

シロイヌナズナの D-アミノ酸代謝関連酵素

加藤 志郎¹⁾, 老川 典夫^{1,2)}¹⁾関西大学先端科学技術推進機構*, ²⁾関西大学化学生命工学部*)D-Amino acids metabolizing enzymes of *Arabidopsis thaliana*Shiro KATO¹⁾ and Tadao OIKAWA^{1,2)}¹⁾High Technology Research Core, Kansai University²⁾Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

Many researchers have studied D-amino acid in *Arabidopsis thaliana* focusing on its composition and biochemical functions of its metabolizing enzymes. Their extensive efforts revealed that *A. thaliana* contains trace amount of D-amino acid and its content changes during germination or growth, and some enzymes show degrading and/or synthesizing activity toward various D-amino acids not only *in vitro* but also *in vivo*. These informations lead us to consider that *A. thaliana* will be a promising model plant for D-amino acid research on higher plant. However, only a few physiological function(s) of D-amino acid and its metabolizing enzymes in *A. thaliana* have been reported so far. In this manuscript, we describe the outline of D-amino acids metabolizing enzymes of *A. thaliana* previously reported and perspective of D-amino acid research on *A. thaliana*.

1. はじめに

アミノ酸はその構造中にアミノ基とカルボキシ基を有する有機化合物であり、グリシンを除く天然の α -アミノ酸は α -位に不斉中心を有していることから互いに鏡像異性体の関係にある L-アミノ酸と D-アミノ酸の 2 種類が少なくとも存在し得る。L-アミノ酸がタンパク質の構成成分やエネルギー源等として生命の主要構成要素とされる一方で、生物体内にその存在が認められていたにも関わらず、D-アミノ酸は生理的役割を持たない不要な分子であると考えられてきた。しかし近年の研究の進展に伴い、哺乳動物脳内における神経伝達¹⁾やホルモンの合成・分泌への関与²⁾など D-アミノ酸が担う真核生物における重要な生理機能が解明されつつある。一方で、高等植物においても様々な D-アミノ酸の存在が見出されてはいる³⁾ものの、その生理的役割の解析は他の生物種に比して遅れているのが現状である。そこで本稿では、双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおける既報の D-アミノ酸代謝関連酵素の概略および今後の課題について記述する。

2. シロイヌナズナにおける D-アミノ酸代謝関連酵素

シロイヌナズナにおいては 5 種の D-アミノ酸代謝関連酵素が同定され、また 2 種の推定 D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子の存在が確認されており (Table 1)、各酵素の概

略を以下にまとめる。

最初に同定されたシロイヌナズナの D-アミノ酸代謝関連酵素は 2005 年に報告された D-システインデスルフィドラーゼ (D-CDes)⁴⁾である。同酵素は D-システインをピルビン酸、アンモニアおよび硫化水素に分解する反応を触媒し、その反応はピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) に依存する。シロイヌナズナ D-CDes は大腸菌 D-CDes とのホモロジーに基づいて同定された酵素であり、同酵素がミトコンドリアへの局在を示すことはその起源を示唆するものであると考えられる。シロイヌナズナ D-CDes 遺伝子の mRNA レベルは発達過程において上昇し老化過程において低下することから、同酵素のシロイヌナズナの発達への関与が示唆されるもののその詳細は不明である。また、2011 年には Jin らによる D-CDes 遺伝子の転写解析が為され⁵⁾、同遺伝子の転写レベルが L-システインデスルフィドラーゼ遺伝子と同様に乾燥ストレスに応答して茎および茎生葉において顕著に上昇すること、および硫化水素がシロイヌナズナを乾燥から保護し得ることが示され、D-CDes がシロイヌナズナの乾燥耐性に寄与する可能性が示唆されている。

2006 年に藤谷らによって同定されたセリンラセマーゼは L-セリンと D-セリンのラセミ化および両者の脱水反応を触媒する PLP 依存性酵素であり、Mg²⁺による活性化を

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

Table 1 Identified or putative enzymes involved in D-amino acid metabolizing enzymes of *A. thaliana*.

Enzyme	Enzymatic function	Ref.
D-Cysteine desulphydrase	Identified: α , β -elimination of D-Cys	4, 5
Serine racemase	Identified: racemization of Ser	6, 7
D-Amino acid aminotransferase	Identified: transamination of D-amino acids	8
Isoleucine racemase	Identified: racemization of Ile	9
D-Aminoacyl-tRNA deacylase	Identified; degradation of D-aminoacyl-tRNA	12
D-Amino acid oxidase	Putative: oxidative deamination of D-amino acids	13
D-Ala: D-Ala ligase	Putative: synthesis of D-Ala-D-Ala	14

受けるなど他の真核生物のセリンラセマーゼと類似の性質を有する⁶⁾。同酵素はセリンの他に、アラニン、アルギニン、グルタミンに対する活性を有することから比較的基質特異性の低い酵素であると考えられる。また、2008年には同酵素の局在および遺伝子発現解析も為されており⁷⁾、茎頂分裂組織などの伸長および発達中の細胞に局在すること、L-, D-セリン、光刺激、生物学的および非生物学的ストレスによる発現誘導を受けないことが明らかにされている。

D-アミノ酸アミノ基転移酵素 (DAAT) はD-アミノ酸と α -ケト酸との間のアミノ基転移反応を触媒するフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 依存性酵素であり、D-アミノ酸を基質として他のD-アミノ酸を生成することから、D-アミノ酸分解酵素であると同時にD-アミノ酸生合成酵素でもあると言える。シロイヌナズナにおける同酵素が真核生物における初のDAATの報告例であり、シロイヌナズナDAATはD-アラニンやD-アスパラギン酸をはじめとする様々なD-アミノ酸に反応性を示す基質特異性の極めて低い酵素である⁸⁾。

2015年にはStrauchらによってシロイヌナズナにおいて初めての補酵素非依存性D-アミノ酸生合成酵素であるイソロイシンラセマーゼが同定された⁹⁾。同酵素はその配列からは真核生物から原核生物まで広く保存されるフェナジン生合成酵素 (PhzF) 様タンパク質であると予測されており、同種のタンパク質として真核生物における初の機能解析例である。

GEK1は当初シロイヌナズナのエタノール耐性関連タンパク質として同定されたが^{10,11)}、2007年にWydaуらによって同タンパク質がD-アミノアシル-tRNAデアシラーゼ活性を有することが明らかにされた¹²⁾。同酵素はD-Tyr-tRNA^{Tyr}およびD-Asp-tRNA^{Asp}に対する高いデアシラーゼ活性を有しており、同酵素の異種発現によりD-アミノアシル-tRNAデアシラーゼ遺伝子を欠損した大腸菌のD-アミノ酸 (D-チロシンまたはD-アスパラギン酸) 添加による世代時間の遅延という表現型を相補することから*in vivo*においてもD-アミノアシル-tRNAに対する分解酵素として機能し得ることが示唆されている。

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) はD-アミノ酸と分子状酸素を基質として対応する α -ケト酸とアンモニア、過酸化水素を生成する、D-アミノ酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒するFAD依存性酵素である。2009年に

GholizadehとKohnehrouzによってトウモロコシ由来のDAAOの同定が為されるとともにイネおよびシロイヌナズナゲノム上に同酵素遺伝子が存在することが報告された¹³⁾。同報告が高等植物で唯一のDAAOの同定例であり、トウモロコシDAAO遺伝子は、D-アラニンによる転写誘導を受けることからD-アラニン代謝への関与が示唆される。

D-アラニル-D-アラニンリガーゼ (Ddl) は2分子のD-アラニンの縮合反応を触媒し、細菌細胞壁合成に必須であるD-アラニル-D-アラニンを合成する酵素である。今年に入って、コケ植物における同酵素遺伝子の破壊により葉緑体の巨大化といった表現型が観察されること、同表現型がD-アラニル-D-アラニンの添加により回復することが明らかにされ、コケ植物においてDdlが葉緑体の正常な分裂に寄与することが示唆された¹⁴⁾。シロイヌナズナもまた推定のDdl遺伝子を有するものの、その遺伝子破壊による類似の表現型が観察されないこともまた併せて報告されており、シロイヌナズナDdlの機能への興味を持たれるとともにその機能解析の進展が期待される。

3. D-アミノ酸の生理的役割と今後の課題

シロイヌナズナはその全ゲノムの解読が2000年に完了しており¹⁵⁻²¹⁾ゲノム情報の入手が容易であること、世代時間が6週間と高等植物としては短いこと、上述の様に複数の代謝関連酵素が同定されていることなどから、高等植物におけるD-アミノ酸の生理的役割を探索する上においても優れたモデルであると考えられる。しかしながら、シロイヌナズナにおけるD-アミノ酸研究は、上述のような代謝関連酵素の機能解析を中心に進められており、D-アミノ酸の生理的役割については不分明な点が多く残されている。

シロイヌナズナの生育に対する外因性D-アミノ酸の影響は比較的早くから知られており、D-セリンの添加により金属イオンの取り込みが阻害されるとともにその生育が阻害されることが報告されている²²⁾が、その分子機序は不明なままである。近年われわれは、シロイヌナズナの生育に対する外因性アミノ酸の影響を網羅的に検証し、D-セリンのみでなくD-アラニンやD-アルギニンといった他のD-アミノ酸およびL-ロイシンやL-リジン等の複数のL-アミノ酸によっても生育阻害が引き起こされ

ることを明らかにしている²³⁾。また、Gördesらおよび ForsumらによってD-アミノ酸を含有する培地または塩化カルシウム溶液に浸漬することで芽生え期のシロイヌナズナが多くD-アミノ酸を吸収するとの報告²⁴⁻²⁶⁾も為されているが、これらは現象論的解析でありその分子機構の解明には至っていない。D-アミノ酸およびL-アミノ酸によるシロイヌナズナの生育阻害という現象の利用もまた試みられており、例えば大腸菌由来D-セリンデアミナーゼ²⁷⁾、土壌メタゲノム由来リジンラセマーゼ²⁸⁾、酵母由来DAAO²⁹⁾といった他生物種由来のD-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子を選択マーカーとして用いた新規形質転換系の開発が為されている。D-セリンデアミナーゼによるD-セリンの分解またはリジンラセマーゼによるL-リジンのD-リジンへの変換といった酵素機能を利用し、それぞれのアミノ酸を無毒化することでD-セリンおよびL-リジンによる生育阻害を選択圧として利用している。DAAOを用いた系においては、シロイヌナズナに対して有毒なD-セリンおよびD-アラニンの分解活性を利用したポジティブセレクションおよびDAAOの作用により産生するD-イソロイシンおよびD-バリン由来の α -ケト酸の毒性を利用したネガティブセレクションの利用可能性が示唆されている。

D-アミノ酸代謝関連酵素に関する知見とともに、外因性D-アミノ酸に対する応答および生育過程のD-アミノ酸動態に関する知見は蓄積されつつある。シロイヌナズナがD-アミノ酸生合成酵素を含む複数のD-アミノ酸代謝関連酵素を有すること、および生育過程におけるD-アミノ酸含量の有意な変動があることは、他の真核生物同様にD-アミノ酸が何らかの生理機能を担う可能性を示唆している。2008年に船越らはDAATの機能解析とともに、発芽期および生育過程においてD-アスパラギン酸含量の一過の上昇が起こること、およびDAAT遺伝子を欠損したシロイヌナズナにおいて外因性のD-アスパラギン酸に対する耐性の低下が認められることを明らかにしている⁸⁾。2011年にはMichardらによるセリンラセマーゼ遺伝子破壊株を用いた解析によってD-セリンが花粉管の伸長に寄与することが示唆された³⁰⁾。近年の研究によりシロイヌナズナにおけるD-アミノ酸の生理機能の解明も進みつつあるが未だ十全とは言い難い。D-アミノ酸の生理的役割の*in vivo*における解明の一層の進展が今後の課題となるであろう。

謝 辞

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成25年～平成29年）により実施している研究である。

参考文献

- 1) Leeson PD, Iversen LL (1994) The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J Med Chem* 37: 4053-4067.
- 2) D'Aniello A (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev* 53: 215-234.
- 3) Brückner H, Weathauer T (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids* 24: 43-55.
- 4) Riemenschneider A, Wegele R, Schmidt A, Papenbrock J (2005) Isolation and characterization of a D-cysteine desulfhydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 272: 1291-1304.
- 5) Jin Z, Shen J, Qiao Z, Yang G, Wang R, Pei Y (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 414: 481-486.
- 6) Fujitani Y, Nakajima N, Ishihara K, Oikawa T, Ito K, Sugimoto M (2006) Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67: 668-674.
- 7) Sugimoto M, Sakamoto W, Fujitani Y (2009) Localization and expression of serine racemase in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 36: 587-590.
- 8) Funakoshi M, Sekine M, Katane M, Furuchi T, Yohda M, Yoshikawa T, Homma H (2008) Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase - D-aspartate behavior during germination. *FEBS J* 275: 1188-1200.
- 9) Strauch RC, Svedin E, Dilkes B, Chapple C, Li X (2015) Discovery of a novel amino acid racemase through exploration of natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 11726-11731.
- 10) Fujishige N, Nishimura N, Iuchi S, Kunii T, Shinozaki K, Hirayama T. (2004) A novel *Arabidopsis* gene required for ethanol tolerance is conserved among plants and archaea. *Plant Cell Physiol* 45: 659-666.
- 11) Hirayama T, Fujishige N, Kunii T, Nishimura N, Iuchi S, Shinozaki K. (2004) A novel ethanol-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45: 703-711.
- 12) Wydau S, Ferri-Fioni ML, Blanquet S, Plateau P (2007) GEK1, a gene product of *Arabidopsis thaliana* involved in ethanol tolerance, is a D-aminoacyl-tRNA deacylase. *Nucleic Acids Res* 35: 930-938.
- 13) Gholizadeh A, Kohnehrouz BB (2009) Molecular clon-

- ing and expression in *Escherichia coli* of an active fused *Zea mays* L. D-amino acid oxidase. *Biochemistry (Moscow)* 74: 137-144.
- 14) Hirano T, Tanidokoro K, Shimizu Y, Kawarabayasi Y, Ohshima T, Sato M, Tadano S, Ishikawa H, Takio S, Takechi K, Takano H (2016) Moss chloroplasts are surrounded by a peptidoglycan wall containing D-amino acids. *Plant Cell* doi:10.1105/tpc.16.00104.
 - 15) Unseld M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15: 57-61.
 - 16) Mayer K *et al.* (1999) Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 769-777.
 - 17) Lin X *et al.* (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761-768.
 - 18) Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S (1999) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 6: 283-290.
 - 19) Tabata S *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 823-826.
 - 20) Salanoubat M *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 820-822.
 - 21) Theologis A *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820.
 - 22) Elis RJ, Joy KW, Sutcliffe JF (1964) The inhibition of salt uptake by D-serine. *Phytochemistry* 3: 213-219.
 - 23) Kato S, Yasuhara H, Oikawa T (2014) Effect of exogenous D- and L-amino acids on *Arabidopsis thaliana* growth. *Trace Nutrients Research* 31: 1-5.
 - 24) Gördes D, Kolukisaoglu Ü, Thurow K (2011) Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 40: 553-563.
 - 25) Gördes D, Koch G, Thurow K, Kolukisaoglu Ü (2013) Analyses of *Arabidopsis* ecotypes reveal metabolic diversity to convert D-amino acids. *SpringerPlus* 2: 559-569.
 - 26) Forsum O, Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T. (2008). Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179: 1058-1069.
 - 27) Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. (2005). The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Mol Biol* 57: 425-433.
 - 28) Chen IC, Thiruvengadam V, Lin WD, Chang HH, Hsu WH. (2010). Lysine racemase: a novel non-antibiotic selectable marker for plant transformation. *Plant molecular biology* 72: 153-169.
 - 29) Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. (2004). A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotechnol* 22: 455-458.
 - 30) Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu L, Obermeyer G, Feijó JA (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332: 434-437.