

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14907

研究課題名(和文) 寿命制御因子としてのD-アミノ酸

研究課題名(英文) D-Amino acid as a regulator of lifespan

研究代表者

齋藤 康昭 (Saitoh, Yasuaki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00631730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：以前に研究代表者らは、線虫*Caenorhabditis elegans*を材料にしてD-アミノ酸が寿命に深く関与することを見出した。これは、これまで全く想定されていなかった事実である。そこで、D-アミノ酸がどのように寿命制御に関与するのかを、寿命研究の成果が豊富な線虫を用いて解析した。D-グルタミン酸含量は老化に伴って低下し、その含量の調節はD-アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO-3)によって行われていることを明らかにした。さらに、D-グルタミン酸による寿命延長作用はアミノ酸感受システムおよびNMDA受容体を介した神経伝達に強く関与していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本は超高齢社会を迎え、健康長寿社会の実現は国民の最大の関心事である。寿命制御メカニズムの解明は、老化によって生じる代表的な疾患である糖尿病などの生活習慣病の予防や治療、ひいては健康寿命社会の実現につながる。本研究の成果は、寿命制御の研究に新しい切り口を与えられ、一方、我々は他大学との共同研究により、長年その存在に疑問が持たれていたD-グルタミン酸が確かにマウスに存在し、心機能に重要な役割を持つことを明らかにしている。哺乳類体内でのD-グルタミン酸の生理的役割の解明をめざすにあたり、本研究の成果は意義深いと言える。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that in the nematode *Caenorhabditis elegans*, D-amino acid plays an important role in lifespan. This is a fact that had not been envisaged at all. To investigate how D-amino acid is involved in the regulation of lifespan, we used *C. elegans*, which is a very good model for the study of aging. The results showed that D-glutamate content decreases with aging and is regulated by D-aspartate oxidase (DDO-3). Furthermore, the results suggested that lifespan extension by D-glutamate is strongly involved in the amino acid-sensing system and NMDA receptor-mediated neurotransmission.

研究分野：生物系薬学 物理系薬学

キーワード：D-アミノ酸 D-グルタミン酸 D-アスパラギン酸オキシダーゼ 線虫 *C. elegans* 寿命 TORC1 GCN2 NMDA受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた哺乳類に存在する遊離型の D-アミノ酸のうち、D-アスパラギン酸はホルモン分泌やステロイド合成を調節し、D-セリンは NMDA 型グルタミン酸受容体を介した神経伝達を調節していることが示唆されている。生体内には、これらの D-アミノ酸を立体特異的に分解する 2 種類の酵素が存在する。酸性 D-アミノ酸を基質とする D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) と、中性・塩基性の D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) である。哺乳類における DDO および DAO は、それぞれ D-アスパラギン酸および D-セリンの体内濃度を調節していると考えられている。

研究代表者は、D-アミノ酸およびその合成・分解酵素の生理機能を分子論的に解析するため、遺伝学的・分子生物学的解析がしやすいモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究を行っている。これまでに、線虫体内には、D-アスパラギン酸、D-セリン、D-グルタミン酸および D-アラニンが存在することを明らかにした(文献 1、2)。また、線虫には 3 種類の DDO (DDO-1, -2, -3) と 1 種類の DAO が存在し(文献 3、4)、これらの酵素の組織分布や欠損変異体の表現型の解析により、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸および D-アラニンとそれを代謝する DDO と DAO が生殖機能に重要な役割を担っていることを示してきた(文献 1)。たいへん興味深いことに、DDO-3 欠損変異体では、野生株に対して D-グルタミン酸含量が 2.4 倍に増加し、寿命が 1.3 倍に延長することを明らかにした(文献 1)。また、餌に D-グルタミン酸を添加するとさらに寿命が延長することを明らかにした。つまり、DDO-3 は D-グルタミン酸を代謝して寿命を調節していることが示唆された。しかしながら、D-アミノ酸がどのように寿命制御に関与するのかは未解明のまま残されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、線虫を材料にして D-アミノ酸が寿命に深く関与することを初めて見出した。これは、これまで全く想定されていなかった事実である。そこで、D-アミノ酸がどのように寿命制御に関与するのかを、寿命研究の成果が豊富な線虫を用いて明らかにする。健康寿命社会の実現は、超高齢社会の日本にとって最大関心事の一つである。ヒトの寿命制御の基盤的研究成果が得られるはずである。

3. 研究の方法

D-グルタミン酸および DDO-3 が寿命制御メカニズムでどのような役割を果たしているかを検討するために、(1) 線虫の老化に伴う D-グルタミン酸含量の変化、(2) D-グルタミン酸の組織分布、(3) D-グルタミン酸および DDO-3 が作用する寿命制御経路を解析した。

(1) 線虫の老化に伴う D-グルタミン酸含量の変化

同調培養した野生株および DDO-3 欠損変異体の L1 幼虫を NGM プレートに移し、通常の培養温度(20°C)で 3 日間培養して成虫まで成長させた。この日を成虫第 1 日目とし、得られた成虫を次世代の混入を防ぐために 5-fluorodeoxyuridine (FUdR) を含む NGM プレートに移し、20 日経時的に培養して得られる線虫をサンプルとした。FUdR は線虫の自家受精を阻害する試薬であり、寿命には影響を与えない。得られたサンプルをスクロース遠心による洗浄後、超音波処理器を用いて破碎し、HPLC により種々の D, L-アミノ酸を定量した。

(2) D-グルタミン酸の組織分布

成虫第 1 日目の野生株および DDO-3 欠損変異体をパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒドを用いて固定した後、抗 D-グルタミン酸抗体を用いた免疫染色を行い、FITC 標識二次抗体と反応させた。蛍光顕微鏡下、D-グルタミン酸の組織分布を解析した。

(3) D-グルタミン酸および DDO-3 が作用する寿命制御経路

既知の寿命制御遺伝子をノックアウトあるいはノックダウンした DDO-3 欠損変異体の寿命を測定した。同様に、餌に D-グルタミン酸を添加することによる寿命延長効果に対しても解析した。寿命試験は、成虫第 1 日目の線虫を FUdR を含むプレートで培養しながら線虫の生死を観察した。線虫変異体はナショナルバイオリソースプロジェクト (<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>) および *Caenorhabditis Genetics Center* (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>) から入手した。フィーディング RNAi は、種々の遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現する大腸菌を餌として線虫を培養して行った。

4. 研究成果

(1) 線虫の老化に伴う D-グルタミン酸含量の変化

野生株体内の D-グルタミン酸含量は老化に伴って低下した。一方、DDO-3 欠損変異体の D-グルタミン酸含量は老化に伴って増加し、老化のいずれの期間においても野生株と比較して高レベルであった。これらの結果は D-グルタミン酸が寿命制御に強く関与していることを示唆する。

(2) D-グルタミン酸の組織分布

D-グルタミン酸の局在は雌雄同体の野生株および DDO-3 欠損変異体のいずれにおいても精子

を貯蔵する貯精嚢でのみ認められた。以前に研究代表者らは、生殖腺で発現した DDO-3 は細胞外に分泌され卵母細胞の表面に輸送されること、また、DDO-3 欠損変異体の産卵数は野生株と比較して低下していることを明らかにした。これらの結果は、貯精嚢に局在する D-グルタミン酸および卵母細胞表面に局在する DDO-3 が線虫の生殖に重要な役割を持つことを示唆する。また、以前に研究代表者らは DDO-3 が体腔液に分泌されていることを明らかにした。おそらく体腔液中に存在する D-グルタミン酸は本法により検出することが出来なかったと考えられる。

(3) D-グルタミン酸および DDO-3 が作用する寿命制御経路

食餌制限による寿命の延長は線虫をはじめ様々な生物で見られる。食餌制限モデルである EAT-2 機能低下型変異体 (単独変異体は長寿命を示す) と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は単独変異体と同程度であり、寿命の更なる延長は認められなかった。この結果は、DDO-3 欠損変異体の寿命延長が食餌制限の効果を受ける経路を介していることを示唆する。

インスリン/IGF-1 受容体 (DAF-2) の不活化あるいはサーチュイン (SIR-2.1) の活性化は FOXO 転写因子 (DAF-16) の活性化を引き起こし寿命を延長させる。DAF-2 機能低下型変異体 (単独変異体は長寿を示す) と DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は単独変異体の寿命と比較して更に延長した。また、短寿命を示す SIR-2.1 欠損変異体あるいは DAF-16 欠損変異体と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は SIR-2.1 および DAF-16 の単独変異体の寿命と比較して延長した。これらの結果は、DDO-3 欠損変異体の寿命延長がインスリン/IGF-1 およびサーチュインシグナル経路を介していないことを示唆する。

TOR (Target of Rapamycin) 複合体の一つである TORC1 はアミノ酸が存在している状況においてリボソームの生成や翻訳を促進する一方、GCN2 キナーゼ (GCN-2) はアミノ酸の飢餓の状況においてそれらを抑制する。アミノ酸による TORC1 の活性化に關与する RagA (RAGA-1) の欠損変異体 (単独変異体は長寿命を示す) と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は単独変異体と同程度であり、寿命の更なる延長は認められなかった。また、野生株と同程度の寿命を示す GCN-2 欠損変異体と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は GCN-2 欠損変異体の寿命と比較して僅かに延長し、DDO-3 の欠損による寿命延長の大部分が消去された。さらに、RAGA-1 および GCN-2 の下流で寿命を正に調節する NRF2 転写因子 (SKN-1) の機能低下型変異体 (単独変異体は短寿命を示す) と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は SKN-1 機能低下型変異体の寿命と同程度あり、DDO-3 の欠損による寿命延長は完全に消去された。SKN-1 を活性化させることができる MAP キナーゼ (MPK-1) の RNAi もまた DDO-3 欠損変異体の寿命延長を完全に消去した。これらの結果は、DDO-3 欠損変異体の寿命延長がアミノ酸感受システムに強く關与していることを示唆する。

哺乳類に存在する D-セリンおよび D-アスパラギン酸はそれぞれ NMDA 受容体のコアゴニストおよびアゴニストとして作用することで記憶や学習を調節している。一方、D-グルタミン酸は部分的アゴニストとして NMDA 受容体に作用することができるが、その生理学的役割は明らかになっていない。NMDA 受容体の NR1 サブユニット (NMR-1) の欠損変異体 (単独変異体は野生株と同程度の寿命を示す) と、DDO-3 欠損変異体の二重変異体の寿命は NMR-1 欠損変異体の寿命と比較して僅かに延長し、DDO-3 の欠損による寿命延長の大部分が消去された。さらに、餌に D-グルタミン酸を添加することによる寿命延長作用はこの二重変異体では認められなかった。これらの結果は、DDO-3 欠損変異体で蓄積した D-グルタミン酸が NMDA 受容体を介して寿命を延長させていることを示唆する。今後は、D-グルタミン酸が線虫のアミノ酸感受システムおよび NMDA 受容体を介した神経伝達にどのように關与して寿命を調節しているのかを明らかにしたいと考えている。

<参考文献>

Saitoh Y, Katane M, Kawata T, Maeda K, Sekine M, Furuchi T, Kobuna H, Sakamoto T, Inoue T, Arai H, Homma H (2012) Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 32, 1967–1983.

Katane M, Saitoh Y, Uchiyama K, Nakayama K, Saitoh Y, Miyamoto T, Sekine M, Uda K, Homma H (2016) Characterization of a homologue of mammalian serine racemase from *Caenorhabditis elegans*: the enzyme is not critical for the metabolism of serine *in vivo*. *Genes Cells* 21, 966–977.

Katane M, Seida Y, Sekine M, Furuchi T, Homma H (2007) *Caenorhabditis elegans* has two genes encoding functional D-aspartate oxidases. *FEBS J* 274, 137–149.

Katane M, Saitoh Y, Seida Y, Sekine M, Furuchi T, Homma H (2010) Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biodivers* 7, 1424–1434.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saitoh Y, Katane M, Miyamoto T, Sekine M, Sakamoto T, Imai H, Homma H	4. 巻 286
2. 論文標題 Secreted D-aspartate oxidase functions in <i>C. elegans</i> reproduction and development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 124-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14691	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saitoh Y, Katane M, Miyamoto T, Sekine M, Sakai-Kato K, Homma H
2. 発表標題 Secreted D-aspartate oxidase functions in <i>C. elegans</i> reproduction
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research IDAR2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部生体分子解析学教室ホームページ http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/

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
---------------------------	-----------------------	----