

## 論文の内容の要旨

氏名：鈴木 千尋

専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：カイコガ *Bombyx mori* の成長過程における D-セリンの役割に関する研究

アミノ酸は、生体構成成分であるタンパク質を構築する最重要な生体分子である。100 以上のアミノ酸がアミノ基とカルボキシ基間で縮合重合した高分子がタンパク質である。生体内には以下のように種々のタンパク質が存在し、生命活動・生命維持のためにそれぞれの役割を遂行している。代謝などの化学反応の触媒である酵素、外界や体内からの刺激・情報を受け取る受容体、体の防御のために体外からの異物を認識して排除する働きをもつ抗体などの機能性タンパク質や、生体構造を形成・維持する筋肉、コラーゲンなどの構造タンパク質等である。タンパク質は光学異性体の L 型アミノ酸のみで構築されており、アミノ酸には立体異性体の一つである光学異性体の L 型と D 型が存在する。両者は光学活性以外の沸点、融点、溶解性、反応性などの物理化学的な諸性質は全く同じである。このように L-アミノ酸のみで構築されている生物界のことを L-アミノ酸ワールドという。

しかし、この範疇に入らない例外が存在することは以前から知られていた。下等生物である真正細菌の細胞壁には D-アラニンと D-グルタミン酸が必須成分として含まれている。近年の分析技術・装置の進歩により高等生物中にも、それまでは稀だとみなされていた D-アミノ酸が遊離型として存在することが急速に明らかになってきた。D-アスパラギン酸はラットの松果体、副腎、精巣などに見出され、概日リズム調節ホルモンメラトニンの分泌制御、ステロイドや男性ホルモンテストステロンの合成制御などを示す証拠が報告されている。1992 年には、ヒトやラットの脳内に高濃度の遊離型 D-セリンが存在するという重要な発見があり、この D-セリンが神経活動を制御していることが明らかにされつつある。さらに、ヒトにおいては、脳内 D-セリンの動態と統合失調症などの神経・精神疾患との関係が指摘されており、実際にこれらの疾患に対して D-セリン投与が試みられている。脳内の D-セリンは、L-セリンと D-セリンの相互変換を触媒する酵素セリンラセマーゼによって産生されていることが明らかにされた。以上のことから、L-アミノ酸ワールドにおける D-アミノ酸の生理作用は医学的見地からも注目度が増している。

一方、チョウやガを含む鱗翅目の昆虫、特にカイコガ *Bombyx mori* に遊離型 D-セリンが高濃度で存在することが 50 年以上も前に報告されている。しかし、その生理的役割について、ならびに生命工学的な研究はされていなかった。カイコガについては、養蚕を背景に膨大な内分泌学的、遺伝学的知識の蓄積があり、系統や飼育方法が確立されており、すでに全ゲノムが解明されたモデル生物として注目されている。また、生理的条件がヒトに近いこと、薬剤の効果や病原体に対する感受性もヒトに近く、昆虫のため取扱いに倫理的な制約も少ないこと、最近では新しい優れた実験動物として注目されている。一方で、カイコガの産生するシルクタンパク質が天然素材として人気を集めており、化粧品や食品など多岐にわたる分野でその応用研究が行われている。先に述べたように、ヒトに対して D-セリンの投与が行われていることから、カイコガへの D-セリン投与の生命工学的研究は、精神疾患の臨床研究など医学的にも貢献しうると期待される。そこで本研究では、カイコガにおける D-セリンの生理的役割を解明し、本アミノ酸がどのように生体機能や代謝経路に関わっているかを明確にして、生命工学の著しい進歩ならびにシルクを原材料とした工業製品の開発の一助になることを目的とした。

本論文では、まず第 1 章で D-アミノ酸の存在、研究背景とカイコガの生態学的・生理学的な特徴について記述した。第 2 章では、新規遊離 D-セリン定量法の開発に関して、その背景、従来の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法と今回開発した酵素法との比較、さらにカイコガ臓器を検体とした測定結果を報告した。第 3 章では、開発した D-セリン定量法を用いて測定したカイコガの日齢・臓器と D-セリンの分布状況について記述した。さらに詳細に D-セリンの局在性を調べるために免疫組織学的方法により検討した後、D-セリン代謝に関わるカイコガ内在性酵素の活性と反応生成物を測定し、代謝経路について考察した。本研究において D-セリンの生理的役割の一部を解明した結果も記述した。第 4 章では、第 1 章から第 3 章の内容をまとめ、総括を述べた。以下に論文の概要を記述する。

## 第1章 序論

本章では、本研究の背景、目的、意義を記述した。

まず、アミノ酸の光学異性体について概説し、D-アミノ酸は結合型または遊離型として生体内に存在すること、生物におけるD-アミノ酸の必要性、D-アミノ酸を多く含む生物、体内の局在性、およびその機能について解説した。結合型（タンパク質・ペプチド中に存在）としては、細菌細胞壁のペプチドグリカンやペプチド抗生物質、また様々な生物の生理活性ペプチド中にD-アミノ酸残基として存在する。遊離型としては、甲殻類や軟体動物の浸透圧調節物質としてのD-アラニンやD-アスパラギン酸、ラットの松果体や副腎のD-アスパラギン酸、哺乳類大脳のN-メチル-D-アスパラギン酸受容体の働きに関わり記憶成立に不可欠なD-セリンなどについて述べた。

D-アミノ酸の存在が各種生物において次々と報告されている一方、その生理的意義は大部分が未解明であり、生命工学的な研究は行われていない。そのため、D-セリンがどのように生体機能や代謝経路に関わっているかを明確にすることを目的とした。

本研究には、遊離型D-セリンを大量に保有しているカイコガを用いた。研究室において人工飼料によるカイコガの飼育・繁殖を行い、次章以降に記述した各研究に用いた。

## 第2章 新規遊離D-セリン定量法の開発とカイコガ臓器への応用

D-セリン定量法開発の背景を以下に述べる。アミノ酸分析計ではD型とL型の分離が不可能であり、HPLC法では測定に時間がかかるという難点がある。一方、医療分野においてD-セリン量の簡便・迅速な測定が求められている。また、このような測定法が開発されれば、多くのD-セリン含有生物についてその存在部位と成長に伴う含有量変動の追跡が可能となるので、D-セリンの生理作用解明のための有力な手段となる。

今回開発した酵素を用いる方法の特徴について、本法は測定時間が短時間（最短30分）であり操作が簡単であること、多サンプルの同時測定（スクリーニング）が可能であることを示した。本酵素法は、ニワトリのD-セリンデヒドラターゼ（DSD）を用いたことに特徴がある。この酵素は基質特異性が高くD-セリン以外のアミノ酸とは反応しないため、本法により正確かつ再現性の高い分析結果が得られる。本酵素は、大量培養した遺伝子組換え大腸菌より抽出・精製した。DSDはD-セリンをピルビン酸とアンモニアに分解する化学反応を触媒する酵素であり、本法は生成したピルビン酸を定量するものである。カイコガ臓器中のD-セリン濃度測定結果をHPLC法による結果と比較したところ、妥当な結果であった。本法によりカイコガ各臓器のD-セリン濃度を測定し、体液、中腸、卵巣、精巣、脂肪体に高濃度で存在することを明らかにした。

## 第3章 カイコガにおけるD-セリン代謝とD-セリンの生理的役割の検討

先行研究において、セリンラセマーゼの阻害剤であるO-ホスホ-L-セリンをカイコガ幼虫に投与すると体内D-セリン濃度が低下し成長速度の低下を引き起こすこと、したがってD-セリンが幼虫の正常な成長に必要であることが示された。本研究の目的は、その原因・メカニズムを探り、D-セリンの代謝系と生理的役割を解明することである。そのためにD-セリンの存在するカイコガの臓器を特定し、含有D-セリン量と日齢の関係を検討することが必要になり、酵素法（第2章）を用いて多種の検体を測定した。その結果、カイコガ体内のD-セリン存在部位は体液以外に中腸、卵巣、精巣、脂肪体に限定されることや、中腸内容物にもD-セリンが多量存在することを明らかにした。吐糸期・蛹期中腸内容物にD-セリンが多い原因は、幼虫の円柱細胞と盃細胞が吐糸期に黄体へと変化することにあると推察した。さらにD-セリンの存在部位を細胞レベルに絞り込むために、酵素法より微小・微量分析が可能な免疫組織学的手法を用いた。その結果、中腸では栄養物質やイオンの吸収・分泌を行う円柱細胞と盃細胞の微絨毛、また卵巣と精巣では細胞外マトリックスが強く染色されることを見出した。

セリンラセマーゼはD-セリンを合成する酵素であり、DSDはD-セリンを分解する酵素である。測定の結果、両酵素の活性は中腸、卵巣、精巣、脂肪体に高く、D-セリン含量が高い臓器と一致した。これらの臓器における、カイコガの日齢に伴うセリンラセマーゼ活性の変動とD-セリン量の変動も一致した。この結果、D-セリンは食餌や共生する腸内細菌由来ではなく、各臓器のセリンラセマーゼによってL-セリンから合成されていることが示唆された。これらの臓器において、D-セリンがDSDによりピルビン酸に変換された後、ATP合成に関わることを証明するため、ATP量の経時変化を測定した。カイコガ精巣無細胞抽出液にD-セリンを添加した場合にはATP量が増加したが、D-セリンの代わりにL-セリンを添加した場合には

ATP量は変化しなかった。この結果から、カイコガに大量に存在するD-セリンは生体内物質代謝の中でも最も重要なピルビン酸に変換され、中腸、卵巣、特に精巣でATP合成に供されるという役割、すなわちD-セリンの生理的役割の一部を解明することができた。また生命工学の著しい進歩ならびにシルクを原材料とした工業製品の開発の一助となった。

#### 第4章 総括

第1章から第3章の内容をまとめ、総括した。