
総 説

水生無脊椎動物における遊離 D-アミノ酸の 分布, 代謝および生理機能

阿 部 宏 喜*

(2001 年 8 月 21 日受付, 2001 年 12 月 3 日受理)

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

Distribution, metabolism and physiological functions
of free d-amino acids in aquatic invertebrates

HIROKI ABE*

Department of Aquatic Bioscience, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

Several aquatic crustaceans and bivalve molluscs contain a large amount of free D-alanine (3-50 $\mu\text{mol/g}$ wet wt.) in their tissues. Under high salinity stress, crustaceans and bivalve molluscs accumulate much D- and L-alanine irrespective of species, together with L-glutamine, L-proline, and glycine, the increases of which are species dependent. These data indicate that D-alanine is one of the major compatible osmolytes responsible for the intracellular isosmotic regulation in the tissues of crustaceans and bivalves.

Under hypoxia stress, crayfish increased D- and L-alanine in muscle and hepatopancreas in addition to the increase of lactate. The increase was much higher in seawater than in freshwater. Thus, D- and L-alanine are possible anaerobic end products during prolonged hypoxia of this species and other invertebrates.

Alanine racemase has been proved to catalyze the interconversion of D- and L-alanine in crustaceans and bivalve molluscs. This enzyme has been isolated to homogeneity from the muscle of black tiger prawn, crayfish and a brackish water clam. It has also been clarified that D-amino acid and D-aspartate oxidases which catalyze the decomposition of D-amino acids to corresponding α -keto acids distributed widely in some tissues of invertebrates and fish species.

In this review, the author also describes the recent advances of D-amino acid researches on invertebrates and other animals.

キーワード: D-アミノ酸, D-アラニン, アラニンラセマーゼ, 分布, 代謝, 生理機能, 無脊椎動物, 細胞内等浸透調節

地球上の生命体は L-アミノ酸のみをタンパク質構成アミノ酸として利用し, ホモキラル性を維持している。その結果, 真性細菌以外には D-アミノ酸は存在しないものと, ごく最近まで考えられてきた。細菌は細胞壁のペプチドグリカン中に D-グルタミン酸や D-アラニンを持ち, これらがプロテアーゼなどに対する抵抗性を与える自己防御機能を担っている。したがって, 細菌では活発に D-アミノ酸を代謝することが知られ, ラセ

マーゼを始めとする D-アミノ酸代謝酵素についてもよく研究が行われている。¹⁾ しかしながら, 分析法の進歩に伴って細菌以外の真核生物にも遊離の D-アミノ酸が存在することが次第に明らかになり, その生理機能や代謝に関する研究がにわかに活発になってきた。

昆虫類²⁾ではナガカメムシの血中に D-アラニン, ミミズやカイコに D-セリンの存在が古くから知られており, 最近カイコからセリンラセマーゼが部分精製されて

* Tel : 81-3-5841-5296. Fax : 81-3-5841-8166. Email : aabe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

いる。³⁾

魚類の諸組織にも微量ながら D-アスパラギン酸や D-グルタミン酸が存在することが報告されており,⁴⁾ 魚類の特に脳および眼に微量の D-アルギニン, D-セリン, D-ヒスチジンなどの存在も認められている。⁵⁾

近年, ラットやヒト組織にも D-アミノ酸の存在が確認され, 哺乳類における研究が急速に進展しつつある。哺乳類では D-セリンが脳のグリア細胞に存在し, N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のグリシンサイトの内在性アゴニストであることが明らかにされ,⁶⁻⁹⁾ 最近セリンラセマーゼがラット脳から単離されている。¹⁰⁾ NMDA は天然ではアカガイで初めて見いだされたものである。¹¹⁾ 中枢神経系^{12,13)}あるいは松果体,¹⁴⁾ 副腎,¹⁵⁾ 下垂体¹⁶⁾などの内分泌腺には D-アスパラギン酸が存在し, 内分泌調節に関与すると考えられており, アスパラギン酸ラセマーゼの関与も予測されている。¹⁷⁾ 一方, D-アスパラギン酸はまた, 精巣のテストステロン合成にも関与するとされている。¹⁸⁾ 脳組織の D-アスパラギン酸はラット新生児期に多く, 加齢に伴って減少する。^{12,19)} これらのデータは哺乳類においても D-アミノ酸は非生理的なものではなく, 重要な生理機能を担うものであることを示唆している。

脊椎動物組織における D-アミノ酸は微量であるが, 水生無脊椎動物には多量の D-アミノ酸を含有する種が多い。筆者らは 10 数年前からエビ・カニ類および二枚貝組織に多量に存在する D-アラニンの生理機能に興味をもち, この研究に着手した。1995 年には日本水産学会でミニシンポジウム「水産生物における D 型アミノ酸の分析法, 分布および生理機能」²⁰⁾が開催されたが, 本総説ではその後の発展について筆者らの成果を中心に紹介する。

1. 水生無脊椎動物における D-アミノ酸の分布

水生無脊椎動物における D-アミノ酸の発見は古く, 1977 年に D'Aniello and Giuditta²¹⁾ がマダコ *Octopus vulgaris* の脳に 10 $\mu\text{mol/g}$ 以上の D-アスパラギン酸を見だし, その後 1980 年には数種のエビ・カニ類筋肉²²⁾に 1~9 $\mu\text{mol/g}$ の D-アラニンの存在を確認している。その後の報告は散発的で, 1984 年に Matsushima ら²³⁾ はヤマトシジミ *Corbicula japonica* 外套筋に 25 $\mu\text{mol/g}$ の D-アラニンを見だし, その他アサリ *Tapes philippinarum* およびチョウセンハマグリ *Meretrix lamarckii* の外套筋および足筋にも高濃度の D-アラニンが存在するが, ムラサキイガイ *Mytilus edulis* やマガキ *Crassostrea gigas* には認められないことを報告している。さらに, ヤマトシジミ足筋にアラニンラセマーゼ活性を検出している。二枚貝に関してはその後 Felbeck and Wiley²⁴⁾ が 17 種について D-, L-アラニンおよび

D-, L-アスパラギン酸を初めて HPLC により分離定量し, 原鰓亜綱のキヌタレガイ *Solemya reidi*, 翼形亜綱のムラサキイガイやバージニアカキ *Crassostrea virginica* の足筋には D-アラニンはほとんど含まれず, 前 2 者には D-アスパラギン酸が著量含まれると報告している。さらに, 異歯亜綱の二枚貝の足筋には多量の D-アラニンが検出され, 特にツキガイ科の二枚貝では 22-187 $\mu\text{mol/g}$ もの D-アラニンが存在し, アラニンのほとんどが D 型であることを報告している。また, キヌタレガイにはアスパラギン酸ラセマーゼ活性も検出されている。²⁵⁾

これら 1980 年代までの研究においては, D-アミノ酸の定量はほとんどが D-アミノ酸あるいは D-アスパラギン酸オキシダーゼにより D-アミノ酸を α -ケト酸に変え, 生成物の α -ケト酸を測定する分光学的方法を取っており, 必ずしも特異的方法とはいえなかった。90 年代に入ると HPLC を用いた様々な光学分割法が考案され, 微量な D-アミノ酸を分別定量することが可能となった。筆者らは (+)-1-(9-フルオレニル) エチルクロロフォルメート (FLEC) でアミノ酸をプレラベルし, ODS カラムで生体液中のすべての D-, L-アミノ酸を分別定量する方法を開発し,²⁶⁾ 微量の D-アミノ酸まで定量を可能にした。現在では N-アセチル-L-システインあるいは N-*t*-ブチロキシカルボニル (Boc)-L-システインと *o*-フタルアルデヒド (OPA) によりプレラベルする方法など, その他様々なプレラベル化剤および分離定量法が考案されている。²⁷⁾

表 1 に数種二枚貝における D-アラニンの分布を示す。^{20,28)} 翼形亜綱に属するアカガイ, マガキおよびホタテガイ組織には D-アラニンはほとんど存在しない。この点は前記の報告^{23,24)}と一致している。最近, アカガイでは D-アスパラギン酸含量が高いことが報告され, 足筋や外套筋にアスパラギン酸ラセマーゼ活性が検出されている。²⁹⁾ 一方, 異歯亜綱に属する二枚貝では D-アラニン含量はすべての組織で著しく高い。特に, ミルクイ水管には 50 $\mu\text{mol/g}$ 以上と多量に含まれ, D-アラニンの全アラニンに占める比率も 80% 以上に達する。その他の種および組織でもこの比率が 50% を超える場合が多い。これら二枚貝にも D-アラニン以外に D-アルギニン, D-アスパラギン酸, D-プロリンなどの D-アミノ酸が検出されるが, いずれも含量および比率共に高くはない。例外は上記のアカガイで, D-アスパラギン酸含量は組織により 0.5-5 $\mu\text{mol/g}$ と高く, 比率も 40-77% に達する。^{28,29)} その他, 腹足綱や頭足綱に属する軟体動物では D-アラニンは検出されてもごく微量である。²⁰⁾ これまで二枚貝における D-アラニンの分布は生態的要因によるとの推測がなされているが,²³⁾ このような分布傾向から見る限り進化的要因すなわち分類群によ

表1 二枚貝における遊離 D-アラニンの分布²⁸⁾

種/組織	D-アラニン ($\mu\text{mol/g wet wt.}$)	D/(D+L) (%)
翼形亜綱		
アカガイ <i>Scapharca broughtonii</i> (n=5)		
閉殻筋	0.061	0.1
外套筋	ND	—
足筋	ND	—
中腸腺	ND	—
鰓	0.650	18.0
マガキ <i>Crassostrea gigas</i> (n=12)		
閉殻筋	ND	—
外套筋	ND	—
中腸腺	ND	—
生殖腺	ND	—
鰓	ND	—
ホタテガイ <i>Patinopecten yessoensis</i> (n=5)		
閉殻筋	ND	—
外套筋	ND	—
中腸腺	0.021	0.3
生殖腺	ND	—
鰓	0.041	1.3
異歯亜綱		
ハマグリ <i>Meretrix lusoria</i> (n=3)		
閉殻筋	29.4	54.0
外套筋	18.1	48.3
足筋	31.2	48.1
水管	9.95	45.7
中腸腺	2.97	24.3
鰓	7.34	34.3
アサリ <i>Ruditapes philippinarum</i> (n=38)		
閉殻筋	13.3	47.8
外套筋	5.78	35.7
足筋	9.92	37.5
水管	8.68	38.8
中腸腺	7.01	32.9
鰓	3.79	24.7
ウバガイ <i>Pseudocardium sachalinensis</i> (n=2)		
閉殻筋	22.1	60.3
外套筋	25.0	67.8
足筋	27.8	58.7
水管	26.7	74.8
中腸腺	5.41	35.2
生殖腺	4.97	37.7
鰓	6.81	33.1
ミルクイ <i>Tresus keenae</i> (n=1)		
閉殻筋	23.2	62.8
外套筋	32.4	80.7
足筋	16.5	64.6
水管	50.6	83.6
中腸腺	4.94	46.8
生殖腺	15.8	62.0
鰓	11.0	58.0

ND, 未検出。—, <0.1

ると考えるのが妥当であろう。

甲殻類における D-アラニンの分布を表2に示す。^{26,30,31)} D-アラニン以外の D-アミノ酸では D-アルギニンがすべての種および組織に認められるが,^{26,30)} 含量は $1.5 \mu\text{mol/g wet wt.}$ 以下で、全アルギニンに対する比率も 6% 以下である。その他、種および組織によっては D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-フェニルアラニン、D-ヒスチジンなどが検出されるが、いずれも量的には $1 \mu\text{mol/g}$ 以下とわずかである。ただし、D-アスパラギン酸が検出される場合はその比率は 50% を超えることが多い。特に、エビ類の神経組織には $2\text{--}5 \mu\text{mol/g}$ 存在する。²⁶⁾

表2に見られるように、D-アラニンは甲殻類のすべての組織に多量に存在する。カニ類では例外なく筋肉で最も含量が高いが、エビ類では心筋や肝臓の方が高い場合が多い。全アラニンに対する D-アラニンの比率は、例外はあるものの、50% を超えない。筋肉部でこの比率は一般に高い。鰓にも検出されるものの、含量は他の組織と比べると一般にわずかである。

その他の無脊椎動物では、D-アミノ酸の種類は特定されていないものの、環形動物³²⁾ でも含量が高いことが報告され、星口動物ホシムシ *Phascolosoma arcuatum*³³⁾ には多量の D-アラニンが検出され、全アラニンに占める比率も 50% を超えるとされている。ウニの卵にも D-アラニンが検出され、受精後の発生過程で急激に減少し、胚発生との関連が指摘されている。³⁴⁾

2. 浸透ストレス下における D-, L-アラニンの生理機能

以上のような分布を見る限り、D-アラニンを多量に含有する甲殻類や二枚貝では重要な生理機能を担っている可能性が高い。アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を淡水から全海水にまで順応させたところ、アラニンの増加量がグリシンの 2 倍にも達し、このアラニンの約半分が D-アラニンであることが判明した。³⁵⁾ したがって、D-アラニンは細胞内等浸透調節 (intracellular isosmotic regulation)、いいかえれば細胞容積の調節のためのオスモライトの一つであることが明らかになった。その後数種甲殻類についてオスモライトとしての有効性が確認されている。その一例を表3に示す。³⁶⁾ アメリカザリガニを淡水から 50% 海水に移し、2 日後 75% 海水に移して 2 日間順応させ、各段階でサンプリングしたもので、遊離アミノ酸総量は淡水から 75% 海水順応で 2 倍以上に増加している。この増加に最も寄与の大きかったアミノ酸は D-, L-アラニンで、淡水から 75% 海水で 6.7 倍に増加し、全アラニンに占める D-アラニンの比率も淡水の 38% から 75% 海水の 48% に増大している。次いで、グリシンおよび L-グルタミンの寄与が大

表 2 甲殻類における遊離 D-アラニンの分布^{26,30,31)}

種/組織	D-アラニン ($\mu\text{mol/g wet wt.}$)	D/(D+L) (%)
クルマエビ <i>Penaeus japonicus</i> (n=35)		
筋肉	3.43	38.2
心筋	4.15	37.9
肝臓	6.96	40.9
鰓	0.64	8.4
神経組織	0.98	8.3
眼	0.82	5.2
アメリカザリガニ <i>Procambarus clarkii</i> (n=20)		
筋肉	3.23	32.1
心筋	3.97	29.8
肝臓	0.72	8.1
鰓	1.14	37.7
神経組織	3.43	35.3
眼	2.53	36.0
ミナミイセエビ <i>Jasus lalandi</i> (n=5)		
筋肉	6.07	45.6
心筋	14.6	60.1
肝臓	11.4	50.4
鰓	1.19	37.2
神経組織	3.83	35.8
眼	1.63	30.3
ズワイガニ <i>Chionoecetes opilio</i> (n=3)		
筋肉	11.9	44.4
心筋	3.63	27.3
肝臓	6.92	34.7
鰓	2.49	24.9
神経組織	9.74	33.9
眼	3.13	33.5
モクズガニ <i>Eriocheir japonicus</i> (n=5)		
筋肉	16.8	41.2
心筋	6.36	29.2
肝臓	2.86	27.4
鰓	3.03	33.8
神経組織	9.72	24.1
眼	4.39	37.5
クロベンケイガニ <i>Holometopus dehaani</i> (n=5)		
筋肉	4.05	28.5
心筋	trace	—
肝臓	1.67	19.4
鰓	2.47	38.9
ケフサイソガニ <i>Hemigrapsus penicillatus</i> (n=20)		
筋肉	5.27	37.2
心筋	1.13	11.3
肝臓	4.53	27.6
鰓	2.69	30.8
オキアミ <i>Euphausia sperba</i> (n=10)		
全組織	2.20	29.9

きく、L-プロリンは 75% 海水でのみ大きく増加した。したがって、アメリカザリガニではこれら 5 種のアミノ酸が等浸透調節のための有効なオスモライトであると結論づけられる。その他のアミノ酸も淡水から 50% 海水では 2 倍に増加しているが、この増加には L-セリン、L-スレオニン、L-アスパラギンなどが含まれる。しかしながら、これらの増加は海水順応に伴う 4% 程度の水分減少によるものである。D-アミノ酸では D-アラニンのみが海水順応に伴って増加し、その他の D-アミノ酸には変動はなかった。このような海水順応に伴う遊離アミノ酸オスモライトの変動は筋肉以外に心筋、肝臓、神経組織でも認められる。

一方、クルマエビ *Penaeus japonicus* の場合は 100% 海水から 75 および 125% 海水に移し、2 日後それぞれ 50 および 150% 海水に 2 日間順応させたもので (表 3)、この 100% の海水濃度変化に対してクルマエビはよく順応し、やはり遊離アミノ酸総量は 2 倍の変化を示している。この種ではグリシンの増加が最も大きく、150% 海水中では遊離アミノ酸総量の約半分を占める。次いで、D-, L-アラニンの寄与が大きく、どの塩濃度でも全アラニンに占める D-アラニンの比率はほぼ 50% で一定であった。L-グルタミンおよび L-プロリンは低張側でのみ減少を示し、高張側では増加を示さなかった。したがって、クルマエビではグリシンと D-, L-アラニンが高浸透順応時の最も有効なオスモライトであるといえる。

その他、表 2 に示したクロベンケイガニは淡水種で、100% 海水中でのみ D-, L-アラニンが大きく増加する。一方、汽水種のケフサイソガニでは淡水中でのみ D-, L-アラニン、L-グルタミン、グリシンおよび L-プロリンが大きく減少を示す。^{5,31)}

D-, L-アラニンが最も興味深い動きを示すのはモクズガニ *Eriocheir japonicus* である。このカニは海で産卵し、孵化したゾエア幼生はメガロパ幼生を経て稚ガニとなり、川を遡って淡水域で成長し、成熟する。モクズガニの血リンパの浸透圧は淡水から海水への順応に伴って 660-860 mOsm/kg 水分程度しか変化せず、淡水中でも高い細胞外および細胞内浸透圧を維持しており、いきなり海水に移しても生存が可能である。近縁のシナモクズガニ *E. sinensis* は 50 年前から等浸透調節のモデル動物として欧州でよく用いられていた。このような高浸透調節動物でも産卵降河回遊に D-アラニンを利用するかどうかは興味をもたれるところである。三重県櫛田川上流 30 km 地点で 4 月から 10 月まで毎月モクズガニを入手し、10 月の産卵期には河口および海岸で回遊中の個体を捕獲した。淡水個体を生殖腺の発達程度から 4-6 月の未成熟個体と 7-10 月の成熟個体に分けてみると、成熟に伴って筋肉では D-, L-アラニンのみが有意

表3 アメリカザリガニおよびクルマエビ筋肉遊離アミノ酸の浸透ストレス応答³⁶⁾

アミノ酸	アメリカザリガニ			クルマエビ		
	淡水	50%海水	75%海水	50%海水	100%海水	150%海水
タウリン	1.5	2.4	2.9	5.6	7.0	8.6
L-グルタミン酸	2.5	9.5***	8.1**	18.2	14.7	13.0
L-グルタミン	28.5	38.2	52.5**	8.5	27.4*	24.7*
L-プロリン	12.6	10.8	29.4***	53.5	74.8	61.0
グリシン	24.6	32.7	67.2***	78.5	165.2*	212.5*
D-アラニン	3.0	9.2*	25.5***	9.1	14.2	26.3**
L-アラニン	4.9	11.0*	27.1***	9.0	14.7	25.8**
アラニン合計量	7.9	20.1*	52.7***	18.1	28.9	52.1**
L-アルギニン	51.3	50.0	59.2**	34.8	47.2	45.3
その他のアミノ酸	25.1	53.5***	49.4***	20.6	19.1	15.1
遊離アミノ酸総量	154	217**	321***	238	384***	433***

単位は $\mu\text{mol/g}$ wet wt. いずれも5尾の平均値。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

に増加し、河口および海岸の個体ではさらに増加し、グリシンは海岸の個体でのみ顕著な増加を示した(図1)。^{31,37,38)} 肝臓でも同様な傾向であった。一方、成熟に伴いナトリウム、カリウムおよび塩素イオンが淡水中でも筋肉細胞内に取り込まれ、未成熟個体に比べて1.5倍の増加を示した。河口の個体では無機イオン含量はさらに増加したが、海岸の個体ではグリシンの増加に見合う量の無機イオンが低下を示した。すなわち、成熟に伴いD-, L-アラニンと無機イオンにより細胞内浸透圧を高めて降河回遊に備え、河口ではさらにこれらを細胞内に蓄積し、海では細胞にとって有害な無機イオンの代わりにグリシンを増加させるものと考えられた。これらのことから、高度な浸透調節能力を有するモクズガニにおいてもD-アラニンはL-アラニンと共に主要なオスモライトであり、さらに成熟過程で耐塩能を獲得するための必須成分として利用されているものと考えられる。

浸透ストレス下におけるD-アラニンの蓄積はヤマトシジミでも確認されており、²³⁾ ハマグリでも100から150%海水に順応させるとD-, L-アラニンのみの大きな増加が認められた。²⁸⁾ 前掲のホシムシでは50から30%海水に塩濃度を低下させると、D-, L-アラニンは顕著に低下する。³³⁾ したがって、甲殻類のみならず、D-アラニンを多量に含有する無脊椎動物では、D-アラニンはL-アラニンと共に細胞内の等浸透調節のための主要なオスモライトであることは確かであろう。

3. 低酸素ストレス下におけるD-, L-アラニンの変動

水圏生物は常に低酸素条件下におかれ、巧みな低(無)酸素耐性を獲得してきている。マガキなどの二枚貝では長期間の無酸素条件下でアラニン、アラノピン、コハク酸、プロピオン酸などの複数の嫌気的最終産物を蓄積

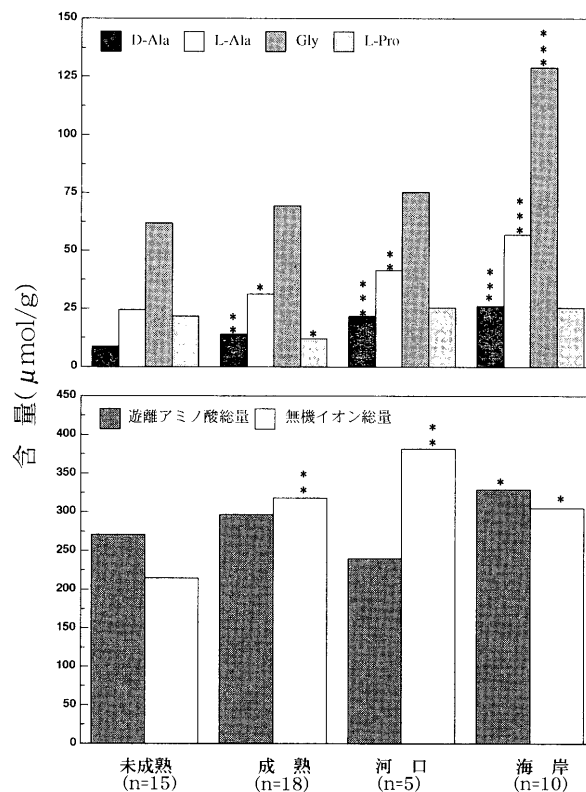


図1 モクズガニの成熟および降河回遊過程における筋肉の遊離アミノ酸および無機イオンの変動³⁷⁾

生殖腺の熟成度から川で捕獲した4~6月の個体(各5尾)を未成熟個体、7~10月の個体(各5尾、10月のみ3尾)を成熟個体とした。河口および海岸で捕獲した個体はいずれも抱卵していた。(上)筋肉の主要遊離アミノ酸の変動、(下)遊離アミノ酸総量と無機イオン総量(ナトリウム、カリウムおよび塩素イオン)の変動。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (未成熟個体との比較)。

表 4 低酸素ストレスに対するアメリカザリガニの代謝応答³⁶⁾

化合物	淡 水			50%海水			75%海水		
	コントロール	低酸素	回復	コントロール	低酸素	回復	コントロール	低酸素	回復
ATP	4.65	1.10**	5.02	6.16	0.47***	3.11**	6.68	0.09***	2.75***
ADP	1.58	1.77	1.56	2.06	1.24	1.70	2.35	0.75***	2.18
AMP	0.92	4.13**	1.11	1.41	6.76***	3.18*	1.83	7.99***	4.61***
グリコーゲン	31.5	17.5	29.7	92.7	48.4*	33.2**	85.7	56.4*	54.7*
乳酸	16.0	53.8***	20.6	13.5	42.3***	16.6	7.2	24.7***	13.5**
筋 肉 D-アラニン	3.2	5.0	5.1	10.1	13.3	16.0*	17.6	26.9**	21.4
L-アラニン	4.5	5.6	6.4	11.9	15.9	18.9*	19.0	29.1**	23.7
合計量	7.7	10.6	11.5*	21.9	29.3	34.9*	36.6	56.0**	45.1
肝臓 D-アラニン	1.0	5.8***	2.0	4.9	11.4**	5.8	7.7	11.0	8.1
L-アラニン	3.0	8.1***	4.8*	6.0	15.6***	7.4	9.3	12.6	10.2
合計量	4.0	13.9***	6.8	10.9	27.0**	13.2	17.0	23.6	18.3

単位は $\mu\text{mol/g wet wt.}$ 。いずれも 5 尾の筋肉の平均値。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。
スクレオチド、グリコーゲンおよび乳酸は筋肉中の変化のみを示す。

し、高い無酸素耐性を有することはよく知られている。³⁹⁾ 前述の淡水、50 および 75% 海水に順応させたアメリカザリガニを、窒素ガスを吹き込んで溶存酸素濃度 0.1 mg/L 以下のほとんど無酸素条件下に 8 時間置き、その後充分空気を送って 8 ないし 12 時間かけて回復させた。³⁶⁾ 表 4 に示すように、いずれの塩濃度でも筋肉の ATP は低酸素下で激減し、海水順応個体でより低下が著しい。筋肉グリコーゲンは低酸素下で有意に低下し、乳酸の著しい増加が認められる。乳酸は回復過程でいずれの場合もほぼコントロール値に回復しているが、グリコーゲンは海水順応個体では回復傾向を示していない。

これまで甲殻類では嫌氣的代謝の最終産物は哺乳類と同様に L-乳酸のみであるとされてきた。しかしながら、アメリカザリガニ筋肉では低酸素条件下で D-, L-アラニンも増加し、この増加は 75% 海水中で最も顕著であった (表 4)。75% 海水中では回復過程でコントロール値近くまで低下したが、淡水および 50% 海水中では回復過程でもほとんど減少を示さなかった。一方、肝臓でも増加傾向を示したが、むしろ低塩濃度で D-, L-アラニンは有意に増加し、回復過程ではほぼコントロール値に戻っている。このような低酸素下における D-, L-アラニンの増加はハマグリ、²⁸⁾ 環形動物 *Arenicola marina*⁴⁰⁾ および星口動物 *Sipunculus nudus*⁴¹⁾ でも観察されている。したがって、D-, L-アラニンは甲殻類でも嫌氣的最終産物の一つである可能性が高く、この点は今後詳細に調べる必要がある。

4. D-アラニンの起源と代謝

これまで二枚貝の D-アミノ酸についてはその起源に関して幾つかの推測がなされており、海水からの取り込

み、⁴²⁾ 細菌起源の D-アミノ酸の経口摂取、³²⁾ 鰓細胞内の共生細菌起源、²⁵⁾ ラセマーゼによる生成^{23,43)} などが提唱されていた。前述の海水順応実験を人工海水で行っても D-アラニンの増加は認められるため、海水からの取り込みとは考えにくい。また、ハマグリを 50 mM の D-アラニンを溶解した海水中に 3 日間収容したところ、D-アラニンは鰓には多量に取り込まれ、血リンパと中腸腺でわずかに増加するものの、筋肉部には全く取り込みが見られない。²⁸⁾ 甲殻類の筋肉と肝臓の粗酵素液について D-アラニン生成系の酵素活性をスクリーニングしたところ、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 [ARase; EC 5.1.1.1] 活性のみが検出された。活性はウシエビ *Penaeus monodon*、クルマエビ、コウライエビ *Penaeus chinensis* などの汽水種で高く、海産のミナミイセエビおよび淡水産のアメリカザリガニでは低く、塩濃度変化の少ない深海産のホッコクアカエビ *Pandalus borealis* ではごく弱い活性しか示さない。⁴⁴⁾ K_m 値はいずれもきわめて高く、組織中の D-, L-アラニン濃度をはるかに超えている。しかしながら、アメリカザリガニの海水順応過程で、筋肉でも肝臓でも活性は上昇し、 K_m 値は低下し、特に生理的 pH 付近の活性上昇が著しく、作用しやすくなるものと考えられた (表 5)。⁴⁴⁾

甲殻類の ARase は硫安および食塩存在下では不安定であるが、⁴⁵⁾ ウシエビ筋肉から単離されている。⁴⁶⁾ 800 g の筋肉から収率 16% で 57 μg の精製酵素が得られ、127,000 倍に精製された単離酵素は分子質量が 90 kDa で 45 kDa の 2 本鎖からなる 2 量体と考えられた。最適 pH は D から L および L から D 方向共に 9.5~10.0 付近で、最適温度は 37°C であった。本酵素は D-, L-アラ

表5 アメリカザリガニ海水順応過程におけるアラニンラセマーゼの性質変化⁴⁴⁾

	V _{max}		K _m	
	筋 肉	肝臓	筋 肉	肝臓
淡 水	0.19	0.29	158	133
1/2 海水	0.26	0.40	117	52
3/4 海水	0.36	0.43	109	51
全海水	0.41	0.44	105	47

V_{max}; $\mu\text{mol/g}$, K_m; mM.

ニンに特異的で、他のアミノ酸には作用しなかった。K_m 値は両方向共に 160 mM 以上であったが、平衡定数は 0.84 でラセマーゼ反応の理論値に近い。細菌類の ARase はピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性で、精製酵素は PLP 存在下でのみ活性を示すことが知られている。ウシエビの酵素は PLP を添加しなくても活性を示すが、添加するとわずかに活性化される。しかしながら、PLP 依存性酵素を不活性化するアミノオキシ酢酸やヒドロキシルアミンには阻害されるため、ウシエビ酵素も PLP 依存性と考えられるが、細菌の酵素とは結合様式等が異なるものと予測される。精製酵素をピリジリエチル化後、臭化シアンあるいはリジリエンドペプチダーゼで断片化し、幾つかのペプチド鎖のアミノ酸配列を決定した。その内 3 つのペプチドは細菌類の ARase と 52~76% の相同性を示した。

水生無脊椎動物の ARase は最近アメリカザリガニ筋肉⁴⁷⁾ およびヤマトシジミ外套筋⁴⁸⁾ から単離されている。ザリガニ ARase は単量体で分子質量 58 kDa とウシエビ ARase とは異なるが、K_m 値は L から D 方向で 171 mM とウシエビ ARase のそれに近く、その他の性質も比較的類似している。ヤマトシジミの酵素はウシエビのそれとはかなり異なり、分子質量は 140 kDa で 3 ないし 4 量体と考えられ、また K_m 値は L から D 方向で 22.6 mM, D から L 方向で 9.2 mM とウシエビ ARase とは大きく異なる。甲殻類の ARase のみが異常なほど高い K_m 値を示す理由は明確ではないが、D-, L-アラニン間の微妙な平衡を触媒する酵素では、わずかなどちらかの基質濃度の上昇で活性は増大するため、K_m 値は高い方が平衡を保ちやすいのかも知れない。

D-アミノ酸分解系の酵素では酸性アミノ酸に特異的な D-アスパラギン酸オキシダーゼ [DAspO; EC 1.4.3.1] およびその他の D-アミノ酸に作用する D-アミノ酸オキシダーゼ [DAO; EC 1.4.3.3] が古くから知られており、細菌から哺乳類にまで広く分布している。これらの酵素は経口摂取した D-アミノ酸を対応する α -ケト酸に転換し、炭素骨格を再利用するための酵素である。水生動物においては DAspO が数種魚類肝臓⁴⁾ およ

びマダコ諸組織⁴⁹⁻⁵¹⁾ に存在することが知られている。マダコでは DAO の存在も確認されている。⁵¹⁾ 両酵素の活性は無脊椎動物では軟体動物の腎臓や中腸腺に認められ、DAO の分布の方が広い。⁵²⁾ クルマエビおよびアメリカザリガニでは触角腺と肝臓に両酵素活性が認められる。魚類では腎臓、肝 (臓) および腸に活性が検出され、脳にも弱い活性があるが、魚種により両酵素活性は様々で、一定の傾向は読みとれない。DAO は D-アラニンの投与で腸管、腎臓および肝臓の活性が増大し、誘導酵素であることが示された。⁵²⁾ したがって、主として D-アラニン含量の高い餌を補食する魚で DAO 活性が高いものと考えられる。DAspO は D-アスパラギン酸および D-グルタミン酸の投与でも活性の誘導は認められなかった。このことは、これら D-アミノ酸の自然界における量的分布が D-アラニンに比べてはるかに低いことを反映しているのかも知れない。

以上のように、水生動物においても D-アミノ酸代謝酵素は予想以上に広く分布し、甲殻類や二枚貝では ARase により積極的に D-アラニンを合成していることが明らかである。現在のところ、動物では ARase 以外には前述のアカガイ等のアスパラギン酸ラセマーゼ²⁹⁾ および哺乳類¹⁰⁾ やカイコ³⁾ のセリンラセマーゼ以外には知られていないものの、水生無脊椎動物にはまだ他の D-アミノ酸代謝酵素が存在する可能性はあるものと考えられる。

なぜ D-アラニンはこのように水生無脊椎動物において重要な役割を担うようになったのであろうか。図 2 に無脊椎動物の細胞内等浸透調節オスモライトとして利用される遊離アミノ酸の生合成経路を示す。⁵³⁾ これらアミノ酸はグリコーゲンから解糖経路を経て容易に合成可能な非必須アミノ酸であり、また L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸を除いてすべて中性アミノ酸で、側鎖にタンパク質と相互作用を示すような解離基をもたない。このようなアミノ酸は細胞内にかなり高濃度に蓄積してもタンパク質の不安定化などの悪影響を及ぼさない。このような細胞内溶質は 'compatible solute' と呼ばれている。⁵⁴⁾ 筆者はこれを「適合溶質」と訳している。しかしながら、細胞内ミクロ環境に悪影響を及ぼさないといっても、ある溶質をあまり多量に細胞内に蓄積することは避ける必要がある。前述のアメリカザリガニのように、浸透ストレス下ではほとんどの無脊椎動物は複数のオスモライトを蓄積し、この点を回避している。例えば、L-アラニンはグリシンと並んで最もよい適合溶質と考えられるが、ピルビン酸キナーゼなどの酵素を阻害し、アラニンデヒドロゲナーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼなどの酵素の基質であるため、多量に蓄積すれば細胞内の恒常性は維持できない。一方、D-アミノ酸はほとんどの細胞内酵素と相互作用をもたな



- sition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neurosci.* 2000; **100**: 183-189.
- 18) Nagata Y, Homma H, Lee JA, Imai K. D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Lett.* 1999; **444**: 160-164.
 - 19) Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, Kaneko T, Ootomo E. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 1993; **61**: 348-351.
 - 20) 阿部宏喜, 佐藤 実, 渡辺勝子. 水産生物における D 型 アミノ酸の分析法, 分布および生理機能. 日水誌 1995; **61**: 771-781.
 - 21) D'Aniello A, Giuditta A. Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* LAM. *J. Neurochem.* 1977; **29**: 1053-1057.
 - 22) D'Aniello A, Giuditta A. Presence of D-alanine in crustacean muscle and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 1980; **60B**: 319-322.
 - 23) Matsushima O, Katayama H, Yamada K, Kado Y. Occurrence of free D-alanine and alanine racemase activity in bivalve molluscs with special reference to intracellular osmoregulation. *Mar. Biol. Lett.* 1984; **5**: 217-225.
 - 24) Felbeck H, Wiley S. Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. *Bio. Bull.* 1987; **173**: 252-259.
 - 25) Felbeck H. Occurrence and metabolism of D-aspartate in the gutless bivalve *Solemya reidi*. *J. Exp. Zool.* 1985; **234**: 145-149.
 - 26) Okuma E, Abe H. Simultaneous determination of D- and L-amino acids in the nervous tissues of crustaceans using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1994; **660**: 243-250.
 - 27) 今井一洋, 加藤 大, 黄 永, 市原秀晃, 福島 健, 三田智文, 本間 浩. D-アミノ酸研究の最近の進歩. 薬学雑誌 1997; **117**: 637-646.
 - 28) Okuma E, Watanabe K, Abe H. 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.* 1998; **64**: 606-611.
 - 29) Watanabe T, Shibata K, Kera Y, Yamada R. Occurrence of free D-aspartate and aspartate racemase in the blood shell *Scapharca broughtonii*. *Amino Acids* 1998; **14**: 353-360.
 - 30) Okuma E, Fujita E, Amano H, Noda H, Abe H. Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans. *Fish. Sci.* 1995; **61**: 157-160.
 - 31) 阿部宏喜. 十脚目甲殻類における遊離 D-アラニンの生理機能. 比較生理生化学 2000; **17**: 100-108.
 - 32) Preston RL. Occurrence of D-amino acids in higher organisms: a survey of the distribution of D-amino acids in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987; **87B**: 55-62.
 - 33) Low WP, Ong WT, Ip YK. Different physiological functions of free D- and L-alanine in three body parts of the intertidal sipunculid *Phascolosoma arcuatum*. *J. Comp. Physiol. B* 1996; **165**: 558-564.
 - 34) D'Aniello A, Nardi G, Cipollaro M, Pischetola M, Padula L. Occurrence of D-alanine in the eggs and the developing embryo of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; **97B**: 291-294.
 - 35) Okuma E, Abe H. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994; **109A**: 191-197.
 - 36) 藤森玉輝. 甲殻類における浸透圧および低酸素ストレスに対する生化学的応答に関する研究. 修士論文, 東京大学, 東京. 2001.
 - 37) Abe H, Okuma E, Amano H, Noda H, Watanabe K. Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 1999; **123A**: 55-59.
 - 38) Abe H, Okuma E, Amano H, Noda H, Watanabe K. Effects of seawater acclimation on the levels of free D- and L-alanine and other osmolytes in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 949-954.
 - 39) Hochachka PW. Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance. Harvard University Press, Cambridge, 1980. (橋本周久, 阿部宏喜, 渡部終五訳. 低酸素適応の生化学—酸素なき世界で生きぬく生物の戦略—. 恒星社厚生閣, 東京. 1984.)
 - 40) Schöttler U, Wienhause G, Westermann J. Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L.: the transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 1984; **79B**: 93-103.
 - 41) Pörtner HO, Vogeler S, Grieshaber MK. Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. I. Restoration of aerobic steady-state energy metabolism. *J. Exp. Biol.* 1986; **122**: 37-50.
 - 42) Bada JL. Racemization of amino acids in nature. *Interdisciplinary Sci. Rev.* 1982; **7**: 30-46.
 - 43) Matsushima O, Hayashi YS. Metabolism of D- and L-alanine and regulation of intracellular free amino acid levels during salinity stress in a brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; **102A**: 465-471.
 - 44) Fujita E, Okuma E, Abe H. Occurrence of alanine racemase in crustaceans and the changes of the properties during seawater acclimation of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **116A**: 83-87.
 - 45) Fujita E, Okuma E, Abe H. Partial purification and properties of alanine racemase from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 440-445.
 - 46) 吉川尚子, 瀧尾擴士, 阿部宏喜. ウシエビ筋肉アラニンラセマーゼの単離および性質. 平成 13 年度日本水産学会春季大会講演要旨集. 日本水産学会, 東京. 2001; 165.
 - 47) Shibata K, Shirasuna K, Motegi K, Kera Y, Abe H, Yamada R. Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000; **126B**: 599-608.
 - 48) Nomura T, Yamamoto I, Morishita F, Furukawa Y, Matsushima O. Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. *J. Exp. Zool.* 2001; **289**: 1-9.
 - 49) Nagahisa E, Kanno N, Sato M, Sato Y. Distribution of free D-aspartic acid and D-aspartate oxidase activity in tissues of *Octopus vulgaris*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1897-1901.
 - 50) Tedeschi G, Negri A, Cecilian F, Ronchi S, Vetere A, D'Aniello G, D'Aniello A. Properties of the flavoenzyme D-aspartate oxidase from *Octopus vulgaris*. *Biochim.*

- Biophys. Acta* 1994; **1207**: 217-222.
- 51) D'Aniello A, D'Onofrio G, Pischetola M, D'Aniello G, Vettere A, Petrucelli L, Fisher G. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase-effect of D-amino acids. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 26941-26949.
- 52) Sarower MG. Studies on D-amino acid and D-aspartate oxidases in aquatic animals. Ms Thesis. The University of Tokyo, Tokyo. 2001.
- 53) Okuma E, Abe H. Effects of starvation and D- or L-alanine administration on the free D- and L-alanine levels in the muscle and hepatopancreas of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998; **120A**: 681-686.
- 54) Hochachka PW, Somero GN. Biochemical adaptation. Princeton University Press, Princeton, 1984; 304-354.
- 55) 長田洋子. 自然界に存在する D-アミノ酸. 生化学 2000; **72**: 173-180.
- 56) 金子 勲. β アミロイド蛋白のラセミ化. *Brain Med.* 1997; **9**: 345-381.
- 57) 藤井紀子. 白内障を化学する—老化と D-アミノ酸—. 化学と生物 1997; **35**: 346-350.
- 58) 西川 徹. 脳の内在性 D-セリンに関する研究—新たな高次機能調節系と精神神経疾患の治療法をもとめて—. 脳の科学 1999; **21**: 757-763.