

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 櫻川昭雄

(副査) 教授 榎泰典 短期大学部教授 西村克史

アミノ酸は水分子に次いで生体中に最も多く含まれる生体分子である。それらの大半はペプチド結合によりアミノ酸重合体を形成し（これを結合型アミノ酸という）ペプチドまたはタンパク質として存在する。アミノ酸はL型とD型の光学異性体に大別されるが、それらは偏光面を回転させる光学活性のみが異なり、他の物理的諸性質は全く同一である。ところが、生体中のタンパク質、例えば、代謝などの化学反応を触媒する酵素、外界や体内からの刺激・情報を受け取る受容体、外界から侵入してきた異物を認識して反応する抗体などの機能性タンパク質は、正確に相手のL型・D型を認識し適切な処理を行っている。機能性タンパク質をはじめ、生体構造を形成・維持する筋肉や腱などの構造タンパク質など、すべてのタンパク質はL型アミノ酸によって構成されている。そのため、新しくタンパク質合成が行われる際に材料として使われるのは単分子のアミノ酸（これを遊離型アミノ酸という）のうちL型アミノ酸のみである。

このような背景から、細菌以外の生物にはD型アミノ酸は存在しないものと一般的に考えられていた。細菌を覆っている細胞壁にはD-アラニンとD-グルタミン酸が構成要素として含まれることが以前から知られている。

しかし、近年の分析技術・装置の進歩により遊離型D-アミノ酸が高等生物にも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や副腎、精巣などに見出され、男性ホルモンであるテストステロン合成への関与などが報告されている。1992年には、ヒトやラットの脳に高濃度の遊離型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の治療においてD-セリン投与が試みられている。以上のようにD-アミノ酸の生理作用は医学的見地からも近年重要視されてきている。

一方、チョウやガを含む鱗翅目の昆虫、特にカイコガ *Bombyx mori* に高濃度の遊離型D-セリンが存在することが50年以上も前に報告されている。しかし、哺乳類以外の真核多細胞生物では、鱗翅目の昆虫以外にD-セリンに関する報告は見当たらず、その生理的役割については研究されることなく放置されてきた。カイコガは、養蚕を背景に膨大な内分泌学的、遺伝学的知識の蓄積がなされ、系統、飼育方法が確立済みであり、大量飼育、繁殖が容易で、既に全ゲノムが解明されている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く、薬剤の効果や病原体に対する感受性がヒトと良く一致し、低コストで飼育可能、取扱いに倫理的な制約も少ないため、新しい優れた実験動物としても注目されてきている。さらに、吐き出すと絹糸にな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。このような背景の下、カイコガの代謝生理に関する新しい知見を得ることは、医学・産業分野に多大な貢献をすることが期待される。本論文に述べられている研究は、カイコガにおけるD-セリンの代謝に考察を加えその生理的役割を解明することを目的としている。

本論文では、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解説し、第2章で、新規D-セリン定量法の開発に関して、開発の必要性、方法、従来のHPLC（高性能液体クロマトグラフィー）法との比較について述べている。第3章では、カイコガ体内におけるD-セリンの局在性の免疫組織学的方法による検討結果について、さらに、D-セリン代謝に関わる二種の酵素活性と代謝産物を検出した結果に基づいて、その代謝経路を推定し、D-セリンの生理的役割について一つの仮説を提唱している。第4章は第1章から第3章の内容のまとめである。

### 第1章 序論

D-アミノ酸は結合型または遊離型として存在すること、D-アミノ酸を含有する生物、含有部位、機

能について解説している。結合型としては、細菌細胞壁のペプチドグリカンやペプチド抗生物質、また種々の生物の生理活性ペプチド中の D-アミノ酸残基を挙げている。これらの D-アミノ酸を対応する L-アミノ酸に置換すると活性が消失する。遊離型としては、D-アラニンや D-アスパラギン酸が甲殻類や軟体動物の浸透圧調節や神経伝達物質として報告されている。また、遊離型 D-アスパラギン酸はラットの松果体や副腎、精巣などに見出され、テストステロン合成への関与が示されていること、遊離型 D-セリンは哺乳類脳の N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体への神経伝達物質 L-グルタミン酸の結合を調節し、記憶の成立に貢献していることについて述べている。

本研究では種々の齢のカイコガを用いている。カイコガを実験材料として用いることの利点は、遊離型 D-セリンを大量に含有すること、飼育が容易であること、哺乳類の実験動物よりも単純な系であるため研究結果の解析が容易であること、全ゲノムが解明されていることなど多数存在する。完全変態をする昆虫であるカイコガは孵化後、眠・脱皮を繰り返して 1 齢から 5 齢幼虫まで成長し、吐糸期に繭を造った後、蛹を経て成虫となり産卵する。その一生は約 40 日間である。人工飼料を用いたカイコガの飼育・繁殖は主として研究室内において行い、次章以降に記述した各研究に用いている。

## 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

医療分野においては D-セリン値の簡便・迅速な測定が求められているが、アミノ酸分析計では D 型と L 型の識別が不可能であり、一方、HPLC 法では測定に長時間を要するという難点がある。このため、簡便、迅速、正確な測定法の開発が待たれていた。このような方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化の追跡も可能となり、D-セリンの生理作用解明につながる有力な手段となる。

従来の HPLC を用いる方法と比較して今回開発を行った酵素を用いる方法の特徴として、操作が簡単であり、測定が短時間（最短 30 分）で済み、多サンプルの同時測定（スクリーニング）が可能である点を強調している。本法では、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ニワトリ D-セリンデヒドラターゼ (DSD) を用いているため、正確かつ再現性の高い分析結果が得られる。DSD は大量培養した遺伝子組換え大腸菌より精製し調製したものを用いている。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。本法を用いてカイコガ諸器官の D-セリンを測定し、HPLC 法による結果と比較して非常に近い値が得られることを示した。また、本法を用いることにより、カイコガの体液、中腸、卵巣、精巣、脂肪体に高濃度の D-セリンを検出している。

## 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

以前の研究において、セリンラセマーゼの阻害剤である O-ホスホ-1-セリン (OPLS) によるカイコガ幼虫の D-セリンレベルの低下が、成長速度の遅延と生存率低下をもたらすこと、よって D-セリンが幼虫の正常な成長に必要であることが示唆されていた。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-セリンの存在部位を器官内の細胞レベルまで絞り込むことが必要になり、酵素法（第 2 章）よりさらに微小・微量の分析が可能な免疫組織学的手法を用いている。抗原抗体反応は鋭敏かつ非常に特異性が高くこの反応を用いた分析法は信頼性が高いので、世界中の医療検査分野をはじめ研究領域において汎く用いられている。本研究では、抗 D-セリン抗体を用いて抗原である D-セリンのみを染色して可視化し、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を明らかにした。さらに、中腸では円筒細胞と盃状細胞の微絨毛が、精巣と卵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。

試験管内で行う *in vitro* 実験では、D-セリンは D-セリンと L-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 L-セリンから産生され、DSD によってピルビン酸とアンモニアに分解されることが示されている。カイコガにおいても同様な反応が進行しているかを検討するためにこれらの酵素活性を検索した結果、活性は中腸、卵巣、精巣、脂肪体で高いこと、そしてそれらは D-セリン含有器官と一致することが判明した。この結果を受けて、カイコガの D-セリンは食餌や共生する腸内細菌由来ではなく各器官内で独自に産生されたものであることと、ピルビン酸に代謝される可能性が示された。実際、D-セリンの投与により中腸、卵巣、精巣中のピルビン酸、さらには ATP 量も増加した。ピルビン酸は生体のエネルギー通貨といわれる ATP 合成のキー物質である。このことから、本論文で

は、カイコガに大量に存在する D-セリンはピルビン酸に変換されているという仮説を提唱し、D-セリンはグルコース以外のもう一つの ATP 産生源としてカイコガのエネルギー獲得に寄与している可能性について述べている。

#### 第 4 章 総括

第 1 章から第 3 章の内容を総括し、D-セリンの新規酵素法による測定方法を確立したこと、カイコガにおける D-セリンの生理的役割について検討した内容を述べ、本研究の成果をまとめている。

本論文の提出者の研究により、D-セリンの新規定量法が開発され分析所用時間の大幅な短縮に繋がったことは、工学的基礎研究の領域で十分に貢献したと言え、さらにカイコガの各変態期における臓器中の D-セリンの偏在を明らかにしたことは、カイコガが生成する絹を原料とする工業製品の今後の製品開発の一助になることが期待できる。

このことは、本論文の提出者が自立して研究活動を行い、またはその他の高度な専門的業務に従事するに必要な能力及びその基礎となる豊かな学識を有していることを示すものである。

よって、本論文を博士（工学）の学位論文として合格と認める。

以上

平成 25 年 5 月 16 日