

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590351

研究課題名(和文)脊椎動物の進化軸から見た中枢神経D-セリン代謝とその役割の解明

研究課題名(英文)Evolutionary aspects of D-serine metabolism in vertebral brain

研究代表者

田中 裕之(Tanaka, Hiroyuki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10293820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：D-セリンは脊椎動物の中枢神経においてNMDA型グルタミン酸受容体に結合し、興奮性神経伝達物質として働いている。脊椎動物にはD-セリン分解酵素としてD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)とD-セリンデヒドラーターゼ(DSD)の2つが知られる。本研究により、ニワトリ脳ではアストロサイトに発現するDSDがD-セリン濃度を調節していることを明らかにした。これまでの研究により、哺乳類の脳ではアストロサイトに発現するDAOがその役割を担っていることがわかっている。今回の結果とあわせて考えると、アストロサイトがD-セリン分解のために使う酵素は、進化の過程でDSDからDAOにスイッチしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chicken D-serine dehydratase (DSD) degrades D-serine to pyruvate and ammonia. D-Serine is a physiological coagonist that regulates the activity of the NMDA receptor for L-glutamate. We have found in chickens that D-serine is degraded only by DSD in the brain, whereas it is also degraded to 3-hydroxypyruvate by D-amino acid oxidase (DAO) in the kidney and liver. In mammalian brains, D-serine is degraded only by DAO. It has not been clarified why chickens selectively use DSD for the control of D-serine concentrations in the brain.

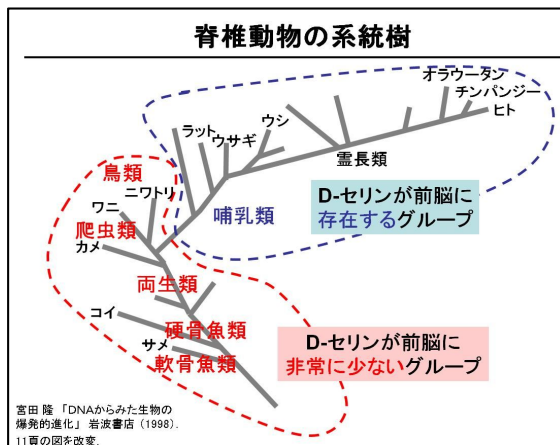
In the present study, we measured DSD activity in chicken tissues, and examined the cellular localization of DSD using a specific anti-chicken DSD antibody. In chicken brain, cerebellum showed about 6-fold-higher activity than cerebrum. At the cellular level DSD was demonstrated in Bergmann-glia cells of the cerebellum and in astrocytes. The finding of DSD in glial cells seems to be important because D-serine is involved in NMDAR-dependent brain functions.

研究分野：生化学 酵素化学

キーワード：D-セリン D-アミノ酸オキシダーゼ D-セリンデヒドラーターゼ PLP酵素 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の高次機能に關与する NMDA 型グルタミン酸受容体が機能するためにはグルタミン酸と同時に D-セリンがモジュレーターとして結合しなければならない。D-セリンによる NMDA レセプターの働きを介した神経伝達異常は、ヒトの神経変性疾患に關連する。例えば、統合失調症のある一群では D-セリン量が減少し、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では D-セリン量が過剰になると病気が進行する。そのため、D-セリン濃度の制御因子がこれらの疾患に対する治療のターゲットとなり、D-セリン代謝酵素の解明が課題となっている。



脊椎動物の脳における D-セリン含有量には生物間で著しい種差が見られる。傾向としてヒトを含む哺乳類の脳には mM レベルの高濃度で存在する (ヒト 130 nmol/g 湿重量、ラット 520 nmol/g 湿重量)。一方、非哺乳類には数十 μ M レベルしか存在しない (コイ 3 nmol/g 湿重量、カエル 1 nmol/g 湿重量、ニワトリ 7 nmol/g 湿重量)。

これらの知見は哺乳類の中枢神経系に特有の D-セリン制御機構が存在することを示唆するが、長い間その機構は不明であった。

申請者は中枢神経系において D-アミノ酸オキシダーゼ以外の D-セリン分解酵素を探索するために、広く脊椎動物を研究対象にしてきた。その過程で独自に D-セリン分解活性測定法を開発し (Tanaka et al., *Anal. Biochem.*,

2007) 新しい D-セリン分解酵素: D-セリンデヒドラターゼ (DSD) を特定の脊椎動物に発見した (Tanaka et al., *J. Biochem.*, 2008)。発見したニワトリ DSD の遺伝子クローニングから明らかになった配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、データベース上でヒットしたホモログタンパク質は、全て「機能未知タンパク質」として登録されていた。本酵素の機能解析により、D-セリン脱水反応を特異的に触媒すること、また N 末端側に新しい PLP 結合モチーフを持つ新規ファミリーを構成することを明らかにした (Tanaka et al., *蛋白質核酸酵素*, 2009)。さらに、本酵素の結晶構造解析に成功し、本酵素の活性部位に存在する亜鉛イオンが、脱水反応に直接關与している触媒因子であることを明らかにした (Tanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 2011)。本酵素は、D-セリン濃度の種差を解明するための鍵酵素であると期待される。

2. 研究の目的

D-セリンは中枢神経系における NMDA 型グルタミン酸受容体のリガンドであり、神経変性疾患に關連する。D-セリンの脳内濃度は適切に調節されなければならないが、その機構は不明である。

申請者は、脊椎動物の D-セリン代謝酵素を調べる過程で、新しく D-セリンデヒドラターゼ (DSD) を発見した。本研究では、D-セリン分解酵素の酵素化学的・細胞化学的な解析を行い、D-セリンの脳内濃度維持機構とその分解代謝酵素系の系統発生 (進化) について研究する。その結果から、統合失調症・難治性うつ病・筋萎縮性側索硬化症の病因解明と治療の道を探る。

3. 研究の方法

(1) 新規 D-セリン分解酵素 (DSD) の酵素化学的解析

ニワトリ DSD の大量発現系を確立し、リ

コンビナント酵素の反応動力的解析を行う。具体的には、ニワトリ DSD の大腸菌 (BL21) による大量発現系を確立し、リコンビナント酵素について反応動力的解析を行う。活性測定は、2,3-DNP を用いた 2-オキソ酸定量法により行う。リコンビナント酵素は N 末端にヒスチジンタグを融合し、HisTrap カラムにより精製する。また、DSD の立体構造解析により分かったタンパク質構造に基づき本酵素が持つ基質特異性および反応特異性を明らかにする。

(2) D-セリンの局在を制御する分解酵素(DSD と DAO)の発現解析

中枢神経系における 2 つの D-セリン分解酵素についてタンパク質・遺伝子発現レベルを脊椎動物の進化軸に沿って調べる。そして、哺乳類の脳に D-セリンが蓄積するに至った直接の要因を明らかにする。具体的には、ウェスタンブロットで交叉性が確認された抗体を用いて、両酵素の免疫組織化学を行う。パラフィン切片、凍結切片の両方を検討する。DSD 抗体を用いた各種脊椎動物の腎臓に対する免疫組織化学では良好な結果が得られており (Tanaka et al., *J. Biochem.*, 2008, Tanaka et al., 蛋白質核酸酵素, 2009)、尿細管に特異的に DSD 陽性細胞が検出された。DAO に関しては免疫組織化学に加え、DAO 活性に基づく酵素組織化学法 (ニッケルイオンを用いる鋭敏な共役過酸化法) も可能である (Tanaka et al., *D-Amino Acids.*, 2006)。酵素組織化学法を用いて DAO の局在を調べ、免疫組織化学の結果と比較する。

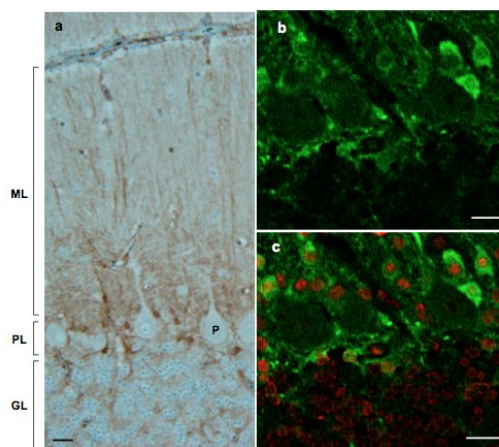
4. 研究成果

X線構造解析により、DSD が触媒機能を発揮するためには、その活性中心に補酵素 PLP (活性型ビタミン B6) だけではなく、亜鉛イオンが必須であることがわかっている。これらの因子のうち、PLP が結合しているアミノ酸残基は N 末端側の Lys45 であり、亜鉛イオンは C

末端側の His347 および Cys349 である。本研究において、興味深い DSD のスプライズバリエーションの配列を見出した。すなわち、補酵素 PLP が結合している Lys45 は保存されているが、亜鉛イオンの結合ドメインのうち Cys349 がセリン残基に置換していた。これは、このバリエーションが亜鉛イオンとの結合能が著しく減少していることを示唆する。

我々のこれまでの分光学的研究により、EDTA 処理により亜鉛イオンを欠いた本酵素は、基質である D-セリンと結合するものの、その先の脱水反応がおこらないことがわかっている。したがって、このスプライズバリエーションはデヒドラターゼ活性を失い、D-セリン結合タンパク質として生理的機能をもっている可能性がある。現在、大腸菌による発現系を用いてこのスプライズバリエーションの機能解析をすすめている。

多くのタンパク質遺伝子にスプライズバリエーションが存在し細胞の種類や発生段階に応じて特異的に発現していることが示されている。今後、DSD の組織特異的なスプライズバリエーションの制御機構が明らかにすることは、D-セリン濃度の調節機構の理解を進める上で重要である。

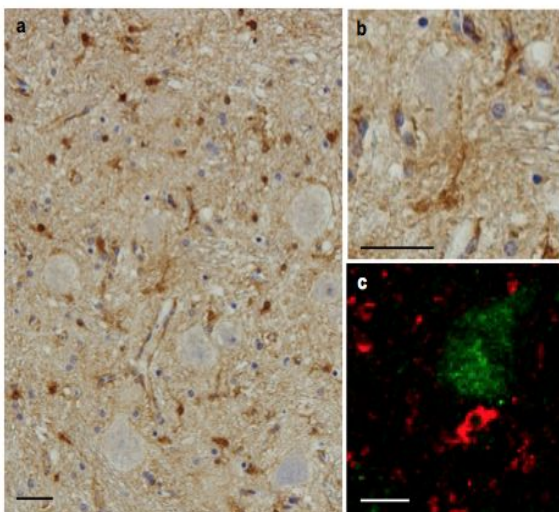


図の説明：

a. 抗 DSD 抗体を用いた免疫組織化学。ニワトリ小脳の矢状断を示す。プルキンエ細胞層にみられるバグマングリア細胞が DSD 陽性細胞である。b および c. 抗 DSD 抗体を用いたニワトリ小脳の蛍光免疫染色。Pax7 (赤) はバグマングリア細胞の核に局在することがわかっており、二重染色により DSD (緑) は同細胞の細胞質に発現している。

脊椎動物にはD-セリン分解酵素としてD-アミノ酸オキシダーゼとD-セリンデヒドラターゼの2つが知られているが、哺乳類以外の脊椎動物、例えばニワトリ中枢神経では、D-セリンデヒドラターゼだけが発現し、D-アミノ酸オキシダーゼは発現していない。本研究では、免疫組織化学的にD-セリンデヒドラターゼの局在を調べ、ニワトリ脳ではアストロサイトがD-セリン濃度の調節に関与していることを明らかにした。

我々のこれまでの研究により、哺乳類の脳ではD-セリンはアストロサイト特異的に発現するD-アミノ酸オキシダーゼによってその濃度調節がおこなわれている。今回の結果とあわせて考えると、脊椎動物の中枢神経



において興奮性神経伝達物質であるD-セリンの代謝分解はアストロサイトが担っており、D-セリンを介した情報伝達の調節に関与していると考えられる。しかし、アストロサイトがD-セリン分解のために使う酵素は、進化の過程でD-セリンデヒドラターゼからD-アミノ酸オキシダーゼにスイッチしている可能性が示唆された。

図の説明：

a. 抗DSD抗体を用いたニワトリ大脳の免疫組織化学。アストロサイトがDSD陽性細胞である。
b. 強拡大
c. 抗DSD抗体を用いたニワトリ大脳の蛍光免疫染色。ニューロンのマーカータンパク質であるNeuN(緑)との二重染色。DSD(赤)はアストロサイトの細胞質に発現。

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 4 件)

1. Maezawa T, Tanaka H, Nakagawa H, Ono M, Aoki M, Matsumoto M, Ishida T, Horiike K, Kobayashi K.

Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. *Mech Dev*, 132, 69-78 (2014) 査読あり

2. Suzuki C, Tanigawa M, Tanaka H, Horiike K, Kanekatsu R, Tojo M, Nagata Y.

Effect of D-serine on spermatogenesis and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) phosphorylation in the testis of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 67, 97-104 (2014) 査読あり

3. Nishimura Y, Tanaka H, Ishida T, Imai S, Matsusue Y, Agata Y, Horiike K

Immunohistochemical localization of D-serine dehydratase in chicken tissues. *Acta Histochem*, 116, 702-707 (2014) 査読あり

4. Senda M, Yamamoto A, Tanaka H, Ishida T, Horiike K, Senda T.

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of D-aspartate oxidase from porcine kidney.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 68, 644-646 (2012) 査読あり

{ 学会発表 } (計 14 件)

1. 富田圭司、影山進、村井亮介、花田英紀、田中裕之、縣保年、河内明宏

D型アスパラギン酸が精子形成に及ぼす影響の検討

第103回日本泌尿器科学会総会(2015)

2. Nanna Nagao, Takanobu Maezawa, Hiroyuki Tanaka, Kazuya Kobayashi

5-Hydroxytryptophan acts as an ovary-inducing substance in asexual worms of the planarian *Dugesia ryukyuensis*.

第48回日本発生生物学会大会(2015)

3. 我妻慶祐, 寺田晃士, 安斎悠樹, 田中裕之, 伊川友活, 増田喬子, 河本宏, 湊長博, 縣保年
E2A 転写因子ファクトリーを足場とした
TCR 遺伝子の染色体ダイナミクス

Kyoto T cell Conference 第25回学術集会
(2015)

4. Hiroyuki Tanaka, Takanobu Maezawa, Yoshihiro Nishimura, Tetsuo Ishida, Kazuya Kobayashi, Yasutoshi Agata

D-Amino Acid oxidase is involved in the ovarian development of asexual planarian worms.

The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (2014)

5. 第86回日本生化学会大会

発表年月日: 9月12日(木)

発表場所: 横浜

田中裕之, 石田哲夫, 西村嘉洋, 坂本健補, 堀池喜八郎

脊椎動物の進化とD-セリン代謝

第86回日本生化学会大会(2013)

6. 石田哲夫, 田中裕之, 西村嘉洋, 坂本健補, 堀池喜八郎

安定同位体標識ダブシルクロリドによるアミンの定量的分析

第86回日本生化学会大会(2013)

7. 谷泰史, 吉田吉孝, 秀瀬涼太, 齊藤茂樹, 中島洋, 渡辺芳人, 石田哲夫, 田中裕之, 堀池喜八郎, 栗原達夫, 江崎信芳, 三原久明

*Escherichia coli*由来ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼのnFeS₂鉄硫黄クラスターに配位するアミノ酸残基の役割

第86回日本生化学会大会(2013)

8. 石田哲夫, 田中裕之, 西村嘉洋, 坂本健補, 堀池喜八郎

ヒト血清アルブミンへのダンシルアミノ酸の結合機構

第13回日本蛋白質科学会年会(2013)

2013年6月12日~14日 鳥取

9. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: The role of D-amino acid oxidase

第46回日本発生生物学会大会 2013

年5月28日~31日 松江

前澤孝信, 田中裕之, 小林一也

10. 石田哲夫, 田中裕之, 堀池喜八郎

キャピラリーゲルろ過で微量試料中の分子間相互作用を直接測定する

第12回日本蛋白質科学会年会(2012)

11. 石田哲夫, 田中裕之, 西村嘉洋, 堀池喜八郎

微量スケール滴定実験への挑戦

2012年度 酵素・補酵素研究会(2012)

12. Ishida, T., Tanaka, H., Horiike, K.

Synthesis of ¹³C₆- and ¹³C₁₂-dabsyl chloride to perform amine-targeted clinical profiling

19th International Mass Spectrometry Conference (2012)

13. 石田哲夫, 田中裕之, 西村嘉洋, 坂本健補, 堀池喜八郎

フラビンオキシダーゼの生理的酸素濃度における活性測定と基質阻害の解析

第85回日本生化学会大会(2012)

14. 西村嘉洋、田中裕之、石田哲夫、前澤孝
信、小林一也、堀池喜八郎

プラナリア D-アミノ酸オキシダーゼのクロ
ーニングと性状解析

第85回日本生化学会大会 (2012)

〔図書〕(計 1 件)

Ito T, Yoshimura T, Ishida T, Tanaka H.

書名：D-Amino Acids: Physiology, Metabolism
and Application

出版社：Springer

発行年：2015, *In press*

〔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

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch1/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 裕之 (Tanaka Hiroyuki)

滋賀医科大学 医学部 助教

研究者番号：10293820

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし