クルマエビにおける D-アラニンの機能解析

吉川 尚子

静岡理科大学理工学部

はじめに

D-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やペプチド抗生物質などの構成成分として古くから知られている。ペプチドグリカンには D-アラニンや D-グルタミン酸等の数種類の D-アミノ酸が含まれており、D-アラニンの生合成酵素である D-, L-アラニンの相互変換を触媒するアラニンラセマーゼは、動物には存在しないものと考えられてきたため、抗生物質のターゲットとして考えられるなど、D-アミノ酸の代謝酵素に関する研究はさかに行われてきている。一方、動物においても、昆虫や水生無脊椎動物において数種の遊離型 D-アミノ酸が存在することが報告されていたが、近年、無脊椎動物から哺乳類に至るまで D-アミノ酸は広く存在することが明らかにされている。

特に、水生無脊椎動物の諸組織中には、多量の遊離型 D-アミノ酸が存在しており、哺乳類等の他の動物で検出されている D-アミノ酸含量と比較すると極めて高い。さらに、D-アラニンについては細菌類と同様にアラニンラセマーゼによって生合成されていることが明らかとなっている種もある。海洋生物の生息環境は陸上とは大きく異なるため、海洋生物はその特殊な環境に適応するために陸上生物にはみられない代謝系を発展させており、生体内に特殊な成分が存在することが知られている。したがって、豊富に存在している遊離型 D-アミノ酸も、他の動物とは異なる生理機能を有することが予想される。本稿では、筆者がこれまで行ってきた水生無脊椎動物であるクルマエビにおける D-アラニンの生理機能に関する研究について紹介する。

水生無脊椎動物における遊離型 D-アラニンの分布

水生無脊椎動物で初めて D-アミノ酸が発見されたのは、タコの脳に存在する D-アスパラギン酸である (D'Aniello and Giuditta, 1977)。それ以降、様々な二枚貝や甲殻類において数種の遊離型 D-アミノ酸が存在することが明らかにされている。特に D-アラニンは、二枚貝や甲殻類の諸組織中に豊富に存在しており、二枚貝であるミルカイの外套筋や水管では全アラニンに占める D-アラニンの割合が 80% を超えている (Okuma et al. 1998)。しかしながら、二枚貝の中でもムラサキガイやマガキには D-アラニンはほとんど含まれておらず、D-アスパラギン酸含量が高いことが報告されている (Felbeck and Wiley, 1987)。一方、エビ・カニ類においては D-アラニンは全ての組織に検出されているが、特に筋肉や肝臓において豊富に含まれており、全アラニンに対する D 体の割合は 30~60% を占めている (Okuma et al. 1995)。

クルマエビにおける D-アラニンの代謝

クルマエビにおいても、全ての組織に D-アラニンが存在しており、全アラニンに占める D 体の割合は、30~40% である (Yoshikawa et al. 2011)。神経組織では、D-アラニンの他にも D-アスパラギン酸が検出され、いずれも 1.5 $\mu\text{mol/g}$ 程度含まれているが、全アラニンに占める D 体の割合は 20% 程度であるのに対し、全アスパラギン酸に占める D-アスパラギン酸はおよそ 40% と D-アラニンよりも高い傾向が見られる。D-アスパラギン酸は、肝臓

臓、腸管およびメスの生殖腺においても検出されており、腸管や肝臓で検出されるD-アミノ酸については、えさあるいは腸内細菌由来である可能性が考えられるものの、D-アラニンとは異なり、その分布には組織特異性が見られた。

水生無脊椎動物に存在するD-アミノ酸の起源としては、海水中の化学的ラセミ化によって生じたD-アミノ酸が取り込まれているという説 (Bada 1982)、鰓の共生細菌由来 (Felbeck 1985) などが考えられてきた。しかし、二枚貝をD-アラニンを含む海水で飼育しても、D-アラニンは鰓には取り込まれるものの、筋肉には取り込まれず (Okuma et al. 1998)、人工海水を用いて高塩濃度海水に順応させた際においてもD-アラニンの増加は認められることから、D-アラニンは生体内で生合成されていると考えられる。D-アラニンの生合成酵素であるアラニンラセマーゼ活性がヤマトシジミで検出されてから (Matsushima et al. 1984)、水生無脊椎動物に存在するD-アラニンは、細菌類と同様にアラニンラセマーゼによって生合成されていると考えられ、ウシエビの筋肉 (Fujita et al. 1997)、ウシエビの肝臓 (Uo et al. 2001)、アメリカザリガニの筋肉 (Shibata et al. 2000)、ヤマトシジミの外套筋 (Nomura et al. 2001) からアラニンラセマーゼの精製が試みられた。

筆者は、まずタンパク質精製試料として多量に入手しやすいウシエビ筋肉を用いてアラニンラセマーゼの単離精製を行い、その諸性質について検討を行った (Yoshikawa et al. 2002)。単離酵素の分子量からはホモダイマーの構造をとると考えられ、細菌類で報告されているアラニンラセマーゼと類似した分子構造であることが予想された。また、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) 要求性については、PLPを酵素反応液に添加しなくても酵素活性は十分に検出されるが、PLP要求性酵素の阻害剤として知られているヒドロキシルアミンやアミノオキシ酢酸により酵素活性が著しく阻害されたことからなどから、細菌類のアラニンラセマーゼと同様にPLP要求性であることが示唆された。Km値およびVmax値については、LからD、DからLの両方向ともに高い値を示していたが、Vmax値はLからD方向の方がやや高い傾向がみられたものの、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を示した。

さらに、この単離酵素を用いて部分アミノ酸配列を決定し、その配列をもとにウシエビと近い種であるクルマエビの筋肉および肝臓からアラニンラセ

マーゼのcDNAクローニングを行い、動物組織から初めてアラニンラセマーゼをコードする遺伝子を同定することに成功した (Yoshikawa et al. 2009)。これにより、クルマエビやウシエビに存在するD-アラニンは、共生細菌ではなく内在性のアラニンラセマーゼによって生合成されていることを明らかにした。

クルマエビのアラニンラセマーゼの演繹アミノ酸配列と細菌類のアラニンラセマーゼのアミノ酸同一率は30%を下回っていたものの、細菌類のアラニンラセマーゼの活性部位として知られているリシン残基とチロシン残基は保存されており、クルマエビのアラニンラセマーゼは進化の過程で細菌から保存されたものであることが示唆された。

浸透ストレス下におけるD-, L-アラニンの変動

甲殻類や二枚貝では高塩濃度海水順応にともないD-, L-アラニン含量が増加することが明らかにされている。開放血管系である水生無脊椎動物では、血リンパの浸透圧と無機イオンの組成は環境水とほぼ同じであることから、環境水の塩濃度に応じて血リンパの浸透圧も変動する。しかしながら、高浸透環境条件下では、無機イオンが流入して血リンパの浸透圧が上昇してしまうと、細胞が委縮してしまう。そこで、細胞内では特定の遊離アミノ酸、ペタイン、トリメチルアミノオキシドなどの低分子化合物の濃度を上昇させて浸透圧を高めることで細胞内等浸透圧調節を行い、血リンパの浸透圧の上昇に対抗している。

アメリカザリガニを淡水から50%海水、75%海水へと段階的に順応させると、筋肉におけるアミノ酸総量は2倍以上に増加する。特に、グリシン、L-プロリン、L-グルタミンが増加するが、D-, L-アラニンの著しい増加も認められるため、D-アラニンはL-アラニンとともに細胞内等浸透圧調節のオスモライトであると考えられている (Okuma and Abe 1994)。

また、産卵降河回遊を行い浸透調節能力が高いことで知られているモクズガニでは、筋肉および肝臓においてD-アラニンはL-アラニンとともにグリシンに次いで主要なオスモライトとして利用されていることが明らかにされている (Abe et al. 1999)。

クルマエビにおけるD-アラニンの生理機能

クルマエビにおいても高塩濃度海水順応によりD-, L-アラニン含量の増加が認められる。100%海

水から150%海水に順応させると心臓や肝臓で遊離アミノ酸含量が増加し、D-アラニン含量は心臓ではおよそ2倍、肝臓では4倍と著しい増加が認められた。さらに、高塩濃度海水順応過程におけるアラニンラセマーゼ活性を経時的に測定したところ、D-アラニン含量の増加があまり見られなかった筋肉においては、ほとんど活性の変動は見られなかったが、肝臓においてはDからL、LからDの両方向ともに10時間後に活性の上昇が認められ、高塩濃度の浸透刺激によりアラニンラセマーゼが活性化されたものと考えられた（未発表）。また、同じ条件下におけるアラニンラセマーゼのmRNAの発現レベルを測定すると、酵素活性の上昇と同様に10時間後に発現量が5倍に増加していたことから、高浸透環境下におけるアラニンラセマーゼの活性の上昇は、アラニンラセマーゼのタンパク質レベルでの発現量の増加によるものであることが示唆され、これによりD-アラニン含量の増加が認められたということが明らかとなった。

また、クルマエビでは脱皮直後の筋肉においてアラニンラセマーゼ活性の上昇が見られたが、D-アラニン含量の増加は認められなかった（Yoshikawa et al. 2011）。したがって、D-アラニンは脱皮にともなって生成されていたとしても、直ちに脱皮に関わる他の物質に変換されて利用されている可能性も示唆された。ザリガニの血糖上昇ホルモンにはD-アミノ酸が含まれているなど（Soyez et al. 1994）、D-アミノ酸を含むペプチドを有している無脊椎動物の存在がいくつか報告されており、クルマエビにおいても、D-アラニンを含む生理活性ペプチドが存在する可能性も考えられるため、脱皮とD-アラニンの関連性については今後さらに検討していきたい。

おわりに

水生動物を取り巻く環境は、様々な代謝系を構築させ、特殊な代謝産物を産生させる要因となっている。したがって、他の動物に比べて多量に存在しているD-アミノ酸も、水生生物ならではの代謝系に利用しているのではないかと考えられる。D-アラニンの生理機能としては、高塩濃度海水順応におけるオスモライトとしての機能が明らかにされているが、クルマエビにおいては全ての組織でD-アラニンが塩濃度の上昇にともない増加するわけではなく、なぜ全ての組織にD-アラニンが存在しているのかは未だ明らかにされていない。さらに、クルマエビのアラニンラセマーゼは細菌類のアラニンラセ

マーゼと同様の触媒反応を行っていると考えられるが、細胞壁をもたない水生無脊椎動物において、なぜアラニンラセマーゼ遺伝子が保存されたのか、D-アラニンをどのように利用してきたのか、今後さらなる検討が必要である。

海産無脊椎動物においてのみ検出されている成分として、嫌氣的代謝産物と考えられているオピン類がある。オピンはピルビン酸と特定のアミノ酸が結合することによって生成するが、D-アラニン構造をもっている。しかしながら、オピン類の1つであるアラノピンは、ピルビン酸とL-アラニンが結合することによって生成されており、遊離型のD-アラニンがオピンの骨格に利用されているわけではない。さらに、オピンは全ての海産無脊椎動物に存在するわけではなく、イカやタコおよび貝類には見出されているものの、エビでは検出されていない。したがって、水生無脊椎動物は、それぞれの生物ならではの代謝産物を巧みに利用して、特殊な生息環境に適応していると考えられる。偶然か、必然か、水生無脊椎動物とD-アミノ酸には非常に深い関係があるように思われる。

文献

- Abe H, Okuma E, Amano H, Noda H and Watanabe K (1999) Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 123A: 55-59.
- Bada JL (1982) Racemization of amino acids in nature. *Interdisciplinary Sci. Rev.* 7: 30-46.
- D'Aniello A and Giuditta A (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octorus vulgaris* LAM. *J. Neurochem.* 29: 1053-1057.
- Felbeck H (1985) Occurrence and metabolism of D-aspartate in the gutless bivalve *Solemya reidi*. *J. Exp. Zool.* 234: 145-149.
- Felbeck H and Wiley S (1987) Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. *Bio. Bull.* 173: 252-259.
- Okuma E, Watanabe K and Abe H (1998) Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, *Meretrix lusoria*. *Fish. Sci.* 64: 606-611.
- Fujita E, Okuma E and Abe H (1997) Partial purification and properties of alanine racemase from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish. Sci.* 63:

- 440-445.
- Matsushima O, Katayama H, Yamada K and Kado Y (1984) Occurrence of free D-alanine and alanine racemase activity in bivalve molluscs with special reference to intracellular osmoregulation. *Mar. Biol. Lett.* 5: 217-225.
- Nomura T, Yamamoto I, Morishita F, Furukawa Y and Matsushima O (2001) Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. *J. Exp. Zool.* 289: 1-9.
- Okuma E, Fujita E, Amano H, Noda H and Abe H (1995) Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans. *Fish. Sci.* 61: 157-160.
- Okuma E and Abe H (1994) Total D-amino and other amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 191-197.
- Shibata K, Shirasuna K, Motegi K, Kera Y, Abe H and Yamada R (2000) Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 599-608.
- Soyez D, Van Herp F, Rossier J, Le Caer J-P, Tensen CP and Lanfont R (1994) Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. *J. Biol. Chem.* 269: 18295-18298.
- Uo T, Ueda M, Nishiyama T, Yoshimura T and Esaki N (2001) Purification and characterization of alanine racemase from hepatopancreas of black-tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J. Mol. Catal. B* 12: 137-144.
- Yoshikawa N, Ashida W, Hamase K and Abe H (2011) HPLC determination of the distribution of D-amino acids and effects of ecdysis on alanine racemase activity in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Chromatogr. B* 879: 3283-3288.
- Yoshikawa N, Dohmae N, Takio K and Abe H (2002) Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133B: 445-453.
- Yoshikawa N, Okada S and Abe H (2009) Molecular characterization of alanine racemase in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biochem.* 145(2): 249-258.

PROFILE

吉川 尚子 静岡理工科大学工学部物質生命科学科

〔経歴〕 東京大学大学院農学生命科学科博士課程修了 博士（農学），東京大学大学院農学生命科学研究科 特任助手

〔専門〕 水産食品化学

〔E-mail〕 yosikawa@ms.sist.ac.jp

Physiological Function of Free D-Alanine in Kuruma Prawn

Marsupenaeus japonicus

Naoko Yoshikawa

Shizuoka Institute of Science and Technology

Abstract: D-Amino acids have long been considered to be unique to microorganisms, which utilize some D-amino acids to construct the peptidoglycan layer of their cell wall. However, several D-amino acids have been detected in many organisms and even in mammals. Aquatic crustaceans and some bivalve mollusks contain a large amount of free D-alanine in their tissues. Along with the hyper-osmotic stress, several free amino acids have been known to increase as intracellular osmolytes in aquatic invertebrates, and the tissue levels of D- and L-alanine in crustaceans and bivalve mollusks were both increased during high salinity acclimation. These data suggest that D-alanine is also a major compatible osmolyte responsible for intracellular isosmotic regulation. Alanine racemase has been proven to catalyze the interconversion of D- and L-alanine in crustacean. A cDNA clone encoding alanine racemase has been isolated from the muscle and hepatopancreas of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* for the first time in the animal kingdom.

In this article, I would like to describe the physiological function and metabolism of D-alanine in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Key words: D-alanine, alanine racemase, aquatic invertebrate, kuruma prawn