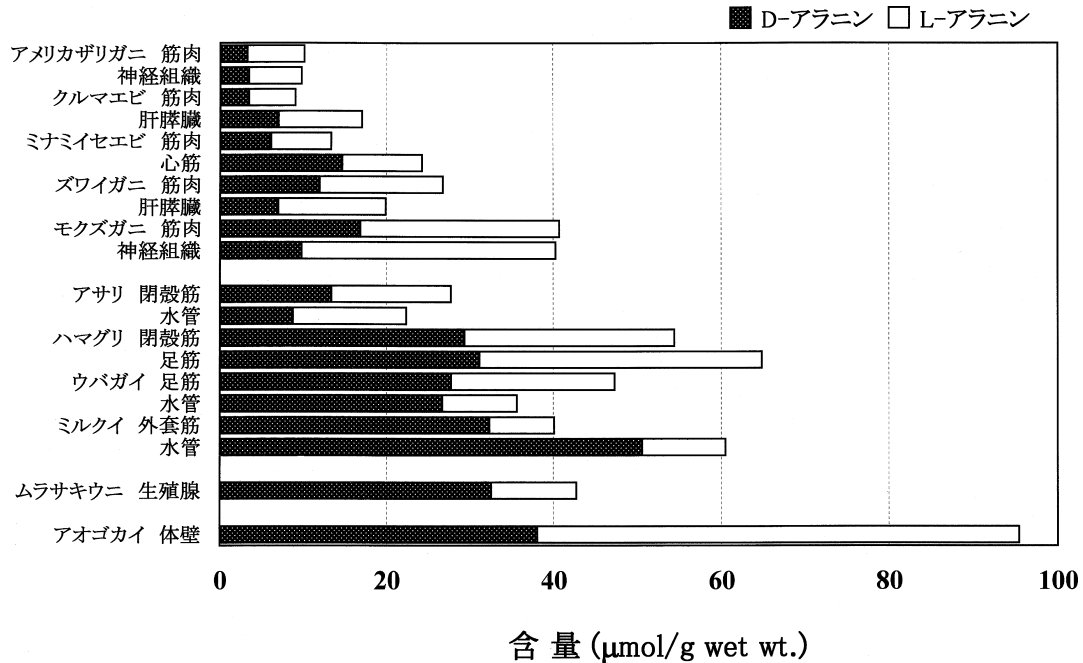


図1 数種水生無脊椎動物組織中の遊離 D-, L-アラニンの分布

を用いている。

代表的な水生無脊椎動物組織における遊離 D-アラニンの分布を図1に示す。後述の D-アスパラギン酸を始め、微量の数種 D-アミノ酸が検出されるものの、多量に存在するのは D-アラニンのみである。

エビ・カニ類筋肉の遊離 D-アラニン含量は 3~17μmol/g 湿重量 (以下、同様に g 湿重量で示す) で、すべての組織に認められる<sup>8)</sup>。全アラニンに対する D-アラニンのパーセンテージは 30~60% で、概して 50% 以下である。二枚貝では図1に示した異歯亜綱の種は甲殻類よりも多量の D-アラニンを筋肉組織に含有するが、ホタテガイ、アカガイ、カキなどの翼形亜綱に属する種では D-アラニンは痕跡程度に過ぎない<sup>9)</sup>。異歯亜綱の二枚貝の筋肉部の D-アラニン含量は 6~50μmol/g に達し、ウバガイ (ホッキガイ) やミルクイ (ミルガイ) 筋肉部では全アラニンの 60~84% が D 型である。一方、ウニ類の生殖腺でも D-アラニン含量は高い。また、環形動物多毛類のゴカイ・イソメでは二枚貝と同様に分類群によって異なり、ゴカイ科のアオゴカイなどでは多量に存在するものの、その他の科では痕跡程度である。

このように、D-アラニンの分布には偏りがあり、近縁種であっても分類群によって大きく異なる点は D-アラニンの生理機能に関連して興味をもたれるところである。

### 3. オスモライトとしての遊離 D-アラニンの機能

前述のように、筆者らはアメリカザリガニの海水順応に伴うオスモライトとしての D-アラニンの生理機能から研

究を開始した。図2に示すように、アメリカザリガニ筋肉中の遊離アミノ酸は淡水から 100% 海水までの順応により 2 倍以上に増加し、この増加は D-, L-アラニン, L-グルタミン, L-プロリンおよびグリシンによるものであり、特に D-, L-アラニンとグリシンの寄与が大きい。これらがアメリカザリガニの主要なオスモライトであるといえる。オスモライトは組織によっても異なり、神経組織ではほとんど D-, L-アラニンと L-プロリンの上昇によって、遊離アミノ酸総量が 4.5 倍にも増加していることは興味深い。一方、図示はしていないが肝臓ではタウリンも大きく増加する。

クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* とハマグリ *Meretrix lamarcki* では 100% 海水に充分順応した個体を 75 および 125% 海水に移し、2, 3 日後に 50 および 150% 海水に移してさらに 2, 3 日順応させた。クルマエビでは 50% 海水中で遊離アミノ酸総量が大きく減少し、100 から 150% への海水濃度上昇の影響は小さいが、グリシンの変動がきわめて大きく、ほぼグリシンのみで細胞内浸透圧を調節している。しかしながら、D-, L-アラニンもグリシンに次いで大きな変動を示す。

一方、ハマグリでは D-, L-アラニンの変動が最も大きく、50% と 150% 海水中では 5 倍近い差がある。多量に存在するタウリンは筋肉では変動が小さいが、中腸腺では大きく変動し、主要なオスモライトである。

これらの結果から、D-アラニンは L-アラニンとともに、これら無脊椎動物の細胞内等浸透圧調節 (intracellular isotonic regulation) において主要な役割を担っていることが

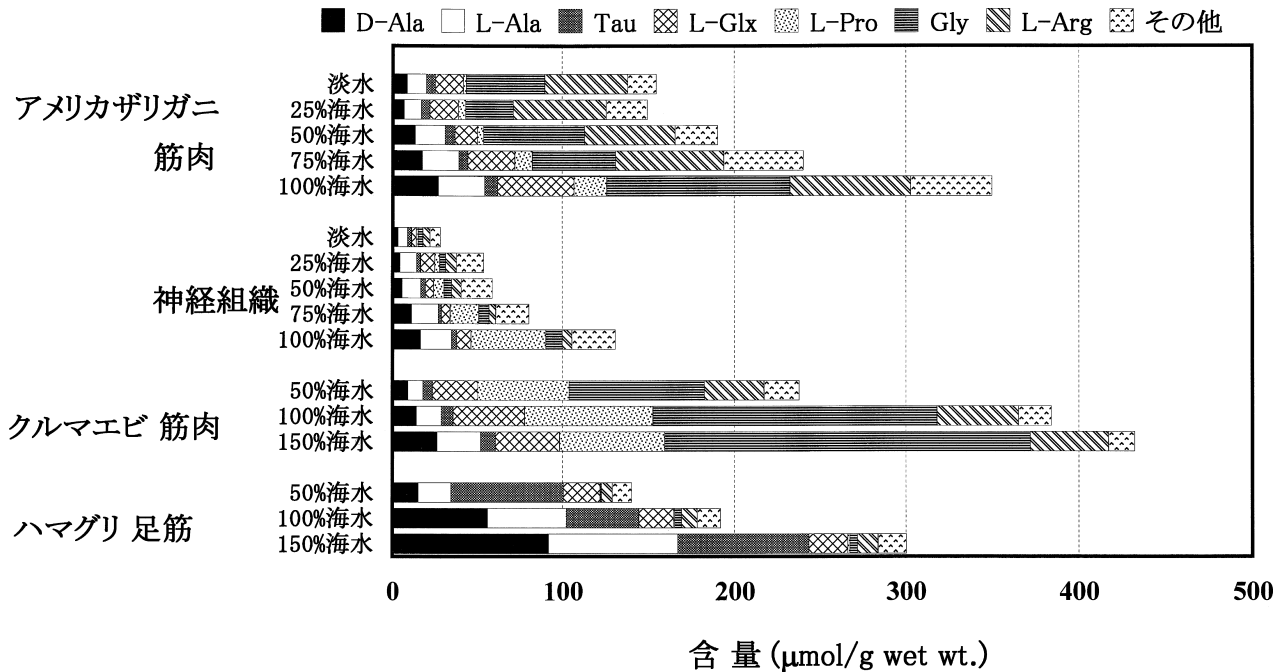


図2 水生無脊椎動物の高浸透ストレス下における遊離アミノ酸の変動

アメリカザリガニは淡水から50%海水に2日間収容後、10%/日程度にゆっくり塩濃度を上げて100%海水に3日ほど順応させた。クルマエビとハマグリは充分100%海水に順応した個体を75および125%海水水槽に収容し、2、3日後に50および150%海水に移して2、3日間馴化させた。

アミノ酸は3文字の略記号を用いた。Glxはグルタミン酸とグルタミンの合計量であるが、ほとんどがグルタミンである。

明らかである。一方、秋に川の上流から海に産卵回遊するモクスガニ *Eriocheir japonicus* では、夏から秋にかけての成熟過程でD-,L-アラニンのみを蓄積し、無機イオンを取り込んで降河回遊に備え、回遊中河口付近ではさらにD-,L-アラニンおよび無機イオンを増加させ、海に達するとグリシンを多量に蓄積して、有害な無機イオンを減少させることが明らかになった<sup>10)</sup>。したがって、モクスガニではD-,L-アラニンは産卵降河回遊のための最も重要なオスモライトである。

さらに、D-,L-アラニンはアメリカザリガニの嫌気ストレス下における最終産物の一つであることも知られており<sup>11)</sup>、二枚貝でも同様に嫌気生活中に上昇する<sup>9)</sup>。また、クルマエビの脱皮中に筋肉中のD-アラニン含量が増加することも認められ、その原因を追及している(未発表)。したがって、今後さらにD-アラニンの新たな生理機能が見いだされる可能性も高い。

#### 4. D-アラニンの生合成：無脊椎動物のアラニンラセマーゼ

上記の無脊椎動物組織には、唯一D-アラニンを合成する酵素としてアラニンラセマーゼ [EC 5.1.1.1, ARase] の存在が確認されている<sup>12)</sup>。ARaseはD-,L-アラニン間の相互変換を触媒するピリドキサル5'-リン酸 (PLP) 依存性の酵素で、従来は細菌でしかその存在が知られていな

かった。無脊椎動物のARaseは最初ウシエビ(ブラックタイガー) *Penaeus monodon* 筋肉から部分精製され<sup>13)</sup>、その後数種から単離精製された(表1)。甲殻類酵素の大きな特徴は、少なくともLからD方向の $K_m$ 値が組織中のD-アラニン濃度と比べて10倍以上も高いことである。生理的に機能しているのかどうか疑われるほどであるが、ミナミイセエビを除いては同様の傾向を示す(表2)。表2に見られるように、アメリカザリガニでは海水順応に伴って筋肉および肝臓のARaseともに $K_m$ 値が低下し、特に肝臓における低下が大きい。また、 $V_{max}$ 値はいずれも上昇し、特に筋肉では2倍に上昇して作用しやすくなることが明らかである<sup>12)</sup>。さらに、D-あるいはL-アラニンをアメリカザリガニ筋肉に投与すると、経時的に相互変換が確認されるため<sup>18)</sup>、本酵素が生体内で機能していることは間違いない。

ウシエビ筋肉ARaseの部分アミノ酸配列を基に、微生物以外では初めてクルマエビ筋肉および肝臓からARaseのcDNAがクローニングされた<sup>19)</sup>。筋肉および肝臓から得られたcDNAは同一の421残基のアミノ酸に相当するコード領域を含み、演繹アミノ酸配列にはN末端にシグナルペプチドと考えられる配列が認められた。微生物の酵素で活性中心と考えられているリシンおよびチロシン残基はいずれも保存されており、PLPとの結合に関与する残基もほぼ保存されていた。また、微生物酵素とは25~27%

表1 無脊椎動物から単離されたアラニンラセマーゼの性質

種	組織	サブユニット構造	単量体分子質量 (kDa)	反応方向	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	文献/起源
アメリカザリガニ	筋肉	単量体	58	L→D D→L	171 73.5	7504 3273	14)
ヤマトシジミ	外套筋	三, 四量体	41	L→D D→L	22.6 9.2		15)
ウシエビ (ブラックタイガー)	肝臓	二量体	41	L→D D→L	150 24		16)
ウシエビ	筋肉	二量体	46	L→D D→L	167 179	2568 2314	17)
クルマエビ	肝臓	二量体	45.77	L→D D→L	196 115		リコンビナント (未発表)
ミルクイ	中腸腺			L→D D→L	21.3 6.16		粗酵素(未発表)
アオゴカイ	体壁			L→D D→L	4.06 1.21		粗酵素(未発表)

表2 エビ類におけるアラニンラセマーゼの  $K_m$  および  $V_{max}$  値およびアメリカザリガニの海水順応過程における変化<sup>12)</sup>

種	最大反応速度 ( $V_{max}$ ) <sup>*1</sup>		ミカエリス定数 ( $K_m$ ) <sup>*2</sup>	
	筋肉	肝臓	筋肉	肝臓
ウシエビ	1.23	0.37	156	185
クルマエビ	1.23	10.8	107	133
コウライエビ	1.02	0.67	92	239
ミナミイセエビ	0.28	1.38	48	35
アメリカザリガニ				
淡水	0.19	0.29	157	133
1/2 海水	0.26	0.40	117	52
3/4 海水	0.36	0.43	109	51
全海水	0.41	0.44	105	47

\*<sup>1</sup>mmol/min・g, \*<sup>2</sup>mM. いずれも粗酵素液について D→L 方向の活性を測定し, Lineweaver-Burk プロットから計算した.

のアミノ酸同一率であった.

クルマエビの ARase の塩基配列を基に, D-アラニン含量の高いミルクイ *Tresus keenae* 中腸腺から cDNA クローニングを試みた. 大変な苦勞の末にクローニングされた cDNA は 404 残基のアミノ酸をコードする翻訳領域をもち, 演繹アミノ酸配列はクルマエビ酵素のそれと比べても僅か 32% のアミノ酸同一率であった (未発表). このような無脊椎動物間における ARase 遺伝子の相同性の低さおよび mRNA 発現量の低さは研究を著しく困難にしている原因である.

いずれにしても, これら遊離 D-アラニンを有する無脊椎動物において, D-アラニンは ARase により L-アラニンから生合成されていることは明らかである. D-アラニンをオスモライトなどとして利用するために, これら動物は永い進化の過程で ARase 遺伝子を保持してきたものと考えられる.

しかし, なぜ D-アラニンなのであろうか. オスモライトとして利用されているアミノ酸はいずれも非必須アミノ酸であり, 体内で解糖経路およびクレブス回路により容易

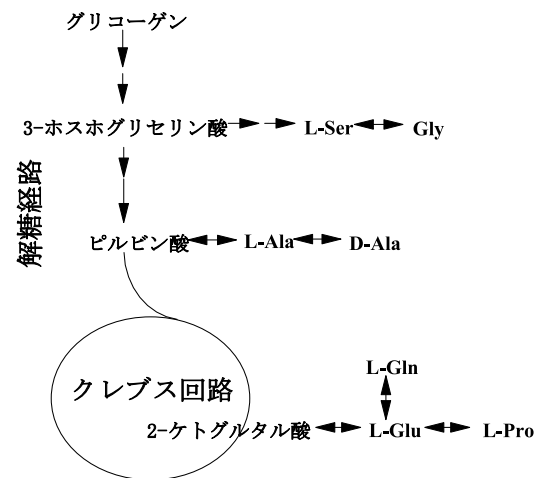


図3 水生無脊椎動物の高浸透ストレス下で増加する遊離アミノ酸の代謝経路

に合成が可能である (図3). これらは中性のアミノ酸であり, 側鎖に他のタンパク質と相互作用をするような酸性あるいは塩基性基などの反応性の高い官能基をもたない. このようなオスモライトは適合溶質 (compatible osmolyte)

と呼ばれ、タンパク質の立体構造や触媒作用に悪影響を与えにくい。すなわち、これらは細胞質中にかなり多量に蓄積することが可能である。しかしながら、単一の溶質のみを多量に貯め込むことはやはり細胞にとっては好ましくない。どのアミノ酸も生体内では様々な酵素の基質や阻害剤として機能しているからである。そのため、図2に見られるように、それぞれの生物は高浸透環境下でも数種のオスモライトを合成、蓄積しており、単一の化合物に依存することは少ない。L-アラニンがグリシンに次いで最も簡単な側鎖をもち、タンパク質に与える影響が小さいアミノ酸ではあるが、幾つかの酵素の基質であり、また解糖経路のピルビン酸キナーゼを阻害することが知られている。このL-アラニンを半分D型に変換できれば、D-アラニンは既存の生物のほとんどの酵素からは認識されないため、多量に蓄積しても細胞内の恒常性は維持できるものと考えられる。したがって、コストは高くつくものの、ARase 遺伝子を放棄せずに保持してきたのであろう。

#### 5. D-アラニンの利用：魚類のD-アミノ酸オキシダーゼ

同じ水生動物であっても、魚類の組織には遊離D-アラニンやD-アスパラギン酸は0.5 $\mu\text{mol/g}$ 以下しか存在しない<sup>20)</sup>。しかし、魚は種によっては甲殻類や貝類をよく摂食しており、経口摂取したD-アミノ酸の命運に興味もたれた。D-アミノ酸を分解する酵素には中性および塩基性D-アミノ酸に作用するD-アミノ酸オキシダーゼ [EC 1.4.3.3, DAO] および酸性D-アミノ酸を分解するD-アスパラギン酸オキシダーゼ [EC 1.4.3.1, DDO] が微生物から哺乳類に至るまで広く分布することが知られている。これらオキシダーゼにより、D-アミノ酸は酸化的脱アミノ反応によって対応するイミノ酸と過酸化水素とに分解され、イミノ酸はさらに非酵素的に2-オキシ酸とアンモニアに変換される。したがって、これらオキシダーゼは内因性および外因性のD-アミノ酸を除去するための解毒酵素と考

えられている<sup>21)</sup>。DDO 活性は数種の魚類肝臓に見いだされ<sup>20)</sup>、マダコの組織にはDAO およびDDOの両活性が認められている<sup>21)</sup>。

両酵素活性は多くの魚類の腎臓、肝(膵)臓、腸管などに検出されるものの、魚種により活性は様々で、概して魚食性の魚よりは無脊椎動物食の魚で高い値であった<sup>22)</sup>。そこで、コイ *Cyprinus carpio* の餌に5 $\mu\text{mol/g}$  体重・日になるようにD-アラニンを添加して30日間経口投与したところ、腸管、肝膵臓および腎臓でそれぞれ8, 3および1.5倍にDAO活性が上昇した。DDO活性に変化はなく、D-アラニンの代わりにD-アスパラギン酸あるいはD-グルタミン酸を投与してもDAOおよびDDOともに変動を示さなかった。したがって、コイのDAOは哺乳類のそれとは異なり、D-アラニンによって誘導される誘導酵素であると考えられた<sup>22)</sup>。

14日間上記のようにD-アラニを経口投与したコイ肝膵臓から、DAOのcDNAを哺乳類以外の動物では初めてクローニングした<sup>23)</sup>。1,294bpのクローンは1,041bpの翻訳領域をもち、347残基のアミノ酸をコードし、演繹アミノ酸配列は哺乳類のDAOとよく一致していた(図4)。哺乳類のDAOとは60%前後のアミノ酸同一率を示し、酵母および細菌のそれとも21-29%の値を示した。N末端に近い補酵素FADとの結合配列GXGXXG(Xは不特定アミノ酸残基)は哺乳類すべてと共通にGAGVIGであった。C末端にはペルオキシソームシグナル配列と考えられているSXLの3残基が存在し、Xは哺乳類のヒスチジンに対してアルギニン残基であった。事実、哺乳類の場合と同様に、コイでもDAOおよびDDOともにペルオキシソームに局在することが確認された<sup>22)</sup>。また、活性部位のTyr224, Tyr228 およびArg283もよく保存されていた。

上記と同様に、コイの餌にD-アラニンを添加して14日間飼育し、その間のDAO活性およびDAOのmRNAの発現を調べたところ、肝膵臓のDAO活性は3日目までに大

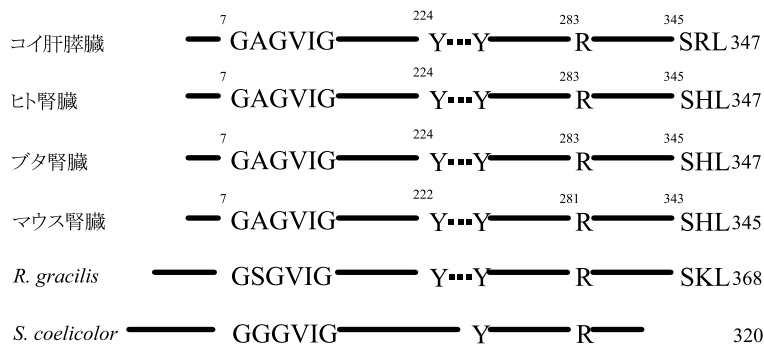


図4 D-アミノ酸オキシダーゼの演繹アミノ酸配列の比較

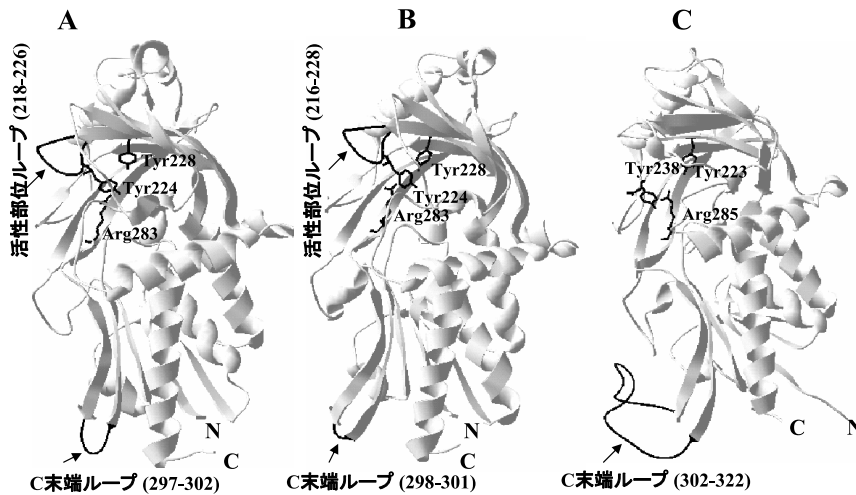
GXGXXG (Xは不特定のアミノ酸)は補酵素FAD結合コンセンサス配列。Y224, Y228, R283はブタ腎臓酵素の活性中心残基。SXLはペルオキシソームシグナル配列。

*R. gracilis*, *Rhodotorula gracilis*; *S. coelicolor*, *Streptomyces coelicolor*.

表3 コイ肝臓、ブタ腎臓および酵母のD-アミノ酸オキシダーゼの性質の比較

	コイ肝臓 <sup>24)</sup>	ブタ腎臓 <sup>25)</sup>	<i>R. gracilis</i> <sup>26)</sup>
吸収極大 (nm)	272, 366, 455	274, 380, 455	274, 368, 455
単量体分子質量 (kDa)	39	38	37
$K_m$ 値 (mM)	0.23	1.1~2.3	0.83~2.6
$k_{cat}$ 値 ( $S^{-1}$ )	190	12.7	350
基質特異性	D-Ala>D-Val >D-Tyr>D-Phe	D-Met>D-Pro >D-Phe>D-Ala	D-Met>D-Trp >D-Ala
最適 pH	8.5 (6.5~11.0)	8.5~9.5	8.0~8.5
pH 安定性	5.0~11.0	7.7~10.5	6.8~8.5
最適温度 ( $^{\circ}C$ )	35	45	40~45
温度安定性 ( $^{\circ}C$ )	20~50	30~50	27~60

$K_m$  値および  $k_{cat}$  値は D-アラニンが基質の場合。

図5 D-アミノ酸オキシダーゼモノマーの三次元立体構造の比較<sup>24)</sup>

A, コイ肝臓; B, ブタ腎臓; C, *Rhodotolula gracilis*.

きく上昇し、平衡に達した。一方、mRNA 発現量は7日目に最大値に達した。14日後に組織別に mRNA 発現を調べたところ、腸管での発現が最も高く、次いで肝臓および腎臓の順で、筋肉での発現は認められなかった。これらのことから、少なくともコイの DAO は誘導酵素であり、餌の二枚貝や甲殻類に含まれる D-アラニンをも腸管でピルビン酸として回収し、さらに肝臓や腎臓で処理して D-アラニンの炭素骨格を利用するものと考えられる<sup>23)</sup>。したがって、コイの DAO は単なる解毒酵素ではなく、栄養上重要な酵素であるといえるであろう。

コイ肝臓の DAO を大腸菌で大量発現させて精製し、その性質を調べた<sup>24)</sup>。  $V_{max}$  値、 $k_{cat}$  値および  $k_{cat}/K_m$  値ともに D-アラニンに対して最も高い値を示し、コイ DAO に対しては D-アラニンが最もよい基質であることが判明した。このことはコイ DAO が D-アラニンによって誘導されることと矛盾しない。哺乳類の DAO に対しては D-メチオニンや D-プロリンが最もよい基質であることは異なっていた (表3)。コイ DAO は D-アスパラギン酸や D-グルタミン酸に対しては全く作用せず、L 型アミノ酸にも作用を示

さなかった。コイ肝臓 DAO はブタ腎臓および酵母 *Rhodotolula gracilis* の DAO とかなり共通の性質を有するが、D-アラニンに対する  $k_{cat}$  値はブタ腎臓 DAO と比べて著しく高く、酵母 DAO に近い値であった。コイ DAO はまた、D-アラニンに対する  $K_m$  値が最も低く、哺乳類および酵母 DAO と比べてより広い pH 範囲で安定であり、温度安定性も高かった。

演繹アミノ酸配列に基づいて Swiss-Model を用いて三次元構造 (3D) モデルを作成し、ブタ腎臓および *R. gracilis* DAO の 3D モデルと比較した (図5)。活性部位ループはブタ腎臓 DAO の 13 残基に対してコイでは 9 残基で、*R. gracilis* DAO にはこのループは欠損していた。一方、C 末端ループはブタ腎臓 DAO の 4 残基よりも長い 6 残基で、*R. gracilis* では 21 残基であった。*R. gracilis* の長い C 末端ループは二量体の形成時に head-to-tail 型の安定した構造を取るのに寄与し、これに対してブタ腎臓およびコイ肝臓の DAO では head-to-head 型の二量体を形成することが示唆された。したがって、コイ肝臓 DAO は酵素学的性質は酵母 DAO に類似しているものの、構造的にはブタ腎

臓 DAO に近く、中間的な性格であるといえるであろう。

最近、コイ肝臓のゲノム DNA から 3,123bp と 2,639bp の二つのコイ DAO 遺伝子が単離できた。いずれも 10 エクソンと 9 イントロンから構成されていたが、プロモーター解析により 2,639bp の遺伝子が機能遺伝子であることが判明した (投稿準備中)。

## 6. 軟体動物の遊離 D-アスパラギン酸とアスパラギン酸ラセマーゼ

軟体動物の中には遊離 D-アラニンをもたないものの、D-アスパラギン酸を数  $\mu\text{mol/g}$  有するものが見いだされる。D-アラニンと D-アスパラギン酸の存在はほとんど排他的で、D-アラニンに富む上述の二枚貝に存在する D-アスパラギン酸は痕跡程度に過ぎない。D-アスパラギン酸は頭足類 (イカ・タコ類) の神経組織に多く、1~4 $\mu\text{mol/g}$  に達する (図 6)。前述のように、無脊椎動物に最初に発見された遊離 D-アミノ酸はマダコ *Octopus vulgaris* の脳の D-アスパラギン酸であった。全アスパラギン酸に対する D-アスパラギン酸のパーセンテージもかなり高く、マダコ視神経節では 93% を占める。一方、アカガイ *Scapharca broughtonii* に近縁のサトウガイ *S. satowi* の足筋先端部では他の足筋部分と比べて 4 倍以上の D-アスパラギン酸を含み、50% が D 型である。これはアカガイについても同様で、アカガイ足筋先端部からはアスパラギン酸ラセマーゼ (DRase) が精製され、cDNA クローニングがなされている<sup>27,28)</sup>。なぜ先端部なのかは明らかではないが、神経線維が豊富である可能性も考えられる。D-アスパラギン酸は

イカ類の神経組織にも豊富で、ヤリイカ *Loligo bleekeri* やスルメイカ *Todarodes pacificus* の視神経節、脳神経節および巨大神経と呼ばれる外套筋の星状神経節から伸びる外套神経にも 2~4 $\mu\text{mol/g}$  の D-アスパラギン酸が検出される。一方、ツツナミガイ *Dolabella auricularia* はアメフラシの仲間であるが、脳神経節に 1 $\mu\text{mol/g}$  程度の D-アスパラギン酸をもち、また他の種とは異なり同程度の D-アラニンも検出される。消化管や肝臓では D-アラニンの方が多い。

アカガイ足筋先端部からクローニングされた DRase cDNA の塩基配列を基に、組織の大きなスルメイカ視神経節から DRase の cDNA クローニングを行った。演繹アミノ酸配列からアカガイ DRase の 338 残基に対してスルメイカ DRase では 329 残基とやや小さく、アミノ酸同一率は 48% と高かった。アカガイおよびスルメイカの DRase はまた、マウス、ラット、ヒトのセリンラセマーゼ (SRase) と相同性を示し、アミノ酸同一率は哺乳類 SRase とスルメイカ DRase で 37%、アカガイ DRase とでは 39~40% であった。さらに、これらラセマーゼは細菌および酵母のスレオニンデヒドラーターゼ (TDase) とも 28~39% のアミノ酸同一率を示した。これらラセマーゼはいずれも PLP 依存性であり、TDase で明らかにされている PLP と相互作用する残基<sup>29)</sup>はよく保存されていた。一方、細菌類の PLP 非依存性 DRase とは全く相同性を示さなかった。哺乳類の SRase<sup>30)</sup>およびアカガイの DRase<sup>28)</sup>はいずれも TDase 活性を有することが確認されている。

これらのことから、哺乳類の SRase および軟体動物の DRase はいずれも細菌類の TDase と共通の祖先をもつこと

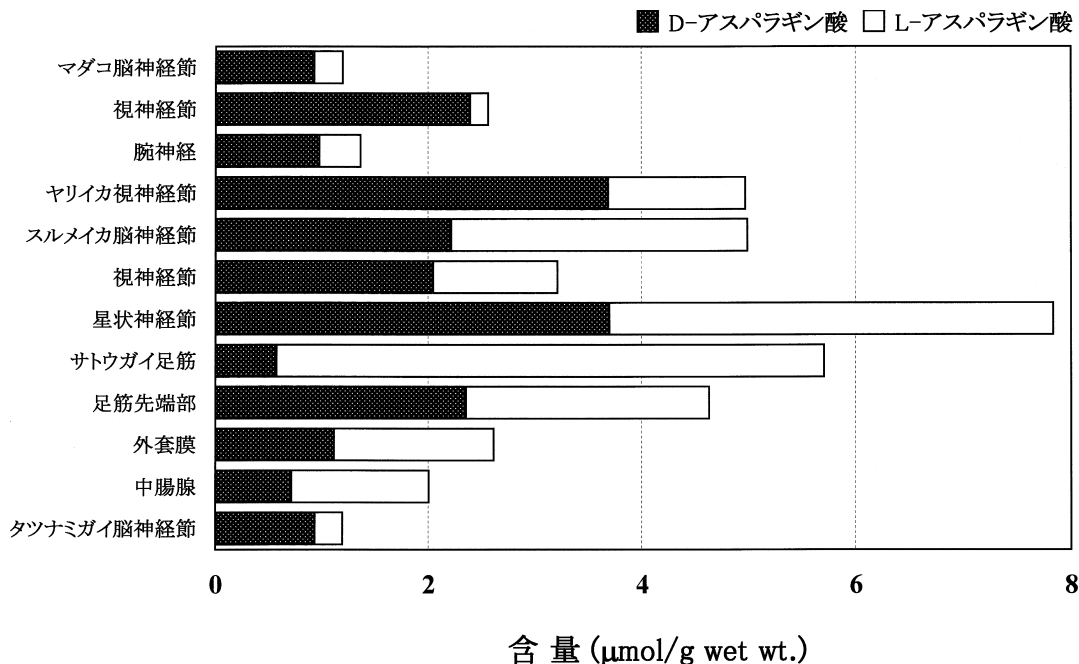


図 6 数種軟体動物組織における D-, L-アスパラギン酸の分布

は明らかである。これらの分子進化過程にはきわめて興味もたれるところである。軟体動物 DRase の生理機能は明らかにされていないが、神経系に含まれることから哺乳類における D-セリンのように、神経伝達への何らかの関与が予測されている。

## 7. おわりに

無脊椎動物の進化過程はほとんど不明であるが、多くの動物門に属する多様な種を含む。また、彼らの生息する環境はきわめて多岐にわたり、陸上環境とは大きく異なる。このような無脊椎動物の中で、種によっては ARase や DRase のようなラセマーゼを保持し、D-アラニンや D-アスパラギン酸を環境適応のために利用してきたものと考えられる。明らかに、これら無脊椎動物には L-アミノ酸バイオシステムとは異なる D-アミノ酸バイオシステムが存在する。このシステムが無脊椎動物あるいは脊椎動物の各門にどのような広がりをもっているのかには多大な興味もたれる。相同性を示す軟体動物の DRase と哺乳類の SRase はどのような関係にあるのであろうか？ ARase や DRase は哺乳類にまで広がりをもっているのであろうか？ 今後の詳細な検討を期待したい。

## 文 献

- 1) Okuma, E. & Abe, H. (1994) *Comp. Biochem. Physiol.*, **109A**, 191-197.
- 2) D'Aniello, A. & Giuditta, A. (1977) *J. Neurochem.*, **29**, 1053-1057.
- 3) D'Aniello, A. & Giuditta, A. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 319-322.
- 4) Matsushima, O., Katayama, H., Yamada, K., & Kado, Y. (1984) *Mar. Biol. Lett.*, **5**, 217-225.
- 5) Okuma, E. & Abe, H. (1994) *J. Chromatogr. B*, **660**, 243-250.
- 6) Okuma, E. & Abe, H. (1995) *Fish. Sci.*, **61**, 157-160.
- 7) Okuma, E., Watanabe, K., & Abe, H. (1998) *Fish. Sci.*, **64**, 606-611.
- 8) Okuma, E., Fujita, E., Amano, H., Noda, H., & Abe, H. (1995) *Fish. Sci.*, **61**, 157-160.
- 9) Okuma, E., Watanabe, K., & Abe, H. (1998) *Fish. Sci.*, **64**, 606-611.
- 10) Abe, H., Okuma, E., Amano, H., Noda, H., & Watanabe, K. (1999) *Comp. Biochem. Physiol.*, **123A**, 55-59.
- 11) Fujimori, T. & Abe, H. (2002) *Comp. Biochem. Physiol.*, **131A**, 893-900.
- 12) Fujita, E., Okuma, E., & Abe, H. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.*, **116A**, 83-87.
- 13) Fujita, E., Okuma, E., & Abe, H. (1997) *Fish. Sci.*, **63**, 440-445.
- 14) Shibata, K., Shirasuna, K., Motegi, K., Kera, Y., Abe, H., & Yamada, R. (2000) *Comp. Biochem. Physiol.*, **126B**, 599-608.
- 15) Nomura, T., Yamamoto, I., Morishita, F., Furukawa, Y., & Matsushima, O. (2001) *J. Exp. Zool.*, **289**, 1-9.
- 16) Uo, T., Ueda, M., Nishiyama, T., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2001) *J. Mol. Catal. B*, **12**, 137-144.
- 17) Yoshikawa, N., Dhomae, N., Takio, K., & Abe, H. (2002) *Comp. Biochem. Physiol.*, **133B**, 445-453.
- 18) Okuma, E. & Abe, H. (1998) *Comp. Biochem. Physiol.*, **120A**, 681-686.
- 19) 吉川尚子 (2003) 学位論文, 東京大学, 東京.
- 20) Kera, Y., Hasegawa, S., Watanabe, T., Segawa, H., & Yamada, R. (1998) *Comp. Biochem. Physiol.*, **119B**, 95-100.
- 21) D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., & Fisher, G. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 26941-26949.
- 22) Sarower, M.G., Matsui, T., & Abe, H. (2003) *J. Exp. Zool.*, **295A**, 151-159.
- 23) Sarower, M.G., Okada, S., & Abe, H. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **420**, 121-129.
- 24) Sarower, M.G., Okada, S., & Abe, H. (2005) *Comp. Biochem. Physiol.*, **140B**, 417-425.
- 25) Miura, R., Setoyama, C., Nishina, Y., Shiga, K., Miyahara, I., Mizutani, H., & Hirotsu, K. (2001) *J. Mol. Catal. B*, **12**, 43-52.
- 26) Pollegioni, L., Falbo, A., & Pilone, M.S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 11-16.
- 27) Shibata, K., Watanabe, T., Yoshikawa, H., Abe, K., Takahashi, S., Kera, Y., & Yamada, R. (2003) *Comp. Biochem. Physiol.*, **134B**, 307-314.
- 28) Abe, K., Takahashi, S., Muroi, Y., Kera, Y., & Yamada, R. (2006) *J. Biochem.*, **139**, 235-244.
- 29) Gallagher, D.T., Gililand, G.L., Xiao, G., Zondlo, J., Fisher, K.E., Chinchilla, D., & Einstein, E. (1998) *Structure*, **6**, 465-475.
- 30) Foltyn, V.N., Bendikov, I., De Miranda, J., Panizzutti, R., Dumin, E., Shleper, M., Li, P., Toney, M.D., Kartvelishvily, E., & Wolosker, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1754-1763.