

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

アミノ酸ラセマーゼの構造と機能

吉 村 徹

遊離 D-アミノ酸生成を担うアミノ酸ラセマーゼは、ピリドキサルリン酸 (PLP) に依存する酵素と、補因子を要求しない酵素の 2 種類に大別される。PLP 酵素は進化的に異なる五つの酵素群 (fold-type I~V) に分類されるが、アミノ酸ラセマーゼには、カビのアラニンラセマーゼ (fold-type I)、哺乳類脳内の D-セリン合成を担う真核細胞型セリンラセマーゼ (fold-type II)、細菌に広く分布するアラニンラセマーゼ (fold-type III) の 3 群の酵素が依存する。fold-type III のアラニンラセマーゼおよび同 II のセリンラセマーゼについて詳細な酵素学的検討を行い、構造は全く異なるものの両酵素反応がともに二塩基機構によって進行することなどを明らかにした。

1. はじめに

本来の機能として遊離 D-アミノ酸合成を触媒可能な酵素には、D-アミノ酸トランスアミナーゼとアミノ酸ラセマーゼがある。前者はケト酸を D-アミノ酸に転換するが、その際アミノ基の供与体として D-アミノ酸を必要とするため、D 型立体配置をもったアミノ酸を新たに合成できる酵素はアミノ酸ラセマーゼであると考えてよい。遊離アミノ酸の立体化学が反転する際、反応の前後でエンタルピーは変化しない。反応はエントロピー駆動によって進行するため、平衡状態では D 型、L 型のアミノ酸の等量混合物、すなわちラセミ体が生成される。アミノ酸ラセマーゼは以前から細菌にその存在が知られており、ビタミン B₆ の補酵素型であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) に依存するアラニンラセマーゼ¹⁾、低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ²⁾、アルギニンラセマーゼ³⁾、セリンラセマーゼ⁴⁾などと、補因子を要求しないアスパラギン酸ラセマーゼ⁵⁾、グルタ

ミン酸ラセマーゼ⁶⁾、プロリンラセマーゼ⁷⁾が見いだされていた。近年、哺乳類を含む真核生物に様々な遊離 D-アミノ酸が見いだされたことを契機に、種々の真核生物においても、PLP に依存する真核細胞型セリンラセマーゼ^{8,9)}、アスパラギン酸ラセマーゼ¹⁰⁾や PLP 非依存型のプロリンラセマーゼ¹¹⁾などの存在が報告されるようになった。

2. PLP 依存性アミノ酸ラセマーゼ

アミノ酸ラセマーゼの反応は一見単純である。一方のエナンチオマーの α -水素が引き抜かれ生成したアニオン性中間体の α -炭素に、引き抜き反応が起こった面とは逆の面上で水素が付加すれば立体反転が起こる (図 1)。PLP はエレクトロンシンクとして働き、キノイド中間体を作ってこのアニオン性中間体を安定化するものと考えられてきた¹²⁾。

ラセミ化の他、アミノ基転移、脱炭酸などアミノ酸を基質とする様々な反応を触媒する PLP 酵素は、二次構造予測や立体構造から少なくとも五つのグループ (fold-type) に分けられる (表 1)^{13,14)}。異なる fold-type に分類される酵素の間には構造上の相同性は認められない。また fold-type と酵素機能の間に相関はなく、例えばトランスアミナーゼには fold-type I と fold-type IV のものが存在し、ラセマーゼでは、fold-type I, II, III の酵素がそれぞれ存在する。それぞれのラセマーゼは、同じく PLP 依存性酵素であり

名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻
(〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

Structure and function of amino acid racemases

Tohru Yoshimura (Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan)

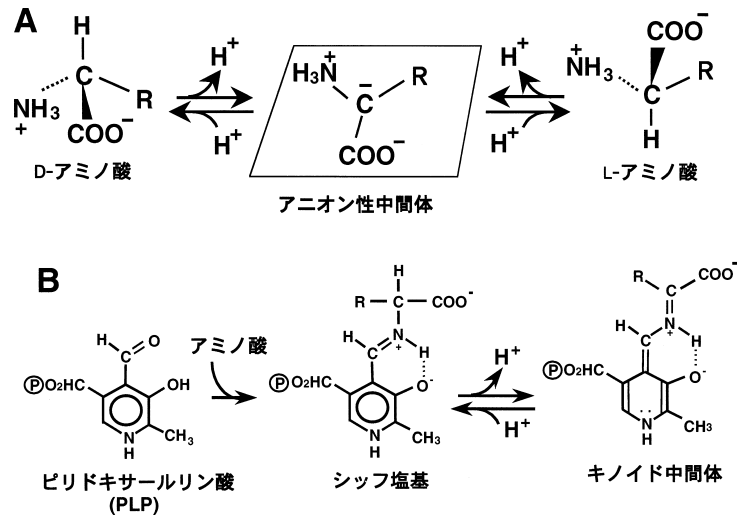
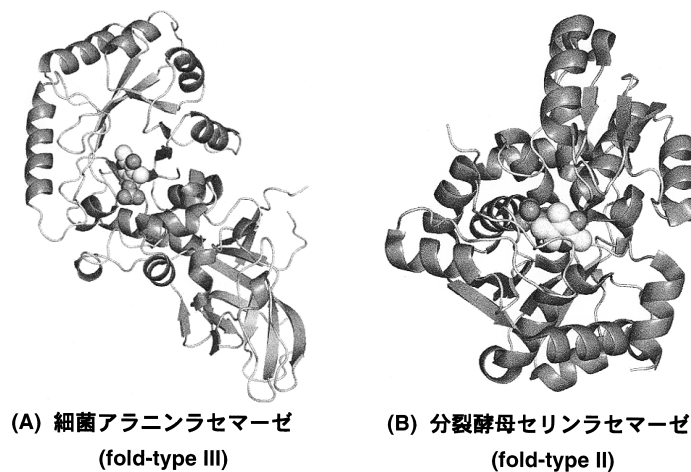


図1 アミノ酸のラセミ化 (A) と PLP の役割 (B)

表1 立体構造に基づく PLP 酵素の分類
文献 14 を基に作製. ラセマーゼは太字で示した.

fold-type	酵	素	名
I	アスパラギン酸トランスアミナーゼ, ω -アミノ酸: ビルビン酸トランスアミナーゼ, アラニンラセマーゼ (カビ), オルニチンデカルボキシラーゼ (原核生物), オルニチントランスアミナーゼ, ジアルキルグリシンデカルボキシラーゼ, シスタチオン β -リアーゼ, セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ, チロシンフェノールリアーゼ, トリプトファンナーゼ, トレオニンアルドラーゼ		
II	<i>O</i> -アセチルセリンスルフィドラーゼ, セリンラセマーゼ (真核生物), トレオニンデアミナーゼ, トリプトファンシターゼ β -サブユニット		
III	アラニンラセマーゼ (細菌), オルニチンデカルボキシラーゼ (真核生物)		
IV	D-アミノ酸トランスアミナーゼ, 4-アミノ 4-デオキシコリスミン酸リアーゼ, 分岐鎖 L-アミノ酸トランスアミナーゼ		
V	グリコーゲンホスホリアーゼ		

図2 *G. stearothermophilus* の細菌型アラニンラセマーゼ (A) と *S. pombe* の真核細胞型セリンラセマーゼ (B) の立体構造

ながら全く異なる構造を有するタンパク質である。このように PLP 酵素は異なる祖先タンパク質から進化して同一の機能をもつに至る収斂 (収束) 進化を遂げてきた。本稿では PLP 依存性の細菌アラニンラセマーゼ (fold-type III,

図 2A) と哺乳類脳内 D-セリンの生合成系とされる真核細胞型セリンラセマーゼ (fold-type II, 図 2B) を中心に解説する。

3. アラニンラセマーゼ

3-1. 真核生物のアラニンラセマーゼ

既報のアラニンラセマーゼはすべて PLP に依存し、真核生物では貝やエビなど水生生物¹⁵⁾とカビに見いだされているほか、分裂酵母¹⁶⁾や植物¹⁷⁾などにも存在する。水生生物の酵素については本特集の他稿を参照されたい。カビの酵素は *Tolyocladium niveum*¹⁸⁾ や *Cochliobolus carbonum*¹⁹⁾ から得られている。前者はシクロスポリン A の、後者は HC-毒素と呼ばれる環状ペプチド (植物毒素) の生産菌であり、アラニンラセマーゼはそれら二次代謝産物の構成成分である D-アラニンの生合成に関与する。なお *C. carbonum* のアラニンラセマーゼは fold-type I に属する L-トレオニンアルドラーゼに近い構造を有する²⁰⁾。分裂酵母, *Shizosaccharomyces pombe* には例外的に fold-type III に属する細菌型のアラニンラセマーゼが存在する¹⁶⁾。同酵素は、構造上 *Proteobacterium* の γ -サブグループの細菌に分布する酵素によく似ており、細菌から水平転移により *S. pombe* に伝えられた可能性がある。

3-2. 細菌のアラニンラセマーゼ

現在、アミノ酸ラセマーゼの中で酵素学的研究が最も進んでいるものは、fold-type III に属する、細菌のアラニンラセマーゼであろう。同酵素の多くは細菌細胞壁ペプチドグリカンの構成成分である D-アラニンの生合成を担う。D-アラニンを含有するペプチドグリカンは細菌に特有であり、またほとんどの細菌に存在する。従って、D-アラニンを生成するアラニンラセマーゼの特異的阻害剤は、抗菌スペクトルが広くかつ選択性の高い抗菌剤となることが期待され、以前から同酵素の構造機能相関について研究が進められてきた²¹⁾。

先に述べたように、アミノ酸ラセマーゼ反応は基質から α -水素が引き抜かれ、生成したアニオン性中間体に対して、水素引き抜きとは逆の面上でプロトンが付加することにより完結する。この水素の引き抜きと中間体へのプロトン付加を、D-, L-両基質について同一の酵素残基が触媒しているのか (単塩基機構)、あるいは D-, L-それぞれの基質に対して別の残基が水素の授受を行うのか (二塩基機構) の議論がなされてきた。我々は好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* のアラニンラセマーゼについてその立体構造に基づく反応機構の研究を行った^{22~24)}。結晶構造解析の結果、同酵素の PLP 近傍には α -水素の授受を行う可能性のある三つの残基、すなわち PLP とシッフ塩基を介して結合している Lys39, PLP をはさんで Lys39 の反対側に位置する Tyr265' (' は別のサブユニット上の残基を意味する) と His166 が存在することが分かっていた²⁵⁾。

Lys39 をアラニンに変異させた K39A 変異型酵素は完全

に活性を失うが、0.25M のメチルアミンを加えると野生型酵素の 0.1% 程度の活性を回復した²¹⁾。これはメチルアミンのアミノ基が Lys39 の ω -アミノ基を代替したものと考えられた。 α -水素を重水素で置換したアラニンを基質とした反応では、D-アラニンを基質とした場合にのみ同位体効果 ($V_H/V_D=5.4$) が現れた²²⁾。一方、重水中で反応を行った場合には、L-アラニンを基質とした場合にのみ同位体効果 ($V_{H_2O}/V_{D_2O}=4.0$) が見られた。これらの結果は、メチルアミン、すなわち野生型酵素にあっては Lys39 が D-アラニンの α -水素引き抜きと、D-アラニン生成へ向かうアニオン性中間体へのプロトン付加を行う触媒基であることを意味する²²⁾。このような同位体効果は野生型酵素では小さい^{26,27)}。Lys39 をメチルアミンで代替することによって α -水素の授受の速度が遅くなり、この過程が反応全体の律速段階となったのであろう。

アラニンラセマーゼ反応が二塩基機構で進行する可能性が強くなったことから、L-アラニンの α -水素の授受を行う触媒基の存在が予想された。そこで Tyr265' と His166 について部位特異的変異を行ったところ、Tyr265' を変異させた場合にのみ酵素は活性を失った²³⁾。さらに我々は野性型および Y265A 変異型酵素のピリドキサミンリン酸 (PMP) 型酵素への転換反応の解析を行い、Tyr265' が L-アラニンの α -水素の授受を行う触媒基であることを立証した²³⁾。

このように、アラニンラセマーゼ反応は Lys39 と Tyr265' の二塩基機構で進行することが示されたが、これを構造面から確認するために、それぞれ D-アラニンおよび L-アラニンとの反応中間体アナログである ϵ -ピリドキシル D-, および L-アラニンを結合したアラニンラセマーゼの結晶構造解析を行った²⁴⁾。この結果、 ϵ -ピリドキシル D-アラニンの α -水素は Lys39 の近傍に、同じく L-アラニンの α -水素は Tyr265' の近傍に配向することが推定され (図 3)、上記の二塩基機構が支持された²⁴⁾。

ところでアラニンラセマーゼ PLP のピリジン環窒素に近接する残基はアルギニンであり、ピリジン環窒素のプロトン化を要する図 1 のキノイド中間体が生成することは考えにくい²⁵⁾。そのため、如何にしてアニオン性中間体が安定化されているかが問題となっていた。また反応が二塩基機構で進行する場合、一方の触媒基によって引き抜かれたプロトンがもう一方の触媒基に転移しなければ反応はターンオーバーしないが、結晶構造解析の結果では、Lys39 と Tyr265' の間でプロトンの受け渡しを可能とする残基や水分子は見いだせなかった。これらの条件を鑑み、我々は Lys39-Tyr265' による水素引き抜き付加反応が協奏的に起こりキノイド中間体は経由しないという反応機構を提案した²⁴⁾。この際、両残基間でのプロトン転移は反応中間体の基質アラニン部分のカルボキシル基を経由して起こる²⁴⁾。しかしこの反応機構については、いくつかのグループから

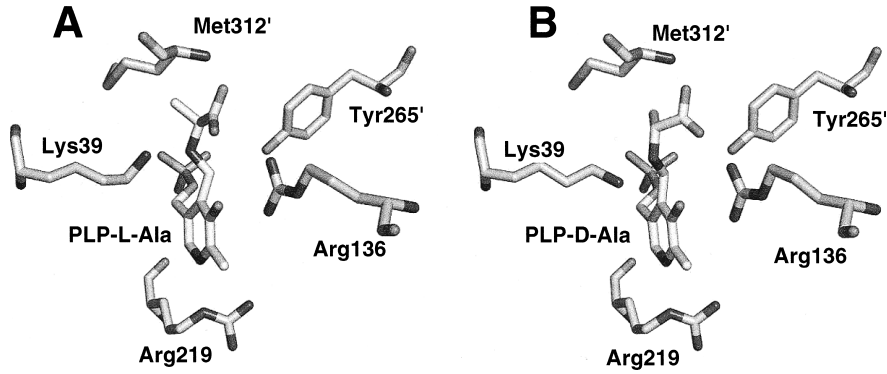


図3 ϵ -ピリドキシル-L-アラニン (A) および同-D-アラニン (B) を結合した *G. stearothermophilus* アラニンラセマーゼの活性中心

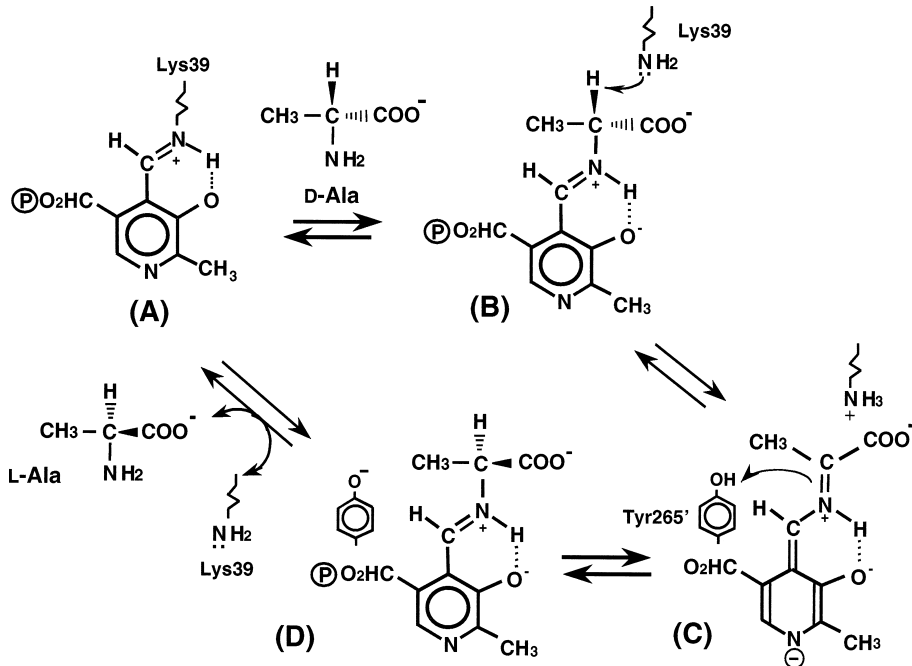


図4 *G. stearothermophilus* アラニンラセマーゼの反応機構

PLPはLys39と Schiff塩基(この構造を、分子内 Schiff塩基、または分子内アルジミンと呼ぶ)を作っている(A)。基質D-アラニンが来れば、PLPは基質と Schiff塩基(分子外 Schiff塩基、または分子外アルジミン、なお分子内 Schiff塩基と分子外 Schiff塩基の転換をアルジミン転移と呼んでいる)を形成する(B)。Lys39が基質の α -水素を引き抜き、キノイド中間体が形成される(C)。 α -水素引き抜きが起こった面とは逆の面上で、キノイド中間体の基質部分のC α 位にTyr265'からプロトンが付加し、L-アラニンとPLPの分子外 Schiff塩基が生成する(D)。アルジミン転移によってL-アラニンが放出され、酵素はもとの状態に戻る。

疑問が呈された²⁷⁻²⁹⁾。MajorとGaoは協奏反応でのTyr265'の位置が不適切となることや、水素転移を仲介するために起こるカルボキシル基の回転におけるエネルギー障壁の存在を指摘した²⁹⁾。またSpiesとToneyは最近の論文の中で、ピリジン環窒素がプロトン化しない形のキノイド中間体(図4)が可能であり、Lys39とTyr265'の間のプロトン転移は溶媒が介するという反応機構を呈示している³⁰⁾。精密な構造解析が進むアラニンラセマーゼの反応機構については、現在、計算化学に基づいた議論が継続中で

ある。

4. セリンラセマーゼ

4-1. 細菌のセリンラセマーゼ

細菌のセリンラセマーゼはバンコマイシン耐性と関連する。糖ペプチド性抗生物質であるバンコマイシンは細菌細胞壁ペプチドグリカン前駆体のD-アラニル-D-アラニン部分に結合してペプチドグリカン形成を阻害する。この部分をD-アラニル-D-セリンとすることによりバンコマイシン

耐性を獲得した *Enterococcus gallinarum* BM4174 株は³¹⁾, この D-セリン合成に働くセリンラセマーゼ (VanT) を有する⁴⁾. VanT は膜貫通領域をもつ N 末端ドメインを含む 698 残基からなる. VanT 全体を *E. coli* で発現させた場合活性は膜画分に見いだされるが, C 末端ドメインのみを発現させた場合には可溶性画分に回収される. VanT の C 末端ドメインは上述した *G. stearothermophilus* のアラニンラセマーゼと 31% の一次構造上の相同性を有する. アラニンラセマーゼにおいて活性発現にかかわると予想される残基のほとんどは VanT において保存されており, VanT の反応はおそらくアラニンラセマーゼと同様の機構で進行するものと思われる.

4-2. 真核細胞型セリンラセマーゼ

遊離 D-アミノ酸のうち哺乳類での生理作用が最もよく研究されているものは, N-メチル D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターのコアゴニストとしての機能が認められている D-セリンであろう. D-セリンの由来については, 外因性か内因性かをはじめ様々な議論がなされてきた. 我々は閉鎖系であるカイコ蛹において, 蛹化および羽化時に体内の D-セリン濃度が一過的に増加することを見だし, 羽化直前のカイコ蛹から動物では初めてとなる PLP 依存性のセリンラセマーゼを部分精製した⁸⁾. 一方, Wolosker らはラット脳から PLP に依存するセリンラセマーゼを精製し⁹⁾, マウスの同酵素遺伝子をクローニングした³²⁾. この真核細胞型セリンラセマーゼはその後, ヒト³³⁾の他, 分裂酵母, 細胞性粘菌といった真核微生物, シロイヌナズナ³⁴⁾などの植物にも存在することが明らかとなった.

この真核細胞型セリンラセマーゼは fold-type II 型の PLP 酵素であり, その構造は fold-type III 型に属する細菌セリンラセマーゼとは全く異なり, セリン/トレオニンデヒドラターゼとの相同性を有する. 真核細胞型セリンラセマーゼはセリンのラセミ化とともに, セリンをピルビン酸とアンモニアに分解するデヒドラターゼ反応 (α , β -脱離反応) を触媒する³⁵⁻³⁷⁾. マウス酵素の, ラセミ化反応での L-セリンに対する k_{cat} および K_m 値は $45.5 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$ と $3.8 \pm 0.1 \text{ mM}$ であり, D-セリンに対しては $113 \pm 3 \text{ min}^{-1}$ および $14.5 \pm 1.1 \text{ mM}$ であった³⁸⁾. 一方, デヒドラターゼ反応における k_{cat} および K_m 値は, L-セリンに対して $81.3 \pm 2.8 \text{ min}^{-1}$ と $4.0 \pm 0.5 \text{ mM}$, D-セリンに対して $8.8 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ と $3.2 \pm 0.3 \text{ mM}$ であった³⁸⁾. D-セリンを基質としたラセミ化反応の k_{cat} 値は, *G. stearothermophilus* のアラニンラセマーゼの k_{cat} 値の約 400 分の 1 である. デヒドラターゼ反応では L-セリンを基質とした場合の k_{cat} 値が D-セリンを基質とした場合の値の約 10 倍高く, k_{cat}/K_m の値は L-セリンのラセミ化活性と遜色ない. またセリンのアナログであり, β

位に脱離基をもつ L-アミノ酸, 例えば L-セリン O-サルフェートや β -Cl-L-アラニンではラセミ化反応は受けないが脱離反応のよい基質となる^{38,39)}. 例えばマウス酵素の L-セリン O-サルフェートに対する k_{cat}/K_m 値は $1973 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であり, 同酵素が触媒するセリンのラセミ化活性より高効率である³⁸⁾. なお, D-セリン O-サルフェートや β -Cl-D-アラニンは基質とならない. アスパラギン酸の誘導体であり β 位にヒドロキシル基をもつ 3-ヒドロキシアスパラギン酸には 4 種類の立体異性体が存在するが, L-threo-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (2S, 3S) はマウス酵素が触媒する脱離反応のよい基質である. 一方, L-erythro-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (2S, 3R) は同酵素の効率的な阻害剤 ($K_i = 0.043 \text{ mM}$) であり, D-threo-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (2R, 3R) は基質にも阻害剤にもならない可能性が高い³⁸⁾. このように, 脱離反応では α 位炭素の立体配置とともに置換基のある β 位の立体配置が重要な意味をもつ.

真核細胞型セリンラセマーゼの結晶構造解析は, *S. pombe* の酵素について大阪市立大学の広津らにより行われた. この結果はまだ出版されていないが, PDB 上に座標が公開されている (1V71, 1WTC) ので, これに基づき構造と反応機構の関係を考察してみたい. *S. pombe* の酵素はダイマー構造をとり, サブユニットは二つのドメインからなる. 補酵素 PLP は両ドメイン間に位置し, PLP 周辺の構造 (図 5) は, すでに報告されているラット肝の L-セリンデヒドラターゼの構造⁴⁰⁾によく似ている. *S. pombe* セリンラセマーゼでの PLP は Lys57 と分子内シッフ塩基を作って結合し, またそのピリジン環窒素は Ser308 に近接している. PLP のリン酸基は L-セリンデヒドラターゼと同様に¹⁸³Gly-Gly-Gly-Gly-¹⁸⁷Leu のクラスターに囲まれ, おそらくはこれらのアミド部分と水素結合を形成している. PLP を挟んで Lys57 の反対側に⁸¹Ser-Ser-Gly-Asn-⁸⁵His 配列が位置する. ラット肝 L-セリンデヒドラターゼでは, こ

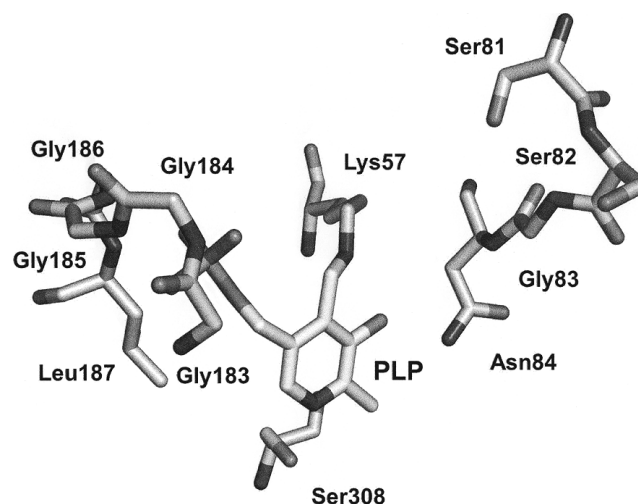


図 5 *S. pombe* セリンラセマーゼの活性中心

れと相同の位置によく似た⁶⁴Ser-Ala-Gly-Asn-⁶⁹Ala配列が存在し、基質アナログであるO-メチルセリンのカルボキシル基がSer64のO₆、Ala65およびAsn67のNと水素結合を形成している。

なお、多くの真核細胞型セリンラセマーゼはカルシウム、マグネシウムなどの二価カチオンによる活性化を受けるが^{35,36)}、*S. pombe*酵素ではマグネシウムがGlu208とAsp214に配位している。両残基は*D. discoideum*酵素を含む真核細胞型セリンラセマーゼに広く保存されているが、*D. discoideum*酵素はEDTA添加によりほとんど影響を受けず、二価カチオンによって阻害される。二価カチオン結合部位に相当する*D. discoideum*酵素のGlu207とAsp213をアラニンに置換しても酵素活性は残存することから、二価カチオンは真核細胞型セリンラセマーゼ反応に必ずしも必須ではないと思われる。

セリンラセマーゼ反応が、アラニンラセマーゼと同様に二塩基機構で進行するのであれば、その触媒基の一つはPLPを結合するLys57である可能性が高い。O-メチルセリンを結合したラット肝のL-セリンデヒドラターゼの構造から類推すると、*S. pombe*セリンラセマーゼのLys57はL-セリンの α -水素の授受を触媒すると予想される。D-セリンの α -水素授受の触媒基としては、PLPを挟んでLys57と反対側にありセリンラセマーゼに広く保存されているSer82と予想される。筆者らは*D. discoideum*酵素においてこのSer82に対応する残基(Ser81)をアラニンに変異させた場合にラセミ化活性とD-セリンデヒドラターゼ活性がほぼ消失すること、一方L-セリンデヒドラターゼ活性は残存することを確認した。この結果は、*S. pombe*酵素のラセミ化反応がL-セリンの α -水素授受を触媒するLys57と、D-セリンの α -水素授受を触媒するSer82の二塩基機構で進行する可能性を支持している。

デヒドラターゼ反応では、セリンの α -水素とともに β 位のOH基が水として脱離する。ラット肝L-セリンデヒドラターゼでは、分子外シッフ塩基を形成したセリンのOH基にグリシクラスターのもとにあって極性が低下しているリン酸基からプロトンが移り、OH基が水として脱離するスキームが提案されている⁴⁰⁾。同時に起こる α -水素引き抜きの結果形成された α -アミノアクリル酸がアルジミン転移反応の過程でPLPとのシッフ塩基から放出され、加水分解を受けてピルビン酸とアンモニアを生じる。なおリン酸基からOH基に渡されるプロトンは、基質セリンのプロトン化したアミノ基に由来する。L-セリンデヒドラターゼに見られるグリシクラスターは、真核細胞型セリンラセマーゼにも保存されており、同酵素においても同様な機構でデヒドラターゼ反応が進行する可能性がある。ただし、セリンラセマーゼはラセミ化も触媒すること、反応の最適pHが10(*D. discoideum*酵素の場合)であり基質ア

ミノ基はプロトン化していない可能性が高いことを考えると、セリンラセマーゼでは基質から引き抜かれた α -水素がLys57やSer82を介して基質セリンのOH基に渡り β -脱離が起こる可能性もあるように思う。反応機構を議論するためには、基質アナログを結合した酵素の構造解析が必要であろう。

5. PLP依存性アスパラギン酸ラセマーゼ

D-セリンと並んでその生理作用が注目されるD-アスパラギン酸であるが、その生合成を触媒する酵素としては、PLPに依存するアスパラギン酸ラセマーゼがある¹⁰⁾。二枚貝*Scapharca broughtonii*から遺伝子がクローニングされた同酵素は、上述の真核細胞型セリンラセマーゼと45%近い一次構造上の相同性を有する⁴¹⁾。同酵素はラセミ化に関してはアスパラギン酸に高い特異性を示しその他のアミノ酸には作用しないが、マウスセリンラセマーゼと同様、L-threo-3-ヒドロキシアスパラギン酸の脱離反応を触媒する。哺乳類には、このアスパラギン酸ラセマーゼのホモログは見いだされておらず、また以下に述べるPLP非依存型の酵素も存在しない。D-アスパラギン酸は哺乳類細胞で合成される可能性が高いが⁴²⁾、今のところその生合成機構は分かっていない。

6. 補因子を要求しないアミノ酸ラセマーゼ

PLPなど補因子を要求せず、システイン残基が触媒基として働くアスパラギン酸ラセマーゼは細菌¹⁰⁾やアーキア⁴³⁾に見いだされている。*Pyrococcus horikoshii*由来の酵素ではCys82とCys194の二つのシステイン残基が反応に関与する。現在、同酵素の立体構造が明らかにされており⁴⁴⁾、単塩基機構か二塩基機構かといった問題も含めて反応機構に関する議論が続けられている。

同様にシステイン残基を触媒基とするPLP非依存性の細菌グルタミン酸ラセマーゼについても多くの研究がなされているが、紙数の関係上最近の文献を挙げるに留めたい⁴⁵⁾。なお、同じく補因子を要求せずシステイン残基を触媒基とするプロリンラセマーゼが細菌¹⁰⁾とともに*Trypanosoma cruzi*¹¹⁾にも存在し、免疫応答の回避に関連して注目されている。

7. おわりに

真核生物におけるD-アミノ酸の生理作用が明らかになるにつれ、その生合成酵素に関心が寄せられた。細菌に広く分布するfold-type III型アミノ酸ラセマーゼについては以前から多くの知見が得られていたが、真核生物のD-アミノ酸生合成経路は容易に明らかにならなかった。これはPLP依存性アミノ酸ラセマーゼが少なくとも3種の祖先タンパク質から収斂進化しており、fold-type III型アミノ酸

ラセマーゼの構造から真核生物のもつ fold-type I および II 型アミノ酸ラセマーゼを予想することが不可能であったためである。さらに PLP 酵素は同じ fold-type 内でラセマーゼ、トランスアミナーゼ、デカルボキシラーゼなどに分岐進化 (divergent evolution) しており、一次構造から酵素機能を推定することが困難な場合も多い。例えば、我々は細菌のアラニンラセマーゼ様モチーフを有する *Saccharomyces cerevisiae* の Ygl196Wp タンパク質が D-セリンデヒドラーゼであることを見いだしたが⁴⁶⁾、その構造から機能を予想することはできなかった。哺乳類の D-アスパラギン酸、D-アラニンの生合成酵素は未だ特定されていないが、データベース上では他の PLP 酵素とされている可能性も考えられる。これら D-アミノ酸の生合成酵素を特定しその構造機能相関を解明することは、D-アミノ酸の生理作用に関する理解を深めると共に、臨床的に有用な酵素阻害剤や活性化剤などの開発につながるものであろう。今後の研究に期待したい。

文 献

- Marr, A.G. & Wilson, P.W. (1954) *Arch. Biochem. Biophys.*, **49**, 424-433.
- Soda, K. & Osumi, T. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 363-368.
- Soda, K., Yorifuji, T., & Ogata, K. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 606-608.
- Arias, C.A., Martín-Martínez, M., Blundell, T.L., Arthur, M., Courvalin, P., & Reynolds, P. E. (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 1653-1664.
- Lamont, H.C., Staudenbauer, W.L., & Strominger, J.L. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5103-5106.
- Diven, W.F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 702-706.
- Cardinale, G.J. & Abeles, R.H. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3970-3978.
- Uo, T., Yoshimura, T., Shimizu, S., & Esaki, N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 31-34.
- Wolosker, H., Sheth, K.N., Takahashi, M., Mothet, J.P., Brady, R.O. Jr, Ferris, C.D., & Snyder, S.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 721-725.
- Yamada, R.H., Kera, Y., & Takahashi, S. (2006) *Chem. Rec.*, **6**, 259-266.
- Reina-San-Martín, B., Degraeve, W., Rougeot, C., Cosson, A., Chamond, N., Cordeiro-Da-Silva, A., Arala-Chaves, M., Coutinho, A., & Minoprio, P. (2000) *Nat. Med.*, **6**, 865-866.
- Eliot, A.C. & Kirsch, J.F. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 383-415.
- Grishin, N.V., Phillips, M.A., & Goldsmith, E.J. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 1291-1304.
- Soda, K., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2001) *Chem. Rec.*, **1**, 373-384.
- Abe, H., Yoshikawa, N., Sarower, M.G., & Okada, S. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1571-1577.
- Uo, T., Yoshimura, T., Tanaka, N., Takegawa, K., & Esaki, N. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 2226-2233.
- Ono, K., Yanagida, K., Oikawa, T., Ogawa, T., & Soda, K. (2006) *Phytochemistry*, **67**, 856-860.
- Hoffmann, K., Schneider-Scherzer, E., Kleinkauf, H., & Zocher, R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 12710-12714.
- Cheng, Y.Q. & Walton, J.D. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4906-4911.
- Contestabile, R., Paiardini, A., Pascarella, S., di Salvo, M.L., D'Aguzzo, S., & Bossa, F. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6508-6525.
- Walsh, C.T. (1989) *J. Biol. Chem.*, **64**, 2393-2396.
- Watanabe, A., Kurokawa, Y., Yoshimura, T., Kurihara, T., Soda, K., & Esaki, N. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 4189-4194.
- Watanabe, A., Yoshimura, T., Mikami, B., & Esaki, N. (1999) *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**, 781-786.
- Watanabe, A., Yoshimura, T., Mikami, B., Hayashi, H., Kagamiyama, H., & Esaki, N. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 19166-19172.
- Shaw, J.P., Petsko, G.A., & Ringe, D. (1997) *Biochemistry*, **36**, 1329-1342.
- Faraci, W.S. & Walsh, C.T. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3267-3276.
- Spies, M.A., Woodward, J.J., Watnik, M.R., & Toney, M.D. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7464-7475.
- Spies, M.A. & Toney, M.D. (2003) *Biochemistry*, **42**, 5099-5107.
- Major, D.T. & Gao, J. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16345-16357.
- Spies, M.A. & Toney, M.D. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10678-10685.
- Billot-Klein, D., Blanot, D., Gutmann, L., & van Heijenoort, J. (1994) *Biochem. J.*, **304**, 1021-1022.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., & Snyder, S.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13409-13414.
- De Miranda, J., Santoro, A., Engelender, S., & Wolosker, H. (2000) *Gene*, **256**, 183-188.
- Fujitani, Y., Nakajima, N., Ishihara, K., Oikawa, T., Ito, K., & Sugimoto, M. (2007) *Phytochemistry*, **67**, 668-674.
- De Miranda, J., Panizzutti, R., Foltyn, V.N., & Wolosker, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14542-14547.
- Neidle, A. & Dunlop, D.S. (2002) *Neurochem. Res.*, **27**, 1719-1724.
- Strisovsky, K., Jiraskova, J., Barinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B. S., & Konvalinka, J. (2003) *FEBS Lett.*, **535**, 44-48.
- Strisovsky, K., Jiraskova, J., Mikulova, A., Rulisek, L., & Konvalinka, J. (2005) *Biochemistry*, **44**, 13091-13100.
- Panizzutti, R., De Miranda, J., Ribeiro, C.S., Engelender, S., & Wolosker, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5294-5299.
- Yamada, T., Komoto, J., Takata, Y., Ogawa, H., Pitot, H.C., & Takusagawa, F. (2003) *Biochemistry*, **42**, 12854-12865.
- Abe, K., Takahashi, S., Muroki, Y., Kera, Y., & Yamada, R. H. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **139**, 235-244.
- Long, Z., Homma, H., Lee, J.A., Fukushima, T., Santa, T., Iwatsubo, T., Yamada, R., & Imai, K. (1998) *FEBS Lett.*, **434**, 231-235.
- Yohda, M., Okada, H., & Kumagai, H. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1089**, 234-240.
- Ohtaki, A., Nakano, Y., Iizuka, R., Arakawa, T., Yamada, K., Odaka, M., & Yohda, M. (2007) *Proteins*, **70**, 1167-1174.
- Lundqvist, T., Fisher, S. L., Kern, G., Folmer, R.H., Xue, Y., Newton, D.T., Keating, T.A., Alm, R.A., & de Jonge, B. L. (2007) *Nature*, **447**, 817-822.
- Ito, T., Hemmi, H., Kataoka, K., Mukai, Y., & Yoshimura, T. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 399-406.