

繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) のセリンラセマーゼの酵素特性
宇田幸司・山城由也・西願麻以

〒780-8520 高知市曙町 2-5-1
高知大学理工学部比較生化学研究室

Enzymatic properties of the serine racemase from *Tetrahymena thermophila*
Kouji Uda, Yuya Yamashiro and Mai Saigan

Laboratory of Comparative Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kochi University,
Kochi 780-8520 Japan

Key Words; amino acid racemase, D-amino acid, D-serine, serine racemase.

要旨

セリンラセマーゼ (SerR) は光学異性体である L-セリンと D-セリンの相互変換反応と、L-セリンまたは D-セリンをピルビン酸に分解する反応を触媒する酵素である。SerR は動物及び植物に広く分布しており、生体内 D-セリンの合成酵素であると考えられている。本研究では、繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) から発見された SerR 遺伝子について、そのリコンビナント酵素を用いた詳細な酵素特性の解明を行った。また、テトラヒメナの増殖が D-セリンによって阻害されること等から、テトラヒメナにおいては、SerR が外部から取り込まれた D-セリンの分解酵素として働く可能性を指摘した。

Abstract

Serine racemase (SerR) is an enzyme that catalyzes the conversion of L-serine and D-serine and the degradation of L-serine or D-serine to pyruvate. SerR is widely distributed in animals and plants and is thought to be involved in the synthesis of D-serine in vivo. In this study, we constructed the recombinant protein of the ciliate *Tetrahymena thermophila* SerR gene and measured its detailed enzymatic properties. Since the growth of *Tetrahymena thermophila* is inhibited by D-serine, we suggested that SerR might act as a degrading enzyme for D-serine taken up from the outside in vivo.

序論

アミノ酸には L 体と D 体の 2 種類の鏡像異性体が存在するが、タンパク質の合成材料となるのは L 体のアミノ酸のみである。そのため、生体内では遊離アミノ酸として L-アミノ酸のみが存在し、D-アミノ酸とその代謝酵素はごく限られた生物にしか存在しないと長い間考えられてきた。しかしながら、近年の研究によって、D-アミノ酸が多くの生物に存在し、多様な生理機能を担うことが明らかとなっている (宇田, 2016)。アミノ酸ラ

セマーゼは、L-アミノ酸と D-アミノ酸の間の相互変換を触媒する酵素であり、D-アミノ酸の生合成酵素であると考えられている。アミノ酸ラセマーゼは基質とするアミノ酸ごとに異なる酵素が存在し、真正細菌においてはアラニンラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ、アルギニン/リシンラセマーゼ、アスパラギン酸ラセマーゼ、セリンラセマーゼ (SerR)、プロリンラセマーゼ、フェニルアラニンラセマーゼ、ヒスチジンラセマーゼ等が報告されている (Radkov & Moe, 2014)。真核生物でも、アラニンラセマーゼ、SerR、アスパラギン酸ラセマーゼの存在が確認されており、特に SerR は多くの動物や植物から単離され、その酵素機能についての研究が数多く行われている (宇田, 2016; Uda et al, 2016; 2020)。本研究では、繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) のゲノムから見つかった SerR 遺伝子がコードするリコンビナント酵素を作製し、様々な酵素的特徴を決定し、既知の真核生物 SerR との比較を行った。

材料と方法

マウスの SerR 遺伝子を Query にした BLAST 検索によって、テトラヒメナのゲノムデータから発見された SerR ホモログ遺伝子 (GenBank accession number : XM_001026954.3) を Overlap extension PCR によって合成した。Overlap extension PCR に用いるプライマーは DNA Works (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) を用い、コドンの使用頻度を大腸菌でのタンパク質発現用に最適化すると共に、*Nde*I 及び 6xHis-tag 配列を 5'末端に、*Eco*R I 配列を 3'末端に付加するように設計した。Overlap extension PCR は Prime STAR DNA polymerase (TaKaRa) を用いて行い、増幅された SerR 遺伝子は発現用プラスミド pET-30b の *Nde*I / *Eco*R I サイトに組み込んだ。作製されたプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) をトランスフォームし、終濃度 1 mM となるよう IPTG を添加後、25°C で 24 時間の発現誘導を行った。遠心分離により集菌された大腸菌を超音波破碎し、Ni-NTA Superflow (Qiagen) によってリコンビナントタンパク質を精製した。さらに、精製酵素を Amicon Ultra (Merck) を用いて脱塩し、各種酵素反応測定に用いた。精製された SerR の純度は SDS-PAGE により確認し、タンパク質濃度は BCA 法により測定した。

L-セリン及び D-セリンを基質とした酵素反応は、既報 (Uda et al., 2016) に従い 25 μ M ピリドキサル-5'-リン酸 (pyridoxal-5'-phosphate; PLP), 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂ 及び 1 mM DTT 存在下で行った。ラセマーゼ反応によって生じた L-セリン及び D-セリンの定量は、L-Boc-cys と ortho-phthaldialdehyde での誘導体化後、Kinetex C18 Column (Phenomenex) を用いた HPLC により行った。デヒドラターゼ反応によって生じたピルビン酸の定量は、Lactate Dehydrogenase を用い、NADH の変化量として分光光度計で測定した。酵素活性パラメータ (k_{cat} 及び K_m) は 7 種類の基質濃度で酵素反応速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットにより求めた。

テトラヒメナ SerR の至適温度及び至適 pH の決定は、基質濃度及び酵素量を一定にした条件下で、反応温度または反応 pH を変化させて酵素反応速度を測定することで行った。至適 pH の測定においては、Tris-HCl バッファーで pH 7.5~pH 9.5 の反応を、CHES-NaOH バッファーで pH 8.5~pH 10.5 の反応を行った。至適温度の測定においては 20°C~50°C の範囲で反応を行った。

PPYG 培地で 24 時間培養したテトラヒメナを液体窒素につけ、凍結融解を 3 回繰り返し、細胞を破碎させアミノ酸を抽出した。抽出したアミノ酸溶液は、L-Boc-cys と ortho-phthaldialdehyde で誘導体化を行い、逆相 HPLC によって、アミノ酸の定量を行った。各種アミノ酸が増殖速度に与える影響を調べるため、テトラヒメナを CDMA 培地 (Szablewski et al 1991) または、CDMA 培地にアミノ酸を添加した培地で培養し、その増殖

曲線を作製した。

結果と考察

テトラヒメナ SerR 遺伝子の合成とリコンビナント酵素の作製

テトラヒメナでは、一般的な生物において終止コドンとして用いられる TAA 及び TAG がグルタミンをコードしている。テトラヒメナの SerR 遺伝子のコード領域にも 15 個の TAA または TAG でコードされるグルタミンが存在し、そのままでは大腸菌でのリコンビナントタンパク質の合成に用いることができない。そこで、本研究ではテトラヒメナ SerR と同じアミノ酸配列をコードする cDNA 配列を人工遺伝子合成し、大腸菌でのリコンビナントタンパク質合成を行った。テトラヒメナ SerR は、1 mM IPTG 存在下、25°C で 24 時間発現誘導することで可溶性分画に大量に発現し、His-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製され、SDS-PAGE において単一バンドを示した (Fig. 1)。

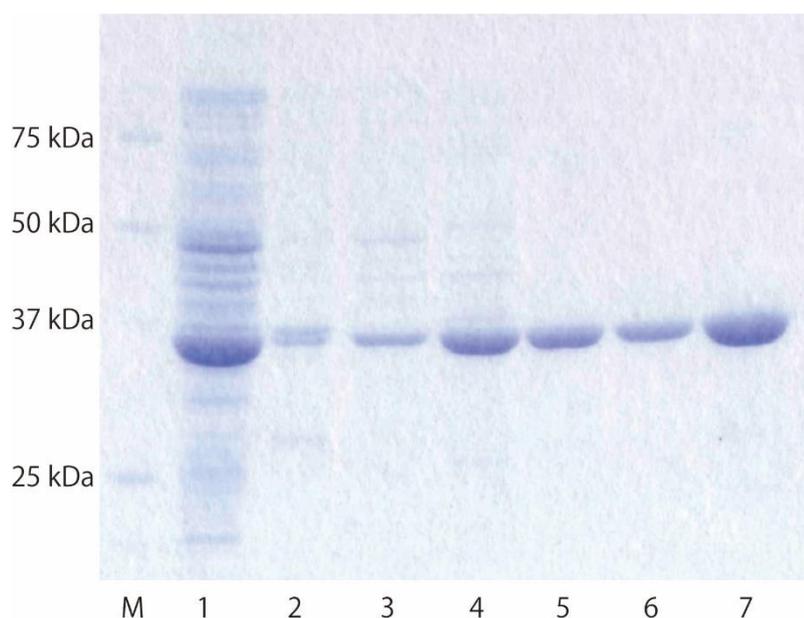


Fig. 1 テトラヒメナ SerR の発現と精製 (SDS-PAGE)

M: マーカータンパク質, 1: 可溶性分画, 2: 不溶性分画, 3: アフィニティークロマトグラフィー未吸着分画, 4: 20 mM イミダゾール溶出分画, 5: 100 mM イミダゾール溶出分画, 6: 150 mM イミダゾール溶出分画, 7: 脱塩処理した分画 6 の酵素。酵素活性測定は分画 7 のリコンビナント酵素を用いて行われた。

テトラヒメナ SerR のアミノ酸配列及び分子系統解析

分裂酵母 SerR の結晶構造 (Goto et al., 2009) において、L-セリン、PLP、及び ATP と結合するアミノ酸残基が特定されている。また、複数の真核生物 SerR へのアミノ酸置換変異体を用いた研究により、基質 L-セリンとは直接結合しないが、基質結合部位の近傍に位置し、触媒反応に必要な不可欠な 3 つの連続するアミノ酸残基 (150~152 位) も特定されている (Uda et al., 2017)。これらの SerR 活性に関与するアミノ酸残基について、テトラヒメナ SerR を含む真核生物 SerR で比較を行った (Table 1)。ATP の結合部位近傍では比較的アミノ酸残基の多様性がみられたが、51 位、52 位、277 位及び 311 位のアミノ酸残基はテトラヒメナ SerR を含む全ての SerR で保存されていた (Table 1)。また、PLP 及び L-セリンの結合部位、そしての 150~152 位のアミノ酸

残基も全ての SerR でよく保存されていた (Table 1)。テトラヒメナ SerR では SerR 活性に関与するアミノ酸残基が保存されており、他の真核生物 SerR と同様の反応機構を持つことが予想された。

真核生物 SerR のアミノ酸配列を用いた分子系統樹 (Fig. 2) は、テトラヒメナ SerR を含む全ての真核生物 SerR が共通の祖先遺伝子から進化したことを強く示唆した。また、この系統樹では、動物の SerR が側系統となり、動物の SerR 遺伝子には複数の系統が存在する可能性が示された (Fig. 2)。今後、より多くの SerR 遺伝子を加えた分子系統解析や遺伝子構造 (exon-intron 構造) の比較によって、真核生物 SerR の進化の過程が解明されることが期待される。

Table 1 真核生物SerRにおける基質結合及び触媒部位のアミノ酸残基

酵素	ATP結合部位														PLP結合部位						L-Ser結合部位				150-152位*			
	分裂酵母SerRのアミノ酸残基番号																											
	25	32	33	34	50	51	52	53	115	119	275	276	277	311	57	84	183	184	185	186	308	82	133	236	238	150	151	152
テトラヒメナSerR	H	C	T	S	F	Q	K	G	A	Y	R	M	K	N	K	N	G	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	Y
分裂酵母SerR	N	S	S	T	F	Q	K	M	A	Y	R	M	K	N	K	N	G	G	G	G	S	S	R	G	Q	P	P	Y
キイロタマホコリカビSerR	H	N	S	T	L	Q	K	T	A	Y	R	M	K	N	K	N	G	G	G	G	S	S	R	G	L	H	P	F
シロイヌナズナSerR	H	S	E	S	L	Q	K	G	N	Y	I	L	K	N	K	N	S	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	Y
イネSerR	H	S	T	S	F	Q	K	A	N	Y	M	L	K	N	K	N	S	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	F
オオムギSerR	H	S	T	S	F	Q	K	A	N	Y	T	L	K	N	K	N	S	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	F
キャッサバSerR	H	S	E	S	F	Q	K	G	N	Y	I	L	K	N	K	N	S	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	Y
トマトSerR	H	S	E	T	F	Q	K	G	N	Y	I	L	K	N	K	N	S	G	G	G	S	S	R	G	R	H	P	Y
オニクマムシSerR	I	N	S	D	L	Q	K	T	A	N	N	L	K	N	K	N	S	G	G	G	C	S	R	G	R	H	P	Y
ウシエビSerR	H	N	E	G	L	Q	K	T	A	Y	R	M	K	N	K	N	S	G	G	G	C	S	R	A	R	H	P	F
マガキSerR	H	S	S	T	L	Q	K	T	A	Y	R	M	K	N	K	N	S	G	G	G	C	S	R	G	R	P	P	Y
プラナリアSerR	H	S	N	V	L	Q	K	T	A	Y	Y	L	K	N	K	N	S	G	G	G	C	S	R	G	K	H	P	Y
ハイマツミドリイシSerR	H	C	S	S	F	Q	K	V	A	Y	R	M	K	N	K	N	S	G	G	G	C	S	R	G	R	P	P	F
ヒトSerR	H	S	S	I	F	Q	K	T	A	Y	R	M	K	N	K	N	G	G	G	G	S	S	R	G	K	H	P	N
マウスSerR	H	S	S	I	F	Q	K	T	A	Y	R	M	K	N	K	N	G	G	G	G	S	S	R	G	K	H	P	N

*: 基質結合部位の近傍に位置し、SerR活性に必要な不可欠だとされるアミノ酸残基 (Uda et al., 2017)

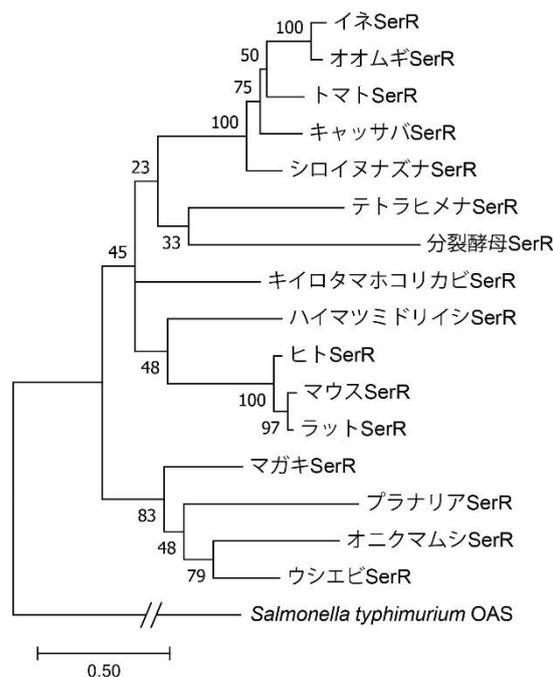


Fig. 2 真核生物 SerR のアミノ酸配列を用いた ML 法による分子系統樹

分子系統樹は外群に *Salmonella typhimurium* の O-acetylserine sulphydrylase (OAS) を用い MEGA7 (Kumar et al., 2016) によって作製された。各分岐の数字はブートストラップ値である。

テトラヒメナ SerR の酵素活性パラメータ

真核生物の SerR は L-セリンと D-セリンを相互変換するラセマーゼ反応と、L-セリン及び D-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を触媒することが知られている (Hoffman et al., 2009; Uda et al., 2017; 2020)。精製したテトラヒメナ SerR についても、各種 L-及び D-アミノ酸に対するラセマーゼ活性及びデヒドラターゼ活性を測定したところ、L-セリン及び D-セリンを基質にしたラセマーゼ活性とデヒドラターゼ活性が確認された。そこで、L-セリン及び D-セリンを基質にした詳細な酵素活性測定を行い、SerR 活性及びセリンデヒドラターゼ活性についての酵素活性パラメータの決定を行った (Table 2)。テトラヒメナ SerR の L-セリン及び D-セリンに対する基質親和性 K_m はラセマーゼ反応で 42.1 mM 及び 60.6 mM であり、デヒドラターゼ反応では 35.4 mM 及び 2.8 mM となった。また、L-セリン及び D-セリンを基質にした触媒定数 (k_{cat}) はラセマーゼ反応で 1.37 s⁻¹ 及び 1.01 s⁻¹ であり、デヒドラターゼ反応では 2.94 s⁻¹ 及び 0.102 s⁻¹ となった。テトラヒメナ SerR はラセマーゼ反応では、L-セリン及び D-セリンへの基質親和性が低い、触媒定数が高いため、触媒効率 (k_{cat}/K_m) は他の真核生物 SerR と同程度の値となった (Table 2)。また、テトラヒメナ SerR の D-セリン→ピルビン酸反応における D-セリンへの基質親和性は真核生物 SerR の中で最も高くなっており、テトラヒメナ SerR が生体内で主に D-セリンの分解に働く可能性が示された (Table 2)。

テトラヒメナ SerR の酵素特性

テトラヒメナ SerR の至適 pH は L-セリン→D-セリン、D-セリン→L-セリン及び D-セリン→ピルビン酸の反応において pH 9 となり、L-セリン→ピルビン酸の反応においてのみ pH 9.5 となった (Fig. 3)。また、至適温度は L-セリン→D-セリンの反応で 40°C、D-セリン→L-セリンの反応で 35°C、L-セリン→ピルビン酸の反応で 37°C、D-セリン→ピルビン酸の反応で 35°C となった (Fig. 4)。この結果は他の真核生物 SerR の至適 pH (7~9.5) 及び至適温度 (30~37°C) (Gogami et al., 2009; Ito et al., 2013; Strisovský et al., 2003) と同程度であり、生息環境にかかわらず、真核生物 SerR の至適 pH と至適温度が共通していることが明らかとなった。

真核生物の SerR は PLP 結合部位のアミノ酸残基が保存され (Table 1)、PLP の存在が反応に必須であることから、PLP 依存型酵素と考えられている (Gogami et al., 2009; Hoffman et al., 2009; Ito et al., 2012)。テトラヒメナ SerR も PLP 非存在下ではラセマーゼ反応は進まず、PLP 濃度依存的に反応速度が増加することから、PLP 依存型酵素であることが示された (Fig. 5A)。デヒドラターゼ反応でも、PLP の濃度依存的に反応速度が増加したが、PLP 非存在下でも反応が進むため、デヒドラターゼ反応には PLP が必須ではないことが明らかとなった (Fig. 5B)。また、テトラヒメナ SerR のラセマーゼ反応は Mg²⁺、Ca²⁺ イオン及び ATP により活性化され、脱塩酵素及び EDTA 存在下に比べて反応速度が約 2~6 倍に増加したが、Cu²⁺、Zn²⁺ イオンの存在下では反応は阻害された (Fig. 6A)。デヒドラターゼ反応においては、L-セリンを基質にした場合のみ、Mg²⁺、Ca²⁺ イオン及び ATP による活性化が確認されたが、Cu²⁺、Zn²⁺ イオンの存在下での反応阻害は確認できなかった (Fig. 6B)。この結果は、マウス SerR やイネ SerR 等で報告されている金属イオンによる影響 (Fujitani et al., 2006; Ito et al., 2012; Strisovsky et al., 2003) と良く一致しており、真核生物 SerR において、金属イオンの結合部位とその作用が共通していることが示された。

Table 2 真核生物SerRの酵素活性

酵素	反応	引用	K_m [mM]	k_{cat} [$10^{-3}\cdot s^{-1}$]	k_{cat}/K_m [$10^3\cdot s^{-1}\cdot mM^{-1}$]
オニクマムシSerR (<i>Milnesium tardigradum</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2016	28.4 ± 4.2	17.5 ± 1.7	0.621 ± 0.046
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2016	19.0 ± 1.9	9.70 ± 0.88	0.513 ± 0.037
プラナリアSerR (<i>Dugesia japonica</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2016	11.2 ± 1.8	94.7 ± 10.2	8.51 ± 0.62
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2016	6.83 ± 0.40	65.5 ± 3.5	9.60 ± 0.06
ウシエビSerR (<i>Penaeus monodon</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2016	146 ± 5	8.17 ± 0.56	0.0559 ± 0.0038
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2016	119 ± 16	7.72 ± 1.13	0.0651 ± 0.0012
	L-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2017	47.4 ± 3.4	48.9 ± 2.3	1.04 ± 0.09
マガキSerR (<i>Crassostrea gigas</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2017	21.5 ± 0.6	1.78 ± 0.01	0.0827 ± 0.0022
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2017	29.3 ± 4.6	2.11 ± 0.25	0.0728 ± 0.0047
	L-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2017	2.26 ± 0.69	29.1 ± 2.1	14.0 ± 3.9
ハイマツミドリイシSerR (<i>Acropora millepora</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2016	7.71 ± 0.65	41.4 ± 2.5	5.38 ± 0.12
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2016	8.48 ± 0.19	55.1 ± 1.6	6.50 ± 0.09
マウスSerR (<i>Mus musculus</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2016	14.9 ± 0.7	668 ± 36	44.7 ± 0.9
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2016	20.9 ± 0.7	840 ± 34	40.2 ± 0.5
	L-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2017	4.79 ± 1.30	285 ± 28	62.1 ± 9.7
	D-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2017	2.61 ± 0.30	39.5 ± 3.4	15.2 ± 0.9
ラットSerR (<i>Rattus norvegicus</i>)	L-Ser → D-Ser	Wolosker et al., 1999	9.8	50	5.1
	D-Ser → L-Ser	Wolosker et al., 1999	60	220	3.7
ヒトSerR (<i>Homo sapiens</i>)	L-Ser → D-Ser	Hoffman et al., 2009	4.1 ± 0.2	691 ± 25	166 ± 13.3
	D-Ser → L-Ser	Hoffman et al., 2009	10.8 ± 0.8	1,415 ± 70	131 ± 15
	L-Ser → Pyruvate	Hoffman et al., 2009	4.7 ± 0.4	1,660 ± 90	353 ± 45
	D-Ser → Pyruvate	Hoffman et al., 2009	9.5 ± 0.6	128 ± 5	13.5 ± 1.5
テトラヒメナSerR (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	L-Ser → D-Ser	本研究	42.1 ± 11.9	1,370 ± 160	32.6 ± 13.5
	D-Ser → L-Ser	本研究	60.6 ± 17.2	1,010 ± 130	16.7 ± 7.6
	L-Ser → Pyruvate	本研究	35.4 ± 8.5	2,940 ± 280	83.1 ± 33.1
	D-Ser → Pyruvate	本研究	2.8 ± 0.6	102 ± 3.8	37.3 ± 6.1
キイロタマホコリカビSerR (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	L-Ser → D-Ser	Ito et al., 2012	30.4 ± 2.7	1,460 ± 60	47.6
	D-Ser → L-Ser	Ito et al., 2012	34.0 ± 5.2	1,160 ± 80	34
	L-Ser → Pyruvate	Ito et al., 2013	6.7 ± 1.1	655 ± 25	97.7
	D-Ser → Pyruvate	Ito et al., 2013	22.4 ± 3.8	71.8 ± 4.2	3.17
イネSerR (<i>Oryza sativa</i>)	L-Ser → D-Ser	Gogami et al., 2010	10.0	310	31
	D-Ser → L-Ser	Gogami et al., 2010	8.9	200	22
	L-Ser → Pyruvate	Gogami et al., 2010	18.0	360	20
	D-Ser → Pyruvate	Gogami et al., 2010	6.3	120	18
シロイヌナズナSerR (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	L-Ser → D-Ser	Fujitani et al., 2006	2.5	2.9	1.17
	D-Ser → L-Ser	Fujitani et al., 2006	0.77	0.64	0.83
	L-Ser → Pyruvate	Fujitani et al., 2006	20	140	7.0
	D-Ser → Pyruvate	Fujitani et al., 2006	5.0	15	3.0
オオムギSerR (<i>Hordeum vulgare</i>)	L-Ser → D-Ser	Fujitani et al., 2007	2.6	12	4.6
	D-Ser → L-Ser	Fujitani et al., 2007	9.0	265	29
	L-Ser → Pyruvate	Fujitani et al., 2007	2.7	1.7	0.63
	D-Ser → Pyruvate	Fujitani et al., 2007	8.3	96	12
キャッサバSerR (<i>Manihot esculenta</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2020	9.06 ± 0.90	60 ± 7.7	6.76 ± 1.41
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2020	8.23 ± 0.20	51.7 ± 5.1	6.28 ± 0.61
	L-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2020	34.7 ± 1.8	203 ± .2	5.87 ± 0.29
	D-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2020	43.5 ± 7.7	110 ± 7	2.63 ± 0.66
トマトSerR (<i>Solanum lycopersicum</i>)	L-Ser → D-Ser	Uda et al., 2020	11.7 ± 3.1	28.7 ± 4.9	2.51 ± 0.23
	D-Ser → L-Ser	Uda et al., 2020	23.3 ± 2.2	42.8 ± 3.8	1.84 ± 0.05
	L-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2020	33.0 ± 1.8	343 ± 31	10.4 ± 0.1
	D-Ser → Pyruvate	Uda et al., 2020	42.1 ± 12.0	159 ± 25	3.89 ± 0.43
分裂酵母SerR (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	L-Ser → D-Ser	Yamauchi et al., 2009	32	18	0.56
	D-Ser → L-Ser	Yamauchi et al., 2009	9.6	4.1	0.43
	L-Ser → Pyruvate	Yamauchi et al., 2009	36	510	14
	D-Ser → Pyruvate	Yamauchi et al., 2009	10	30	3.0

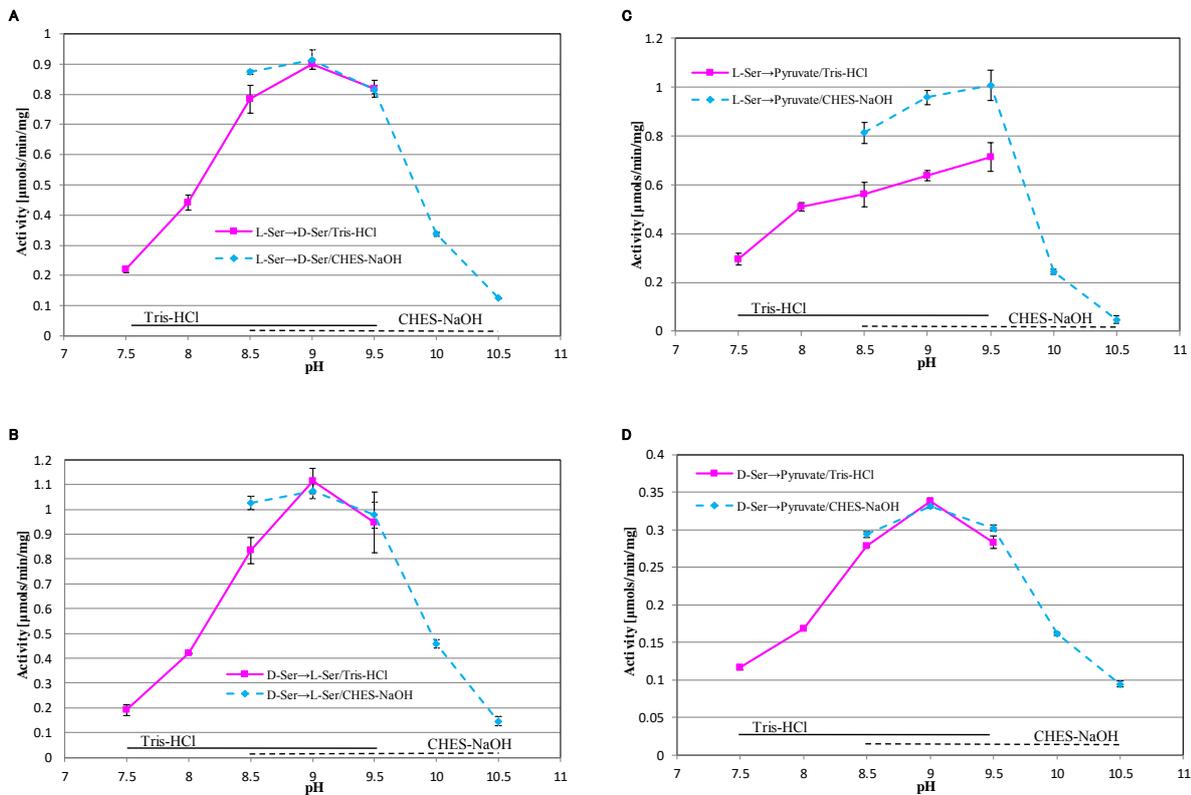


Fig. 3 テトラヒメナ SerR の酵素活性への pH の影響

A : L-セリン→D-セリン反応, B : D-セリン→L-セリン反応, C : L-セリン→ピルビン酸反応, D : D-セリン→ピルビン酸反応。
pH 7.5~9.5 の範囲は Tris-HCl バッファーで pH を調整し, pH 8.5~10.5 の範囲は CHES-NaOH バッファーで pH を調整した。
酵素反応は 80 mM の L-または D-セリン, 1 mM ATP, 25 μ M PLP 存在下で 40°C で 30 分間行った。

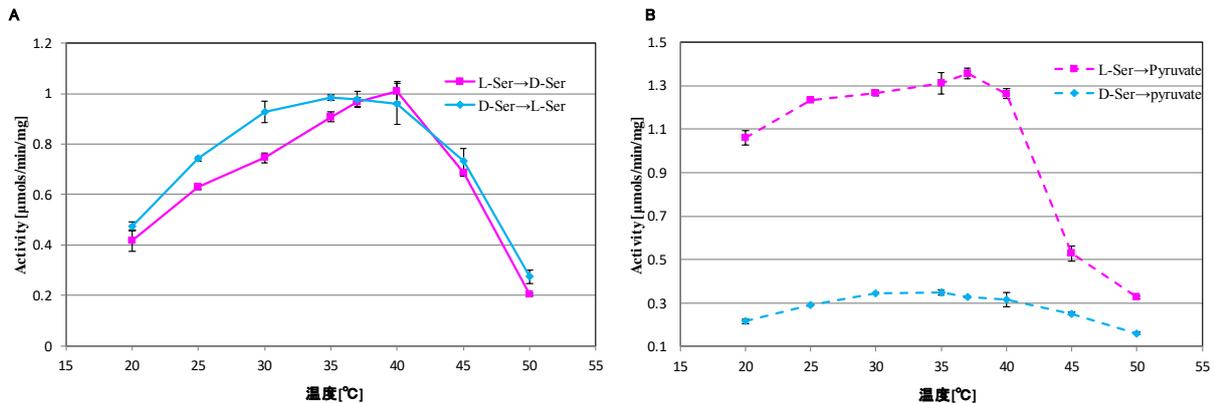


Fig. 4 テトラヒメナ SerR の酵素活性への温度の影響

A : L-セリン→D-セリン及び D-セリン→L-セリン反応, B : L-セリン→ピルビン酸及び D-セリン→ピルビン酸反応。酵素反応は 80 mM の L-または D-セリン, 1 mM ATP, 25 μ M PLP 存在下で pH 9.0 (CHES-NaOH) で 30 分間行った。

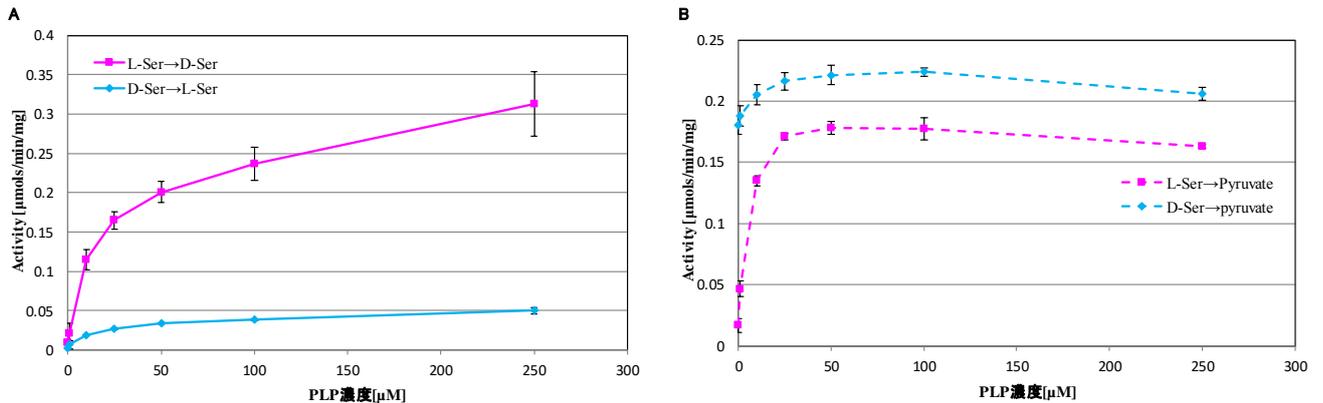


Fig. 5 テトラヒメナ SerR の酵素活性への PLP の影響

A : L-セリン→D-セリン及び D-セリン→L-セリン反応, B : L-セリン→ピルビン酸及び D-セリン→ピルビン酸反応。酵素反応は 80 mM の L-または D-セリン, 1 mM ATP 存在下で pH9.0 (CHES-NaOH), 40°C で 30 分間行った。

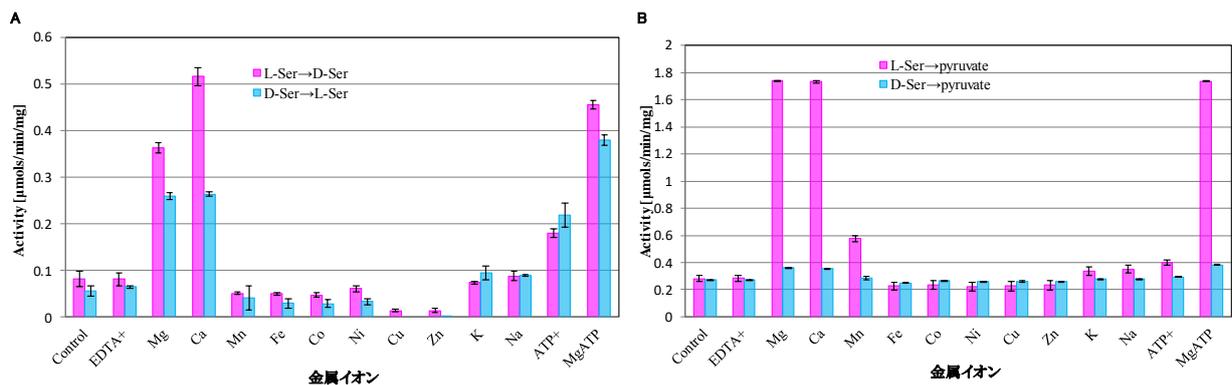


Fig. 6 テトラヒメナ SerR の酵素活性への金属イオン及び ATP の影響

A : L-セリン→D-セリン及び D-セリン→L-セリン反応, B : L-セリン→ピルビン酸及び D-セリン→ピルビン酸反応。酵素反応は 80 mM の L-または D-セリン, 25 μM PLP 存在下で pH9.0 (CHES-NaOH), 40°C で 30 分間行った。脱塩した精製酵素を Control として用いた。EDTA, 各金属イオン及び ATP は 1 mM の濃度で添加した。

テトラヒメナの増殖における D-セリンの影響と SerR の役割

Tetrahymena Functional Genomics Database (TetraFGD; <http://tfgd.ihb.ac.cn/>) では, RNA-Seq データに基づき, テトラヒメナの増殖期, 飢餓期, 接合期における各遺伝子の発現量を確認する事ができる。テトラヒメナ SerR 遺伝子の発現時期を TetraFGD で確認すると (http://tfgd.ihb.ac.cn/search/detail/gene/TTHERM_00688520), 飢餓期や接合期では殆ど発現しておらず, 増殖期に強く発現していることがわかった。では, テトラヒメナの増殖期において SerR は D-セリンの合成酵素として働くのだろうか, または D-セリンの分解酵素として働くのだろうか。その確認のため, テトラヒメナの増殖に D-セリンが与える影響を調べた。テトラヒメナの培養培地に L-セリン, D-セリン, L-アラニン, D-アラニン及びグリシンを各種濃度で添加し, その増殖曲線を比較した (Fig. 7)。テトラヒメナの培養に用いた CDMA 培地には終濃度で約 1.5 mM の L-セリンが含まれているが, これを 0.5~

25 mM まで変化させても増殖曲線に影響は見られず、50 mM まで増加したときのみ、増殖の阻害が確認された (Fig. 7A)。一方で、D-セリンを添加した場合には、終濃度 8 mM を超えると、増殖が阻害されることがわかった (Fig. 7B)。また、L-アラニン、D-アラニン及びグリシンを添加した場合は、L-セリン同様に、終濃度 50 mM になるまで増殖は阻害されなかった (Fig. 7C-E)。これらの結果は、D-セリンが特異的にテトラヒメナの増殖を阻害する可能性があることを示しており、増殖期に発現する SerR が D-セリンの分解酵素として働くことを示唆した。また、増殖期のテトラヒメナの細胞内には D-セリンが存在しないこと (Table 3) も、SerR が生体内で D-セリンの合成酵素としては機能しないことを裏付けた。

テトラヒメナは自然界では細菌を餌としており、当然、増殖期には多量の細菌を摂食している。一方で、細菌は D-セリンを蓄積していることが多く (Radkov & Moe, 2014)、テトラヒメナが摂食により取り込んだ増殖阻害作用を持つ D-セリンの分解を SerR によって行うことは理にかなっている。また、D-セリン→ピルビン酸反応における D-セリンへの基質親和性の高さ (Table 2) を考えると、テトラヒメナ SerR は、生体内 D-セリンを L-セリンに変えるのではなく、ピルビン酸へと分解していると考えられた。本研究では、テトラヒメナ生体内での D-セリンと SerR の働き的一端を明らかにすることができたが、SerR のより詳細な生理機能については、今後の SerR 遺伝子のノックアウト解析などによって明らかにされることを期待したい。

Table 3 テトラヒメナ生体内のアミノ酸量

アミノ酸	L型*	D型
Ala	2,106	-
Asp	793	-
Glu	2,816	-
Phe	935	-
His + Thr	1,222	-
Ile	2,043	-
Leu	2,093	-
Met	551	-
Asn	1,035	-
Gln	1,192	-
Arg	2,875	-
Ser	1,411	-
Val	1,613	-
Trp	193	-

--: 検出限界以下

*:[μ mols / kg wet wt]

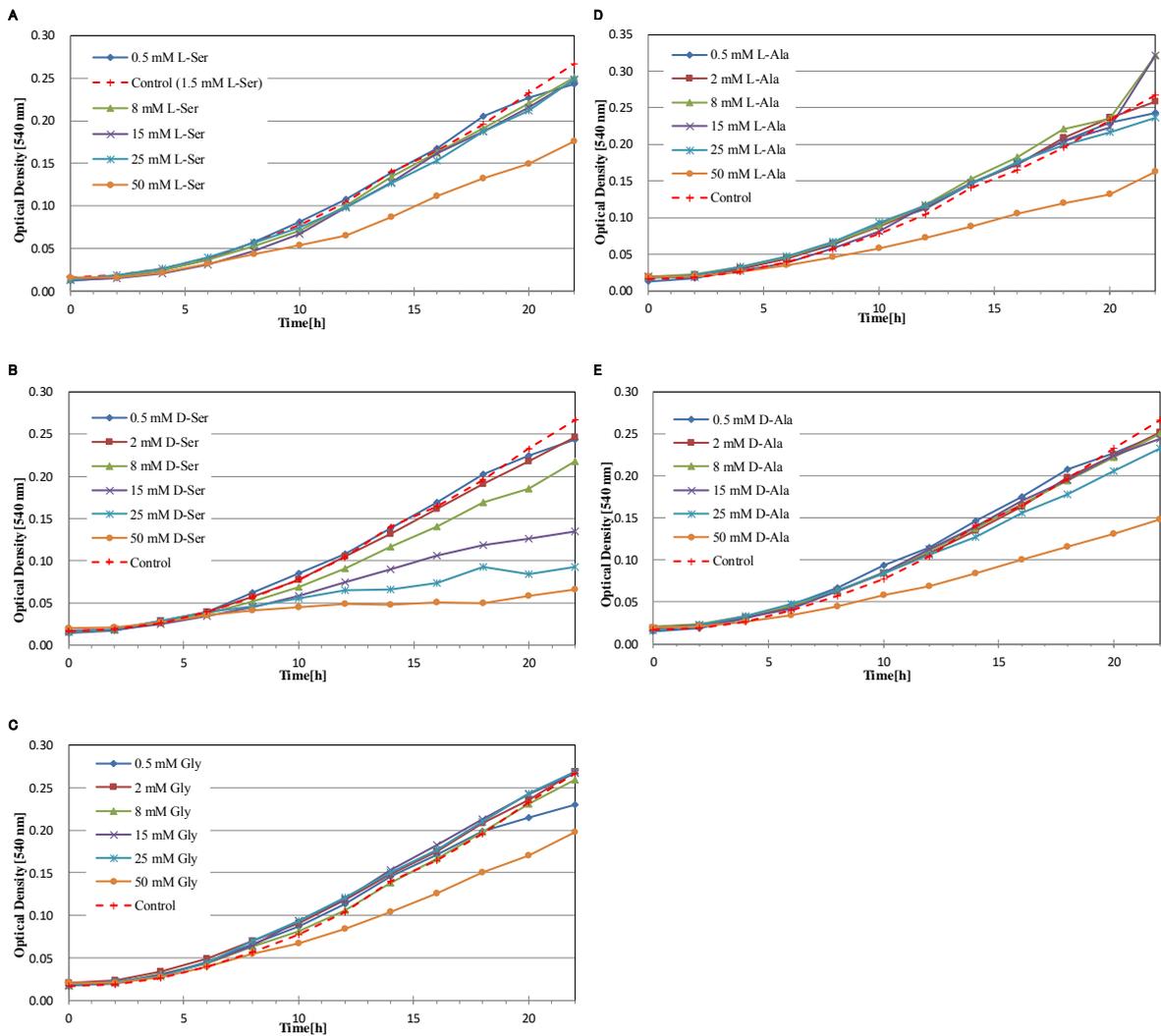


Fig. 7 テトラヒメナの増殖に与える L-セリン (A) , D-セリン (B) , グリシン (C) , L-アラニン (D) , D-アラニン (E) の影響

CDMA 培地のみでの培養を Control とした。CDMA 培地には約 1.5 mM の L-セリンが含まれているため、0.5 mM L-セリンは Control よりも L-セリン濃度が低い培養条件となっている。

謝辞

本研究で用いた *Tetrahymena thermophila* (B2086 株)は金沢大学の東 (遠藤) 浩准教授から分譲されたものである。

引用文献

- 宇田幸司. (2016). セリン/アスパラギン酸ラセマーゼの構造と機能の進化. 比較生理生化学, 33(2), 68-76.
 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(7), 668-674.

- Fujitani, Y., Horiuchi, T., Ito, K., & Sugimoto, M. (2007). Serine racemases from barley, *Hordeum vulgare* L., and other plant species represent a distinct eukaryotic group: gene cloning and recombinant protein characterization. *Phytochemistry*, 68(11), 1530-1536.
- Gogami, Y., Ito, K., Kamitani, Y., Matsushima, Y., & Oikawa, T. (2009). Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry*, 70(3), 380-387.
- Gogami, Y., Kobayashi, A., Ikeuchi, T., & Oikawa, T. (2010). Site - Directed Mutagenesis of Rice Serine Racemase: Evidence That Glu219 and Asp225 Mediate the Effects of Mg²⁺ on the Activity. *Chemistry & biodiversity*, 7(6), 1579-1590.
- Goto, M., Yamauchi, T., Kamiya, N., Miyahara, I., Yoshimura, T., Mihara, H., ... & Esaki, N. (2009). Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25944-25952.
- Hoffman, H. E., Jirásková, J., Ingr, M., Zvelebil, M., & Konvalinka, J. (2009). Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog. Protein expression and purification, 63(1), 62-67.
- Ito, T., Murase, H., Maekawa, M., Goto, M., Hayashi, S., Saito, H., ... & Yoshimura, T. (2012). Metal ion dependency of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino acids*, 43(4), 1567-1576.
- Ito, T., Maekawa, M., Hayashi, S., Goto, M., Hemmi, H., & Yoshimura, T. (2013). Catalytic mechanism of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino Acids*, 44(3), 1073-1084.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Radkov, A. D., & Moe, L. A. (2014). Bacterial synthesis of D-amino acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5363-5374.
- Stříšovský, K., Jirásková, J., Bařinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B. S., & Konvalinka, J. (2003). Mouse brain serine racemase catalyzes specific elimination of L-serine to pyruvate. *FEBS letters*, 535(1-3), 44-48.
- Szablewski, L., Andreassen, P. H., Tiedtke, A., Florin - Christensen, J., Florin - Christensen, M., & Rasmussen, L. (1991). Tetrahymena thermophila: Growth in synthetic nutrient medium in the presence and absence of glucose. *The Journal of protozoology*, 38(1), 62-65.
- Uda, K., Edashige, Y., Nishimura, R., Shikano, Y., Matsui, T., Radkov, A. D., & Moe, L. A. (2020). Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in plants. *Phytochemistry*, 169, 112164.
- Uda, K., Abe, K., Dehara, Y., Mizobata, K., Sogawa, N., Akagi, Y., ... & Moe, L. A. (2016). Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. *Amino Acids*, 48(2), 387-402.
- Uda, K., Abe, K., Dehara, Y., Mizobata, K., Edashige, Y., Nishimura, R., ... & Moe, L. A. (2017). Triple serine loop region regulates the aspartate racemase activity of the serine/aspartate racemase family. *Amino acids*, 49(10), 1743-1754.
- Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P., Brady, R. O., Ferris, C. D., & Snyder, S. H. (1999). Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 721-725.
- Yamauchi, T., Goto, M., Wu, H. Y., Uo, T., Yoshimura, T., Mihara, H., ... & Esaki, N. (2009). Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. *Journal of biochemistry*, 145(4), 421-424.