

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22380058

研究課題名（和文）

真核生物におけるD-アミノ酸バイオシステムの機能と制御

研究課題名（英文）Function and regulation of D-amino acid biosystem in eukaryote

研究代表者

吉村 徹 (YOSHIMURA TOHRU)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70182821

研究成果の概要（和文）：

本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼおよび、細胞性粘菌、*Dictyostelium discoidium* のセリンラセマーゼの反応機構について検討し、前者についてはその亜鉛の役割、後者については二塩基機構による反応機序を明らかにした。また哺乳動物におけるD-アスパラギン酸の生理機能を明らかにすることを目的に、アスパラギン酸ラセマーゼの可能性が指摘されているマウスの GOT1L1 遺伝子のクローニングと同タンパク質の取得を試みた。一方D-アミノ酸と発生の関係を明らかにするため、単細胞から多細胞へと生活環を変化させる細胞性粘菌、*Dictyostelium discoidium* をとりあげ、同菌においてD-セリン分解にかかわるD-セリンデヒドラターゼの遺伝子破壊を行った。その結果、多細胞期の変異型粘菌体内にD-セリンが蓄積するとともに、胞子形成にかかわる細胞分化に関して異常が起こる事が認められた。本研究ではさらに、生体内D-セリンを分解するためのツールを構築する目的で、酵母のD-セリンデヒドラターゼのポリエチレングリコール修飾を行い、免疫原性が低減した酵素を得る事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In these studies, we examined the role of zinc in the D-serine dehydratase of *Saccharomyces cerevisiae*. We also studied the reaction mechanism of serine racemase of a slime cellular mold, *Dictyostelium discoidium*, and found that the enzyme reaction proceeds through the two-base mechanism with Lys56 and Ser81. In order to clarify the role of D-aspartate in mammals, we cloned the gene of mouse GOT1L1, which was suggested to be an aspartate racemase, and attempted to purify the protein. We also studied the D-serine metabolism in *D. discoidium* to understand the role of D-serine in development. We constructed the mutant *D. discoidium* cells lacking D-serine dehydratase, which is responsible for the D-serine degradation. The mutant cells contained D-serine at their multicellular stage and showed the defects in fruiting body formation. We also constructed the polyethylene glycol-modified D-serine dehydratase, which can be a tool for the *in vivo* D-serine degradation. The modified enzyme exhibited a decreased immunogenicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野： 生物化学

科研費の分科・細目： 農芸化学・応用生物化学

キーワード： D-アミノ酸、D-セリン、D-アスパラギン酸、*Dictyostelium discoideum*、D-セリンデヒドラターゼ、セリンラセマーゼ

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は原核生物にのみ存在すると考えられていたが、実際には真核生物にも存在し、多様な生理機能を有している。例えば、D-Ser は哺乳動物脳内に存在し、記憶・学習など脳の高次機能に関わる N-メチル D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターのコアゴニストとして、L-グルタミン酸と協同して同レセプターを活性化する。それゆえ脳内 D-Ser の動態は様々な神経疾患と関わっており、統合失調症の患者では脳脊髄液中の D-Ser 含量の低下が、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者では D-Ser 濃度の上昇が報告されている。D-Ser 濃度の減少や過剰は、それぞれ NMDA レセプター機能の低下や異常亢進を引き起こし、脳の高次機能低下や神経細胞の壊死をもたらすと予想される。一方、正常なマウスでは、D-Ser の投与が記憶の増強に働くことが報告されている。D-Ser はまた、動物組織の発達や節足動物の変態などに応じて一過的な増減を示すことから、発生・分化にもかかわると推測される。

D-Asp はプロラクチンなど脳ホルモンの分泌制御に関係する他、テストステロンの合成を促進する。最近、ヒトの精子や卵巣に D-Asp が存在し、その濃度が体外受精における卵子の受精率や精子の運動性と相関すること、D-Asp の経口投与が精子の運動性を高めることなどが報告された。さらに、D-Asp が細胞の抗酸化性を増大させ、皮膚の老化予防に働くことも示唆された。

以上のように D-アミノ酸には様々な機能が示唆されており、学会のみならず産業界からも注目され始めている。しかし分子レベルで説明可能なものは D-Ser の一部の機能に限られ、D-Asp に関してはその生合成機構も十分には解明されていない。その生理的役割を考えると D-アミノ酸機能の詳細な解析は、基礎・応用の両面において今後大きな展開をもたらす可能性がある。我々は真核生物の D-アミノ酸代謝について研究を行い、これまでにカイコに動物では最初の D-アミノ酸生合成酵素となるセリンラセマーゼを見いだした他、真核細胞型セリンラセマーゼの酵素学、酵母の新奇 D-セリンデヒドラターゼの発見と解析などの成果を挙げて来た。一方、細胞性粘菌を系とした D-Ser と発生に関する研究、発酵食品における D-アミノ酸の生成機構などの研究にも取り組んで来た。

2. 研究の目的

本研究では、D-アミノ酸研究の基盤をなすその代謝関連酵素の解析を行うとともに、D-Ser の酵素定量法などこれまでの研究で構築した独自のツールを駆使し、発生・生殖との関連、細胞への抗酸化性の付与など D-アミノ酸に示唆される様々な機能の分子機構の解明に挑んだ。具体的には、1) 真核細胞型セリンラセマーゼの構造機能相関の解明、2) 真核細胞型 D-セリンデヒドラターゼの酵素化学的解析、3) 哺乳動物における D-アスパラギン酸生合成機構の解明、4) 細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* を用いた D-セリンの発生・分化における役割の解明、5) 動物体内での D-セリン分解ツールとしてのポリエチレングリコール (PEG) 修飾 D-セリンデヒドラターゼの作成 を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 真核細胞型セリンラセマーゼの構造機能相関の解明については、本酵素活性に対するカチオンの活性化効果、および本酵素反応が単塩基機構で進行するか二塩基機構で進行するかといった課題について、ヒト酵素と 46%の一次構造上の相同性を有する細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* のセリンラセマーゼの活性中心近傍残基の部位特異的変異や分光学的手法によって解析した。

(2) 真核細胞型 D-セリンデヒドラターゼの酵素化学的解析については、本酵素の活性中心に存在する亜鉛の役割を明らかにするため、EDTA 処理あるいは Cys400 の変異により亜鉛を除去した酵素の性質を検討するとともに、D-トレオニンの α -水素引き抜きと、 β -水酸基の脱離反応の速度を比較した。

(3) 哺乳動物における D-アスパラギン酸生合成機構の解明については、D-アスパラギン酸生合成酵素として報告されたマウスの GOT1L1 の酵素学的研究を行うため、*E. coli* と昆虫培養細胞を宿主に、同酵素の発現系の構築を行った。

(4) 細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* を用いた D-セリンの発生・分化における役割の解明では、*D. discoideum* において D-セリン分解を担う D-セリンデヒドラターゼ遺伝子のノックアウトを行い、そのフェノタイプを解析した。

(5) 動物体内での D-セリン分解ツールとしての PEG 修飾 D-セリンデヒドラターゼの作成では、出芽酵母の同酵素を PEG の N-hydroxysuccinimide-活性化エステルであ

る SUNBRIGHT ME-050AS (NOF Corporation) を用いて PEG 化した。PEG 化酵素の免疫源性については BALB/c マウス (雌) と 6 週齢の ICR マウス (雌) の腹腔内へ PEG 化酵素を 2、7、12、17、22 日目に注射、7、14、21、28、35、44 日目に採血、血中の抗体力価を、ペルキシダーゼ標識した抗マウス IgG ヤギ抗体を用いて ELISA アッセイにて評価した。

4. 研究成果

(1) 真核細胞型セリンラセマーゼの構造機能 相関の解明については以下の成果を得た。多くの真核細胞型セリンラセマーゼはカルシウム、マグネシウムなどの二価カチオンおよび、MgATP による活性化を受ける。*S. pombe* 酵素の結晶構造ではマグネシウムが Glu208、Gly212、Asp214 に配位しており、MgATP はサブユニット間のこれとは異なる部位に結合する。両残基は真核細胞型セリンラセマーゼに広く保存されている。*D. discoideum* 酵素はこれら二価カチオンの他、 Na^+ によっても活性化される。同酵素の L-セリンデヒドラーゼ活性の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 値は、それぞれ 1 mM MgCl_2 、20 mM NaCl 、1 mM MgATP によって、2.6、10.6、42 倍に上昇した。 Na^+ によって最大限活性化された場合の活性は、 Mg^{2+} によって同じく活性化された酵素の 2-3 倍に達した。一方、最大活性の半分の活性化をもたらすのに必要な Na^+ 濃度は Mg^{2+} の 1000 倍の 2.2 mM であった。同酵素の二価カチオン結合部位である Glu207 と Asp213 をアラニンに置換しても酵素活性が残存することから、二価カチオンは真核細胞型セリンラセマーゼの反応に必ずしも必須ではないものと考えられた。またこれらの変異によって Na^+ による活性化効果も消失したことから、 Na^+ と Mg^{2+} の結合部位は同一であると推測された。なお Na^+ と Mg^{2+} の添加は L-セリンに対する K_{m} 値には影響しないが、MgATP を加えると K_{m} 値は 1/8 程度に低下した。さらに MgATP を添加した場合のみトリプトファンに由来する蛍光スペクトルの変化が見えたことから、MgATP の添加は酵素のコンフォメーション変化をもたらすことが予想された。

アミノ酸ラセマーゼが触媒する基質の立体化学的反転は、基質から α -水素が引き抜かれ生成したアニオン性中間体に対して、水素引き抜きとは逆の面上でプロトンが付加することにより起こる。アミノ酸ラセマーゼ反応については、この α -水素の引き抜きと中間体へのプロトン付加を、D-、L-両基質について同一の酵素残基が触媒しているのか (単塩基機構)、あるいはそれぞれの基質に対して別の残基が行うのか (二塩基機構) の議論がなされてきた。我々は以前、好熱菌、*Geobacillus stearothermophilus* のアラニンラセマーゼを取り上げこの機構の研究を

行い、アラニンラセマーゼでは PLP とシッフ塩基を介して結合している Lys39 と、PLP をはさんで Lys39 の反対側に位置する Tyr265' がそれぞれ D-および L-アラニンの α -水素授受に関わる触媒基であることを明らかにした。そこでアラニンラセマーゼとは進化的に異なる真核細胞型セリンラセマーゼの反応も同様な機構で進行するかどうかを検証した。基質アナログを結合した *S. pombe* セリンラセマーゼの結晶構造解析の結果では PLP の *si* 面上に位置する PLP 結合リジン残基 (Lys57) に対して、PLP の *re* 面上には Ser82 が対峙しており、両残基は基質 α -炭素からそれぞれ 3.3 および 3.0 Å の位置にある。そこで粘菌酵素においてこれらの残基に相当する Lys56 と Ser81、および立体構造から基質カルボキシル基の結合部位と予想される Ser80 など活性中心近傍のいくつかの残基について部位特異的変異を試みた。その結果、Ser80 をアラニン残基に改変した S80A は、D-、L-セリンのラセミ化活性もデヒドラーゼ活性もほぼ完全に消失した。しかし S80C ではいずれの活性も維持されており、Ser80 は予想通り基質カルボキシル基の結合部位であるものと考えられた。K56A ではすべての活性が消失する一方、S81A ではラセミ化活性が消失したものの L-セリンデヒドラーゼ活性は 96% 残存、D-セリンデヒドラーゼ活性は 3% 残存との結果となった。以上の結果から、我々は真核細胞型セリンラセマーゼの反応は、L-セリンの α -水素の授受を行う Lys56 と D-セリンの α -水素の授受を行う Ser81 の二塩基機構で進行するものと結論した。ラセミ化反応では D-、L-両基質の α -水素の授受を行う残基が必要であるため、触媒基の一方を欠失すれば反応は進行しない。一方、デヒドラーゼ反応は D-、L-各基質それぞれの α -水素引き抜きを触媒する残基がどちらか片方あれば、当該の基質については反応が進行するものと考えられる。S81A でラセミ化活性が消失し D-セリンデヒドラーゼ活性が大幅に減少したものの L-セリンデヒドラーゼ活性が維持されたことは、Ser81 が D-セリンの α -水素授受を行う触媒基であることを示している。なお S81A が示した野生型酵素の 3% 程度 D-セリンデヒドラーゼ活性については、水分子が D-セリンの α -水素引き抜きを触媒した結果生じたものと結論された。ところで Lys56 が L-セリンの α -水素授受を行う触媒基であるとすれば、K56A が D-セリンデヒドラーゼ活性を保持する可能性が考えられるが、実際にはこれを含むすべての活性を消失した。Lys56 は PLP 結合リジン残基であるため、基質結合と生成物の放出の際に起こるアルジミン転移反応に関わっている。当初、K56A がすべての活性を消失したのはアルジミン転移反応の欠失によるものと考えた。しかし蛍

光スペクトルの変化から K56A と D-セリンをインキュベートした場合の分子外シッフ塩基の形成が認められたことから、少なくとも D-セリンが結合する際のアルジミン転移反応は進行することが分かった。そこで分子外シッフ塩基形成の次の段階である D-セリンからの α -水素引き抜きが起るかどうかを K56A と D-セリンを重水中で反応させることにより検討した。その結果 α -水素と重水素との交換は認められなかった。これは D-セリンからの α -水素引き抜きが起らないか、起ったとしても溶媒中の重水素と交換することなく極めて短時間に Ca に再付加されると解釈される。もし前者が正しいのであれば、D-セリンの α -水素引き抜きがヒドロキシル基の脱離と協奏的に起る機構が考えられる。すなわち Ser81 が D-セリンの α -水素引き抜きを触媒し、引き抜かれたプロトンが Lys56 を経由してセリンの β -位のヒドロキシル基に渡される。その結果ヒドロキシル基は水として脱離するというものである。ただし K56A が D-セリンデヒドラーゼ反応を触媒しない理由として、セリンラセマーゼは D-セリンのデヒドラーゼ活性もたず、D-セリンはラセミ化反応によって L-セリンに転換された後デヒドラーゼ反応を受けるとする場合も考えられる。今後の検討課題である。

(2) 真核細胞型 D-セリンデヒドラーゼの酵素化学的解析については、重水中での D-トレオニンの α -水素の引き抜きと、その後起こるヒドロキシル基脱離の速度を $^1\text{H-NMR}$ を用いて分別測定した。Zn $^{2+}$ 結合型酵素の α -水素の引き抜き速度は 9.7s^{-1} 、ヒドロキシル基の脱離速度は 8.5s^{-1} で両者の間に大きな差は認められなかった。EDTA 処理により Zn $^{2+}$ を除去したアポ酵素では、両活性ともに検出できなかった。以上の結果から本酵素では α -水素の引き抜きとヒドロキシル基の脱離が共役して起こるものと推定した。

(3) 哺乳動物における D-アスパラギン酸生合成機構の解明については、以下の結果を得た。

哺乳動物において D-Asp の生合成を担うアスパラギン酸ラセマーゼとして報告された、アスパラギン酸トランスアミナーゼのホモログ、mGOT1L1 の酵素学的解析を行うため、同酵素遺伝子を大腸菌にクローニングし、タンパク質の発現を試みた。リコンビナントタンパク質の可溶性を向上させる Nus-tag 付加 mGOT1L1 を以下の方法によって発現させた。まずマウス GOT1L1cDNA を含む EST クローンより、cDNA 領域全長に 6xHis タグ配列を付加した mGOT1L1 を PCR によって増幅し、pET44b ベクターに組み込んだ。得られたプラスミド

を Rossetta 2 (DE3) 株に導入し、0.1 mM IPTG, 22°C で発現誘導した。集菌後、菌体を超音波破碎し、その上清画分を Ni キレートカラムへ供した。その後、カラムに吸着したタンパク質は 0.5 M イミダゾールを含む緩衝液で溶出した。SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング解析の結果、極少量の Nus-mGOT1L1-His 精製タンパク質を確認した。

得られた融合タンパク質の酵素活性 (ラセミ化活性およびトランスアミナーゼ活性) を検討するため、同画分を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 μM PLP、10 mM L-Asp、溶液と混合し、37°C で 13 h インキュベートした後、HPLC によって生成アミノ酸を解析した。得られた融合タンパク質の酵素活性 (ラセミ化活性およびトランスアミナーゼ活性) の有無を方法の項に示した反応組成を用いて検討したが、 α -ketoglutarate を加えた場合に痕跡量の L-Glu の生成が認められたのに対して、D-Asp のシグナルは得られなかった。すなわち、得られた画分は微弱なアスパラギン酸トランスアミナーゼ活性を示すもののラセミ化活性は持たないとの結果となった。しかし、本法で得られた酵素量は極めて少なく、また *E. coli* がアスパラギン酸トランスアミナーゼを有しているため、得られたトランスアミナーゼ活性も微量の *E. coli* の酵素の混入による可能性が高かった。そこで昆虫培養細胞を用いてより多量の酵素の調整を目指した。

昆虫細胞を用いた mGOT1L1 発現系では、mGOT1L1 の C 末端に 6xHis タグを付加、または不付加の形として発現させた。目的の DNA フラグメントを結合したプラスミド、pFASTBac $^{\text{TM}}$ で、DH10Bac $^{\text{TM}}$ を形質転換した。Tn7 部位特異的トランスポジションによって pFastBac $^{\text{TM}}$ 内 mGOT1L1 が転移された bacmid DNA を Sf-9 細胞へと導入し、組み替えバキュロウイルスストック (P1) を得た。この P1 ウイルスを Sf-9 細胞へ感染させ、P2 ウイルスを所得するとともに、タンパク質の発現確認を行った。組み替えバキュロウイルス (P2) の感染後の Sf-9 細胞を破碎し、その上清と沈殿画分を SDS-PAGE 解析に供した。しかしながら、目的タンパク質と思われる明瞭なタンパク質バンドは確認できなかった。一方で、同サンプルを用いて、抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、可溶画分に His タグが付加された mGOT1L1 の発現を確認した。同様に、P2 ウイルスを感染させた Sf-9 細胞を破碎し、Ni キレートカラムを用いて、精製酵素の所得を試みた。その結果、微量ではあるが、可溶画分に精製 mGOT1L1-His タンパク質を確認したが、その酵素活性は検出できず、GOT1L1 がアスパラギン酸ラセマーゼであるという報告の再現性は得られなかった。

(4) 細胞性粘菌、Dictyostelium discoideum を用いた D-セリンの発生・分化における役割の解明では、以下の結果を得た。

D. discoideum は、通常バクテリアを捕食して単細胞のアメーバの状態ですべて分裂・増殖を行うが、飢餓状態に陥ると細胞同士の放出するシグナルの濃度勾配によって集まり、子実体形成を行う多細胞体を形成する。このような生活環から *D. discoideum* は発達・分化のモデル生物として広く研究されている。一方、*D. discoideum* は NMDA レセプターを持たない真核生物であるが、3 種類の D-セリン代謝関連酵素、セリンラセマーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、D-セリンデヒドラターゼの各ホモログを有しており、D-セリンの意義を研究する上で良い系である。*D. discoideum* のこれら 3 種の酵素の D-セリン分解に関する k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$) 値は、セリンラセマーゼで 0.045、D-アミノ酸オキシダーゼで 0.008、D-セリンデヒドラターゼでは 13.89 であり、3 種の酵素のうち主に D-セリンデヒドラターゼが D-セリン分解を担うことが示唆された。そこで、相同組み替えによって D-セリンデヒドラターゼ遺伝子を破壊した欠損株 (Δdsd) を作製した。ペプトン、yeast extract、glucose を主成分とする HL5 培地に培養した欠損株を飢餓誘導によって多細胞期に誘導し、野生株 (WT) との比較を行った。WT では飢餓誘導後集合が開始され、約 12 時間で mound、約 16 時間後には slug とよばれる構造体を形成する。slug 形成後は culmination とよばれる段階を経由し、約 24 時間で子実体を形成する。 Δdsd の発達の過程を観察したところ、 Δdsd では WT と比較して集合の開始に約 2 時間の遅延が生じた。mound は約 14 時間で形成され、飢餓誘導開始約 18 時間後に slug が観察された。WT の子実体形成は約 24 時間で完了する一方、 Δdsd では 24 時間経過後も slug や culmination にある細胞が多く見られた。40 時間後には Δdsd においてわずかながらの子実体形成が観察された。しかしながら Δdsd の子実体数は極めて少なく (子実体形成率は WT の 5.88%)、その大部分は slug や culmination で発達が停止していた。またわずかに形成された子実体を観察すると、 Δdsd の子実体は柄が短い傾向にあった。以上のように Δdsd は発達遅延、子実体形態異常、子実体形成率 (孢子形成能) の低下を示した。*D. discoideum* に関する情報をまとめた Dictybase には、各遺伝子の発達の各段階における発現状況が示されている。これによれば D-セリンデヒドラターゼの発現量は飢餓誘導開始から 4 時間後に一度高くなり、12 時間後に最大になる。この発現のピークと Δdsd の発達の停滞がみられる mound、slug の形成期はほぼ一致する。またこの時期の菌体を分析した結果では、 Δdsd において WT では見ら

れない D-セリンの蓄積が認められた。発生が正常に行われるためには、D-セリンは slug 形成後までに DSD によって除去されていなければいけないことが示唆された。

細胞性粘菌は自然界ではバクテリアを捕食し増殖する。実験室においてバクテリアを餌にした培養法を、前述のような単独培養に対して二員培養と呼ぶ。*Klebsiella* を播種した 5LP 培地に細胞性粘菌をスポットし、その増殖速度をブランク半径の増加速度から判定した。この条件下では Δdsd が WT に比べ大きなブランク半径の増加速度を示し、二員培養の単細胞期においては Δdsd が WT と比べてより大きな増殖速度を示すと推測された。一方、 Δdsd は WT と比べて多細胞体の発達に顕著な遅延を示した。WT では培養日数 2 日目にはすでに多細胞体の形成が確認されたが、培養日数 2 日目の Δdsd の多細胞体数は WT に比べ顕著に少なかった。ただし WT、 Δdsd ともに子実体を形成した培養日数 4 日目では、両者の子実体形成数に大きな違いはないように見受けられた。しかし形成された子実体を観察すると、その柄が WT に比べ比較的短い傾向にあり、単独培養で観察された Δdsd の子実体の形態と同様であった。以上の結果から、 Δdsd は二員培養においても多細胞期の発達に遅延を示すことが認められた。しかしながら、単独培養の後飢餓誘導した際の Δdsd が示す slug や culmination 段階での発達の停止や、子実体形成率の顕著な低下は二員培養においては認められなかった。

(5) 動物体内での D-セリン分解ツールとしての PEG 修飾 D-セリンデヒドラターゼの作成では以下の結果を得た。

D-セリンデヒドラターゼと *N*-hydroxysuccinimide-活性化 PEG をそのまま反応させた場合には修飾は進行しなかったが、DMSO を加えた系、すなわち 20 μM D-セリンデヒドラターゼ、25% dimethylsulfoxide (DMSO) および 1 mM SUNBRIGHT ME-050AS をリン酸緩衝液 (10mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl および 140 mM NaCl (pH 7.4)) 中で 30°C 1 h 反応させることで PEG 修飾が進行した。DMSO および未反応の PEG 化試薬は Amicon Ultra15 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) にて洗浄して取り除いた。PEG 化酵素の活性は未修飾の酵素と変わらず、基質特異性にも変化は見られなかった。PEG 化酵素で免疫したマウスの血中の抗体力価を、ペルキナーゼ標識した抗マウス IgG ヤギ抗体を用いて ELISA アッセイにて評価した結果、PEG 化酵素を注射したマウスでは、未修飾酵素および PEG 修飾酵素のいずれに対する抗体力価も、未修飾酵素で免疫した場合に比べ著しく低いこと

が判明した。

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) Ito T, Maekawa M, Hayashi S, Goto M, Hemmi H, Yoshimura T. (2013) Catalytic mechanism of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino Acids* 44, 1073-1084. (doi: 10.1007/s00726-012-1442-4) 査読有

(2) Ito T, Murase H, Maekawa M, Goto M, Hayashi S, Saito H, Maki M, Hemmi H, Yoshimura T (2012) Metal ion dependency of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. *Amino acids* 879, 3190-3195. (<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00726-012-1232-z>) 査読有

(3) Kato S, Hemmi H, Yoshimura T (2012) Lysine racemase from a lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*: Structural basis of substrate specificity. *J. Biochem.* 152, 505-508 (<http://jb.oxfordjournals.org/content/152/6/505.long>) 査読有

(4) Ito T, Koga K, Hemmi H, Yoshimura T. (2013) Role of Zinc Ion for Catalytic Activity in D-Serine Dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 279, 612-624

(doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08451.x.) 査読有

(5) Kato S, Kito Y, Hemmi H, Yoshimura T (2012) Simultaneous determination of D-amino acids by the coupling method of D-amino acid oxidase with high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. B* 879, 3190-3195

(doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.005.) 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) 吉村 徹, 加藤 志郎, 伊藤 智和, 邊見久 D-アミノ酸代謝関連酵素を用いた D-アミノ酸の定量と機能性評価, 第 64 回日本生物工学会シンポジウム, 2012 年 10 月 24 日, 神戸

(2) Yoshimura T, D-Amino acid as a novel biofactor, 103rd AOCS Annual meeting & Expo, 2012 年 5 月 1 日, Long Beach (USA)

(3) 吉村 徹, D-アミノ酸研究の展開と展望: 分布、機能、代謝、食品・医薬への応用へ, 日本農芸化学会 2012 年度大会ランチョーセミナー, 2012 年 3 月 25 日, 京都

(4) 吉村 徹, 真核生物の D-アミノ酸代謝関連酵素, 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム, 2011 年 9 月 24 日, 京都

(5) Tohru Yoshimura, Eukaryotic D-serine dehydratase and its application to D-serine assay, The 65th West Lake International Symposium of Zhejiang University, 2010 年 11 月 20 日, Zhejiang (China)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 徹 (Yoshimura Tohru)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 70182821

(2) 研究分担者

邊見 久 (Hemmi Hisashi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号: 60302189

(3) 連携研究者なし