

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18686

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解明

研究課題名(英文) D-amino acid biological system 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・講師

研究者番号：90584970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類セリンラセマーゼが哺乳類のD-Asp合成酵素の一つであることを見出した。また、D-セリンデヒドラターゼ(Dsd)を用いたD,L-Ser酵素定量法を利用し、尿中D-Ser比を解析した。D-セリンが、ある場合における腎機能低下を予測可能なバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。また、細胞性粘菌Dsd欠損株が示す発達異常の分子機序を解析し、D-セリンとcAMPシグナリングとの関連性を明らかとした。ブナシメジ子実体に新奇なDsd基質D-アミノ酸を見出し、これを(2R,3S)2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acidと同定した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the catalytic and regulatory mechanisms of D-Asp synthetic activity of mammalian serine racemase (SR). Data indicated that SR is one of mammalian D-Asp biosynthetic enzymes. In addition, we analyzed urinary D-Ser using our D-, and L-Ser enzymatic assay method. The results obtained here suggested that D-Ser levels could be used as a predictable biomarker of renal function reduction in some situations. In addition, we studied the molecular mechanism of developmental abnormalities of Dsd-deficient *Dicystotylum* strains and revealed the involvement of D-Ser in cAMP signaling. We found a novel Dsd substrate D-amino acid in the fruiting body of *Bunashimeji* mushroom, and identified it as (2R, 3S) 2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acid.

研究分野：応用生物化学

キーワード：D-セリン D-アスパラギン酸 D-アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

(i) D-Asp は長期増強の形成に関与する他、メラトニンやプロラクチン、テストステロン等のホルモン合成・分泌制御や、精子数やその運動性、卵子の成熟化への寄与など、多岐に亘る生理作用が知られているが、生理作用の機序や必然性はほとんどわかっていない。この一つの理由として、D-Asp が内因的に生成することは示されてきたものの、生合成機構が明らかとされていないことが挙げられる。D-Asp 合成酵素の同定は、D-Asp が示す多様な生理機能の作用機序の解明に資することが予想された。

(ii) D-Ser は、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターや 2 グルタミン酸レセプターのリガンドとして機能し、脳の高次機能発現に重要な役割を果たしている。その詳細は明らかではないものの、D-Ser 量比、特に D-Ser 比は、神経疾患や腎障害の超早期検出のマーカーとしての有用性が示唆される状況にあるが、現行の HPLC による分析は煩雑かつ長時間を要し、この臨床応用は困難であった。D-セリン比は近位尿細管での再吸収率や、ここに発現する D-アミノ酸酸化酵素および D-セリン合成酵素 (セリンラセマーゼ) の発現状態等によって規定されると予想される。腎疾患の進行は糸球体病変そのものよりも尿細管の障害の程度と相関することが知られるため、この点においても、尿中 D-セリン比は尿細管障害の程度を反映可能な新規なマーカーとして期待できると予想された。

(iii) 哺乳類以外の真核生物の多くは D-セリン代謝酵素を有するが、その存在意義はほとんどわかっていなかった。先行研究によって得られた結果から、我々は、D-Ser やその代謝酵素が、発達過程で何らかの重要な生理的役割を有すると考えた。

## 2. 研究の目的

哺乳類をはじめとした真核生物には内因性の D-アミノ酸が存在し、重要な生理機能を示している。本研究では、2 種類の D-Ser 代謝酵素の詳細な酵素学的解析、応用利用、生理機能解析によって、真核生物の D-アミノ酸バイオシステムを理解する。具体的には、(i) 哺乳類セリンラセマーゼ (SR) に見出した D-Asp 合成活性の触媒・制御機構の解析による、D-Asp 生合成機構の基盤情報の所得。(ii) D-セリンデヒドラターゼ (Dsd) を用いた D,L-Ser 酵素定量法のキット化による D,L-Ser 動態解析の飛躍的な加速と、D-Ser 比の腎障害マーカーとしての可能性の検証。(iii) 細胞性粘菌 Dsd 欠損株が示す発達異常の分子機序の解析や、プナシメジ子実体的な Dsd 基質 D-アミノ酸の同定や局在解析による、非哺乳類における D-アミノ酸の生理的意義の解明。について考究する。

## 3. 研究の方法

(i) 哺乳類 SR に見出した Asp ラセマーゼ活性の触媒機構について、部位特異的変異を用いて解析し、その反応が Ser のラセマーゼ活性と同様な反応機構、制御機構によって進行するか検証する。また、SR が示す微弱な Asp ラセマーゼ活性の生理的意義・重要性を、SR 過剰発現細胞、欠損細胞を用いて検証する。

(ii) D-セリン測定の高速度な迅速化を可能とする、新規 D-セリンサイクリングアッセイ法の確立を検証する。腎障害自然発症モデルラットを用い、血中および尿中 D-セリン動態の経時的な測定を行うことで、D-セリン動態と腎障害等の循環系等の疾患との関連性を明らかとする。腎障害を含む循環系疾患患者における尿中 D-セリン動態を解析する。

(iii) 細胞性粘菌由来 Dsd 欠損株が示す発達異常の分子機序を、菌体内アミノ酸分析や、発達に関与するシグナルカスケードタンパク質の発現量解析などによって解析する。また、プナシメジ子実体に特異的に存在する Dsd 基質 D-アミノ酸を各種 D-アミノ酸代謝酵素の反応特性や質量分析によって同定する。プナシメジの生長段階における当該アミノ酸の動態・局在解析を行い、当該アミノ酸の由来、生理機能等についての知見を得る。

## 4. 研究成果

(i) 哺乳類 SR (マウス由来酵素) の Asp ラセマーゼ活性の動力学的解析を行ったところ L-Asp D-Asp 方向のラセミ化活性の  $k_{cat}$  および  $K_m$  値が  $0.05 \text{ min}^{-1}$  および  $2.2 \text{ mM}$  であった。この値は以前より知られる Ser のラセマーゼ活性の数百倍低いものであった。また、SR の Ser のラセミ化活性は PLP 結合 Lys 残基とこれと PLP を挟んで対合する Ser 残基 (マウス酵素においては Ser84) が関与する二塩基機構により進行することが知られている。D-Ser からのプロトン授受を担う Ser84 の変異体 Ser84Ala を作製し、同様に Asp のラセミ化活性を検証したところ、Asp のラセミ化活性が完全に消失した。また、SR の活性化因子として知られる  $\text{Mg}^{2+}$  や ATP によって SR の Asp ラセミ化活性は上昇した。SR が担う Asp のラセミ化活性が Ser の場合と同様の機構によって進行することが示唆された。

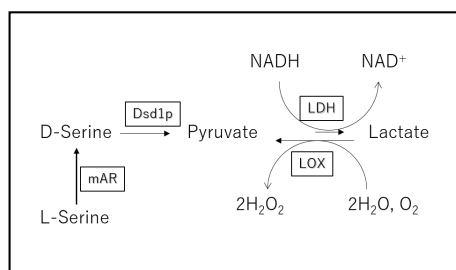
SR が示す微弱な Asp ラセマーゼ活性が、生体内における D-Asp 供給に寄与するか検証する目的で、SR 欠損マウス、SR 欠損細胞を用いて、細胞内 D-Asp レベルを検証した。PC12 細胞における SR の欠損は PC12 細胞における D-Asp レベルおよび PC12 細胞が示す D-Asp 合成能に影響を与えなかった。SR 欠損マウスにおいては、一部の臓器 (前頭皮質や海馬) において D-Asp レベルの有意な低下が認められた。一方で SR 欠損によって精巣や小脳における D-Asp レベルに顕著な影響は認められなかった。前頭皮質や海馬は SR の発現量が高いことが知られている。今回得られた結果は、

SRは哺乳類におけるD-Asp合成酵素の一つであることを示唆した。さらに、哺乳類にはSRに加え、未だ未同定のD-Asp合成酵素が存在することが示唆された。

以上の結果は、富山大学・森寿教授との共同研究として行い、その成果は、以下のように報告した。

Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis. (2016) Ito T, Hayashida M, Kobayashi S, Muto N, Hayashi A, Yoshimura T, Mori H. *J Biochem.* 160:345-353

(ii) 腎疾患においては、いかに早期に腎疾患患者を選別し治療を導入するかが極めて重要である。しかしながら、既存の指標(Cre, BUN, eGFR)では、既にある程度症状が顕在化している状況のみが検出可能であり、より高感度なマーカー分子の同定が望まれている。ヒト血中におけるD-セリンレベルと腎障害の関連性が報告されつつある。ヒト尿中にもD-セリンは存在するが、これと腎障害等との関連性は報告されていない。本研究では、乳酸脱水素酵素、および乳酸オキシダーゼを用いた新規のサイクリングアッセイ法の可能性を検証した(下図参照)。本法では、10min程度での測定が可能となる可能性があり、また、その測定感度を任意に増幅できると予想された。



検証の結果、標品を用いた反応系システムの構築が可能であった。約10min程度で数 $\mu$ Mの標品の定量が可能であった。本法は使用するLDHの量や、反応時間の延長によるエンドポイント定量によって、その感度を任意に増幅可能である点が特徴であるが、これらによる感度の増幅には至らなかった。更なる反応条件の検証が今後の課題である。

D-セリンの腎障害検出マーカーとしての可能性の検証を検証する目的で、腎障害モデルラットを用いたD-セリンと腎障害の因果関係を解析した。糖尿病性腎障害モデルラット(OLETF)およびコントロールラット(LETO)を用い、D-セリン動態(D-セリン量、D-セリン比、D-セリン/クレアチニン比)や他のマーカー分子、SRやD-アミノ酸オキシダーゼなどのD-セリン代謝酵素などの動態解析を行い、D-セリンと腎障害の因果関係の関連性を検証した。本研究は、名古屋大学大学院・生命農学研究科、下村吉治教授、北浦靖之講師らとの共同研究として行った。

(iii) プナシメジ子実体に特異的に存在するDsd基質D-アミノ酸の同定を行った。当該アミノ酸がDsdによって異化されることから、当該アミノ酸はC $\beta$ 位に何らかの脱離基を有する可能性が示唆された。そこで、当該アミノ酸をDsdによって対応するケト酸へと変換し、その後、得られたケト酸をD-アミノ酸トランスアミナーゼ(DAAT)と作用することで、C $\beta$ 位に脱離基を有さないD-アミノ酸が再生すると考えた。DAAT処理後のアミノ酸をアミノ酸分析によって解析したところ、この溶出時間がD-ホモセリンのそれと一致した。また、Dsd処理前のD-アミノ酸およびDAAT再生後のD-アミノ酸を6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシニルイミド(AQC試薬)によって誘導体化し、これをESI-MS解析に供したところ、当該アミノ酸の分子量が136である可能性が示唆された。これら結果から、当該D-アミノ酸が2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acidである可能性が示唆された。また、当該アミノ酸のアミノ酸分析における溶出時間は、酵素的に合成した(2R,3S)体の2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acidのそれと完全に一致した。以上のことから、プナシメジに存在するDsd基質アミノ酸を(2R,3S)2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acid(D-ADHB)と同定した。さらに、生長過程におけるD-ADHBの動態解析を行った。D-ADHBは子実体形成期に内因的に合成されることが明らかとなった。当該アミノ酸が何らかの形で子実体形成に関与する可能性が考えられた。

本研究は、香川大学農学部の麻田恭彦教授らとの共同研究として行った。得られた成果は、以下のように報告した。

Occurrence of the (2R,3S)-Isomer of 2-Amino-3,4-dihydroxybutanoic Acid in the Mushroom *Hypsizygus marmoreus*. (2017) Ito T, Yu Z, Yoshino I, Hirozawa Y, Yamamoto K, Shinoda K, Watanabe A, Hemmi H, Asada Y, Yoshimura T. *J Agric Food Chem.* 65:6131-6139.

また、細胞性粘菌のDsd欠損株が示す発達異常の詳細を検証し、Dsdが同菌における主要なD-セリン分解酵素として機能すること、Dsdの欠損が、細胞内D-セリンの蓄積をもたらし、アデニル酸シクラーゼの発現、胞子形成率、などに影響を与えることを見出した。Dsd(もしくはD-セリン)は細胞内で、cAMPシグナリングカスケードの恒常性維持に関与することが見出された。以上の研究成果は、以下のように報告した。

Ito T, Hamauchi N., Hagi T., Morohashi N., Hemmi H., Sato G Y., Saito T., Yoshimura T. (2018) D-Serine metabolism and its importance in development of *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology.* 9:784

## 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 3 件)

1. Ito T., Hamauchi N., Hagi T., Morohashi N., Hemmi H., Sato G Y., Saito T., Yoshimura T. (2018) D-Serine metabolism and its importance in development of *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology*. 9:784 doi: 10.3389/fmicb.2018.00784. (査読有)
2. Ito T., Yu Z, Yoshino I, Hirozawa Y, Yamamoto K, Shinoda K, Watanabe A, Hemmi H, Asada Y, Yoshimura T. (2017) Occurrence of the (2R,3S)-Isomer of 2-Amino-3,4-dihydroxybutanoic Acid in the Mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *J Agric Food Chem*. 65:6131-6139. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01893. (査読有)
3. Ito T., Hayashida M, Kobayashi S, Muto N, Hayashi A, Yoshimura T, Mori H. (2016) Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis. *J Biochem*. 160:345-353 DOI: 10.1093/jb/mvw043 (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 武藤菜摘、伊藤智和、邊見久、吉村徹「D-アミノ酸合成酵素のファンクショナルクローニング系の開発」2018 年 3 月、2018 年度日本農芸化学会大会
2. 戸野真由香、伊藤智和、邊見久、吉村徹「D-セリンデヒドラターゼの基質となるヒト尿中未知アミノ酸の同定」2018 年 3 月、2018 年度日本農芸化学会大会
3. 堀蘭、伊藤智和、山内綾子、邊見久、吉村徹「E. coli ビタミン B6 結合タンパク質 YggS の機能解明: glyA との合成致死性の解析」2018 年 3 月、2018 年度日本農芸化学会大会
4. 伊藤智和「D-アミノ酸研究における代謝酵素の応用利用」2018 年 2 月、D-アミノ酸学会第三回ワークショップ
5. 戸野真由香、伊藤智和、邊見久、吉村徹「D-セリンデヒドラターゼの基質となるヒト尿中未知アミノ酸の同定」2017 年 12 月、ConBio2017
6. 伊藤智和、吉村徹「高度に保存された機能未知タンパク質の機能解析」2017 年 12 月、ConBio2017
7. 伊藤智和、堀蘭、山内綾子、吉村徹、邊見久「E.coli の PLP 結合タンパク質 YggS の生理機能: 欠損株が示すホモセリン毒性の要因の解析」2017 年 9 月、酵素・補酵素研究会
8. Tomokazu Ito, Zhuoer Yu, Issei Yoshino, Yurina Hirozawa, Kana Yamamoto, Akira Watanabe, Hisashi Hemmi, Yasuhiko Asada, Tohru Yoshimura 「Unusual D-Amino acids in mushroom」2017 年 9 月、International Conference of D-Amino

Acid Research (IDAR2017)

9. 伊藤智和・余卓尔・吉野一晴・渡邊彰・邊見久・麻田恭彦・吉村徹「ブナシメジに存在する新奇 D-アミノ酸の同定」2017 年 3 月 19 日、日本農芸化学会
10. 伊藤智和・余卓尔・吉野一晴・渡邊彰・邊見久・麻田恭彦・吉村徹「ブナシメジに存在するユニークな D-アミノ酸の同定と生長過程における動態解析」2016 年 9 月 14 日、D-アミノ酸学会
11. 武藤菜摘・伊藤智和・邊見久・川原幸一・吉村徹「哺乳類における D-アスパラギンサンの生合成機構と抗酸化作用の解析」2016 年 05 月 21 日、日本生化学会中部支部例会・シンポジウム

〔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:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://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・講師  
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:  
(4)研究協力者  
( )