

D-アミノ酸代謝関連酵素の構造、機能、応用

名古屋大学 大学院生命農学研究科 吉村 徹

1. はじめに

近年、D-アミノ酸が哺乳類を含む高等動物においても重要な生理機能を有することが明らかになってきた。例えば、D-セリンは記憶や学習など脳の高次機能制御に、D-アスパラギン酸は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いている。アラニンラセマーゼなど細菌のD-アミノ酸代謝関連酵素について長らく研究してきた演者らは、数年前から酵母を中心に真核生物でのD-アミノ酸代謝とその関連酵素について研究を行っている。その過程で、*Saccharomyces cerevisiae* のD-アミノ酸N-アセチルトランスフェラーゼ、D-セリンデヒドラターゼ、*Schizosaccharomyces pombe* のD-アミノ酸オキシダーゼ、アラニンラセマーゼ、アルギニンラセマーゼ、セリンラセマーゼなどの存在と酵素学的性質を明らかにしてきた。今回のシンポジウムでは、動物型セリンラセマーゼと出芽酵母のD-セリンデヒドラターゼに関する研究を中心に紹介する。

2. D-セリンの機能とセリンラセマーゼ

哺乳動物脳内に存在するD-セリンは、L-グルタミン酸依存性のイオンチャンネルであり記憶や学習などに関与するN-メチル-D-アスパラギン酸受容体のコアゴニストとして機能し、L-グルタミン酸とともに同レセプターを活性化させる。グルタミン酸系神経伝達の異常は統合失調症の原因の一つとされるが、D-セリンやその誘導體であるD-シクロセリンは統合失調症の緩和に有効である。また統合失調症やアルツハイマー病の患者では、血中や脊髄液中のD-セリン濃度が有意に低下することも指摘されている。一方、D-セリンと発生の関連も示唆されているがその理解は進んでいない。

D-セリンの生理的役割が明らかになるにつれ、その生合成経路に興味を持たれた。演者らは、カイコに動物では初めてとなるセリンラセマーゼを見いだした。これに続いて、Woloskerらによりラット脳からセリンラセマーゼが単離精製され、マウスからその遺伝子がクローニングされた。ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) に依存するこの動物型セリンラセマーゼは、既報の原核生物のアミノ酸ラセマーゼとは進化的に異なり、微生物のL-トレオニンデヒドラターゼなどと同じファミリーに属する。哺乳動物のセリンラセマーゼは大量調製が困難であったことから、演者らは分裂酵母 *S. pombe* の動物型セリンラセマーゼを得てその酵素学的解析を行った。

S. pombe ゲノムからマウスセリンラセマーゼ遺伝子と高い相同性を示す遺伝子 (SPCC320.14) を増幅し、大腸菌にクローニングした。発現・精製した遺伝子産物はセリンラセマーゼ活性を示すとともに、マウス酵素と同様にD-およびL-セリンを脱水してピルビン酸とアンモニアを生じるデヒドラターゼ反応を触媒した。ラセミ化活性とデヒドラターゼ活性におけるL-セリンに対する K_m 値はそれぞれ32および36 mM、 V_{max} 値は30および870 nmol/min/mg、D-セリンに対する K_m 値は9.6および10 mM、 V_{max} 値は7.1および52 nmol/min/mgであった。マウス酵素と同様その活性は低く、 V_{max} 値や V_{max}/K_m についてはデヒドラターゼ活性がラセミ化活性を上回った。酵母酵素はマウス酵素と同じく、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等の金属イオンにより活性化された。大阪市立大学の広津らのもとで行われた酵母セリンラセマーゼのX線結晶構造解析の結果、PLPのC4' と Schiff 塩基を形成するリジン残基、リン酸基を結合するグリシンクラスター、同じくPLPのピリジン環窒素と相互作用するセリン残基、また金属の結合部位と考えられるアスパラギン酸、グルタミン酸残基など特徴的な構造が明らかとなった。

さて哺乳類脳内 D-セリンは、この動物型セリンラセマーゼにより生合成されると考えられているが、同酵素のノックアウトなどについては報告がなく、本酵素とD-セリン生成の関連は今のところ直接証明されていない。また、本来触媒効率が低く、ラセミ化活性を上回るセリン分解活

性を有する動物型セリンラセマーゼが、0.3 mmol/g 組織（ラットの場合）にも達する脳内 D-セリンの生成を担うかどうかについては疑問が残る。D-セリンの生理的意義や発生との関連について改めて検討するため、演者らは細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* とカイコのセリンラセマーゼについても解析した。細胞性粘菌は単細胞と多細胞の両方の生活環を有する真核生物で、その含有セリンの約 5% が D-体である。マウスや分裂酵母の酵素と 40%程度 の相同性を有する細胞性粘菌酵素は、セリンデヒドラターゼ活性を示すなど他の動物型セリンラセマーゼとよく似た性質を有する。一方、閉鎖系であるカイコ蛹において D-セリンは羽化直前に一過的に増加し、その変動はセリンラセマーゼ活性と連動する。カイコ蛹から部分精製したセリンラセマーゼはデヒドラターゼ活性を示さず、またカイコゲノムには動物型セリンラセマーゼ遺伝子ホモログが存在しない。そのため、演者はカイコ酵素こそ D-セリン生合成を担う真の動物型ラセマーゼではないかと考え、研究を続行中である。

3. D-セリンデヒドラターゼ

演者らは *S. cerevisiae* に真核生物では初めてとなる、D-セリンデヒドラターゼ (DsdSC) を見いだした。本酵素は、既報の細菌 D-セリンデヒドラターゼとは一次構造上の相同性をもたず、データベース上では機能未知とされていた。DsdSC 遺伝子を導入した大腸菌から精製した同酵素は PLP に特有の吸収スペクトルを示すと共に、PLP 酵素の阻害剤により失活した。DsdSC は D-セリンに対する特異性が極めて高く、D-セリン以外では合成基質である β -C1-D-アラニンと D-トレオニンにわずかに作用する。D-セリンに対する V_{max} 値は 6.48 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、 K_m 値は 0.61 mM であり、細菌酵素とは異なり L-セリンには全く活性を示さない。EDTA 処理により活性を失った同酵素に、KCl、NaCl、MnCl₂、CuCl₂、MgCl₂、CaCl₂、ZnCl₂ を加えたところ、ZnCl₂ を加えた場合のみ活性を回復した。精製酵素の原子吸光分析では、酵素 1 mol あたり 0.38 mol の Zn が結合していた。NEM により阻害される DsdSC のシステイン残基の役割について検討した結果、C 末端近くのシステイン残基が Zn の結合に関与する可能性を見いだした。このシステインをアラニンに変異させた酵素では D-セリンに対するデヒドラターゼ活性は消失するが、 β -C1-D-アラニンに対する α 、 β -脱離反応と、D-セリンの α -水素の引き抜き反応は維持される。この結果、Zn は D-セリンの α -水素引き抜きにより生じた α -アミノアクリル酸中間体から OH が脱離する際に働いているものと推測された。

さて先に述べたように、統合失調症やアルツハイマー病の患者では脊髄液や血液中の D-セリン含量や全セリン量に対する D-セリン量比が有意に低下する。また今のところその意義は不明であるが、ヒト尿中には多量の D-セリンが存在する。これらの知見は、生体試料中の D-セリン定量が、脳や腎の疾患検査につながる可能性を示している。現在標準的に使用されている HPLC を用いた D-セリンの定量法は、測定時間が長く高価な機器を必要とするため大量のサンプル処理には向かない。そこで D-セリンに対する高い特異性を利用して DsdSC による D-セリンの酵素定量法を構築した。D-セリン分解によって生じるピルビン酸を NADH 存在下で乳酸脱水素酵素との共役により測定することで、10 μM から 200 μM の D-セリン定量が可能であった。本法は高濃度の L-セリンや血清の存在により影響されず、また尿中の D-セリン定量に適用可能であった。

4. おわりに

D-セリンや D-アスパラギン酸の生合成系やその動態の理解は、統合失調症や精子減少など今日的な課題を解く鍵になる可能性がある。この他にも、D-アラニン、D-プロリン、D-フェニルアラニン、D-グルタミン酸、D-グルタミンなど幾つかの D-アミノ酸がマウスやヒトで見いだされている。中でも、D-アラニンについてはラット膵臓のランゲルハンス島に局在することが報告されており糖尿病等との関連が注目される。今後、D-アミノ酸が生命活動の様々な場で多様な役割を果たしていることが明らかになると予想される。その意味で生合成系を中心とした D-アミノ酸代謝関連酵素の研究は、これから益々重要になるものと考えている。