

植物におけるセリンラセマーゼ及びアスパラギン酸ラセマーゼの分布とその進化

宇田幸司・三步泉汰郎

〒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

Distribution and evolution of serine racemase and aspartate racemase in plants

Kouji Uda and Sentarou Miho

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

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

要旨

セリンラセマーゼ (SerR) は D-セリンを L-セリンから合成する酵素であり、その遺伝子は植物に広く分布している。さらに、一部の植物では、SerR 遺伝子の重複と基質認識部位である 150–152 位のアミノ酸残基への変異を通じて、アスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) へと進化した例が報告されている。本研究では、他の植物においても同様に、SerR 遺伝子から AspR 遺伝子への進化が生じているかを検証することを目的とした。GenBank データベースを用いて SerR のホモログ遺伝子を探索した結果、ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、パチヨリ (*Pogostemon cablin*)、アサ (*Cannabis sativa*)、コショウ (*Piper nigrum*) ではゲノム中に 2 種類の SerR ホモログ遺伝子が存在し、150–152 位のアミノ酸配列に基づき、片方が AspR として機能すると推定された。また、ミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*) では遺伝子の重複ではなく、1 つの SerR 遺伝子から選択的スプライシングにより 2 種類の転写産物が生じ、片方が AspR として機能すると予測された。これらの SerR ホモログ遺伝子を単離し、リコンビナント酵素を作製して酵素活性を確認したところ、不溶化したものを除いて、予測された基質特異性と一致する酵素活性が確認された。さらに分子系統解析の結果、各植物種において、それぞれ独立に AspR が獲得されたことが示唆された。

Abstract

Serine racemase (SerR) is an enzyme that synthesizes D-serine from L-serine, and its gene is widely distributed among plant species. In certain plants, previous studies have reported that duplication of the SerR gene, followed by amino acid substitutions at the substrate recognition site (positions 150–152), led to the evolution of aspartate racemase (AspR). This study aimed to determine whether similar evolutionary events from SerR to AspR have occurred independently in other plant lineages. Homologs of SerR were identified through database searches using GenBank, revealing that four plant species

(*Helianthus annuus*, *Pogostemon cablin*, *Cannabis sativa*, and *Piper nigrum*) each possess two SerR homologous genes in their genomes. Based on the amino acid sequences at positions 150–152, one of the homologs in each species was predicted to function as AspR. In *Arabidopsis lyrata*, however, two transcript variants were predicted to arise not from gene duplication but from alternative splicing of a single SerR gene, with one variant likely functioning as AspR. These SerR homologs were isolated and expressed as recombinant proteins, and their enzymatic activities were characterized. Except for proteins that were insoluble, the observed substrate specificities were consistent with predictions based on amino acid sequence features. Furthermore, phylogenetic analysis suggested that AspR homologs have been independently acquired in each plant lineage.

1. 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、タンパク質合成に用いられるのはL-アミノ酸のみであることから、かつては生体内にD-アミノ酸は存在しないと考えられていた。しかし近年、動植物の生体内に遊離型D-アミノ酸が存在することが明らかとなり、それらが多様な生理機能を担うことが報告されている^{1,2}。例えば、哺乳類ではD-セリン (D-Ser) が脳内に高濃度で存在し、N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして、中枢神経系における神経伝達や記憶・学習の調節に関与することが知られている^{3,4}。また、D-アスパラギン酸 (D-Asp) も脳、網膜、下垂体後部、松果体などに高濃度で存在し、オキシトシンやバソプレシンといったホルモンの産生調節に関与することが報告されている^{5,6}。

植物においても、D-Asp、D-Glu、D-Ser、およびD-Alaが、真正双子葉類のリンゴ (*Malus sylvestris*)、ブドウ (*Vitis* spp.)、オレンジ (*Citrus sinensis*)、単子葉類のトウモロコシ (*Zea mays*)、裸子植物のイチヨウ (*Ginkgo biloba*)、トウヒ (*Picea abies*) などから検出されており、D-アミノ酸が植物界に広く存在することが明らかとなっている^{7,8}。さらに、D-Serがトマト (*Solanum lycopersicum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において種子の成長を阻害すること⁹、またD-Alaがイネ (*Oryza sativa*) や大豆 (*Glycine max*) の成長を抑制することも報告されている¹⁰。一方で、成長阻害とは対照的に、D-Serがシロイヌナズナの花粉管の成長を促進するとの報告もある¹¹。生体内におけるD-アミノ酸の合成経路としては、アミノ酸ラセマーゼによるL-アミノ酸からの異性化反応が広く知られており、動物では、セリンラセマーゼ (SerR) 遺伝子が主要な動物門すべてに存在している¹²。さらに、SerRと高いアミノ酸配列の一致率を示すアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) も、複数の動物種から単離されている^{12,13}。動物のSerRとAspRは、分子系統樹上で両者が同一クレード内に分布し、セリン/アスパラギン酸ラセマーゼファミリーを構成しており、共通の祖先遺伝子から進化したことが示唆されている¹²。また、動物のAspRでは基質認識に関与する150–152位に2個または3個のSer残基が存在しており、SerR遺伝子が重複した後、この領域にSer残基を獲得することでAspRへと進化したと考えられている¹⁴。植物においても、動物のSerRに相同な遺伝子が広く分布しており、その多くはSerRとして機能することが知られている¹⁵。一方、真正双子葉類のバラ類に属するキャッサバ (*Manihot esculenta*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、およびキク類のトマト (*Solanum lycopersicum*) では、2種類のSerRホモログ遺伝子が同定され、それぞれがSerRとAspRとして機能することが報告されている¹⁵。さらに、植物のAspRも動物のAspRと同様に、基質認

識部位である 150–152 位に特異的に Ser 残基を持つことから、植物においても SerR 遺伝子の重複とその後の Ser 残基の獲得によって、AspR 遺伝子への進化が生じたと考えられている¹⁵。本研究では、他の植物においても、SerR 遺伝子の重複と、150–152 位における Ser 残基の獲得を伴う変異によって、AspR 遺伝子への進化が生じているかを検証することを目的とした。まず、データベース検索により、植物に存在する SerR ホモログ遺伝子の網羅的な探索を行った。次に、ゲノム中に複数の SerR ホモログ遺伝子が確認されたヒマワリ (*Helianthus annuus*)、コショウ (*Piper nigrum*)、パチヨリ (*Pogostemon cablin*)、アサ (*Cannabis sativa*) に加え、選択的スプライシングにより異なる転写産物が生成されるミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*) を対象に、SerR ホモログ遺伝子を単離し、リコンビナント酵素による酵素活性の確認を行った。

2. 材料と方法

GenBank に登録されている Nucleotide、Sequence Read Archive (SRA)、および Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) データベースを用い、既知のシロイヌナズナ SerR のアミノ酸配列をもとに、他種植物における類似配列を検索して SerR ホモログ遺伝子候補を同定した。ヒマワリ、コショウ、パチヨリ、およびミヤマハタザオの SerR ホモログ遺伝子は、植物体から抽出したトータル RNA を逆転写して得られた cDNA プールを鋳型として PCR 増幅した。アサの SerR ホモログ遺伝子については、IDT 社の eBlocks Gene Fragments を用いて人工遺伝子合成を行った。各 SerR ホモログ遺伝子の 3' 末端には 6×His タグ配列を付加し、発現ベクター pET30b にクローニングした。リコンビナント酵素は、1 mM IPTG の存在下、18°C で 48 時間発現誘導した。可溶性画分から得られたリコンビナント酵素は、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。L-/D-Ser または L-/D-Asp へのラセマーゼ活性は、反応後の L-/D-アミノ酸を L-Boc-Cys および ortho-phthaldialdehyde で誘導体化したのち、逆相 HPLC により分離・定量して測定した¹²。

3. 結果と考察

3-1 植物に存在する SerR ホモログ遺伝子とその酵素活性

これまでの研究により、真核生物における SerR および AspR の基質認識は、150–152 位のアミノ酸残基によって決定されることが明らかとなっている¹⁴。多くの SerR では、この領域に HPY または HPN という配列が見られる一方、AspR では必ず 2 つ以上の Ser 残基が存在する¹²。また、いくつかの SerR では、150–152 位に Ser 残基を 2 つ以上導入したアミノ酸置換変異体が高い AspR 活性を示すことが確認されている¹⁴。本研究では、データベース検索により、100 種を超える植物から SerR ホモログ遺伝子を新たに同定した。その中から、2 種類の SerR ホモログを有し、150–152 位の配列に基づいて SerR 型と AspR 型の両方が存在すると予測された種を研究対象として選定した (表 1)。選定された植物種はすべて被子植物に分類され、コショウはモクレン類に、ヒマワリ、パチヨリ、ミヤマハタザオ、アサは真正双子葉類に属していた。これらの種に存在する 2 種類の SerR ホモログ遺伝子のうち、一方は 150–152 位のアミノ酸残基が HPY または HPF となっており、SerR として機能すると予測された。実際に、アサを除く 4 種の植物に由来するリコンビナント酵素は、L-Asp に対するラセマーゼ活性よりも L-Ser に対する活性の方が高く、SerR として機能することが確認された (表 1)。一方、アサに存在する SerR ホモログは 150–152 位に HPY 配列を有していたにもかかわらず、リコンビナント酵

素は SerR 活性を示さなかった。この酵素は他のアミノ酸に対するラセマーゼ活性も示さなかったが、L-Ser をピルビン酸に分解するセリンデヒドラターゼ (SDH) 活性を有しており、10 mM の L-Ser を基質とした場合の反応速度は $5.36 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{hr}$ であった。このことから、この酵素は SDH として機能していると推定された。

ヒマワリ、パチヨリ、およびコショウに存在するもう一方の SerR ホモログ遺伝子は、151 位および 152 位に Ser 残基を有しており、AspR としての機能が予測された。このうち、ヒマワリおよびコショウの遺伝子由来のリコンビナント酵素は、L-Ser よりも L-Asp を基質としたときに高いラセマーゼ活性を示し、AspR として機能することが確認された (表 1)。一方、パチヨリの遺伝子 (アクセッション番号 GJHT01033241) は、リコンビナント酵素が不溶性であったため、酵素活性の測定には至らなかった。アサおよびミヤマハタザオに見られたもう一方の SerR ホモログでは、150–152 位に Ser 残基が 1 つのみ存在するという、既知の SerR や AspR には見られない特徴を有していた。アサ由来の遺伝子では 151 位に Ser 残基が存在し、リコンビナント酵素が AspR 活性を有することが明らかとなった (表 1)。この結果は、この領域に Ser 残基が 1 つだけ存在していても、AspR 活性が発現し得ることを示唆している。一方、ミヤマハタザオ由来の遺伝子 (アクセッション番号 XM_021022647) は 150 位に Ser 残基を持っていたが、リコンビナント酵素が不溶性であったため、活性の確認はできなかった。全体として、リコンビナント酵素が可溶であった場合には、150–152 位のアミノ酸配列に基づいて予測された酵素活性と一致する結果が得られた (表 1)。

表1 植物SerRホモログ遺伝子の150–152位のアミノ酸残基及び酵素活性

種名	遺伝子の アクセッション番号	150–152位 アミノ酸残基	酵素名	反応 ¹	
				L-Ser → D-Ser	L-Asp → D-Asp
ヒマワリ	XM_035974317	HPY	SerR	1.52 ± 0.09	0.131 ± 0.030
(<i>Helianthus annuus</i>)	XM_022159506	PSS	AspR	0.254 ± 0.033	550 ± 26
パチヨリ	GJHT01007061	HPY	SerR	3.18 ± 0.03	ND
(<i>Pogostemon cablin</i>)	GJHT01033241	PSS	—	—	—
アサ	XM_030644850	HPY	SDH	ND	ND
(<i>Cannabis sativa</i>)	XM_030644851	HSY	AspR	6.93 ± 0.04	13.02 ± 0.05
ミヤマハタザオ	XM_002872559	HPY	SerR	1.61 ± 0.05	ND
(<i>Arabidopsis lyrata</i>)	XM_021022647	SIF	—	—	—
コショウ	SRR12518068.44107.1	HPF	SerR	2.10 ± 0.06	ND
(<i>Piper nigrum</i>)	GFIY01007231	HSS	AspR	ND	13.0 ± 0.5

¹: 1:10 mMのL-SerまたはL-Aspを基質にした時の反応速度[$\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{hr}$]。

—: リコンビナント酵素が不溶化したため酵素活性の測定は行われず、酵素名も特定されていない。

ND: 酵素活性が検出されなかった。

3-2 植物 SerR と AspR の反応速度解析

各植物に存在する SerR および AspR について、主基質の濃度を 8 段階に設定して反応速度を測定し、 k_{cat} および K_m 値を決定した (表 2)。測定したすべての酵素において、同一アミノ酸の L 体と D 体に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m 値) はほぼ等しく、ラセミ化反応を触媒する酵素の特徴と一致していた (表 2)。また、各酵素の主基質に対する k_{cat} および K_m 値は、これまでに報告されている動物や植物の SerR または AspR における値の範囲内にあり、生体内で十分に機能することが推定された^{12,15}。本研究で得られた SerR および AspR の主基質に対する反応速度論的パラメータには、両酵素間で明確な違いが認められた。 K_m 値は SerR の方が高く、 k_{cat} 値および k_{cat}/K_m 値は AspR の方が高かった (表 2)。このことは、AspR が SerR よりも高い反応速度を示すことを意味している。アサ由来の AspR は、本研究で単離した AspR の中でも特に L-Ser に対する活性が高かったことか

ら（表 1）、L-Ser および D-Ser を基質とした場合の k_{cat} および K_m 値も測定した（表 2）。その結果、アサ AspR の L-および D-Ser に対する k_{cat} および K_m 値は、他の植物 SerR と同程度であり、 k_{cat}/K_m 値は他の SerR よりも高い値となった（表 2）。これらの結果は、本酵素が AspR としてだけでなく、SerR としても機能し得ることを示唆している。

表2 植物SerR及びAspRの酵素活性

種名	酵素名	反応	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
ヒマワリ	SerR	L-Ser → D-Ser	28.6 ± 2.7	0.0618 ± 0.0050	0.00217 ± 0.00004
		D-Ser → L-Ser	25.5 ± 0.7	0.0579 ± 0.0008	0.00228 ± 0.00003
	AspR	L-Asp → D-Asp	14.6 ± 1.6	14.3 ± 1.3	0.982 ± 0.016
		D-Asp → L-Asp	5.85 ± 0.40	4.82 ± 0.10	0.832 ± 0.049
パチヨリ	SerR	L-Ser → D-Ser	44.7 ± 3.0	0.175 ± 0.012	0.00393 ± 0.00005
		D-Ser → L-Ser	21.0 ± 0.3	0.0882 ± 0.0053	0.00419 ± 0.00020
アサ	AspR	L-Asp → D-Asp	1.95 ± 0.05	0.167 ± 0.001	0.0857 ± 0.0013
		D-Asp → L-Asp	1.33 ± 0.10	0.119 ± 0.001	0.0914 ± 0.0075
		L-Ser → D-Ser	69.3 ± 4.1	0.554 ± 0.036	0.00798 ± 0.00008
		D-Ser → L-Ser	14.0 ± 0.5	0.111 ± 0.003	0.00798 ± 0.00005
ミヤマハタザオ	SerR	L-Ser → D-Ser	29.5 ± 0.3	0.0659 ± 0.0006	0.00224 ± 0.00001
		D-Ser → L-Ser	26.4 ± 0.3	0.0651 ± 0.0010	0.00246 ± 0.00004
コショウ	SerR	L-Ser → D-Ser	20.3 ± 0.5	0.0689 ± 0.0026	0.00340 ± 0.00012
		D-Ser → L-Ser	17.0 ± 0.7	0.0644 ± 0.0011	0.00381 ± 0.00017
	AspR	L-Asp → D-Asp	17.4 ± 2.5	0.527 ± 0.030	0.0315 ± 0.0028
		D-Asp → L-Asp	8.43 ± 0.15	0.295 ± 0.001	0.0351 ± 0.0007

3-3 植物における SerR から AspR への進化

これまでに報告された植物の SerR および AspR に加え、本研究で単離した SerR ホモログのアミノ酸配列を用いて、分子系統樹を作成した（図 1）。ヒマワリ、パチヨリ、ミヤマハタザオ、アサ、コショウに加え、タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）、キャッサバ（*Manihot esculenta*）、トマト（*Solanum lycopersicum*）の計 8 種において、2 種類の遺伝子が存在していた。これらの遺伝子は分子系統樹上で、酵素活性に基づく分類ではなく、植物種ごとにクラスターを形成した。一部の例外を除き、同一植物種内の 2 つの遺伝子のうち、一方は SerR、もう一方は 150–152 位に Ser 残基を持つ AspR であった（図 1）。なお、分子系統樹には含めていないが、陸上植物のほとんどの系統において SerR の存在が確認されており¹⁵、陸上植物の共通祖先には SerR 遺伝子のみが存在していたと推定される。これらの知見は、SerR が植物において普遍的な機能を担っていることを示唆している。そして、一部の植物種では、SerR 遺伝子が独立に重複し、その後、片方の遺伝子が AspR へと進化したと考えられる。アサでは、SerR に相当する遺伝子は存在せず、SDH および AspR のみが確認された（表 1）。これは、アサ AspR が SerR 活性と AspR 活性の両方を持つため、SerR であった遺伝子とその機能を失い、新たな機能を獲得したのだと推測された（表 2）。

GenBank に登録されているゲノム配列情報から、アサ、キャッサバ、およびトマトでは、2 つの SerR ホモログ遺伝子がタンデムに配置されており、遺伝子の重複が比較的最近生じたことが示唆された。特にナ

ス科では、トマトが属するナス亜科のゲノムにおいてのみ遺伝子重複が確認され、ナス科の他の亜科および姉妹群であるヒルガオ科のゲノムには SerR 遺伝子しか存在しなかったことから、遺伝子の重複はナス亜科への分岐以降に生じたと考えられた¹⁵。ヒマワリ、パチョリ、タルウマゴヤシにおいても、遺伝子重複によって生じたと推測される 2 つの SerR ホモログ遺伝子がゲノム中に存在していた。一方、ミヤマハタザオでは、遺伝子の重複は確認されず、1 つの SerR 遺伝子から選択的スプライシングによって 2 種類の転写産物が生成されていた (図 2)。近縁種であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) と比較したところ、ミヤマハタザオでは SerR 遺伝子の第 3 エキソン内に新たなスプライス部位が形成されており、第 3 インترونの一部配列が第 4 エキソンとして利用されることで、新たな転写産物 (XM_021022647) が生じていた。この 2 種類の mRNA の存在は、複数の RNA-seq データ (アクセッション番号 DRX049298、SRX1486829 ほか) によっても確認された。このスプライシングにより、基質特異性に関わる 150–152 位を含む周辺 15 残基のみが異なる、2 種類のタンパク質が発現していた (図 2)。

本研究により、SerR から AspR への機能分化が、複数の植物種において独立に繰り返し生じていたことが明らかとなった。また、植物では SerR が広く保存されており、その遺伝子が重複あるいはスプライシングを経て機能的に分化することで、酵素活性の多様性が生み出されていたことが示唆された。

引用文献

1. Fujii, N. D-amino acid in elderly tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1585–1589 (2005).
2. Du, S., Wey, M. & Armstrong, D. W. d-Amino acids in biological systems. *Chirality* **35**, 508–534 (2023).
3. Hamase, K., Morikawa, A. & Zaitu, K. D-Amino acids in mammals and their diagnostic value. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781**, 73–91 (2002).
4. Wolosker, H., Blackshaw, S. & Snyder, S. H. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13409–13414 (1999).
5. D’Aniello, A. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res. Rev.* **53**, 215–234 (2007).
6. Mothet, J. P. *et al.* D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4926–4931 (2000).
7. Brückner, H. & Westhauser, T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids* **24**, 43–55 (2003).
8. Brückner, H. & Westhauser, T. Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia* **39**, 419–426 (1994).
9. Erikson, O., Hertzberg, M. & Näsholm, T. The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **57**, 425–433 (2005).
10. Kolukisaoglu, Ü. D-amino Acids in Plants: Sources, Metabolism, and Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
11. Michard, E. *et al.* Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* **332**, 434–437 (2011).
12. Uda, K. *et al.* Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. *Amino Acids* **48**, 387–402 (2016).
13. Uda, K. & Moe, L. A. Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. II. Frequent and widespread parallel evolution of aspartate racemase. *J. Biochem.* **172**, 303–311 (2022).
14. Uda, K. *et al.* Triple serine loop region regulates the aspartate racemase activity of the serine/aspartate racemase family. *Amino Acids* **49**, 1743–1754 (2017).
15. Uda, K. *et al.* Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in plants. *Phytochemistry* **169**, 112164 (2020).