〔ミニレビュー〕

オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子の分子進化

下桐 猛・辻 莊一

神戸大学農学部応用動物遺伝学講座
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

Molecular evolution of ornithine transcarbamylase gene

Takeshi SHIMOGIRI, Soichi TSUJI

Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture
Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

1. は じ め に

尿素サイクルは、アンモニアを尿素に代謝する経路で、カルバミルリン酸合成酵素 I (CPS I)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギニノコハク酸合成酵素 (AS)、アルギニノコハク酸リアーゼ (AL)、アルギナーゼ (ARG) の 5 種類の酵素から成り、これら全ての酵素が肝臓で多量に発現している。

このサイクルは、バクテリアでも発現しているようにアンモニアから必須アミノ酸のアルギニン合成する系として獲得されたものと考えられており、その後、脊椎動物への進化と共に、海水中に棲息する水生動物では、浸透圧の調節のためにも利用されるようになった。脊椎動物の陸生化に伴い、アンモニアの水環境への拡散放出が不可能となり、尿素サイクルにより、アンモニアを尿素に変えて解毒し、排泄するようになったとされている。他方、カメ類以外のハ虫類や鳥類のような尿酸排泄動物にはこのサイクルが存在しないことが知られている。これらの動物は胚発生を閉鎖卵内で行うために、水溶性の尿素は卵中の浸透圧を上昇させる結果となり胚にとって有害となる。

そこで、これらの動物は不溶性の尿酸として蓄積するようになり、また、この性質が成長後も変わらず維持される。それゆえ、ニワトリでは生体内に必要なアルギニンはもっぱら外因性の食物タンパク質に依存しており、必須アミノ酸の一つとなっている。しかしながら、ニワトリの腎臓では CPS I 以外の尿素サイクル酵素の活性がわずかに検出される (Tamir & Ratner, 1963)。我々は、以前よりその 1 酵素である OTC に着目し、検討してきた。その結果、本酵素は 2 日齢のニワトリで最高の活性を示し、高脂肪食で活性が誘導される。その一方で、活性が全く得られないニワトリも存在し、これらは酵素誘導もおこらないが、正常に生存、繁殖する (辻, 1990)。つまり、ニワトリの OTC は尿素サイクルが不要になったために、生理的に無意味な、いわゆる 'junk' (がらくた) になった酵素であると考えられる。進化の過程で尿素サイクルを失ったのは 2~3 億年前と言われており、このような junk となった酵素がなぜ維持、発現されるのかは興味深い問題である。そこで、その手掛かりを得るため本研究では、尿酸排泄動物において OTC の発現を調べ、その分子進化について検討を行った。

2. OTC

オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC : EC 2.1.3.3) は, カルバミルリン酸の結合エネルギーを用いて, L-オルニチンからシトルリンと無機リン酸とを生成する反応を触媒する酵素で, ミ

トコンドリアに局在する. すでに尿素排泄動物や大腸菌などでクローニングされており, 哺乳類の OTC は 354 アミノ酸残基からなり, N 末端側 32 残基がミトコンドリアへの移行に必要なリーダーペプチドで, 残りが成熟体である. 成熟体 OTC は哺乳類内では相同性が高く, 哺乳類と大腸菌の

		R F xx	Gxxxx	
chicken	MLFNLKLNLYRITKLTQ-NSKHLPRHF/CR---	GPPNQMNVCCLKGRDLLTLQNYTADELKYLLWVASDLKQRIKDK	70	
alligator	-MWHFQGPQPSLK.ENIG.L.AMG.PA	QQNRP.K.T.T..H.....E.I.....H.	73	
lizard	...FRS.FSTRNVNK-I....VQRI	RYR-H...SETP.Q.....FS.E.I....SA...E...HR	72	
snake			0	
turtle	R..LNAAT.RN-S..Q.VQH.	RS---Q.T.T.IN.....E.I....T.....	70	
bovine	...H.RT.LNNAAR.N-GHNFVV.N.	RC---Q.L.DK.Q.....K.F.GE.I..M..LSA...F...Q.	70	
xenopus	..SL.RHVFSSAPILN-T..CVAHH.	RS-----SHC..Q...GN...K...E.I.....T...Y...Q.	67	
skate	MI.A.R...SG--RWLSLGI.CSV.S.	GC---QVALGAAA...RH..S.KDFSGE.I.QF..T.A...M...Q.	69	
chicken	GE YLPLMQGKSLAMIFEKRSRTRLSAET\	GALLGGHSSFLTQDIHLGTNESLTDTA/RVLSSTMTNAILARV	142	
alligator	..	..T...V...PC...T...I.....G..D.....	145	
lizard	..	..L...T...T...PC...AE...I..NI.....T..D.....	144	
snake			0	
turtle	..	..L...T...PC...T...V.....V...V...	142	
bovine	..	..L...G...T...PC...TD...V.....D..V...	142	
xenopus	..	..V..L...N...PC...T...V...K...G..D..V...	139	
skate	..	..I...L...I...T...PC...T...V...RK...G..D..V...	141	
chicken	YKHNDLDMTKEATIPVINGLSLDLYHPLQILADYLTQ	EHYGGNLGLTIAWIGDGNNVLHSIMTSAAKLGMHLR	216	
alligator	..QS...LA...S..I...S...I..V.....H...S...N...M...H		219	
lizard	C..H..E.LA...L...SE..I.....S...LC...N...L...F..N.H		218	
snake	..ITLAE..V...SD..I.....RS...LS...N...LLT...F..N.H		69	
turtle	..QS...LA...S..IV...S...I.....Y..K...S...N...LM...F...		216	
bovine	..QS...LA...S..IV...I.....S..K...LS...I...M...F...Q		216	
xenopus	..CQT...LA...K..IV...M..I.....H...S...N...M...F..N.		213	
skate	..S...EQLAEDG...V...EM...I.....F.S...LS...N..F..M..P.....N		215	
chicken	IATPK GFEPDLRITKVTEQYSKE YGTRLLLLTDPLEAANGANVLVTDTWISMGQEEERKRLKAFQGYQITMQ		289	
alligator	V...S...Y..I..IA...K...SG...Q..IE..R.....		292	
lizard	..I...TMV...TA.E..IK..C...FR..N...R...I.....QA...D.....		291	
snake	V...PTVI..IA.E..IK..C.K...N...K...I.....QK...E.....		142	
turtle	V...PNVV..A.E...S.K.FF...S...ESD.....		289	
bovine	V...Y...PS...MA...A..N..K.S..N...C.G...I.....KK..Q...V..K		289	
xenopus	..Y...SAVISAAK.F...F..K.FM.NE...T...V...KK...D..N...		286	
skate	V...ADV...AKSLAG..C..K.FF.N..V...S...A...V...D..AE...H...K		288	
chicken	TVQSAASNWTFLHCLERKPEEVDDEVFYSRSLVQEAENRKWTIM	AVMVSLLTDYSPQLQMPTF	354	
alligator	..AKA...D...R...S...Q.....K...		357	
lizard	IGKV..PG...Q.....S.....M..K...		356	
snake	..G.E...PD...F.....K...		166	
turtle	..GKH...D...SP...K.K...		354	
bovine	..AKV...PD...A...K...P...V...A...I...PK...		354	
xenopus	..GKV.SPD...GA..NI...LSNK.K.		351	
skate	..GK...P...		353	

図 1 OTC アミノ酸配列のアライメント

本研究で決定された OTCcDNA から推定されたアミノ酸配列である. ニワトリ OTC と同一なアミノ酸はピリオド (.) で示し, アミノ酸のギャップはバー (-) で示した. カルバミルリン酸とオルニチンに結合する領域は実線と破線で囲んだ. MPP と MIP に対する認識部位に矢印をした. また, ニワトリで同定されているイントロンの挿入部分にスラッシュ (|, \, /) を入れたが, それぞれコドン間, 次のコドンの第一塩基と第二塩基の間, 第二塩基と第三塩基の間に挿入されることを意味する. これらはすべてヒト OTC 遺伝子と一致する.

アミノ酸配列の相同性から基質結合部位（カルバミルリン酸，オルニチン；図1）が推定されている（Kraus ら，1985）。さらに，OTC 活性が欠損している sparse-fur マウスを使っての実験から，1 ヶ所の非同義的置換（ヒスチジン→アスパラギン）により機能を失うことも報告されている（Veres ら，1986）。一方，リーダーペプチドは，酵素の機能に影響しないために機能的制約は低いと考えられ，哺乳類内でも低い相同性を示すが，その配列中には塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸に富むことが知られている（Kaput ら，1982）。一方，OTC のミトコンドリアへの移行のメカニズムもよく研究されている。すなわち，翻訳された OTC はリーダーペプチドを有する前駆体として存在し，細胞質中に存在する分子量 70 kDa の熱ショック蛋白質と結合することで，ミトコンドリアへの移行が効率良く行われるのに必要な高次構造を維持し（Terada ら，1996），その後，ミトコンドリアへの移行の際にリーダーペプチドが 2 種類のプロテアーゼ（MPP と MIP）の作用で 2 段階で切断され成熟体となる。したがって，OTC のリーダーペプチドには，これらのプロテアーゼの認識部位，アルギニン残基（Arg-23；Horwich ら，1986）と，モチーフ配列（FXXGXXXX；Isaya ら，1992）が存在する（図1）。しかしながら，実際には，このような領域が完全に保存され

ていなくてもよく，アミノ酸配列の保存よりもその高次構造が重要なようである。

3. 尿酸排泄動物での OTC の発現と分子進化

1) ニワトリ OTC

ニワトリ OTCcDNA は，高い活性を示すニワトリヒナの腎臓から cDNA ライブラリーを構築し，ラット OTCcDNA をプローブとしてスクリーニングにより単離し，その塩基配列を決定した。その後，PCR 法を用いて遺伝子の構造を決定した。

ニワトリ OTC 遺伝子は，哺乳類と全く同じエキソン・イントロン構造をもつ約 28 kb の遺伝子であり，エキソン中にコードされるアミノ酸数は 354 残基であり，その配列は成熟体領域でヒトと 78% 一致していた（図1）。また，各イントロンのスプライシング接合部位は，表1に示すように一般に知られている GT-AG ルールに従っていた。つまり，高い酵素活性を示すニワトリの OTC 遺伝子は翻訳領域の塩基配列の上からも構造上からも機能を維持していることが推定された。

前述のように，ニワトリには OTC 活性を示さない品種も存在する。この原因には，翻訳領域中のミスセンスやナンセンス突然変異あるいはフレームシフトや，さらに，スプライシング部位の

表 1 ニワトリ OTC 遺伝子のエクソン・イントロン構造

エクソン No.	エクソン	イントロン	エクソン
1	GGCATTTTTTG	gtaagcttat	tttttcacag
2	CAAAGGAGAG	gtaaaatgct	tattgtccag
3	GCAGAAACAG	gtaaattgga	ctccttgcag
4	ATACAGCAAG	gttggtgaaga	catccccacag
5	AACTCTTCAG	gtaccaatat	cttttggcag
6	AACTCCCAAG	gtataaaagc	cttttggcag
7	CTCAAAGAG	gtatgagccc	ttcacattag
8	TACGATGCAG	gtaaaaattc	tgatctacag
9	GACAATTATG	gtaaaaaac	cctcctctag

変異なども考えられる。我々は、活性のない品種から OTCcDNA のクローニングや遺伝子構造を詳細に調べ、これらの形の突然変異がみられないことを確認した。つまり、ニワトリ OTC 遺伝子は junk と考えられたにもかかわらず、その活性の高低に関係なく機能を維持していることが明らかとなった (Shimogiri ら, 1998)。

このような junk な酵素は、生存に影響を与えないので、ゲノム中に居座ってしまってもよい。しかしながら、通常は今まで受けてきた生理的機能による制約が緩和され、その進化速度が高まるため、その保存の程度は明らかに低下することが知られている。例えば、junk な DNA の代表とされる偽遺伝子は、その置換速度が非常に早く、それらの半減期は平均 4720 万年ほどであることが知られており (Ohno, 1985)、尿素サイクルを必要としなくなった 2-3 億年は、これらに関連する遺伝子が消失するのに十分な時間である。また、Hendriks ら (1987) は、機能を失ったはずのメクラネズミの αA クリスタリンを他のラットと比較した結果、その進化速度は高くなっていったが、ゲノム中から消失していなかったことから、視覚以外の何らかの機能を維持していることを示唆している。こうして考えると、我々の得た結果は、今までの junk とした見解と異なり、OTC が微量でも何らかの生理的な意義があることを示唆する。

2) ハ虫類の OTC

もし、上述の仮説が正しいとすれば、ニワトリと同じく尿酸排泄をするハ虫類においても OTC は維持、発現される必要があろう。そこで、尿酸排泄動物であるハ虫類として、ワニ (*Alligator mississippiensis*)、トカゲ (*Sceloporus undulatus*)、ヘビ (*Python regius*) を選び、それらの cDNA ライブラリーから PCR クローニングによって OTCcDNA の存在と発現を調べた。さらに、尿酸排泄動物の OTC と比較するため、尿素合成動物を代表する OTC として、尿素排泄を主に行うハ虫類のカメ (*Trachemys scripta elegans*)、軟骨魚類のエイ (*Raja sp.*)、カエル

(*Xenopus laevis*)、ウシ (*Bos taurus*) から OTCcDNA のクローニングを行った。

その結果、すべてから OTCcDNA がクローニングされ、それから推定されるアミノ酸配列のアライメントを図 1 に示した。尿酸排泄動物の OTC も、リーダーペプチドに相当する N 末端側のアミノ酸配列の相同性は低く、この領域のアミノ酸配列にギャップが確認された。また、その配列中には塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸に富んでいるが、ペプチダーゼ認識部位は種によってその保存に有無がみられた。他方、成熟体はよく保存されており、オルニチンとカルバミルリン酸の両基質結合部位はいずれの種の OTC でも完全に保存されていた。また、成熟体領域中でも N 末端よりも C 末端側がよくアミノ酸が保存されているが、これは尿素排泄動物の OTC でも得られる傾向である。これらのことから、尿酸排泄動物一般に OTC が存在し、発現していることが示され

図 2 脊椎動物 11 種の成熟体 OTC の塩基配列から作成された分子系統樹

本研究で決定された以外のデータは GenBank より得た。以下に学名とアクセッション番号を記した：ラット (*Rattus norvegicus* ; K 00001), マウス (*Mus musculus* ; M 17030), ヒト (*Homo sapiens* ; K 02100), カエル (*Rana catesbeiana* ; M 95193)

た。

図2は、現在得られている11種の成熟体OTCの塩基配列から、neighbour-joining (NJ) 法を使って得られた分子系統樹である。得られた系統樹は、これまで一般的に認められている脊椎動物の進化系統樹と一致しており、オーソログな遺伝子のそれであることが分かった。また、成熟体OTCのアミノ酸配列から進化速度を求めたところ、OTC遺伝子の進化速度は両生類、ハ虫類、鳥類、哺乳類の間で近似的にほぼ一定であった。これらのことから、尿酸排泄動物のOTCも進化の過程で、尿素合成動物と同様に尿素サイクル酵素としての機能的制約を受け、維持、発現されていることが示された。つまり、尿酸排泄動物のOTCは肝臓での多量発現の機構は失ったが、これらの動物でもなお、何らかの生理的な意義があり、尿素サイクル酵素のOTCとして維持され続けたと考えられる。

3) CPS I と OTC

一連の研究の結果、最初junkと考えられていたOTCが尿酸排泄動物全般で保持され、分子進化の上からでも尿素サイクル酵素のOTCとして意義を持つものと考えられた。ところで、CPS I と OTC はセットとして働かなければ、その生理的意義は発揮できない。すなわち、 NH_3 と CO_2 と ATP からカルバミルリン酸が合成され、これがオルニチンと結合してシトルリンとなるが、前の段階はCPS Iが、後はOTCが触媒しており、CPS Iが存在しなければ、OTCは無意味である。ところが、文献的にはニワトリはCPS Iを欠いていることが知られている。そこで、我々はこの謎を解くべく、ニワトリにおいてCPS I遺伝子の存在と発現を分子レベルで検討した。その結果、予想通りニワトリの胚や腎臓から作成したcDNAからCPS Iがクローニングされた（未発表）。得られた領域はヒトCPS IのC末端側860アミノ酸残基に相当し、およそ80%の相同性があった。

4. お わ り に

以上、進化の過程でjunkとなったと考えられていた尿素サイクルのキーエンザイムの遺伝子が、尿酸排泄動物においても機能的制約を受けながら維持され、わずかに発現していることが明らかとなった。一般的にはjunkな酵素は数千万年の時を経るとゲノムDNAから消失するとされるが、全ての遺伝子がある様な道をたどるとは限らず、ここで示したように、アルギニン合成系のような生物に共通して必須の遺伝子は、junkとなってもごくわずかに遺伝子を発現させ、発現タンパク質の生理的なチェックをしながら維持していくというメカニズムが存在すると思うのは考えすぎであろうか？

文 献

- Hendriks, W., J. Leunissen, E. Nevo, H. Bloemendal, & W.W. de Jong. The lens protein α A-crystallin of the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*: Evolutionary change and functional constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84: 5320-5324. 1987.
- Horwich, A.L., F. Kalousek, W.A. Fenton, R.A. Pollock, & L.E. Rosenberg. Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide. *Cell* 44: 451-459. 1986.
- Isaya, G., F. Kalousek, & L.E. Rosenberg. Amino-terminal octapeptides function as recognition signals for the mitochondrial intermediate peptidase. *J. Biol. Chem.*, 267: 7904-7910. 1992.
- Kaput, J., S. Goltz, & G. Blobel. Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the pre sequence for protein transport into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 257: 15054-15058. 1982.
- Kraus, J.P., P.E. Hodges, C.L. Williamson, A.L. Horwich, F. Kalousek, K.R. Williams, & L.E. Rosenberg. A cDNA clone for the precursor of rat mitochondrial ornithine transcarbamylase: comparison of rat and human leader sequences and conservation of catalytic sites. *Nucleic Acids Res.*, 13: 943-952. 1985.
- Ohno, S. 1985. Dispensable genes. *Trends in Genet.*,

- 1 : 160-164. 1985.
- Shimogiri, T., M. Kono, H. Mannen, M. Mizutani, & S. Tsuji. Chicken ornithine transcarbamylase gene, structure, regulation, and chromosomal assignment : repetitive sequence motif in intron 3 regulates this enzyme activity. *J. Biochem.*, 124 : 962-971. 1998.
- Tamir H, & S. Ratner. 1963. Enzymes of arginine metabolism in chicks. *Arch. Biochem. Biophys.*, 102 : 249-258. 1963.
- Terada, K., I. Ueda, K. Ohtsuka, T. Oda, A. Ichiyama, & M. Mori. The requirement of heat shock cognate 70 protein for mitochondrial import varies among precursor proteins and depends on precursor length. *Mol. Cell. Biol.*, 16 : 6103-6109. 1996.
- 辻 莊一. 1990. ニワトリ・オルニチントランスカルバミラーゼに関する遺伝・育種学的研究. *日畜会報*, 61 : 571-578.
- Veres, G., R.A. Gibbs, S.E. Scherer, & C.T. Caskey. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, 237 : 415-417. 1987.

(平成 11 年 6 月 30 日 受理)