

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

平成 24 年 11 月

鈴木 千尋

目次

	ページ
第1章 序論	1
1.1 アミノ酸光学異性体	1
1.2 タンパク質と酵素	1
1.3 自然界のD-アミノ酸	3
1.4 カイコガ <i>Bombyx mori</i> について	6
1.5 本研究の意義と目的	8
参考文献	9
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	12
2.1 序論	12
2.2 材料と方法	13
2.3 結果	14
2.4 考察	20
2.5 結論	21
参考文献	22
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	24
3.1 序論	24
3.2 材料と方法	25
3.3 結果と考察	28
3.4 結論	43
参考文献	45
第4章 総括	47
謝辞	48

第1章

序論

本研究の報告をするにあたり、まずその研究背景と基本事項について解説し、本研究の目的について述べる。

1.1 アミノ酸光学異性体

アミノ酸とは、分子内にアミノ基と、カルボキシ基とをもつ化合物の総称である。炭素は四価であり相異なる4つの原子あるいは原子団が結合している場合、それは不斉炭素となる。タンパク質構成アミノ酸のうち、グリシン以外のアミノ酸は、不斉炭素を持つためL-アミノ酸とD-アミノ酸と呼ばれる光学異性体が存在する (Fig. 1-1)。光学活性以外の両者の物理的諸性質 (沸点, 融点, 溶解性, 反応性) や化学的性質も全く同一である。アミノ酸を化学的に合成した場合, L-アミノ酸とD-アミノ酸の等量混合物であるラセミ体が生じる。生体中のD-アミノ酸は, ラセマーゼにより生合成される。しかし生体においては, L-アミノ酸とD-アミノ酸は, 酵素によって触媒されるアミノ酸の合成・分解反応や, 種々の受容体や抗体による認識において厳密に区別されている。なぜならば生体を構成するタンパク質はL-アミノ酸ワールドと呼称されるようにL-アミノ酸のみで成り立っているからである。

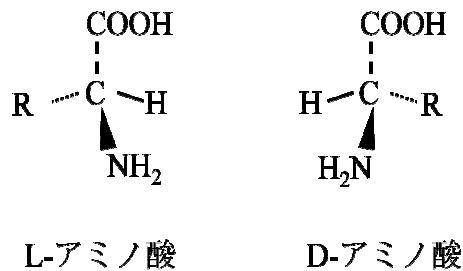


Fig. 1-1. L-アミノ酸とD-アミノ酸 (R: 側鎖)

1.2 タンパク質と酵素

アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基間で縮合重合 (ペプチド結合, Fig.1-2) した高分子 (ペプチド) を形成することができる。ペプチド結合を形成しているアミノ酸を「結合型アミノ酸」または「アミノ酸残基」という。これに対してペプチド中ではなく単独に存在しているアミノ酸を「遊離型アミノ酸」という。ペプチドのうち, ア

ミノ酸残基数 10 程度までのものをオリゴペプチド，それ以上のものをポリペプチドと呼ぶ。分子量約 5,000 以上（アミノ酸残基数約 50 以上）のポリペプチドをタンパク質という。タンパク質は生体を構成する分子群の中で，水について多く存在する最重要化合物である。生体内には種々のタンパク質が存在しそれぞれの役割を担っている。たとえば，筋肉のアクチンとミオシン，腱や角質を構成するコラーゲン，毛髪・爪などのケラチンのような構造タンパク質，生体内の代謝などのあらゆる化学反応を触媒する酵素タンパク質，外界や体内からの刺激を受け取りその情報を細胞核に伝える受容体タンパク質や情報伝達タンパク質，免疫反応で特定の分子を認識して結合する抗体などのような機能性タンパク質が存在し，その種類は数万におよぶ。

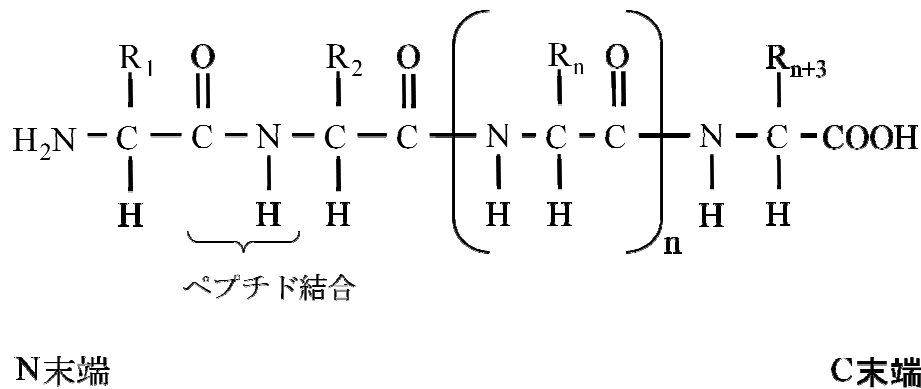


Fig. 1-2. タンパク質（ペプチド）の一次構造

ところが，生体を構成しているタンパク質はL-アミノ酸のみによって形成されており，これをL-アミノ酸ワールドという（タンパク質中のL-アミノ酸残基を該当するD-アミノ酸に置換した場合，立体構造が変化し本来の機能を発揮できなくなる）。したがって酵素，受容体，抗体などのタンパク質は生体中のD-アミノ酸とL-アミノ酸を厳密に区別して反応している。例えばD-アミノ酸の酸化脱アミノ反応を触媒する酵素D-アミノ酸オキシダーゼはD-アミノ酸にのみ働き，L-アミノ酸には作用しない。

タンパク質が機能を発揮する上で重要なのはその立体構造である。タンパク質の立体構造はその一次構造（構成アミノ酸の数と結合順序）に依存する。従来，タンパク質合成の素材として利用されない遊離型D-アミノ酸に関する研究は少なかったが，近年，D型-アミノ酸，特にD-セリンに関する研究が活発に行われ，他のD-アミノ酸関係の報告も増加している。次項で自然界におけるD-アミノ酸の存在と利用について，現在の知見を紹介する [1]。

明らかになってきた。ある種のカビが生合成するサイクロスポリン A は免疫抑制剤として臓器移植に必須である。この分子は環状ペプチドの中に D-アラニン残基を有している [9] が、この D-アラニンを L-アラニンに置き換えると活性は失われてしまう。他にも、ヒナタクサグモが分泌する神経毒の ω -agatoxin IV B [10] や、アフリカマイマイの神経ペプチド、南米産木登りカエルの皮膚に含まれる非常に強力なオピオイド（受容体に結合し鎮痛作用を持つ物質）dermorphin [11]、同じカエルが分泌する抗菌ペプチド bombinin H [12]、タコの心筋収縮ペプチド cardioactive peptide [13]、カモノハシが分泌する毒性ペプチド platypus venom [14] などに D-アミノ酸残基が存在する (Fig. 1-4)。

Omega-Agatoxin IV B	-Met-Glu-Gly-Leu-Ser-Phe-Ala-
Cardioactive peptide	Gly-Phe-Gly-Asp-
Conotoxin rlla	-Thr-Ser-Ser-Phe-Phe-Lys-Ile-
Platypus venom	Leu-Leu-His-Asp-His-Phe-
Hyperglycemic peptide	Glu-Val-Phe-Asp-Gln-Ala-Lys-
Achatin I	Gly-Phe-Ala-Asp-
Fulicin	Phe-Asn-Glu-Phe-Val-
Dermorphin	Tyr-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-
Dermenkephalin	Tyr-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-
Deltorphin I	Tyr-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-
Bombinin H	Ile-Ile-Gly-Pro-Val-Leu-Gly-

Fig. 1-4. 生理活性ペプチド中の D-アミノ酸 (赤文字 D-アミノ酸)

前出の dermorphin の場合、タンパク質の設計図である mRNA には D 型アミノ酸を指定する配列は含まれておらず、リボソーム上で L-アミノ酸のみからなる前駆体を作られる [15] ことから、前駆体の L-アラニン残基が翻訳後修飾を受けて D-アラニンに置き換えられて成熟した dermorphin になることが示された。2005 年には、bombinin 前駆体の N 末端から 2 番目の L-イソロイシンを D-allo-イソロイシンに変換するイソメラーゼ（異性化酵素）が発見された [16]。さらに、この酵素の遺伝子に類似した塩基配列がヒト、ニワトリ、フグなどで見つかったことから、高等動物においても D-アミノ酸残基を含むペプチドの存在する可能性が示唆されている [16]。

遊離型 D-アミノ酸について

一方、遊離型の D-アミノ酸に関しては、D-アラニンを高濃度（全遊離アラニンの約 50%）含有する真正細菌が多い [17]。真正細菌と同じ原核生物ではあるが系統発生

的には真核生物に近い古細菌の *Pyrobaculum islandicum* などでは遊離 D-アミノ酸濃度は低くなり [18], 真核生物では以前の分析技術では検出できなかったほど低濃度である。このように, 地球上に初期に出現した生物ほど D-アミノ酸の濃度が高いと考えられてきた。しかし, 二枚貝などの軟体動物やエビなどの甲殻類を含めた水生無脊椎動物には D-アラニン [19] が, 同じくタコなどの軟体動物には D-アスパラギン酸 [20] が, そしてチョウやガなどの昆虫には D-セリン [21] が発見された。この中で特に解析の進んでいるものが, 水生無脊椎動物の D-アラニンである。エビやカニでは生体内の全遊離アラニンに対して 30~50%を, 二枚貝の一種であるミルカイでは 50%以上を D-アラニンが占めている [19]。D-アラニンを産生する酵素アラニンラセマーゼがアメリカザリガニにおいて発見された [19]。汽水域に棲息するアサリなどの水生無脊椎動物の生体内で産生された D-アラニンは, 潮の干満により大きく変る海水の浸透圧から身を守るための浸透圧調節物質 (オスモライト) として機能していると考えられている。

無脊椎動物より高等な生物である哺乳類では, 特定臓器に高濃度の遊離型 D-アミノ酸が局在する。その代表は D-アスパラギン酸と D-セリンである。D-アスパラギン酸は, 脳, 松果体, 下垂体, 精巣などに検出されている [20]。松果体は概日リズム調節ホルモンメラトニンを分泌する内分泌器官であるが, D-アスパラギン酸によって分泌の制御を受けていることが示唆されている。また, D-アスパラギン酸は, 副腎ではステロイド合成の, 精巣では男性ホルモンテストステロン合成の調節に関与していることが報告され [21] 研究が進められている。また, 正常なヒトの唾液 [22] や胃液 [23] にもアラニン, セリン, プロリン, アスパラギン酸, グルタミン酸の D-型異性体が検出されている。

ヒト脳内に存在する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体は, 特に海馬 (記憶や学習といった高度な神経活動の中枢部位) に高密度に存在し, 神経伝達物質である L-グルタミン酸が結合すると作動する。研究の結果, その L-グルタミン酸の NMDA 受容体への結合を遊離型 D-セリンは調節していて, 記憶の成立に不可欠なアミノ酸であることが明らかになった [24]。その後, ラットの脳でセリンラセマーゼが発見され [25], その DNA 遺伝子配列も明らかにされた。さらにヒトにおいては, 脳内の D-セリンの動態と統合失調症などの神経・精神疾患との関連が指摘されている。NMDA 受容体の遮断薬が統合失調症と酷似した症状を引き起こすこと, D-セリンの投与がある種の統合失調症の症状を改善すること, D-セリンを分解する酵素 D-アミノ酸オキシダーゼの遺伝子変異と統合失調症発症者の相関関係 [26] などが報告され, ヒトに対する D-セリンの投与試験も行われている。このように高等生物の 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を増してきている。

同じ真核生物のミミズ [27, 28] や, チョウ・ガが属する鱗翅目の昆虫に高濃度の遊離型 D-セリンが存在することは古くから知られていた [21]。特にサクサン (柞蚕) *Antheraea pernyi* やセクロピアサン *Hyalophora cecropia* などの繭を作る種において D-

セリンが検出され、とりわけ、カイコガ *Bombyx mori* から高濃度の D-セリンが検出された [29]。その後、放射性同位体を用いた研究により、カイコガ体内で L-セリンから D-セリンの産生されていることが明らかになり、その反応を触媒する酵素セリンラセマーゼが部分精製された [30]。しかし、カイコガにおいて D-セリン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。

1.4. カイコガ *Bombyx mori* について

カイコガ *Bombyx mori* (Fig. 1-5) は節足動物門，昆虫綱の鱗翅目（チョウ目）に属する完全変態の昆虫である。繭を作るので，古くから絹糸生産のために飼育・繁殖が行われてきた。特に日本では養蚕を背景に，形態学的，内分泌学的，遺伝学的な知見が蓄積されている。



N4



春嶺鐘月



Fig. 1-5. カイコガ *Bombyx mori* 5 齡幼虫と成虫

その他にも、カイコガを研究材料とする上で以下のような利点がある。系統、飼育方法が確立済み。大量飼育・繁殖が容易。既に全ゲノムが解明されたモデル生物。組み替えタンパク質の発現用に大腸菌に代わってカイコガ培養細胞やカイコガ体液が利用されている。バイオリサーチセンターで多くの品種が保存されており随時頒布されることなどである。さらに最近では、カイコガは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、取扱い上倫理的な問題も少ないため、新しい実験動物として注目されている。特に本研究に用いた N4 株は、特別な処理をせずに卵を通年孵化させることが可能であり、また人工飼料のみで飼育できるという利点を持つ品種である。近年は、カイコガの産出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、繊維産業のみならず化粧品や食品など多岐にわたる分野で応用研究が進められている。

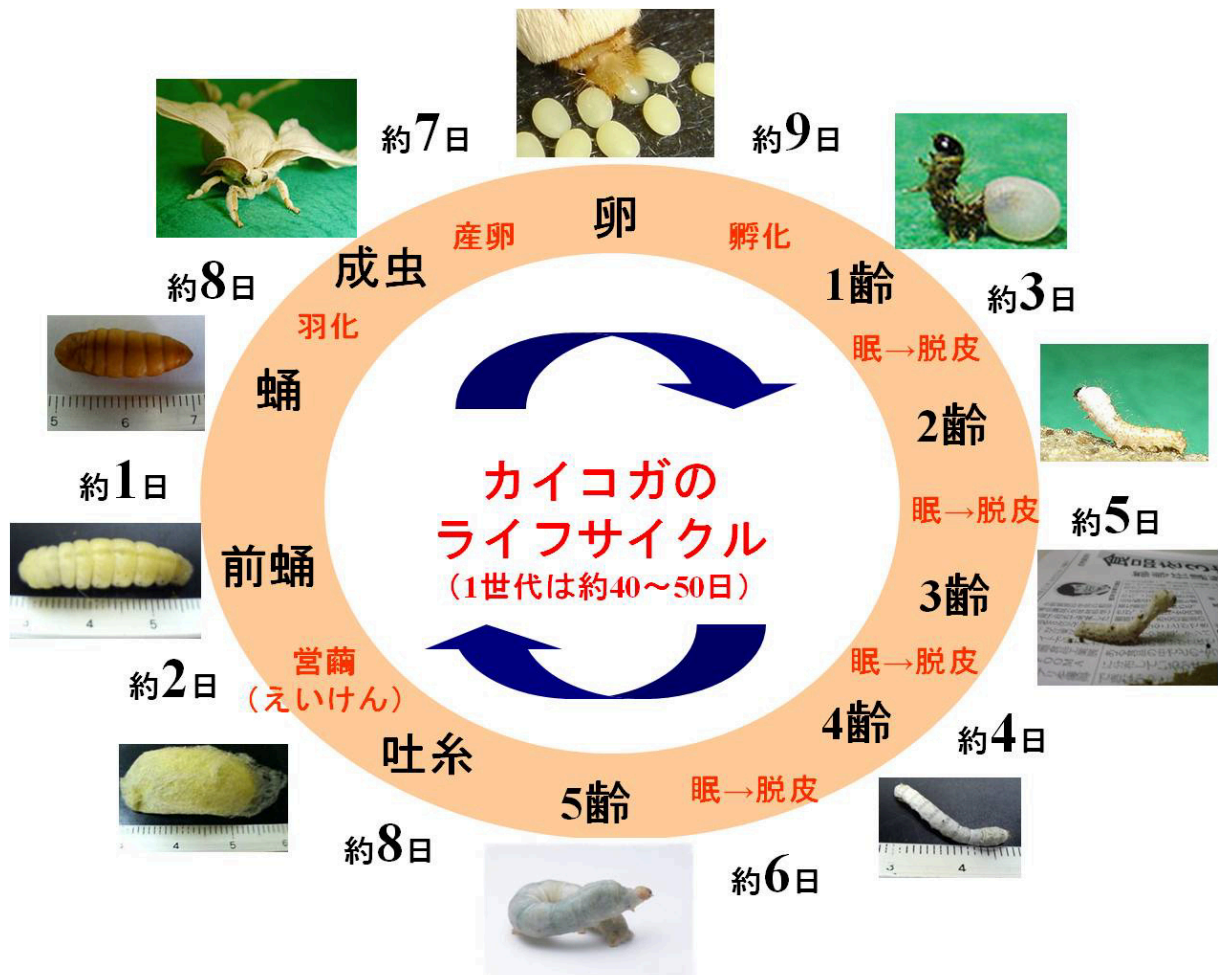


Fig. 1-6. カイコガのライフサイクル (N4)

本研究では信州大学より提供された *Bombyx mori* N4 株と、九州大学の National Bio-Resource Project より提供された春嶺鐘月株を使用した。一般的なカイコガと同様に N4 株も孵化後、眠と脱皮を繰り返しながら 1~5 齢 (各齢 4~6 日間) まで成長し、吐糸幼虫 (2 日間) を経て繭を作る。繭の中で蛹 (8~9 日間) となり成熟する。吐糸幼虫になると以後採餌・排糞を行わなくなる。成虫は交尾・産卵を行い、一生を終える。その寿命は約 40~50 日である。カイコガのライフサイクルを Fig. 1-6 に示す。

1.5 本研究の意義と目的

脳内における D-セリン動態の研究をはじめとして、高等動物の L-アミノ酸ワールドにおける D-アミノ酸の生理作用については医学的見地からも注目度が増している。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、生命工学的な応用に必要な情報を得ることを目的とした。

参考文献

- [1] Nagata, Y. (2005) 細菌から高等生物までの D-アミノ酸の動態. *ファルマシア*, **41**, 831-835
- [2] K, H, Schleifer and O, Kandler (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.*, **36**: 407-477.
- [3] Geok-Yong Yow, Uo, T., Yoshimura, T., and Ezaki, N. (2004) D-amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch, Microbiol.*, **182**, 396-403.
- [4] Lambert, P.A., Hancock, I.C., and Baddiley, J. (1977) Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim, Biophys. Acta.*, **471**, 1-12.
- [5] Troy, F.A. (1985) Capsular poly-gamma-D-glutamate synthesis in *Bacillus licheniformis*. *Methods in Enzymol.*, **113**, 146-168.
- [6] Bodanszky, M., and Perlman, D. (1969) Peptide antibiotics. *Science*, **163**, 352-358.
- [7] Belshaw, P., Walsh, C., and Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, **284**, 486-489.
- [8] Shen, Q. T., Chen, X. L., Sun, C. Y., and Zhang, Y. Z. (2004) Dissecting and exploiting nonribosomal peptide synthetases. *Biochim, Biophys. Acta. Sin.*, **36**, 243-249.
- [9] Hoffman, K., Scherzer, S. H., Kleinkauf, H., and R, Zocher. (1994) Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12710-12714.
- [10] Heck, S. D., Siok, C. J., Krapcho, K. J., Kelbaugh, P. R., Thadeio, P. F., Welch, M. J., Williams, R. D., Ganong, A. H., Kelly, M. E., and Lanzetti, A. J. (1994) Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin. *Science*, **266**, 1065-1068
- [11] Montecucchi, P. C., de Castiglione, R., Piani, S., Gozzini, L., and Erspamer, V. (1981) Amino acid composition of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 275-283.
- [12] Mignogna, G., Simmaco, M., Kreil, G., and Barra, D. (1993) Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J.*, **12**, 4829-4832.
- [13] Iwakoshi, E., Hisada, M., and Minakata, H. (2000) Cardioactive peptides isolated from the brain of Japanese octopus, *Octopurs minor*. *Peptides*, **21**, 623-630.
- [14] Torres, A. M., Menz, I., Alewood, P. F., Bansal, P., Lahnstein, J., Gallagher, C. H., and Kuchel, P. W. (2002) D-amino acid residue in the C-type natriuretic peptides from the

- venom of the mammal, *Ornithorhynchus anatinus*, the Australian platypus. *FEBS Lett.*, **524**, 172-176.
- [15] Richter, K., Egger, R., and Kreil, G. (1987) D-alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from L-alanine in the precursor. *Science*, **238**, 200-202.
- [16] Jilek, A., Mollay, C., Tippelt, C., Grassi, J., Mignogna, G., Mullegger, J., Sander, V., Fehrer, C., Barra, D., and Kreil, G. (2005) Biosynthesis of a D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 4235-4239.
- [17] Nagata, Y., Fujiwara, T., Kawaguchi-Nagata, K., Fukumori, Y., and Yamanaka, T. (1998) Occurrence of peptidyl D-amino acids in soluble fractions of several eubacteria, archaea and eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1379**, 76-82.
- [18] Nagata, Y., Tanaka, K., Iida, T., Kera, Y., Yamada, R., Nakajima, Y., Fujiwara, T., Fukumori, Y., Yamanaka, T., Koga, Y., Tsujii, S., and Kawaguchi-Nagata, K. (1999) Occurrence of D-amino acids in few *archaea* and dehydrogenase activities in hyperthermophile *Pyrobaculum islandicum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1435**, 160-166.
- [19] Abe, H. (2002) Distribution, metabolism and physiological functions of free D-amino acids in aquatic invertebrates. *NIPPON SUISAN GAKKAI*, **68**, 516-525.
- [20] D'Aniello, A., and Guiditta, A. (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* Lam. *J. Neurochem.*, **6**, 1053-1057.
- [21] 古地壯光 (2004) ステロイドホルモン産生調節における D-アミノ酸の役割. 武田科学振興財団薬学系研究奨励 研究報告書
- [22] Nagata, Y., Higashi, M., Ishii, Y., Sano, H., Tanigawa, M., Nagata, K., Noguchi, K. and Urade, M. (2007) The presence of high concentrations of free D-amino acids in human saliva. *Life Sci.*, **78**, 1677-1681.
- [23] Nagata, Y., Sato, T., Ishii, Y., Sasaki, K., and Yamada, T. (2007) High concentration of D-amino acids in human gastric juice. *Amino Acids*, **32**, 137-140.
- [24] Schell, M., Molliver, M., and Snyder, S. (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 3948-3952.
- [25] Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. (1999) Serine racemase: A glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 13409-13414.
- [26] Nishikawa, T. (2005) ヒトの脳に存在する遊離型 D-セリンの機能と病態—精神神経疾患の治療への応用. *Biol Pharm Bul*, **41**, 863-868.
- [27] Rosenberg, H., and Ennor, A. H. (1960) Occurrence of free D-serine in the earthworm. *Nature*, **187**, 617-618.

- [28] Rosenberg, H., and Ennor, A. H. (1961) The occurrence of free D-serine in the earthworm. *Biochem. J.*, **79**, 424-428
- [29] Srinivasan, N. G., Corrigan, J. J., and Meister, A. (1962) D-serine in the blood of the silkworm *Bombyx mori* and other Lepidoptera. *J. Biol. Chem.* **237**, PC3844-PC3845
- [30] Uo, T., Yoshimura, T., Shimizu, S., and Esaki, N. (1998) Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 31-34.

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

2.1 序論

カイコガ *Bombyx mori* は遊離 D-セリン (L-セリンの光学異性体) を高濃度含有している。その濃度は 50% (全遊離型セリンに対する D 型の割合, 以下同様) も占めている [1]。昆虫より高等な生物における D-セリンの検索の結果, ヒト血漿 [2] や哺乳類の脳において 20~25% の D-セリンが存在することが明らかになった [3, 4]。ラット脳の大脳遊離セリンのおよそ 25% は, D-異性体である。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 [5, 6] によって L-セリンから合成される。遊離 D-セリンは脳に存在する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のグリシン結合部位に作用する神経制御物質である [7, 8]。D-セリンは NMDA 受容体機能障害 [9] と関係していて, 統合失調症 [10] と心的外傷後ストレス障害 [11] の治療に役立てられている。

我々はカイコガの成長において, D-セリンの重要性を認識した [12, 13]。D-セリンはどのようなメカニズムでカイコガの成長を支えているのか, その生理的役割解明の研究や診断と神経障害の治療のために, 生体試料中の D-セリンを迅速・正確に測定することが求められている。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) は, 微量の D-セリンを正確に定量するために用いられている [14, 15]。しかし, 機器, カラム, キラル溶媒などコスト面と測定に時間を要すること, 測定操作にある程度習熟しなければならないなどの難点がある。さらにシステムのメンテナンスも必要である。また, アミノ酸分析機は D-異性体と L-異性体を区別できない。以上の背景のもと簡便・正確で低コストの D-セリン測定法の開発を目指した, 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と期待される。

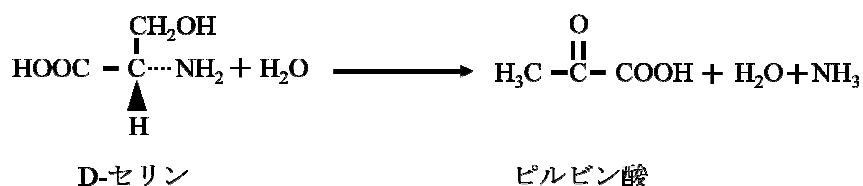


Fig. 2-1. DSD の反応機構

そこで比色定量法に着目した。D-セリンに対する高い基質特異性を持つニワトリの酵素 D-セリンデヒドラターゼ (DSD, EC 4.3.1.18 [16]) を用いて、新たな D-セリン定量法を開発した。D-セリンは DSD が触媒する酵素反応の基質である。この反応によって D-セリンはピルビン酸とアンモニアに分解される (Fig. 2-1)。ピルビン酸は、分光光度計を用いて簡単に比色定量することができる。本研究では、この方法を用いてカイコガ臓器中の D-セリンを測定し、その結果を HPLC 法 [17] によって得られた値と比較して遜色のないことを確認した。

2.2 材料と方法

2.2.1 カイコガ飼育法

Bombyx mori N4 株、或いは、春嶺鐘月株を研究室内で飼育して研究に用いた。非休眠卵を孵化させ、クワの葉から作られた人工飼料 Silkmate 2S (日本農産) を与えた。室温はエアコンを用いて通年 25°C 前後を保ち、齢を揃えるため 25W 蛍光灯によって 12 時間の明期と 12 時間の暗期 (20 時~8 時) の日周期環境において飼育した。

2.2.2 ニワトリ D-セリンデヒドラターゼの調製

組換え大腸菌 BL21 Star (DE 3) (Invitrogen) を Luria-Bertani (LB) 培地中 37°C で培養して殖やした。この大腸菌にはニワトリ D-セリンデヒドラターゼ (DSD, DDBJ 登録番号: AB284370) の DNA を組み込んだプラスミドを含有する pET100/D-TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) が存在する。以下の実験はすべて 4°C で行った。大腸菌を集めて 100 μ M ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を含む Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁後、超音波破碎 (50 W, 60 min) した。超遠心分離 (140,000 g \times 30 min, 4°C) した無細胞抽出液の上澄みに 0.5 M NaCl と 20 mM イミダゾールを加え、Ni-NTA Superflow (Qiagen) カラムに添加した。0.5 M イミダゾールを加えた buffer A (20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 100 μ M PLP, 0.5 M NaCl, 20 mM イミダゾール) を用いて溶出した活性画分を buffer B (20 mM リン酸カリウム buffer, pH 7.8, 50 μ M PLP) に平衡化した Q Sepharose カラム (GE Healthcare Life Sciences) に通し精製 DSD を得た。

2.2.3 測定試料の調製

カイコガ 5 齢幼虫、吐糸幼虫、蛹、成虫を解剖し、体液、頭、中腸、精巢、卵巣、絹糸腺、マルピーギ管、脂肪体、気管、翅原基、皮膚を取り出し、測定に用いるまで -80°C で保存した。中腸からは消化内容物を完全に除去した。4 倍量 (v/w) の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) を各臓器に加え、はさみで細切し、氷上でガラスホモジナイザー (1,200 rpm \times 3 min) を用いて摺り潰した。破碎液を遠心分離 (12,000 g \times 10 min, 4°C) し、上澄みとして得られた無細胞抽出液を測定試料とした。

2.2.4 D-セリンの酵素法による定量

反応溶液（全量 100 μL ，無細胞抽出液 10 μL ， 0.5×10^{-3} U DSD，10 μM PLP，50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)) を 96-well 平底ポリスチレン製マイクロタイタープレート (Asahi Technoglass, Tokyo) 中で， 37°C ，10 min インキュベート後，フェニルヒドラジン溶液 (1 mM 2,4- dinitrophenylhydrazine/1 M HCl) 20 μL を加えて反応を止め，さらに室温で 5 min 静置後 0.6 M NaOH を 160 μL 加えた。マイクロプレートリーダー (MTP-450, Corona, Ibaragi) を用いて 450 nm の吸光度 (A_{450}) 測定を行った。D-セリンに対する検量線は，カイコガ精巢の無細胞抽出液 (タンパク質濃度 40 mg/mL) に種々の量の D-セリンを加えることにより作成した。反応溶液中の D-セリン量は， A_{450} と検量線から算出した。

サンプルのタンパク質濃度は，Bradford 法 [18] を用いた検量線 (ウシ血清アルブミンを使用) により決定した。

2.3 結果

2.3.1 測定条件の決定

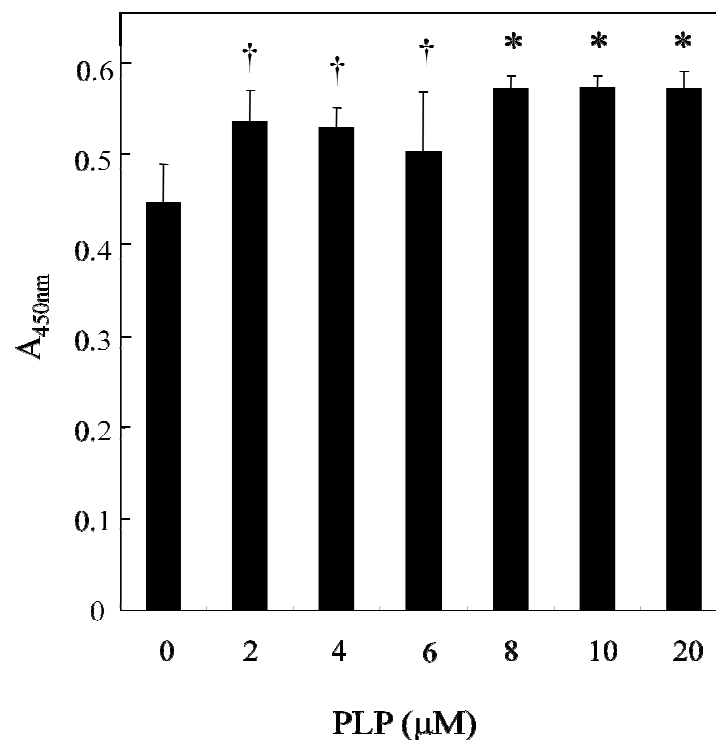


Fig. 2-2. DSD による D-セリン脱水によるピルビン酸変換時の PLP 濃度影響
有意差 t 検定 †は $p < 0.05$ ，*は $p < 0.002$ ，mean \pm SD ($n = 4$)

DSD は PLP 依存性酵素のため、最大酵素活性が得られる PLP 濃度を検索した (Fig. 2-2)。2~6 μM PLP は 17%, 8~20 μM PLP は 28% ピルビン酸生成を増加した。10 μM 以上の PLP は、10 μM PLP と同じ効果を示した。以上より、10 μM PLP を反応溶液に加えることに決定した。

つぎに、反応溶液中の DSD 量と吸光度の関係を検討した (Fig. 2-3)。一定量の D-セリンに対して、より高い吸光度 (A_{450}) を与える DSD 量を用いる方が測定精度は増す。しかし、分光学的定量法は D-セリン濃度と A_{450} が直線関係である範囲内でのみ採用できる。また、DSD 使用量を抑えることも必要である。その結果、 0.5×10^{-3} U DSD を用いることに決定した。

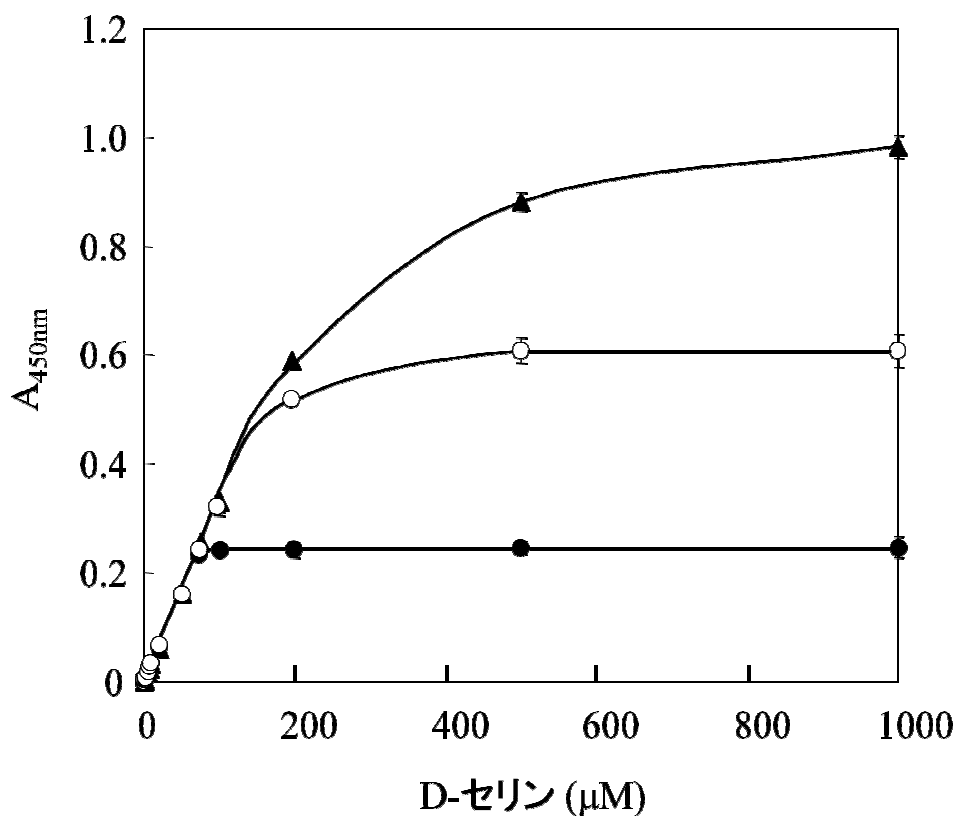


Fig. 2-3. 反応液中 DSD 量と吸光度の関係
 0.1×10^{-3} U DSD (●), 0.5×10^{-3} U DSD (○), 1.0×10^{-3} U DSD (▲), mean \pm SD ($n = 4$)

2.3.2 D-セリン検量線の作製

無細胞抽出液を加えない Tris-HCl buffer (pH 8.5) のみ中に D-セリンを加えて、DSD

による D-セリンに対する検量線を作製した (Fig. 2-4)。D-セリンを加えていない状態をコントロールとした。有意差のある ($p < 0.05$) D-セリン検出限界値は 200 pmol であった。D-セリン量を X 軸, A_{450} を Y 軸とした際の検量線の方程式は $y = 0.0328x$ であり, 非常に高い相関係数 $r^2 = 0.999$ が示された。

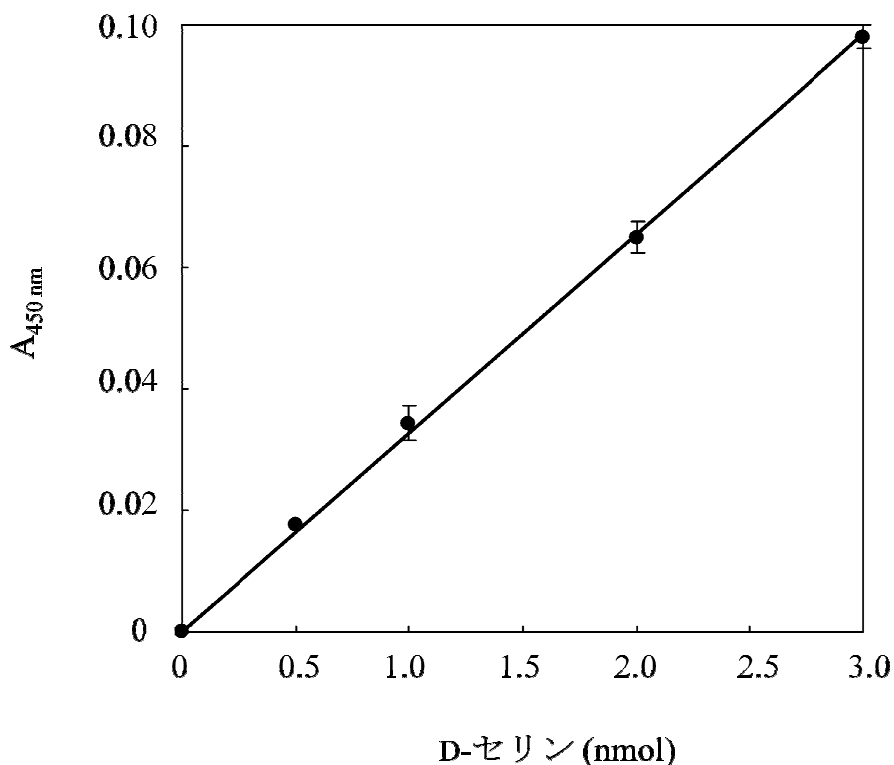


Fig. 2-4. D-セリン検量線

縦軸はコントロール値を差し引いた値, mean \pm SD ($n = 4$)

生体内には通常 D-セリン濃度よりも圧倒的に高濃度の L-セリンが存在しているために, この L-セリンが測定時の DSD 反応に影響を与えていないかを, 反応溶液に D-セリン濃度の約 10^4 倍の 20 mM L-セリンを共存させて調べた。下図 (Fig. 2-5) のように高濃度の L-セリンが共存するときの検量線は共存しない時の検量線とほぼ一致したので, 明らかに L-セリンは反応に影響を及ぼさないことが判明した。 ($y = 0.0323x$, $r^2 = 0.997$)。

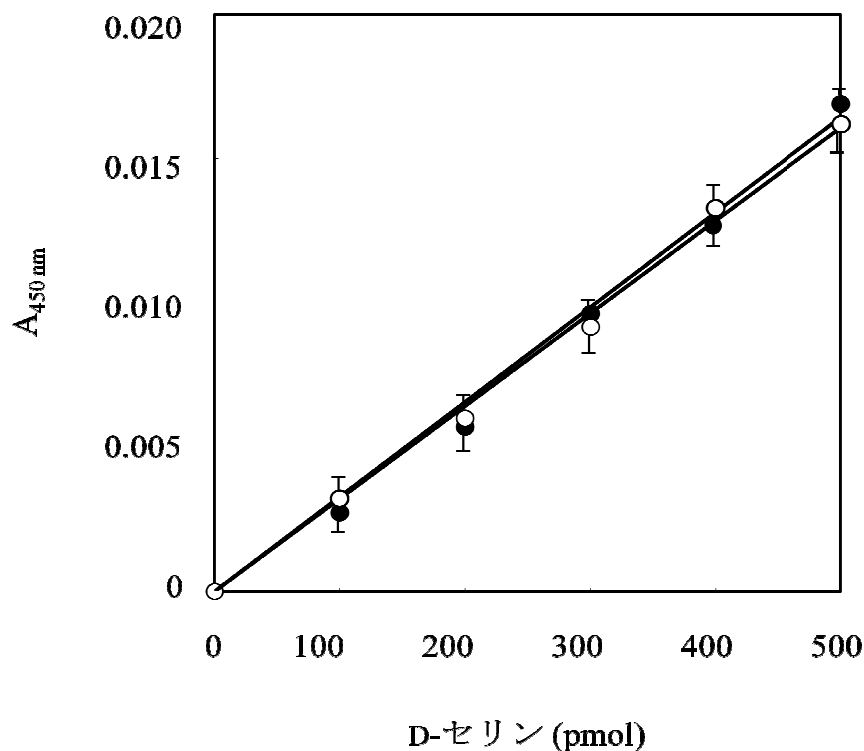


Fig. 2-5. D-セリン検量線 (L-セリン共存下)
D-セリンのみ (●), 20 mM L-セリン共存 (○), mean \pm SD ($n = 4$)

実際の測定試料に近い条件をつくるために、精巣無細胞抽出液 (40 mg/mL) 中に種々の量の D-セリンを加えて、検量線を作製した (Fig. 2-6)。その結果は、 $y = 0.0322x + 0.167$, $r^2 = 0.997$, $K_m = 0.145$ mM となり、Fig. 2-4 の反応の K_m 値 0.149 mM と非常に近い値であった。また、Fig. 2-4, Fig. 2-5, Fig. 2-6 の方程式や相関係数も非常に似通った値であった。これらのことから無細胞抽出液は測定反応に影響を及ぼさないこと、したがって無細胞抽出液中の D-セリン濃度を正確に測定することができることが証明された。このため、臓器の種類ごとに検量線を作製する必要性はなく、いろいろな臓器や組織中の D-セリン量を測定することができる。このことは、ネズミ大脳の無細胞抽出液を用いて D-セリン検量線を作製したところ、方程式は $y = 0.0316x$, $r^2 = 0.996$, $K_m = 0.137$ とカイコガの精巣無細胞抽出液とほぼ同じ値が得られたことによっても支持される。

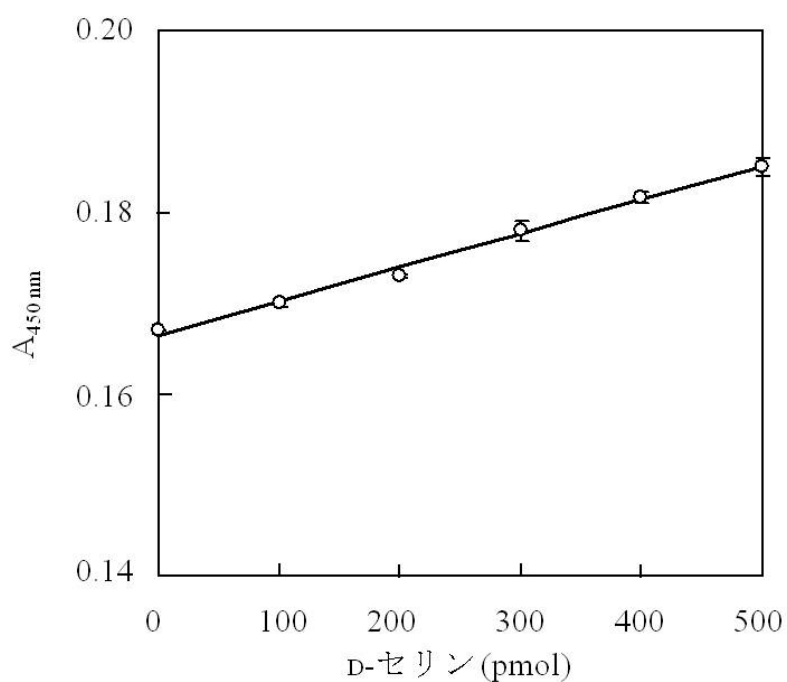


Fig. 2-6. D-セリン検量線 (精巢無細胞抽出液中)
mean \pm SD ($n = 4$)

2.3.3 酵素法と HPLC 法の測定値比較

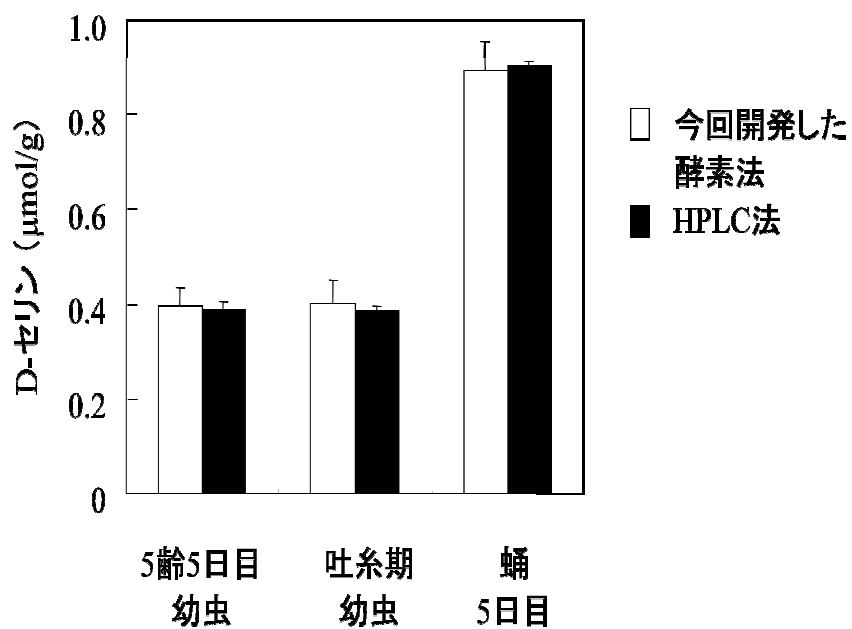


Fig. 2-7. 酵素法と HPLC 法の測定値比較 (カイコガ中腸)
mean \pm SD ($n = 4$)

カイコガ 5 齢幼虫, 蛹, 成虫の中腸の D-セリン量を酵素法と HPLC 法で測定した (Fig. 2-7)。酵素法と HPLC 法で測定した D-セリン量は, 共にほぼ同じ値であった。以上より, 今回開発した酵素法の信頼性が確認された。

2.3.4 カイコガ臓器の D-セリン測定

カイコガの成長に伴い内在 D-セリン濃度はどのように変動するか, 本酵素法を用いて各齢のカイコガ中腸の D-セリン濃度を調査した (Fig. 2-8)。D-セリン濃度は 3 日目蛹まで徐々に増加した後, 5 日目にかけて急激に増加し, その後は羽化・成虫期にかけて減少した。

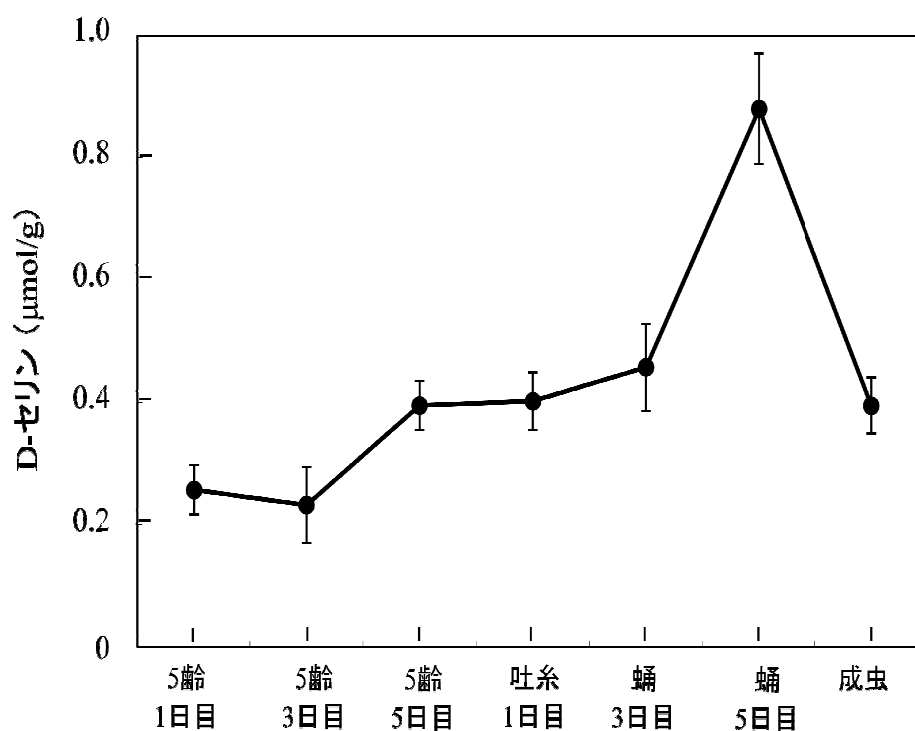


Fig. 2-8. 成長に伴うカイコガ中腸の D-セリン濃度変化
mean \pm SD ($n = 4$)

カイコガ 5 齢 5 日目幼虫, 5 日目蛹, 成虫 1 日目のいろいろな臓器の D-セリン量を測定した (Fig. 2-9)。体液, 中腸, 卵巣, 精巣 (または卵巣), 脂肪体に D-セリンが高

濃度存在すること、すなわち、カイコ体内ではこれらの臓器に D-セリンが分布していることを明らかにした。

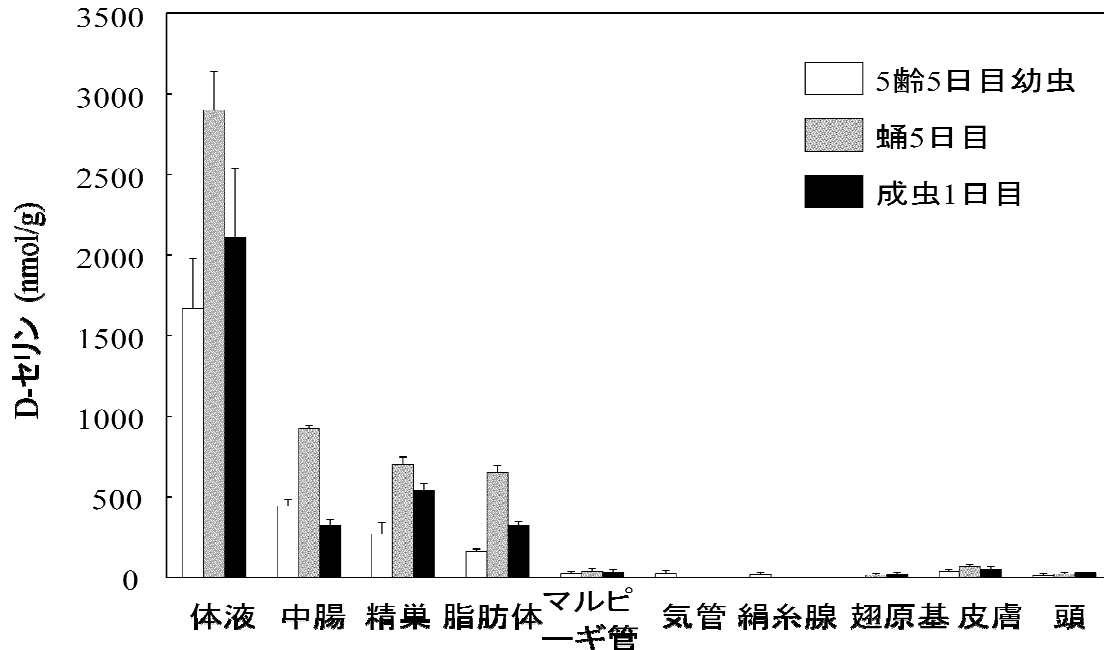


Fig. 2-9. カイコガ D-セリンの臓器分布
mean ± SD (n = 4)

2.4 考察

DSD は、今までに大腸菌 [19]、酵母 [20] とニワトリ [16] から精製されている。これらの酵素の基質特異性と酵素学的性質を Table 2-1 にまとめた。

Table 2-1. DSD の基質特異性と酵素学的精室

基質	ニワトリ		酵母		大腸菌	
	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	V_{max} (μmol/min/mg)
D-セリン	0.131	0.811	0.39	13.1	1.3	300
D-スレオニン	0.312	0.0512	0.13	0.43	3.2	50
L-セリン	12.3	0.197	ND	ND	ND	ND

酵母 DSD は D-スレオニンに対して D-セリンより高い親和性を持ち、大腸菌 DSD は、 V_{\max} 値が示すように、D-スレオニンにもかなりの活性を示す。ニワトリ DSD も D-スレオニンに反応するが、本法を用いて測定した結果、 $1 \mu\text{M}$ D-セリンは $A_{450} = 0.0025$ 、この 1000 倍も高濃度の 1mM D-スレオニンは $A_{450} = 0.002$ であった。通常、生体中の D-スレオニン濃度はとても低いので、ニワトリ DSD の D-スレオニンを分解する活性は測定に影響しないと考えられる。D-セリンの定量にはニワトリ DSD が酵母や細菌の DSD より優秀な酵素であると言えよう。

D-セリン濃度を測定するために酵母 DSD を使う類似した方法 [21] は、検出限界が $2 \mu\text{mol}$ で、検出限界 200pmol の今回開発した方法と比較すると感度は 10 倍低い。近年、さらに感度の高い方法も報告されている [22] が、その方法では、蛍光物質と蛍光分光光度計が必要であり、コスト面に難点がある。今回開発した方法は、必要な光学機器は分光光度計だけである。感度が 2 桁高い HPLC 法 [17] は測定に 4 日間を要するのに比べて、本法では試料調製を含めても 1 時間で D-セリン定量（測定所要時間は 30 分）を完了することができる。本法によって D-セリンのスクリーニングが可能になるので、未測定 of 多くの生物の種々の臓器について D-セリン含有量に関する情報を得ることができるようになる。また、医療分野にも貢献できることと期待される。

2.5 結論

本測定法の開発により、今までよりも短時間に、多量の試料の D-セリンを同時測定できるようになった。今後、本法によりさらに多くの生物について D-セリンが測定されることになれば、L-アミノ酸ワールドにおいて、D-アミノ酸の一種である D-セリンが生体において果たしている役割の解明に一步近づける。

本測定法を *Journal of Chromatography B* に公表した [23]。

参考文献

- [1] Corrigan, J. J., and Srinivasan, N. G. (1966) The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochemistry*, **5**, 1185-1190.
- [2] Nagata, Y., Masui, R., and Akino, T. (1992) The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experimentia*, **48**, 986-988.
- [3] Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., and Takahashi, K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FFBS Lett.*, **296**, 33-36.
- [4] Nagata, Y., Horiike, K., and Maeda, T. (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res.*, **634**, 291-295.
- [5] Srinivasan, N. G., Corrigan, J. J., and Meister, A. (1965) Biosynthesis of D-serine in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, **240**, 796-800.
- [6] Uo, T., Yoshimura, T., Shimizu, S., and Esaki, N. (1998) Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 31-34.
- [7] Kleckner, N. W., and Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, **241**, 835-837.
- [8] Snyder, S. H., and Kim, P. M. (2000) D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine. *Neurochem Res.*, **25**, 553-560.
- [9] Nishikawa, T. (2005) Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains. *Biol Pharm Bul*, **28**, 1561-1565.
- [10] Kantrowitz, J. T., Malhotra, A. K., Cornblatt, B., Silipo, G., Balla, A., Suckow, R. F., D'Souza, C., Saksa, J., Woods, S. W., and Javitt, D. C. (2010) High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia, Res.*, **121**, 125-130.
- [11] Heresco-Levy, U., Vass, A., Bloch, B., Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Deutsch, L., and Kremer, I. (2009) Pilot controlled trial of D-serine for the treatment of post-traumatic stress disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 1275-1282.
- [12] Hasegawa, Y., Okumura, M., Tojo, M., Nakagaki, M., and Nagata, Y. (2009) Developmental changes in D-serine level in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **78**, 69-73.
- [13] Hasegawa, Y., Ogawa, T., Nakanishi, M., Tojo, M., Okumura, M., Nakagaki, M., and Nagata, Y. (2009) Effects of O-phospho-L-serine on the larval growth and development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Biotechnol. Sericol.* **78**, 75-79.
- [14] Miyoshi, Y., Hamase, K., Tojo, Y., Mita, M., Konno, R., and Zaitso, K. (2009) Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **877**, 2506-2512.

- [15] Miyoshi, Y., Hamase, K., Okamura, T., Konno, R., Kasai, N., Tojo, Y., and Zaitso, K. (2011) Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3184-3189.
- [16] Tanaka, H., Yamamoto, A., Ishida, T., and Horiike, K. (2008) D-Serine dehydratase from chicken kidney: a vertebral homologue of the cryptic enzyme from *Burkholderia cepacia*. *J Biochem.* **143**, 49-57.
- [17] Tojo, M., Murakami, M., and Nagata, Y. (2011) Simple and low-cost high-performance liquid chromatographic method for determination of D- and L-amino acids. *J. Chromatogr. Sci.*, **49**, 810-812.
- [18] Bradford, M, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [19] Dupourque, D., Newton, W. A., and Snell, E.E. (1966) Purification and properties of D-serine dehydrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **241**, 1233-1238.
- [20] Ito, T., Hemmi, H., Kataoka, K., Mukai, Y., and Yoshimura, T. (2008) A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **409**, 399-406.
- [21] Ito, T., Takahashi, K., Naka, T., Hemmi, H., and Yoshimura, T. (2007) Enzyme assay of D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Biochem.* **371**, 167-172.
- [22] Naka, T., Hemmi, H., and 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.
- [23] Suzuki, C., Murakami, M., Yokobori, H., Tanaka, H., Ishida, H., Horiike, K., and Nagata, Y. (2011) Rapid determination of free D-serine with chicken D-serine dehydratase. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3326–3330.

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

3.1 序論

グリシン以外のすべてのアミノ酸は、光学活性である。L-セリンはタンパク質構成成分だが、D-セリンは、タンパク質構成成分ではない。一方、遊離型の D-セリンが、哺乳類の前脳に高濃度存在（全遊離セリンの約 25%） [1, 2] することが知られている。ヒト脳内に存在する *N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体は、特に海馬（記憶や学習といった高度な神経活動の中枢部位）に高密度に存在し、神経伝達物質である L-グルタミン酸が結合すると作動する。研究の結果、遊離型 D-セリンが L-グルタミン酸の NMDA 受容体への結合を調節している神経制御物質であり、記憶の成立に不可欠なアミノ酸であることが明らかになった [3, 4]。セリンラセマーゼがマウス大脳中で D-セリンの生産を行っている酵素であることが、本遺伝子をノックアウトしたマウスを使った実験から示唆されている [5]。

カイコガに D-セリンが高濃度（50%以上）存在することは 50 年以上も前に報告されており [6]、その D-セリンはカイコガ体内で合成されていることが ^{14}C -L-セリンと ^{14}C -D-セリンを用いて示されている [7]。カイコガにセリンラセマーゼが存在することは既に報告されている [8]。カイコガ体内で L-セリン濃度は 2 齢以降蛹期まで増減を繰り返しながら減少していくのに対して、D-セリン濃度は蛹後期まで増え続ける [9]。このことは D-セリンの生理的機能と代謝は L-セリンとは別個のものであることを示している。さらに、セリンラセマーゼの阻害剤を幼虫に投与することにより幼虫の D-セリン濃度を低下させると、体重増加に重大な遅れが生じた [10]。このことは、カイコガの成長における D-セリンの重要性を示している。

カイコガに高濃度存在している遊離 D-セリンであるが、生理的役割は判明しておらず、生命工学的な研究は行われてこなかった。5 齢 5 日目幼虫で臓器により D-セリン含有量が違うことから [9]、本研究では、臓器ごとの D-セリン分布を生育日数・齢との関係において分析した。D-セリン量測定に使用したチキン DSD [11] は、特異的に D-セリンをピルビン酸とアンモニアに変える酵素である。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。さらに、D-セリンの代謝酵素であるセリンラセマーゼと D-セリンデヒドラターゼ（DSD）の活性を測定し臓器分布を検索し、カイコガにおける D-セリンの生理的役割について解明することを目的とした。

3.2 材料と方法

3.2.1 用いた測定試料

カイコガは **2.2.1** に示した方法で飼育・繁殖させ実験に用いた。

3.2.2 D-セリンの定量

2.2.4 に記述した測定法を用いた。カイコガを氷上で解剖し、各臓器を取り出しプールした。プロテアーゼインヒビターカクテルを含む4倍量 (v/w) の PBS (pH 7.4) をそれぞれの臓器 (約 1 g) に加え、はさみで細切し、砕氷中のポリトロン型ホモジナイザー (5,000 rpm × 3 min) を用いて破碎した。破碎液を遠心分離 (12,000 g × 10 min, 4°C) し、上澄みとして得られた無細胞抽出液を測定試料とした。反応溶液 (全量 100 μL, 無細胞抽出液 10 μL, 5×10^4 U ニワトリ DSD, 10 μM PLP, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)) を 96-well 平底ポリスチレン製マイクロタイタープレート (Asahi Technoglass, Tokyo) 中で、37°C, 10 min インキュベートした。ニワトリ DSD は、**2.2.1** に述べた方法で組換え大腸菌から精製したのを用いた。フェニルヒドラジン溶液 (1 mM 2,4- dinitrophenylhydrazine/1 M HCl) 20 μL を加えて反応を止め、さらに室温で 5 min 静置した。最後に 0.6 M NaOH を 160 μL 加えた。マイクロプレートリーダー (MTP-450, Corona, Ibaragi) を用いて 450 nm の吸光度 (A_{450}) 測定を行った。DSD をフェニルヒドラジン溶液添加後に加えたときの値をコントロールとして用いた。

3.2.3 免疫組織化学的観察

この方法の原理は、臓器中の D-セリンにだけ抗 D-セリン抗体が結合するが、結合した抗体を蛍光色素で標識した二次抗体が可視化するものである。すなわち、臓器切片中で蛍光の観察された (=赤く染まった, 免疫反応が見られた) 部位に D-セリンが存在する。

中腸から消化管内容物を取り除くために、24 時間前から幼虫を飢餓状態に置いた。生理食塩水 (PBS) を注いだ氷上のバットにゴムマットを置きその上で、カイコガを解剖し、中腸、卵巣、精巣、脂肪体、気管、絹糸腺、マルピーギ管、皮膚、頭を摘出した。PBS 中に 2.5% グルタルアルデヒドと 4% ホルムアルデヒドを含む固定液でこれらの臓器を固定 (4 h, 20°C) した。固定後、70%→99% エタノールのアルコールシリーズを経て 100% キシレンに浸漬し、臓器中の水を除去した。ついで密閉式自動固定包埋装置 (Tissue-Tek VIP 1000, Sakura Finetek, Tokyo) を用いてパラフィン包埋した臓器からマイクロトーム (SM2000R, Leica, Germany) で得られた 5 μm の超薄切片をスライドガラス (Superfrost, MAS-coated, Matsunami Glass, Osaka) に貼り付けた。

超薄切片のパラフィンをキシレンとエタノール洗浄によって除去した後、ペルオキシダーゼ活性とアルデヒドを除去するために、3% H_2O_2 処理を 15 min, 0.5% $NaBH_4$

処理を 30 min 行った。このスライドガラスに、100 倍希釈したグルタルアルデヒド結合型抗 D-セリン抗体 (MoBiTec, Goettingen, Germany) を添加し一次抗原抗体反応を室温, 10 h 行った。PBS 洗浄後, 400 倍希釈した Alexafluoro555 抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, USA) を添加し, 二次抗原抗体反応を室温で 2 h 行った。反応終了後, スライドガラス上の切片を GEL/MOUNT (Biomedica, Pittsburg, PA, USA) で封入した後, $\times 10$, $\times 20$, $\times 63$ 対物レンズを搭載した Zeiss LSM510 レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて観察した。観察結果を Windows 版 Zeiss LSM510 イメージブラウザー・ソフトウェアを使用してビジュアル化した。コントロール試料として, 4% ホルムアルデヒド/PBS を用いて固定した臓器を同様に染色したものをを用いた。また 0.1% ヘマトキシリンと 0.1% エオシンで HE 染色も行った。

カイコガの D-アラニン局在性を調べる実験は, 一次抗体としてグルタルアルデヒド結合型抗 D-アラニン抗体, 或いは市販の抗 D-アラニン抗体 (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) を用いたこと以外, D-セリンの局在性を調べた時と同じ実験手順に従って行った。

3.2.4 酵素活性測定

摘出した各臓器は PBS で洗浄後, 測定に用いるまで -20°C で保存した。体液は尾角から採取した。4 倍量 (v/w) の PBS (pH 7.4) を各臓器 (約 1 g) に加え, 氷上でポリトロン型ホモジナイザーを用いて破碎した。破碎液を遠心分離 ($12,000\text{ g} \times 10\text{ min}$, 4°C) し, 上澄みとして得られた無細胞抽出液を測定試料とした。セリンラセマーゼ活性は L-セリンから変換された D-セリンを定量することにより求めた。その反応溶液は全量 $200\ \mu\text{L}$ 中に $100\ \text{mM}$ L-セリン, $25\ \mu\text{M}$ PLP, $100\ \mu\text{g}$ 無細胞抽出液, $5 \times 10^4\ \text{U}$ DSD, $50\ \text{mM}$ Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む組成とした。DSD 活性は D-セリンが分解されて生じるピルビン酸を定量することにより求めた。その反応溶液は全量 $200\ \mu\text{L}$ 中に, $100\ \text{mM}$ D-セリン, $25\ \mu\text{M}$ PLP, 無細胞抽出液 $100\ \mu\text{g}$, $50\ \text{mM}$ Tris-HCl buffer (pH 7.6) を含む組成とした。 37°C , 30 min 反応させた後, セリンラセマーゼ活性は D-セリンを, DSD 活性はピルビン酸を測定した。無細胞抽出液のタンパク質濃度は, ブラッドフォード法 [12] を用いて測定した。

3.2.5 DSD の精製

3 日目蛹から精巢 (約 50 g) を摘出した。1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), $10\ \mu\text{M}$ pyridoxal 5'-phosphate (PLP), 0.4% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテルを含む $50\ \text{mM}$ Tris-HCl buffer (pH 8.0) を精巢に加え, 氷上でポリトロン型ホモジナイザー ($11,000\ \text{rpm} \times 5\ \text{min}$) を用いて破碎した。破碎液を遠心分離 ($15,000\ \text{g} \times 20\ \text{min}$, 4°C) し, 得られた上澄みを無細胞抽出液とした。無細胞抽出液に硫酸アンモニウム (以下硫安) 25~50% 飽和になるように硫安を加え塩析し, 遠心分離 ($15,000\ \text{g} \times 20\ \text{min}$, 4°C) を行った。得られた沈殿物を 1 mM EDTA, 1 mM DTT, $10\ \mu\text{M}$ PLP を含

む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) (Buffer A) に対して 16 時間透析した。その後, DEAE Toyopearl カラムを Buffer A を用いて平衡化した後, 透析した硫酸 25~50%飽和沈殿画分を吸着させ, 0 mM NaCl 溶出画分, 50 mM NaCl 溶出画分, 300 mM NaCl 溶出画分を得た。酵素活性が 0 mM NaCl 溶出画分に得られたので, この画分に 150 mM NaCl を加え, 150 mM NaCl を含む Buffer A を用いて平衡化した Superose™ 12 カラムに通し, 溶出した。

3.2.6 ピルビン酸定量

臓器試料に 2 倍量 (v/w) の PBS (pH 7.4) を加え, ガラスホモジナイザー (1,000 rpm × 3 min) を用いて摺り潰した。これを 100°C, 5 min 熱処理した後に, 遠心分離 (15,000 g × 10 min, 4°C) した。得られた上澄み (無細胞抽出液) 10 µl に 20 µl フェニルヒドラジン溶液, 150 mM リン酸 buffer (pH 7.0) 100 µl を加えた。室温, 5 min インキュベート後, 0.6 M NaOH 80 µl を加え, 450 nm の吸光度 (A_{450}) 測定を行った。反応溶液中のピルビン酸量を A_{450} と検量線から算出した。

カイコガ体内で D-セリンがピルビン酸に変換するかを調べるために, 5 齢 3 日目幼虫の尾角から体液 (200 µL と仮定 [22]) 中に種々の濃度の D-セリン 5 µl を注射した。コントロール用に同量の PBS を注射した。注射後一定時間ごとに, 体液, 中腸, 卵巣, 精巣を取り出し, ピルビン酸を定量した。

3.2.7 細胞内 ATP の定量

細胞内 ATP 量は, ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光分析キットと ATP アナライザー (AF-100, DKK-TOA, Tokyo, Japan) を使用して定量した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁した無細胞抽出液 100 µl, 細胞抽出試薬 100 µl, 発光試薬 100 µl さらに 200 nmol D-セリン, L-セリンまたはコントロールとして Tris-HCl buffer を加えて, ATP 定量を行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 カイコガの成長に伴う各臓器の D-セリン濃度変化

以前の研究において、蛹後期に D-セリン濃度が最も高く、また 5 齢 5 日目幼虫の体液、中腸内容物、中腸の D-セリン濃度が高いことがわかっていた [9]。本研究において、3 齢から成虫までのカイコガに関して D-セリン局在性を詳しく調べた結果、体液、中腸、精巢、脂肪体、卵巣の D-セリン濃度が高く、マルピーギ管、気管、絹糸腺、翅原基（成虫は羽）、皮膚、頭では低かった。孵化後、成長日数とともに体液、中腸、精巢、脂肪体、卵巣の D-セリン濃度は変化した (Fig. 3-1)。

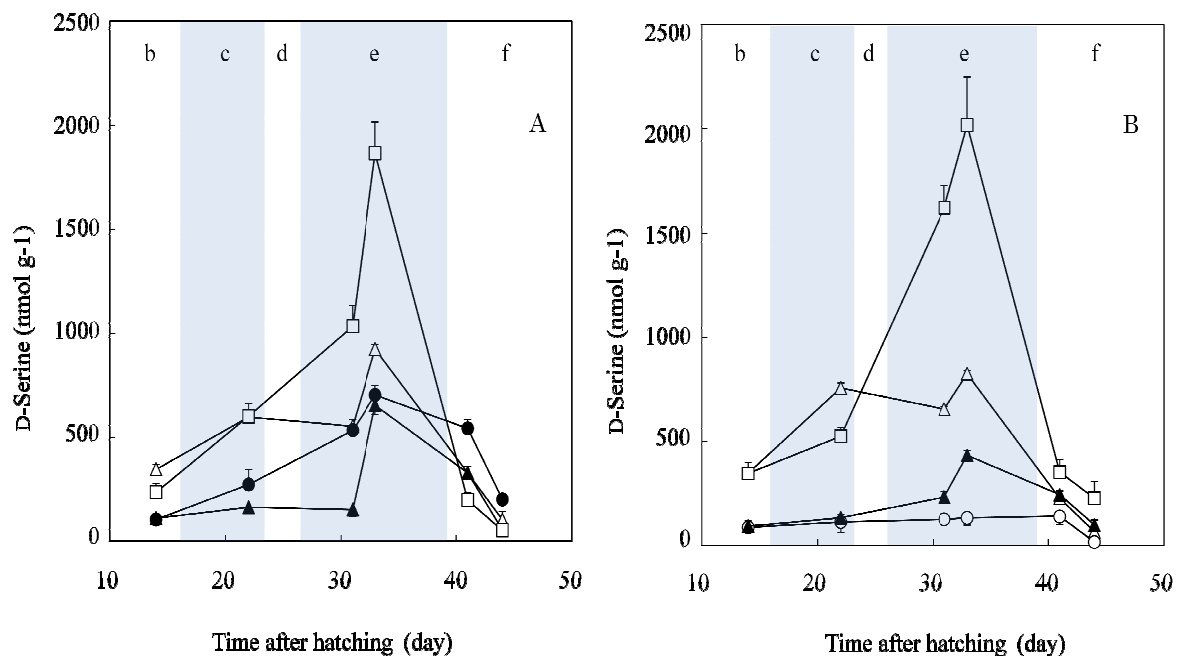


Fig. 3-1. カイコガの成長に伴う各臓器の D-セリン濃度変化

A, オス; B, メス: □, 体液; △, 中腸; ▲, 脂肪体; ●, 精巢; ○, 卵巣
b, 4 齢幼虫; c, 5 齢幼虫; d, 吐糸・前蛹期; e, 蛹; f, 成虫 mean ± SD (n = 5)

5 日目蛹において D-セリン濃度は体液中で最も高く、ついで中腸で高かった。これらの D-セリン濃度は雌雄間で差は無かったが、生殖器官の精巢と卵巣では、精巢の方に卵巣よりもかなり高濃度に局在していた。

3.3.2 カイコガの成長に伴う中腸および中腸内容物の D-セリン濃度変化

幼虫の中腸を前部（第 4・5 体節部分）、中部（第 6・7 体節部分）、後部（第 8・9 体節部分）の 3 部位に分け、内容物を除去して D-セリン濃度を測定した（Fig. 3-2）。

3 齢から吐糸期まで、中部の D-セリン濃度が最も高かった。D-セリンは円柱細胞の微絨毛と盃細胞の微絨毛に局在するので、中部の D-セリン濃度が最も高かった原因は、中部の中腸にはこれらの細胞密度が高いことにあると推察される。蛹以後は中腸が変形し前・中・後の 3 部に分けることは不可能になるので、分割せず全中腸として測定した。全中腸の D-セリン濃度は、5 日目蛹まで増加した後、以降は減少した。雌雄間の違いはなかった。

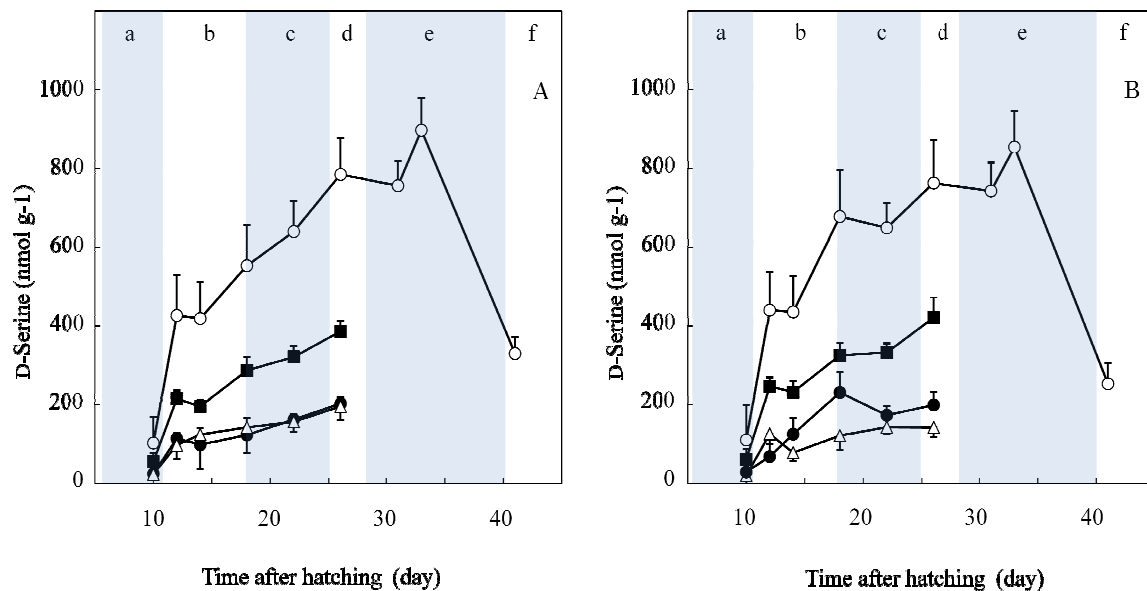


Fig. 3-2. カイコガの成長に伴う中腸の D-セリン濃度変化

A ; オス ; B ; メス, ○ ; 中腸全体 (内容物除去) ; △ ; 前部 ; ■ ; 中部 ; ● ; 後部, a : 3 齢幼虫 b : 4 齢幼虫 ; c : 5 齢幼虫 ; d : 吐糸・前蛹期 ; e : 蛹 ; f : 成虫 mean ± SD (n = 5)

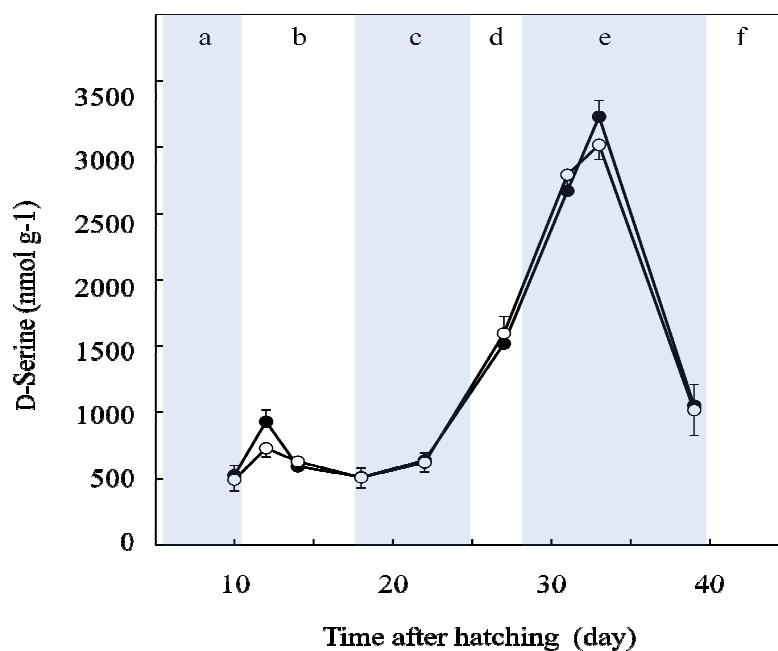


Fig. 3-3. カイコガの成長に伴う中腸内容物の D-セリン濃度変化
 ● ; オス ; ○ ; メス mean ± SD (n = 5)

また中腸内容物の D-セリン濃度は、雌雄共に 5 日目蛹に最も高かった (Fig. 3-3)。D-セリン濃度が中腸内容物に高い原因は、蛹期には自食されてしまう幼虫の円柱細胞、盃細胞にあると思われる。ショウジョウバエでは、幼虫の中腸は蛹期に黄体として蛹の中腸内側に密接した状態で取り込まれる [13]。カイコガでは幼虫の中腸上皮 (円柱細胞、盃細胞などを含む) は、吐糸期と蛹期にアポトーシスと自食により消化され、摂食しない蛹期中に栄養分として完全に消費される [14]。ハチノスツヅリガ *Galleria* についても同様の報告がある [15]。3 日目蛹中腸を HE 染色して検鏡した結果、幼虫の中腸細胞を取り込んでいる蛹の中腸が観察された (Fig. 3-4)。



Fig. 3-4. 3日目蛹の中腸 HE 染色
矢印；幼虫の中腸細胞；矢尻；蛹の中腸上皮。スケールバー；30 μm 。

3.3.3 免疫組織化学的観察による D-セリン局在性

カイコガ中腸，卵巣，精巣，脂肪体，気管，絹糸腺，マルピーギ管，皮膚，頭における遊離 D-セリンの分布を免疫組織学的に調べた。

まず中腸について，輪切りにしたカイコガの切片に HE 染色を行い，観察した部位を黄枠で示した (Fig. 3-5i, 1j)。

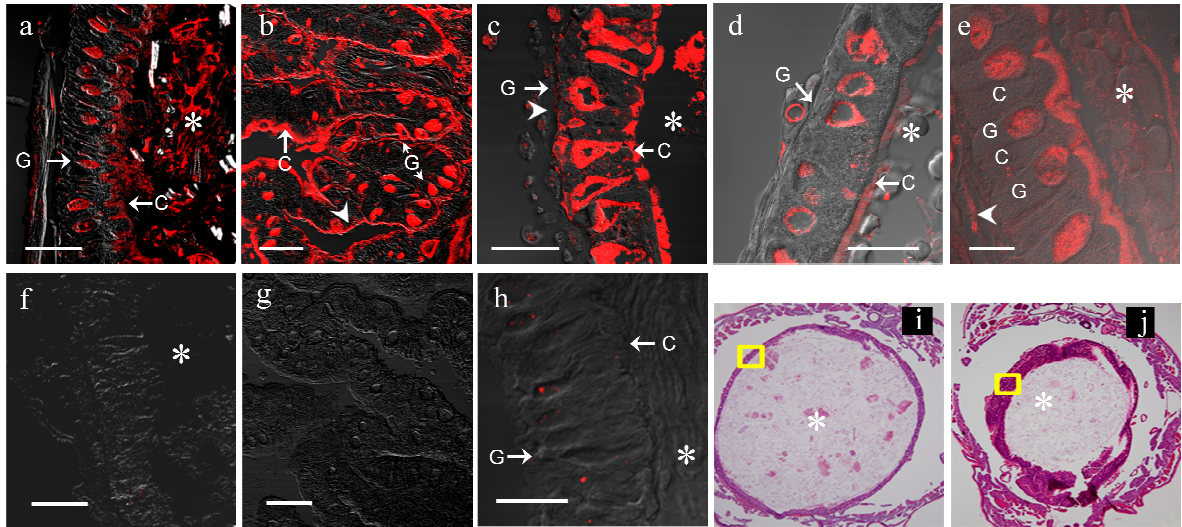


Fig. 3-5. カイコガ幼虫の中腸における D-セリン分布

2 齢 3 日目 (a, f), 3 齢 3 日目 (b, g), 4 齢 3 日目 (c, d, e, h) の中腸。グルタルアルデヒド結合型抗 D-セリン抗体染色。a-e ; グルタルアルデヒド-ホルムアルデヒド固定 : f-h ; ホルムアルデヒド固定。i, j ; HE 染色 (固定前に中腸内容物を除去), 横断切片, 黄枠は d, e に示された中腸上皮部分。b, g ; 単離後の中腸を固定。c, d, h, i ; 第 6 体節 : e, j ; 第 8 体節。C ; 円筒細胞 : G ; 盃状細胞 : * ; 管腔。スケールバー a-d, f-h ; 50 μm : e ; 20 μm 。

2 齢, 3 齢, 4 齢幼虫の中腸は, コントロールと比較して強い免疫反応 (Fig. 3-5) を示した。抗 D-セリン抗体で染色された細胞は, 管腔に面した円柱細胞の微絨毛と, 盃細胞 (Fig. 3-5a-5e) の微絨毛であった。盃細胞と円柱細胞は, 1 齢幼虫 (図示せず) も免疫反応を示した。体腔 (Fig. 3-5b, c, e, arrow head) に面した基底膜と消化管内容物 (Fig. 3-5a, e, 星印, Fig. 3-6a, arrow) も強染された。幼虫の盃細胞の微絨毛は, 吐糸期に変形する [23, 24, 25]。5 齢終期に, それまで盃細胞と円柱細胞の間にあった新生 (幹) 細胞は盛んに増殖・分化を開始し, つぎの蛹期の中腸上皮細胞となる。蛹では, 折り畳まれた構造になった中腸だが良く染色され (Fig. 3-6a, コントロールは Fig. 3-6d, HE 染色は Fig. 3-6e), 大部分の細胞が幼虫の時とは異なる形に変化していた (Fig. 3-2b)。蛹の中腸上皮は, 成虫の中腸 (吸胃) になる。成虫の中腸細胞も, コントロール (Fig. 3-6f) と比較して免疫陽性であった (Fig. 3-6c)。

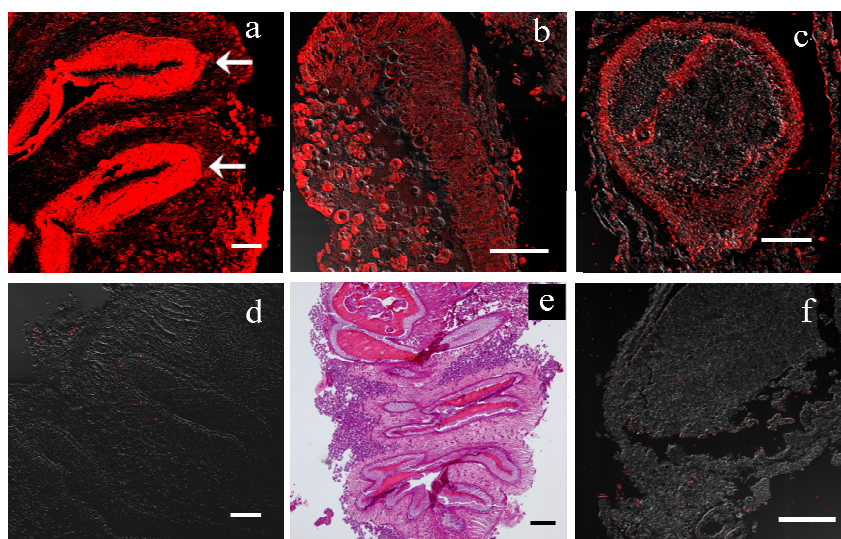


Fig. 3-6. カイコガの蛹と成虫の中腸における D-セリン分布

蛹 1 日目 (a, b, d, e), 成虫 1 日目 (c, f) の中腸。グルタルアルデヒド結合型抗 D-セリン抗体染色。a-c ; グルタルアルデヒド-ホルムアルデヒド固定 : d, f ; ホルムアルデヒド固定。e ; HE 染色。b ; 単離後の中腸を固定。arrow ; 中腸内容物。スケールバーは全て 100 μm 。

卵原細胞は、1つの卵母細胞と7つの栄養細胞に分化する。そして、卵母細胞は蛹期中に栄養細胞と包卵被膜細胞から栄養分を供給され卵細胞になる。5 齢 5 日目幼虫未熟卵管の卵原細胞 (Fig. 3-7a、arrow) はコントロール (Fig. 3-7e) と比較すると強く免疫染色されていた。蛹 2 日目の卵母細胞と栄養細胞だけでなく卵巣小管壁 (arrow head) と卵巣小管細胞 (arrow) (Fig. 3-7b) はほとんど何も染まっていないコントロール (Fig. 3-7f) と対照的に免疫陽性であった。しかし、より高い倍率で観察すると、包卵被膜細胞と卵黄顆粒自身は染色されておらず、包卵被膜細胞 (Fig. 3-7c) や卵黄顆粒 (Fig. 3-7d) の間隙やこれらの細胞・顆粒の表面 (Fig. 3-7g) にあるマトリック substance が免疫陽性であるように見えた。これらより発育の進んだ過程にある、未熟な卵細胞の周辺部と包卵被膜細胞の免疫反応性は弱く淡く染まっていた (Fig. 3-7h)。

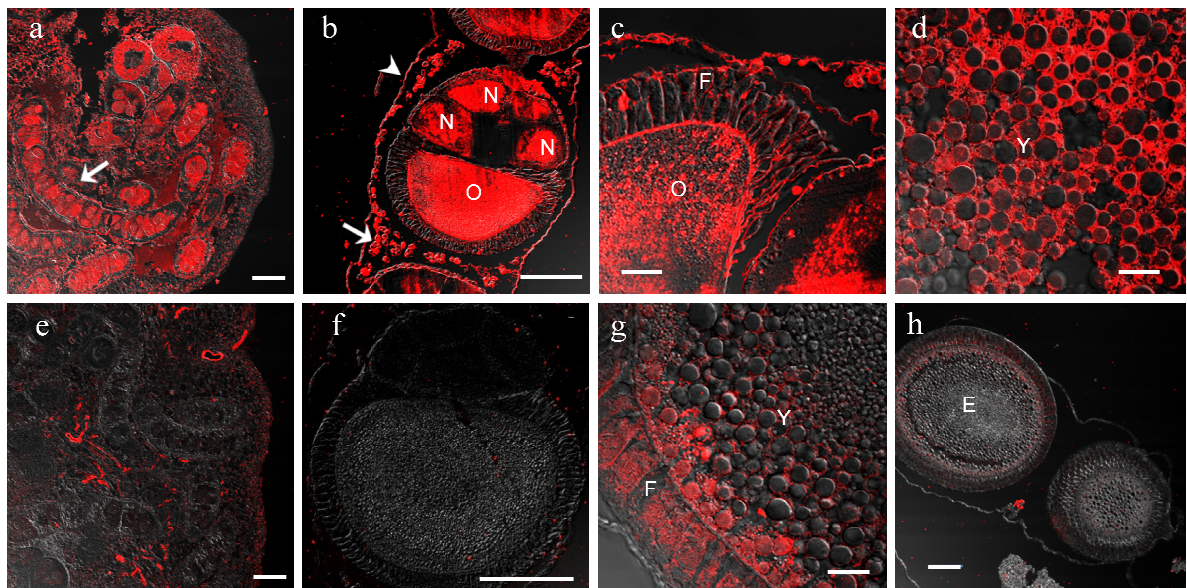


Fig. 3-7. カイコガの幼虫と蛹の卵巣における D-セリン分布

5 齢 5 日目 (a, e), 蛹 2 日目 (b, c, f), 蛹 5 日目 (d), 蛹 7 日目 (g, h) の卵巣。グルタルアルデヒド結合型抗 D-セリン抗体染色。a-d, g, h ; グルタルアルデヒド-ホルムアルデヒド固定 : e, f ; ホルムアルデヒド固定。E ; 未成熟卵 : F ; 卵胞細胞 : N ; ナース細胞 : O ; 卵母細胞 : Y ; 卵黄顆粒。arrow (a) ; 早期卵巣管の卵原細胞 : arrow (b) ; 卵巣管 : arrow head (b) ; 卵巣管壁。スケールバー a, b, e, f, h ; 100 μ m : c, d, g ; 20 μ m。

精巣は、4つの精室から構成されている。Fig. 3-8dはそのうちの2室である。精子形成を制御する大きな先端細胞 (Fig. 3-8a, arrow) [26, 27] は、単細胞の精原細胞によって囲まれている。4 齢幼虫の先端細胞と精原細胞は、抗 D-セリン抗体で染色されなかった (Fig. 3-8a, 上)。5 齢幼虫の精母細胞と精細胞 (Fig. 3-8b-8d) も染色されなかったが、これらの細胞の表面 (Fig. 3-8b,) や細胞間のマトリックス (Fig. 3-8c, 8d), 精室被膜上皮 (Fig. 3-8b, arrow), 精室隔壁 (Fig. 3-8c, arrow) はコントロール (Fig. 3-8e, 8f) とは対照的に明瞭に着色した。しかし、これらの上皮細胞と隔壁細胞自身は染色されなかった。多数の精母細胞 (Fig. 3-9a, 9d), 精細胞, 未熟精子が蛹 (Fig. 3-9b, 9d) と成虫 (Fig. 3-9c) の精巣にみられた。表面とマトリックス物質 (Fig. 3-9a-9d) がネガティブコントロール (Fig. 3-9e, 9f) とは対照的に赤く染まった。D-セリンを含んでいるマトリックスは、精母細胞と精細胞を含有しているシスト, 未熟精子 (Fig. 3-9b, 9d, arrowhead), 精巣被膜上皮細胞 (Fig. 3-9d, arrow) などの間隙を満たしていた。

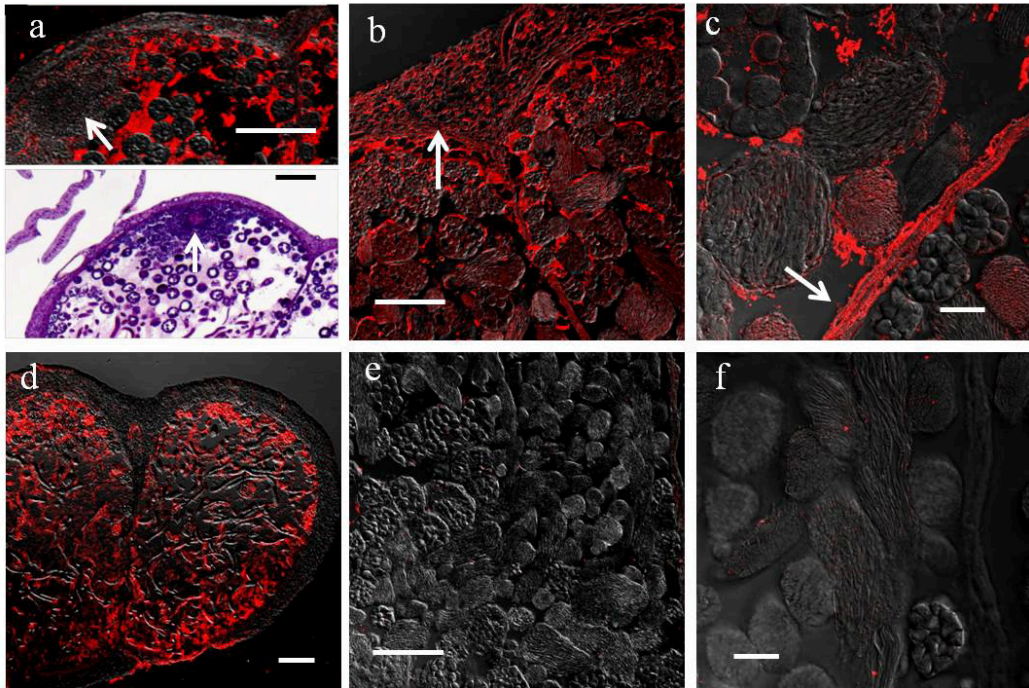


Fig. 3-8. カイコガの幼虫の精巣における D-セリン分布

4 齢 3 日目 (a), 5 齢 3 日目 (b, c, e, f), 5 齢 5 日目 (d) の精巣。グルタルアルデヒド結合型抗 D-セリン抗体染色。a 上, b-d ; グルタルアルデヒド-ホルムアルデヒド固定 : e, f ; ホルムアルデヒド固定。a 下 ; HE 染色。arrow (a) ; 先端細胞 : arrow (b) ; 精巣上皮 : arrow (c) ; 精室間の精巣隔壁。スケールバー a, b, d, e ; 100 μm ; c, f ; 20 μm 。

気管，絹糸腺，マルピーギ管，皮膚，頭も強染されたが，コントロールも同様に染まった。脂肪体については，繰り返し実験を行ったが明瞭な結果は得られなかった。D-アラニンに関しては，鱗翅目昆虫の幼虫の消化管微絨毛の膜に D-アラニン特異的な輸送システムがある [28] にも関わらず，抗 D-セリン抗体で調べたどの臓器も抗 D-アラニン抗体にはポジティブな免疫反応を示さなかった。

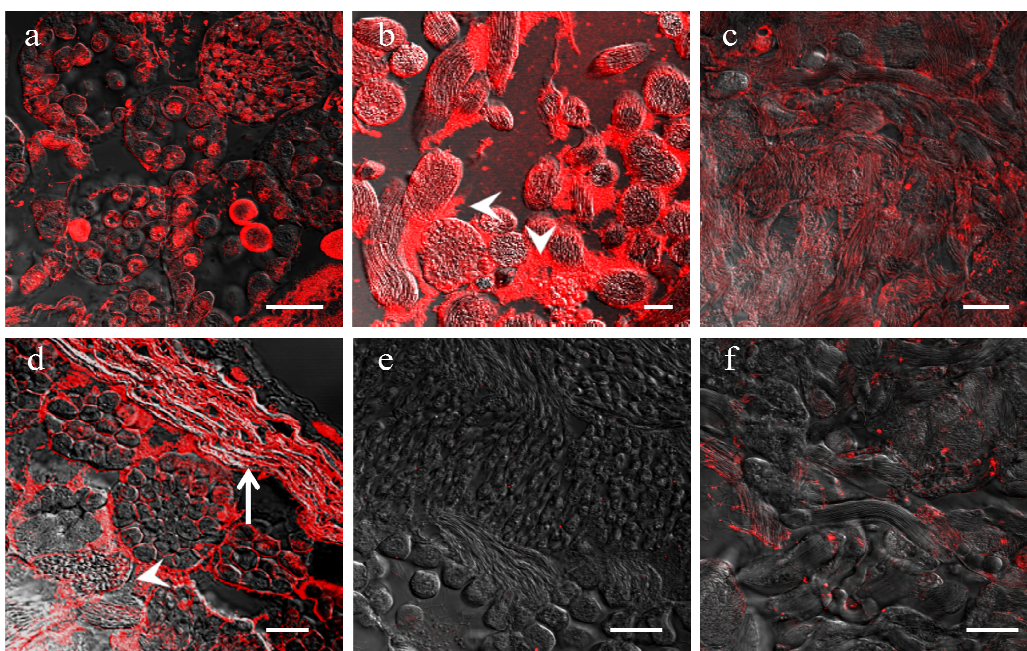


Fig. 3-9. カイコガの蛹と成虫の精巣における D-セリン分布
 蛹 2 日目 (a, d), 蛹 7 日目 (b, e), 成虫 1 日目 (c, f) の精巣。グルタルアルデヒド結合型
 抗 D-セリン抗体染色。a-d ; グルタルアルデヒド-ホルムアルデヒド固定 : e, f ; ホルムアル
 デヒド固定。スケールバーは全て 20 μm 。

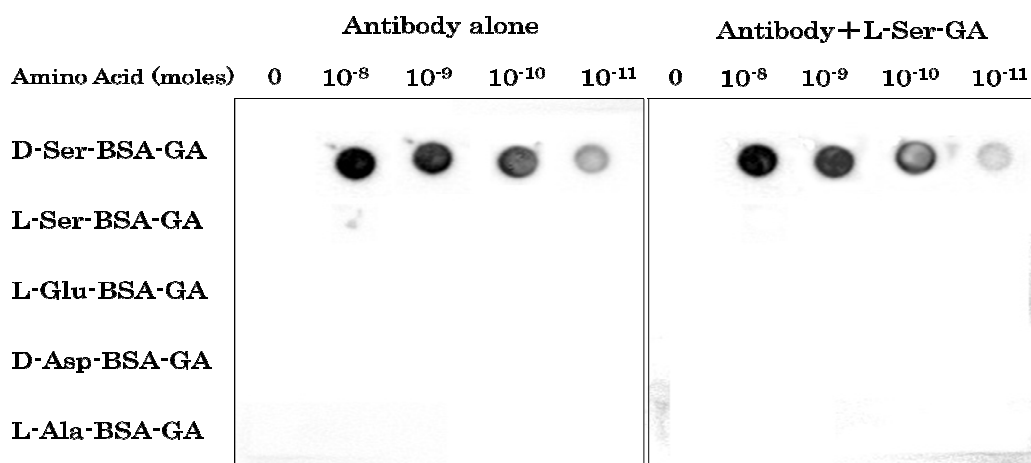


Fig. 3-10. 抗 D-セリン抗体の特異性

D-セリン, L-セリン, L-グルタミン酸, D-アスパラギン酸, L-アラニン, は, 1 mg/ml ウシ血
 清アルブミンと 4% グルタルアルデヒド混合液として一晩静置後, ポリフッ化ビニリデン
 (PVDF) 膜にスポットした。抗 D-セリン抗体のみ (左), 0.5 mM L-セリン-グルタルアル
 デヒド結合型抗 D-セリン抗体 (右)。1000 倍希釈して, 一次抗原抗体反応, 室温, 1 h 行っ
 た。ペルオキシダーゼ結合型二次抗体 (5000 倍希釈) を用いて, 二次抗原抗体反応, 室温,
 1 h 行い, 発光検出を行った。

本研究で使用した抗 D-セリン抗体が、もし、D-セリン以外のアミノ酸を含めた化学物質とも反応するのなら、本研究の結果から、カイコガにおける D-セリンの局在を云々することはできない。そこで、抗 D-セリン抗体の特異性 (D-セリンに対してのみ抗原抗体反応をすること) をテストするため、抗 D-セリン抗体 (Fig. 3-10, 左) およびグルタルアルデヒド結合 L-セリンと結合させた抗 D-セリン抗体 (Fig. 3-10, 右) を用いて、ドットブロットを行った。両ブロットの結果を比較すると、ほとんど差がなく左のブロットでわずかに 10^{-8} モルの L-セリンだけかすかに染色された。L-グルタミン酸, D-アスパラギン酸, L-アラニンには反応しなかった。以上より抗 D-セリン抗体はほぼ完全に D-セリンにのみ反応する特異性の高いものであることが示された。

3.3.4 カイコガの成長に伴うセリンラセマーゼと DSD 活性の変動

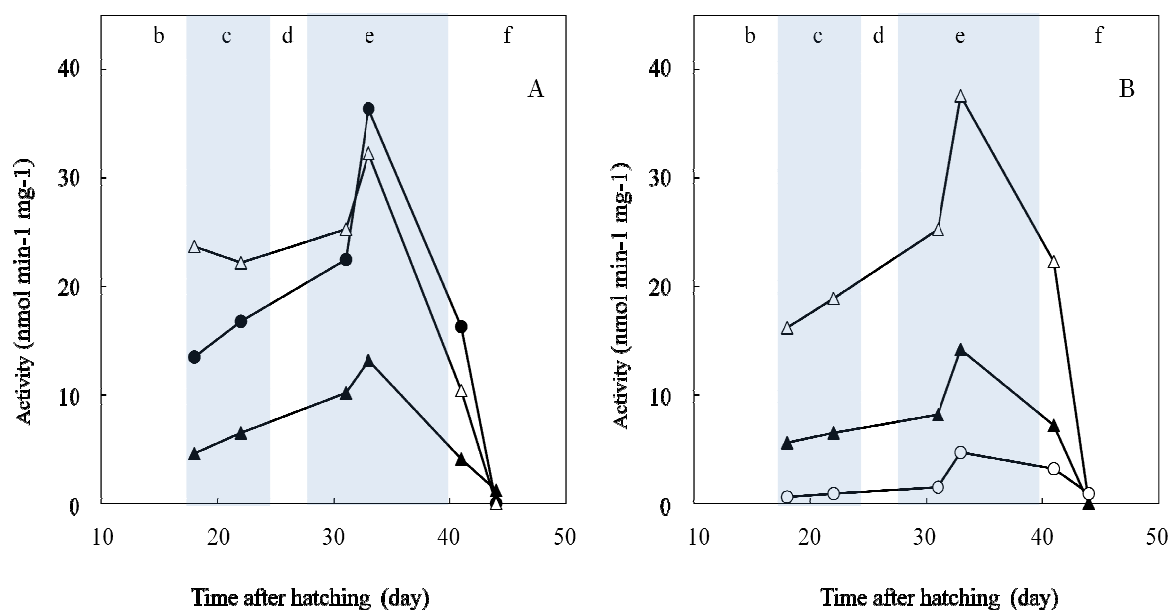


Fig. 3-11. カイコガの成長に伴うセリンラセマーゼ活性の変動

A ; オス : B ; メス, Δ ; 中腸 : \blacktriangle ; 脂肪体 : \bullet ; 精巣 : \circ ; 卵巣, b : 4 齢幼虫 ; c : 5 齢幼虫 ; d : 吐糸・前蛹期 ; e : 蛹 ; f ; 成虫 mean \pm SD ($n = 3$)

D-セリン生合成は、ラット脳 [5] とカイコガ [7] で示された。多数のカイコガ臓器のセリンラセマーゼ活性を測定した結果、中腸, 脂肪体, 精巣, 卵巣 (Fig. 3-11) に活性が検出された。

セリンラセマーゼ活性は、5日目蛹にピークに達した。幼虫から蛹期間中、高い活性を示した精巣と中腸に比べて、卵巣の活性は低かった。カイコガ日齢とセリンラセマーゼ活性の関係は、日齢と中腸、脂肪体、精巣、卵巣の D-セリン量 (Fig. 3-1) の関係と一致した。このことは、各臓器に局在しているセリンラセマーゼによって L-セリンから D-セリンが作り出されていることを示唆していた。人工飼料 Silkmate 2S の D-セリン含有量は、測定の結果 4 nmol/g であった。成長期間中最も多く餌を食べる 5 齢 5 日目幼虫の 1 日当たり最大摂取量は 1.2 g であったので、餌がカイコガの D-セリン濃度に与える影響は無視できる量であると考えられた。またマルピーギ管、気管、絹糸腺、翅原基、皮膚、頭、体液、メコニウム、中腸内容物中にセリンラセマーゼ活性はなかった。体液中に活性が検出されなかったことより、体液中の D-セリンはセリンラセマーゼが存在する各臓器より供給されたと考えられた。

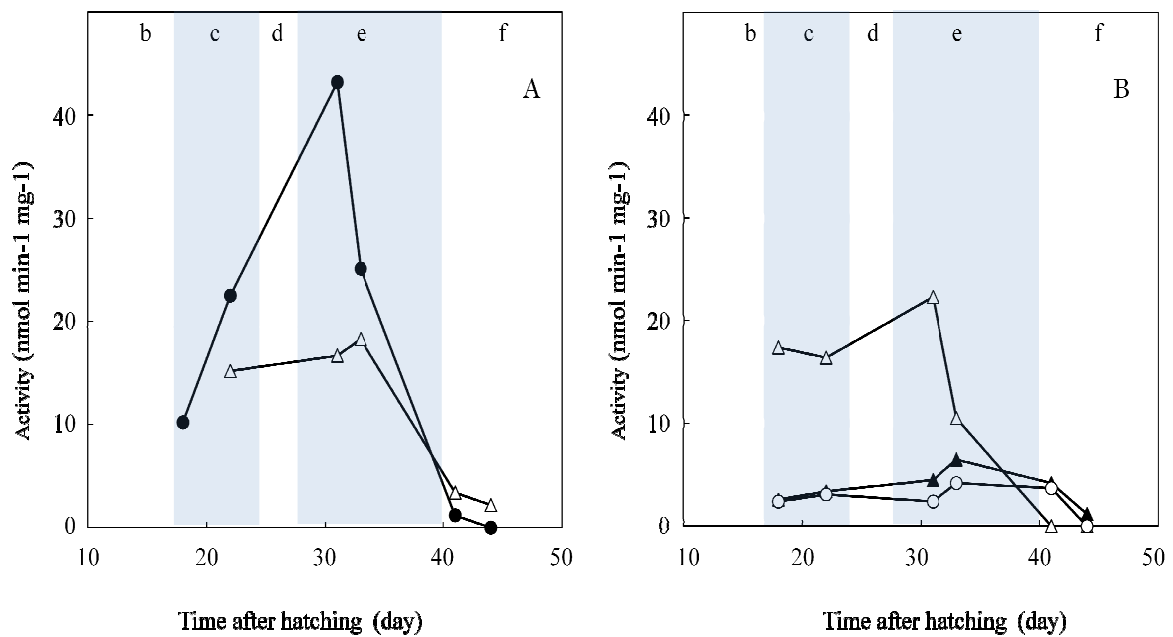


Fig. 3-12. カイコガの成長に伴う DSD 活性の変動

A ; オス ; B ; メス, △ ; 中腸 : ▲ ; 脂肪体 : ● ; 精巣 : ○ ; 卵巣, b : 4 齢幼虫 ; c : 5 齢幼虫 ; d : 吐糸・前蛹期 ; e : 蛹 ; f : 成虫 mean ± SD (n = 3)

DSD は、特異的に D-セリンをピルビン酸に変換する酵素である [11]。この酵素活性は、いくつかの生物 (例えばラット, ニワトリ, 酵母菌など) で見つけられている。DSD 活性を測定した結果, 精巣と中腸で高い活性が検出され, 脂肪体と卵巣では低か

った (Fig. 3-12)。これらの臓器で、3日目および5日目蛹に最も高い活性を示した。マルピーギ管, 頭, 体液, 中腸内容物には活性がなかった。大部分のD-セリンが精巣と中腸でピルビン酸に変換されることを, この結果は示唆していた。そして, 残りのD-セリンは脂肪体と卵巣で変換されるのかもしれない。

3.3.5 カイコガ精巣からの DSD 精製

カイコガ3日目蛹, 精巣を取り出し, 硫酸アンモニウム分画および, DEAEToyopearl と Superose 12 の2種類のカラムクロマトグラフィーを用いて, 無細胞抽出液中の DSD に比し 44 倍に精製した DSD を得た (Table 3-1)。

Table 3-1. カイコガ精巣からの DSD 精製

	Total protein (mg)	Total activity (nmol min ⁻¹)	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification fold
Cell-free extract	566.3	1070	1.9	100	1.0
AS 25-50%	164.3	1120	6.8	105	3.6
DEAE Toyopearl	17.1	384	24.2	35.9	12.8
Superose 12	0.002	1.6	84.4	0.1	44.0

粗酵素の最適 pH は 8.6 であったが, 最終精製酵素では 7.6 であった。酵素の最適温度は, 37°C~50°C であった。

3.3.6 カイコガの成長に伴う臓器湿重量変化

各臓器に含まれている D-セリン量を測定するために, まず雌雄の体液, 中腸, 中腸内容物, 精巣, 卵巣の湿重量を測定した (Fig. 3-13)。

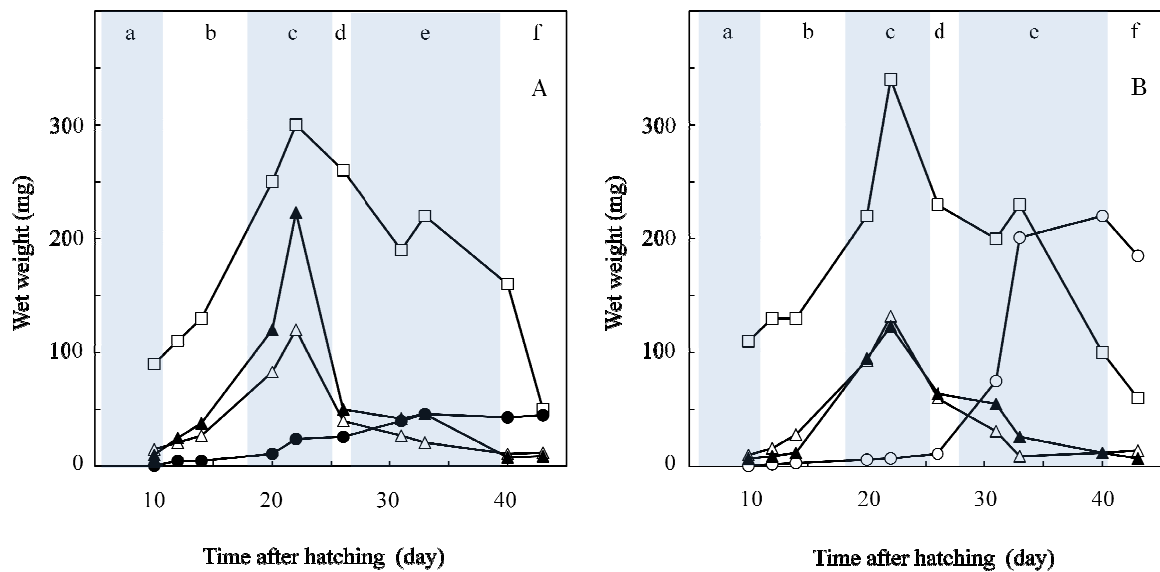


Fig. 3-13. カイコガの成長に伴う臓器湿重量変化

A ; オス ; B ; メス, □ ; 体液 : △ ; 中腸 : ▲ ; 脂肪体 : ● ; 精巢 : ○ ; 卵巣, a : 3 齢幼虫 ; b : 4 齢幼虫 ; c : 5 齢幼虫 ; d : 吐糸・前蛹期 ; e : 蛹 ; f : 成虫 mean ± SD (n = 3)

体液, 中腸, 中腸内容物の湿重量は 5 齢 5 日目に最も高かったが, 精巢と卵巣の場合は, 交尾前の蛹最終日または成虫まで増加した。特に, 卵巣は多数の卵の成熟によりその重さは著しく増加した。D-セリン含有量を求めるために湿重量を測定した結果, 雄の D-セリン含有量 (平均値) は, 5 齢 5 日目幼虫 : 576 nmol/匹, 3 日目蛹 : 361 nmol/匹, 5 日目蛹 : 658 nmol/匹, 交尾後の成虫 : 9 nmol/匹であった。同様に雌は, 5 齢 5 日目幼虫 : 451 nmol/匹, 3 日目蛹 : 311 nmol/匹, 5 日目蛹 : 608 nmol/匹, 交尾後の成虫 : 20 nmol/匹であった。この結果は, 以前のデータ [9] とほぼ同じであった。D-セリン量は, 3 齢から 5 齢最終日まで増加し続け, 吐糸期と蛹前半で減少した後に, 蛹 5 日目のピーク値まで増加し, 以降は成虫に向かって大幅に減少した。

中腸内容物中にセリンラセマーゼと DSD 活性は認められなかった。蛹になると餌を摂取せず, 排出もしない。このことより 5 日目蛹に存在した多量の D-セリンが成虫になるとほぼ消失する原因を迫及することは, とても重要である。中腸内容物の D-セリンは, 中腸に再吸収, または体液を介して精巢, 卵巣, 脂肪体に供給されている可能性もある。DSD とセリンラセマーゼが局在するこれらの臓器において, D-セリンはピルビン酸に, または, アミノ酸プールの平衡化のために L-セリンに変換されるのかもしれない。また, D-セリンから作り出されるピルビン酸の一部がエネルギー源として脂肪体で貯蔵されることも考えられた。

3.3.7 D-セリン投与によるピルビン酸レベルの上昇

D-セリンデヒドラーゼ活性が観測されたカイコガ臓器（中腸、脂肪体、精巣、卵巣）で、D-セリンのピルビン酸への変換が考えられた。投与されたD-セリンがこれらの臓器でピルビン酸に変換されるか実験した。ピルビン酸濃度は無細胞抽出液存在下の検量線（Fig. 3-14）に基づいて算出した。カイコガにD-セリンを注射すると、投与量依存的に体液中のピルビン酸量が増加し10分後に最大値を示した（Fig. 3-15）。

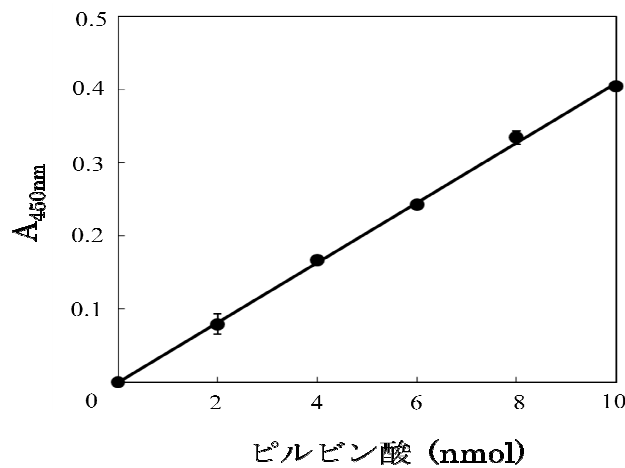


Fig. 3-14. ピルビン酸検量線
mean \pm SD ($n=5$)

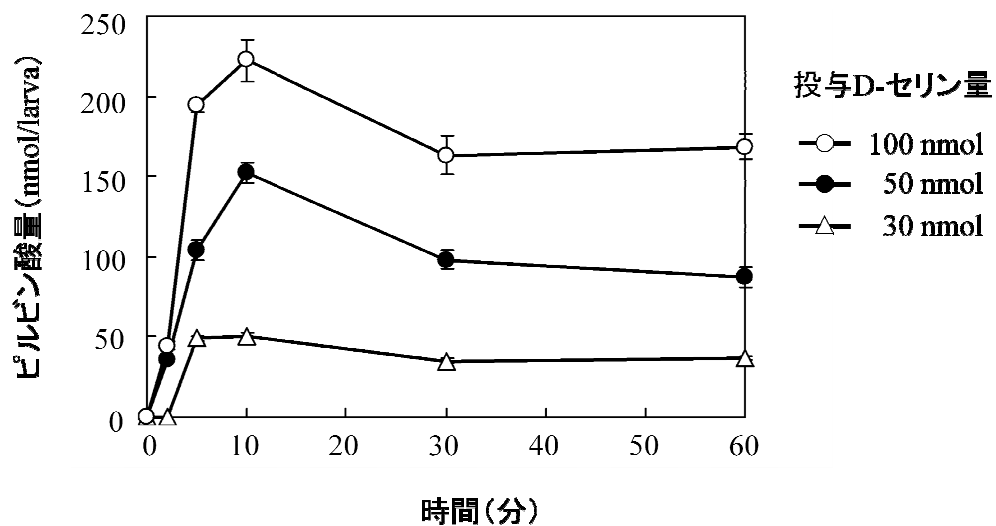


Fig. 3-15. D-セリン投与後のピルビン酸量変化（体液）
mean \pm SD ($n=4$)

また、体液では投与 10 分後、中腸と精巣では 30 分～60 分後にピルビン酸レベルは最高になった (Fig. 3-16)。

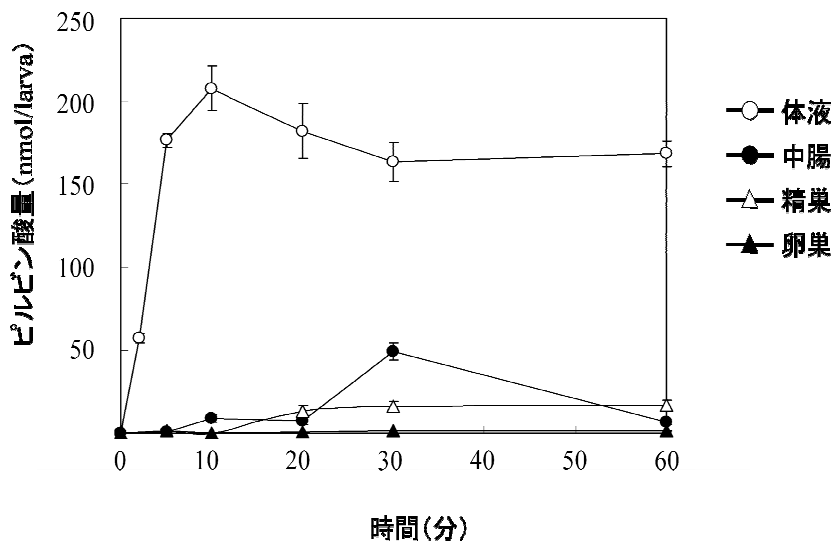


Fig. 3-16. D-セリン投与と各器官のピルビン酸量変化
mean \pm SD ($n=4$)

3.3.8 D-セリンによる ATP 合成の誘導

ピルビン酸は ATP 合成の基質であるために、中腸、脂肪体、精巣、卵巢で D-セリンから変換されたピルビン酸が、これらの臓器で ATP 合成に使われるという仮説を立てた。この仮説を立証するために、D-セリンが細胞内 ATP 量におよぼす影響を調べた。3 日目および 5 日目蛹の各臓器の細胞内 ATP 量を測定すると、各臓器の細胞内 ATP 量は、脂肪体：30,000 nmol/g (湿重量)、卵巢：30,000 nmol/g、精巣：20,000 nmol/g、中腸：3,000 nmol/g であった。精巣より得た無細胞抽出液を含む反応液に 1 mM D-セリンを添加した結果、ATP 量が、3 日目蛹：3,500 nmol/g、5 日目蛹：2,500 nmol/g 増加した。(Fig. 3-17)。他臓器の無細胞抽出液に D-セリンを添加しても ATP 量は増加しなかった。また中腸と卵巢の無細胞抽出液に 1 mM ピルビン酸を添加した結果、15,000 nmol/g 増えた。しかし、D-セリンの代わりに添加した L-セリンは ATP 量に影響を与えなかった。このことより、精巣において D-セリンはピルビン酸を介して ATP 合成に用いられていることが証明された。1 mM D-セリンを添加した場合でも 25% が ATP 生産に使われた。精子形成時には莫大な量の ATP が必要とされるため、精巣内の D-セリンは ATP 合成のために使われると推量した。

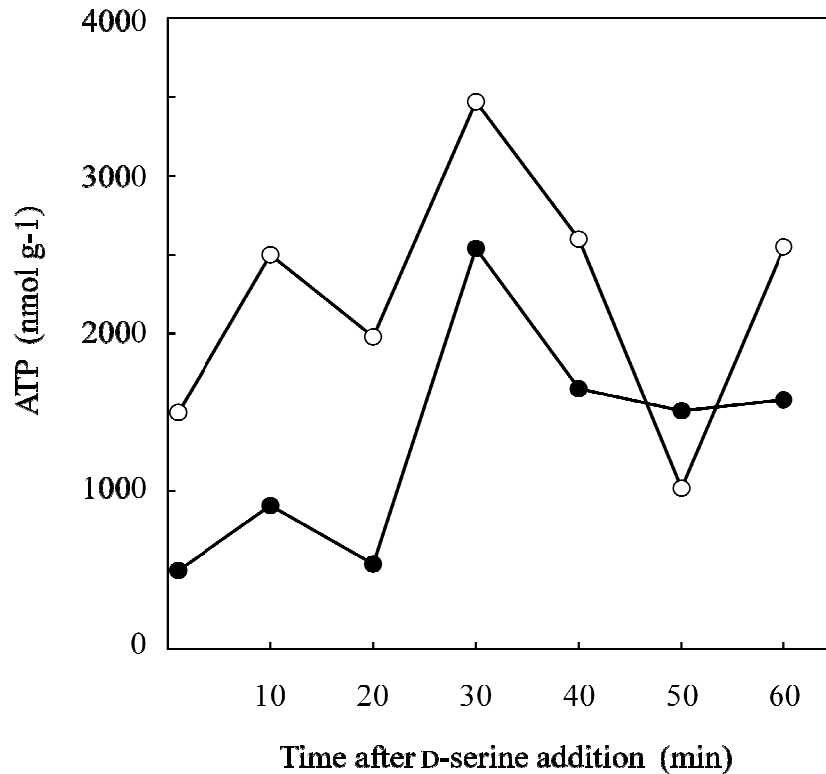


Fig. 3-17. D-セリンが細胞内 ATP 量におよぼす影響

精巢より得た無細胞抽出液を含む反応液に 1 mM D-セリンを添加, ● ; 3 日目蛹 : ○ ; 5 日目蛹 mean \pm SD ($n = 5$)

3.4 結論

カイコガにおいて、遊離型 D-セリンは中腸、脂肪体、卵巢、精巢、体液、中腸内容物に局在することが明らかになった。これらの臓器の内、中腸、脂肪体、卵巢、精巢ではセリンラセマーゼと D-セリンデヒドラターゼ (DSD) 活性が検出された。両酵素の活性は D-セリンを含有する臓器と一致することが判明した。またこれらの臓器において、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-セリン量の変動が一致した。しかし、体液、中腸内容物に両酵素は検出されなかった。放射性同位体を用いた研究により、カイコガ体内で L-セリンから D-セリンの産生されていることが明らかになっているので [8]、この結果と併せて考察すると、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-セリンから作り出されていることが示唆された。また投与したD-セリンがピルビン酸に変換されることがわかった。これらの臓器においてDSDにより分解されたD-セリンは、反応生成物としてピルビン酸に変換後、ATP合成に関わることを証明するため、カイコガ精巣無細胞抽出液にD-セリンを添加した結果、ATP量が増加した。またD-セリンの代わりにL-セリンを添加した結果、ATP量に影響を与えなかった。このことから、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重要なピルビン酸に変換され、中腸、脂肪体、卵巣、特に精巣でATP合成に使われることが示唆された。L-セリンからセリンラセマーゼによってD-セリンが作り出され、DSDによりD-セリンがピルビン酸に変換された後にATP合成に関わっているという、D-セリンの生理的役割の一部と酵素の関連性を解明した。

参考文献

- [1] Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Letters* **296**, 33–36.
- [2] Nagata, Y., Horiike, K., Maeda, T. (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res.* **634**, 291–295.
- [3] Kleckner, N.W., Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835–837.
- [4] Schell, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H. (1995) D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3948–3952.
- [5] Horio, M., Kohno, M., Fujita, Y., Ishima, T., Inoue, R., Mori, H. and Hashimoto, K. (2011) Levels of D-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (*Srr*) knock-out mice. *Neurochem. Int.* **59**, 853–859.
- [6] Corrigan, J.J., Srinivasan, N.G. (1966) The occurrence of certain D-amino acids in insects. *Biochemistry* **5**, 1185–1190.
- [7] Srinivasan, N.G., Corrigan, J.J., Meister, A. (1965) Biosynthesis of D-serine in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **240**, 796–800.
- [8] Uo, T., Yoshimura, T., Shimizu, S., Esaki, N. (1998) Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 31–34.
- [9] Hasegawa, Y., Okumura, M., Tojo, M., Nakagaki, M., Nagata, Y. (2009a) Developmental changes in D-serine level in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* **78**, 69–73.
- [10] Hasegawa, Y., Ogawa, T., Nakanishi, M., Tojo, M., Okumura, M., Nagata, Y. (2009b) Effects of O-phospho-L-serine on the larval growth and development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* **78**, 75–79.
- [11] 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. Biochemistry* **143**, 49–57.
- [12] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- [13] Takashima, S., Younossi-Hartenstein, A., Ortiz, P.A., Hartenstein, V. (2011) A novel tissue in an established model system: the *Drosophyla* pupal midgut. *Dev. Genes Evol.* **221**, 6981.
- [14] Franzetti, E., Huang, Z., Shi, Y., Xie, K., Deng, X., Li, J.L.Q., Yang, W., Zeng, W.,

Casartelli, M., Deng, H., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Tettamanti, G., Cao, Y. and Feng, Q. (2011) Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silk worm larval midgut. *Apoptosis* **3**, 305–324.

[15] Uwo, M.F., Ui-Tei, K., Park, P., Takeda, M. (2002) Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell Tissue Res.* **308**, 319–331.

第4章

総括

本研究により新規のD-セリン定量法（酵素法）を確立した。この測定法の開発により今までよりも短時間に、多数の試料のD-セリン含量と濃度を同時測定できるようになった。今後、多くの生物について本法によりD-セリンの定量が行われることになれば、L-アミノ酸ワールドにおいて、D-アミノ酸の一種であるD-セリンが生体中で果たしている役割の解明に一步近づける。医療分野においても、このD-セリン定量法を用いて、短時間に多量の試料測定が可能になれば、統合失調症などの神経・精神疾患の治療への応用の可能性を開き、さらに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と期待できる。

本D-セリン測定法を用いて、カイコガ中のD-セリン量を測定し、セリンラセマーゼ活性を求め、さらにカイコガへのD-セリン投与の生命工学的研究を行った結果、D-セリンはカイコガ体内においてL-セリンからセリンラセマーゼにより生じることが明らかになり、そのD-セリンはDSDによりピルビン酸に代謝されること、さらに精巢などではATP合成に用いられることが示された。また生命工学の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。

謝 辞

本研究において、貴重なご指導とご助言を賜りました日本大学理工学部前教授 長田洋子博士に心より感謝致します。また懇切なご教示を頂いた日本大学理工学部教授 櫻川昭雄博士，櫛泰典博士，日本大学短期大学部生命物質化学科教授 西村克史博士，日本大学理工学部専任講師 谷川実博士に感謝致します。さらにカイコガの提供と飼育法を含めたカイコガ全般にわたるご助言を頂いた信州大学繊維学部教授 金勝廉介博士，ならびに共同研究者としてレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いての観察に多大な協力を頂いた滋賀医科大学生化学分子生物学教室助手 田中裕之博士，同教授 堀池喜八郎博士にこの場を借りて感謝致します。さらに遺伝子組み換え実験を行うにあたり御指導を賜りました中央大学理工学部教授 石塚盛雄博士にこの場を借りて感謝致します。本研究を進めるにあたり協力を頂いた本学大学院生ならびに卒業研究生にも心よりお礼申し上げます。