

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292059

研究課題名(和文) D-アミノ酸による生体制御：分子機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Biomodulation with D-amino acids: molecular mechanism and application

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：D-アミノ酸は様々な生理機能を有するがその分子機構は必ずしも明確ではない。本研究では我々が構築した定量法などを用いて、D-SerやD-Aspなどの機能の分子レベルでの解明とその応用を目指した。具体的には、セリンラセマーゼやD-セリンデヒドラターゼの反応機構解析、細胞性粘菌の発生・分化におけるD-Serとセリンラセマーゼの役割、哺乳動物におけるD-Asp合成酵素の解明、D-Aspによる動物培養細胞への抗酸化性付与の分子機構、D-Ser定量法の改良、PEG修飾D-セリンデヒドラターゼの投与によるマウス脳内D-セリンの制御、D-アミノ酸を認識するタンパク質構造などを検討し、一定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In the current studies, we intended to clarify the molecular bases of the physiological functions of D-amino acids, especially D-Ser and D-Asp. We clarified the reaction mechanism of D-Ser metabolizing enzymes, serine racemase and D-serine dehydratase with focusing on the elimination of the hydroxyl group of substrate. We examined the role of D-Ser and serine racemase in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum, and found that serine racemase probably regulates L-serine concentration. We tried to clarify the synthetic enzyme of D-Asp in mammals, and found that Got111 is not an aspartate racemase but a L-glutamate transaminase. We tried to improve the sensitivity of our enzymatic D-Ser assay system, and succeeded to increase it ten times. We attempted to regulate the brain D-Ser concentration with PEGylated D-serine dehydratase. We also studied the protein structure recognizing D-amino acids.

研究分野：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 セリンラセマーゼ D-セリンデヒドラターゼ

1. 研究開始当初の背景

1990年代に D-アミノ酸が哺乳動物を含む真核生物にも存在し、多様な生理機能を有することが明らかとなった。例えば、D-Ser は記憶や学習など脳の高次機能に関わる *N*-メチル D-アスパラギン酸レセプター (NMDAR) のコアゴニストとして働き、同レセプターを活性化する。そのため脳内 D-Ser の動態は様々な神経疾患と関係すると考えられ、実際に、脳脊髄液中 D-Ser 含量の統合失調症における低下や、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) での上昇が報告された。これらの結果が正しければ、D-Ser 濃度の減少や過剰がそれぞれ NMDAR 機能の低下や異常亢進をもたらし、脳機能の低下や神経細胞の壊死を起こすと解釈できる。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や、小脳では D-Ser が運動記憶の獲得に関与することが報告されていた。D-Ser はまた動物組織の発達や節足動物の変態に際して増減することから、発生・分化にもかかわると推測されていた。D-Ser とともに哺乳動物での含量が多い 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ことが報告されていた。またヒトの精子や卵巣に D-Asp が存在し、卵胞液内の濃度が体外受精の受精率と相関すること、D-Asp の経口投与が精子の運動性能を高めることなどが示されていた。さらに、D-Asp が細胞の抗酸化性を増大させるとともに、コラーゲン産生の促進等を通じて皮膚の老化予防に働くことも示唆されていた。

2. 研究の目的

前項で述べたように D-アミノ酸には様々な生理的役割が示唆されていた。しかし、D-アミノ酸の機能が分子レベルで解明された例は、NMDAR に関わる D-Ser の一部の機能に限られ、D-Asp に関してはその生合成経路も未だ解明されていない。そこで本研究では、申請者らがこれまでに構築してきた D-アミノ酸定量法などのツールを用いて、D-セリン (D-Ser) と D-アスパラギン酸 (D-Asp) を中心とした D-アミノ酸の機能を分子レベルで解明し、その応用を計ることを目的とした。具体的には、両アミノ酸の代謝酵素の酵素学的解析、D-Asp 生合成酵素の解明、D-Ser が細胞性粘菌の発生・分化に果たす役割の解明、D-アミノ酸による細胞への抗酸化性付与の機構解明、尿中 D-Ser 量の動態の解明などを試みた。

3. 研究の方法

(1) D-アミノ酸代謝関連酵素の酵素学

では、①真核細胞型 D-Ser デヒドラターゼ (以後 Dsd) の構造機能相関の解明、および②哺乳動物における D-Asp 生合成機構の解明、の2課題をテーマとした。①では出芽酵母の

Dsd を用いて、同酵素の補酵素であるピリドキサル5'-リン酸 (PLP) のピリジン環窒素部位の特異的変異を通じて、PLP の電子状態から酵素の反応機構を検討した。②では哺乳動物において D-Asp 生合成を担うアスパラギン酸ラセマーゼであると報告されているマウスの GOT1L1 の活性を検証するため、HEK293T 細胞で産生させた GOT1L1 を精製し、酵素活性を測定した。

(2) 発生・分化における D-Ser の役割の解明 では、Dsd、Ser ラセマーゼ (SR)、D-アミノ酸オキシダーゼの3種類の D-Ser 代謝酵素遺伝子を有する細胞性粘菌、*Dyctioasterium discoideum* を用いて、これら酵素遺伝子のノックアウトを行い、そのフェノタイプを解析することにより、各酵素の生理的意義の検証を試みた。

(3) D-アミノ酸による細胞への抗酸化性の付与に関する研究 では、ラジカル発生下の培養細胞に対して D-Aspなどを添加し、生存率への影響を検討した。同時に Nrf2 や H0-1 など、抗酸化に関係するタンパク質の発現誘導について検討した。

(4) D-セリン定量キットによるヒト尿中の D-セリン動態の解析と疾患マーカーへの応用。Dsd は D-Ser をピルビン酸とアンモニウムに分解する反応を触媒する。そこで Dsd とピルビン酸オキシダーゼを共役させ、生成する過酸化水素を蛍光的に定量することで D-Ser を測定するアッセイ系を構築するとともに、この方法を用いて尿中 D-Ser 濃度と腎疾患の関連性を検討した。

(5) PEG 修飾 D-セリンデヒドラターゼによるマウス体内 D-セリン濃度の制御

PEG 化して免疫原性を低減させた Dsd をマウスに投与し、大脳や海馬における D-Ser 濃度の変化を検討した。

(6) D-アミノ酸を認識する細菌転写制御因子の構造解析

Bacillus subtilis の転写制御因子である GabR は γ -アミノ酪酸 (GABA) の PLP の存在下で、GABA の資化に関わる *gabTD* の転写を活性化する。本研究では GABA の C 末端側ドメインが D-アミノ酸を認識することを見出し、X 線結晶構造解析や分光学的検討によって、この構造-機能相関の解析を目指した。

4. 研究成果

(1) D-アミノ酸代謝関連酵素の酵素学

① Dsd の構造機能相関の解明

PLP は多くの酵素中でそのピリジン環窒素 (N_1) がプロトン化された状態で存在し、反応中に生じるカルボアニオン中間体を安定化する「電子溜め」としての役割を担っている。Dsd において PLP の N_1 は酸性度の低い Tyr 残基 (Y203) と相互作用している。この

ため PLP の N_1 は非プロトン化状態であると予想される。本研究では、PLP の N_1 のプロトン化状態を変化させる目的で、Y203 変異体 (Y203F、Y203A、Y203S、Y203R、Y203D、Y203E) を作成し、各酵素の性質を検討した。Y203 を非極性及び塩基性残基に置換した Y203F、Y203A、Y203S、Y203R 変異体は、デヒドラーゼ活性を保持した。一方、 N_1 をプロトン化し易くして、PLP の電子溜め効果を強化した Y203D、Y203E 変異体では活性が顕著に減少した。Y203D 変異体を重水中で反応させた場合には、野生型酵素ではほとんど観察されなかった D-Ser の α -プロトンと重水素との交換が観測され、Y203D 変異体では D-Ser の α -プロトン引き抜きにより生ずるカルボアニオン中間体が安定化されていることが示唆された。以上の結果から Dsd 反応においては PLP の N_1 のプロトン化は必須でないこと、また非プロトン化状態の PLP は、 α -プロトン引き抜き後に生じる $C\alpha$ カルボアニオン中間体へのプロトンの再付加反応を防ぐことで、デヒドラーゼ反応を促進していることが予想された。

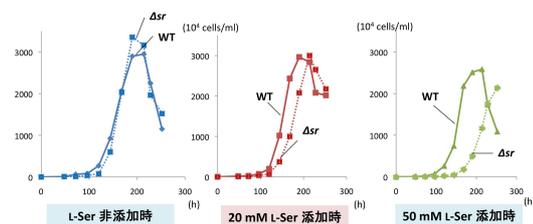
哺乳動物の D-Asp 生合成機構の解明

哺乳動物の D-Asp 生合成機構は長らく未知であったが、米国の Snyder らによって L-Asp と α -ケトグルタル酸の間のアミノ基転移反応を触媒する L-Asp トランスアミナーゼ (GOT) のホモログである Got1L1 が Asp ラセマーゼ活性と、D-Asp トランスアミナーゼ活性を有しており、これが D-Asp の生合成経路であるとの報告がなされた。この結果を追試するため、大腸菌や昆虫細胞を利用した Got1L1 の発現を試みてきたが、成功しなかった。本研究では、HEK293T 哺乳細胞を用いてマウスの GOT1L1 を発現、精製した。この酵素活性を測定したところ、Asp ラセマーゼ活性や D-Asp トランスアミナーゼ活性は検出されず、微弱な GOT 活性のみが得られた。また Got1L1 をノックアウトしたマウスでも、精巣や海馬における D-Asp 濃度が減少しなかったことから、Got1L1 は Asp ラセマーゼではないと結論した。動物における D-Asp の生合成機構はなお不明である。

(2) 発生・分化における D-Ser の役割の解明

以前の研究において、細胞性粘菌、*D. discoideum* の Dsd 遺伝子をノックアウトした場合に、多細胞期での生育遅延や孢子形成能の著しい低下などが起こることを報告した。今回は同菌の有する Ser ラセマーゼ (DdSR) 遺伝子のノックアウトを行った。野生株 (WT) および変異株 (*sr*) の生育や発達過程の形態変化にはほぼ差異が認められないことから、用いた実験条件下では、SR は生育や発達において必須ではないことが示され

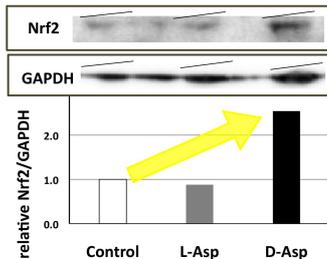
た。*D. discoideum* の培養に用いていた HL5 培地に微量の D-Ser が含まれていることや、*D. discoideum* が D-Ser の取り込み能を有することが示されたが、*sr* に *dsd* を恒常的に過剰発現させた変異株 (*sr/dsd⁺*) の発達過程が野生株とほぼ同等であることや、培地に D-セリンを含まない SIH 培地で培養した際の *sr* の発達に顕著な影響がないことなどから、DdSR や D-Ser の発達・分化における必要性を確認することはできなかった。また、SR の D-Ser 合成能を検証するために *sr* と *dsd* の二重欠損株 (*sr / dsd*) を作製し、菌体内のアミノ酸分析を行ったが、*dsd* および *sr / dsd* における菌体内 D-Ser レベルに有意差は見られなかった。よって SR が菌体内で D-Ser の合成酵素として働き、生育や発達過程において、何らかの寄与を果たしているという明確な証拠は得られなかった。しかし *sr* では添加された L-Ser の濃度依存的に増殖速度が遅くなるとともに、L-Ser を含む HL5 培地で培養した *sr* 菌体内には WT の約 3 倍量の L-セリンが蓄積していた。このことから、SR は少なくとも、菌体外に高濃度の L-Ser が存在する際の、菌体内の L-Ser レベルの制御に関与することが示された。また、SR の D-Ser 分解への寄与は L-Ser 分解への寄与に比べて小さいことが示唆された。



(3) D-アミノ酸による培養細胞への抗酸化性の付与に関する研究

哺乳動物細胞に対する D-Asp の抗酸化機構を検証するために、D-および L-Asp 存在下もしくは非存在下で培養した RAW264.7 細胞にヒドロキシラジカル発生剤である 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミン)二塩酸塩 (AAPH) を添加し、この影響を検証した。AAPH の作用によって RAW264.7 細胞の細胞死が誘導されたが、D-Asp 存在下で培養した際の生細胞率は、D-Asp 非存在下で培養した場合に対して有意に増加した。D-Asp が細胞の抗酸化防御系に与える影響を検討するために、活性酸素種の除去に寄与する応答性タンパク質である Hemeoxygenase-1 (HO-1) の発現レベルをウエスタンブロット法によって定量した。D-Asp 存在下で培養した細胞では HO-1 の発現レベルが D-Asp 非添加時の約 1.3 倍に増加した。また、HO-1 の発現を制御する転写因子である NF-E2 related factor (Nrf2)

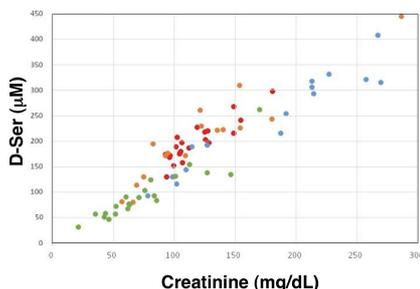
を定量したところ、D-Asp 存在下で培養した細胞では核内の Nrf2 レベルが D-Asp 非添加時の約 3 倍に増加した。以上の結果より、D-Asp は核内 Nrf2 レベルの増加を介して H0-1 の発現を誘導し、抗酸化経路を増強することで細胞を酸化ストレスから保護すると予想された。



D-AspによるNrf2発現量の増加

(4) D-セリン定量キットによるヒト尿中のD-セリン動態の解析と疾患マーカーへの応用

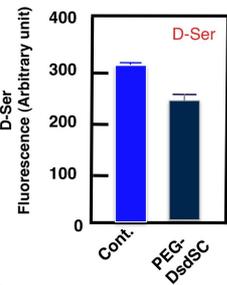
以前の研究において、D-Ser に極めて高い特異性を有する出芽酵母の Dsd と、Ser への反応性を高めた好熱菌由来アラニンラセマーゼを利用した D-,L-Ser の同時分別定量法を構築した。その一つは、D-Ser を Dsd によってピルビン酸とした後、NADH の存在下で乳酸脱水素酵素によってこれを乳酸とし、その際共役する NADH から NAD⁺への反応を分光学的に追跡するものである。この方法はキット化され上市されているが、検出限度は 10 μM である。今回、ヒト尿中の D-,L-Ser の動態を解析する目的で、D-セリンデヒドラターゼによって D-Ser から生じたピルビン酸を、ピルビン酸オキシダーゼとキシレノールオレンジ(XO)を用いて比色定量する方法を構築した。この方法によって 10 倍近くまで感度が上昇するとともに、96 穴プレートを用いて数時間で数百サンプルの測定が可能となった。酵素法により健康者の尿検体を分析したところ、尿中の D-Ser/L-Ser 比や D-Ser/クレアチニン値が、日内、および 2 週間程度の期間において、各個人で一定に保たれる傾向が得られた。最近、腎疾患モデルマウスにおいて尿中 D-Ser に対する L-Ser 量比が増加するとの報告がなされている。これがヒトでも同様に見られるかについて検証を進めている。



4名の健康人の連続する3日間の尿中D-Serとクレアチニンとの関係

(5) PEG 修飾 D-セリンデヒドラターゼによるマウス体内 D-セリン濃度の制御

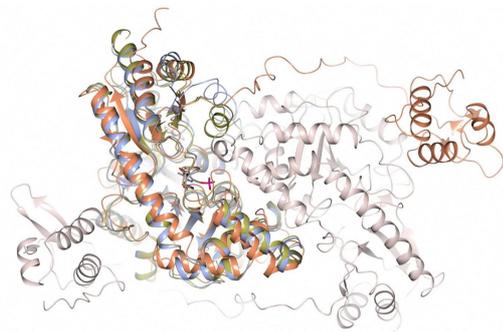
PEG 修飾によって免疫原性を低下させた Dsd をマウスに静脈注射し、脳内 D-Ser 濃度に与える影響を検証した。この結果、大脳における D-Ser 濃度については Dsd 投与群と非投与群で差が認められなかったが、海馬において投与群では有意な D-Ser 濃度の低下が認められた。



なお図は PEG 化 Dsd 投与による海馬での D-Ser の減少を示す。

(6) D-アミノ酸を認識する細菌転写制御因子の構造解析

本研究は当初の研究計画には無く、枯草菌の *gabTD* オペロンの転写を制御する GabR の解析中に偶然見出された現象に基づき進めているものである。X 線結晶構造解析の結果では、GabR はヘリックス-ターン-ヘリックス構造をもつ N-末端側の DNA 結合ドメインと、PLP を補酵素とするアミノ基転移酵素と相同性を示す C-末端側ドメインがリンカーで結ばれた構造を有している。C 末端ドメインのリジン残基には PLP が結合しており、GABA とシッフ塩基を形成することにより GabR の構造変化をもたらす。PLP と GABA のシッフ塩基形成は吸収スペクトルを変化させるが、インタクトな GabR では GABA のみがスペクトル変化を起こす。C 末端側ドメインに相当するペプチドのみを大腸菌に発現させた場合、このペプチドは可溶性画分に主としてダイマーとして得られた。PLP を保持するこのペプチドは GABA 以外にも D-Ala や D-Gln などの D-アミノ酸によってもスペクトルを変化させた。この結果、単独で発現させた C 末端ドメインは D-アミノ酸に親和性の高い構造を有するものと予想され、現在未知の D-アミノ酸レセプターの研究のヒントとなるものと考えられた。



GabR の立体構造

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)

(1) PEGylated D-serine dehydratase as a D-serine reducing agent. Ito T, Takada H, Isobe K, Suzuki M, Kitaura Y., Hemmi H., Matsuda T, Sasabe J., Yoshimura T., (2015) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 116, 34-39. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.044. (査読有)

(2) A new member of MocR/GabR-type PLP-binding regulator of D-alanyl-D-alanine ligase in *Brevibacillus brevis*. Takenaka T, Ito T, Miyahara I, Hemmi H., Yoshimura T. (2015) *FEBS J.* 282:4201-4217. doi: 10.1111/febs.13415. (査読有)

(3) Role of the aminotransferase domain in *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator. Okuda K, Kato S, Ito T, Shiraki S, Kawase Y, Goto M, Kawashima S, Hemmi H., Fukuda H, Yoshimura T. (2015) *Molecular Microbiology* 95, 245-257. doi: 10.1111/mmi.12861 (査読有).

(4) Domain characterization of *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator. Okuda K, Ito T, Goto M, Takenaka T, Hemmi H., Yoshimura T. (2015) *J Biochem.* 158, 225-234 doi: 10.1093/jb/mvv040. (査読有)

(5) Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111): a putative aspartate racemase? Tanaka-Hayashi A, Hayashi S, Inoue R, Ito T, Konno K, Yoshida T, Watanabe M, Yoshimura T., Mori H. (2015) *Amino Acids.* 47, 79-86. doi: 10.1007/s00726-014-1847-3. (査読有).

(6) Reaction mechanism of Zn²⁺-dependent D-serine dehydratase: role of a conserved tyrosine residue interacting with pyridine ring nitrogen of pyridoxal 5'-phosphate. Ito T., Matsuoka M., Koga K., Hemmi H., Yoshimura T. (2014) *J. Biochem.* 156, 173-180. doi: 10.1093/jb/mvu035. (査読有).

(7) 真核生物型セリンラセマーゼの反応機構 吉村 徹、伊藤智和 (2014) *Vitamins* 88 425-428 (総説 査読有).

(8) Conserved pyridoxal protein that regulates Ile and Val metabolism. Ito T, Imori J, Takayama S, Moriyama A, Yamauchi A, Hemmi H., Yoshimura T. (2013). *J Bacteriol* 195, 5439-5449 doi: 10.1128/JB.00593-13. (査読有)

(9) Catalytic mechanism of serine racemase from *Dictyostelium discoideum*. Ito T,

Maekawa M, Hayashi S, Goto M, Hemmi H., Yoshimura T. (2013). *Amino Acids* 44, 1073-1084. doi: 10.1007/s00726-012-1442-4. (査読有)

〔学会発表〕(計 27 件)

(1) D-セリン分解の生物学と酵素学 吉村 徹 (2015) 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会 (滋賀県立大学 10月23日)

(2) Properties of GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator of *Bacillus subtilis*, and alteration of its ligand specificity. Yoshimura T. (2015) 18th Japanese-German Workshop Enzyme Technology (Kyoto University, September 13-15)

(3) Properties of GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator of *Bacillus subtilis* Yoshimura T. (2014) Joint Symposium: New Trends in Science and Engineering of Enzyme and Microbiology for Sustainable Society (Nara, Nov. 6)

(4) D-アミノ酸オキシダーゼとその応用 吉村 徹 (2013) 第 65 回日本生物工学会大会 シンポジウム (広島市 9月19日)

(5) Eucaryotic D-serine dehydratase: reaction mechanism and application to D-serine assay Yoshimura T. (2013) 17th German-Japan Workshop on Enzyme Technology (Technical University, Hamburg, July 26)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ピリドキサルリン酸濃度の測定方法
発明者: 吉宗 一晃、太田 寛毅、吉村 徹
権利者: 学校法人日本大学、国立大学法人名古屋大学

種類: 方法の発明

番号: 特願 2014-15203(P2014-15203)

出願年月日: 2014 年 1 月 30 日

国内外の別: 国内

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