

Award Accounts

第 11 回 D-アミノ酸学会奨励賞

C. elegans における D-アミノ酸バイオシステム

齋藤 康昭

北里大学薬学部

D-Amino acid biosystem in *C. elegans*

Yasuaki SAITOH

Faculty of Pharmaceutical Life Sciences, Kitasato University

1. はじめに

近年の光学分割法をはじめとする分析技術の進展に伴い、遊離型の D-アミノ酸は広く生物界に存在することが明らかになってきた。ヒトを含めた哺乳類体内には、D-セリン、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸などが存在する。これらの D-アミノ酸のうち、D-セリンと D-アスパラギン酸は、哺乳類体内で生合成され比較的高濃度で存在して、神経伝達、内分泌機能や生殖機能に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。D-セリンの合成酵素としては D-セリンと L-セリンとの間で相互変換を触媒するセリンラセマーゼ (SerR) が知られている。また、D-セリンなどの中性・塩基性 D-アミノ酸を立体特異的に分解する酵素として D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) が知られている。哺乳類におけるこれらの酵素は D-セリンの体内濃度を調節していると考えられている。一方、哺乳類における D-アスパラギン酸の生合成経路については未だ不明な点が多いが、D-アスパラギン酸の体内濃度は酸性 D-アミノ酸を基質にする D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) によって調節されている。

筆者らは D-アミノ酸とその合成・分解酵素の生理機能を分子論的に解析するために、センチユウ *Caenorhabditis elegans* を材料にして研究を行ってきた。*C. elegans* は全ゲノム配列が決定され、遺伝学的・分子生物学的に解析がしやすい多細胞モデル生物である。*C. elegans* には雌雄同体と雄の 2 つの性別が存在し、ほとんどが雌雄同体で、ごく稀に雄を産む。ライフサイクルは受精から孵化までの胚発生期、4 段階の幼虫期 (L1 幼虫から L4 幼虫)、生殖を行う成虫期で構成され、全体で約 3 日と非常に短い。*C. elegans* は土壌に生息して、D-アラニンや D-グルタミン酸といった D-アミノ酸を豊富に含む細菌を餌としている (実験室では大腸菌を塗布した寒天培地上で培養する)。このことから、*C. elegans* は D-アミノ酸を体内に摂取し、重要な生理活性物質として用いている可能性が考えられる。実際、*C. elegans* 体内には多様な D-アミノ酸が存在し、様々な生理機能を有していることを発表してきた。本稿ではこれまでに明らかにした、*C. elegans* における D-アミノ酸バイオシステムについて概説する。

【責任著者/Corresponding Author】

齋藤 康昭 北里大学薬学部 〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1 TEL: 03-5791-6380
Yasuaki SAITOH Faculty of Pharmaceutical Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan TEL: 81-3-5791-6380
E-mail: saitohy@pharm.kitasato-u.ac.jp

2. *C. elegans* 体内の D-アミノ酸

D-アミノ酸が *C. elegans* 個体において担っている生理機能を解明するために、各成長段階における *C. elegans* 体内の D-アミノ酸を定量した¹⁾。 *C. elegans* の同調培養を行い、各成長段階（卵、L1 幼虫、L3 幼虫、成虫の各期）にある *C. elegans* のホモジネートを超音波処理により調製した。得られたホモジネート中の D, L-アミノ酸を HPLC ジアステレオマー法あるいは HPLC キラル固定相法を用いて分離・定量した。D-アミノ酸の同定は DAAO あるいは DDO を用いた酵素消化により行い、D-アミノ酸のクロマトグラム上のピークが完全に消失することで確かめた。その結果、いずれの成長段階においても D-セリン、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸が検出され、その含量は成長に伴って増加することが認められた。

タンパク質中の D-アミノ酸は、加齢の過程で非酵素的なラセミ化反応によって自発的に生じ、異常なタンパク質の凝集体が生成して白内障などの加齢性疾患を引き起こしていると考えられている。一方、遊離型の D-アミノ酸の老化過程における量的変動と老化の相関性は報告されていなかった。*C. elegans* の成虫の平均寿命は約 2 週間と非常に短いため、老化研究の主要なモデル生物としても利用されている。筆者らは *C. elegans* 体内の D-アミノ酸含量が老化に伴ってどのように変動するのか解析した²⁾。D-セリン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸の体内含量は、老化の過程で目立った変化はなかった。一方、D-アラニンの体内含量は老化に伴って著しく増加し、成虫 1 日目（若齢期）と比較すると成虫 10 日目（老齢期）で約 6 倍に達した。更に、この D-アラニン含量の増加は老化が抑制されている長寿命変異株において遅れて起こるといった結果が得られた。これらの結果は、D-アラニンが健康・老化の状態を客観的に評価することができる老化バイオマーカーになりうることを示している。

C. elegans の L1 幼虫は飢餓状態などの環境の悪化に対応して、脂肪を体内に蓄積しエネルギー

ーを節約しながら長期間餌なしで生存できる耐性幼虫という休眠状態に変化する。正常発生した *C. elegans* の寿命は約 2 週間であるが、耐性幼虫は 2~3 ヶ月間も生存し、この間に老化は起こらない。その後外部環境が改善されると、耐性幼虫は正常発生の L4 幼虫に復帰する。正常発生した幼虫では全セリン（L 体+D 体）含量の約 5%が D-セリンであるのに対して、耐性幼虫では約 20%にまで D-セリン含量が増加していた（未発表データ）。すなわち、D-セリンが *C. elegans* の休眠の調節に何らかの役割を果たしている可能性が示された。50 年以上前から、カイコ幼虫が蛹へ変態する際に一過的に D-セリン含量が増加することが知られているが³⁾、この問題は未説明のまま残されている。

3. SerR

C. elegans の餌の大腸菌 OP50 株に含まれる D-アミノ酸を定量したところ、D-セリンは検出されず、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸が検出された¹⁾。*C. elegans* で検出された D-セリンは体内で生合成されていることが示唆された。一方、*C. elegans* で検出された D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸は少なくとも一部は餌に由来していることが考えられた。

C. elegans の統合データベース（WormBase; <http://www.wormbase.org>）において SerR をコードすると推定される T01H8.2 遺伝子（SERR-1 と命名した）が存在する。実際、SERR-1 はマウス SerR と比較して弱いながら SerR 活性を持つことが明らかにされている⁴⁾。筆者らは SERR-1 が *in vivo* において D-セリンの生合成に関与しているかどうか明らかにするために、SERR-1 遺伝子のエキソン領域を欠失した *C. elegans* 変異株体内の D, L-アミノ酸を定量した。その結果、SERR-1 変異株の成虫の D-セリン含量は野生株と同程度であり、L-セリン含量においても違いは認められなかった⁵⁾。したがって、SERR-1 は *in vivo* において D-セリンの主要な合

成酵素ではないことが示唆された。しかし興味深いことに、餌のある寒天培地（通常の飼育条件）から餌のない寒天培地に *C. elegans* 野生株を移すと、10分間という短時間でD-セリン含量が増加するが、この増加は SERR-1 変異株では完全に抑制されていた⁶⁾。すなわち、*C. elegans* は変化した環境への適応行動に神経調節因子としてD-セリンを利用しており、その合成を SERR-1 が担っていることが明らかになった（詳細は後述する）。最近、組換えタンパク質を用いた解析によりカイコ SerR が見出され、本酵素は哺乳類 SerR に存在しない ACT-like ドメインを有するという特徴を持つことが報告された⁷⁾。*C. elegans* ゲノムには、ACT-like ドメインを持ち、哺乳類 SerR と相同性が高い Y51H7C.9 遺伝子が存在する。この遺伝子が *C. elegans* 体内の D-セリン合成に深く関わっている可能性が考えられる。

4. DAAO と DDO の酵素学的性質

筆者らは、WormBase において DAAO あるいは DDO をコードすると推定されていた4種類の遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子の産物タンパク質を大腸菌で発現させて精製し、詳細な酵素学的性質を解析した^{8,9)}。その結果、*C. elegans* には1種類の DAAO (DAAO-1 と命名した) と3種類の DDO (それぞれ DDO-1, DDO-2, DDO-3 と命名した) が存在することが明らかになった。*C. elegans* が複数の DDO 遺伝子を持つ生物として最初の報告例となった。*C. elegans* DAAO の基質特異性はヒト DAAO とは異なっており、D-アラニンに対する触媒効率がヒト DAAO と同程度である一方で、D-セリンに対する触媒効率はやや低く、D-アルギニンや D-ヒスチジンといった塩基性 D-アミノ酸に対する触媒効率が高かった。3種類の *C. elegans* DDO の基質特異性もヒト DDO とは異なっており、D-アスパラギン酸に対してのみならず、ヒト DDO がほとんど活性を示さない D-グルタミン酸に対しても高い触媒効率を示した。*C. elegans*

DAAO と3種類の DDO の補酵素依存性とその結合様式を解析したところ^{9, 10)}、他の生物の DAAO や DDO と同様に FAD と非共有結合するフラビン酵素であることが明らかになり、とりわけ、*C. elegans* DDO-1 の FAD との非共有結合は *C. elegans* や哺乳類の DAAO や DDO と異なり非常に強力であるという特徴を有していた。

5. DAAO と DDO の時空系分布

D-アミノ酸の生理機能を知るうえで、これらの酵素の局在情報は極めて重要である。筆者らは、DAAO-1 と3種類の DDO の *C. elegans* 個体における発現時期や組織分布といった時空系分布の解析を行った¹⁾。そのために、各酵素遺伝子のプロモーター領域の下流に GFP がコードされたレポータープラスミドを構築した。次に、それらを *C. elegans* の生殖腺にマイクロインジェクションして形質転換体を樹立した。得られた形質転換体の蛍光観察を行い、レポータータンパク質としての GFP が発現する時期や部位を解析することにより、各酵素が発現する時期や部位を同定した。雌雄同体の形質転換体を用いた蛍光観察では、DAAO-1 と DDO-1 の発現は卵から成虫に至るまで主に消化系で観察された。DAAO-1 と DDO-1 の C 末端にはペルオキシソーム標的化シグナル1 (PTS1) に相当する SKL 配列が存在することから、これらの酵素は他の生物の DAAO や DDO と同様に細胞内ではペルオキシソームに局在すると推測される。DDO-2 の発現は DAAO-1 や DDO-1 と同様に卵から成虫に至るまで消化系で観察され、筋肉系でも観察された。DDO-2 は PTS1 を持たず、ペルオキシソーム以外のオルガネラへの局在化シグナルも持たないことから、細胞質に局在すると推測される。DAAO-1, DDO-1, DDO-2 の雄における時空系分布は、雌雄同体における上述の結果と同様であった。

ヒトを含めた真核生物で見出されている DAAO と DDO はペルオキシソーム酵素であることが知られている。ところが興味深いことに、*C. elegans* DDO-3 は PTS1 を持たず、N 末端に

推定シグナルペプチド (SP) 配列を有することから、分泌タンパク質として細胞外へ放出されると推測された。そこで、DDO-3 が実際に分泌されるのか否かを解析した¹⁾。すなわち、赤色蛍光タンパク質 mCherry あるいは DDO-3 融合 mCherry を DDO-3 遺伝子のプロモーター活性により発現する形質転換体を樹立し、その蛍光観察により DDO-3 の転写局在とタンパク質局在が異なるかどうかを解析した。その結果、雌雄同体の成虫における DDO-3 の転写局在は生殖腺で観察された一方、DDO-3 のタンパク質局在は生殖腺で観察されず、卵母細胞膜で観察された。また、推定 SP 配列を欠失させた DDO-3 のタンパク質局在は、DDO-3 の転写局在と同様であった。これらの結果から、DDO-3 は生殖腺から SP 依存的に分泌され、卵母細胞表面に輸送されていることが明らかになった。更に、雄においては DDO-3 が精囊から精液に、雌雄同体と雄の両方において体腔液に SP 依存的に分泌されていた。このように、DDO-3 はこれまでに報告例がない分泌型 DDO であることが明らかになった。

6. DAAO と DDO の欠損変異株の解析

DAAO-1 と 3 種類の DDO が *in vivo* において D-アミノ酸の分解に関与しているかどうか明らかにするために、これらの酵素遺伝子それぞれのエキソン領域を欠失した *C. elegans* 変異株体内の D-アミノ酸を定量した¹⁾。卵と成虫における D-セリン含量は、いずれの変異株においても野生株との違いは認められなかった。一方、卵における D-アラニン含量は DAAO-1 変異株において有意に増加しており、成虫では増加が見られなかった。更に、D-アスパラギン酸と D-グルタミン酸含量は、卵と成虫でそれぞれ DDO-1 変異株と DDO-3 変異株において有意に増加していた。これらの結果から、DAAO-1、DDO-1、DDO-3 は、それぞれ D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸を *C. elegans* 体内で分解していることが明らかになった。

D-アミノ酸とその分解酵素の生理機能の解明

を目的として、DAAO-1 と 3 種類の DDO の変異株の表現型解析を行った。DAAO-1 変異株と 3 種類の DDO 変異株のいずれにおいても野生株と比較して産卵数と孵化率の低下が認められた¹⁾。一方、各変異株に特有の表現型も認められた。DAAO-1 変異株においては採餌行動パターンに大きな変化が認められた⁶⁾。DDO-1 変異株は受精率の低下¹⁾に加えて、排泄行動の異常と体後部の機械刺激感受性の低下 (未発表データ) を示した。DDO-2 変異株では受精率の低下¹⁾と採餌行動の異常 (未発表データ) が認められた。DDO-3 変異株においては、卵が孵化して成虫になるまでの成長速度の僅かな遅延¹⁾と寿命の大幅な延長^{1,2)}が認められ、頭部の機械刺激感受性の低下¹⁾も認められた。上述したように、各酵素はそれぞれ異なる基質特異性と局在性を示し、各変異株が特有の表現型を示すことから、各酵素は独自の生理学的役割を担っていることが明らかになった。次項からは、表現型の分子メカニズムの解析を通して明らかになった *C. elegans* の採餌行動における D-セリンの役割 (次頁図参照)⁶⁾と、*C. elegans* の寿命制御における D-グルタミン酸の役割²⁾について紹介する。

7. *C. elegans* の適応的な採餌行動を調節する D-セリン

動物にとって、報酬価値が高い餌をいかに効率的に見つけ出すかは重要であり、過去の経験に基づいて採餌行動をとる。通常、*C. elegans* は餌の細菌を塗布した寒天培地上で培養する。この餌が豊富にある寒天培地から餌のない寒天培地に *C. elegans* を移すと、過去の経験に基づいて局所的に餌を探索する。この局所的な餌探索は NMDA 受容体の活性化によって起こる¹²⁾。そして、餌のない寒天培地にいる時間が続くと、その変化した環境に対する適応戦略として広い範囲に分散して餌を探索ようになる。

筆者らは、餌のない寒天培地に移した *C. elegans* 野生株体内の D-セリン含量が、餌のない時間の経過に伴って有意に増加することを見出した。SERR-1 変異株ではこの D-セリン

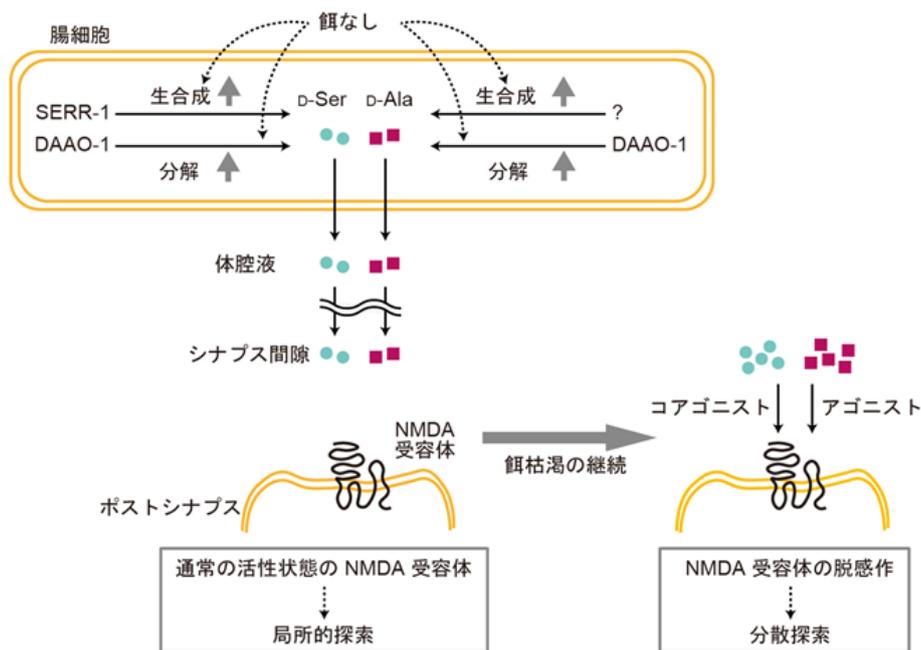


図 C. elegans の適応的な採餌行動を調節する D-セリン

餌枯渇のシグナルは通常の NMDA 受容体の活性化を引き起こして局所的探索を起こす。それと同時に餌枯渇のシグナルは、腸細胞において SERR-1 による D-セリン合成と何らかの機構を介した D-アラニン合成を促進し、合成された D-セリンと D-アラニンは体腔液に放出された後、NMDA 受容体が局在するシナプスの間隙に到達する。餌の枯渇が続くと、シナプス間隙に蓄積した D-セリンと D-アラニンがそれぞれ NMDA 受容体のコアゴニストおよびアゴニストとして作用し、NMDA 受容体の脱感作が起こり分散探索に切り替わる。

含量の増加が完全に抑制されており、局所的に餌を探索し続けて広い範囲に分散することはなかった。DAAO-1 変異株は餌のない寒天培地に移った直後から D-セリン含量が増加すると共に、広い範囲に分散して餌を探索するようになった。これらの結果から、SERR-1 と DAAO-1 による代謝制御を介して、D-セリンが局所的餌探索から分散餌探索への切り替えに重要な役割を持つことが明らかになった。一方、C. elegans 体内の D-アラニン含量は、野生株において餌のない時間が経過しても変化が認められなかったが、DAAO-1 変異株においては餌のない寒天培地に移った直後から増加した。D-アラニンは何らかの機構を介して生合成され、DAAO-1 による分解を受けていることが示唆された。

次に、D-セリンがこの餌探索行動の切り替えにどのように関与しているのかを明らかにするために行動薬理的解析を行った。その結果、

餌のない環境下で増加した D-セリンと D-アラニンがそれぞれ NMDA 受容体のコアゴニストおよびアゴニストとして作用し、NMDA 受容体を持続的に活性化させて、その後の神経応答がなくなる脱感作現象を利用して採餌行動を局所的から広範囲への分散へと切り替えていることが示唆された。D-セリンは進化上の早い時期から高次な脳機能の機能分子として利用されてきたと考えられる。

8. C. elegans の寿命制御における D-グルタミン酸

上述したように、全ての成長段階で D-グルタミン酸含量が増加した DDO-3 変異株の平均寿命は野生株の 1.4 倍に延長していた。餌に D-グルタミン酸を添加すると DDO-3 変異株の平均寿命が更に延長した。すなわち、DDO-3 は D-グルタミン酸ホメオスタシスを介して寿命を制御して

いることが示唆された。更に、運動機能の指標の一つであるスラッシング運動の回数（水泳運動の頻度）が野生株では老化の過程で低下するのに対して DDO-3 変異株では低下が抑制されていたことから、健康寿命も延長していることが判明した。

そこで、*C. elegans* 体内の D-グルタミン酸含量が野生株と DDO-3 変異株の老化に伴ってどのように変動するのか解析した。D-グルタミン酸の体内含量は野生株においては老化の過程で明らかな変化はなかった。しかし、DDO-3 変異株においては成虫 1, 5, 10 日目のいずれにおいても野生株と比較して増加していた。特に、成虫 1 日目から 5 日目にかけて D-グルタミン酸含量が著しく増加し、それ以降も高いレベルで維持されていた。この期間に増加する D-グルタミン酸が寿命延長に強く関与している可能性が示唆された。

次に、D-グルタミン酸と DDO-3 が寿命制御機構でどのような役割を果たしているか明らかにするために、これまでに分離されている寿命に関わる多数の *C. elegans* 変異株を用いて寿命解析を行った。本稿ではその一部の結果を紹介する。モデル動物を用いた寿命研究では、食餌制限を行うと様々な生物の寿命が延長され、霊長類においてはがん、糖尿病、心血管疾患といった老化関連疾患の発症も抑制される。*C. elegans* の摂食障害を示す EAT-2 変異株は食餌制限モデルの一つとして用いられ長寿命を示す。この EAT-2 変異株と DDO-3 変異株の二重変異株の平均寿命は DDO-3 単独変異株と同程度であり、平均寿命の相加的な延長は認められなかった。更に、食餌制限シグナルを受けて抗老化に関わる遺伝子群の発現を誘導する SKN-1 (Nrf 転写因子) の変異株と DDO-3 変異株の二重変異株の平均寿命は、短寿命を示す SKN-1 単独変異株と同程度であり、DDO-3 の不活性化による長寿命効果を完全に消失させた。これらの結果は、DDO-3 変異株の寿命延長が食餌制限による寿命延長と共通のメカニズムを介していることを示している。

著者らは共同研究において、長年その存在に

疑問が持たれていた D-グルタミン酸が確かにマウスに存在することを示し、更に D-グルタミン酸に立体特異的な代謝酵素 D-グルタミン酸シクラーゼ (DGLUCY) を初めてクローニングした¹³⁾。DGLUCY 欠損マウスの心臓では D-グルタミン酸が蓄積し、D-グルタミン酸が心不全に対して保護的に働いていることを示唆した¹³⁾。食餌制限は心血管疾患を抑制することができることから、種を超えた普遍的な寿命制御経路において D-グルタミン酸が重要な役割を持つ可能性が考えられる。

謝辞

本研究は、北里大学 薬学部 生体分子解析学教室および分析化学教室で行われました。ご指導いただいた北里大学 本間浩名誉教授、加藤くみ子教授、片根真澄准教授に深く感謝いたします。また、ご支援いただいた同研究室の諸先生方、卒業生および在学生の皆さま、共同研究者の先生方に深く感謝いたします。本研究は JSPS 科研費および北里大学学術奨励資金により実施された成果です。本研究に用いた *C. elegans* 株は ナショナルバイオリソースプロジェクトおよび Caenorhabditis Genetics Center により提供されたものです。

参考文献

1. Saitoh Y, Katane M, Kawata T et al. Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during the development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*, **32**:1967–1983, 2012.
2. 齋藤康昭, 片根真澄, 本間浩: 寿命制御因子としての D-アミノ酸. 月刊細胞 (石谷太編), 52 巻, 11 号, 632 頁–634 頁, ニューサイエンス社, 2020.
3. Corrigan JJ, Srinivasan NG. The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochemistry*, **5**:1185–1190, 1966.
4. Uda K, Abe K, Dehara Y et al. Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates. *Amino Acids*, **48**:387–402, 2016.

5. Katane M, Saitoh Y, Uchiyama K et al. Characterization of a homologue of mammalian serine racemase from *Caenorhabditis elegans*: the enzyme is not critical for the metabolism of serine *in vivo*. *Genes Cells*, **21**:966–977, 2016.
6. Saitoh Y, Katane M, Miyamoto T et al. D-Serine and D-alanine regulate adaptive foraging behavior in *Caenorhabditis elegans* via the NMDA receptor. *J Neurosci*, **40**:7531–7544, 2020.
7. Tanaka Y, Yoshimura T, Hakamata M et al. Identification and characterization of a serine racemase in the silkworm *Bombyx mori*. *J Biochem*, **172**:17–28, 2022.
8. Katane M, Seida Y, Sekine M et al. *Caenorhabditis elegans* has two genes encoding functional D-aspartate oxidases. *FEBS J*, **274**:137–149, 2007.
9. Katane M, Saitoh Y, Seida Y et al. Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biodivers*, **7**:1424–1434, 2010.
10. Katane M, Kuwabara H, Nakayama K et al. Biochemical characterization of D-aspartate oxidase from *Caenorhabditis elegans*: its potential use in the determination of free D-glutamate in biological samples. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, **1868**:140442, 2020.
11. Saitoh Y, Katane M, Miyamoto T et al. Secreted D-aspartate oxidase functions in *C. elegans* reproduction and development. *FEBS J*, **286**:124–138, 2019.
12. Brockie PJ, Mellem JE, Hills T et al. The *C. elegans* glutamate receptor subunit NMR-1 is required for slow NMDA activated currents that regulate reversal frequency during locomotion. *Neuron*, **31**:617–630, 2001.
13. Ariyoshi M, Katane M, Hamase K et al. D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria. *Sci Rep*, **7**:43911, 2017.



略歴

- 2003–2007 北里大学薬学部
 2007–2009 北里大学大学院薬学研究科
 修士課程
 2009–2012 北里大学大学院薬学研究科
 博士課程 博士（薬学）
 2012–現在 北里大学薬学部助教