

氏 名	田 中 裕 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 5 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 9 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	脊椎動物におけるD-セリン代謝の研究 1. Simultaneous Measurement of D-Serine Dehydratase and D-Amino Acid Oxidase Activities by the Detection of 2-Oxo-Acid Formation with Reverse-Phase HPLC 2. D-Serine Dehydratase from Chicken Kidney: A Vertebral Homologue of the Cryptic Enzyme from <i>Burkholderia cepacia</i> 脊椎動物におけるD-セリン代謝の研究 1. (逆相 HPLC による 2-オキソ酸生成の検出に基づく 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活性の同時測定) 2. (ニワトリ腎臓の D-セリンデヒドラターゼ : <i>Burkholderia cepacia</i> の新奇酵素と相同性を示す脊椎動物酵素)
審 査 委 員	主 査 教 授 大 久 保 岩 男 副 査 教 授 木 村 博 副 査 教 授 清 水 猛 史

論文内容要旨

*整理番号	362	(ふりがな) 氏名	たなか ひろゆき 田中 裕之
学位論文題目	脊椎動物における D-セリン代謝の研究 1. Simultaneous Measurement of D-Serine Dehydratase and D-Amino Acid Oxidase Activities by the Detection of 2-Oxo-Acid Formation with Reverse-Phase HPLC. (逆相 HPLC による 2-オキソ酸生成の検出に基づく 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活性の同時測定) 2. D-Serine Dehydratase from Chicken Kidney: A Vertebral Homologue of the Cryptic Enzyme from <i>Burkholderia cepacia</i>. (ニワトリ腎臓の D-セリンデヒドラターゼ: <i>Burkholderia cepacia</i> の新奇酵素と相同性を示す脊椎動物酵素)		
<p>【目的】</p> <p>D-セリンは脊椎動物の中樞神経系に存在する。D-セリンは NMDA 型グルタミン酸レセプターの生理的リガンドであり、高次脳機能に関連することがわかっている。最近、ヒトの統合失調症の一群で脳内 D-セリン含有量が減少している症例が報告された。</p> <p>D-セリンは、3-ヒドロキシピルビン酸かピルビン酸のいずれかに代謝される。しかし、脊椎動物の中樞神経系では D-アミノ酸オキシダーゼ(以下 DAO と略す)による分解しか調べられておらず、D-セリン組織含有量の調節機構は不明である。</p> <p>本研究では、D-セリンの代謝を系統的に調べるために、D-セリンから酵素的に生成する 2-オキソ酸の逆相 HPLC による定量法を確立した。本方法を用いて組織中の D-セリン分解活性を測定し、D-セリン代謝に関わる DAO 以外の酵素を探索した。その結果、哺乳動物以外の脊椎動物の中樞神経系ではじめて D-セリンデヒドラターゼ(以下 DSD と略す)活性を検出した。さらに、最も DSD を多く発現しているニワトリ腎臓から精製・クローニングし、本酵素がピリドキサルリン酸依存性酵素の新規ファミリーを構成すること明らかにした。</p> <p>【方法】</p> <p>1-1 逆相 HPLC による 2-オキソ酸定量</p> <p>2-オキソ酸を MBTH でアジン誘導体化し、逆相 HPLC を用いて分離・定量した。内部標準物質には 2-オキソグルタル酸を用いた。</p> <p>1-2 組織中の D-セリン分解酵素活性の測定</p> <p>各種脊椎動物の主要臓器を、9 倍量の 20mM Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液中でホモジネートした。組織ホモジネートを 50 mM の D-セリンを含む反応液に添加し、生成した 2-オキソ酸を測定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

2-1 ニワトリ腎臓からの DSD 精製

ニワトリ腎臓より、各種クロマトグラフィー法を組み合わせることで DSD を精製した。サブユニット分子量は SDS-PAGE と MALDI-TOFMS で、ネイティブ分子量は HPLC ゲルろ過と光散乱法を組み合わせることで GPC-LALLS 法で測定した。吸収スペクトルおよびヒドロキシルアミンによる不活性化により補酵素を同定した。

2-2 ニワトリ腎臓 DSD のクローニング

精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列をペプチドシーケンサーで決定し、得られたアミノ酸配列に基づきプライマーを設計した。ニワトリ腎臓から Total RNA を精製し、RT-PCR と RACE 法により本酵素の cDNA をクローニングした。

2-3 抗 DSD ポリクローナル抗体による DSD の組織分布の検討

精製酵素を抗原に用い、ウサギを宿主として抗 DSD ポリクローナル抗体を作製した。そのポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットおよび免疫組織染色を行った。

【結果】

(1) 各種 2-オキソ酸を測定限界 100 pmol の高感度で測定できた。(2) ニワトリ腎臓では DAO 活性と DSD 活性が共に認められたが、脳では DSD 活性のみが検出された。ラットでは、脳を含むすべての組織で DAO 活性のみが検出された。(3) ニワトリ腎臓から DSD をおよそ 350 倍に精製した。(4) 精製酵素の SDS-PAGE で二つのバンドが検出された。各バンドは同一の N 末端配列を示し、質量分析による分子量はともに 40 kDa であった。ネイティブ酵素の分子量は 80 kDa であった。(5) 精製酵素は、ピリドキサルリン酸を補酵素として含有していた。(6) 本酵素の D-セリン、D-トレオニン、L-セリンに対する k_{cat}/K_m は、それぞれ $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $164 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。(7) DSD の一次構造を決定し (376 アミノ酸)、新規ファミリーに属するピリドキサルリン酸依存性酵素であることが分かった。(8) ウェスタンブロットにより、DSD が腎臓、肝臓、脳で発現していることがわかった。(9) 免疫組織染色で、ニワトリ腎臓の近位尿細管が強く染色された。

【考察】

ニワトリ脳では DSD 活性のみが、ラット脳では DAO 活性のみが認められたことから、哺乳動物以外の脊椎動物の中樞神経系では DSD が D-セリンを分解することが示唆された。精製したニワトリ DSD は D-セリンに高い基質特異性を示し、分子量 37 kDa のヘテロ 2 量体であった。本酵素は *dsdA* 遺伝子がコードする大腸菌 DSD に代表されるバクテリア DSD ではなく、*Burkholderia cepacia* 由来の新奇 DSD に高い相同性を示した。ニワトリ DSD は、新奇 DSD と共に N 末端側にピリドキサルリン酸結合モチーフ (PHXK(T/A)) を持つ新規ファミリーを構成することが明らかになった。

【結 論】

逆相 HPLC による 2-オキシ酸定量法を開発することで、組織中の DAO および DSD 活性が同時測定できた。ニワトリ DSD を腎臓からはじめて精製・クローニングした。本酵素は、ピリドキサルリン酸依存性酵素の新規ファミリーを構成する。ニワトリの脳では DSD のみが発現しており、ラットを含む哺乳類の脳では DAO のみが発現していることが明らかになった。哺乳類の脳では D-セリンは DAO 優位で分解を受けるのに対して、哺乳類以外の脊椎動物の脳では DSD が優位であることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	362	氏名	田 中 裕 之
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>D-セリンは NMDA 型グルタミン酸レセプターの生理的リガンドであり、高次脳機能に関与する。最近、脳内 D-セリン含有量の減少が統合失調症の発症に関わると提唱されている。脊椎動物の中樞神経系での D-セリン分解は D-アミノ酸オキシダーゼによるものしか知られておらず、D-セリン含有量の調節機構は不明である。</p> <p>本研究では、D-セリンから酵素的に生成する 2-オキシ酸の逆相 HPLC による定量法を確立し、この方法を用いて、D-セリン代謝に関わる酵素を体系的に調べた。その結果、哺乳動物以外の脊椎動物の中樞神経系で D-セリンデヒドラターゼ活性を初めて検出した。ニワトリ腎臓からは精製・クローニングし、本酵素がピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性酵素であること、さらに PLP 依存性酵素群において新規ファミリーを構成することを明らかにした。</p> <p>本論文は、グルタミン酸レセプターの必須リガンドである D-セリンの濃度調節機構の解明に貢献すること多大であり、よって、博士 (医学) の授与に値する。</p>			
(平成 20 年 9 月 4 日)			