

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06888

研究課題名（和文）神経精神疾患治療創薬を目指したD-セリン動態制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of D-serine dynamics for the development of new drug against neuropsychiatric disorders

研究代表者

森 寿 (Mori, Hisashi)

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：00239617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳では、アストロサイトで産生された L-セリンが神経細胞に輸送され、セリン異性化酵素（SRR）でD-セリンとなり機能しているとの「セリンシャトル仮説」が提唱されているが、個体レベルでの検証は行われていない。そこで、神経細胞およびアストロサイト特異的にD-セリンを分解できる新たなマウス系統を作製し解析したところ、両系統マウスとも脳内D-セリンの低下が観察され、アストロサイトから神経細胞へのD-セリン輸送機構の存在が新たに示唆された。また、SRRの遺伝子発現を発光計測できるマウス系統を作製し、SRR発現に影響を与える薬物等の同定が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経伝達、神経可塑性、高次脳機能、神経精神疾患に関わるNMDA型グルタミン酸受容体は、内在性のD-セリンによって活性制御を受ける。脳内のD-セリン動態機構は十分には明らかされていない。本研究では、新たな遺伝子組換えマウス系統を作製して解析し、D-セリンがアストロサイトから神経細胞に輸送され細胞間で分布の平衡を保つ機構の存在が示唆された。またD-セリン合成を担うセリン異性化酵素の遺伝子発現を生体発光で計測できるマウス系統の作製にも初めて成功した。本研究成果には、D-セリン動態を明らかにする学術的意義の他に、D-セリン操作を介し神経精神疾患への新たな治療薬の開発につながる社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In the mammalian brain, L-serine produced in astrocytes is transported to neurons and changes into D-serine by serine racemase (SRR). D-Serine returns to astrocyte, and this process is hypothesized as “serine shuttle” based on the in vitro experiments. However, this hypothesis is not examined in vivo. In this study, we generated novel two transgenic mouse strains inducing the D-serine degradation in astrocytes- or neurons-specific manner. Both transgenic mouse strains showed significant reduction of D-serine in the brain, suggesting the novel mechanism of D-serine transport from astrocytes to neurons. Furthermore, we generated another novel mouse strain detecting SRR gene expression with bioluminescence in vivo. Using this mouse strain, we identified some compounds affecting the gene expression of SRR.

研究分野：分子神経科学

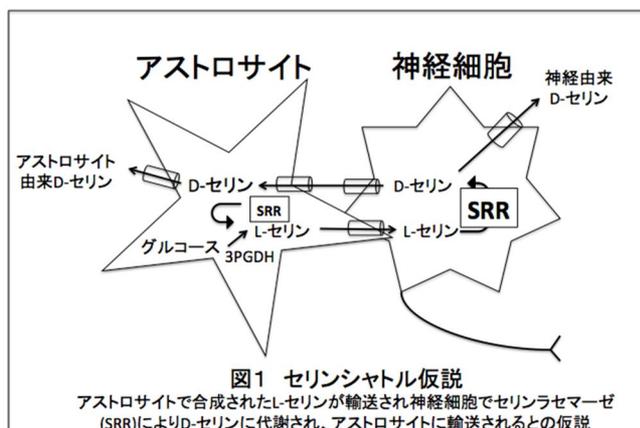
キーワード：セリンラセマーゼ D-セリン NMDA受容体 セリンシャトル仮説 遺伝子発現制御 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

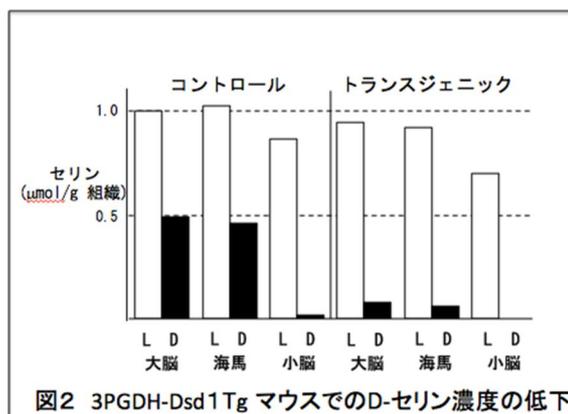
分析技術の向上によりタンパク質合成に使われない遊離型 D-アミノ酸が多く生物で発見された。哺乳類前脳には D-セリンが L-セリンの 1/2~1/3 の濃度で存在している (Hashimoto et al., 1993)。神経回路形成、シナプス可塑性、高次脳機能、また神経精神疾患において中心的役割を担う NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) の十分な活性化には、アゴニストのグルタミン酸とともに、コ・アゴニストとしてグリシンあるいは D-セリンが必須である (Kleckner and Dingledine, 1988)。NMDAR の過剰活性化は多くの神経変性疾患に伴う神経細胞死に関わり、一方、NMDAR の機能低下は統合失調症やうつ病などの精神疾患に関わる。従って、D-セリン動態制御機構の解明と創薬標的としての評価は、NMDAR が関わる神経精神疾患治療薬の新たな開発に必要である。

D-セリンの合成酵素として、セリンラセマーゼ (SRR) が発見されたこと (Wolosker et al., 1999)、D-セリンが海馬の NMDAR や小脳の型グルタミン酸受容体の制御によりシナプス可塑性に関わること (Hennenberger et al., 2010; Kakegawa et al., 2011) が報告され、その機能的な重要性が明らかにされてきたが、SRR の遺伝子発現制御機構は明らかになっておらず、また D-セリンの脳内分布についても議論が続いている。培養マイクログリア細胞では検討が行われているが (Wu et al., 2004)、SRR の遺伝子発現制御機構は、個体レベルでの解析は行われていない。一方、SRR と D-セリンの脳内分布に関しては、神経細胞説とアストロサイト説との議論が続いている (Wolosker et al., 2016)。当初 SRR がアストロサイトに存在すると報告されたことから、D-セリンはアストロサイトで合成され放出される「グリオ・トランスミッター」と主張された。この主張は、培養アストロサイトでの SRR の発現とカルシウム依存的な D-セリン放出の発見から支持された。一方で、SRR ノックアウト (SRR-KO) マウスの解析や、SRR と D-セリンに対する新たな特異抗体の作製と検出条件の工夫をもとに、SRR と D-セリンが神経細胞に主に存在すると主張されている。この議論を複雑にしている原因の一つは、SRR の発現が細胞培養条件や病態で変動することであり (Miya et al., 2008; Perez et al., 2017)、正常な個体脳内での D-セリン分布については結論が出ていない。この議論に結論を出し、NMDAR の機能異常に関わる神経精神疾患に対する新たな治療薬の開発につながる SRR の遺伝子発現に影響する薬物候補を探索するために、SRR の遺伝子発現解析マウス系統の作製と解析が必要であると考えられる。

脳内の神経細胞とアストロサイトは共役し、それぞれ特異的に発現する酵素により生産される代謝産物のやりとりを行い機能連関している。例えば、グルタミン酸は神経細胞から放出されたのち、アストロサイトに取り込まれ、特異的酵素であるグルタミン合成酵素によりグルタミンに変換される。グルタミンはアストロサイトから神経細胞に輸送され、特異的酵素グルタミナーゼによりグルタミン酸に変換され、神経伝達物質として使われる「グルタミン酸-グルタミンサイクル」が、神経細胞-アストロサイト間に存在する (Bak et al., 2006)。同様のアイデアで、神経細胞-アストロサイト間でセリンシャトル仮説が提唱されている (Wolosker and Radzishewsky, 2013、**図1**)。この仮説では、アストロサイト特異的酵素 3PGDH がグルコースからの L-セリンの合成に関わり、合成された L-セリンが神経細胞に輸送され、SRR により D-セリンとなり、神経由来 D-セリンとして機能し、一部がアストロサイトに運ばれ、アストロサイト由来 D-セリンとして機能するとの仮説である。細胞間の D-セリン輸送には中性アミノ酸トランスポーターが関わっている。しかしながら、この仮説は個体レベルではまったく検証されていない。



そこで、この仮説を検証するためにアストロサイト特異的 3PGDH 遺伝子を用いて酵母由来 D-セリン分解酵素 (Dsd-1) を発現する新たなトランスジェニックマウス (BAC-Tg-3PGDH-Dsd1) 系統を作製し、脳内セリン濃度を測定した結果、コントロールマウス系統に比べ前脳 D-セリンが 1/6 程度に減少していることを見出した (図 2、未発表)。



この結果は、脳内でD-セリンは、アストロサイトに主に貯蔵されていることを示唆している。この結論を導き出すためには、さらに神経細胞特異的に Dsd-1 を発現させたマウス系統を作製し、同様に解析して比較する必要がある。

したがって、本研究では、1) SRR の遺伝子発現制御機構を明らかにするために SRR 遺伝子発現モニターマウスを作製し解析すること、2) セリンシャトル仮説を検証すること、により、脳内 D-セリン動態機構の解明を行い、神経精神疾患に対する治療創薬の基盤研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内 D-セリンの動態制御機構を、SRR の遺伝子発現制御機構の解明とセリンシャトル仮説の検証の観点から明らかにすることである。本研究では、研究代表者のこれまでの D-セリン研究の実績をもとに、分子遺伝学的手法を用い SRR 遺伝子発現モニターマウス系統の作出と解析、ならびに、アストロサイトおよび神経細胞特異的に D-セリンを分解する新たな遺伝子操作マウス系統を独自に作出し個体レベルで解析を行うことである。本研究は、新規遺伝子操作マウス系統の開発と解析、SRR 発現制御薬のスクリーニング系の開発、個体レベルでの D-セリン動態評価系の構築を通して、D-セリン動態制御に関わる創薬標的の同定に展開できる可能性がある。学術的には、神経細胞-アストロサイト代謝連関概念の新たな証明となる。このように本研究は、新たな学術的概念の創出のみならず、脳内 D-セリン動態制御薬の発見や新たな神経精神疾患治療薬の開発が期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の方法で解析を進める。

### (1) SRR 遺伝子発現モニターマウス系統の作製と解析

マウス SRR ゲノム遺伝子全体を含むバクテリア人工染色体(BAC)を用い、大腸菌内相同遺伝子組換え法により、SRR の翻訳開始部位に、レポーターとして高感度で定量性が高いホタルルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を挿入したトランスジーン BAC-Tg-SRR-Luc を構築し、全身からの発光計測が容易なヘアレスマウス系統の受精卵にマイクロインジェクションし、ファウンダーマウス系統を樹立する。マウス系統を確立したのち、生後発達に伴う SRR 発現変化を発光計測により検討し、ウェスタンブロット法による内在性 SRR の発現変化と比較して、SRR 遺伝子発現モニターマウスとしての評価を行う。また、このマウス系統あるいは C57BL/6 系統マウスを用いて作製する Tg マウス系統より初代培養神経細胞とアストロサイトを調整し、既存薬や和漢薬ライブラリーを用いて、SRR 発現に影響を与える薬物スクリーニングを行う。

### (2) アストロサイト特異的 D-セリン分解 (BAC-Tg-3PGDH-Dsd-1) マウス系統の解析

アストロサイト特異的 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH) 遺伝子を用いたマウス系統はすでに確立できているので、Dsd-1 に対する特異抗体を作製し Dsd-1 がアストロサイトに特異的に発現することを確認する。さらに生後発達に伴う Dsd-1 の発現量変化の解析と脳内セ

リン濃度の測定を行い、アストロサイト由来 D-セリンの生後発達変化を明らかにし、アストロサイトが関わる D-セリン動態とその機能を評価する。

#### (3) 新たな神経細胞特異的 Dsd-1 発現トランスジェニックマウス系統の作製と解析

神経細胞由来 D-セリンの機能を明らかにするために、興奮性錐体神経細胞に広く発現する CaMKII 遺伝子 BAC を用いて、同様に Dsd-1 発現マウス(BAC-Tg-CaMKII-Dsd-1) 系統を作製し、上記2)のアストロサイト特異的 Dsd-1 発現マウスと同様の解析を行い、神経細胞由来 D-セリンの機能を明らかにし、アストロサイト由来 D-セリン機能との比較を行う。

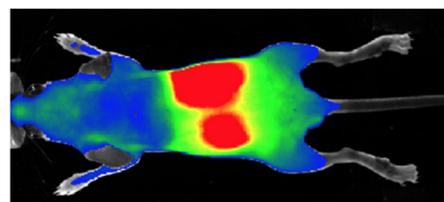
#### (4) D-セリン輸送体の同定

セリンシャトルの検証により、D-セリン動態制御における神経細胞とアストロサイトの貢献度を明らかにしたのち、より重要な貢献をしている細胞種を初代培養し、D-セリン輸送に関わる中性アミノ酸トランスポーターの発現を qRT-PCR 法で解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) SRR 遺伝子発現モニターマウス系統の作製と解析

セリンラセマーゼ (SRR) 遺伝子の翻訳開始部位に、ホタルルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を挿入したトランスジーン BAC-Tg-SRR-Luc を構築し、全身からの発光計測が容易なヘアレスマウス系統の受精卵にマイクロインジェクションし、ファウンダーマウス系統を樹立した。このマウスを用いた発光計測の結果、脳のみならず内臓(肝臓、小腸)、胸腺、顎下腺でも発光を検出した(右図)。



これまで SRR の機能解析は脳での神経伝達への作用を中心として行われていたが、この結果から、脳-内臓機能連関、免疫系や内分泌系での D-セリン機能解析に展開できる可能性が示唆された。さらに今後の行動解析等に使用するため C57BL/6 系統マウスでもトランスジェニックマウスのファウンダーを樹立し、脳での定量的発光計測が可能となった。神経変性疾患と D-セリン代謝の関与に関して、SRR の発現変化とその機能を解析するために遺伝学的なアルツハイマー病 (AD) モデルマウスとの交配により、新たな AD+BAC-Tg-SRR-Luc マウス系統を作製し AD 発症進行過程における SRR 発現解析を開始した。また、C57BL/6 系統のトランスジェニックマウス系統の胎児脳由来の初代培養神経細胞を用いて、SRR 遺伝子発現に影響を与える薬物等を 96 ウェルプレートの発光計測によりスクリーニングし、抗てんかん薬や双極性障害の治療薬として用いられているパルプロ酸による SRR 遺伝子発現上昇、NMDAR のチャンネルブロッカー MK-801 や脱分極を引き起こす KCl による遺伝子発現低下が観察された。

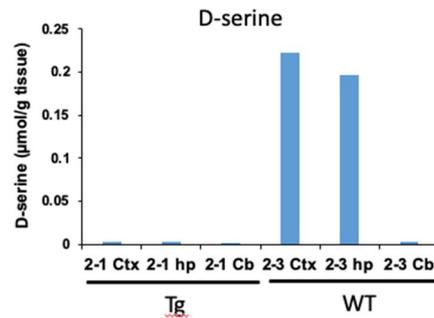
#### (2) アストロサイト特異的 D-セリン分解 (BAC-Tg-3PGDH-Dsd-1) マウス系統の解析

アストロサイト特異的に D-セリンを分解するために、作製した(BAC-Tg-3PGDH-Dsd-1) マウス系統を用い Dsd-1 に対する特異抗体を作製しウェスタンブロット法で、このマウス系統での Dsd-1 の発現を確認した。また免疫組織染色により、このマウス系統の若齢では Dsd-1 の発現を検出し 3PGDH と同様の発現を示すことを見出した。しかしながら成体マウス脳での Dsd-1 のシグナルが弱いので、BAC-Tg 遺伝子の再構築を行い、Dsd-1 のアミノ末端に FLAG-Tag を挿入した新たな BAC-Tg マウスを作製した。この新たなマウス系統でも脳内 D-セリンが低下していることを確認した。今後脳内の Dsd-1 の発現確認を行い、解析を進める。

#### (3) 新たな神経細胞特異的 Dsd-1 発現トランスジェニックマウス (BAC-Tg-CaMKIIa-Dsd1) 系統の作製と解析

神経細胞特異的 Dsd-1 発現トランスジェニックマウス系統を作製するために、研究計画段階で

は神経細胞のマーカである NeuN/Fox3 遺伝子の利用を考えていた。しかしながら NeuN 遺伝子は多数の転写開始点を持つことからトランスジーン遺伝子発現を制御することが困難であることが明らかとなった。そこで、興奮性錐体神経細胞特異的 CaMKIIalpha 遺伝子を用い BAC-Tg-CaMKIIa-Dsd-1 トランスジーンを構築し C57BL/6 系統でトランスジェニックマウス系統を樹立した。このマウスでは、興奮性錐体細胞で Dsd-1 の発現が確認でき、大脳や海馬では D-セリン含量が野生型の 10% 以下であった（右図）。この結果は、アストロサイトに貯蔵されて



BAC-Tg-CaMKII-Dsd1マウスでは、大脳皮質(Ctx)、海馬(hp)、小脳(Cb)でD-セリンの低下が検出された。

いる D-セリンも神経細胞に輸送され、分解されている可能性を示唆している。これまでのセリンシャトル仮説では、アストロサイトから神経細胞への D-セリンの輸送は想定されていないため、新たな輸送経路の存在や、アストロサイトと神経細胞間で D-セリン濃度の平衡を保持する機構の存在が示唆された。

#### (4) D-セリン輸送体の同定

セリンシャトルの検証により、D-セリン動態制御における神経細胞とアストロサイトの貢献度を明らかにしたのち、D-セリン輸送に関わる中性アミノ酸トランスポーターの発現を qRT-PCR 法で解析する予定であったが、マウス系統の作製と解析に時間がかかり、輸送体の発現解析には至らなかったため今後の研究課題とした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ozaki H, Inoue R, Matsushima T, Sasahara M, Hayashi A, Mori H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Serine racemase deletion attenuates neurodegeneration and microvascular damage in diabetic retinopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0190864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0190864.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahara S, Nakagawa K, Uchiyama T, Yoshida T, Matsumoto K, Kawasumi Y, Mizuguchi M, Obita T, Watanabe Y, Hayakawa D, Gouda H, Mori H, Toyooka N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of novel inhibitors for wild-type human serine racemase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 441-445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2017.12.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue R, Talukdar G, Takao K, Miyakawa T, Mori H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Dissociated role of D-serine in extinction during consolidation vs. reconsolidation of context conditioned fear.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2018.00161.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihisa Y, Rehman MU, Nakagawa M, Matsukuma S, Makino T, Mori H, Shimizu T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Inflammatory cytokine-mediated induction of serine racemase in atopic dermatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med.	6. 最初と最後の頁 3133-3138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.13592.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dong C, Zhang JC, Ren Q, Ma M, Qu Y, Zhang K, Yao W, Ishima T, Mori H, Hashimoto K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Deletion of serine racemase confers D-serine -dependent resilience to chronic social defeat stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 43-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.03.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Krasovec Gabriel, 保住暁子, 吉田知之, 濱田麻友子, 白石慧, 佐竹 炎, 堀江健生, 森寿, 笹倉靖徳
2. 発表標題 D-serineは脊索動物ホヤの変態時に表皮細胞からの細胞外基質の分泌を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ni X, Inoue R, Mori H.
2. 発表標題 Both D-serine signaling and hippocampal neurogenesis are required for maintaining remote contextual fear memory following repeated memory retrievals.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue R, Ni X, Mori H.
2. 発表標題 Durable fear memory after repeated memory retrieval requires D-serine and intact adult hippocampal neurogenesis.
3. 学会等名 IDAR2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue R, Ni X, Mori H.
2. 発表標題 Erasure of remote contextual fear memory by blocking both D-serine signaling pathway and adult hippocampal neurogenesis.
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石本哲也、森寿
2. 発表標題 発光蛋白質を用いた新しい細胞内蛋白質機能操作法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 寿
2. 発表標題 遺伝子操作マウスを用いたセリンラセマーゼとD-セリンの機能解析
3. 学会等名 D-アミノ酸学会第3回ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori H.
2. 発表標題 The opposite role of D-serine in immediate and retrieval extinction of contextual fear memory.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 蘭, Talukdar Gourango, 森 寿
2. 発表標題 恐怖記憶の消去における脳内D-セリンの役割
3. 学会等名 第14回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Mori, H. Site of ketamine action on the NMDA receptor. (p47-67)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 189
3. 書名 Ketamine; From Abused Drug to Rapid-Acting Antidepressant.	

1. 著者名 井上蘭、森寿	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 368
3. 書名 脳神経化学、5章「興奮性神経伝達物質とそれらの受容体のダイナミクス」p44-54.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学分子神経科学講座HP <a href="http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html">http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------