

## PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF FREE D-ALANINE IN AQUATIC INVERTEBRATES

Hiroki Abe and Naoko Yoshikawa

Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

FAX: 03-5841-8166. E-mail address: aabe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

(Received 4 July 2002 Accepted 20 August 2002)

Several free D-amino acids, which were thought not to exist in eukaryotes, have recently been detected in various aquatic invertebrates. In particular, free D-alanine was found in large amount (3-50 mmol/g wet wt.) in the tissues of several crustaceans and bivalve mollusks. Under high salinity stress, these animals largely accumulate D- and L-alanine irrespective of species, together with several other non-essential L-amino acids of which increases are species dependent. In these species, D-alanine is proven to be one of the major compatible osmolytes responsible for the intracellular isosmotic regulation or cell volume regulation. D-Alanine is also accumulated with L-alanine and inorganic ions in the tissues of Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* during gonadal maturation in the river and during spawning downstream migration toward the sea.

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

Alanine racemase [EC 5.1.1.1] has been proven to catalyze the interconversion of D- and L-alanine in crustaceans and bivalve mollusks and purified from two crustacean species and a mollusk. The enzyme isolated from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon* is a dimer having molecular mass of 90 kDa. Several partial amino acid sequences of peptide fragments obtained from the isolated enzyme showed positive homologies from 52 to 76% (identity from 31 to 45%) with bacterial counterparts and a catalytic tyrosine residue of the bacterial enzyme was also retained in the prawn one, indicating that alanine racemase gene is well conserved from bacteria to invertebrates.

(Key Words) alanine racemase, D-alanine, D-amino acid, hypoxia, invertebrate, isosmotic regulation, metabolism, physiological role

## 水生無脊椎動物における遊離 D-アラニンの生理機能

阿部宏喜・吉川尚子

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

FAX: 03-5841-8166

E-mail: aabe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

## 1. はじめに

生物体を構成するアミノ酸はすべて L 型であると考えられてきたが，分析法の進歩に伴ってこの 20 年ほどの間に哺乳類を含む多くの生物種に遊離の D-アミノ酸が存在することが明らかになり，その生理機能には多大な興味もたれている．なかでも，水生無脊椎動物では種により筋肉部に多量の D-アラニンあるいは D-アスパラギン酸を含有することが知られてきている．水生無脊椎動物における D-アミノ酸の発見は意外に古く，1977 年にマダコ *Octopus vulgaris* に D-アスパラギン酸が初めて見いだされ[1]，1980 年には数種エビ・カニ類筋肉に D-アラニンが[2]，また 1984 年にはヤマトシジミ *Corbicula japonica* 等数種二枚貝の筋肉に D-アラニンが発見され，ヤマトシジミにはアラニンラセマーゼ活性も検出されている[3]．90 年代にはいると高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いる光学分割法が考案され，D-, L-アミノ酸の分析は容易になった．筆者ら[4]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，逆相 HPLC で生体液中のすべての D-, L-アミノ酸を分離定量する方法を開発し，微量の D-アミノ酸の分析を可能にした．本稿では筆者らのその後の成果を中心に，無脊椎動物における D-アラニンの生理機能について述べる．

## 2. 甲殻類および二枚貝における D-アラニンの分布

数種甲殻類における遊離 D-アラニンの分布を Table 1 に示す．筋肉のみの含量を示したが，肝臓や神経組織にも広く分布している[4, 5]．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．全アラニンに占める D-アラニンの割合は，例外はあるものの，50%を超えない．筋肉部でこの割合は一般に高い．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少ない．D-アラニン以外にも D-アルギニンや D-アスパラギン酸などの他の D-アミノ酸も検出されるが，含量も割合も一般に低い．

Table 1. Distribution of free D- and L-alanine in the muscle of aquatic crustaceans

Species	Muscle	D-Ala	L-Ala	D/(D+L)%	Reference
Kuruma prawn	Tail	3.43	5.54	38.2	[5]
<i>Penaeus japonicus</i>	Heart	4.15	6.79	37.9	
Shiba shrimp	Tail	13.6	18.5	42.4	*
<i>Metapenaeus joyneri</i>					
Pink prawn	Tail	5.95	14.9	28.5	*
<i>Pandalus nipponensis</i>					
Crayfish	Tail	3.23	6.83	32.1	[5]
<i>Procambarus clarkii</i>	Heart	3.97	9.32	29.8	
Rock lobster	Tail	6.07	7.24	45.6	[5]
<i>Jasus lalandii</i>	Heart	14.6	9.7	60.1	
Coconut crab	Tail	17.3	24.1	41.4	*
<i>Birgus latro</i>					
Snow crab	Leg	11.9	14.9	44.4	[5]
<i>Chionoecetes opilio</i>	Heart	3.63	9.65	27.3	
Japanese mitten crab	Leg	16.8	24.0	41.2	[5]
<i>Eriocheir japonicus</i>	Heart	6.36	15.4	29.2	
Marsh crab	Leg	5.27	8.89	37.2	[5]
<i>Holometopus dehaani</i>					
Shore crab	Leg	4.05	10.1	28.5	[5]
<i>Hemigrapsus penicillatus</i>					

μmol/g wet wt. \*Unpubl. data

数種二枚貝における D-アラニンの分布を Table 2 に示す. 翼形亜綱 (Pterimorphia) に属するアカガイ *Scapharca broughtonii*, マガキ *Crassostrea gigas*, ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* などの組織には D-アラニンはほとんど検出されず, 初期の研究結果と一致している [3, 7]. 翼形亜綱の種にほとんど含まれない D-アラニンは異歯亜綱 (Heterodonta) の種にはいずれも多量に含有される. 筋肉部のみならず, 中腸腺や鰓にも多い. 特にミルクイ *Tresus keenae* 水管には 50  $\mu\text{mol/g}$  以上存在し, D-アラニンの割合も 80% 以上に達する. 甲殻類の場合とは異なり, 異歯亜綱の二枚貝では D-アラニンの割合が 50% を超える場合が多い. これら二枚貝と他の D-アラニンの割合が低い種との間に, 何らかの代謝的な差異があるのではないかと予測している. これら二枚貝にもその他の D-アミノ酸がわずかに検出されるが, 量的には少ない. しかしながら, アカガイでは D-アスパラギン酸含量が比較的高く (0.5-5  $\mu\text{mol/g}$ ), 最近アスパラギン酸ラセマーゼの存在が報告されている [6, 8].

二枚貝の D-アラニンの起源については, 海水からの取り込み説, 鰓の共生細菌あるいは腸内細菌起源説などいくつかの説があったが [9, 10], これら甲殻類および二枚貝にはアラニンラセマーゼが存在し, D-, L-アラニン間の相互変換を触媒している. し

かしながら, 上記のアカガイの例もあり, 他の酵素系が存在する可能性も否定できない. その他の無脊椎動物では, ある種の環形動物 [10], 星口動物ホシムシ [11], ウニ生殖腺 [12] などでも D-アラニンの存在が報告されている.

### 3. 甲殻類の浸透ストレス下における D-, L-アラニンの生理機能

常に塩濃度の変化する潮間帯や汽水域に生息する水生動物にとって体内浸透圧の調節は重大な問題である. 特に無脊椎動物は開放血管系であるため, 血リンパ (hemolymph) 中の浸透圧を一定に保つことはむずかしく, 細胞内浸透環境を維持するために, 容易に生合成の可能な非必須アミノ酸やベタイン類などのオスモライトを高浸透環境下で蓄積し, 細胞内浸透圧を上昇させ, 細胞容積を一定に保つよう進化してきた. このような調節メカニズムは細胞内等浸透調節 (intracellular isosmotic regulation) と呼ばれ, 1950 年代から研究が行われている. グリシンやアラニンは多くの無脊椎動物種で最も有効なオスモライトとされている.

アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を淡水から全海水まで順応させると, 遊離アミノ酸総量はほぼ 2 倍に増加する (Fig. 1).

Table 2. Distribution of free D- and L-alanine in the muscle of bivalve mollusks

Sub-class/Species	Muscle	D-Ala	L-Ala	D/(D+L)%	Reference
Pterimorphia					
Ark shell	Adductor	0.06	7.76	0.8	[6]
Scapharca broughtonii	Foot	ND	6.07		
Oyster	Adductor	ND	8.64		[6]
Crassostrea gigas	Mantle	0.06	2.88	2.0	
Scallop	Adductor	ND	21.9		[6]
Patinopecten yessoensis					
Pearl oyster	Adductor	0.36	10.2	3.4	*
Pinctada martensii	Mantle	0.04	1.85	2.1	
Pen shell	Adductor	ND	12.4		*
Atrina pectinata					
Heterodonta					
Surf clam	Adductor	41.4	16.4	71.6	*
Mactra chinensis					
Otter shell	Adductor	23.2	13.7	62.8	[6]
Tresus keenae	Foot	16.5	9.04	64.6	
	Siphon	50.6	9.93	83.6	
Hard clam	Adductor	29.4	25.0	54.0	[6]
Meretrix lusoria	Foot	31.2	33.7	48.1	
	Siphon	9.95	11.8	45.7	
Short-necked clam	Adductor	13.3	14.5	47.8	[6]
Ruditapes philippinarum	Foot	9.92	16.5	37.5	
	Siphon	8.68	13.7	38.8	
Sakhalin surf clam	Adductor	22.1	14.6	60.3	[6]
Pseudocardium sachalinensis	Foot	27.8	19.6	58.7	
	Siphon	26.7	9.00	74.8	

$\mu\text{mol/g}$  wet wt. \*Unpubl. data . ND, Not detected.

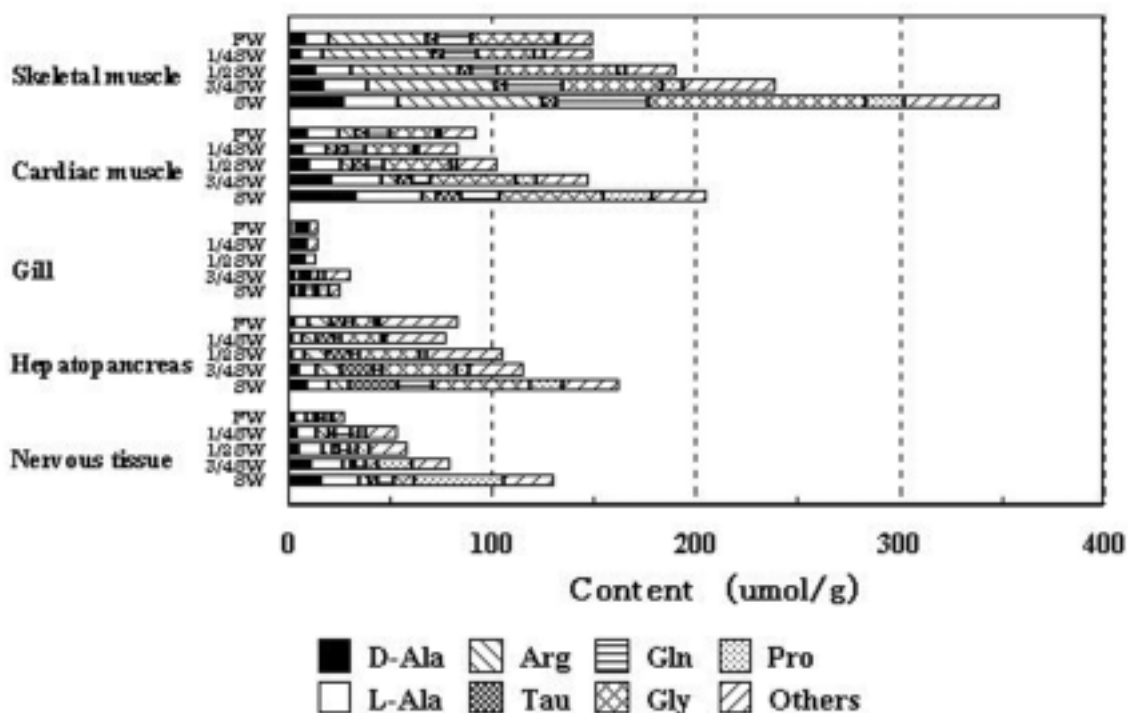


Fig.1. Changes of the major free amino acids in the tissues of crayfish during acclimation from freshwater to full-strength seawater. Salinity in the rearing water was gradually increased using an artificial seawater salt mixture. After 2 days acclimation in 1/4 seawater, salinity was increased to 1/2-seawater. Salinity was then gradually increased after that up to 3/4-seawater level taking 2 days and then up to full seawater level (3.5%) taking 2 days.

顕著に増加を示したアミノ酸は D-, L-アラニン, L-グルタミン, グリシンおよび L-プロリンで, アメリカザリガニではこれらのアミノ酸が細胞内等浸透調節のための有効なオスモライトであることがわかる. この傾向は程度の差はあれ, 心筋, 肝臓, 神経組織でも同様であるが, 鰓などでは認められない(Fig. 1). このような高浸透環境ストレスに応答する D-アラニンの増加は他にモクズガニ *Eriocheir japonicus*, クルマエビ *Penaeus japonicus*, クロベンケイガニ *Holometopus dehaani*, ケフサイソガニ *Hemigrapsus penicillatus* などでも認められ[13, 14, 15], 他のアミノ酸の増加は種によって異なるものの, D-, L-アラニンはどの種においても高浸透環境下で増加する.

高浸透ストレス下における D-アラニンの増加はヤマトシジミでも確認され[3], またハマグリ *Meretrix lusoria* でも 100 から 150%海水に順応させると D-, L-Ala のみの大きな増加が見られる[6]. 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[11]. したがって, 甲殻類のみならず, 多量に D-アラニンを組織中に含有する無脊椎動物で

は D-アラニンは等浸透調節のための主要なオスモライトとして働いていることは確かであろう. これは L-アラニンを D-アラニンに転換することにより, 単一のオスモライトを細胞内に多量に蓄積する弊害を避ける適応と考えられる. ある低分子溶質を細胞内に多量に蓄積することは酵素作用およびタンパク質構造の制御ひいては細胞のホメオスタシスの破綻をきたすことになるからである.

#### 4. 低酸素ストレス下における D-, L-アラニンの生理機能

水生動物は陸上と比べて低酸素環境下におかれ, また水中の溶存酸素濃度は日々大きく変動している. そのため, 水生動物はすぐれた低(無)酸素耐性メカニズムを発展させてきている. マガキなどの数種二枚貝では 2 週間にも及ぶ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最終産物を蓄積し, またグリコーゲンのグルコース単位当たりの ATP 収率を上げることにより, 高い無酸素耐性を示すことは古くからよく知られている[16]. 淡水, 50 および 75%海

水に順応させたアメリカザリガニをほとんど無酸素条件下に 8 時間おいてダブルストレスを負荷し，その後 8 ないし 12 時間回復させると，どの条件下でも筋肉の ATP は低酸素下で劇的に低下し，グリコーゲンの低下と乳酸の増加が顕著に起こる．これらは回復期にはコントロールレベルに復帰する傾向を示す．低酸素下では D-, L-アラニンも顕著に増加し，海水中でこの増加は著しい(Fig. 2).

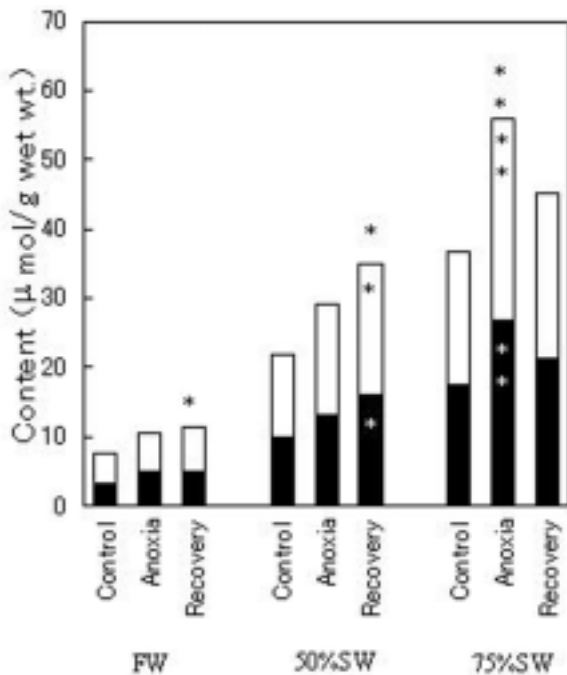


Fig.2. Changes of D-(■) and L- (□)alanine in muscle of crayfish during anoxia ( $PO_2 < 0.1$  mg/mL for 12h) and recovery (12h) in freshwater, 50% (17ppt), and 75% (25ppt) seawater. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Refer to the legend of Fig.1 for seawater acclimation method.

75%海水中では回復過程でコントロールレベル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．肝臓でも同様な D-, L-アラニンの増加が確認されている．これまで甲殻類の嫌気最終産物は乳酸のみと考えられていたが，D-, L-アラニンも最終産物の一つとして利用しているものと考えられる．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 [6], 環形動物 *Arenicola marina* [17] およびホシムシ *Sipunculus nudus* [18] でも観察されており，広く無脊椎動物が D-アラニンを嫌気最終産物の一つとして利用している可能性がある．

5. アラニンラセマーゼによる D-, L-アラニンの相互変換  
組織中に D-アラニンを多量に有する無

脊椎動物には D-, L-アラニン間の相互変換を触媒するアラニンラセマーゼ [EC 5.1.1.1] (ARase)が認められる．真性細菌における ARase はこれまで多くの種について詳細な検討が行われてきた [19]．無脊椎動物における ARase についてはこれまで二枚貝について検討が行われていたが [3, 20, 21]，最近甲殻類でもいくつかの報告がある．甲殻類では ARase 活性はウシエビ，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 *Jasus lalandi* および淡水種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 [22]． $K_m$  値はいずれも高く，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，作用しやすくなる [22]．

無脊椎動物の ARase は最初ウシエビ筋肉から部分精製され [23]，最近アメリカザリガニの筋肉 [24]，ヤマトシジミ外套筋 [25] およびウシエビの肝臓 [26] と筋肉 [27] から単離されている．真核生物では他に真菌の *Tolyptocladium niveum* [28] から単離されているに過ぎない．細菌類の酵素の一次構造は参考にならないため，酵素を単離する必要があるが，無脊椎動物の ARase は硫酸および食塩溶液中では不安定で，組織中の含量が著しく少ないため精製はきわめて困難である．ウシエビ筋肉 ARase は筋肉 800g から 127,500 倍に精製され，16%の収率で 57μg の精製酵素が得られた．分子質量は 90kDa の二量体と推定された．サブユニットの分子質量は 44kDa で肝臓酵素の 41kDa に近い．細菌類の ARase は 40kDa 内外の比較的類似したサブユニットを持つとされており [29]，ヤマトシジミでも 41 kDa であることから ARase のサブユニットは細菌でも無脊椎動物でも類似していると考えられる．例外はザリガニの酵素で，58kDa の単量体と報告されている [24]．

無脊椎動物 ARase はきわめて高い  $K_m$  値を示す．ウシエビ筋肉酵素の L-および D-アラニンに対する  $K_m$  値はそれぞれ 167 および 179 mM と，筋肉内 D-, L-アラニン含量の 10 倍にも達する．この点はザリガニ ARase でも同様であるが，ヤマトシジミではそれぞれ 22.6 および 9.2 mM であり，また *T. niveum* でも  $K_m$  値は低く，真核生物でも甲殻類のみが極端に高い  $K_m$  値を示

すようである。しかし、最大反応速度は高く、両方向で差異は見られず、触媒効率も高い。したがって、Km 値が高く、筋肉内の存在量はわずかであっても、D-, L-アラニンの相互変換を効率よく触媒できるものと考えられる。ウシエビ筋肉の ARase は D-, L-アラニンにのみ特異的で、他のアミノ酸には作用しない。

これまで知られている ARase はすべてピリドキサーール 5'-リン酸 (PLP) を補欠分子族とする。しかしながら、無脊椎動物の酵素は PLP なしでも活性を示し、精製中 PLP を添加しなくても活性のロスはない。しかしながら、PLP 依存性酵素の阻害剤には細菌酵素と同様に阻害される。したがって、無脊椎動物の ARase では PLP はより強固に酵素タンパクに結合しているものと予測される。

ウシエビ筋肉の精製酵素を断片化し、いくつかのペプチドフラグメントを精製し、シークエンスを決定した。Fig. 3 に示すように、3 種のペプチドは細菌類の酵素とかなり高い相同性を示した。アミノ酸同一率は 31~45%であったが、最初のペプチドフラグメントの細菌酵素との相同性は *Lactobacillus plantarum* の酵素で 58%, *L. reute* で 60%, *Bacillus psychrosaccharolyticus* で 57%, *B. stearothermophilus* で 53% および *Listeria monocytogenes* で 52%であった。*B. stearothermophilus* の ARase は 2 つの触媒残基、すなわちリシン 39 およびチロシン 265 を持つことが知られており [29], Fig. 3 に見られるようにこのチロシン残基はす

べての細菌酵素およびウシエビ筋肉酵素で保存されている。したがって、ウシエビ ARase も細菌類のそれと類似のメカニズムで D-, L-アラニンのラセミ化を触媒するものと予測される。第 2 のペプチドフラグメントは *B. psychrosaccharolyticus* および *B. subtilis* の ARase のほぼ C 末端部位に相当し、それぞれ 75 および 76%の相同性を示した。第 3 のフラグメントは *Vibrio cholerae* の推定 ARase および *Enterococcus gallinarum* のセリンラセマーゼと 53%の相同性であった。これらのことから、ARase 遺伝子は細菌から無脊椎動物まで比較的よく保存されていることが明らかで、無脊椎動物は前記のような生理機能に D-アラニンを利用するために、永い進化過程でこの遺伝子を保ち続けたものと考えられる。

## 6. おわりに

以上のように、D-アラニンは多くの無脊椎動物種において重要な生理機能を果たしていることが明らかになった。これまで考えられていたように、地球上の生物は L-アミノ酸システムのみで成り立っているのではなく、明らかに D-アミノ酸システムが存在し、生命システムの維持に貢献している。この D-アミノ酸システムの研究はまだ緒についたばかりであり、今後多くのサブシステムが明らかになってくるものと考えられる。膨大な種を擁する水生無脊椎動物についても D-アミノ酸の未知の生理機能あるいは未知の代謝経路が今後明らかにされる可能性は高い。

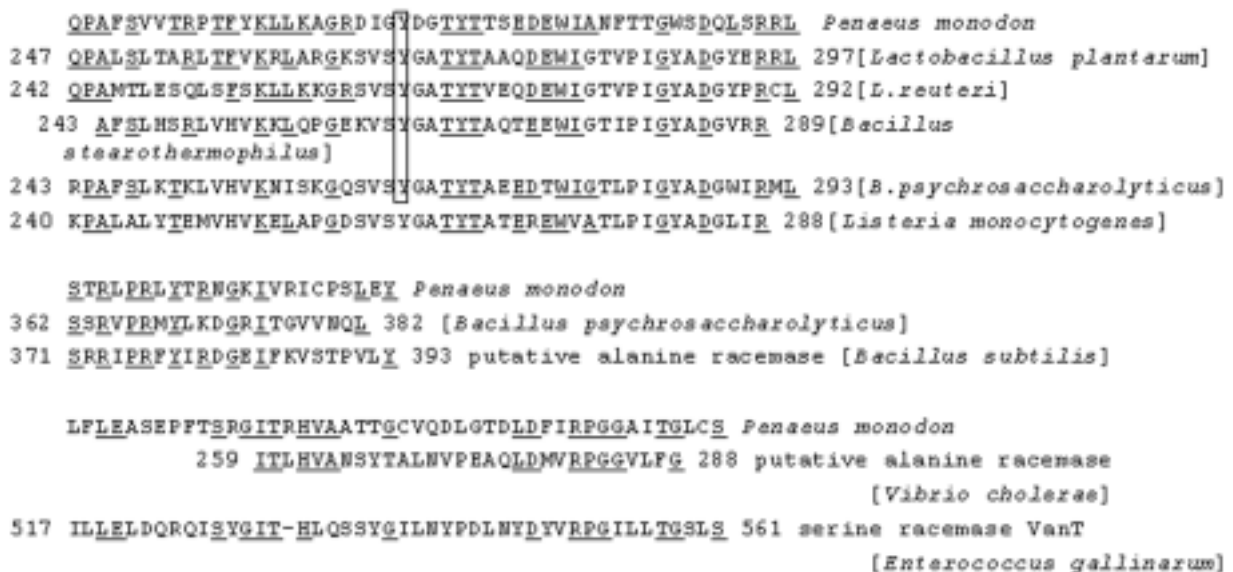


Fig.3. Comparison of partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of *P. monodon* to the corresponding region of that from bacteria. Amino acids identical with those of *P. monodon* are underlined. A catalytic tyrosine residue, which is known as tyrosine 265 in alanine racemase from *B. stearothermophilus*, is boxed.

文 献

1. D'Aniello, A. and Giuditta, A. Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* LAM, J. Neurochem. 29, 1053-1057 (1977)
2. D'Aniello, A. and Giuditta A. Presence of D-alanine in crustacean muscle and hepatopancreas, Comp. Biochem. Physiol. 60B, 319-322 (1980)
3. Matsushima, O., Katayama, H., Yamada, K. and Kado, Y. Occurrence of free D-alanine and alanine racemase activity in bivalve molluscs with special reference to intracellular osmoregulation, Mar. Biol. Lett. 5, 217-225 (1984)
4. Okuma, E. and 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. 660B, 243-250 (1994)
5. Okuma, E., Fujita, E., Amano, H., Noda, H. and Abe, H. Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans, Fish. Sci. 61, 157-160 (1995)
6. Okuma, E., Watanabe, K. and 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. 64, 606-611 (1998)
7. Felbeck, H. and Wiley, S. Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. Biol. Bull. 173, 252-259 (1987).
8. Watanabe, T., Shibata, K., Kera, Y. and Yamada, R. Occurrence of free D-aspartate and aspartate racemase in the blood shell *Scapharca broughtonii*, Amino Acids 14, 353-360 (1998)
9. Wiley, S. and Felbeck, H. D-Alanine metabolism in the lucinid clam *Lucinoma aequizonata*, J. Comp. Physiol. B 164, 561-569 (1995)
10. Preston, R. L. Occurrence of D-amino acids in higher organisms: a survey of the distribution of D-amino acids in marine invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. 87B, 55-62 (1987)
11. Low, W. P., Ong, W. T., Ip, Y. K. Different physiological functions of free D- and L-alanine in three body parts of the intertidal sipunculid *Phascolosoma arcuatum*, J. Comp. Physiol. B 165, 558-564 (1996)
12. D'Aniello, A., Nardi, G., Cipollaro, M., Pischetola, M. and Padula, L. Occurrence of D-alanine in the eggs and the developing embryo of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, Comp. Biochem. Physiol. 97B, 291-294 (1990)
13. 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 17, 100-108 (2000)
14. Okuma, E. and Abe, H. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. Comp. Biochem. Physiol. 109A, 191-197 (1994)
15. Abe, H., Okuma, E., Amano, H., Noda, H. and 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. 65, 949-954 (1999)
16. Hochachka, P.W. Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance. Harvard University Press, Cambridge, 1980
17. Schöttler, U., Wienhause, G. and Westermann, J. Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L.: the transition from aerobic to anaerobic metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 79B, 93-103 (1984)
18. Pörtner, H.O., Vogeler, S. and Grieshaber, M.K. Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. I. Restoration of aerobic steady-state energy metabolism, J. Exp. Biol. 122, 37-50 (1986)
19. Walsh, C.T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly, J. Biol. Chem. 264, 2393-2396 (1989)
20. Matsushima, O. and Hayashi, Y.S. 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. 102A, 465-471 (1992)
21. Yamada, A. and Matsushima, O. The relation of D-alanine and alanine racemase activity in molluscs, Comp.

- Biochem. Physiol. 103B, 617-621 (1992)
22. Fujita, E., Okuma, E. and Abe, H. Occurrence of alanine racemase in crustaceans and the changes of the properties during seawater acclimation of crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.* 116A, 83-87 (1997)
  23. Fujita, E., Okuma, E. and Abe, H. Partial purification and properties of alanine racemase from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon*, *Fish. Sci.* 63, 440-445 (1997)
  24. Shibata, K., Shirasuna, K., Motegi, K., Kera, Y., Abe, H. and Yamada, R. Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkii*, *Comp. Biochem. Physiol.* 116B, 599-608 (2000)
  25. Nomura, T., Yamamoto, I., Morishita, F., Furukawa, Y. and Matsushima, O. Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*, *J. Exp. Zool.* 289, 1-9 (2001)
  26. Uo, T., Ueda, M., Nishiyama, T., Yoshimura, T. and Esaki, N. Purification and characterization of alanine racemase from hepatopancreas of black-tiger prawn, *Penaeus monodon*, *J. Mol. Catal. B* 12, 137-144 (2001)
  27. Yoshikawa, N., Dhomae, N., Takio, K. and Abe, H. Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of black tiger prawn *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 445-453 (2002)
  28. Yoshimura, T. and Soda, K. Alanine racemase: structure and function. In *Molecular aspects of enzyme catalysis* (Fukui, T. and Soda, K., Ed.), pp. 147-163, Kodansha, Tokyo, 1994
  29. Watanabe, A., Yoshimura, T., Mikami, B. and Esaki, N. Tyrosine 265 of alanine racemase serves as a base abstracting  $\alpha$ -hydrogen from L-alanine: the counterpart residue to lysine 39 specific D-alanine, *J. Biochem.* 126, 781-786 (1999)