

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04908

研究課題名(和文) D-アミノ酸による生体制御システムの解明と応用

研究課題名(英文) Studies of bio-regulation with D-amino acids and its 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：D-アミノ酸の機能や代謝について明らかにするとともに、D-アミノ酸の様々な研究ツールへの応用を試みた。(1) NMDAレセプターのコアゴニストであるD-Ser合成を担うセリンラセマーゼがD-Serの脱離反応も触媒することを確認した。(2) ブナシメジに新奇D-アミノ酸、D-2-amino-3,4-dihydroxy-butanoic acidの存在を見出した。(3) 尿中のD-Serとクレアチニンの濃度比が腎臓疾患マーカーへ応用可能であることを示した。(4) アラニンおよびグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を欠損したE.coliによる新奇D-アミノ酸生合成酵素遺伝子スクリーニング系の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸の生理機能が注目されている。例えばD-Serは記憶や学習などの脳機能に、D-Aspは脳ホルモンの分泌などに関与する。本研究ではD-アミノ酸の機能や代謝の解明、様々な研究ツールへの応用を試みた。具体的には、D-Ser合成を担うセリンラセマーゼがD-Serの分解にも働くこと、ブナシメジに新奇D-アミノ酸、D-2-amino-3,4-dihydroxy-butanoic acidが存在すること、尿中のD-Serとクレアチニンの濃度比が腎疾患マーカーへ応用可能であることを示した。またD-アミノ酸研究の強力なツールとなるD-アミノ酸生合成酵素遺伝子スクリーニング系を構築した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to clarify the metabolism and physiological functions of D-amino acids, and their application to various research tools. The following studies were conducted. 1) Serine racemase, which is responsible for the biosynthesis of D-Ser, a co-agonist of NMDA receptor, was confirmed to catalyze the D-serine dehydration. 2) An unknown D-amino acid was found in an edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*, and identified as D-2-amino-3,4-dihydroxy-butanoic acid. (3) Urinary D-Ser concentrations of renal disease patients and healthy subjects were analyzed. Ratio of the urinary D-Ser concentration to that of urinary creatinine was suggested to serve as a biomarker of renal disorder. (4) Functional cloning system of the genes encoding D-amino acid synthesizing enzymes was constructed with E. coli mutant lacking alanine racemase and glutamate racemase genes.

研究分野：生物化学

キーワード：D-アミノ酸 D-セリン セリンラセマーゼ D-セリンデヒドラターゼ 腎疾患マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降、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てきた。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同レセプターを活性化させる。そのため脳内 D-Ser の動態は様々な神経疾患と関係しており、例えば統合失調症における脳脊髄液中の D-Ser 含量の低下や、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に伴う脊髄での D-Ser 量の上昇が報告されている。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、さらに D-Ser が動物組織の発達や節足動物の変態に際して増減し、発生・分化にもかかわると推測されている。D-Asp はプロラクチンなど脳ホルモンの分泌制御やテストステロンの合成促進に働くほか、卵巣での濃度が体外受精の受精率に相関するなど生殖と関連すること、細胞の抗酸化性を増大させることやコラーゲン産生の促進を促すことなどが示唆されている。D-アミノ酸研究は、基礎・応用の両面において今後大きく展開するものと思われるが、現在までに D-アミノ酸機能の分子レベルで解明は、NMDAR に関わる D-Ser の一部の機能に限られて、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。

2. 研究の目的

本研究では、様々な生物における D-アミノ酸の機能やその代謝酵素への理解を深めるとともに、D-アミノ酸の医療研究ツールなどへの応用を計った。具体的な研究目的は以下の通りである。

(1) 真核細胞型セリンラセマーゼの反応機構

真核細胞型セリンラセマーゼ(SerR)は Ser のラセミ化とともに、L-Ser、D-Ser をピルビン酸とアンモニアに分解する脱離反応を触媒するが、この反応は生体内での D-Ser 濃度の調整に重要であるとされている。L-Ser、D-Ser に対するラセミ化効率はほぼ同等であるのに対し、脱離反応では L-Ser に対する効率が極めて高い。そのため D-Ser の脱離は、D-Ser がラセミ化によって L-Ser に転換された後に起こるとの説もある。本研究では同位体効果を用いた動力学解析により SerR による D-Ser の脱離反応の機構解明を目指した。

(2) ブナシメジに見出した新奇 D-アミノ酸の同定と役割

D-Ser や D-Ala が発生・分化のシグナルとして働く可能性が指摘されている。この解明を目指して、様々なキノコに含まれる D-アミノ酸を解析したところ、ブナシメジ実体に新奇 D-アミノ酸を見出した。本研究ではこのアミノ酸の同定と生理的意義の解明を目指した。

(3) 腎疾患マーカーとしてのヒト尿中 D-Ser

本研究では、尿中 D-Ser 濃度が腎臓疾患のバイオマーカーとなる可能性の検証を目指した。

(4) *E. coli* を用いた新奇 D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング系の構築

本研究では、D-Asp 生合成酵素の同定を念頭に、*E. coli* の D-Ala、D-Glu 生合成酵素遺伝子を欠損した変異株を用いた新奇 D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 真核細胞型セリンラセマーゼの反応機構

α -水素を重水素化した L-および D-Ser とラベル化していない両基質を、軽水および重水中で細胞性粘菌 SerR による α 、 β -脱離反応に供し、その際の同位体効果を解析した。脱離反応の速度は Ser から生成するピルビン酸を乳酸脱水素酵素と NADH を用いたカップリング反応を用いてアッセイした。さらに細胞性粘菌 SerR およびマウス SerR と、Thr の 4 つの立体異性体、L-Thr、L-*allo*-Thr、D-Thr および D-*allo*-Thr を反応させ、脱離反応の動力学定数を求めた。

(2) ブナシメジに見出した新奇 D-アミノ酸の同定と役割

ナメコ、エリンギなど 9 種類のキノコの抽出液中のアミノ酸を蛍光ジアステレオマー化した後、HPLC によって分析した。ブナシメジの抽出液に未知 D-アミノ酸を見出したため、

6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) で誘導体化の後、LC-MS により構造を推定した。

(3) 腎疾患マーカーとしてのヒト尿中 D-Ser

健常者および腎臓患者の尿中の D-Ser およびその他のアミノ酸濃度とクレアチニン濃度を解析した。健常者については、年齢 21-25 歳の男女 20 人 (男女比 1 対 1) の尿サンプルを分析した。尿検体は、同日の朝、昼、晩の 3 サンプルを 3 日分 (計 9 サンプル) 採取した。尿検体は煮沸後、遠心分離し、その上清を測定に用いた。アミノ酸分析用標品は、尿検体からトリクロロ酢酸 (TCA) 処理によってタンパク質を除去した後、TCA を水飽和ジエチルエーテルで抽出除去して調整した。尿中アミノ酸は *N*-アセチル-L-システインと *o*-フタルアルデヒド (OPA) を用いて蛍光ジアステロマー化した後 HPLC に供し、励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm で定量した。クレアチニンの測定には LabAssay™ Creatinine kit (Wako) を用いた。腎臓疾患患者の尿については秋田大学医学部より供与されたものを用いた。

(4) *E. coli* を用いた新奇 D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング系の構築

D-アミノ酸生合成に関わる遺伝子のファンクショナルスクリーニングのため、*E. coli* のアラニンラセマーゼをコードする *alr* および *dadX*、グルタミン酸ラセマーゼをコードする *murI* を破壊した MB3000 株を構築し、ここに *Geobacillus stearothermophilus* 由来の D-アミノ酸アミノ基転移酵素 (DAT) 遺伝子の発現プラスミドを導入した。

4. 研究成果

(1) 真核細胞型セリンラセマーゼの反応機構

α -水素を重水素化した L-[^{-2}H]Ser とラベルしていない L-[$^{-\text{H}}$]Ser を軽水中で細胞性粘菌 SerR 反応させた。脱離反応の *kcat* 値について得られた基質同位体効果は 2.4 であった。同様にして得た D-Ser の軽水中での脱離反応における基質同位体効果は 2.2 で、L-Ser の場合とほぼ同様であった。一方、ラベルしていない基質を重水中および軽水中で反応させた場合の脱離反応の *kcat* について得られた溶媒同位体効果は、L-Ser、D-Ser 場合いずれも 1.79 と変わらなかった。このような基質同位体効果および溶媒同位体効果の一致は D-、L-Ser の脱離反応が同様の機構によって進行することを示唆している。

アミノ酸ラセマーゼ反応を重水中で行った場合、生成物アミノ酸の α -水素が重水素と交換することが知られている。SerR が D-Ser の脱離反応を直接には触媒せず、ラセミ化によって L-Ser となった後に脱離反応を受けると仮定した場合、重水中で進行する D-[$^{-\text{H}}$]Ser の脱離反応の基質は L-[^{-2}H]Ser となる。重水中で行った D-[$^{-\text{H}}$]Ser の脱離反応の *kcat* 値は 0.47 s^{-1} で、この値は L-[^{-2}H]serine を重水中で SerR と反応させた際の *kcat* 値、 0.63 s^{-1} に近かった。ただし上記仮定のもとでこれらの数値が一致するためには基質濃度が同程度である必要がある。すなわち、ほぼ全ての D-[$^{-\text{H}}$]Ser が反応開始後速やかにラセミ化され L-[^{-2}H]Ser となる必要がある。重水中でのラセミ化反応の速度を測定したところ、基質の 10~20% 消失した時点、すなわち脱離反応が進行した時点で、ラセミ化反応の産物である立体化学が反転した Ser は得られず、重水中でのラセミ化速度は脱離反応の速度に比べて極めて遅いものと考えられた。以上の結果から、SerR は D-Ser の脱離反応を直接触媒するものと結論された。

粘菌およびマウスの SerR と L-Thr、L-*allo*-Thr、D-Thr および D-*allo*-Thr を反応させた場合、いずれの酵素においても L-Thr (2*S*, 3*R*) および D-*allo*-Thr (2*R*, 3*R*) に対する触媒効率 (*kcat*/*Km*) が D-Thr (2*R*, 3*S*) および L-*allo*-Thr (2*S*, 3*S*) に対するよりも 50~250 倍程度が大きかった。この結果から SerR は Thr の脱離反応において、3 位の立体化学を認識するものと考えられた。

(2) ブナシメジに見出した新奇 D-アミノ酸の同定と役割

食用キノコを含む 9 種類のキノコ (エノキ、ヒラタケ、マイタケ、ハナビラタケ、ヤコウタケ、ワサビタケ、ブナシメジ、エリンギ、ナメコ) の菌糸および子実体中のアミノ酸分析の過程で、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) に未知のアミノ酸 (X) が高濃度で存在することが見出された。X は D-アミノ酸オキシダーゼおよび D-アミノ酸トランスアミナーゼ (DAAT) と反応したことから D-アミノ酸であると考えられた。X の HPLC による分析、陽イオン・陰イオン交換カラムからの溶出パターンなどから、X は Ser や Thr と類似した構

造的特徴を有することが示唆された。さらに X が Dsd1p と反応しケト酸を生成したことから、X は 1 位にヒドロキシ基を有する可能性が示唆された。Dsd1p 反応で生成したケト酸を、D-Glu 存在下で DAAT とインキュベートしたところ D-ホモセリンが生成したため、X は 1 位と 2 位にそれぞれヒドロキシ基を有する D-2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acid (D-4-ヒドロキシトレオニン) であると推測した。X を 6-aminoquinolyyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC) により誘導体化し、逆相 HPLC によって精製後、ESI-MS で解析した結果、m/Z 306 のピークが得られ、X はヒドロキシトレオニンであることが確かめられた。次に X の C_β位の立体化学を明らかにするため、標品となる(2*S*, 3*S*)-4-ヒドロキシトレオニンを、L-Thr に L-Thr hydroxylase を作用させることにより合成した。またこれにアミノ酸ラセマーゼを作用させ、(2*R*, 3*S*) 4-ヒドロキシトレオニンを得た。(2*S*, 3*S*)-4-ヒドロキシトレオニンと(2*R*, 3*S*) 4-ヒドロキシトレオニンの HPLC での溶出位置の比較から、X は(2*R*, 3*S*) 4-ヒドロキシトレオニンであると同定された。ブナシメジの分化過程での X の消長を検討したところ、X の大部分はブナシメジの子実体に存在すること、また未成熟子実体形成期から出現し、成熟子実体形成期に最大量(子実体 1g あたり 1.3 mg) となることが明らかとなった。

(3) 腎疾患マーカーとしてのヒト尿中 D-Ser

20 名の健常者から提供された尿中のアミノ酸のうち D-Asp、D-Ser、L-Asp、L-Ser、L-Glu、L-Asn、L-Glu、L-His、L-Thr、Gly、L-Arg、L-Ala について定量した。尿中クレアチニン値に対する各アミノ酸値をプロットしたところ、尿中 D-Ser 濃度とクレアチニン濃度に強い正の相関 ($r = 0.879$) が認められた。一方、L-Ser 濃度とクレアチニン濃度には相関を認められなかった ($r = 0.471$)。健常者の尿中 D-Ser/クレアチニンについて、日内変動ならびに日間変動を調べたところ、いずれも変動は極めて少なく、値が一定(中央値、112.8 nmol/mg creatinine) になる傾向が認められた。これに対して、L-Ser/クレアチニン比の日内変動は大きかった。一方、秋田大学より提供された 65 人の腎障害患者 (Age years: 68 ± 12 , eGFR: 65.3 ± 30.6 ml/min/1.73m², mean \pm SD) の尿中 D-セリン動態を調べたところ、健常者の尿に比べて低値(中央値、77.1 nmol/mg) を示す傾向が見られた。一方、L-セリン/クレアチニン値については、腎障害患者と健常者で差は認められなかった。以上の結果から、尿中 D-Ser/クレアチニン比が腎臓疾患マーカーとなる可能性が示唆された。

(4) *E. coli* を用いた新奇 D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング系の構築

murI、*alr* および *dadX* を欠損した大腸菌 MB3000 株は、予想どおりその生育に D-Glu と D-Ala を要求した。ここに様々な D-アミノ酸と α -ケト酸の間のアミノ基転移反応を触媒する DAAT の遺伝子を導入することで、菌体内で何らかの D-アミノ酸生合成酵素が発現した場合に D-Glu、D-Ala 要求性が相補される菌株の作出が期待された。しかし、野生型 DAAT を導入した MB3000 株は D-アミノ酸非添加培地においても生育した。この原因は、DAAT が有するリン酸イオン依存性の微弱なセリンラセマーゼ活性にあることを見出した。そこで活性部位近傍に点変異を導入した DAAT を用いたところ、D-アミノ酸添加培地でのみ生育する D-アミノ酸要求株が得られた。同株は、その生育に D-Glu と D-Ala のどちらか一方、また D-Ser、D-Asp、D-Cys、D-Met、D-Asn などの D-アミノ酸を要求した。得られたこの D-アミノ酸要求株に既知のアミノ酸ラセマーゼ遺伝子を発現させたところ、D-アミノ酸非添加培地における生育が確認された。この D-アミノ酸要求株を用いることで、D-アミノ酸生合成酵素の活性検出や遺伝子クローニングが可能であると考えられた。しかしより効率的なスクリーニング系の構築のためには、現在プラスミド上で発現させている DAAT の遺伝子を *E. coli* の染色体に組み込むなどの改良が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Ito T, Yamamoto K, Hori R, Yamauchi A, Downs DM, Hemmi H, Yoshimura T. (2019) Conserved Pyridoxal 5'-Phosphate Binding Protein YggS Impacts Amino Acid Metabolism through Pyridoxine 5'-Phosphate in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 査読あり、**85**, in press. DOI.10.1128/AEM.00430-19

Ito T, Hamauchi N, Hagi T, Morohashi N, Hemmi H, Sato YG, Saito T, Yoshimura T. (2018) D-Serine Metabolism and Its Importance in Development of *Dictyostelium discoideum*. *Front. Microbiol.* 査読あり、**9**, 784. DOI. 10.3389/fmicb.2018.00784.

Iwakawa H, Makabe S, Ito T, Yoshimura T., Watanabe H. (2018) Urinary D-serine level as a predictive biomarker for deterioration of renal function in patients with atherosclerotic risk factors. *Biomarkers* 査読あり、Mar;24(2)、159-165
DOI. 10.1080/1354750X.2018.1528632.

吉村 徹 (2018) ピリドキサル5'-リン酸に依存する細菌の転写制御因子GabR. *ビタミン* 査読なし、**92**、86-89.

Ito T., Tokoro M., Hori R., Hemmi H., Yoshimura T. (2018) Production of ophthalmic acid using engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 査読あり、**84**, 2806-2817.
DOI. 10.1128/AEM.02806-17.

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.* 査読あり、**65**, 6131-6139. DOI. 10.1021/acs.jafc.7b01893.

Ito T, Yamauchi A, Hemmi H, Yoshimura T. (2016) Ophthalmic acid accumulation in an *Escherichia coli* mutant lacking the conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS. *J. Biosci. Bioeng.* 査読あり、**122**, 689-693. DOI. 10.1016/j.jbiosc.2016.06.010.

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.* 査読あり、**160**, 345-353

[学会発表](計 13 件)

那須 涼麻、伊藤 智和、武藤 菜摘、坂神 晴菜、邊見 久、森 寿、吉村 徹、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いたD-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング 2019年度日本農芸化学会大会 (2019)

Tohru Yoshimura, Tomokazu Ito, Hisashi Hemmi, Eukaryotic D-Serine Dehydratase and its Application to D-Serine Assay. *AC21 Joint mini symposium "Agro Industry Research for well being"* (招待講演) 2018

山本 佳奈、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹、YggS/PROSC ファミリータンパク質のアミノ酸代謝制御機構の解析 第91回日本生化学会大会 2018

那須 涼麻、伊藤 智和、邊見 久、森 寿、吉村 徹、新規 D-アミノ酸生合成酵素のスクリーニング系の確立 第14回D-アミノ酸研究会学術講演会 2018

伊藤智和、武藤菜摘、邊見 久、吉村 徹、D-アミノ酸生合成酵素の同定を目的としたファンクショナルクローニング系の開発 日本ビタミン学会第70回大会 2018

吉村 徹 微生物酵素のD-アミノ酸研究への応用 応用生命化学研究センター第9回公開シンポジウム (招待講演) 2018

Tohru Yoshimura, Ayako Yamauchi, Maiko Tokoro, Hisashi Hemmi, Tomokazu Ito, Production of ophthalmic acid with an *E. coli* mutant lacking the conserved pyridoxal protein YggS. *19th Japan-German Workshop on Enzyme Technology* (招待講演、国際学会) 2017

Tohru Yoshimura, Ayako Yamauchi, Maiko Tokoro, Hisashi Hemmi, Tomokazu Ito, Ophthalmic acid production by *E. coli* yggS mutant. *Italy-Japan Joint Symposium "New Trends in Enzyme and Microbial Science in the Translational Biology Era"* (招待講演、国際学会) 2017

Tohru Yoshimura, Takashi Takenaka, Tomokazu Ito, Ikuko Miyahara, Hisashi Hemmi, Transcriptional regulator of *Brevibacillus brevis* D-alanine: D-alanine ligase gene. *International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2017)* (招待講演、国際学会) 2017

吉村 徹、ブナシメジの新奇 D-アミノ酸 第 446 回ビタミン B 研究協議会 2016

Tohru Yoshimura, Reaction mechanism of eukaryotic serine racemase catalyzing both racemization and dehydration of D-,L-serine. *The Fifth International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016 (ICC05-AEM2016)* (国際学会) 2016

吉村 徹、真核生物における D-アミノ酸の機能とその代謝関連酵素 第 12 回 D-アミノ酸研究会学術講演会・日本農芸化学会中四国支部合同シンポジウム「環境・ひと・微生物」(招待講演) 2016

吉村 徹、D-アミノ酸の機能と代謝関連酵素 日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会(第 496 回講演会) (招待講演) 2016

〔図書〕(計 1 件)

Yoshimura T 他 (Yoshimura, Tohru, Nishikawa, Toru, Homma, Hiroshi (Eds.))
D-Amino acids Physiology, Metabolism, and Application Springer, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。