

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780098

研究課題名(和文) 真核生物におけるD型アミノ酸の機能と制御機構の解明

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：様々な神経疾患との関連が示唆され、ある種の神経疾患におけるマーカーとして利用できる可能性があるD-セリンの96ウェルプレートに対応した簡便・迅速な酵素定量キットを開発し、これを用いたヒト尿中D-Ser動態を解析した。また、セリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ両酵素の触媒機構を詳細に解析し、細胞性粘菌における両酵素の欠損株の作製とその解析を行った。哺乳類の推定D-Asp合成酵素(アスパラギン酸ラセマーゼ、Got111)の酵素学的解析、欠損マウスの解析を行い、同タンパク質が哺乳類におけるD-Aspの主要な合成酵素でない可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple and rapid D-serine enzymatic assay kit applicable to determine D-serine content in human urine. We studied the reaction mechanisms of two D-serine metabolic enzymes, serine racemase and Zn<sup>2+</sup>-dependent D-serine dehydratase. We characterized the enzymatic properties of putative D-aspartate biosynthetic enzyme in mammals, Got111, and analyzed the effects of knock-out of the Got111 on the D-aspartate production. The obtained results showed that the Got111 is not the major D-aspartate synthetic enzyme in mammals.

研究分野：生化学 酵素学

キーワード：D-アミノ酸 D-セリン D-アスパラギン酸 D-セリンデヒドラターゼ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトをはじめとした真核生物中で、様々な遊離型 D-アミノ酸が見いだされ、重要な生理作用を示すことが明らかとなりつつある。特に、D-Ser、D-Asp は哺乳類体内に著量存在し、神経伝達や内分泌系におけるメッセンジャーとしての機能が示唆されているが、その全貌は明らかではない。

### 2. 研究の目的

D-Ser 動態は様々な神経疾患との関連が示唆され、ある種の神経疾患におけるマーカーとして利用できる可能性がある。そこで、本研究では、D-Ser 酵素定量法の 96 ウェルプレート対応キットの開発と、これを用いた D-Ser 動態の解析を目的とした。また、D-Ser 代謝酵素である、セリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ両酵素の触媒機構および、これら酵素の真核微生物における生理的機能の解明を目指した。さらに、ほぼ未知のまま残される、哺乳類の推定 D-Asp 合成酵素 (アスパラギン酸ラセマーゼ、Got111) の酵素学的解析、欠損マウスの解析を目的とした。これら研究を通じ、D-Ser、D-Asp の合成およびその制御機構、生理機能の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (i) D-Ser 酵素定量法による D-Ser 動態解析

D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリン酵素定量法による臨床的な D-Ser 動態解析の第一段階として、96 穴プレートを用いたヒト尿中 D-Ser スクリーニングキットの構築を目指した。ヒト尿は生理的意義や由来の不明な D-Ser を数百  $\mu\text{M}$  オーダーで含んでいる。なお、LDH-coupling 法がヒト尿中の D-,L-Ser 定量に適用可能であることは既に示されている。健常者尿中 D/L-Ser 比および、クレアチニン値との比較解析による、D-Ser の動態解析を行った。

#### (ii) Dsd1p の触媒機構解析と真核微生物における D-Ser 代謝酵素の生理機能解析

出芽酵母 D-セリンデヒドラターゼ (Dsd1p) は数ある PLP 酵素の中で、Zn<sup>2+</sup>を要求する唯一の酵素であり、古くから E.coli などに知られるバクテリア型 D-セリンデヒドラターゼとは進化的、構造的に異なっている。出芽酵母 Dsd1p の活性中心は他の PLP 依存性酵素と比較し極めてユニークな特徴を有している。その 1 つは活性中心の Zn<sup>2+</sup>の存在であり、また、PLP のピリジン環窒素の相互作用残基が非酸性残基である点もユニークである。PLP 酵素において、ピリジン環窒素が酸性残基と相互作用することは PLP の「電子溜め」としての機能を増強し、中間体の安定化に極めて重要であると考えられている。そこで今回、Dsd1p における触媒機構の解明の一環として、同酵素のピリドキサールリン酸のピリジン環窒素 (N1) と相互作用するチロシン残

基 (Y203) に着目した変異体解析を行った。

また、Dsd1p ファミリータンパク質の生理機能解明を目的とし、形態形成や増殖、分化制御機構解析の為にモデル生物として用いられる細胞性粘菌を用い、その D-Ser 代謝関連酵素 (セリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ) の酵素学的解析や、これら酵素遺伝子の単一および多重変異株を作製し、その影響を解析した。

#### (iii) 哺乳類におけるアスパラギン酸ラセマーゼの機能解析

D-Asp は、神経内分泌および内分泌系に存在している。D-Asp の生理機能として、メラトニン、プロラクチン、バソプレシン等のホルモンの合成・分泌調節能が報告され、精巣では D-Asp が全アスパラギン酸量の 40% 近くに達し、テストステロン産生を促進する。また、D-Asp が配偶子形成やその機能発現に関与する可能性も示唆されている。D-Asp の生理作用は多岐にわたり、多くの報告があるが、その分子レベルでの作用機序はよくわかっていない。

本研究では、先頃、D-Asp 合成酵素 (アスパラギン酸ラセマーゼ) として同定が報告された Got111 タンパク質の酵素学的諸性質の解析、および、同ノックアウトマウスの組織中 D-Asp 量の定量を行った。

### 4. 研究成果

#### (i) D-Ser 酵素定量法による D-Ser 動態解析

96 穴プレートを用いた D-Ser 酵素定量キットの開発に成功した。本キットは数 10  $\mu\text{M}$  程度の D-Ser の迅速・安価な定量に効果的であり、特にヒト尿中 D-Ser の動態解析に有効である。なお、本キットは現在コスモバイオ社より入手可能である。本キットを用い、健常者から尿を採取し、尿中 D-セリンの日内変化および日間変化を検証した。その結果、尿中 D-Ser 濃度は尿の濃縮度合によって大きく変動するのに対し、D-Ser / 全 Ser (D-および L-Ser) 値、D-Ser / クレアチニン値は、各個人でほぼ一定の値をとる傾向があることが示唆された。マウスにおいて、腎障害と D-Ser 値との関連性が報告されており、ヒトにおける腎障害と D-Ser 動態の解析が次なる課題と考えている。

#### (ii) Dsd1p の触媒機構解析と真核微生物における D-Ser 代謝酵素の生理機能解析

前述したように Dsd1p の PLP ピリジン環窒素は Tyr 残基 (Y203、pKa ~10) と相互作用している。今回、Dsd1p の反応機構について、PLP ピリジン環窒素のプロトン化状態に着目して解析した。PLP のプロトン化状態を変化させる目的で、Y203F、Y203A、Y203S、Y203R、Y203D、Y203E を作成し、その影響を解析した。これらのうち、Y203F、Y203A、Y203S、Y203R 変異体は、WT とほぼ同程度の触媒活性を保持

した。このことは、Dsd1p の酵素反応にプロトン化されたピリジン環窒素が必須ではないことを意味する。一方、Y203D、Y203E 変異体では触媒活性が顕著に (~105 倍) 減少した。興味深いことに、Y203D では、野生型酵素ではほぼ観察されないカルボアニオン中間体の再プロトン化が主要な反応として観察された。以上の結果から、Dsd1p において PLP のピリジン環窒素は非プロトン化状態にあること、これに起因するカルボアニオン中間体の不安定化が逆反応の抑制に寄与している可能性を見出した。

細胞性粘菌は D-セリン合成酵素として SR、分解酵素として D-アミノ酸オキシダーゼ、D-セリンデヒドラターゼ (DSD) をコードしている。DSD 欠損株を作製し、解析した先行結果から、これが D-セリンの主要な分解酵素である可能性が示され、また、DSD 欠損株では、菌体内に D-セリンが蓄積するとともに多細胞期の発達が遅延すること、子実体形成率が顕著に低下すること、単細胞期の生育が顕著に阻害されることなどが見出された。この dsd に DSD を過剰発現させた相補株を作製し、DSD の欠損と表現型との相関を検証した。多細胞期に dsd 欠損株で見られた発達の遅延及び孢子形成率の低下は dsd の相補によって補われた。またこのフェノタイプの一要因として cAMP シグナル経路に関わる遺伝子 (acaA : アデニル酸シクラーゼ、carA : cAMP レセプター) の発現量の変化が見出された。以上の結果、細胞性粘菌の多細胞期の発達過程に DSD が介する D-セリン代謝が重要であることが示唆された。D-セリンが発達を阻害する可能性や、DSD による D-セリンの分解によって生じるピルビン酸やアンモニアが発達に関与する可能性が示された。

#### (iii) 哺乳類におけるアスパラギン酸ラセマーゼの機能解析

本研究では GOT1L1 の酵素学的諸性質を明らかにすることを目的とし、Escherichia coli や哺乳類細胞を用いて GOT1L1 組換えタンパク質の取得し、その性質を検討した。E. coli では pET15b、pET22b、pET44b、pGEX4T の 4 種類のベクターに、ヒトもしくはマウス由来 GOT1L1 (hGOT1L1、mGot111) の cDNA 配列を導入し、アフィニティータグの種類や位置の異なる 7 種類の発現プラスミドを構築した。加えて、in vivo における GOT1L1 の酵素活性を E. coli の D-グルタミン酸要求株 (WM335) を用いて検証した。哺乳類細胞については、HEK293T 細胞で His タグ付加の mGot111 を発現させ、精製酵素を得た。その結果、E. coli および哺乳類細胞のいずれの発現系で得られた GOT1L1 についても、Asp のラセミ化活性は確認されなかった。しかし、哺乳類細胞の発現系を用いた場合、GOT1L1 は L-Asp とケトグルタル酸から L-グルタミン酸を形成するアミノ基転移活性を示した。なお GOT1L1 の発現はグルタミン酸ラセマーゼを

欠損した E. coli の D-Glu 要求株 (WM335) を相補せず、GOT1L1 は D-Glu 合成能を示さないと考えられた。また、野生型マウス、Got111 ノックアウトマウスを用い、海馬・大脳皮質・精巣における、D-アスパラギン酸を含む各種アミノ酸含量の分析を行った。その結果、Got111 ノックアウトマウスと野生型マウスの組織における D-Asp 含量に変動は確認されなかった。以上の結果から、GOT1L1 は哺乳動物での D-アスパラギン酸の主要な合成酵素ではなく、D-アスパラギン酸生成には他の系が関与することが予想された。

#### 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 11 件)

PEGylated D-Serine Dehydratase as a D-Serine Racemizing Agent (2015) Ito T., Takada H., Isobe K., Suzuki M., Kitaura Y., Hemmi H., Matsuda T., Sasabe J., Yoshimura T. Journal of Pharmacological and Biomedical Analysis. in press

Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111), a putative aspartate racemase? (2015) Tanaka-Hayashi A., Hayashi S., Inoue R., Ito T., Kouno K., Yoshida T., Watanabe M., Yoshimura T., Mori H. Amino Acids. 47. 79-86

酵母 D-セリンデヒドラターゼの反応機構 (Reaction mechanism of yeast D-serine dehydratase) (2014) 松岡舞, 伊藤智和, 吉村徹. Vitamins 88 (11) 576-579

ビタミン B6 が担う D-セリンの機能と代謝: セリンラセマーゼと D-セリンデヒドラターゼ (Vitamin B6-dependent enzymes involved in D-serine metabolism: serine racemase and D-serine dehydratase) (2014) 吉村徹, 伊藤智和. Vitamins, 88 (9), 462-468

真核生物型セリンラセマーゼの反応機構 (Reaction mechanism of eukaryotic serine racemase) (2014) 吉村徹, 伊藤智和. Vitamins 88 (8), 425-428

Reaction mechanism of Zn<sup>2+</sup>-dependent D-serine dehydratase: role of a conserved tyrosine residue interacting with pyridine ring nitrogen of pyridoxal 5'-phosphate (2014) Ito T., Matsuoka M., Koga K., Hemmi H., Yoshimura T. Journal of Biochemistry. 156, 173-180

D-アミノ酸代謝関連酵素--構造・機能研究の最前線--「D-セリンデヒドラターゼ」について執筆担当, BIOINDUSTRY, シーエムシー出版, 2014 年 3 月号

Conserved pyridoxal protein that regulates Ile and Val metabolism (2013) Ito T, Iimori J, Takayama S, Moriyama A, Yamauchi A, Hemmi H, Yoshimura T. Journal of Bacteriology. 195, 5439-5449

Catalytic mechanism of serine racemase from *Dictyostelium discoideum* (2013) Ito T, Maekawa M, S Hyashi, Goto M, Hemmi H, Yoshimura T. Amino Acids. 44, 1073-84

Metal ion dependency of serine racemase from *Dictyostelium discoideum* (2012) Ito T, Murase H, Maekawa M, Hayashi S, Maki M, Hemmi H, Yoshimura T. Amino Acids, 43, 1567-1576

Role of zinc ion for catalytic activity in D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. (2012) Ito T, Koga K, Hemmi H, Yoshimura T. FEBS J. 279, 612-624

〔学会発表〕(計 16 件)

伊藤智和、萩 泰典、濱内菜月、邊見 久、齊藤玉緒、吉村 徹 [細胞性粘菌における D-セリンの代謝と機能] 第 8 回 D-アミノ酸研究会学術講演会

伊藤智和、松岡舞、邊見久、吉村徹 [亜鉛に依存する D-セリンデヒドラターゼ：亜鉛の役割と反応機構の解析] 第 85 回日本生化学会大会

伊藤智和 [真核生物型 D-セリンデヒドラターゼの触媒機構] 2012 年度酵素補酵素研究会

伊藤智和、飯盛淳平、邊見久、吉村徹 [イソロイシン、バリン代謝系に關与する新奇ビタミン B6 タンパク質] 日本ビタミン学会第 65 回大会

伊藤智和 [真核生物における D-セリン：代謝酵素と生理的意義] 第 86 回日本生化学会大会

奥田啓太、深田はるみ、伊藤智和、後藤勝、吉村徹 [ピリドキサル 5'-リン酸に依存する *Bacillus subtilis* の転写制御因子 GabR] 日本生物高分子学会 2013 年度大会

伊藤智和、濱内菜月、邊見久、吉村徹 [細胞青年期意における D-セリン代謝酵素欠損の影響] 2014 年度日本農芸化学会大会

松岡舞、伊藤智和、邊見久、吉村徹 [真核生物型 D-セリンデヒドラターゼの反応機構：PLP ピリジン環窒素の相互作用残基 Y203 の役割] 2013 年度酵素補酵素研究会

林修平、伊藤智和、邊見久、田中亚由美、吉田知之、森寿、吉村徹 [D-アスパラギン酸合成酵素とされる哺乳動物 Got111 の酵素活性] D-アミノ酸学会

松岡舞、伊藤智和、古賀和司、邊見久、吉村徹 [亜鉛依存性 D-セリンデヒドラターゼの反応機構：PLP ピリジン環窒素相互作用残基 Y203 の変異体解析] 第 86 回日本生化学会大会

濱内菜月、伊藤智和、邊見久、齊藤玉緒、吉村徹 [細胞性粘菌における D-セリンデヒドラターゼ欠損の影響] 第 86 回日本生化学会大会

Tomokazu Ito, Hisashi Hemmi, Tohru Yoshimura [Conserved Pyridoxal Protein that Regulates Ile and Val Metabolism] Japan-Italy Joint Symposium: New Trends in Science and Engineering of Enzyme and Microbiology for Sustainable Society

Tomokazu ITO, Natsuki HAMAUCHI, Hisashi HEMMI, Tamao SAITO, Tohru YOSHIMURA [D-SERINE METABOLISM IN CELLULAR SLIME MOLD AND EFFECTS OF D-SERINE DEHYDRATASE MUTATION] 4th International Conference on Cofactors (ICC-04)

Tomokazu Ito, Mai Matsuoka, Hisashi Hemmi, and Tohru Yoshimura [Catalytic mechanism of PLP- and Zn<sup>2+</sup>-dependent D-serine dehydratase] 4th International Conference on Cofactors (ICC-04)

伊藤智和・松岡舞・邊見久・吉村徹 ["亜鉛依存性 D-セリンデヒドラターゼの反応機構：PLP ピリジン環窒素の相互作用残基(Y203)の変異体解析] 日本ビタミン学会第 65 回大会

伊藤智和、竹中崇、邊見久、吉村徹 [Brevibacillus brevis の新奇ピリドキサル 5'-リン酸(PLP)結合性転写調節因子の解析] 第 87 回日本生化学会大会

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：

国内外の別：

〔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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：