

Award Accounts

第8回 D-アミノ酸学会奨励賞

D-アミノ酸を介する多様な相互作用

鈴木 将貴

慶應義塾大学 医学部 薬理学教室 特任助教

1. はじめに

筆者はこれまでに哺乳類における D-アミノ酸の生理的、病態生理的意義について研究を行ってきた。生物の基本的な活動のほとんど全て「相互作用」が基盤となっている。分子生物学的現象は分子間相互作用を必要とするだけでなく、個々の細胞は他の細胞と相互作用し組織構造や機能を形成し、器官（臓器）を構築する。さらに最近では器官同士が血液やリンパを介して様々なシグナルをやりとりしていることが徐々に明らかになり、全身の臓器の相互作用という、マクロな視点での研究が盛んになってきている。相互作用を観察することで、動物个体の中で起こっている分子間、細胞間、組織間の現象の一端を見いだすことができるのではないかと考えている。

本稿では 1. 神経伝達物質 D-セリンの調節機構と糖代謝の相互作用、2. 宿主—腸内細菌間の相互作用における D-アミノ酸代謝の意義、の 2 つの項目について筆者の研究を紹介したい。

2. 神経伝達物質 D-セリンの糖代謝による調節メカニズム

興奮性グルタミン酸受容体の 1 つである N-Methyl-D-Aspartate 受容体 (NMDAR) は大脳皮質や海馬の神経に発現し、神経細胞にカルシウムの流入を引き起こすことで興奮性神経伝達を誘導し、情動、記憶、学習に重要な役割を担うことが知られている^{1),2)}。D-セリンは NMDAR の NR1 サブユニットのグリシン結合部位に結合し

受容体の活性を調節することで^{3),4)}、哺乳類の脳の活動を制御している。

D-セリンは内在性に発現する酵素セリンラセマーゼ (SRR) によって L-セリンから合成され、D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) によって分解される^{5),6)}。D-セリンはマウスやヒトの脳において大脳皮質や海馬に分布し、小脳や脳幹、脊髄には限定的である⁷⁾。筆者はヒト脳検体における D-セリンの分布をより詳細に調べたところ、大脳皮質においても領域ごとに存在量が異なり、特に前頭側頭葉や側頭葉聴覚野で濃度が高く、眼窩前頭皮質や視覚野で相対的に低いことを確認した⁸⁾。このような D-セリンの分布は SRR と DAO の発現比率および酵素活性で決定され、正常な脳では D-セリンの量は厳密に制御されている。しかし D-セリンが減少すると正常な神経活動が行われず、統合失調症の発症リスクとなると考えられている⁹⁾。一方、D-セリンの増加は NMDAR の過剰興奮を引き起こし、神経細胞死を誘導することで神経変性疾患の発症に寄与することが報告されている^{10),11)}。

ではどのようなメカニズムで D-セリンの量は制御されているのだろうか？ 大脳皮質や海馬では SRR の発現が高いことから、SRR の活性が重要と考えられる。SRR はピリドキサルリン酸を補酵素とし、ATP によって活性が増加することが知られている¹²⁾。また、GRIP, DISC1 などのタンパク質との相互作用や翻訳後修飾などにより調節される¹³⁻¹⁷⁾。これらの SRR 調節メカニズムの多くは神経伝達後のフィードバックメカニズムとして説明されている。

そのような中、筆者は 1 型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン投与マウスにおける脳内

の D-セリン量を測定したところ、海馬において D-セリンが増加することを発見した (図 1A)¹⁸⁾。この D-セリンの増加はインスリンの投与により抑制されたことから、糖代謝が D-セリンの量を調節している可能性がある。

脳に取り込まれたグルコースはアストロサイトが取り込み、解糖系活性によりピルビン酸や乳酸に分解する。ピルビン酸や乳酸は神経細胞へ輸送され、ミトコンドリア TCA サイクルおよび酸化リン酸化の基質として利用されると考えられている。すなわち脳の糖代謝制御はアストロサイトが重要な役割を担う。脳内では SRR は主に神経細胞に局在するが、一部アストロサイトにも存在すると考えられている。そこで糖代謝と D-セリン合成の関連性を明らかにするため、マウス初代培養アストロサイトに解糖系を阻害する 2-デオキシグルコース、ミトコンドリアの酸化リン酸化を阻害して代償的に解糖系を活性化する MPP⁺、Rotenone、Antimycin A を処理し、合成される D-セリンの量を測定した。その結果、解糖系を阻害すると D-セリンの合成が亢進し、一方で解糖系が活性化すると D-セリ

ンの合成は抑制された。合成される D-セリンの量はグルコースの消費量と負の相関を示していた (図 1B)。

そこで糖代謝に関わる分子が SRR の活性を調節すると予想し、プルダウン法による相互作用解析を行ない、新規にグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が結合することを発見した。続いて精製タンパク質を用いて SRR 活性への影響を調べたところ、GAPDH とその基質である glyceraldehyde-3-phosphate および酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 共存化で SRR 酵素活性が抑制されることを発見した (図 1C)。さらに GAPDH より合成される還元型 NADH は、SRR の補酵素 ATP を乖離させることで活性を阻害することが明らかとなった (図 1D, E)¹⁹⁾。アストロサイトの解糖系が活性化すると GAPDH と SRR の結合および NADH 産生を介して D-セリン合成が減少する (図 1F)、すなわち D-セリンの量が脳の糖代謝によって制御されることを示しており、それにより神経伝達が制御されている可能性がある。

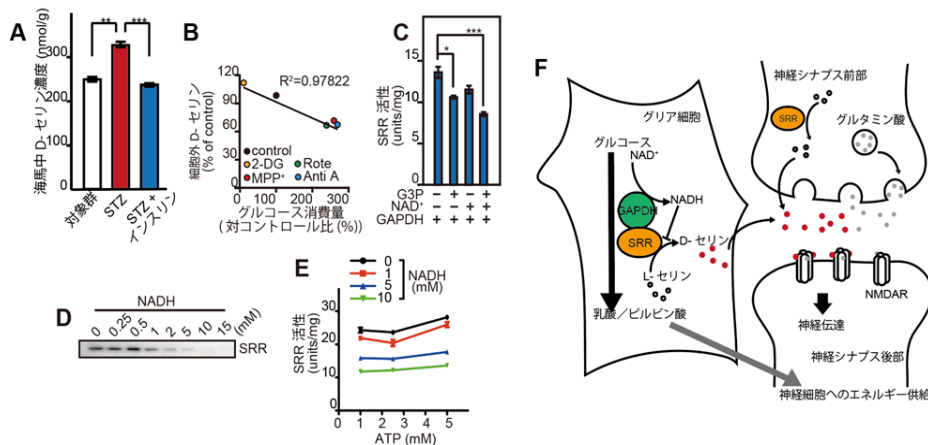


図 1 糖代謝による D-セリンの制御

(A) ストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病モデルマウスにおける海馬組織中 D-セリン濃度。インスリン投与により D-セリンの上昇は抑えられる。(B) 初代培養アストロサイトにおけるグルコース消費量と D-セリン産生量の相関。D-セリン合成量は解糖系ヘキソキナーゼ阻害剤 2-デオキシグルコース (2-DG) により増加し、ミトコンドリア酸化リン酸化阻害剤であるロテノン (Rote)、1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP⁺)、アンチマイシン A (Anti A) により減少する。(C) GAPDH とその基質共存化における SRR 活性。GAPDH の酵素反応により SRR 活性が低下する。(D) SRR と ATP の結合阻害。biotin-ATP と SRR の結合が NADH により濃度依存的に阻害される。(E) NADH による SRR 活性阻害。NADH の濃度依存的に SRR の活性が阻害され、5mM 以上の濃度の NADH では ATP を増加しても SRR 活性は回復しない。(F) 糖代謝と D-セリン合成の関係を示す模式図。アストロサイトは高い解糖系活性を持つが、GAPDH は SRR に結合して NADH を産生することで SRR と ATP の結合を阻害し、D-セリンの合成を抑制していると考えられる。これらは NMDAR を介する神経伝達に影響している可能性がある。

3. D-アミノ酸を介する宿主-腸内細菌相互作用

哺乳類の腸管には自身の細胞の数より多いバクテリアを保有している。腸内細菌は宿主が摂取した食物より栄養を獲得する一方、宿主にとって不可欠なビタミンなどの栄養素を供給することで共生関係が成立している。しかしながら感染症や抗生物質の乱用による腸内細菌叢の乱れは共生関係を崩し、時に共生細菌が宿主にとって害となることがある。近年のシーケンス解析技術の飛躍的な発展は腸内細菌研究を大きく進展させ、代謝性疾患、免疫疾患、神経疾患やがんなど様々な領域の疾患との関係性が積極的に研究されている²⁰⁻²³。そこで以下に D-アミノ

酸を介する腸内細菌と宿主免疫の相互作用について述べたい。

哺乳類の体内に存在する D-アミノ酸のうち、D-セリンと D-アスパラギン酸を除いて、ほとんどは腸内細菌由来と考えられている。バクテリアは D-アラニンや D-グルタミン酸などを合成し、ペプチドグリカン合成の基質として利用している。D-アミノ酸を利用することで宿主の消化酵素に対し抵抗性を持つことができる。それに対し宿主は小腸の盃細胞より DAO を分泌し、D-アミノ酸を分解して H₂O₂ を産生させ、コレラ菌などの腸管感染性細菌を殺菌し、宿主の腸内細菌叢を制御していることが報告されている²⁴。一方で、バクテリアが産生する D-アミノ酸が宿主の免疫機構に与える影響は明らかでない。

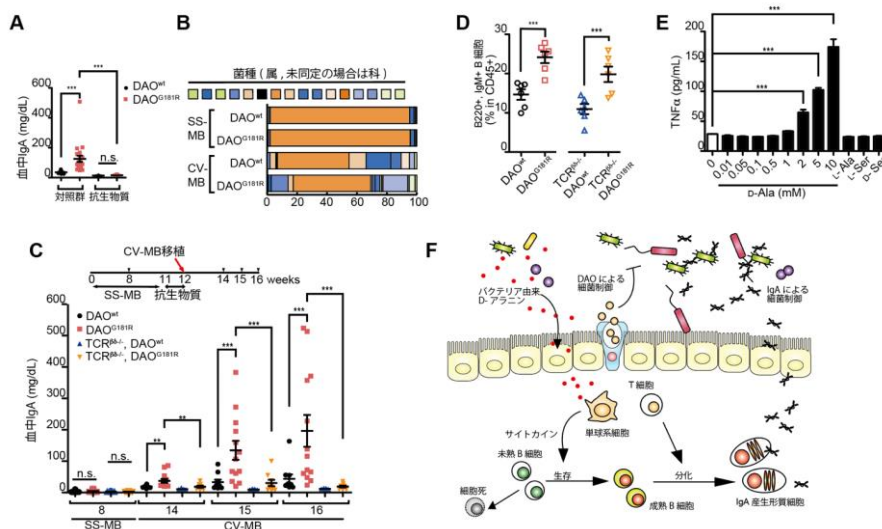


図2 腸内細菌由来 D-アミノ酸による B 細胞の分化制御と IgA 産生調節

(A) DAO 活性欠損(DAO^{G181R})マウスにおける血中 IgA 濃度。対照群では DAO^{G181R} マウスで IgA が高値を示すが、抗生物質の投与により差は認められなくなる。(B)通常の SPF (CV-MB) 環境および特定の菌叢のみを持つ環境 (SS-MB) における DAO 活性有無による菌叢の違い。SS-MB では DAO 活性の有無による菌叢の差は認められないが、CV-MB では大きく異なる。(C)各遺伝子欠損マウスにおける血中 IgA 濃度。SS-MB 環境から CV-MB の菌叢を移植すると DAO^{G181R} マウスに血中 IgA の増加が認められるが、TCRβδ を欠損した DAO^{G181R} マウスでは認められない。(D) SS-MB 環境における腸管粘膜固有層の IgM 陽性 B 細胞の割合。DAO^{G181R} マウスでは IgM+ 成熟 B 細胞が増加しており、この差は TCRβδ 欠損でも同様に認められる。(E)D-アラニンによる骨髄由来マクロファージからの TNFα 産生亢進。(F) バクテリア由来 D-アミノ酸による B 細胞および IgA 産生制御機構。正常な小腸粘膜組織では DAO が発現し菌叢を制御している。DAO 活性欠損動物ではバクテリア由来の D-アラニンが小腸粘膜組織に取り込まれ、粘膜下層の単球系細胞 (マクロファージなど) を刺激して炎症性サイトカインを放出する。これにより B 細胞の生存率が高まる。さらに T 細胞刺激の入力をうけると IgA 産生形質細胞に分化し IgA 産生が増加する。

筆者は DAO 活性欠損 (DAO^{G181R}) マウスの糞便中 IgA が野生型と比較して多いことに着目した。IgA は腸管粘膜の主要な免疫グロブリンであり、腸管粘膜上皮組織に局在する B 細胞から分化した形質細胞より分泌される。管腔側へ移行した IgA は腸内細菌を認識して細菌の活動を制限する。IgA には T 細胞非依存性に産生される特異性の低い自然 IgA と呼ばれる型と、T 細胞依存性に誘導される抗原特異性の高い IgA の 2 種類が存在する。前者は恒常的に産生され、共生細菌の過剰な増殖を制御していると考えられ、後者は獲得免疫機構として感染症に対する抵抗性に寄与している。

筆者は DAO^{G181R} マウスの血液中 IgA を測定したところ、野生型と比べて有意に高いことを発見した。このマウスに抗生物質を投与すると IgA の増加が抑えられたことから、DAO が腸内細菌制御を介して IgA 産生に影響していると考えられた (図 2A)。そこで通常の SPF 環境で飼育したマウスの小腸内細菌叢 (CV-MB) を解析したところ、野生型と DAO^{G181R} マウスでは異なる菌が生着しやすいことを発見した (図 2B)。DAO^{G181R} マウスで増加していた菌の一部 (セグメント細菌など) は T 細胞依存性の IgA を誘導することが知られている。したがって、DAO は IgA 誘導性細菌の増殖を抑制することで過剰な IgA 産生を抑制していると考えられた。

続いて IgA 産生に T 細胞が関与するか否かを T 細胞受容体 β および δ のダブルノックアウトマウスと DAO 活性欠損マウスを交配することで検証した。T 細胞受容体を欠損したマウスでは CV-MB において DAO の活性欠損による IgA の産生誘導が有意に抑制された (図 2C)。したがって DAO 活性欠損マウスの IgA 増加は T 細胞に強く依存すると言える。

一方で、特定の腸内細菌のみ (SS-MB) を保有するマウスで同様に菌叢解析と小腸上皮における B 細胞の解析を行った。SS-MB は小腸における菌叢の 90% が *Lactobacillus* という特殊な菌

叢であるが、通常の SPF 環境と比べても解剖組織学的に大きな差は認められない。興味深いことに SS-MB の菌叢をもつマウスでは DAO 活性の有無による菌叢に差はなく (図 2B)、血中 IgA+濃度にも野生型と DAO^{G181R} マウスで差は認められない (図 2C)。一方で IgM+成熟 B 細胞が DAO^{G181R} マウスで増加しており、この差は T 細胞受容体欠損マウスでも同様に認められた (図 2D)。この結果は IgM+B 細胞が菌叢および T 細胞非依存的に増加したことを意味している。

そこで DAO 活性欠損による成熟 B 細胞の増殖メカニズムを明らかにするため、T 細胞受容体欠損マウスの DAO 活性の有無による腸管遺伝子発現をマイクロアレイにより比較したところ、自然免疫や感染症に対する反応に関与する遺伝子群が多数ヒットした。さらにパスウェイ解析を行った結果、シグナル上流の因子として TNF α や IL1 β , IFN γ などのサイトカインの関与が示された。そこで腸内細菌に由来する DAO の基質のうち小腸で増加している D-アラニンをもとに骨髄由来マクロファージに処理したところ、濃度依存的な TNF α の増加を認めた (図 2E)。このことから、腸内細菌由来の D-アラニンがマクロファージを刺激し、炎症性サイトカインの放出を介して成熟 B 細胞の増加に寄与していると考えられた (リバイス中)。

D-アラニンは細菌の細胞壁合成に不可欠な成分であることから、D-アラニンを宿主の免疫細胞が認識することは生物の免疫獲得の進化上でも初期から存在する古典的な機構であると考えられる。しかしながら D-アラニンを認識する機構は報告がなく、それらを同定する研究を進めている。

謝 辞

ここに述べた研究成果は共同研究者や企業の方々、慶應義塾大学医学部解剖学、薬理学、東京医科大学薬理学講座のラボメンバーのサポートがあったおかげで得ることができました。研究の基礎から指導して頂いた慶應義塾大学の笹部先生、研究の土台となった HPLC 技術を教えてくださいました九州大学の浜瀬先生には深く感謝申し上げます。多くの方々に巡り会えた環境に感謝し、その方々との「相互作用」のおかげで得られた研究成果を誇りに思うと同時に、今後さらに研鑽を積み D-アミノ酸の研究を広げたい。

参考文献

- 1) Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* 2010;626(1):49-56.
- 2) Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JN, Monyer H, et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(3):181-92.
- 3) Reynolds IJ, Murphy SN, Miller RJ. 3H-labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7744-8.
- 4) Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Science.* 1988;241(4867):835-7.
- 5) Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO, Jr., Ferris CD, et al. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(2):721-5.
- 6) Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, Niwa A, Yasumura Y, Oka T, et al. Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neuroscience letters.* 1993;152(1-2):33-6.
- 7) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K. Endogenous D-serine in rat brain: *N*-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem.* 1993;60(2):783-6.
- 8) Suzuki M, Imanishi N, Mita M, Hamase K, Aiso S, Sasabe J. Heterogeneity of D-Serine Distribution in the Human Central Nervous System. *ASN Neuro.* 2017;9(3):1759091417713905.
- 9) Coyle JT, Balu DT. The Role of Serine Racemase in the Pathophysiology of Brain Disorders. *Adv Pharmacol.* 2018;82:35-56.
- 10) Billard JM. Changes in Serine Racemase-Dependent Modulation of NMDA Receptor: Impact on Physiological and Pathological Brain Aging. *Front Mol Biosci.* 2018;5:106.
- 11) Paul P, de Belleruche J. The role of D-amino acids in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a review. *Amino Acids.* 2012;43(5):1823-31.
- 12) De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H. Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14542-7.
- 13) Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, et al. Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(6):2105-10.
- 14) Ma TM, Abazyan S, Abazyan B, Nomura J, Yang C, Seshadri S, et al. Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. *Mol Psychiatry.* 2013;18(5):557-67.
- 15) Mustafa AK, Kumar M, Selvakumar B, Ho GP, Ehmsen JT, Barrow RK, et al. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2950-5.
- 16) Balan L, Foltyn VN, Zehl M, Dumin E, Dikopoltsev E, Knoh D, et al. Feedback inactivation of D-serine synthesis by NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(18):7589-94.

- 17) Kolodney G, Dumin E, Safory H, Rosenberg D, Mori H, Radzishevsky I, et al. Nuclear Compartmentalization of Serine Racemase Regulates D-Serine Production: IMPLICATIONS FOR *N*-METHYL-D-ASPARTATE (NMDA) RECEPTOR ACTIVATION. *J Biol Chem.* 2015;290(52):31037-50.
- 18) Suzuki M, Sasabe J, Furuya S, Mita M, Hamase K, Aiso S. Type 1 diabetes mellitus in mice increases hippocampal D-serine in the acute phase after streptozotocin injection. *Brain Res.* 2012;1466:167-76.
- 19) Suzuki M, Sasabe J, Miyoshi Y, Kuwasako K, Muto Y, Hamase K, et al. Glycolytic flux controls D-serine synthesis through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(17):E2217-24.
- 20) Jamshidi P, Hasanzadeh S, Tahvildari A, Farsi Y, Arbabi M, Mota JF, et al. Is there any association between gut microbiota and type 1 diabetes? A systematic review. *Gut Pathog.* 2019;11:49.
- 21) Li XV, Leonardi I, Iliev ID. Gut Mycobiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Immunity.* 2019;50(6):1365-79.
- 22) Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(11):690-704.
- 23) Tremlett H, Bauer KC, Appel-Cresswell S, Finlay BB, Waubant E. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Ann Neurol.* 2017;81(3):369-82.
- 24) Sasabe J, Miyoshi Y, Rakoff-Nahoum S, Zhang T, Mita M, Davis BM, et al. Interplay between microbial d-amino acids and host d-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2016;1(10):16125.



鈴木 将貴 (すずき まさたか) 氏

略歴

- 2004-2008 北里大学薬学部
- 2008-2010 慶應義塾大学大学院
医学研究科 修士課程
- 2010-2014 慶應義塾大学大学院
医学研究科 博士(医学)
- 2014-2017 慶應義塾大学医学部解剖学教室
特任助教
- 2017 東京医科大学薬理学講座 研究員
- 2018-2020 慶應義塾大学医学部薬理学教室
訪問研究員
- 2017-2020 日本学術振興会 特別研究員(PD)
- 2020-現在 慶應義塾大学医学部薬理学教室
特任助教