

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790086

研究課題名(和文) D-アミノ酸代謝酵素の生理機能の解明：生殖と神経伝達における D-アミノ酸の役割

研究課題名(英文) Study of physiological functions of D-amino acid degradative enzymes: role of D-amino acids in reproduction and neurotransmission

研究代表者

片根 真澄 (Katane, Masumi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90383653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

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・塩基性D-アミノ酸を基質とするD-アミノ酸オキシダーゼで、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である。これらの遺伝子それぞれに欠失のある変異株では、D-アミノ酸の体内含量が上昇するとともに産卵数の低下などが認められる。そこで、各変異株における生殖細胞の形成能や神経伝達を解析し、野性株と比較した。また、変異株で発現が変動している遺伝子群をDNAマイクロアレイ解析により同定し、同定した遺伝子群が関わる代謝経路における代謝産物の含量などを調べ、野性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 that encode the enzymes degrading D-amino acids oxidatively. One of them encodes D-amino acid oxidase, which degrades neutral and basic D-amino acids, while the other three are D-aspartate oxidases, which degrade acidic D-amino acids. In the mutants defective in each gene, several phenotypic changes are observed such as decreased brood size, along with an increase in D-amino acid contents in the body. In this work, the quality of germ cells and the neurotransmission in the mutants were investigated and compared with those in the wild-type strain. In addition, several genes whose expressions are altered in the mutants were identified by DNA microarray analysis, and subsequently the contents of metabolites in the metabolic pathway involved in the identified genes were determined and compared with those of the wild-type. Based on these results, the physiological roles of D-amino acids and their degradative enzymes were discussed.

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：D-アミノ酸 D-アミノ酸オキシダーゼ D-アスパラギン酸オキシダーゼ 線虫 セロトニン 寿命 トリプトファン 欠損変異株

## 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、近年の光学分割法をはじめとする分析技術の進展に伴い、D-アミノ酸は遊離型、あるいはペプチドまたはタンパク質に結合した形で広く生物界に存在することが明らかになってきた。特に遊離型の D-セリン (D-Ser) と D-アスパラギン酸 (D-Asp) に関しては、ヒトを含めた高等動物体内に比較的高濃度で存在することが判明し、重要な機能を担っていることが明らかになりつつある。D-Ser は前脳に多く存在し、L-グルタミン酸 (L-Glu) 受容体的一种である N-メチル-D-Asp (NMDA) 受容体を介した神経伝達を調節していると考えられている。また、D-Asp は松果体、下垂体および精巣といった様々な組織に多量に存在し、ホルモン分泌やステロイドの合成を調節することが示唆されている。したがって、高等動物には D-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。

## 2. 研究の目的

D-アミノ酸を立体特異的に分解する生体内酸化酵素として、D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) と D-Asp オキシダーゼ (DDO) が知られている。両酵素の基質特異性は明確に異なっており、DAO が中性および塩基性 D-アミノ酸を分解する一方で、DDO は酸性 D-アミノ酸を分解する。したがって、DAO および DDO は、それぞれ D-Ser および D-Asp を分解することにより、これらの D-アミノ酸の体内濃度を調節していると考えられている。しかしながら、これらの酵素の生理機能には未だ不明な点が多いというのが現状である。

このような背景のもと、我々は研究材料を見直し、多細胞モデル生物として汎用されている線虫 *Caenorhabditis elegans* を材料として研究を行ってきた。*C. elegans* を用いる利点は、1) 体が透明であり、DAO や DDO 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、様々な生育段階での D-アミノ酸の分析が可能であることなどである。

以前に我々は、*C. elegans* には 1 種類の DAO 遺伝子と 3 種類の DDO (DDO-1、DDO-2 および DDO-3) 遺伝子が存在すること、また、これらの遺伝子にコードされる DAO と DDO の詳細な酵素学的性質を明らかにした。また、green fluorescent protein

(GFP) をレポータータンパク質とした発現解析を行い、これらの酵素が *C. elegans* の消化系、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を明らかにした。さらに、*C. elegans* 体内では D-アラニン (D-Ala)、D-Glu、D-Ser および D-Asp といった D-アミノ酸が検出されること、また、DAO あるいは DDO 遺伝子それぞれに欠失のある変異株では、D-Ala、D-Glu または D-Asp 含量の上昇とともに産卵数の低下、孵化率の低下、受精率の低下、および寿命の延長などが認められることを明らかにした。

本研究の目的は、上述したように欠損変異株において種々の表現型を生み出す DAO および DDO の生理機能を解明することであり、また、それに関連する D-アミノ酸の役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、1) 変異株の生殖細胞の解析、2) 変異株の行動解析と薬剤感受性解析、3) 変異株と野生株の DNA マイクロアレイ解析などを行い、DAO と DDO、および D-アミノ酸の生理学的役割を考察した。

1) に関して、変異株で認められた産卵数の低下の原因として、排卵の異常、あるいは生殖細胞の質や数の低下が考えられるため、成虫の子宮内にある受精卵の数を計測した。また、*C. elegans* には雌雄同体と雄が存在するが、通常、雌雄同体の自家受精から雄が産まれる確率は約 0.1% と非常に低頻度である。一方、両者の交配からは雌雄同体と雄が 1:1 で産まれるという特徴的規則性がある。このことを利用して、*C. elegans* では生殖細胞の形成異常による産卵数や受精率の低下が卵子と精子のどちらに起因するのかを解析することが可能である。すなわち、雌雄同体の変異株と雄の野生株が混在する環境で、他家受精により産まれる雄の数を測定した。変異株の精子に異常がある場合には産まれる雄の数に変化は認められないが、変異株の卵子に異常がある場合には産まれる雄の数が激減する。同様に、雌雄同体の野生株と雄の変異株が混在する環境で他家受精により産まれる雄の数を測定し、変異株の精子に異常があるかどうかを解析した。

2) に関して、変異株で異常が認められた産卵行動は主にアセチルコリン伝達やセロトニン伝達などにより調節されることが知られているので、*C. elegans* の神経伝達の解析で汎用されている行動解析を行った。すなわち、機械刺激感受性試験、排泄行動試験および運動量試験などを行い、アセチルコリンや GABA、セロトニンなどの神経伝達異常を調べた。また、アセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼを阻害する aldicarb、およびアセチルコリン受容体のアゴニストである levamisole とい

った薬剤を含む寒天培地上で *C. elegans* 変異株を培養し、神経伝達異常により引き起こされる麻痺を観察した。

3) に関して、変異株で観察された表現型に至る分子経路を同定するために、変異株と野生株を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。すなわち、常法に従って同調培養した変異株と野生株から全 RNA を抽出した。それに引き続く cDNA の合成、cDNA を鋳型としたピオチン化 cRNA の合成、Affymetrix® 社製 GeneChip® アレイへのハイブリダイゼーション、蛍光強度のスキヤニング、および得られた発光量の数値化等を株式会社バイオマトリックス研究所 (<http://www.biomatrix.co.jp/>) に委託した。これらのデータを用いて、変異株で発現変動している遺伝子との関与が高いと思われる代謝経路を Gene Ontology 解析により同定した。また、同定した遺伝子群が関わる代謝経路における代謝産物の含量などを調べ、野生株との違いを解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 変異株の生殖細胞の解析

成虫の子宮内にある受精卵の数を計測したところ、DAO および DDO 欠損変異株における子宮内の受精卵の数が減少していることが明らかになった。したがって、これらの変異株で認められる産卵数の低下は、排卵の異常ではなく生殖細胞の形成異常に起因していると考えられた。

各変異株と野生株の交配試験を行ったところ、精子を提供する雄としていずれの変異株を用いた場合にも交配由来の子孫の数に影響は見られなかったが、雄として野生株を用いて雌雄同体の変異株と交配させると、いずれの変異株を用いた場合にも交配由来の子孫の数が有意に低下した。したがって、変異株では精子ではなく、卵子の質あるいは数が低下していると考えられた。そこで、卵子の質を解析するために、産み落とされた受精卵および未受精卵をそれぞれ計測して受精率を算出した。その結果、DAO および DDO-3 変異株の受精率が野生株と同程度であるのに対して、DDO-1 および DDO-2 変異株の受精率は有意に低下していることが明らかになった。すなわち、DAO および DDO-3 変異株では卵子の数が減少していると考えられた。また、DDO-1 および DDO-2 変異株で認められた受精率の低下の程度 (22-31%) が産卵数の低下の程度 (34-47%) と比較して低かったことから、これらの変異株では卵子の質だけでなく数も低下していると考えられた。

##### 2) 変異株の行動解析と薬剤感受性解析

機械刺激感受性試験において、変異株と野生株との間に有意な差は認められなかった。一方、排泄の間隔を測定したところ、DDO-1 変異株でのみ野生株と比較して有意

な延長が認められた。*C. elegans* における排泄の間隔は腸細胞の  $Ca^{2+}$  濃度の変化、イノシトール三リン酸シグナル、脂質代謝、エネルギー代謝、および筋肉の形成などが関与していることから、DDO-1 はこれらの生命現象に密接に関与していると考えられた。

また、一定時間あたりに身体を屈曲させる回数 (運動量) を測定したところ、DDO-3 でのみ有意な上昇が認められた。*C. elegans* の運動は、GABA、アセチルコリン、および L-Glu 作動性の神経伝達により制御されることが知られている。そこで、アセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼを阻害する aldicarb に対する感受性を解析した。その結果、DDO-3 変異株では aldicarb に対する感受性が有意に上昇しており、DDO-2 変異株では有意に低下していることが明らかになった。次に、これらの感受性の変化が、アセチルコリン放出などのプレシナプスの異常によるのか、またはニコチン性アセチルコリン受容体の変化などの体壁筋側の異常によるのかを解析するために、ニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストである levamisole に対する感受性を解析した。その結果、DDO-3 変異株の感受性が野生株と同程度であるのに対して、DDO-2 変異株の感受性は有意に低下していることが明らかになった。すなわち、アセチルコリン作動性の神経伝達が、DDO-3 変異株ではプレシナプスの異常により亢進しており、DDO-2 変異株では体壁筋の異常により低下していると考えられた。

##### 3) 変異株と野生株の DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析の結果、DDO-3 変異株では L-トリプトファン (L-Trp) 代謝経路遺伝子群の発現量が変動していることが示唆された。そこで、これらの遺伝子の DDO-3 変異株における発現量をリアルタイム PCR により定量したところ、L-Trp からセロトニンを合成する経路の律速酵素である Trp ヒドロキシラーゼの発現量が野生株と比較して有意に低下していた。

次に、抗セロトニン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、摂食行動の制御に関わる NSM ニューロンでは野生株との違いは認められなかったが、化学物質の受容や産卵行動の制御等に関わる ADF および HSN ニューロンや、機能未知の AIM および RIH ニューロンにおける免疫原性が野生株と比較して低下していた。さらに、セロトニン伝達に関わる幾つかの表現型を解析したところ、以前に明らかにした寿命の延長のみならず、脂肪の蓄積といった Trp ヒドロキシラーゼ変異株で報告されているものと同様の表現型が認められた。したがって、DDO-3 はセロトニン作動性の神経伝達において重要な役割を担っていると考えられた。

## 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4件)

Masumi Katane, Satsuki Matsuda, Yasuaki Saitoh, Masae Sekine, Takemitsu Furuchi, Nobuhiro Koyama, Izumi Nakagome, Hiroshi Tomoda, Shuichi Hirono and Hiroshi Homma (2013) The antiviral drug acyclovir is a slow-binding inhibitor of D-amino acid oxidase. *Biochemistry* **52**: 5665–5674. 査読有り

Masumi Katane, Naoko Osaka, Satsuki Matsuda, Kazuhiro Maeda, Tomonori Kawata, Yasuaki Saitoh, Masae Sekine, Takemitsu Furuchi, Issei Doi, Shuichi Hirono and Hiroshi Homma (2013) Identification of novel D-amino acid oxidase inhibitors by *in silico* screening and their functional characterization *in vitro*. *J. Med. Chem.* **56**: 1894–1907. 査読有り

Yasuaki Saitoh, Masumi Katane, Tomonori Kawata, Kazuhiro Maeda, Masae Sekine, Takemitsu Furuchi, Hiroyuki Kobuna, Taro Sakamoto, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Yasuhito Nakagawa and Hiroshi Homma (2012) Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during the development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* **32**:1967–1983. 査読有り

Masumi Katane, Masae Sekine and Hiroshi Homma (2012) Assay of amino acid racemases. *Methods Mol. Biol.* **794**: 367–379. 査読有り

[学会発表](計21件)

片根 真澄、松田 さつき、金子 雄介、宮本 哲也、齋藤 康昭、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 「抗ウイルス薬である acyclovir の D-アミノ酸代謝酵素に対する新規阻害活性」 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.30 [日本薬学会第 134 年会 要旨集 3 p.80 2014.3]

野中 聖子、関根 正恵、角田 誠、片根 真澄、齋藤 康昭、宮本 哲也、本間 浩 「HPLC-蛍光検出法を用いたメチルアルギニン類の高感度検出法の開発」 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.29 [日本薬学会第 134 年会 要旨集 2 p.279 2014.3]

関根 正恵、尾関 裕二、藤井 久彌子、片根 真澄、齋藤 康昭、宮本 哲也、下田 和孝、秋山 一文、本間 浩 「統合失調症患者血漿におけるアミノ酸の定量」 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.29 [日本薬学会第 134 年会 要旨集 2 p.275 2014.3]

片根 真澄、本間 浩 「ビタミン B<sub>2</sub> 誘導体を補酵素とする脳内活性 D-アミノ酸代謝酵素の新規阻害剤」(シンポジウム ビタミン B 群が担う脳内アミノ酸代謝と疾患をターゲットにした次世代学術研究—ビタミン

研究が切り拓く疾患生命科学のフロンティア) ビタミン B 研究委員会 平成 25 年度シンポジウム(大阪) 2014.1.31 [ビタミン B 研究委員会 平成 25 年度シンポジウム 要旨集 2014.1]

齋藤 康昭、宮本 哲也、関根 正恵、片根 真澄、本間 浩 「線虫 D-アスパラギン酸オキシダーゼの寿命における役割」 第 31 回 白金シンポジウム(東京) 2013.12.17 [第 31 回 白金シンポジウム 講演要旨集 p.10 2013.12]

関根 正恵、野沢 岳史、片根 真澄、齋藤 康昭、宮本 哲也、本間 浩 「植物における D-アミノ酸と D-アミノ酸代謝酵素の解析」 第 31 回 白金シンポジウム(東京) 2013.12.17 [第 31 回 白金シンポジウム 講演要旨集 p.9 2013.12]

片根 真澄、宮本 哲也、齋藤 康昭、関根 正恵、本間 浩 「抗ウイルス薬 acyclovir の D-アミノ酸オキシダーゼに対する阻害作用」 第 31 回 白金シンポジウム(東京) 2013.12.17 [第 31 回 白金シンポジウム 講演要旨集 p.8 2013.12]

片根 真澄、本間 浩 「D-アミノ酸代謝酵素に対する新規阻害剤」(シンポジウム D-アミノ酸研究の新展開) 第 86 回 日本生化学会大会(横浜) 2013.9.12 [生化学 第 85 巻 第 8 号 p.62 2013.9]

松田 さつき、片根 真澄、前田 和洋、齋藤 康昭、関根 正恵、古地 壯光、本間 浩 「哺乳類細胞における D-アスパラギン酸の含量と D-アスパラギン酸代謝関連酵素」 第 9 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会(大阪) 2013.9.5 [第 9 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 要旨集 p.24 2013.9]

金子 雄介、古地 壯光、奥田 麻耶、保母 香純、関根 正恵、片根 真澄、本間 浩 「天然物ライブラリーを用いた細胞内 D-Asp 濃度に影響を及ぼす化合物のスクリーニング」 第 9 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会(大阪) 2013.9.5 [第 9 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 要旨集 p.22 2013.9]

松田 さつき、片根 真澄、前田 和洋、齋藤 康昭、関根 正恵、古地 壯光、本間 浩 「哺乳類細胞における D-アスパラギン酸の生合成と D-アスパラギン酸代謝関連酵素」 第 26 回 北里大学バイオサイエンスフォーラム(相模原) 2013.8.8 [第 26 回 北里大学バイオサイエンスフォーラム 講演要旨 p.24 2013.8]

Yasuaki Saitoh, Mari Okutsu, Masumi Katane, Masae Sekine, Takemitsu Furuchi, Taro Sakamoto, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Hiroshi Homma “D-Aspartate oxidase is involved in the caloric restriction-induced lifespan extension in *C. elegans*” 19th International *C. elegans* Meeting (California, USA) June 29, 2013 [19th International *C. elegans* Meeting p.146–147 2013.6]

齋藤 康昭、片根 真澄、関根 正恵、古

地 壯光、坂本 太郎、井上 貴雄、新井 洋由、中川 靖一、本間 浩 「線虫 D-アスパラギン酸オキシダーゼの寿命における役割」日本薬学会第 133 年会（横浜）2013.3.30 [日本薬学会第 133 年会 要旨集 3 p.74 2013.3]

古地 壯光、保母 香純、奥田 麻耶、金子 雄介、関根 正恵、片根 真澄、太田 安隆、本間 浩 「HEK293 細胞における D-Asp 濃度調節機構の解明」日本薬学会第 133 年会（横浜）2013.3.28 [日本薬学会第 133 年会 要旨集 3 p.94 2013.3]

齋藤 康昭、片根 真澄、関根 正恵、古地 壯光、本間 浩 「線虫 D-アスパラギン酸オキシダーゼの寿命における役割」第 30 回 白金シンポジウム（東京）2012.12.18 [第 30 回 白金シンポジウム 講演要旨集 p.10 2012.12]

片根 真澄、大坂 奈央子、松田 さつき、前田 和洋、川田 知紀、齋藤 康昭、関根 正恵、古地 壯光、本間 浩 「バーチャルスクリーニングで同定した D-アミノ酸オキシダーゼ新規阻害剤の *in vitro* での解析」第 30 回 白金シンポジウム（東京）2012.12.18 [第 30 回 白金シンポジウム 講演要旨集 p.9 2012.12]

齋藤 康昭、片根 真澄、関根 正恵、古地 壯光、坂本 太郎、井上 貴雄、新井 洋由、中川 靖一、本間 浩 「線虫の寿命における D-アスパラギン酸オキシダーゼの機能解析」第 35 回 日本分子生物学会年会（福岡）2012.12.13 [第 35 回 日本分子生物学会年会 プログラム p.454 2012.11]

片根 真澄、大坂 奈央子、松田 さつき、前田 和洋、川田 知紀、齋藤 康昭、関根 正恵、古地 壯光、土井 一生、広野 修一、本間 浩 「バーチャル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 *in vitro* での性質決定」第 35 回 日本分子生物学会年会（福岡）2012.12.12 [第 35 回 日本分子生物学会年会 プログラム p.454 2012.11]

片根 真澄、大坂 奈央子、松田 さつき、前田 和洋、齋藤 康昭、川田 知紀、関根 正恵、古地 壯光、土井 一生、広野 修一、本間 浩 「*In silico* スクリーニングで同定した D-アミノ酸オキシダーゼ新規阻害剤の *in vitro* での解析」第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会（大津）2012.9.8 [第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 要旨集 p.45 2012.9]

齋藤 康昭、片根 真澄、関根 正恵、古地 壯光、坂本 太郎、井上 貴雄、新井 洋由、中川 靖一、本間 浩 「線虫の生殖における D-アミノ酸分解酵素の機能解析」第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会（大津）2012.9.8 [第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 要旨集 p.41 2012.9]

④ 古地 壯光、原田 怜、立石 秀樹、清水 由香里、伊藤 耕平、片根 真澄、関根 正

恵、太田 安隆、本間 浩 「Protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase (PIMT) の発現制御因子の探索」第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会（大津）2012.9.7 [第 8 回 D-アミノ酸研究会 学術講演会 要旨集 p.27 2012.9]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称：D-アミノ酸オキシダーゼの阻害剤  
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：特願 2013-080701  
出願年月日：平成 25 年 4 月 8 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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  
片根 真澄 (KATANE, Masumi)  
北里大学・薬学部・講師  
研究者番号：90383653

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし