

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19380059
 研究課題名(和文) 新規バイオフィクター、D-アミノ酸の生合成機構と分子機能：哺乳動物への展開
 研究課題名(英文) Biosyntheses and molecular functions of novel biofactors, D-amino acids: from microorganisms to mammals
 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

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* に新奇 D-セリンデヒドラターゼを見出し、その酵素学的性質を解明した。また同酵素の高い基質特異性を利用した D-セリンの新規酵素定量法を構築した。一方、BSE のモデル動物であるスクレイピー感染ハムスターで、病状の進行と各種臓器における D-アミノ酸濃度の変化を検討した。さらに D-アミノ酸と発生の関係を明らかにするため、単細胞から多細胞へと生活環を変化させる細胞性粘菌、*Dictyostellium discoidium* をとりあげ、同菌が 3 種の D-セリン代謝酵素、すなわち動物型セリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ、D-アミノ酸オキシダーゼを有することを明らかにした。さらに、細菌のアラニンラセマーゼや酵母の D-セリンデヒドラターゼと一次構造上の相同性を持ち、細菌から哺乳動物まで広く分布する機能未知タンパク質(UPF0001)の *E. coli* ホモログである YggS の機能解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we found a novel D-serine dehydratase in *Saccharomyces cerevisiae*, and studied its properties. With this enzyme exhibiting high substrate specificity for D-serine, we constructed a novel D-serine assay system. We examined the relationship between the concentration of D-amino acids in the various organs of a scrapy-infected hamster and the progress in the disease. We also studied the D-serine metabolism in a slime cellular mold, *Dictyostellium discoidium*, to understand the role of D-serine in development, and found that the cell contains serine racemase catalyzing D-serine synthesis, and D-serine dehydratase and D-amino acid oxidase catalyzing D-serine degradation. In this study, we also examine the function of *E. coli* YggS, a homolog of the unknown mammalian protein, PROSC, which exhibits the similarity in the primary structure with the bacterial alanine racemase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：D-アミノ酸、D-セリンデヒドラターゼ、D-セリン定量、ピリドキサルリン酸、スクレイピー、細胞性粘菌、*Saccharomyces cerevisiae*、*Escherichia coli*

1. 研究開始当初の背景

真核生物にも様々な遊離 D-アミノ酸が存在し、多様な機能を果たしていることが明らかとなっている。例えば、D-セリンは哺乳動物脳内に存在し、記憶・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 (NMDA) レセプターのコアゴニストとして、L-グルタミン酸と協同して同レセプターを活性化する。これに関連して、統合失調症やアルツハイマー病患者の脊髄液や血液中の D-セリン含量の低下が報告されている。一方、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者では D-セリン濃度が上昇しており、D-セリンによる NMDA レセプターの過剰な活性化が神経細胞壊死の原因となる可能性が示唆されている。D-アスパラギン酸はプロラクチンなどの脳ホルモンの分泌制御に関係する他、ヒトの精子や卵巣に存在して、体外受精における卵子の受精率などに関係している。一方、D-アラニンには膵臓のランゲルハンス島や脳下垂体前葉に局在し、インスリンや副腎皮質刺激ホルモンの機能発現への関与が示唆されている。このように D-アミノ酸は哺乳動物において様々な機能を担うと考えられ、病態との関連も深い。また、これら D-アミノ酸は動物組織の発達や節足動物の変態などに応じて一過的な増減を示すことから、発生・分化との関わりも予想されている。しかし、本研究を開始した時点では、その機能が分子レベルで解明された D-アミノ酸は D-セリンのみで、D-アスパラギン酸、D-アラニンについては、生合成機構も未だ不明な状況にあった。我々は、真核生物での D-アミノ酸機能の理解のためには、D-アミノ酸の生合成や分解系、およびそれらの制御機構の解明が必須であると考え、真核生物における D-アミノ酸の生合成経路の解明を目指した。また研究を行う過程で得られた知見に基づき、哺乳動物における D-アミノ酸の役割や、D-アミノ酸の動態と病態との関連を研究するツールの開発を試みた。以下に本研究の成果を 5 項目に分けて報告する。

2. 研究の目的

(1) *Saccharomyces cerevisiae* の新奇 D-セリンデヒドラターゼの酵素学的解析

原核細胞では、D 型アミノ酸はアミノ酸ラセ

マーゼの作用により L 型アミノ酸から合成される。アミノ酸ラセマーゼの一種であるアラニンラセマーゼは、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) に依存して、ペプチドグリカンの構成成分である D-アラニンの生合成を触媒する。アラニンラセマーゼは一部の例外を除き細菌以外では検出されていないが、出芽酵母、*Saccharomyces cerevisiae* はアラニンラセマーゼの N 端ドメインと類似の構造をもつと予想される 2 種類のタンパク質を有している。我々はこの 2 つの機能未知タンパク質、Ygl196wp および Ybl036cp が真核生物における D-アミノ酸生合成を担う可能性を検討した。その結果、Ygl196wp が新奇の D-セリンデヒドラターゼをコードすることを見出したため、その酵素学的性質の解明を行った。

(2) *S. cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリンの新規酵素定量法の構築

D-セリンは哺乳類脳内で NMDA レセプターのコアゴニストとして、記憶や学習などの脳の高次機能に重要な役割を果たしている。上述のように、脊髄液や血中の D-セリン量、D-セリンの全セリンに対する量比が、統合失調症や ALS 病態と関連する可能性が指摘されている。また、ヒト尿中には生理的意義や由来の不明な D-セリンが、 $30 \sim 379 \mu\text{M}$ と高濃度で排出されており、D-セリンが尿路疾病原因大腸菌のコロニゼーションや毒性遺伝子発現のシグナルとして働く可能性が示唆されている。これらの結果は D-セリン量の動態が脳や腎臓の疾患のマーカーとなる可能性を示すものである。

D-セリンを含めて、現在 D-アミノ酸の分析のほとんどがガスクロマトグラフィー法や HPLC 法によって行われている。どちらの方法でも各 D-, L-アミノ酸を光学活性試薬によりジアステレオマーとし、非光学活性のカラムにより分離する。サブピコモルのアミノ酸の同時分析が可能である一方で、アミノ酸の抽出や分離条件の設定などに熟練を要し、何より 1 サンプル当たりの分析時間が長いという欠点もある。そこで本研究では、DsdSC の D-セリンに対する高い特異性を利用し、簡便な D-セリンの酵素定量法を構築した。

(3) スクレイピー感染ハムスターにおける D-アミノ酸の動態

ヒツジやヤギにおいて自然発症するスク

レイピーは、プリオンタンパク質 (prion protein ; PrP) の感染によって発症する致死性および伝播性海綿状脳症・プリオン病のひとつである。「プリオン仮説」によると、宿主遺伝子にコードされている膜タンパク質 PrP は、その高次構造に変化を起こし特異な構造をとると感染性を獲得し、プリオン病を引き起こすと考えられている。この異常 PrP の増殖は中枢神経細胞の変性をともなう。神経細胞に隣接するグリア細胞は D-セリン生合成の場であるため、スクレイピーと生体内 D-セリン量の関係には興味を持たれる。本研究では、スクレイピー感染ハムスターをモデルとして、スクレイピーの進行にともなう組織中 D-セリンおよび D-アスパラギン酸量の動態を観察した。

(4)細胞性粘菌の D-アミノ酸代謝関連酵素に関する研究

前述のように、D-セリンが発生・発達に関与する可能性がある。この検討のため、単細胞と多細胞の二つの生活環を持つ細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* に着目した。*D. discoideum* は下等真核生物の一種で、通常は細菌を餌とし単細胞アメーバの状態が増殖する。しかし、飢餓状態に陥ることで細胞同士が集合をはじめ、多細胞体を形成し、最終的に子実体と呼ばれる構造体を形成する。そのユニークな生活環のため、*D. discoideum* は発生・分化のモデル系として研究に用いられている。ゲノム解析の結果では、*D. discoideum* には哺乳動物のセリンラセマーゼや、D-アミノ酸の分解系である D-アミノ酸オキシダーゼ、真核細胞型 D-セリンデヒドラターゼのホモログが存在する。このことから、*D. discoideum* は D-アミノ酸、特に D-セリンの動態と代謝酵素群を研究する良いモデルとなると考えられた。そこで本研究では、*D. discoideum* における D-アミノ酸代謝関連酵素、特に分解系である D-セリンデヒドラターゼおよび D-アミノ酸オキシダーゼのホモログについて酵素学的性質を検討した。また、セリンラセマーゼを含めたこれら遺伝子発現の状況を、*D. discoideum* の生活環の各段階で検討した。

(5) *E. coli* YggS タンパク質の機能解明

出芽酵母 *S. cerevisiae* の機能未知タンパク質 Ybl036cp を含む UPF0001 ファミリータンパク質は、微生物からヒトまで広く保存されており、何らかの生理的意義を担うと予想される。Ybl036cp は PLP を結合し、その構造は 8 つの連続した α/β モチーフから成る $(\beta/\alpha)_8$ -TIM バレル構造をとる。Ybl036cp は PLP 酵素の fold-type III に分類される細菌アラニンラセマーゼなどの N 末端ドメインと相同性を示す。われわれは、Ybl036cp とそ

のホモログである哺乳動物 PROSC および *E. coli* の YggS について研究し、*yggS* を欠損した大腸菌が嫌気条件下では生育に遅れが生じるなどを見出している。本研究では、*E. coli* の *yggS* ならびに *yggSTUVW* オペロンの機能解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) *Saccharomyces cerevisiae* の新奇 D-セリンデヒドラターゼの酵素学的解析

N-末端側、または C-末端側にヒスチジンタグをつけた *S. cerevisiae* の Ygl196wp タンパク質を大腸菌で大量発現させ、ニッケルキレートカラム、DEAE Toyopearl、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。D-セリンデヒドラターゼのアッセイは、D-セリンより生成するピルビン酸を、乳酸脱水素酵素により乳酸に転換する過程で起こる、NADH の 340nm の吸光度の減少を追跡することで行った。

(2) *S. cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリンの新規酵素定量法の構築

DsdSC の調製と酵素のアッセイは本項(1)に示した方法で行った。本研究では D-セリンとともに全セリン量 (D-セリン+L-セリン) の定量を酵素的に行う手法も構築した。これは、L-セリンを酵素的にラセミ化した後、DsdSC により定量する方法である。このセリンのラセミ化活性を有する酵素として、*Geobacillus stearothermophilus* 由来のアラニンラセマーゼの Tyr354 をグルタミンに変換した Y354N 変異型酵素を部位特異的変異により作成した。

(3) スクレイピー感染ハムスターにおける D-アミノ酸の動態

スクレイピープリオンタンパク質 263k 株に感染したハムスターの脳をホモジナイズし、これをスクレイピー脳液とした。エーテル麻酔下において、シリアンハムスター Slc:Syrian (SPF) 3 週齢オスに、脳液または PBS 20 μ L を右側脳内に接種した。接種後 76 日目に、プリオン接種した個体の脳における抗 PrP^{Sc} 抗体 3F4 による染色で、スクレイピー感染を確認した。接種直後、接種後 20、40 および 60 日後に、エーテル麻酔下において採血することでハムスターを致死させ、脳、肝臓、腎臓、脾臓を採取した。採取した組織ホモジネートに TCA を加えて除タンパク後、ジエチルエーテルで抽出し、フィルター処理したものをアミノ酸分析用サンプルとした。アミノ酸は、蛍光試薬として *o*-フタルジアルデヒドを、キラル誘導試薬として Boc-Cys-OH を用いて蛍光ジアステレオマーに誘導体化した後、HPLC 法により分別定量した。

(4)細胞性粘菌のD-アミノ酸代謝関連酵素に関する研究

データベース検索により見出した *D. discoideum* の哺乳動物型セリンラセマーゼ、真核細胞型D-セリンデヒドラターゼ、D-アミノ酸オキシダーゼのホモログ遺伝子(それぞれ DDB0230209, DDB0215298, DDB0238431、これらの遺伝子は理研より分与された)の発現ベクターを構築し、*E. coli* Rosseta II (DE3) 株を使用して大量発現させた。各酵素はヒスチジンタグを有しているためニッケルキレートカラムを用いて精製した。D-セリンデヒドラターゼ活性のアッセイには、デヒドラターゼ反応によってD-セリンから生じるアンモニア(NH₃)を、2-オキシグルタル酸とグルタミン酸脱水素酵素(GluDH)を用いてL-グルタミン酸へ転換し、その過程で消費されるNADHの減少を測定するGluDH共役アッセイ系を用いた。D-アミノ酸オキシダーゼは、D-アミノ酸を分解する際に生じる過酸化水素量を測定することでアッセイした。

D. discoideum 発生の諸段階における各酵素遺伝子の転写の解析には、Ax-2株を用いた。単細胞、集合体、マウンド、移動体、子実体の各段階の全RNAを抽出し、各酵素のゲノムDNAに対応するプライマーを用いてRT-PCRを行い、その際のDNAの増幅により酵素遺伝子の転写の有無を推定した。

(5) *E. coli* YggS タンパク質の機能解明

実験には *E. coli* MG1655 株およびカリウムのトランスポーターを欠落させた TK4240 株を用い、それらの $\Delta yggS$ 株および $\Delta yggS$ -T 株は λ red 法により作成した。YggS のブルダウンアッセイは、C 末端に His-tag を付加した GST 融合 YggS を Glutathione Sepharose 4B レジンに吸着させた bait とした後、嫌気培養した MG1655 株の細胞抽出液 (prey) を結合させた。同レジンに吸着させた状態で GST-tag を Thrombin により切断し、YggS \cdot His と相互作用するタンパク質複合体を溶出した。タンパク質-タンパク質相互作用は SDS-PAGE 後、CBB 染色もしくは銀染色で確認した。アミノ酸分析には Shimadzu LC20A アミノ酸分析システムを用いた。

4. 研究成果

(1) *Saccharomyces cerevisiae* の新奇 D-セリンデヒドラターゼの酵素学的解析

S. cerevisiae の機能未知遺伝子、YGL196W を大腸菌にクローニングし、大量発現させることに成功した。遺伝子産物である Ygl196wp はホモダイマー構造を有し、PLP に依存して D-セリンをピルビン酸とアンモニアに分解する D-セリンデヒドラターゼ

活性を示した。PLP に依存する酵素群は、その構造から 5 群 (fold-type I - V) に分類することができるが、異なる fold-type に属する酵素は構造上の共通性を示さず、それぞれ異なる祖先タンパク質から進化したものと考えられる。大腸菌 DsdA に代表されるバクテリア型 D-セリンデヒドラターゼはグリシンクラスターなど特有のコンセンサス配列を有し fold-type II に属している。これに対し、DsdSC および、真菌や一部の脊椎動物など真核生物に分布するそのホモログは、fold-type III に属するアラニラセマーゼと一次構造上の相同性を示すが、バクテリア型 D-セリンデヒドラターゼを含め、セリンデヒドラターゼ活性を有する他の酵素とは構造を異にする。すなわち、DsdSC とこれら酵素は収斂的な進化によりセリンデヒドラターゼ活性を得たものと考えられる。DsdSC は D-セリンの他、D-トレオニン、 β -クロロ-D-アラニンに、それぞれ D-セリンの 3%、2% 程度の活性を示す一方、L-セリン、L-トレオニンなど L 型アミノ酸には全く反応しなかった。精製 DsdSC はタンパク質 1 mol あたり、1 mol の Zn²⁺ を結合しており、EDTA 処理によって大部分の活性を失い、Zn²⁺ の添加により活性を回復した。この EDTA 処理酵素の活性化は Zn²⁺ に特異的で、Ca²⁺ や Mg²⁺ など他の二価金属や K⁺ や Na⁺ などの一価金属では認められなかった。また、DsdSC の反応性に対する Zn²⁺ の影響は基質により異なった。すなわち、D-セリンと D-トレオニンのデヒドラターゼ反応は Zn²⁺ に依存する一方、 β -クロロ-D-アラニンの α, β -脱離反応に対する酵素活性は EDTA 処理により変化せず、Zn²⁺ の影響を受けなかった。¹H-NMR を用いて基質 Ca プロトンの引き抜きと、その後起こるヒドロキシル基脱離速度を分別測定した結果、Ca プロトンの引き抜き速度はヒドロキシル基の脱離速度より少なくとも 3 倍速いこと、Zn²⁺ は両速度を高めるが、特にヒドロキシル基脱離のステップを高めていることが明らかとなった。またトリプトファン蛍光の測定結果から、EDTA 処理は酵素に微細な構造変化を引き起こしていることが示唆され、Zn²⁺ は Ca プロトンの引き抜きの後の、C β 位脱離基の脱離能を高める為に必要な構造の維持に寄与するものと予想された。

(2) *S. cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリンの新規酵素定量法の構築

本研究で構築した D-セリン定量法では、D-セリンを DsdSC により分解し、生成したピルビン酸を乳酸脱水素酵素と共役させ、付随しておこる NADH の酸化による 340 nm の吸光度の減少から D-セリン量を算出する。本法は約 10 μ M 程度までの D-セリン定量が可能であり、反応液中に D-セリンの 10 倍量の D-

L-アラニン、L-セリン、L-トレオニンや、40%程度までの血清成分があっても影響を受けなかった。また本法はセリンに対する触媒能を上昇させた Y354N 変異型アラニンラセマーゼを共役させることで、D-、L-セリンの同時定量にも適用可能であった。本法はヒト尿中の D-セリン定量やハムスター脳内の D-セリン量の定量に適用可能であることが確認された。

(3) スクレイピー感染ハムスターにおける D-アミノ酸の動態

プリオンタンパク質接種ハムスターでの行動異常は、接種後 72 日前後から観察される。一方、接種約 30 日で、脳内での空胞形成が始まる。もしスクレイピーの進行により脳内での D-セリン生合成に障害が起これば、接種後 30 日前後から、脳におけるセリンの D/(D+L)比に影響が見られると予想される。接種直後のハムスター脳内セリンの D/(D+L)量比は、未接種のハムスターともども約 20%で、他組織と比較して非常に高かった。このセリンの D/(D+L)比は、プリオン接種後 60 日を経ても変化しなかった。脳以外の組織でのセリンの D/(D+L)比は数%前後であったが、腎臓では、プリオン未接種個体（コントロール）の 40 日目以降でセリンの D/(D+L)比が 2 倍以上増大したのに対し、スクレイピー感染個体においては日数経過後も同比は 5%前後であった。コントロール個体腎臓でのセリン D/(D+L)比の経時的な増加が正しいとすれば、スクレイピー感染個体腎臓中セリンの D/(D+L)比が増加しなかった理由として、腎臓への D-セリン蓄積機構がスクレイピーにより破壊された可能性や、腎臓における D-セリン分解系である D-アミノ酸オキシダーゼの発現や活性が増大した、あるいは合成系であるセリンラセマーゼの発現や活性が減少したなどの可能性も考えられる。

一方、コントロール個体とスクレイピー個体との間に、アスパラギン酸の D/(D+L)比の差異は観察されなかった。脳においては、スクレイピー個体およびコントロール個体の両方で、接種直後 (1.5~2.0%) と比較して、20 日目ではアスパラギン酸の D/(D+L)比が半分程度 (1.0%前後) にまで減少し、以降 60 日目までその値を維持していた。スクレイピー感染個体とコントロール個体の間に差異が見られなかったことから、この経時変化はエイジングによる可能性がある。その他の組織において、コントロール個体とスクレイピー個体との間にアスパラギン酸の D/(D+L)比の相違や経時変化は観察されなかった。

(4) 細胞性粘菌の D-アミノ酸代謝関連酵素に関する研究

DDB0215298、DDB0238431 の遺伝子産物が、それぞれ D-セリンデヒドラターゼ活性、D-アミノ酸オキシダーゼ活性を示したことから、両遺伝子の機能が確認された。

粘菌 D-セリンデヒドラターゼの至適 pH は 8.0、おおよそ 20°C までは安定であった。同酵素活性は EDTA 処理によって約 10% まで減少し、亜鉛の添加によって回復した。この性質は *S. cerevisiae* D-セリンデヒドラターゼと同様である。同酵素は D-セリンの他、D-スレオニンおよび β -Cl-D-アラニンを基質とし、L-セリンに対してもわずかに活性を示した。

粘菌の D-アミノ酸オキシダーゼの最適 pH は 8.5 で、熱安定性は低く、D-アラニンを最も良い基質とする他、D-メチオニン、D-プロリン、D-ロイシン、D-バリンなどの非極性アミノ酸に対し高い活性を示した。なお L-アミノ酸は基質としなかった。

D. discoideum の発生の諸段階におけるセリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ、D-アミノ酸オキシダーゼの各遺伝子の転写を検討した結果、単細胞期では、合成系のセリンラセマーゼと分解系の D-セリンデヒドラターゼ、および D-アミノ酸オキシダーゼがともに発現していることが確認された。これに対して、細胞性粘菌が多細胞体を形成し、生活環の段階が進行するにつれて各酵素遺伝子の転写量は低下した。

(5) *E. coli* YggS タンパク質の機能解明

精製 YggS を用いて各種 D-、L-アミノ酸との反応を検討したが、好気・嫌気条件下ともいかなる酵素活性も認められなかった。Hara らによって、*yggS* を欠損させると、大腸菌の ATP 合成活性が野生株に比べて 2.2 倍に増大するという報告がなされており、*yggS* が何らかの機構で菌体内代謝に関わることは確かである。しかし *yggS* を欠損させた大腸菌のメタボローム解析や含有アミノ酸量を解析した結果では、代謝産物量に野生株との顕著な差は見られなかった。ただし今回の実験結果からは、YggS が何らかの代謝酵素の一つであり、その欠損が他のサルベージ経路によって相補されている可能性は否定できない。

プルダウンアッセイの結果では、YggS と 50S ribosomal protein (L1、L9) との相互作用が観察された。大腸菌は飢餓などストレス状態に陥ると、それに応答して無機リン酸のポリマー (polyP) を蓄積することが知られている。polyP は、ATP 依存性プロテアーゼ Lon と複合体を形成し、多くの ribosomal protein を分解することで、飢餓応答に必要なタンパク質の合成に用いるアミノ酸を供給する。YggS はこの飢餓応答へ関与する可能性も考えられる。

一方、我々は *yggS* 遺伝子に隣接する *yggT*

遺伝子が、浸透圧ショックに応答したカリウム取り込みに関与することを明らかとした。これら 2 遺伝子を含む *ykkSTUVW* がオペロンを形成していることから、*ykkS* も浸透圧ショックに応答した調節制御機構に関与している可能性も残されている。

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 7 件)

(1) Ito T, Uozumi N, Nakamura T, Takayama S, Matsuda N, Aiba H, Hemmi H, Yoshimura T. (2009) The implication of YggT of *Escherichia coli* in osmotic regulation. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 2698-2704. (査読有)

(2) Yamauchi T, Goto M, Wu HY, Uo T, Yoshimura T, Mihara H, Kurihara T, Miyahara I, Hirotsu K, Esaki N. (2009) Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. *J Biochem.* **145**, 421-424. (査読有)

(3) Yoshimura T, Goto M. (2008) D-Amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS J.* **275**, 3527-3537. (総説・査読有)

(4) Ito T, Hemmi H, Kataoka K, Mukai Y, Yoshimura T. (2008) A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **409**, 399-406. (査読有)

(5) Ito T, Takahashi K, Naka T, Hemmi H, Yoshimura T. (2007) Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* **371**, 167-172. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

(1) Tohru Yoshimura, D-Amino acids as disease marker and construction of their detection system, Italy-Japan Symposium New Trends in Enzyme Science and Technology, 2009 年 10 月 28 日、Naples, Italy

(2) Tohru Yoshimura, Eukaryotic D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*, The first international conference of D-amino acid research, 2009 年 7 月 4 日、淡路島

(3) Tohru Yoshimura, Eucaryotic D-serine dehydratase and its application to D-serine assay Recent Trends in Bioconvergence Technology, 2009 年 6 月 9 日、Daejeon, Korea

(4) Tohru Yoshimura, Enzymology and application of D-serine-related enzymes. 4th apan-Finland Biotechnology Symposium. 2008 年 10 月 2 日、札幌

(5) Tohru Yoshimura, A novel Zinc-dependent D-serine dehydratase of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to enzymatic assay of D-serine. JSPS-NOW Joint Seminar on The 4th Japan-Netherland Joint Seminar on Enzymatic Science and Biotechnology. 2008 年 9 月 29 日、福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: D-セリンデヒドラターゼ及びその利用

発明者: 吉村 徹、伊藤智和

権利者: 名古屋大学

種類: PCT

番号: JP2007/070193

出願年月日: 平成 21 年 3 月 12 日

国内外の別: 国外

名称: D-アミノ酸測定法

発明者: 吉村 徹、加藤志郎

権利者: 名古屋大学

種類: 特願

番号: 2009-241924

出願年月日: 平成 21 年 10 月 21 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

授

研究者番号: 60302189