

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590071
 研究課題名（和文） 線虫におけるD-アミノ酸酸化酵素の時空系分布の解析とD-アミノ酸含量の分析
 研究課題名（英文） Study of spatiotemporal expression of D-amino acid oxidases and D-amino acid contents in *Caenorhabditis elegans*
 研究代表者
 本間 浩（HOMMA HIROSHI）
 北里大学・薬学部・教授
 研究者番号：50190278

研究成果の概要（和文）：

モデル生物である線虫には、D-アミノ酸を酸化的に分解する酵素の遺伝子が4つ存在する。1つは、中性と塩基性 D-アミノ酸を分解する D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）で、他の3つは酸性 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 1-3（DDO-1～DDO-3）である。そこで、これらの遺伝子を欠失した変異株を取得して野生株と比較した。まず、各生育段階にある線虫変異株体内に存在する D-アミノ酸を HPLC を用いて分離定量し、野生株と比較した。また、各変異株の表現形質と行動について調べ、野生株との違いを解析した。

研究成果の概要（英文）：

Caenorhabditis elegans, a model organism has four genes which encode the enzymes degrading D-amino acids oxidatively. One of them encodes D-amino acid oxidase which degrades neutral and basic amino acids, while the other three are D-aspartate oxidases 1-3 degrading acidic D-amino acids. In this work, I isolated and prepared the mutants defective in each gene, and compared them with the wild type strain. First I determined by HPLC the contents of D-amino acids in the body of wild type and the mutants. Then I examined the phenotypes and behaviors of the mutants and compared with those of the wild type. Based on these results I discussed the physiological roles of D-amino acids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するアミノ酸は、細菌のペプチドグリカンや微生物由来の抗生物質の一部に例外的に見出される以外、ほぼL型であ

ると信じられてきた。すなわち、鏡像異性体の片方だけ（アミノ酸でいえばL型だけ）が存在するというホモキラリティーが、生命活動の存在を示す確実な証拠だと考え

られてきた。しかし、ヒトを含めた高等動物体内に、多量の D 型アミノ酸が発見され、D 型に立体特異的な酵素群が次々に見出され、また、D 型アミノ酸の機能が分子論的に解析されてきた結果、高等動物には D 型アミノ酸を機能分子として用いる新規なバイオシステムが存在すると考えられるようになった。

2. 研究の目的

高等動物の神経系には、D 型セリンが多量に存在しており、ヒトの前頭葉皮質部では、D-セリン (D-Ser) の含量は、全 Ser の約 30% にも及んでいる。この D-Ser は、グルタミン酸受容体の一種である NMDA 受容体の coagonist として機能することが既に明らかにされている。すなわち、NMDA 受容体に対して agonist である L-グルタミン酸が作用するにあたって、D-Ser が存在しなければ、この受容体は活性化されない。いわば、D-Ser は NMDA 受容体にとって必須の機能分子ということができる。

高等動物の体内には、D-Ser 以外にも高濃度の D-アスパラギン酸 (D-Asp) や他の D-アミノ酸が見出されている。D-Asp は、下等動物や植物にも高濃度に検出され、D-Ser よりも様々な生物に広く存在することが知られている。D-Asp は、哺乳類体内では様々な組織内で特定の細胞群に局在しており、成長の過程で独特の含量変化を示すことを明らかにしている。また、D-Asp には、松果体実質細胞ではメラトニン分泌の抑制、下垂体前葉ではプロラクチン分泌の促進、精巣では Leydig 細胞でのテストステロン産生の促進などの作用が報告されている。このように、D-Asp は、D-Ser と同様に、高等動物体内で内分泌系の機能分子として振る舞っているものと考えられる。しかし、D-Asp が一次的に作用する部位 (第一に結合するタンパク質) は残念ながら同定できていない。そのため、存在が想定される D-Asp を用いる新規バイオシステムの研究が、D-Ser と比べると大きく立ち後れている。そこで、我々は研究材料を見直し、モデル生物として汎用されている線虫を材料として D 型アミノ酸 (主に D-Asp) の機能解析を行おうと考えた。線虫を用いる利点は、1) 体が透明であり、D 型アミノ酸に立体特異的な酵素群や関連タンパク質の発現をレポータータンパク質を用いて容易に観察できること、2) 特定の遺伝子を欠損した

変異株を用いた機能解析が容易であること、3) 生育が早いため、多量の線虫を回収して、様々な生育ステージでの D-アミノ酸の分析が可能であることなどである。このような利点を有する線虫を用いて、D-アミノ酸の生理的役割を明らかにすることが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

我々の解析結果から、線虫には D-アミノ酸を立体特異的に分解する酵素遺伝子が 4 つ存在することが明らかになっている。1 つは、中性と塩基性 D-アミノ酸を基質にする D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) であり、他の 3 つは、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 1-3 (DDO-1- DDO-3) である。本研究課題では、1) これらの分解酵素の時空系分布の解析、2) 各遺伝子の欠損変異株を取得し、さまざまな生育ステージでの D-アミノ酸の網羅的分析と野生株との比較、3) 欠損変異株と野生株との表現形質と行動の比較解析などを行い、D-アミノ酸の生理的役割を考察する。

1) については、上記の 4 種の酵素遺伝子の、ATG コドンを含めたプロモーター領域 (約 2-3kb) を、green fluorescent protein (GFP) をコードするレポータープラスミド pPD95.67 にクローニングし、これらのプラスミドを、形質転換体の選択マーカーである *rol-6* と同時に、雌雄同体の young adult の生殖腺にマイクロインジェクションする。形質転換体を選別し、さらに F2、F3 の安定な形質転換体を選別し、蛍光実体顕微鏡を用いて、成長過程の各ステージにおける GFP の発現を観察する。

2) に関して、まず各遺伝子の欠損変異株を取得する。各変異株及び野生株の同調培養を行い、成長段階が異なる線虫のストックを調製する。一方、我々の研究室では既に 2 種類の HPLC システムを開発して、D-アミノ酸の定量分析を行っている。これらを用いて、D-アミノ酸の分離分析を行う。

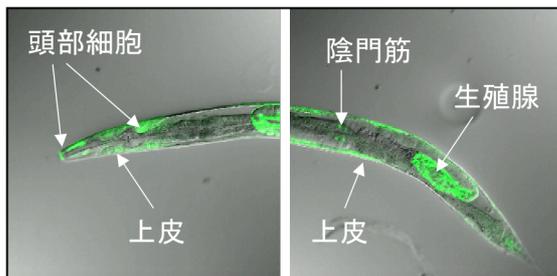
3) に関しては、各変異株と野生株を用いて、以下の基礎的表現形質と行動の解析を行う。基礎的表現形質としては、①成長速度、②産卵数、③孵化率について、行動解析としては、④寿命、⑤機械刺激に対する応答性、⑥排泄行動、⑦誘引・忌避

行動、⑧一般運動性、⑨薬剤感受性、⑩記憶・学習について解析する。

4. 研究成果

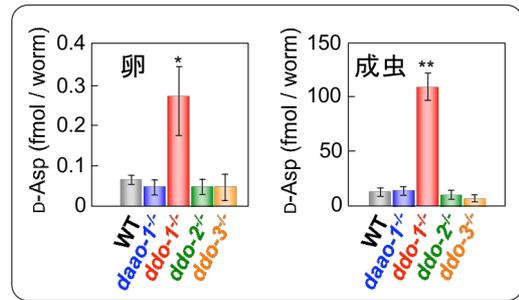
1) 線虫 D-アミノ酸 oxidase の時空系分布の解析

上記のように、線虫には D-アミノ酸特異的分解酵素として、DAO と DDO 1-3 が存在する。それらの発現時期と部位を、GFP をレポーターに用いて解析した。その結果、DAO、DDO-1 および DDO-2 は embryo から adult に至る全ての発生段階において腸で観察された。DDO-1 は頭部神経でも観察され、上皮では adult でのみ観察された。また、DDO-2 は頭部神経、咽頭および体壁筋でも観察された。一方、DDO-3 は（下図参照）腸では発現しておらず、頭部神経での発現が L3 幼虫から観察された。さらに、陰門、生殖腺および上皮での発現が観察された。以上のように、これらの酵素が神経系、消化系、骨格系および生殖系といった様々な組織で成長時期特異的に発現していることが明らかになった。



2) DAO および DDO 1-3 遺伝子の欠損変異株と野生株体内の D-アミノ酸の網羅的分析

線虫の野生株では、すべての発生段階で D-Ser、D-Asp、D-Ala および D-Glu が検出された。また、これらの D-アミノ酸含量が成長に伴って増加していることが明らかになった。一方、DAO、DDO-1、DDO-2 または DDO-3 遺伝子に欠失のある変異株体内の D-アミノ酸を定量したところ、DDO-2 変異株では野生株との違いは認められなかったが、DAO、DDO-1 および DDO-3 変異株では、それぞれ D-Ala、D-Asp および D-Glu の量が野生株と比較して有意に増加していることが明らかになった。すなわち、線虫体内で、DAO が D-Ala を、DDO-1 が D-Asp を、DDO-3 が D-Glu をそれぞれ基質として分解していることが示唆された（DDO-1 の結果：下図参照）。



3) 各変異株と野生株の基礎的表現形質と行動の解析

解析結果は以下の通りであった。

- ① DDO-3 変異株は成長速度が遅れており、結果として寿命の延長が生じていた。
- ② 25°C の培養においてすべての変異株で産卵数と孵化率の低下が認められ、その原因として、DAO および DDO-3 変異株では卵子の数の減少、DDO-1 および DDO-2 変異株では卵子の数と質の低下が示唆された。さらに野生株との交配実験で、DDO-1-3 の変異株から卵子が提供された場合に孵化率が低下したことから、DDO-1-3 が卵子を提供する母体、あるいは卵子で発現していることが重要であると考えられた。一方、DAO 変異株と野生株との交配実験では孵化率に影響が見られなかったことから、DAO は受精後の胚で発現していることが重要であると考えられた。
- ③ DDO-1 変異株では排泄の周期が有意に延長していた。また、一定時間あたりに身体を屈曲させる回数（運動量）は、DDO-3 変異株で有意に上昇していたことから、神経伝達に影響が生じていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 10 件）

- ① M. Katane, M. Sekine and H. Homma: Assay of amino acid racemases: *Methods in Mol Biol.* 査読有、**794**, 2012, 367-379
- ② M. Katane, Y. Saitoh, K. Maeda, T. Hanai, M. Sekine, T. Furuchi, and H. Homma: Role of the active site residues arginine-216 and arginine-237 in the substrate specificity of mammalian D-aspartate oxidase: *Amino Acids*, 査読有、**40**, 2011, 467-476
- ③ T. Yokoyama, M. Amano, M. Sekine, H.

- Homma, M. Tokuda and M. Sato:
Immunohistochemical localization of endogenous D-aspartate in the marine brown alga *Sargassum fusiforme* *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有、 **75**, 2011, 1481-1484
- ④ M. Katane and H. Homma: D-Aspartate - an important bioactive substance in mammals: a review from an analytical and biological point of view: *J. Chromatogr. B*, 査読有、 **879**, 2011, 3108-3121
- ⑤ T. Miyamoto, M. Sekine, T. Ogawa, M. Hidaka, H. Homma and H. Masaki: Detection of D-amino acids in purified proteins synthesized in *Escherichia coli*: *Amino Acids*, 査読有、 **38**, 2010, 1377-1385
- ⑥ M. Katane, Y. Saitoh, Y. Seida, M. Sekine, T. Furuchi, and H. Homma: Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*: *Chem. Biodivers.*, 査読有、 **7**, 2010, 1424-1434
- ⑦ M. Katane, Y. Saitoh, T. Hanai, M. Sekine, T. Furuchi, N. Koyama, I. Nakagome, H. Tomoda, S. Hirono and H. Homma: Thiolactomycin inhibits D-aspartate oxidase: a novel approach to probing the active site environment: *Biochimie*, 査読有、 **92**, 2010, 1371-1378
- ⑧ M. Katane, H. Homma: D-Aspartate oxidase: the sole catabolic enzyme acting on free D-aspartate in mammals: *Chem. Biodivers.*, 査読有、 **7**, 2010, 1435-1449
- ⑨ T. Miyamoto, M. Sekine, T. Ogawa, M. Hidaka, H. Homma and H. Masaki: Generation of enantiomeric amino acids during acid hydrolysis of peptides detected by the liquid chromatography / tandem mass spectroscopy: *Chem. Biodivers.*, 査読有、 **7**, 2010, 1644-1650
- ⑩ T. Furuchi, T. Suzuki, M. Sekine, M. Katane and H. Homma: Apoptotic inducers activate the release of D-aspartate through a hypotonic stimulus-triggered mechanism in PC12 cells: *Arch. Biochem. Biophys.*, 査読有、 **490**, 2009, 118-128
- [学会発表] (計41件)
- ① 片根真澄ら、*in silico* スクリーニングに

- 基づく D-アミノ酸オキシダーゼ新規阻害剤の同定と機能解析 日本薬学会第132年会 2012. 3.30、札幌
- ② 齋藤康昭ら、線虫 D-アミノ酸代謝酵素の生殖における役割 日本薬学会第132年会 2012. 3.30、札幌
- ③ 野沢岳史ら、シロイヌナズナにおける D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの発現部位の解析 日本薬学会第132年会 2012. 3. 29、札幌
- ④ 古地壯光、本間 浩 Protein L-isoaspartyl / D-aspartyl-O-methyltransferase (PIMT) の転写調節機構の解析 第84回日本生化学会大会 シンポジウム「D-アミノ酸の生化学 -飛躍する新領域-」 2011.9.24、京都
- ⑤野沢岳史ら、D-アスパラギン酸存在下におけるシロイヌナズナの生育と代謝関連遺伝子の発現解析 第84回日本生化学会大会 2011. 9.23、京都
- ⑥ 前田和洋ら、哺乳類細胞内のD-アスパラギン酸含量とD-アスパラギン酸代謝酵素 第84回日本生化学会大会 2011. 9.23、京都
- ⑦ 立石 秀樹ら、異性化タンパク質修復酵素 PIMT の転写因子の同定 第7回D-アミノ酸研究会学術講演会 2011. 9.9、東京
- ⑧ 齋藤康昭ら、線虫 *Caenorhabditis elegans* のセロトニン合成におけるD-アスパラギン酸オキシダーゼの関与 第7回D-アミノ酸研究会学術講演会 2011. 9.9、東京
- ⑨ T. Furuchi et al. Identification of the transcription factor(s) responsible for Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) gene expression 23rd Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the European Society for Neurochemistry (ESN) 2011. 8. 29、アテネ、ギリシャ
- ⑩ 野沢岳史ら、D-アスパラギン酸によるシロイヌナズナの生育阻害と代謝関連遺伝子 *GEK1* 日本薬学会第131年会 2011. 3.30、静岡
- ⑪ 宮本 哲也ら、ペプチド加水分解反応における異性化の検証 日本農芸化学会

- 2011年度大会 2011. 3. 26、京都
- ⑫ 野沢岳史ら、シロイヌナズナにおける D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の発現解析 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) 2010. 12.7、神戸
- ⑬ M. Katane et al. Identification and functional characterization of thiolactomycin as a novel D-aspartate oxidase inhibitor of microbial origin 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010. 12.7、神戸
- ⑭ Y. Saitoh et al. Involvement of D-amino acid degradative enzymes in cholinergic signaling in nematode *Caenorhabditis elegans* 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010. 12.7、神戸
- ⑮ 伊藤耕平ら、Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) の転写調節に関わる因子の探索 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010. 12.7、神戸
- ⑯ 中込 泉ら、*In silico*創薬技術に基づく D-aspartate oxidase-thiolactomycin 複合体の構造解析 第38回構造活性相関シンポジウム 2010. 10. 30、徳島
- ⑰ 宮本 哲也ら、一般のタンパク質に D-アミノ酸が含まれないのはほんとうか? 第62回日本生物工学会大会 2010. 10.29、宮崎
- ⑱ T. Furuchi et al. Functional analysis of the protein L-isoaspartyl / D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) gene promoter OzBio2010 2010. 9. 27、Melbourne, Australia
- ⑲ M. Katane et al. Physiological significance of D-amino acid degradative enzymes in nematode *Caenorhabditis elegans* OzBio2010 2010. 9. 27、Melbourne, Australia
- ⑳ 宮本哲也ら、酸加水分解反応におけるジペプチド異性化の評価 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会 2010. 9.18、富山
- ㉑ 原田 怜ら、異性化タンパク質修復酵素 PIMT の転写調節因子の検索 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会 2010. 9.18、富山
- ㉒ 片根真澄ら、活性中心解析プローブとして有用な新規 D-アスパラギン酸オキシダーゼ阻害剤 thiolactomycin の同定と機能解析 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会 2010. 9.17、富山
- ㉓ 齋藤康昭ら、D-アミノ酸分解酵素遺伝子が欠失した線虫 *Caenorhabditis elegans* 変異株の解析 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会 2010. 9.17、富山
- ㉔ Y. Saitoh et al. Study on physiological functions of D-amino acid degradative enzymes in nematode *Caenorhabditis elegans* The 4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010. 7.12、Yoyogi, Tokyo
- ㉕ 片根真澄、齋藤康昭、花井俊彦、関根正恵、古地壯光、小山信裕、中込 泉、供田 洋、広野修一、本間 浩 新規D-アスパラギン酸オキシダーゼ阻害剤 thiolactomycin の同定と機能解析 日本薬学会第130年会 2010. 3.30、岡山
- ㉖ 関根正恵、野沢岳史、古地壯光、片根真澄、小林義典、本間 浩 モデル植物シロイヌナズナにおける D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの解析 日本薬学会第130年会 2010. 3.30、岡山
- ㉗ 宮本 哲也、関根 正恵、小川 哲弘、日高 真誠、渡邊 秀典、本間 浩、正木 春彦 精製タンパク質における D-アミノ酸残基の再現性ある検出と由来 日本農芸化学会 (東京) 2010. 3.29、東京
- ㉘ 原田 怜ら、Protein L-isoaspartyl / D-aspartyl-O-methyltransferase (PIMT) の転写活性化に必須な領域の同定 日本薬学会第130年会 2010. 3.28、岡山
- ㉙ 齋藤康昭ら、D-アミノ酸代謝酵素遺伝子を欠失した線虫 *Caenorhabditis elegans* 変異株の表現型に関する研究 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12.12、横浜
- ㉚ 中込 泉ら、ホモロジーモデリングとドッキング手法による thiolactomycin と D-aspartate oxidase の結合様式の推定 第37回構造活性相関シンポジウム 2009. 11.12、東京
- ㉛ 齋藤康昭ら、線虫 *Caenorhabditis elegans* における D-アミノ酸代謝酵素の生理機能の解明 第82回日本生化学会大会 2009. 10.23、神戸
- ㉜ 宮本哲也ら、大腸菌で生合成したタンパク質中に検出される D-アミノ酸残基の

検討 第82回日本生化学会大会 2009.
10.22、神戸

- ③③ 清水由香里ら、Protein L-isoaspartyl / D-aspartyl methyltransferase (PIMT) プロモーターの転写制御に関わる転写因子の探索 第53回日本薬学会関東支部大会 2009. 10.3. 坂戸、埼玉
- ③④ T. Furuchi et al.: Simple high - performance liquid chromatography - fluorescence detection method to measure protein L-isoaspartyl / D-aspartyl O-methyltransferase activity in cell lysates 21th IUBMB and 12th FAOBMB International congress of biochemistry and molecular biology 2009. 8. 3-4. Shanghai, China
- ③⑤ M. Katane et al. Thiolactomycin as a novel inhibitor of D-aspartate oxidase and D-amino acid oxidase 21th IUBMB and 12th FAOBMB International congress of biochemistry and molecular biology 2009. 8. 3-4. Shanghai, China
- ③⑥ T. Furuchi et al.: Analysis of mechanisms of EDF-triggered hyperactivation of ERK in L-isoaspartyl / D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT)-knockdown cells The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo
- ③⑦ T. Miyamoto et al.: Evaluation of D-amino acid content in purified proteins produced by *Escherichia coli* The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo
- ③⑧ M. Sekine et al.: D-Amino acids in *Arabidopsis thaliana* The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo
- ③⑨ Y. Saitoh et al.: Molecular characterization and tissue localization of nematode D-amino acid degradative enzymes The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo
- ④⑩ Masumi Katane, Toshihiko Hanai, Masae Sekine, Takemitsu Furuchi, Hiroshi Homma Site-directed mutagenesis study on the active site residues of mouse D-aspartate oxidase The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo

- ④⑪ Y. Shimizu et al.: Characterization of the promoter region of the protein L-isoaspartyl / D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) gene The first international conference of D-amino acid research 2009. 7. 2, Awaji, Hyogo

[図書] (計1件)

H. Homma et al. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, D-Amino Acids in Chemistry, Life Sciences, and Biotechnology, 2010, 377

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計1件)

名称：「D-アスパラギン酸オキシダーゼおよび D-アミノ酸オキシダーゼに対する新規阻害剤」
発明者：本間 浩、片根 真澄、供田 洋、小山 信裕
権利者：学校法人 北里研究所
種類：特許
番号：第 4462382 号
取得年月日：平成22年2月26日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 浩 (HOMMA HIROSHI)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号：50190278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし