

Award Accounts

第5回 D-アミノ酸学会奨励賞

D-セリンデヒドラターゼ

伊藤智和

名古屋大学大学院 生命農学研究科

1. はじめに

D-セリンは哺乳類脳内に著量存在し、*N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のコアゴニストとして、また $\delta 2$ グルタミン酸受容体のリガンドとして機能することで、記憶や学習など、脳の高次機能発現に重要な役割を担っている¹⁻³⁾。

哺乳類において D-セリンは、ピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性酵素であるセリンラセマーゼ (SR) によって生合成され^{4,5)}、フラビン酵素である D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) による酸化脱アミノ化反応によって異化される^{6,7)}。DAO は D-セリンをヒドロキシピルビン酸とアンモニアに分解し、D-セリン以外の様々な中性・塩基性 D-アミノ酸にも作用する。

哺乳類体内の D-セリンレベルは、これら代謝酵素 (SR および DAO) に加え、トランスポーターによって厳密に制御される。D-セリンの NMDA 受容体に対する制御能を反映し、この機能不全

に関連した疾病との関連も報告されている^{1,2,8)}。例えば、統合失調症患者の血清中の D-セリンレベルが健常者と比べ低いことが報告され、この治療薬候補として、D-セリンや D-サイクロセリンが試験されている⁹⁾。また、家族性および孤発性筋縮性側索硬化症 (ALS) 患者で、脊髄中 D-セリンレベルの上昇が認められ、D-セリンが ALS におけるグルタミン酸毒性増強の鍵物質である可能性も示唆されている¹⁰⁾。

さて、筆者らは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* より真核生物で初めてとなる D-セリン分解酵素、D-セリンデヒドラターゼ (DSD、出芽由来の DSD を示す際には Dsd1p と表記する) を見出した¹¹⁾。後述するように、哺乳類や植物を除く大部分の真核生物は、SR、DAO に加え、DSD (Dsd1p ホモログ) が存在する。我々は、Dsd1p の酵素学的解析¹¹⁻¹³⁾や、生理機能の検証を行ってきた。また、Dsd1p を利用した D-, L-セリン酵素定量法^{14, 15)}や D-セリン減少剤¹⁶⁾の開発などに取り組んできた。本稿では二種類の DSD の酵素学的特徴、生理機能などについて概説し、Dsd1p を用い開発した D-, L-セリン酵素定量法についても紹介する。

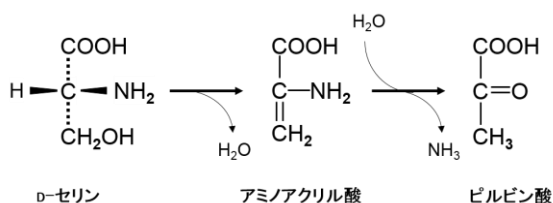


図1 DSD による D-セリンデヒドラターゼ反応

DSD は PLP に依存して D-セリンからアミノアクリル酸を生合成する。アミノアクリル酸は非酵素的にピルビン酸とアンモニアに加水分解される。

2. DSD の酵素学的特徴

DSD は PLP に依存して D-セリンをピルビン酸とアンモニアへと分解する酵素である (図 1)。DSD には、*Escherichia coli* DsdA¹⁷⁻²⁰⁾、および

*S. cerevisiae*由来 Dsd1pに代表される二種類の酵素ファミリーが知られている。DAO が様々なD-アミノ酸に対して反応性を示すのと対照的に、DSD はほぼ D-セリンにのみ作用する。L-セリンや D-トレオニンに対する活性は認められないか微弱である。DSD は D-セリンに特異的かつ高反応性であり、DsdA や Dsd1p の D-セリンに対する触媒活性 (k_{cat}/K_m) は、ヒトやマウスなどの哺乳類 DAO のそれと比べ数 10~数 100 倍高い。

二種類の DSD は、同一の反応を触媒するが、進化的・構造的に異なっている。PLP 依存性酵素はその構造により大きく分けて 7 つのファミリー (Fold-type I~VII) に分類されるが、DsdA は Fold-type II に、Dsd1p は Fold-type III に分類される。DsdA は PLP を結合する大ドメイン、 $\alpha\beta$ 構造を有する小ドメインからなるモノマータンパク質であり (図 2 左)¹⁹⁾、同じ Fold-type に属する PLP 酵素として、SR やセリン/トレオニンデヒドラターゼ (SDH)、トリプトファン合成酵素 β サブユニットなどがある。Dsd1p ファミリーの酵素として、Dsd1p と同時期に見出され 31% の配列相同性を有するニワトリ由来 DSD (chDSD) の構造が明らかとなっている^{21, 22)}。chDSD は N 末端の TIM バレルドメインと C 末端の β バレルドメインからなる head-to-tail 型のホモダイマー構造を有する (図 2 右)。TIM バレルドメインは細菌の D-アラニン合成酵素アラニンラセマーゼの N 末端ドメインと高い相同性を有している。なお、chDSD や Dsd1p からセリンのラセミ化活性は検出されていない。

また、二種類の DSD の大きな差異として、金属イオンの要求性がある。DsdA は活性発現に PLP に加えて K^+ を要求する。 K^+ の結合部位は、同じ Fold-type II に属する SR (Mg^{2+}) や SDH (K^+) などの金属イオン結合部位と同様である。 K^+ は、PLP リン酸基が配位するグリシンクラスターを裏打ちし、酵素と PLP とのアフィニティーを高め、PLP リン酸基の配向や水素結合様式を制御すると示唆されている²⁰⁾。一方、Dsd1p は Zn^{2+} 結合タンパク質であり¹¹⁾、活性中心の PLP の近傍に存在する²²⁾。 Zn^{2+} 除去酵素や Zn^{2+} 結合に関与する His 残基および Cys 残基の変異体は (Dsd1p に

おいては His398 および Cys400)、D-セリンや D-トレオニンに対するデヒドラターゼ活性を完全に失う^{12, 22)}。 Zn^{2+} は D-セリンのヒドロキシル基と相互作用可能な位置に存在し、脱離反応に関与する。 Zn^{2+} は構造的な役割というよりは、触媒的な役割を果たすと予想されている。

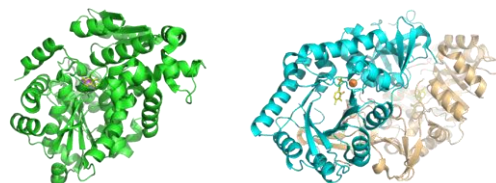


図 2 二種類の D-セリンデヒドラターゼ

DsdA (左、PDB:3SS7) は Fold-type II、Dsd1p (右、PDB:3ANU より作製したモデル図) は Fold-type III に属する PLP 酵素で、両者は進化的・構造的に異なる。PLP をスティック、 K^+ (左) および Zn^{2+} (右) を球で示す。

3. DSD の分布および生理的意義

DsdA に代表される Fold-type II の DSD は一部のバクテリアのみに存在する。*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Pseudomonas aeruginosa* などの一部の Proteobacteria 門細菌と、Firmicutes 門細菌のうち *Bacillus subtilis* や *Lactobacillus plantarum* などが属する β -、および γ -proteobacteria 属細菌に存在する。*E. coli* では D-セリンが L-セリン生合成の初発酵素である D-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼや、補酵素 A (CoA) 生合成に関与するパントイン酸- β -アラニンリガーゼを阻害することが知られる。また、*E. coli* や *Staphylococcus* 属細菌において尿路感染症と D-セリン資化能との関連性が報告されている^{23, 24)}。*E. coli* で DsdA は D-セリンの毒性に対処する解毒酵素であるとともに、D-セリンの唯一の資化酵素である。

Dsd1p と相同性を有するタンパク質は多くの真核生物に見出される。鳥類、爬虫類、魚類、真菌、細胞性粘菌などから見出されるが、なぜ

か哺乳類と植物には存在しない。実際に田中からはニワトリ、コイ、シマヘビ、アフリカツノガエルから D-セリンデヒドラターゼ活性を検出している²⁵⁾。ニワトリ由来酵素は、脳、肝臓、腎臓に存在し、腎臓では近位尿細管に局在している²⁶⁾。なお、これら生物からは DAO 活性も検出されている。すなわち、多くの真核生物は D-セリン合成・代謝酵素として SR、DAO に加え DSD を有する。哺乳類以外の多くの脊椎動物の脳 D-セリンレベルは哺乳類の約 1% であることが報告され、酵母や細胞性粘菌の細胞内における D-セリンレベルもまた痕跡程度である。前述したように DSD の D-セリンに対する反応性は DAO と比べ桁から二桁程度高いことが予想される。多くの真核生物において DSD は、D-セリンの主要な異化酵素として働き、生体内の D-セリンレベルを低レベルに維持している可能性がある。

Dsd1p ホモログは、 α , β , γ , δ -proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes などの細菌にもコードされている。ただし、これらが生体内で D-セリンのデヒドラターゼとして機能しているかは不明である。Dsd1p と 30% 程度の配列相同性を示す *Delftia* sp. HT23 株由来酵素、D-トレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (D-THA) デヒドラターゼは、D-セリンにも高い反応性を示すが、D-THA を最もよい基質とし、D-THA によって発現誘導される²⁷⁾。

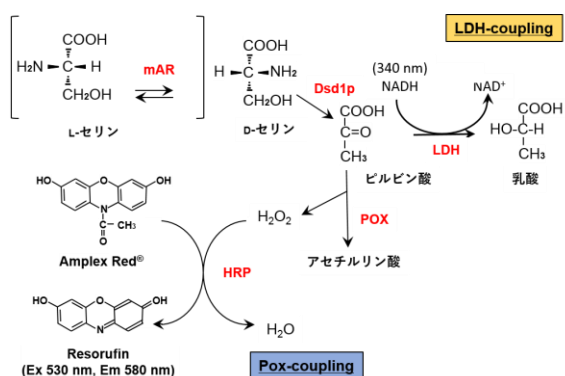


図3 Dsd1p を用いた D-, L-セリン定量法
Dsd1p を用いた二種類の D-, L-セリン酵素定量法の原理。詳しくは本文および文献 14, 15) 参照。

4. DSD のセリン定量法への応用

上述したように、ある種の神経疾患において D-セリン量比の変動が報告されている。また、慢性腎障害患者や急性腎障害モデルマウスにおいて血中 D-セリン比 (D-セリン/L-セリン) の上昇や尿中 D-セリン比の減少が報告されている^{28, 29)}。D-セリンは、種々の神経変性疾患や腎障害の検出やその進行をモニターするマーカー分子として利用できる可能性がある。

現在の D-セリンや L-セリンの定量は専ら HPLC を用いて行われる。HPLC を用いた D-セリン定量は、高感度で多成分の同時分析が可能であるが、前処理が煩雑で、1 サンプルあたりの分析時間が長い。また、分析条件の検討など、専門的手技も要求される。このため、現状では臨床現場で D-セリンレベルをデータとして用いることは困難である。

我々は、Dsd1p が D-セリン以外に、D-トレオニンや D-アロトレオニンにわずかながらの反応性を示す他は、L-セリンや L-トレオニンなどその他アミノ酸に反応性を示さないことを見出し、この特異性を利用した簡便・迅速な二種類の D-, L-セリン酵素定量法を報告している^{14, 15)}。図 3 にそのスキームを示した。いずれの定量法でも D-セリンを Dsd1p により特異的に分解し、生成したピルビン酸を定量する。1 つ目の方法は、D-セリンより生じたピルビン酸を乳酸脱水素酵素 (LDH) によって乳酸へと変換し、この際の NADH (340 nm) の吸光度の減少量から D-セリンを定量する (LDH-coupling 法)。他方は、生成したピルビン酸をピルビン酸オキシダーゼ (POX) によって分解し、生じる H₂O₂ をペルオキシダーゼ (HRP)、Amplex Red® 共存下で定量する (POX-coupling 法)。LDH-coupling 法は 20 μ M 程度、POX-coupling 法は 1 μ M 程度の D-セリンを定量可能である。

現在、L-トレオニン非反応性の L-セリン異化酵素は報告されていない。そこで我々は、反応系にセリンへの反応性を特異的に上昇させた変異型アラニンラセマーゼ (mAR) を用いることで L-セリンの酵素定量を可能とした。mAR はアラ

ニンやセリンに加え、いくつかのアミノ酸をラセミ化するが、トレオニンに対する反応性は有していない。サンプル中 L-セリンは mAR によって D-セリンに変換され、その後は上記と同様の原理で定量される。

上記定量法は、UV もしくは蛍光分光光度計があれば測定できる。マルチウェルプレートを用いることで、100 サンプル程度であれば、1 時間程度で定量が可能である。また、特別な手技も必要ない。本法は D-セリン、もしくは L-セリンをバイオマーカーとして利用した種々の疾病の検出、モニタリングに有効な指標になり得ると予想される。

謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果の大部分は、名古屋大学大学院生命農学研究科にて行われたものである。終始ご指導頂いた吉村徹教授、共に研究に取り組んだ研究室の学生諸子に感謝致します。

文 献

- 1) 西川徹. 2008. 脳の内在性 D-セリンの代謝・機能と精神神経疾患における意義. 生化学 80: 267-276
- 2) 掛川 渉, 柚崎 通介. 2014. D-アミノ酸の神経生理: 脳内 D-セリンによる記憶・学習制御. 生物工学 92: 657-660
- 3) Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN. 2008. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. FEBS J. 275: 3514-3526
- 4) Wolosker H, Mori H. 2012. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. Amino Acids. 43: 1895-1904
- 5) 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
- 6) Yamanaka M, Miyoshi Y, Ohide H, Hamase K, Konno R. 2012. D-Amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino-acid oxidase

activity. Amino Acids. 2012. 43: 1811-1821

- 7) Sacchi S. 2013. D-Serine metabolism: new insights into the modulation of D-amino acid oxidase activity. Biochem Soc Trans. 41: 1551-1556
- 8) Wolosker H, Balu DT, Coyle JT. 2016. The Rise and Fall of the D-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. Trends Neurosci. 39: 712-721
- 9) 上里彰仁. 2013. グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患. D-アミノ酸研究会誌 1: 1-6
- 10) Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S. 2007. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. EMBO J. 26: 4149-4159.
- 11) 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
- 12) Ito T, Koga K, Hemmi H, Yoshimura T. 2012. Role of zinc ion for catalytic activity in D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS J. 279 :612-624
- 13) Ito T, Matsuoka M, Koga K, Hemmi H, Yoshimura T. 2014. Reaction mechanism of Zn²⁺-dependent D-serine dehydratase: role of a conserved tyrosine residue interacting with pyridine ring nitrogen of pyridoxal 5'-phosphate. J Biochem. 156: 173-180
- 14) 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.
- 15) Naka, T., Ito, T., Hemmi, H. & Yoshimura, T. 2010. A highly sensitive enzymatic assay for D- and total serine detection using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Catal B: Enzym. 67: 150-154.
- 16) Ito T, Takada H, Isobe K, Suzuki M, Kitaura Y, Hemmi H, Matsuda T, Sasabe J, Yoshimura T. 2015. PEGylated D-serine dehydratase as a D-serine reducing agent. J Pharm Biomed Anal. 116: 34-39.
- 17) Dowhan W Jr, Snell EE. 1970. D-serine

- dehydratase from *Escherichia coli*. II. Analytical studies and subunit structure. *J Biol Chem.* 245: 4618-28.
- 18) Marceau M, McFall E, Lewis SD, Shafer JA. 1988. D-serine dehydratase from *Escherichia coli*. DNA sequence and identification of catalytically inactive glycine to aspartic acid variants. *J Biol Chem.* 263: 16926-16933.
- 19) Urusova DV, Isupov MN, et al. 2012. Crystal structure of D-serine dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1824:422-432
- 20) Kojiro CL, Marceau M, Shafer JA. 1989. Effect of potassium ion on the phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectrum of the pyridoxal 5'-phosphate cofactor of *Escherichia coli* D-serine dehydratase. *Arch Biochem Biophys.* 268: 67-73
- 21) Tanaka H, Yamamoto A, Ishida T, Horiike K. 2008. D-Serine dehydratase from chicken kidney: a vertebral homologue of the cryptic enzyme from *Burkholderia cepacia*. *J Biochem.* 143: 49-57
- 22) Tanaka H, Senda M, Venugopalan N, Yamamoto A, Senda T, Ishida T, Horiike K. 2011. Crystal structure of a zinc-dependent D-serine dehydratase from chicken kidney. *J Biol Chem.* 286: 27548-27558
- 23) Roesch PL, Redford P, Batchelet S, Moritz RL, Pellett S, Haugen BJ, Blattner FR, Welch RA. 2003. Uropathogenic *Escherichia coli* use D-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Mol Microbiol.* 49: 55-67
- 24) Korte-Berwanger M, Sakinc T, Kline K, Nielsen HV, Hultgren S, Gatermann SG. 2013. Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of *Staphylococcus saprophyticus* for virulence. *Infect Immun.* 81: 4525-4533
- 25) Tanaka H, Yamamoto A, Ishida T, Horiike K. Discovery of D-serine dehydratase in vertebrate and its deficiency in mammals. 2009. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 54: 1190-1196
- 26) Nishimura Y, Tanaka H, Ishida T, Imai S, Matsusue Y, Agata Y, Horiike K. 2014. Immunohistochemical localization of D-serine dehydratase in chicken tissues. *Acta Histochem.* 116: 702-707.
- 27) Maeda T, Takeda Y, Murakami T, Yokota A, Wada M. 2010. Purification, characterization and amino acid sequence of a novel enzyme, D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase, from *Delftia* sp. HT23. *J Biochem.* 148: 705-712.
- 28) Sasabe J, Suzuki M, Miyoshi Y, Tojo Y, Okamura C, Ito S, Konno R, Mita M, Hamase K, Aiso S. 2014. Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers. *PLoS One.* 9:e86504.
- 29) Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. 2016. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Sci Rep.* 6: 26137.



伊藤 智和 (いとう ともかず)

略歴

- 2000-2004 名古屋大学農学部応用生物科学科
2004-2009 名古屋大学大学院生命農学研究科
博士(農学)
2008-2010 日本学術振興会特別研究員
2009-2010 京都大学化学研究所
2010-2016.5 名古屋大学大学院生命農学研究科
助教
2016.6-現在 名古屋大学大学院生命農学研究科
講師