

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880014

研究課題名（和文）真核生物におけるD型セリンの機能と代謝

研究課題名（英文）Functions and metabolism of D-serine in eukaryote

研究代表者

伊藤 智和 (ITO TOMOKAZU)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90584970

研究成果の概要（和文）：D型セリンの合成・分解を担う二酵素（細胞性粘菌セリンラセマーゼ、出芽酵母由来D-セリンデヒドラターゼ）の生化学的な解析を行った。細胞性粘菌由来セリンラセマーゼが、 Mg^{2+} や Ca^{2+} に加え、 Na^+ によっても活性化されることを見だし、 Na^+ による活性化効果が、二価金属への結合に起因することを明らかとした。

また、出芽酵母D-セリンデヒドラターゼが要求する Zn^{2+} の意義について検証した。 Zn^{2+} はD-セリンからの α プロトンおよびヒドロキシル基の脱離に必須であった。また、本酵素反応において、D-セリンからの α プロトンの引き抜きとヒドロキシル基の脱離が共役することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We examined the properties of the serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. The enzyme was found to be unique in its stimulation by Na^+ in addition to Mg^{2+} and Ca^{2+} , which are well-known activators for the mammalian serine racemase. Mutation of the divalent metal ion binding sites abolished both Mg^{2+} - and Na^+ -dependent stimulation, indicating that Mg^{2+} and Na^+ share the common metal ion-binding site. In addition, we studied the catalytic mechanism of D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. We found that the Zn^{2+} is indispensable for the abstraction of α -hydrogen as well as elimination of hydroxyl group from D-serine. We revealed that both α -hydrogen abstraction and hydroxyl group elimination from D-serine occurs in a concerted fashion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：D-セリン、D-アミノ酸、ピリドキサル5'リン酸

1. 研究開始当初の背景

D-セリンは哺乳動物脳内で NMDA レセプターのコアゴニストとして作用する他、さまざまな神経疾患や発生との関連などが示唆されているが、その生理機能の全貌はまだ明らかではない。また、哺乳類以外における

D-セリンの生理的役割は未知のまま残されている。本研究では、真核微生物 D-セリンの代謝関連酵素の解析や応用利用を通じて、哺乳類を含めた真核生物における D-セリンシステムの生理的役割の解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、D-セリンに高い特異性を示すD-セリン分解酵素(出芽酵母由来 D-セリンデヒドラターゼ)とD-セリン合成酵素(細胞性粘菌由来セリンラセマーゼ)に着目し、これら二酵素の酵素学的解析を行った。また、モデル生物として細胞性粘菌を選定し、細胞性粘菌における、上記D-セリン代謝酵素の機能解析を通じて真核生物におけるD-セリンシステムの全容解明に挑んだ。さらに、D-セリンデヒドラターゼを用い、D-セリンの高感度酵素定量法の開発し、D-セリンの臨床的な動態解析法の創出を目指した。

3. 研究の方法

(1) D-セリンデヒドラターゼの酵素学的解析

結晶構造解析と共に、本酵素が有するユニークなZn²⁺依存性に着目した解析を遂行した。野生型酵素、Zn²⁺除去酵素と共に、本酵素の補酵素であるPLP結合残基変異体(K57A)、Zn²⁺結合残基変異体(C400A)調整し、これら酵素のカイネティックパラメータを算出した。また上記酵素のUV-vis、蛍光スペクトル解析や、重水中におけるD-セリンの分解活性の経時的な解析によって、本酵素のZn²⁺の意義や、触媒機構を検証した。

(2) 細胞性粘菌セリンラセマーゼの触媒機構解析

本酵素が既報の二価金属イオンに加えてNa⁺によっても活性化される事を見出し、二価金属イオン結合部位の変異体(E207A、D213A)の作出と、変異体解析によってNa⁺やMg²⁺イオンによる活性調節機構を検証した。また、同酵素の反応機構解析の為に、活性部位に存在する極性残基の網羅的な変異体を作成した。

(3) 細胞性粘菌D-セリンデヒドラターゼの欠損株の作製

D-セリンデヒドラターゼ遺伝子をプラストサイジン耐性遺伝子に置換することでD-セリンデヒドラターゼ欠損株を作製し、この変異体の解析を行った。

(4) 出芽酵母D-セリンデヒドラターゼを用いた高感度D-セリン酵素定量法の構築

D-セリンデヒドラターゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、Amplex Redを用い、D-セリンのサブマイクロモル濃度の酵素定量法を構築した。

4. 研究成果

(1) D-セリンデヒドラターゼの酵素学的解析

D-セリンに高い特異性を示す出芽酵母由来D-セリンデヒドラターゼの結晶構造解析を試みた。タンパク質結晶の析出条件等を検討し、ある条件で微結晶を得ることに成功し

た。2.4 オングストロームの分解能のデータを得た。しかしながら、結晶析出の再現性が不良でありこの点の改善が今後の課題として残された。

また、同酵素が有するユニークな亜鉛の依存性と意義について検討した。EDTA処理によって亜鉛を除去した酵素や亜鉛結合残基の変異株(H398A、C400A)ではD-セリンに対する触媒活性が完全に失われた。一方でこれらの酵素において、D-セリンのヒドロキシル基がC1に置換された合成基質であるβ-C1-D-アラニンに対する活性はほぼ完全に保持されていた。¹H-NMRを用い、Zn²⁺除去酵素やZn²⁺結合残基の変異体酵素のD-セリンからのαプロトン脱離速度とヒドロキシル基の脱離速度を分別測定した。結果、野生型酵素ではαプロトン脱離速度とヒドロキシル基の脱離速度がほぼ同等であること、また、Zn²⁺除去酵素とZn²⁺結合残基変異体ではヒドロキシル基の脱離能とともに、αプロトンの引き抜き能が完全に失われていることが明らかとなった(Fig. 1)。すなわち、本酵素において、Zn²⁺がD-セリンからのαプロトンの引き抜きとヒドロキシル基の脱離双方に要求されること、D-セリンからのαプロトンの引き抜きとヒドロキシル基の脱離が共役することが示された。

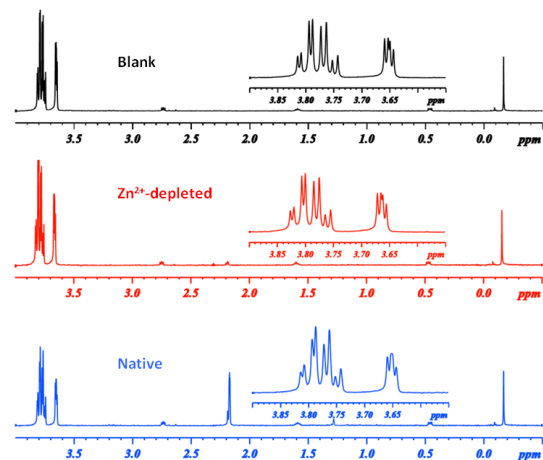


Fig.1 重水中におけるD-セリン分解活性とZn²⁺の影響

(2) 細胞性粘菌セリンラセマーゼの触媒機構解析

細胞性粘菌由来セリンラセマーゼの生化学的な解析を行った。解析の結果、同酵素は哺乳類セリンラセマーゼと一次構造上で約50%の相同性を有する一方で、哺乳類セリンラセマーゼには見られない性質を有していることが明らかとなった。すなわち、細胞性粘菌セリンラセマーゼは既報の二価金属イオン(Mg²⁺やCa²⁺)に加えてNa⁺によっても活性化される事を見出した(Fig. 2)。

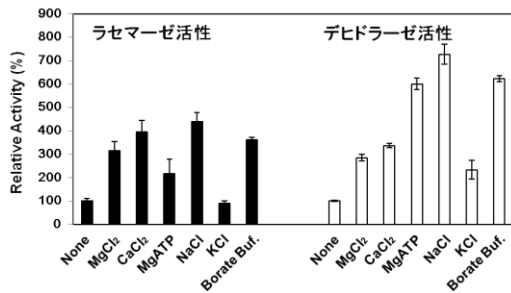


Fig. 2 細胞性粘菌セリンラセマーゼへの金属イオン、核酸の影響

本酵素が各金属イオンによって与えられる最大活性値の1/2の活性化に必要な金属イオン濃度を算出したところ、Mg²⁺、Ca²⁺のそれが1.2 μMであり、Na⁺では2.2mMであることが明らかとなった。二価金属イオンの結合残基として知られる E207、D213 のアラニン変異体を作製し、解析したところ、これら変異体において Na⁺による活性化が完全に消失していた (Fig. 3)。この結果から、Na⁺による本酵素の活性化が二価金属イオン結合サイトへの作用によって齎されることを明らかとなった。

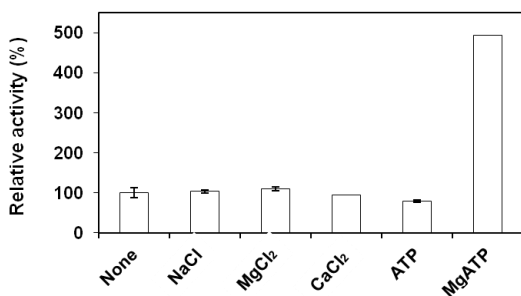


Fig. 3 細胞性粘菌セリンラセマーゼ E207A 変異体への金属イオンの影響

(3) 細胞性粘菌 D-セリンデヒドラターゼの欠損株の作製

細胞性粘菌における D-セリン合成酵素 (セリンラセマーゼ) および分解酵素 (D-セリンデヒドラターゼ) 破壊株作製用プラスミドベクターを構築し、D-セリンデヒドラターゼ破壊株を所得した。細胞性粘菌のゲノム中には哺乳類における D-セリン分解酵素と考えられる D-アミノ酸オキシダーゼが見いだされるが、野生型細胞性粘菌の無細胞抽出液には D-アミノ酸オキシダーゼ活性を見出すことができなかった。野生株で D-セリンは D-セリンデヒドラターゼによって分解され D-セリンデヒドラターゼ欠損株ではその活性が

完全に消失した。すなわち、細胞性粘菌で、D-セリン分解は哺乳類とは異なり、D-セリンデヒドラターゼによってなされることを見出した。

(4) 出芽酵母 D-セリンデヒドラターゼを用いた高感度 D-セリン酵素定量法の構築

出芽酵母 D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリンの高感度酵素定量法の開発を行った。試料溶液中に含まれる D-セリンを D-セリンデヒドラターゼ、ピルビン酸オキシダーゼ存在化でアセチルリン酸と過酸化水素へと変換させ、生じた過酸化水素をペルオキシダーゼ、蛍光色素である AmplexRed 共存下で定量する測定系を考案した。種々の測定条件を検討し、最終的に、サブマイクロモルオーダーの D-セリンの迅速定量が可能となった。本定量法は臨床的なスクリーニング等、多サンプルにおける D-セリン量の分析に有用と思われる。

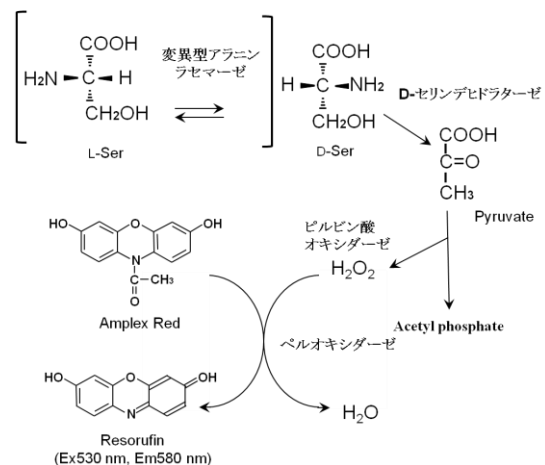


Fig. 4 D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリンの高感度酵素定量法

実際に、本定量法をウシ血清やマウス脳抽出液、各種食品サンプル中の D-セリンの定量に適用し、本定量法がこれら試料に適用可能であることが示された。今後は、臨床応用を目指したより簡便な前処理法や 96 穴プレートを用いたより簡便な定量法の確立を目指す必要がある。

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 5 件)

① Role of zinc ion for catalytic activity in D-serine dehydratase from

Saccharomyces cerevisiae. Ito T, Koga K, Hemmi H, Yoshimura T, FEBS J. 279, 612-24 (2012) [査読有]

② Metal ion dependency of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. Ito T, Murase H, Maekawa M, Goto M, Hayashi S, Saito H, Maki M, Hemmi H, Yoshimura T, Amino acids (2012) in press [査読有]

③ A highly sensitive enzymatic assay for D- and total serine detection using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. Naka T, Ito T, Hemmi H, Yoshimura T, J. Mol. Catal. B Enzymatic. 67, 150-154 (2011) [査読有]

④ ほ乳類のアスパラギン酸ラセマーゼ
伊藤智和、吉村徹 Vitamins 85, 661-662 (2011) [査読無]

⑤ 右手型アミノ酸の役割 伊藤智和 生
物工学会誌 88, 613 (2010) [査読無]

[学会発表] (計 12 件)

① 萩 泰典、伊藤智和、齊藤玉緒、邊見 久、
吉村 徹「細胞性粘菌における D-セリン代謝
関連酵素とその生理機能」(2012)日本農芸化
学会 2012 年度大会

② 萩 泰典、伊藤智和、齊藤玉緒、邊見 久、
吉村 徹「細胞性粘菌における D-セリンの生
理的役割の解明」(2011)第 84 回日本生化学
会大会

③ 飯盛淳平、伊藤智和、邊見久、吉村徹「新
奇ビタミン B6 タンパク質 YggS の機能解析：
E. coli における L-バリン合成制御」(2011)
第 84 回日本生化学会大会

④ 高田紘江、磯部恵子、伊藤智和、邊見久、
吉村徹「PEG 化 D-セリンデヒドラーゼの調
製と物性の解析」(2011)第 7 回 D-アミノ酸
研究会学術講演会

⑤ 飯盛淳平、伊藤智和、邊見久、吉村徹
「Characterization of YggS from
Escherichia coli: A unique PLP-dependent
protein involved in the refulation of
L-valine production」(2011)IUMS2011

⑥ 伊藤智和、高田紘江、磯部恵子、邊見久、
吉村徹「真核細胞型 D-セリンデヒドラーゼ
の神経疾患解析への応用」(2011)日本ビタ
ミン学会第 63 回大会

⑦ 吉村徹、白木俊介、奥田啓太、深田はる
み、後藤勝、伊藤智和、邊見久「ビタミン B
6 を要求する細菌の転写制御因子、GabR」
(2011)日本ビタミン学会第 63 回大会

⑧ 高田紘江、磯部恵子、伊藤智和、邊見久、
吉村徹「真核生物 D-セリンデヒドラーゼ：神
経疾患解析への応用」(2011)日本農芸化学
会 2011 年度大会

⑨ 伊藤智和、邊見久、吉村徹「真核生物型
D-セリンデヒドラーゼにおける亜鉛の意義」
(2011)日本農芸化学会 2011 年度大会

⑩ 前川元貴、伊藤智和、後藤勝、邊見久、
吉村徹「Catalytic mechanisms of serine
racemase from *Dictyostelium discoideum*」
(2010)日本生化学会大会 2010 年度大会

⑪ 伊藤智和、邊見久、吉村徹「真核生物型
D-セリンデヒドラーゼにおける亜鉛の意義」
(2010)酵素補酵素研究会

⑫ 吉村徹、前川元貴、邊見久、伊藤智和
「細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* の
真核細胞型セリンラセマーゼに対する金属
の影響」(2010)日本ビタミン学会第 62 回大
会

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~bmm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智和 (ITO TOMOKAZU)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：90584970