

哺乳類細胞における生理活性
D 型アミノ酸の生合成に関する研究

Studies on the biosynthesis of bioactive
D-amino acids in the mammalian cells

平成 27 年度

北里大学大学院 薬学研究科 薬学専攻博士課程
生体分子解析学教室 (薬物治療学 I)

DP-12205 松田さつき

目次	p. 1 – p. 4
学位論文要旨	p. 5 – p.11
第 1 章 背景と目的	p.12 – p.18
1-1 背景と目的	p.12 – p.14
1-2 図表	p.15 – p.18
第 2 章 ラット GOT1L1 およびヒト GOT1L1 の D-Asp 生合成への関与	p.19 – p.48
2-1 序論	p.19
2-2 材料と方法	p.20 – p.27
2-2-1 試薬及び機器	p.20
2-2-2 細胞培養	p.21
2-2-3 細胞培養時の D,L-Asp の HPLC による定量	p.21 – p.24
2-2-3-1 各種ヒトおよびラット由来培養細胞株における細胞内 D,L-Asp 含量の定量	p.21 – p.22
2-2-3-2 GH ₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析	p.22 – p.23
2-2-3-3 GOT1L1 ノックダウン GH ₃ 細胞株における細胞・培地 中のアミノ酸含量の HPLC による定量	p.23 – p.24
2-2-4 ヒト組換え DDO の調製	p.24
2-2-5 リアルタイム PCR を用いた発現解析	p.24 – p.25
2-2-6 ラット <i>Got1l1</i> ノックダウン GH ₃ 細胞の作製	p.25 – p.27
2-2-6-1 si RNA 発現プラスミドの構築	p.25 – p.26
2-2-6-2 ラット <i>Got1l1</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株の単離	p.27
2-2-6-3 ラット <i>Got1l1</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株の細胞増殖 アッセイ	p.27
2-2-7 統計解析	p.27
2-3 結果	p.28 – p.32
2-3-1 ラット由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と <i>Got1l1</i> および <i>Ddo</i> mRNA 発現量との相関	p.28 – p.29
2-3-1-1 ヒト組換え DDO の調製	p.28
2-3-1-2 ラット由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量	p.28
2-3-1-3 ラット由来培養細胞におけるリアルタイム PCR を 用いたラット <i>Got1l1</i> mRNA およびラット <i>Ddo</i> mRNA 発現レベルの解析	p.28 – p.29
2-3-2 ヒト由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と <i>GOT1L1</i> および	

DDO mRNA 発現量との相関	p.29 – p.30
2-3-2-1 ヒト由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量	p.29
2-3-2-2 ヒト由来培養細胞におけるリアルタイム PCR を 用いたヒト <i>GOT1L1</i> mRNA およびヒト <i>DDO</i> mRNA 発現レベルの解析	p.29 – p.30
2-3-3 GH ₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析	p.30
2-3-4 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株における D,L-Asp 含量 の変化	p.30 – p.31
2-3-4-1 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞の作製	p.30
2-3-4-2 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞におけるラット <i>Got1ll</i> mRNA 発現レベルの解析	p.30 – p.31
2-3-4-3 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株の細胞増殖 アッセイ	p.31
2-3-4-4 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株における細胞内 D,L-Asp 含量の定量	p.31 – p.32
2-4 考察	p.33 – p.34
2-4-1 ラット由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と <i>Got1ll</i> および <i>Ddo</i> mRNA 発現量との相関	p.33
2-4-2 ヒト由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と <i>GOT1L1</i> および <i>DDO</i> mRNA 発現量との相関	p.33
2-4-3 ラット <i>Got1ll</i> ノックダウン GH ₃ 細胞株における D,L-Asp 含量 の変化	p.33 – p.34
2-5 図表	p.35 – p.49
第 3 章 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質	p.50 – p.89
3-1 序論	p.50
3-2 材料と方法	p.51 – p.60
3-2-1 試薬及び機器	p.51 – p.52
3-2-2 細胞培養	p.52
3-2-3 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去した 組換えヒト DDO 安定高発現培養細胞の作製	p.52 – p.53
3-2-3-1 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去 したヒト組換え DDO 発現プラスミドの構築	p.52 – p.53
3-2-3-2 SNL 配列を除去したヒト組換え DDO 安定高発現培養 細胞株 (HEK293.SNL(-)_HA-hDDO) の単離	p.53
3-2-4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連	

タンパク質のスクリーニング	p.53 – p.56
3-2-4-1 エンドトキシンフリー ヒト脳由来 cDNA ライブラリーの調製	p.53 – p.54
3-2-4-2 トランスフェクション回数の検討	p.54
3-2-4-3 HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 株における D-Asp 薬剤選択濃度の決定	p.55
3-2-4-4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニング	p.55 – p.56
3-2-5 ヒットタンパク質の解析	p.56 – p.57
3-2-5-1 配列類似性の解析	p.56
3-2-5-2 モチーフ配列の解析	p.56
3-2-5-3 立体構造比較	p.56 – p.57
3-2-6 N 末に His タグが付加されたヒト組換え GRHPR (His-hGRHPR) の調製	p.57 – p.59
3-2-6-1 大腸菌用 His-hGRHPR 発現プラスミドの構築	p.57 – p.58
3-2-6-2 N 末に His タグが付加されたヒト GRHPR (His-hGRHPR) の調製	p.58
3-2-6-3 His-hGRHPR のグリオキシル酸還元酵素活性の測定	p.58 – p.59
3-2-7 His-hGRHPR の Asp 代謝活性の測定	p.59
3-2-8 N 末に HA タグが付加されたヒト GRHPR 安定高発現 HeLa 細胞 (HeLa.HA-hGRHPR) の作製	p.59 – p.60
3-2-8-1 哺乳類培養細胞用 HA-hGRHPR 発現プラスミドの構築	p.59 – p.60
3-2-8-2 HeLa.HA-hGRHPR 安定高発現株の単離	p.60
3-2-9 HA-hGRHPR 安定高発現株における細胞培養時 Asp 含量の HPLC による定量	p.60
3-2-10 HA-hGRHPR 安定高発現株に対する Asp 添加実験	p.60
3-3 結果	p.61 – p.64
3-3-1 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索	p.61
3-3-1-1 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去した組換えヒト DDO 安定高発現培養細胞の作製	p.61
3-3-1-2 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニング	p.61
3-3-2 ヒットタンパク質の解析	p.61 – p.62
3-3-2-1 配列類似性の解析	p.61 – p.62
3-3-2-2 モチーフ配列の解析	p.62

3-3-2-3	立体構造比較	p.62
3-3-3	ヒト GRHPR の D-Asp 代謝における機能解析	p.62 – p.64
3-3-3-1	HA タグが付加されたヒト組換え GRHPR 安定高発現 培養細胞株 (HeLa.HA-hGRHPR) の作製	p.62 – p.63
3-3-3-2	HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の D,L-Asp 含量の定量	p.63
3-3-3-3	D,L-Asp を添加した HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の D,L-Asp 含量の定量	p.63
3-3-3-4	His タグが付加されたヒト組換え GRHPR (His-hGRHPR) の調製	p.63 – p.64
3-3-3-5	His-hGRHPR の D,L-Asp に対する代謝活性の解析	p.64
3-4	考察	p.65 – p.66
3-4-1	ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連 タンパク質の探索	p.65
3-4-2	ヒットタンパク質の解析	p.65
3-4-3	ヒト GRHPR の D-Asp 代謝における機能解析	p.65 – p.66
3-5	図表	p.67 – p.89
第4章	まとめと今後の展望	p.90 – p.91
4-1	まとめ	p.90
4-2	今後の展望	p.90 – p.91
	謝辞	p.92
	参考文献	p.93 – p.98

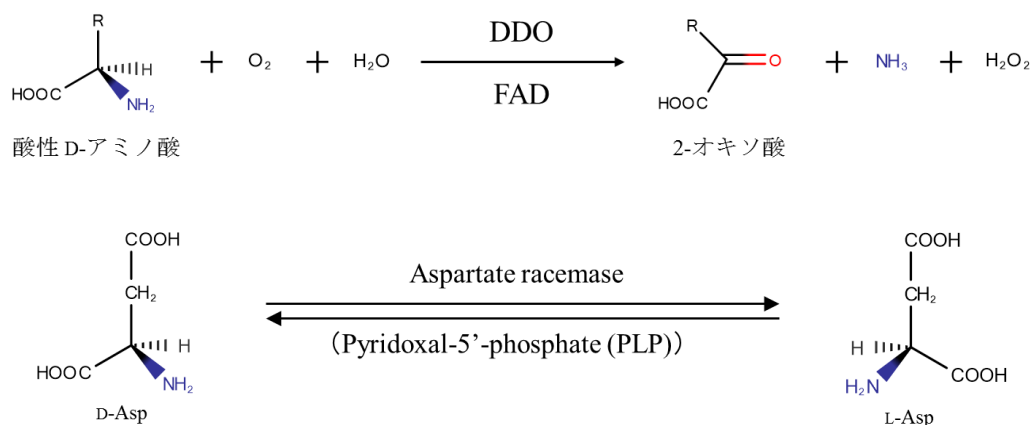
「哺乳類細胞における生理活性 D 型アミノ酸の生合成に関する研究」

1. 背景と目的

近年の分析技術の向上により、ヒトを含めた哺乳類体内には、これまでの常識に反して比較的高濃度の D-アミノ酸が存在することが明らかにされている。中でも遊離の D-アスパラギン酸 (D-Asp) は、哺乳類の脳、下垂体、副腎、松果体、および精巣等の様々な組織に存在し、発生と分化や、種々のホルモンおよびステロイドの産生・分泌の調節に関与することが示唆されている。また、D-Asp はグルタミン酸受容体の一種である N-メチル-D-Asp (NMDA) 受容体のグルタミン酸結合部位にアゴニストとして結合し、この受容体を介した神経伝達を調節することも示唆されている。

哺乳類における D-Asp 代謝関連酵素の 1 つとして、D-Asp を立体特異的に分解する D-Asp オキシダーゼ (DDO) が知られている。DDO は、酸素と水の存在下、D-Asp をオキサロ酢酸に分解し、同時にアンモニアおよび過酸化水素が生成する (図 1)。D-Asp の合成酵素に関しては、D,L-Asp の相互変換を触媒する Asp ラセマーゼが知られており、細菌ではピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 非依存性の Asp ラセマーゼが同定され、真核生物ではアカガイとアメフラシで PLP 依存性の Asp ラセマーゼが報告されている。一方、哺乳類における D-Asp の合成経路は未だ不明であるが、最近、機能未知のタンパク質であったマウス glutamate-oxaloacetate transaminase 1-like 1 (GOT1L1) が Asp ラセマーゼ活性を示すと報告された。

図 1 D-Asp オキシダーゼ (DDO) と Asp ラセマーゼの反応



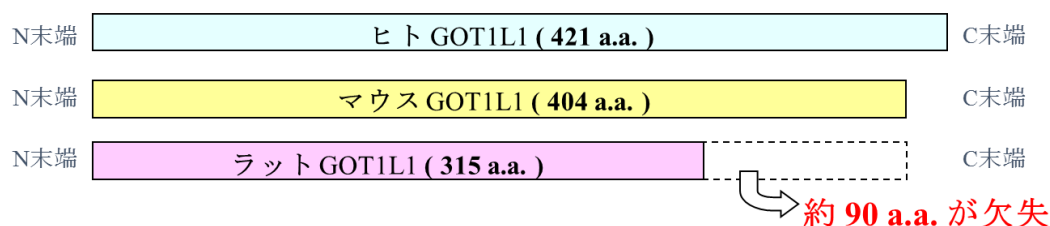


図2 ヒト、ラットおよびマウス GOT1L1 ホモログ

興味深いことに、ヒトおよびラットにはマウス GOT1L1 のホモログが存在しているが(図2)、これら3種のタンパク質間ではアミノ酸配列の保存性が比較的低く、また、上述の真核生物型 Asp ラセマーゼや、哺乳類で見出されているセリン (Ser) ラセマーゼ (D,L-Ser の相互変換を触媒する D-Ser の合成酵素) に共通して保存されているモチーフ配列が GOT1L1 では保存されていない。したがって、GOT1L1 が D-Asp の主要な合成酵素であることには疑問の余地があると考えられた。

本研究では、哺乳類細胞における D-Asp の合成経路の解明を目的として、まず始めに、種々の哺乳類培養細胞株を用いて、GOT1L1 が実際に D-Asp の生合成に関与しているか否かを解析した。次に、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質のスクリーニングと、それによって選別した候補タンパク質の機能解析を行った。

2. GOT1L1 の D-Asp 生合成への関与

まず始めに、種々のラット由来培養細胞株 (GH₃、PC-12 および NRK-52E) およびヒト由来培養細胞株 (NEC8、ECV304、A431、TASK1、Hep G2 および HeLa) における細胞内 D-Asp 含量と GOT1L1 mRNA の発現レベルとの相関を解析した。この際、分解酵素である DDO の mRNA の発現レベルも同時に解析した。細胞内 D-Asp 含量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し、mRNA の発現レベルはリアルタイム RT-PCR により測定した。その結果、ラットおよびヒト由来培養細胞株のいずれにおいても、(DDO の発現レベルを考慮したとしても) GOT1L1 の発現レベルと細胞内 D-Asp 含量との間に明確な相関性は認められないことが明らかになり、GOT1L1 が D-Asp の生合成に関与していないことが示唆された。

次に、GH₃ 細胞を用いて、GOT1L1 の RNAi によるノックダウンが D-Asp の生合成に与える影響を解析した。この細胞株では、培養系全体 (細胞内および培養上清中) の D-Asp 量を経時的に定量することで D-Asp が生合成されることが明らかにされている。その結果、GOT1L1 のノックダウンにより、培養系全体の総 L-Asp 含量が有意に低下する一方で、総 D-Asp 含量に有意な低下は認められないことが明らかになった (図3)。これらの結果から、ラットおよびヒト細胞において、GOT1L1 は D-Asp の生合成にほとんど寄与していないことが示された。

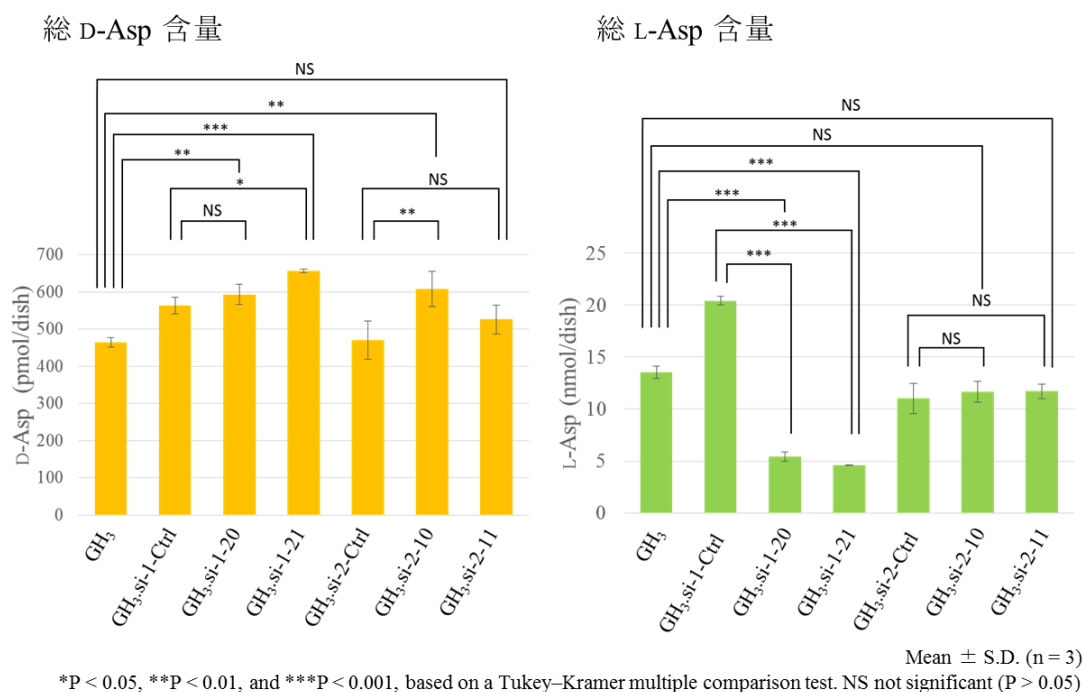


図3 GOT1L1 ノックダウンの D,L-Asp 含量への影響

si-1 と si-2 の異なる si (small interference) RNA によりノックダウンした4種の細胞株 (si-1-20, si-1-21 と si-2-10, si-2-11) を用いて細胞内と培養上清中の D,L-Asp 量を測定した。対照として si-1 と si-2 の配列をランダム化した si-1-ctrl と si-2-ctrl を用いた。

3. ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索

哺乳類細胞における D-Asp の主要な合成酵素の同定を念頭に置き、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質の探索を行った。その準備として、ヒト由来培養細胞株である HEK293 細胞に、C 末端に存在するペルオキシソーム局在化シグナルを除去したヒト組換え DDO を高発現させた細胞株を作製した。この細胞株に比較的高濃度の D-Asp を添加すると、細胞質に高発現させた DDO による D-Asp の分解により過酸化水素が生成して細胞は死滅する。そこで、この細胞株にヒト脳由来の cDNA ライブラリーを導入し、比較的高濃度の D-Asp 存在下でも生存できる細胞を選別した。すなわち、D,L-Asp の相互変換を触媒する Asp ラセマーゼといった、D-Asp の細胞内濃度の調節に関与するタンパク質が高発現している可能性が高いクローンを選別した。得られたクローンから全 RNA を調製し、RT-PCR に引き続くシーケンシングにより、導入した cDNA ライブラリー由来の配列を決定した (図4)。

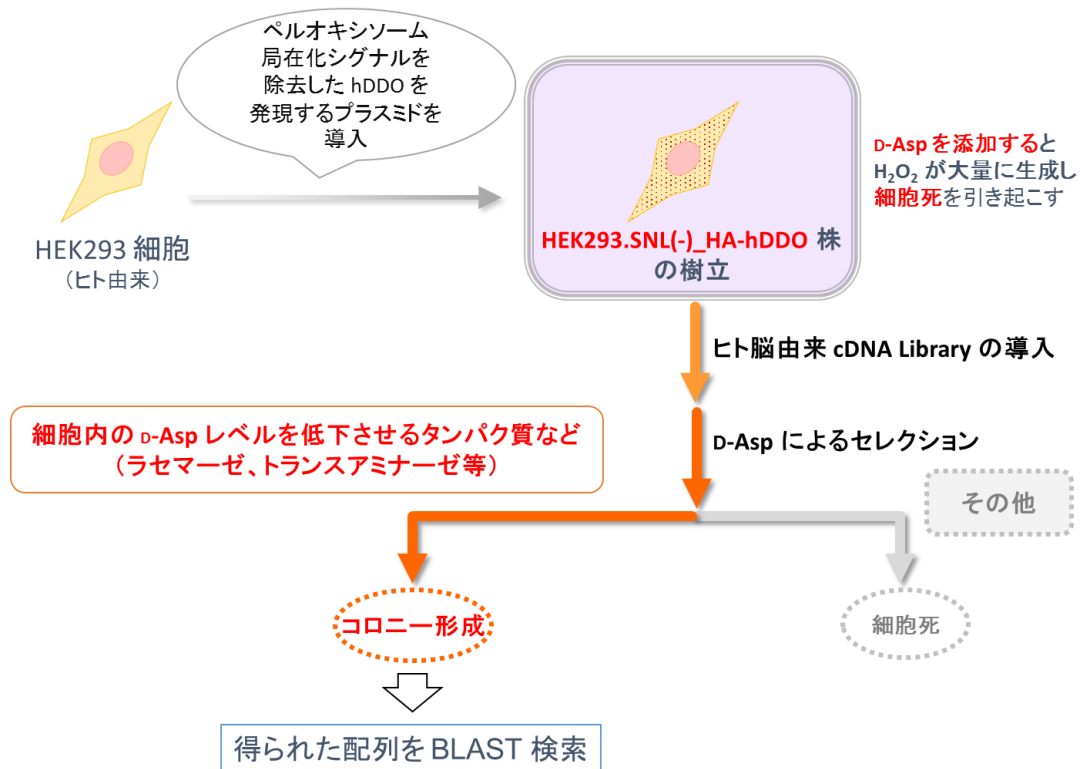


図4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質探索のフローチャート

決定した配列を問い合わせ配列とした BLAST 検索を行い、51種のヒットタンパク質を得た(表1)。これらの中で、既知の Asp ラセマーゼや Ser ラセマーゼと高いアミノ酸配列相同性を示すタンパク質はなかった。

表1 得られたヒットタンパク質

ヒットタンパク質
[ATP6V0A1], [CABP1], [CAMK2B], [CFL1], [CHCHD2], [CMTR1], [COX1], [COX2], [COX3], [COX6B1], [CST3], [DMTN], [ENO2], [FURIN], [GNB1], [GRHPR], [GSTP1], [KIF3A], [MAPK8IP3], [MRPL37], [MT-ATP6], [MT-ND2], [MTFMT], [MYL12B], [NACC2], [NCAM1], [NCAN], [NDUFB7], [NFASC], [P4HB], [PEX3], [PDK2], [PFN1], [PTGDS], [PUM1], [RAPGEFL1], [RPL23A], [RPL23AP7], [RPL27], [RPL34], [RPS13], [SH3KBP1], [SLC46A1], [SNCB], [SNCG], [SQSTM1], [SYCP3], [TMED10], [TTC3], [ZNF664], [ZUFSP]

そこで、1次配列は異なるが立体構造・機能が類似しているタンパク質がヒットしている可能性を想定し、ヒットタンパク質と既知の Asp および Ser ラセマーゼとの立体構造比較を行った。タンパク質の立体構造は、Protein Data Bank (PDB) に登録されているもの、また、PDB に登録されていないものについては SWISS-MODEL を用いたホモロジーモデリングにより構築した推測立体構造を使用した。Dali Server を用いて立体構造比較を行ったところ、既知の Asp または Ser ラセマーゼと構造が統計的に類似していると判断されたタンパク質が6つ (Cap methyltransferase 1 [CMTR1], Furin (paired basic amino acid cleaving enzyme) [FURIN], Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase [GRHPR], Mitochondrial methionyl tRNA folmyltransferase [MTFMT], Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide [P4HB], Tetratricopeptide repeat domain 3 [TTC3]) 得られた。このうち GRHPR 以外のタンパク質は、目視での立体構造比較や既知の機能からアミノ酸代謝に関与している可能性が低いと考え、GRHPR についてのみ以降の実験を行った。

D-Asp の代謝における GRHPR の機能を解析するために、HeLa 細胞から全 RNA を調製し、RT-PCR によりヒト GRHPR cDNA を増幅した。増幅した DNA を大腸菌発現用プラスミド pRSET-B にクローニングし、N 末に His タグが付加された GRHPR を発現するプラスミドを構築した。構築したプラスミドで形質転換した大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS 株を培養し、ヒト組換え GRHPR を精製した。

また、細胞内 D-Asp 含量の調節における GRHPR の役割を解析するために、上述のヒト組換え GRHPR 発現プラスミドを鋳型にした PCR により、N 末に HA タグが付加された GRHPR 配列を増幅した。増幅した DNA を哺乳類培養細胞発現用ベクターである pIRESneo3 にクローニングし、N 末に HA タグが付加された GRHPR を発現するプラスミドを構築した。スクリーニングに用いた HEK293 細胞では D-Asp 生合成に関する報告が無いため、ヒト由来培養細胞株のうち D-Asp 生合成を行っていることが明らかにされている HeLa 細胞を以降の実験に使用した。構築したプラスミドを HeLa 細胞に導入し、G418 による薬剤選択後のクローニングにより、GRHPR を安定的に高発現する細胞株を作製した。また、コントロールとして、親ベクター (pIRESneo3) を導入した細胞株も同様に作製した。これらの細胞株における D,L-Asp 含量を HPLC で測定したところ、コントロールと比較して、GRHPR 高発現細胞株では、D-Asp および L-Asp とともに、細胞内含量と培地上清中含量を和した総量が有意に減少していた (図 5)。このことから、GRHPR は細胞内 D-Asp を減少させる機能を有することが示唆された。

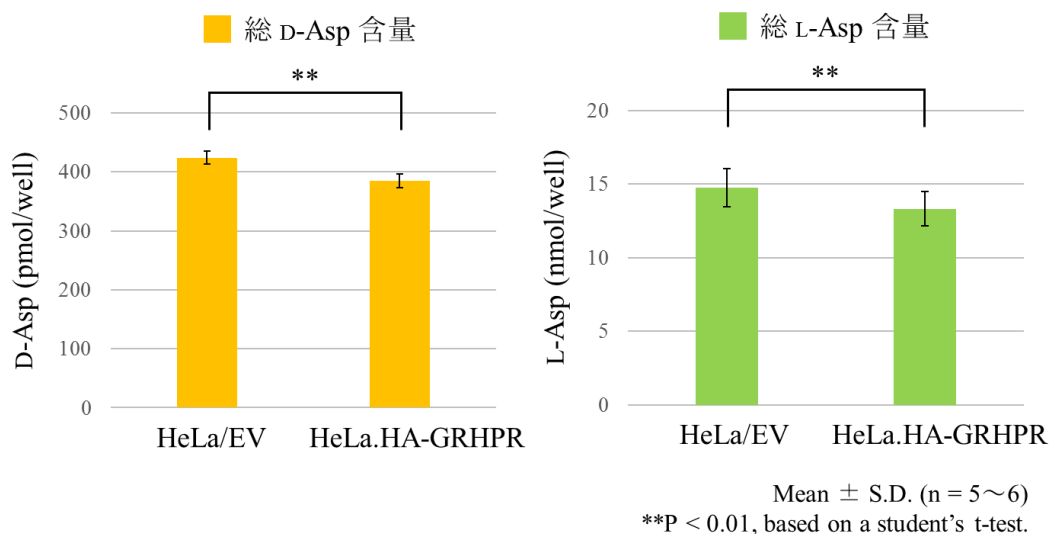


図5 GRHPR 高発現 HeLa 細胞培養時の D,L-Asp 含量

より詳細な解析を行うために、精製したヒト組換え GRHPR の活性を以下に述べる条件で解析した。D-Asp または L-Asp を基質として、37°C で 15 時間反応を行い HPLC で D,L-Asp の残存量を測定したところ、酵素の代わりに透析バッファーを加えたコントロールと比較して、サンプルにおいて D-Asp の残存量が有意に減少した (図 6)。L-Asp では残存量に有意な違いは見られなかった。これらの結果から、GRHPR は D-Asp を立体特異的に分解する活性を持つことが明らかになった。

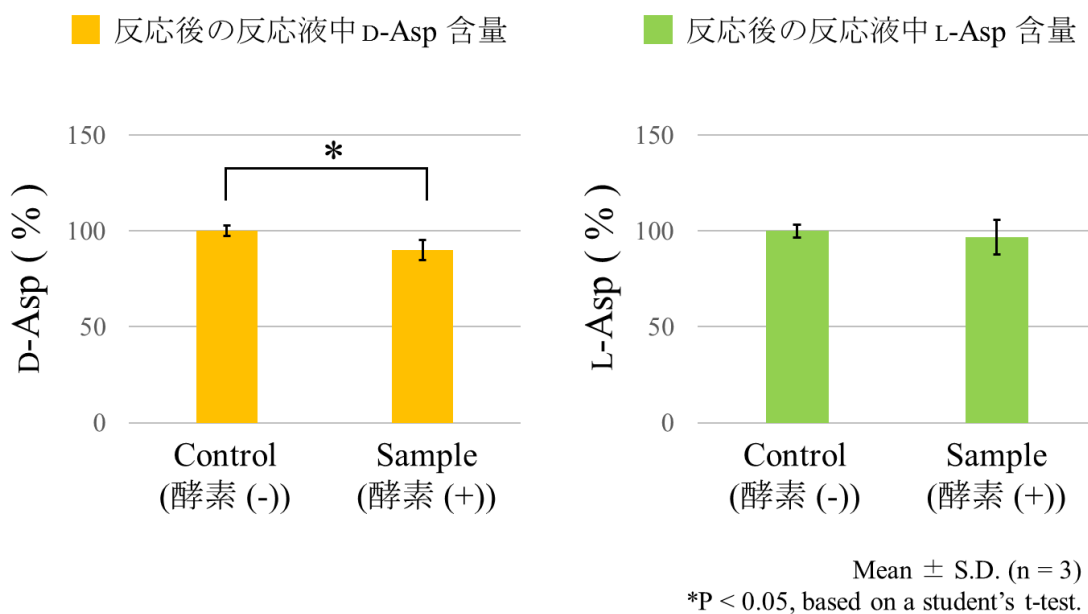


図6 組換え GRHPR タンパク質の D,L-Asp に対する活性

4. 結論

ラットおよびヒト細胞では、D-Asp の生合成に GOT1L1 はほとんど寄与していないことが明らかになった。また、ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを材料としたスクリーニングにより、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する候補タンパク質として GRHPR を選別した。GRHPR は少なくとも D-Asp 分解機活性を持つことが示唆された。本研究は、未だ不明な点が多い哺乳類における D-Asp の合成経路の解明のみならず、生体内における D-Asp の生理機能および D-Asp が関与する疾患の研究分野の進展に貢献すると思われる。

第1章 背景と目的

1-1 背景と目的

アミノ酸にはL体とD体の2種類の鏡像異性体が存在する (Fig. 1-1)。従来、生体内に存在するアミノ酸はL体のみであると考えられてきた。しかし、分析技術の進展に伴い、哺乳類を含む生物体内にも、遊離型D-アミノ酸が比較的高濃度で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では、特に、D-セリン (D-Ser) およびD-アスパラギン酸 (D-Asp) が注目され、精力的に研究が行われている。

D-Ser は、哺乳類の前脳に胎児期から出生後の生涯に亘って恒常的に高濃度で存在することが知られている¹⁾。D-Ser の分布は、グルタミン酸 (Glu) 受容体のサブタイプの1つであるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (NMDAR) の局在と相関している^{1, 2)}。また、D-Ser はNMDAR のグリシン結合部位にコアゴニストとして結合し (Fig. 1-2)、神経伝達を調節することが知られている^{3, 4, 5)}。Ser ラセマーゼ (SerR) は、ピリドキサルリン酸 (pyridoxal phosphate, PLP) 依存的にD,L-Ser の相互変換を触媒するD-Ser の生合成酵素である⁶⁾。SerR は Wolosker らによって、哺乳類では初めてラットの脳から同定・精製された⁶⁾。それ以降、哺乳類 SerR ラセマーゼの cDNA がマウス⁷⁾、ヒト⁸⁾、ラット⁹⁾ でクローニングされ、これらの組換え酵素が精製されて機能解析が行われている^{10, 11, 12)}。

一方 D-Asp は、D-Ser が組織特異的に発現していることとは対照的に、様々な哺乳類の組織および細胞に存在しており、特に神経系、神経内分泌系および内分泌系組織に高濃度で存在している。これまでの様々な研究結果により、D-Asp が発生と分化、ホルモン分泌およびステロイド生合成の調節において重要な役割を担っていることが示唆されている^{13, 14, 15)} (Table 1-1)。また、D-Asp はNMDAR の Glu 結合部位に結合し (Fig. 1-2)、アゴニストとして働くことでNMDAR を刺激することも知られている^{16, 17)}。最近の研究では、D-Asp が神経系および神経内分泌系組織においてシグナル伝達分子として働くことが示唆されており、NMDAR への結合を介して、脳機能の調節に重要な役割を担っていると考えられている^{14, 15, 18)}。

D-Asp と疾患との関連もいくつか報告されている。精子無力症患者および無精子症の患者では、ヒト精漿および精子におけるD-Asp 含量が、健常人よりも顕著に低い¹⁹⁾。加えて、体外受精を受けている女性患者の排卵前の卵胞液のD-Asp 含量は、若い患者よりも年上の患者で低い²⁰⁾。また、このD-Asp 含量の減少は、卵母細胞の質と受精能力の減少に相関することが示唆されている。これらの知見は、D-Asp が不妊の病態生理に関与している可能性を示唆している。

また、最近、統合失調症患者の死後脳の前頭前野および線条体のD-Asp レベルが、非精神病患者よりも有意に低いことが報告された。このことは、D-Asp がNMDAR の機能不全による統合失調症の発症に関連している可能性を示唆している²¹⁾。

D-Asp の細胞内濃度調節機構を Fig. 1-3 に示した。D-Asp の細胞内への取り込みはL-Glu

トランスポーター (L-Glu、L-Asp および D-Asp に同程度の親和性を示し、これらのアミノ酸の取り込みに関与するが、D-Glu は取り込まない) を介して行われることが知られている²²⁾。一方、D-Asp の細胞外への放出に関しては、前述の L-Glu トランスポーターを介した逆輸送^{23, 24)}、容積感受性有機アニオンチャネル (VSOC) を介した放出²⁵⁾ およびエキソサイトシス²⁶⁾ による分泌の可能性が示唆されているが、詳細は不明である。また、D-Asp の分解酵素として、D-Asp オキシダーゼ (DDO) が知られている。DDO は Fig. 1-4 に示したように、酸素と水の存在下、酸性 D-アミノ酸を分解する反応を触媒し、D-アミノ酸に対応する 2-オキソ酸、アンモニアおよび過酸化水素を生成する。哺乳類において、DDO は D-Asp の濃度調節を行っていると考えられている^{27, 28)}。一方、哺乳類における D-Asp の生合成は、初めにラット PC-12 細胞で確認され²⁹⁾、それ以降、ラット GH₃ 細胞³⁰⁾、ラット胚性ニューロン初代培養細胞³¹⁾、ラット MPT1 細胞³²⁾ で報告されている。ラット胚性ニューロン初代培養細胞を用いた解析では、細胞に [¹⁴C]-L-Asp を与えると [¹⁴C]-D-Asp が生成される³¹⁾。また、 [¹⁴C]-D-Asp の生合成は強力な PLP 阻害剤であるアミノオキシ酢酸の添加により顕著に阻害される。これらの知見から、哺乳類では PLP 依存的に L-Asp から D-Asp へと変換する Asp ラセマーゼ (AspR) (Fig. 1-5) が D-Asp の生合成を担っていると考えられている。アカガイ (*Scapharca broughtonii*) では、真核生物からは初めての報告となる PLP 依存的に L-Asp から D-Asp への変換を触媒する AspR が同定されており^{33, 34)}、このことは、哺乳類での予想を支持している。興味深いことに、アカガイ AspR と哺乳類 (ヒト、マウスおよびラット) SerR は、共通のモチーフ配列 (Pfam ID: PF00291, Pyridoxal-phosphate dependent enzyme) が保存されており (Table 1-2)、配列類似性も 38~40% と高かった (Table 1-3)。このことから、哺乳類の D-Asp 生合成を担う酵素も、哺乳類 SerR およびアカガイ AspR と配列類似性が高いと予測されていた。

一方、2010 年に Kim らによって、機能未知のタンパク質であったマウス glutamate-oxaloacetate transaminase 1-like-1 (GOT1L1) が、PLP 依存的に Asp ラセマーゼ活性を示すと報告された³⁵⁾。マウス GOT1L1 は約 45.5 kDa のタンパク質で、大腸菌で発現させ精製した組換えタンパク質は L-Asp を基質、PLP を補酵素として酵素反応を行うと D-Asp を主反応生成物 (D-Asp: 約 73.3%、L-Glu: 約 16.7%、D-Glu: 約 10.0%) として生じる Asp ラセマーゼであると報告された。しかしながら、このマウス GOT1L1 は、哺乳類の SerR および他の真核生物型 AspR (アカガイおよびアメフラシ (*Aplysia californica*) AspR³⁶⁾) に共通して保存されているモチーフ配列 (Pfam ID: PF00291, Pyridoxal-phosphate dependent enzyme) が見出されず (Table 1-2)、配列類似性も 6% 以下と低かった (Table 1-4)。むしろ、細胞質型グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT1) と共通のモチーフ配列 (Pfam ID: PF00155, Aminotransferase class I and II) が存在し、配列類似性も 37~41% と高かった (Table 1-4)。

ラットおよびヒトには、マウス GOT1L1 のホモログが存在している。しかし、ラット GOT1L1 では C 末端のアミノ酸配列が約 90 残基欠失しており、これら 3 種のタンパク質間

ではアミノ酸残基数の保存性が比較的低い (Fig. 1-5)。また、ラットおよびヒト GOT1L1 のアミノ酸配列もマウス GOT1L1 と同様に、既知の真核生物型 AspR および哺乳類 SerR ではなく GOT1 に類似していた (Table 1-2 および Table 1-4)。これらの理由から、ラットおよびヒトにおいて GOT1L1 が主要な D-Asp 合成酵素であることには疑問の余地があると考えられた。

本研究では、哺乳類細胞における D-Asp の合成経路の解明を目的として、まず初めに、種々の哺乳類培養細胞株を用いて、GOT1L1 が実際に D-Asp の生合成に関与しているか否かを解析した。次に、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質のスクリーニングと、それによって選別した候補タンパク質の機能解析を行った。

1-2 図表

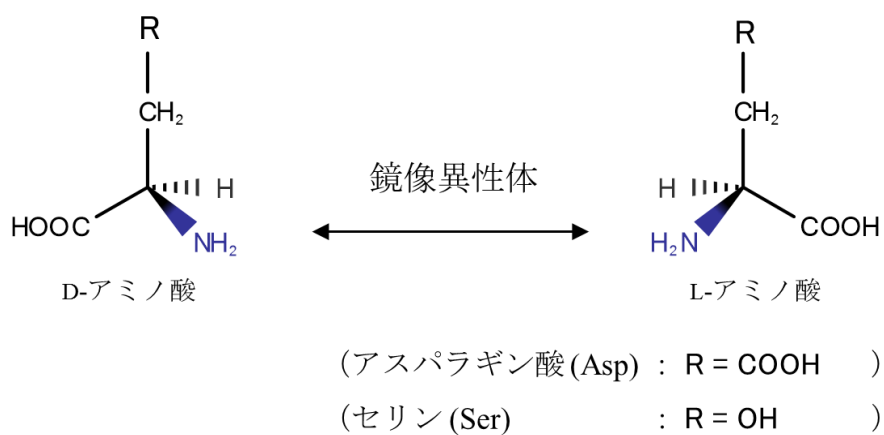


Fig. 1-1. D-アミノ酸と L-アミノ酸の関係

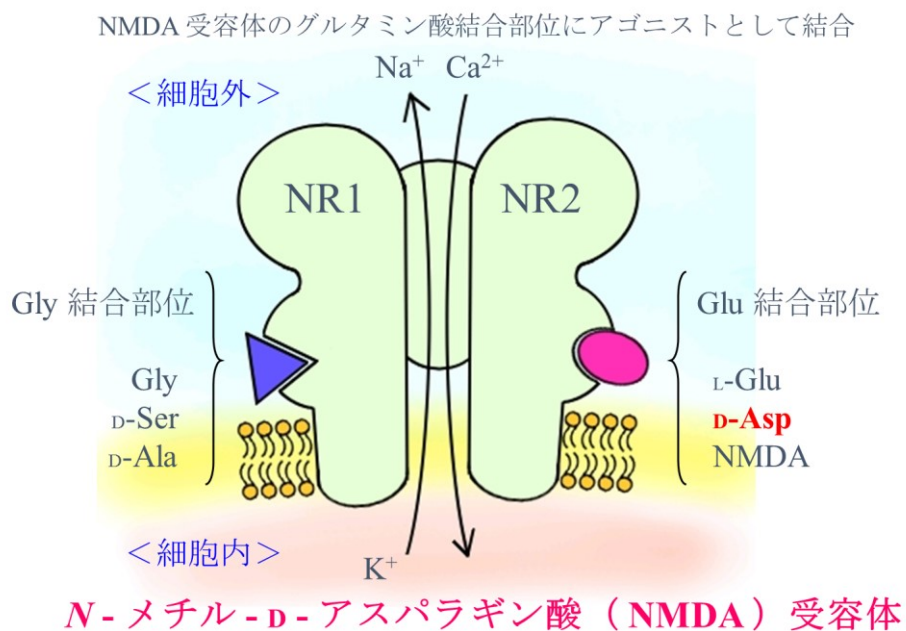


Fig. 1-2. N-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (NMDAR) に結合する D-アミノ酸

D-Asp は NMDAR の Glu 結合部位にアゴニストとして結合する。また、遊離型 D-Ser は NMDAR のグリシン結合部位にコアゴニストとして結合する。

Table 1-1. 哺乳類において報告されている遊離型 D-Asp の機能

組織分布	生理学的役割
脳	発生と分化への関与
松果体	メラトニン合成・分泌の抑制
下垂体前葉	プロラクチン合成・分泌の促進
下垂体中葉	α -MSH レベルの抑制
下垂体後葉	オキシトシン、バソプレシン産生の調節
精巣	テストステロン合成の促進

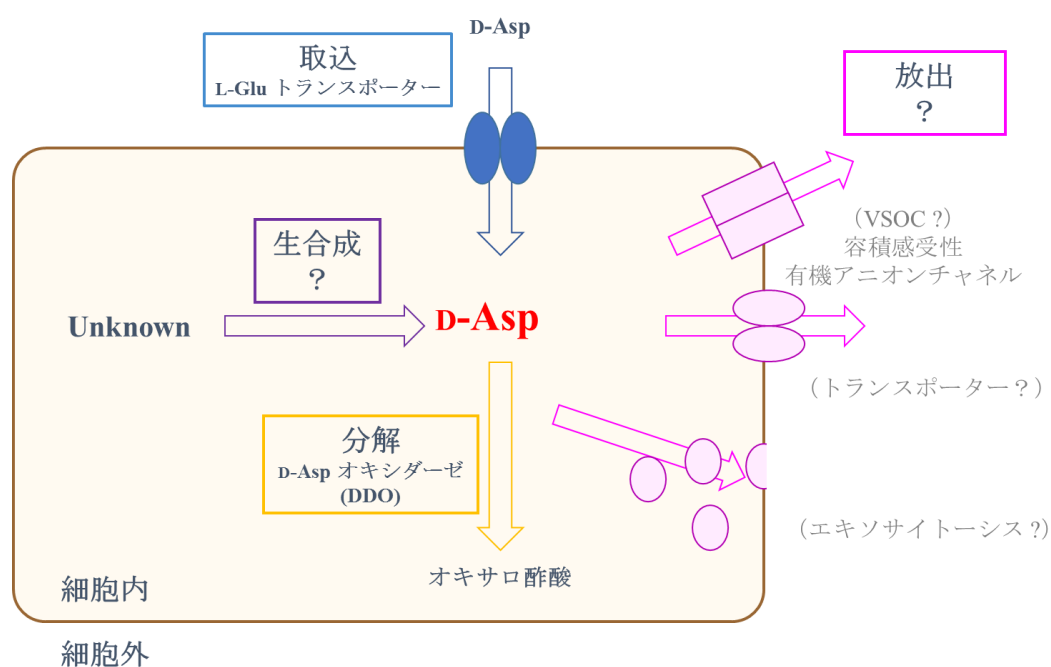


Fig. 1-3. 哺乳類における D-Asp の細胞内濃度調節機構

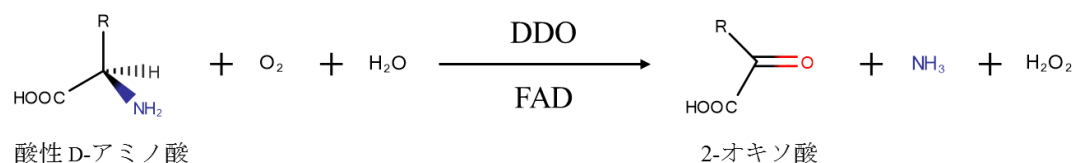


Fig. 1-4. D-Asp オキシダーゼ (DDO) の反応式

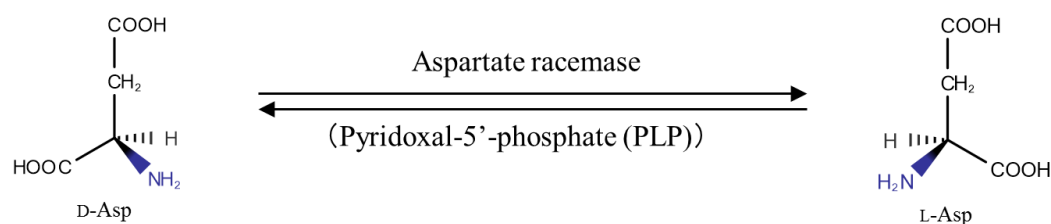


Fig. 1-5. Asp ラセマーゼ (AspR) の反応式

Table 1-2. 真核生物型 AspR、哺乳類 SerR、哺乳類 GOT1L1 および哺乳類 GOT1 に保存されているモチーフ配列一覧

生物種	酵素名	Pfam ID	Pfam ID Description
アカガイ	AspR	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
アメフラシ	AspR	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
ヒト	SerR	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
マウス	SerR	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
ラット	SerR	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
ヒト	GOT1L1	PF00155	Aminotransferase class I and II
マウス	GOT1L1	PF00155	Aminotransferase class I and II
ラット	GOT1L1	PF00155	Aminotransferase class I and II
ヒト	GOT1	PF00155	Aminotransferase class I and II
マウス	GOT1	PF00155	Aminotransferase class I and II
ラット	GOT1	PF00155	Aminotransferase class I and II

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、各タンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 1-3. 真核生物型 AspR と哺乳類 SerR の配列類似性

	アカガイ AspR との 配列類似性	アメフラシ AspR との 配列類似性
ヒト SerR	38%	41%
マウス SerR	39%	41%
ラット SerR	40%	40%

Table 1-4. 哺乳類 GOT1L1 と各酵素（真核生物型 AspR、哺乳類 SerR および哺乳類 GOT1）との配列類似性

	マウス GOT1L1 との 配列類似性	ヒト GOT1L1 との 配列類似性	ラット GOT1L1 との 配列類似性
アカガイ AspR	5%	4%	5%
アメフラシ AspR	6%	2%	1%
ヒト SerR	3%	5%	6%
マウス SerR	5%	5%	2%
ラット SerR	5%	5%	2%
ヒト GOT1	41%	39%	41%
マウス GOT1	38%	37%	36%
ラット GOT1	37%	37%	37%

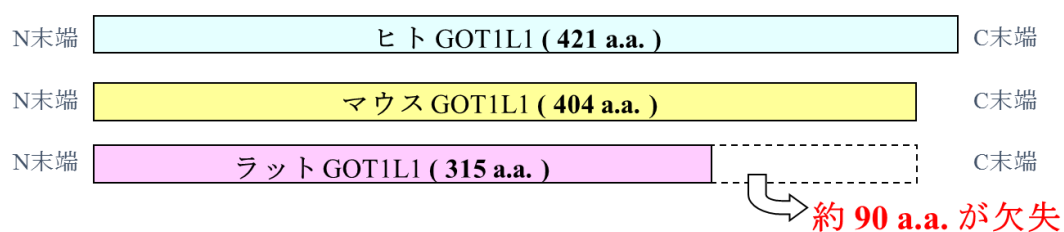


Fig. 1-6. ヒト、ラットおよびマウス GOT1L1 ホモログ

第2章 ラット GOT1L1 およびヒト GOT1L1 の D-Asp 生合成への関与

2-1 序論

前章で述べたように、ラットおよびヒト GOT1L1 が実際に D-Asp の生合成を担う酵素であることについて疑念の余地があると考えられたため、これらの酵素が実際に哺乳類培養細胞内で D-Asp 生合成を担っているかどうかを解析した。

当研究室では以前に、ラットおよびヒト GOT1L1 組換えタンパク質の大腸菌からの調製を試みていたが、種々の条件を検討しても可溶性の組換え GOT1L1 を得ることはできなかった。そこで、本研究では以下の2つの戦略をとった。はじめに種々のラットおよびヒト由来培養細胞株における細胞内 D-Asp 含量と、各細胞における *Got1l1*/*GOT1L1* の mRNA 発現レベルの間に相関が見られるか否かを解析した。また、以前に当研究室で D-Asp を生合成することを明らかにしているラット下垂体由来培養細胞株 (GH₃)³⁰、および上記の実験で細胞内 D-Asp 含量が高かったヒト子宮頸がん由来培養細胞株 (HeLa)を用いて、時間依存的な D-Asp 含量の変化を解析した。次に、D-Asp 生合成能を持つ GH₃ 細胞において、RNA 干渉法によりラット *Got1l1* 遺伝子の発現をノックダウンした細胞株を作製し、ノックダウンによる影響を細胞中及び培養上清中の D-Asp 含量を定量することで解析した。

2-2 材料と方法

2-2-1 試薬および機器

D-Asp, L-Asp, ampicillin, puromycin dihydrochloride from *Streptomyces alboniger*, catalase from *Aspergillus niger*, sodium pyrophosphate (Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA))

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI-1640 medium, G418 disulfate, penicillin, streptomycin, protease inhibitor cocktail, DEPC water, Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque (Kyoto, Japan))

Fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS) (Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA))

N-Acetyl-L-cysteine (NAC), o-phthalaldehyde (OPA), flavin adenine dinucleotide, 100% methanol (for HPLC), boric acid, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), imidazole, glycerol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2-mercaptoethanol, sodium acetate (Wako Pure Chemical Industries, (Osaka, Japan))

Boc-L-cysteine (Novabiochem (Läufelingen, Switzerland))

100 mm tissue culture dish, collagen type I-coated 100 mm tissue culture dish, 60 mm tissue culture dish, collagen type I-coated 60 mm tissue culture dish, 6 well tissue culture plate, collagen type I-coated 6 well tissue culture plate (Iwaki/Asahi Glass (Tokyo, Japan))

Mammalian Transfection Kit (Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA))

Luria-Bertani (LB) medium (Merck (Darmstadt, Germany))

BugBuster Protein Extraction Reagent, Lysonase Bioprocessing Reagent (Novagen)

0.45 μ m Millex-LH filter (Milipore (Bedford, MA, USA))

Dialysis membrane (Viskase (Darien, IL, USA))

HisGraviTrap Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare UK, (Little Chalfont, UK))

0.45 μ m membrane filter (Sartorius (Göttingen, Germany))

TSK-gel ODS-100Z (Tosoh Bioscience LLC (Tokyo, Japan))

JASCO 2089 Plus pump, FP 2025 Plus, JASCO 807-IT インテグレーター (JASCO (Tokyo, Japan))

Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μ m) (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i.d.), Mightysil RP-18 GP 5-4.6 (5 μ m) (5 μ m, 5 mm \times 4.6 mm i.d.), 100% acetonitrile (for HPLC) (Kanto Chemical (Tokyo, Japan))

RNeasy Mini Kit, RNase-Free DNase Set, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, DEPC water (QIAGEN (Hilden, Germany))

SuperScript III RT, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, dNTPs (10 mM each) (Invitrogen (Carlsbad, CA, USA))

Sso Fast EvaGreen Supermix, Hard-Shell PCR Plates 96-well CLR, CFX96, CFX manager (BIO-RAD (Hercules, CA, USA))

pBasi-mU6 Neo, Ligation kit ver2.1, BamH I, Hind III (Takara Bio (Shiga, Japan))

2-2-2 細胞培養

ラット褐色細胞腫細胞株 (PC-12) は、終濃度 5% FBS および 10%HS を添加した DMEM 培地で培養した。ラット下垂体由来培養細胞株 (GH₃)、ラット腎由来培養細胞株 (NRK-52E)、ヒト子宮頸がん由来培養細胞株 (HeLa)、ヒト肝がん由来培養細胞株 (Hep G2)、ヒト類上皮がん由来培養細胞株 (A431)、およびヒト神経外胚葉性腫瘍由来培養細胞株 (TASK1) は、終濃度 10%の FBS を添加した DMEM 培地で培養した。ヒト精巣胚細胞性がん由来培養細胞株 (NEC8)、およびヒト膀胱がん由来培養細胞株 (ECV-304) は、終濃度 10%の FBS を添加した RPMI-1640 培地で培養した。すべての培地には、終濃度 100 units/mL ペニシリンと終濃度 100 µg/mL のストレプトマイシンを添加した。なお、PC-12 の培養には、タイプ I コラーゲンコートされたディッシュ／プレートを用い、それ以外の細胞には通常のディッシュ／プレートを用いた。すべての培養細胞は、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。

2-2-3 細胞培養時の D,L-Asp の HPLC による定量

2-2-3-1 各種ヒトおよびラット由来培養細胞株における細胞内 D,L-Asp 含量の定量

6 well plate に 1×10^6 cells/well の細胞を播種し、2 mL の培地で培養した。翌日 (Day 0)、新鮮な 1.2 mL の培地で培地交換を行い、さらに一晩培養した。翌日 (Day1) 培地を除き、500 µL の氷冷 PBS(-) で細胞表面を 2 度洗浄後、400 µL の氷冷 PBS(-) をウェルに加えてスクレイパーで細胞をかき集めて 1.5 mL チューブに回収した。細胞を回収したウェルにさらに 200 µL の氷冷 PBS(-) を加えて洗浄し、先ほど細胞を回収した時と同一のチューブに回収した。遠心 (4℃、300×g、5 分間) 後上清を除き、細胞ペレットに 600 µL の 100%メタノールを添加し、ボルテックスをかけて細胞を懸濁させた。続いて、超音波洗浄槽で 10 分間超音波処理を行い、-80℃に 1 時間以上静置した (アミノ酸のメタノール抽出、およびサンプルの除タンパク)。メタノール抽出後遠心 (4℃、10,000×g、10 分間) し、上清 500 µL を新しい 1.5 mL チューブに移し、遠心エバポレーターを用いて減圧乾固させた。減圧乾固させたサンプルの残渣を 50 µL の 200 mM ホウ酸バッファー (pH10.2) に再度溶解し、0.45 µm フィルターでフィルトレーションし、HPLC 用サンプルとした。30 µL の 200 mM ホウ酸バッファー (pH10.2)、10 µL の調製した HPLC 用サンプル、20 µL の OPA/NAC³⁷⁾ 試薬を混合し、室温で 2 min 間反応させ蛍光誘導体化し、10 µL を HPLC にインジェクションし、Asp 含量を定量した。なお、HPLC 分析の際の標準物質として、各 150 pmol の D,L-Asp を用いた。また、グラジエントポンプは JASCO PU2089、蛍光検出器は JASCO FP-2025、インテグレーターは JASCO 807-IT、カラムは TSK gel ODS-100Z (5 µm、250 mm×4.6 mm i.d.) を用いた。移動相は 15 mM リン酸溶液 (pH 6.0) および 100 %メタノールを用い、メタノールの濃度が 0–10 min : 7%、10–20 min : 7-17% というグラジエント条件により 1 mL/min の流速で流した。検出は 350 nm の励起波長および 445 nm の蛍光波長で行った。標準物質で得られたピークの面積から、サンプルで得られたピーク面積に相当するアミノ酸量を比例計算により求

め、その値から 1 well の細胞に含まれるアミノ酸量を計算した。

以上の条件下で、検出されたピークが D-Asp であることを確かめるために、DDO で処理したサンプルと未処理のサンプルの 2 種類を調製した。DDO は、後述した方法で調製したヒト組換え DDO を用いた。200 mM ホウ酸バッファー (pH 10.2) で再溶解した適当量の HPLC 用サンプルを、40 mM ピロリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.3)、8.3 μg ヒト組換え DDO および 5 μg カタラーゼを含む酵素反応液に加えて全量を 150 μL にし、37°C で一晩の酵素反応を行った。翌日、反応液に 600 μL の 100% メタノールを添加し、ボルテックスをかけ、-80°C に 1 時間以上静置した。遠心 (10,000 \times g、4°C、10 分間) により除タンパクし、500 μL の上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。遠心エバポレーターを用いてサンプルの減圧乾固を行った。減圧乾固したサンプルを 50 μL の 200 mM ホウ酸バッファー (pH10.2) で再溶解し、これを DDO 処理のサンプルとした。また、ヒト組換え DDO の代わりに滅菌水を用いて同様の操作を行ったものを DDO 未処理のサンプルとした。これらのサンプルに含まれるアミノ酸の蛍光誘導体化と HPLC による解析は、上述したのと同様の方法で行った。

2-2-3-2 GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析

前述の定量方法では、感度が悪く、特に培地中の D,L-Asp の定量が難しいことから、以降の実験では HPLC による定量方法を変更した。

サンプル回収最終日 (Day 2) に 100% コンフルエントにするため、6 well plate に GH₃ 細胞は 1×10^6 cells/well を播種し、HeLa 細胞は 2×10^5 cells/well を播種し、2 mL の培地で培養した。翌日 (Day 0)、新鮮な 1.2 mL の培地で培地交換を行い、Day 0 におけるサンプルは培地交換直後に細胞および培地サンプルを回収し、Day 1 および Day 2 におけるサンプルはサンプル回収時 (それぞれ翌日、翌々日) まで 37°C で培養し、細胞および培地サンプルを回収した。

培養を終了した細胞の培地全量 (1,200 μL) を 2 mL チューブに回収し、そのうち 120 μL を新しい 1.5 mL チューブに移し、4 倍量の 100% メタノール 480 μL を加えてボルテックスにかけ、1 時間以上 -80°C に静置した (アミノ酸のメタノール抽出、およびサンプルの除タンパク)。一方、6 well plate に付着している細胞は、500 μL の氷冷 PBS(-) で細胞表面を 2 度洗浄後、400 μL の氷冷 PBS(-) をウェルに加えてスクレイパーで細胞をかき集めて 1.5 mL チューブに回収した。細胞を回収した well にさらに 200 μL の氷冷 PBS(-) を加えて洗浄し、先ほど細胞を回収した時と同一のチューブに回収した。遠心 (4°C、300 \times g、5 分間) 後、上清を除き、細胞ペレットに 600 μL の 100% メタノールを添加し、ボルテックスをかけて細胞を懸濁した。続いて、超音波洗浄槽で 10 分間超音波処理を行い、-80°C に 1 時間以上静置した (アミノ酸のメタノール抽出、およびサンプルの除タンパク)。メタノール抽出以降は培地および細胞サンプルともに同一の操作を行った。すなわち、メタノール抽出後、遠心 (4°C、10,000 \times g、10 分間) し、上清 500 μL を新しい 1.5 mL チューブに移し、遠心エバポレータ

ーを用いて減圧乾固させた。減圧乾固させたサンプルの残渣を 50 μ L の 400 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0) に再度溶解し、0.45 μ m フィルターでフィルトレーションし、HPLC 用サンプルとした。冒頭に記載した理由のため、サンプルの蛍光誘導体化試薬を OPA/NAC から OPA/Boc-L-Cys³⁸⁾ に変更した。400 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0)、調製した HPLC 用サンプル、20 μ L の OPA/Boc-L-Cys³⁸⁾ 試薬を混合し (計 60 μ L、検量線に乗るようにサンプルごとにサンプルとバッファーの混合割合を変更した)、室温で 2 min 間反応させて蛍光誘導体化し、適当量を HPLC にインジェクションし、Asp 含量を定量した。なお、HPLC 分析の際の標準物質として、各 50 pmol の D,L-Asp を用いた。また、グラジエントポンプは JASCO PU2089、蛍光検出器は JASCO FP-2025、インテグレーターは JASCO 807-IT、カラムは Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μ m) (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i.d.) を用いた。移動相は 200 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 6.2) および 100 %アセトニトリルを用いた (この移動相条件においては、HeLa 細胞の細胞サンプルでは D-Asp のピークに夾雑ピークが重なるため、酢酸ナトリウム溶液の pH を 5.8 に変更して使用した)。アセトニトリルの濃度が 0–20 min : 10-16% というグラジエント条件により 1 mL/min の流速で移動相を流し、検出は 344 nm の励起波長および 443 nm の蛍光波長で行った。標準物質で得られたピークの面積から、サンプルで得られたピーク面積に相当するアミノ酸量を比例計算により求め、その値から 1 well の細胞および培地に含まれるアミノ酸量を計算した。

以上の条件下で、検出されたピークが D-Asp であることを確かめるために、DDO で処理したサンプルと未処理のサンプルの 2 種類を調製した。DDO は、後述した方法で調製したヒト組換え DDO を用いた。400 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0) で 3 倍または 6 倍濃縮 (それぞれ細胞サンプル、培地サンプル) になるように再溶解した 15 μ L の HPLC 用サンプルを、40 mM ピロリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.3)、10 μ g ヒト組換え DDO および 5 μ g カタラーゼを含む酵素反応液に加えて全量を 150 μ L にし、37°C で 2 時間の酵素反応を行った。反応終了後、反応液に 600 μ L の 100%メタノールを添加し、ボルテックスをかけ、-80°C に 1 時間以上静置した。遠心 (10,000 \times g, 4°C, 10 分間) により除タンパクし、500 μ L の上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。遠心エバポレーターを用いてサンプルの減圧乾固を行った。減圧乾固したサンプルを 30 μ L の 400 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0) で再溶解し、これを DDO 処理のサンプルとした。また、ヒト組換え DDO の代わりに酵素精製時の透析バッファーを用いて同様の操作を行ったものを DDO 未処理のサンプルとした。これらのサンプルに含まれるアミノ酸の蛍光誘導体化と HPLC による解析は、上述したのと同様の方法で行った。

2-2-3-3 GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株における細胞・培地中のアミノ酸含量の HPLC による定量

6 well plate に 1×10^6 cells/well の細胞を播種し、2 mL の培地で培養した。翌日 (Day 0)、新鮮な 1.2 mL の培地で培地交換を行い、さらに一晚培養した。翌日 (Day1)、細胞および培

地を別々に回収した。細胞および培地の HPLC 定量用サンプルの調製および HPLC による解析は、前述の GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析と同様に行った。

2-2-4 ヒト組換え DDO の調製

ヒト組換え DDO の調製には、以前に当研究室で作製した N 末に His タグが付加されたヒト DDO を発現するプラスミドにより形質転換した大腸菌 BL21(DE3)pLysS である BL21/pRSET-His-hDDO を用いた³⁹⁾。前培養として、終濃度 100 µg/mL のアンピシリンを含む 2 mL の LB 培地にフレッシュなコロニーを植菌し、37°C で一晩培養した。翌日、900 µL の前培養液を終濃度 100 µg/mL のアンピシリンを含む 500 mL の LB 培地に添加し、*A*₆₂₀ が 0.8 になるまで 37°C で培養した。その後 26°C で 30 分間培養し、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を添加してから 26°C で一晩培養し、発現誘導した。翌日、遠心 (4°C、10,000×g、10 分間) により菌体を回収し、破菌バッファー (BugBuster Protein Extraction Reagent、50 µM FAD、2× protease inhibitor cocktail、および Lysonase Bioprocessing Reagent) を加えて懸濁し、室温で 30 分間穏やかに振盪することにより破菌した。破菌後、遠心 (4°C、12,000×g、20 分間) により得られた上清を 0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過することで可溶性画分を得た。

可溶性画分の凍結融解を一旦経た後、オープンニッケルカラム (HisGraviTrap Ni Sepharose 6 Fast Flow) を用いて、製品のプロトコールに従ってヒト組換え DDO のニッケルカラムによる精製を行った。イミダゾール濃度の異なる各溶出画分 (50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、400 mM、500 mM) に対し、12% SDS-PAGE とそれに引き続くクマシー染色により精製の純度を確認した。各画分に含まれるイミダゾールを除去するために、1 L の透析バッファー (50 µM FAD、10 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.3)、10% グリセロール、2 mM EDTA および 5 mM 2-メルカプトエタノール) に対する 4°C、2.5 時間以上の透析を 2 回行った。透析後に回収した溶液は -80 °C に保存した。

2-2-5 リアルタイム PCR を用いた発現解析

実験に使用した各培養細胞株 (ラット由来: PC-12、GH₃、NRK-52E、ヒト由来: HeLa、Hep G2、A431、TASK1、NEC8、ECV-304) を 60 mm dish で約 100% confluent まで培養し、RNeasy Mini kit を用いて製品のプロトコールに従い total RNA を調製した。なお、オプションの RNase-Free DNase Set を用いたゲノム DNA の除去も実施した。得られた total RNA の濃度を 260 nm の吸光度を測定することにより求めた。

得られた total RNA から以下のように cDNA を合成した。5 µg の total RNA、0.5 µg の Oligo (dT)₁₂₋₁₈ プライマー、各 10 mM の dNTPs を含む全量 13 µL の反応液を、65°C で 5 分間反応後、氷上で 1 分間以上静置して total RNA に Oligo (dT)₁₂₋₁₈ プライマーをアニーリングさせた。引き続き、4 µL の 5× First-Strand Buffer、1 µL の 0.1 M DTT、および 1 µL (200 units) の SuperScript III を加え、50°C で 1 時間の逆転写反応を行った。その後、70°C、15 分間の

処理により反応を停止させ、氷上で 1 分間以上静置した。引き続き、1 μ L (2 units) の RNaseH を加え、37°C、20 分間の処理を行い、これを cDNA とした。

ラット由来の種々の培養細胞株におけるラット *Got1l1* および *Ddo* 遺伝子の発現レベル、およびヒト由来の種々の培養細胞株におけるヒト *GOT1L1* および *DDO* 遺伝子の発現レベルを解析するために、各細胞から調製した全 cDNA を鋳型として、SsoFast™ EvaGreen® Supermix を用いてリアルタイム PCR を行った。5 μ L の鋳型 cDNA、10 μ L の SsoFast™ EvaGreen® Supermix、2 μ L の 10 pmol/ μ L フォワードプライマー、2 μ L の 10 pmol/ μ L リバープライマー、および 1 μ L の滅菌水を混合して PCR 反応液を調製し、全量を Hard-Shell PCR Plates 96-well CLR にスポットした。PCR 反応は、95°C、30 秒間の処理に引き続き、95°C、5 秒間の変性、66°C、10 秒間のアニーリングおよび伸長反応のサイクルを 45 回行った。PCR 後、CFX マネージャーにより算出された Ct 値により発現レベルを解析した。なお、内部標準としてラット *Gapdh* およびヒト *GAPDH* の発現レベルも同様に解析した。リアルタイム PCR に用いた各プライマーの塩基配列は、以下の通りである。

Rat <i>Got1l1</i>	Forward	5' -GAC TCAT CT TCC GGG ACA TGG GCT- 3'
	Reverse	5' -GCC G GG ATA TGC TGT AGA ACT TCG A- 3'
Rat <i>Ddo</i>	Forward	5' -GAG ACG CCA CGG TTT CCC CG- 3'
	Reverse	5' -GCC CCC GTC GCG GAT GAA AT- 3'
Rat <i>Gapdh</i>	Forward	5' -TGC TGG GGC TGG CAT TGC TC- 3'
	Reverse	5' -GGC CAT GAG GTC CAC CAC CC- 3'

Human <i>GOT1L1</i>	Forward	5' -GGG CAG AAG CGG AAC ACA G GA- 3'
	Reverse	5' -CTT GTG GGC GAG GGG CAC A TC- 3'
Human <i>DDO</i>	Forward	5' -TCC CTC CAC GGA G CC TGC AA- 3'
	Reverse	5' -GCC TCT GTC CAT CTC GCG CA- 3'
Human <i>GAPDH</i>	Forward	5' -AGC ACC CCT GGC CAA GGT CA- 3'
	Reverse	5' -CCG GAG GGG CCA TCC ACA GT- 3'

2-2-6 ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株の作製

2-2-6-1 si RNA 発現プラスミドの構築

Invitrogen 社から提供されている web ツール (Block-iT™ RNAi Designer) を用いて、ラット *Got1l1* 遺伝子の異なる 2 領域を標的配列として選別した (siGOT1L1-1 : +587~+605 (exon 5)、siGOT1L1-2 : +669~+687 (exon 6)。いずれも 1st Met をコードする ATG コドンの A を 1 とした時の場所を示す。また、コントロールには各々の標的配列をランダムに入れ替えた配列 (siGOT1L1-1-Ctrl および siGOT1L1-2-Ctrl) を使用した。これらの配列をもとにヘアピン型 si RNA 発現プラスミド構築用のオリゴ DNA を下記のように設計し、化学的に合

成されたものを Invitrogen 社から購入した。この際、Top オリゴ DNA と Bottom オリゴ DNA がアニール後、それぞれの末端が BamHI および Hind III による制限酵素処理後の突出末端と同じ配列になるように設計した。設計した Top オリゴ DNA と Bottom オリゴ DNA をアニールさせた。

siGOT1L1-1 (top strand)	5' -GAT CCG GAC AAA GTT GAT GTC CAT CTG TGA AGC CAC AGA TGG GAT GGA CAT CAA CTT TGT CCT TTT TTA-3'
siGOT1L1-1 (bottom strand)	5' -AGC TTA AAA AAG GAC AAA GTT GAT GTC CAT CCC ATC TGT GGC TTC ACA GAT GGA CAT CAA CTT TGT CCG-3'
siGOT1L1-2 (top strand)	5' -GAT CCG CCT TGA AGA AGA TAG CAA ACT GTG AAG CCA CAG ATG GGT TTG CTA TCT TCT TCA AGG CTT TTT TA-3'
siGOT1L1-2 (bottom strand)	5' -AGC TTA AAA AAG CCT TGA AGA AGA TAG CAA ACC CAT CTG TGG CTT CAC AGT TTG CTA TCT TCT TCA AGG CG-3'
siGOT1L1-1-Ctrl (top strand)	5' -GAT CCG GAT GAA TAG TCT GAC CAT CTG TGA AGC CAC AGA TGG GAT GGT CAG ACT ATT CAT CCT TTT TTA-3'
siGOT1L1-1-Ctrl (bottom strand)	5' -AGC TTA AAA AAG GAT GAA TAG TCT GAC CAT CCC ATC TGT GGC TTC ACA GAT GGT CAG ACT ATT CAT CCG-3'
siGOT1L1-2-Ctrl (top strand)	5' -GAT CCG CCT AGA ATA GAC GAG TAA ACT GTG AAG CCA CAG ATG GGT TTA CTC GTC TAT TCA AGG CTT TTT TA-3'
siGOT1L1-2-Ctrl (bottom strand)	5' -AGC TTA AAA AAG CCT TGA ATA GAC GAG TAA ACC CAT CTG TGG CTT CAC AGT TTA CTC GTC TAT TCT AGG CG-3'

si RNA 発現用プラスミドとして、タカラバイオ社より購入した pBAsi-mU6 Neo を用いた。pBAsi-mU6 Neo を BamHI および Hind III で制限酵素処理し、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて、前述のアニールしたオリゴ DNA とライゲーションした。ライゲーション反応液を用いて、大腸菌 XL1-Blue を形質転換した。得られた大腸菌のクローンを定法に従い培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を精製した。得られたプラスミドを BamHI および Hind III で制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動で予想されたサイズのバンドが検出されたプラスミドを選別した。

2-2-6-2 ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株の単離

100 mm dish で約 50%コンフルエントまで培養した GH₃ 細胞に、作製した si RNA 発現プラスミド約 20 µg を Mammalian Transfection Kit を用いて導入した。使用している pBAsi-mU6 Neo はネオマイシン耐性遺伝子を持つ。そこで、導入して約 48 時間後から終濃度 800 µg/mL の G418 を含む培地で薬剤選択を行い、si RNA 発現プラスミドが導入されたクローンを単離した。

得られたクローンに対し、前述の方法で、ラット *Got1l1* 遺伝子の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。最も効率的にラット *Got1l1* 遺伝子の mRNA 発現レベルが抑制された細胞株 (GH₃.si-1-20、GH₃.si-1-21、GH₃.si-2-10、GH₃.si-2-11) を以降の実験に使用した。また、コントロール細胞も同様に、作製したプラスミドを導入して薬剤選択後にクローンを単離することにより作製し (GH₃.si-1-Ctrl、GH₃.si-2-Ctrl)、以降の実験に使用した。

2-2-6-3 ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株の細胞増殖アッセイ

GOT1L1 のノックダウンが細胞の増殖速度に影響を与えていないことを確認する為に、実験に使用した細胞 (GH₃、GH₃.si-1-Ctrl、GH₃.si-1-20、GH₃.si-1-21、GH₃.si-2-Ctrl、GH₃.si-2-10、GH₃.si-2-11) の細胞増殖を解析した。96 well plate に各細胞を 5×10^3 cells/well で播種し (Day 0)、Day 1 から Day 4 まで培養した。Cell Count Reagent SF は細胞内脱水素酵素により還元され高水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として含有する。そこで、Day 1、Day 2、Day 3 および Day 4 の各測定点において Cell Count Reagent SF を細胞に添加し 37°C で 1 時間培養した後、生成されたホルマザンの 450 nm での吸光度を測定し、検量線式より細胞数を求めた。

2-2-7 統計解析

各値は、平均値±標準偏差で示した ($n = 3$)。統計解析は、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意であるとした。

2-3 結果

2-3-1 ラット由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と *Got1ll* および *Ddo* mRNA 発現量との関係

2-3-1-1 ヒト組換え DDO の調製

N 末に His タグが付加されたヒト組換え DDO を発現する大腸菌 BL21/pRSET-His-hDDO の培養液から可溶性画分を調製し、オープンニッケルカラムを用いて N 末に His タグが付加されたヒト組換え DDO を精製した。精製した酵素の純度を 12% SDS-PAGE とそれに引き続くクマシー染色により確認した (Fig. 2-1)。200 mM 画分、400 mM 画分および 500 mM 画分において N 末に His タグが付加されたヒト DDO の推定分子量 (41,692 Da) に相当する位置に明確なバンドがほぼ単一の状態で検出された。以降の実験には、400 mM 画分の酵素を使用した。

2-3-1-2 ラット由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量

ラット由来培養細胞 (GH₃ 細胞、PC-12 細胞および NRK-52E 細胞) 中の D,L-Asp を OPA/NAC 試薬により蛍光誘導体化し (Fig. 2-2)、HPLC で測定した。D-Asp のピークは約 7 分に検出された (Fig. 2-3A)。このピークは DDO で処理したサンプルでは消失していた (Fig. 2-3B) ことから D-Asp 単独のピークであることを確認した。定量した各細胞中のアミノ酸含量を Table 2-1 にまとめた。以前に Long らが報告したように^{29, 30)}、PC-12 および GH₃ 細胞で D-Asp が検出され、それぞれ 111 ± 29 pmol/well および 155 ± 26 pmol/well だった。また、NRK-52E からも D-Asp が検出された (52.5 pmol/well) が、GH₃ 細胞と比較すると有意に D-Asp 含量が低かった。L-Asp は全ての細胞株で検出され、細胞内 L-Asp 含量は GH₃ 細胞 (2,324 ± 408 pmol/well) と比較して PC-12 細胞 (2,359 ± 165 pmol/well) では有意差は認められなかったが、NRK-52E 細胞 (788 ± 45 pmol/well) では有意に低かった。全 Asp 含量に対する D-Asp の比率を示す D% (D% = D-Asp 含量 / [D-Asp 含量 + L-Asp 含量] × 100) はいずれも 4.5 ~ 6.2% であり、今回解析を行った 3 種の細胞株間で有意差は認められなかった。

2-3-1-3 ラット由来培養細胞におけるリアルタイム PCR を用いたラット *Got1ll* mRNA およびラット *Ddo* mRNA 発現レベルの解析

2-3-1-2 「ラット由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量」で細胞内 D,L-Asp 含量を定量したラット由来培養細胞株 (GH₃ 細胞、PC-12 細胞および NRK-52E 細胞) でのラット *Got1ll* および *Ddo* の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。各遺伝子の発現レベルが最も高い細胞の発現レベルを 100% とした相対発現レベルのグラフを Fig. 2-4 に示した。ラット *Got1ll* mRNA 発現レベルは NRK-52E 細胞 (100.0 ± 20.1 %) で最も高く、次いで GH₃ 細胞 (6.3 ± 1.5 %)、PC-12 細胞 (3.9 ± 0.8 %) の順であった。GH₃ 細胞

および PC-12 細胞は NRK-52E 細胞と比較して有意にラット *Got111* mRNA 発現レベルが低かった。また、ラット *Ddo* mRNA 発現レベルは NRK-52E 細胞 ($100.0 \pm 8.1\%$) で最も高く、次いで GH₃ 細胞 ($7.4 \pm 1.9\%$) であった。一方、PC-12 細胞におけるラット *Ddo* mRNA 発現レベルは検出限界以下であった。GH₃ 細胞は NRK-52E 細胞と比較してラット *Ddo* mRNA 発現レベルが有意に低かった。すなわち、GH₃ 細胞と NRK-52E 細胞を比較すると、NRK-52E 細胞ではラット *Got111* mRNA 発現レベルは有意に高いが、細胞内 D-Asp 含量は有意に低く、細胞内 D-Asp 含量と *Got111* 発現レベルの間に相関は見られなかった。しかし、GH₃ 細胞と比較して NRK-52E 細胞では、ラット *Ddo* mRNA 発現レベルも有意に高かったことから、DDO によって D-Asp が分解を受けたために含量が低下していることが考えられた。

2-3-2 ヒト由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と *GOT111* および *DDO* mRNA 発現量との相関

2-3-2-1 ヒト由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量

ヒト由来培養細胞 (HeLa 細胞、NEC8 細胞、TASK1 細胞、ECV304 細胞、Hep G2 細胞および A431 細胞) 中の D,L-Asp を OPA/NAC 試薬により蛍光誘導体化し (Fig. 2-2)、HPLC で測定した。得られたクロマトグラムのうち、例として NEC8 細胞のクロマトグラムを Fig. 2-5A, B に示した。このヒト由来培養細胞のクロマトグラムでは約 7 分に D-Asp のピークが検出された (Fig. 2-5A)。このピークは DDO で処理したサンプルでは消失していた (Fig. 2-5B) ことから D-Asp 単独のピークであることを確認した。定量した各細胞中のアミノ酸含量を Table 2-2 にまとめた。D-Asp は HeLa 細胞 (234 ± 48 pmol/well)、NEC8 細胞 (227 ± 18 pmol/well)、TASK1 細胞 (48.4 ± 11.5 pmol/well) および ECV304 細胞 (33.6 ± 9.1 pmol/well) で検出されたが、Hep G2 細胞および A431 細胞では検出限界以下であった (Fig. 2-5C, D)。細胞内 D-Asp 含量を HeLa 細胞と比較すると、NEC8 細胞では有意差は認められなかったが、TASK1 細胞および ECV304 細胞では有意に低値であった。一方、L-Asp は今回解析を行ったすべての細胞株で検出された。細胞内 L-Asp 含量は HeLa 細胞 ($1,409 \pm 360$ pmol/well) と比較すると NEC8 細胞 ($2,173 \pm 83$ pmol/well) および TASK1 細胞 ($4,434 \pm 366$ pmol/well) で有意に高く、Hep G2 細胞 ($1,687 \pm 98$ pmol/well) では有意差は認められず、ECV304 細胞 (572 ± 58 pmol/well) および A431 細胞 (647 ± 92 pmol/well) では有意に低かった。D% を HeLa 細胞 ($14.3 \pm 0.6\%$) と比較すると、NEC8 細胞 ($9.5 \pm 0.6\%$)、TASK1 細胞 ($1.1 \pm 0.4\%$) および ECV304 細胞 ($6.1 \pm 2.0\%$) では有意に低かった。

2-3-2-2 ヒト由来培養細胞におけるリアルタイム PCR を用いたヒト *GOT111* mRNA およびヒト *DDO* mRNA 発現レベルの解析

2-3-2-1 「ヒト由来培養細胞における細胞内 D,L-Asp 含量の定量」で細胞内 D,L-Asp 含量を定量したヒト由来培養細胞株 (HeLa 細胞、NEC8 細胞、TASK1 細胞、ECV304 細胞、Hep G2

細胞および A431 細胞) でのヒト *GOT1L1* および *DDO* の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR で解析した。各遺伝子の発現レベルが最も高い細胞の発現レベルを 100% とした相対発現レベルのグラフを Fig. 2-6 に示した。ヒト *GOT1L1* mRNA の発現レベルは、TASK1 細胞 (100.0 ± 15.1 %) で最も高く、次いで Hep G2 細胞 (41.3 ± 25.5 %)、A431 細胞 (12.0 ± 5.8 %)、ECV304 細胞 (0.53 ± 0.42 %)、HeLa 細胞 (0.42 ± 0.37 %)、NEC8 細胞 (0.06 ± 0.04 %) の順であった。ヒト *GOT1L1* mRNA の発現レベルを TASK1 細胞と比較すると、Hep G2 細胞、A431 細胞、ECV304 細胞、HeLa 細胞および NEC8 細胞では有意に低値であった。一方、ヒト *DDO* mRNA 発現レベルは、A431 細胞 (100.0 ± 28.0 %) で最も高く、次いで Hep G2 細胞 (82.2 ± 8.1 %)、HeLa 細胞 (13.9 ± 1.0 %)、TASK1 細胞 (3.7 ± 0.8 %)、NEC8 細胞 (0.15 ± 0.04 %)、ECV304 細胞 (0.11 ± 0.05 %) の順であった。ヒト *DDO* mRNA の発現レベルを TASK1 細胞と比較すると、Hep G2 細胞および A431 細胞では有意に高く、ECV304 細胞、HeLa 細胞および NEC8 細胞では有意差は認められなかった。これらの結果から、今回解析を行ったヒト由来培養細胞株では、細胞内 D-Asp 含量とヒト *GOT1L1* mRNA 発現レベルの間に相関は得られなかった。

2-3-3 GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析

以前に Long らにより D-Asp の生合成が報告されている³⁰⁾ GH₃ 細胞の細胞中および培地中の D-Asp 含量を和した総 D-Asp 含量の経時変化を解析した。細胞および培地中の D,L-Asp は OPA/Boc-L-Cys 試薬による蛍光誘導体化 (Fig. 2-7) の後、HPLC で測定した。D-Asp のピークは約 18 分に検出された (Fig. 2-8A, C)。このピークは DDO で処理したサンプルでは消失していた (Fig. 2-8B, D) ことから D-Asp 単独のピークであることを確認した。GH₃ 細胞の総 D-Asp 含量の経時変化を Fig. 2-9A に示した。以前に Long らが報告したように³⁰⁾、GH₃ 細胞の細胞中および培地中の D-Asp 含量を和した総 D-Asp 含量は経時的に増加した。培養中は、外部から何も添加していないので、D-Asp 含量の増加は GH₃ 細胞における D-Asp の生合成を反映していると考えられる。

同様に、HeLa 細胞の総 D-Asp 含量の経時変化も解析した。細胞および培地中の D,L-Asp は OPA/Boc-L-Cys 試薬による蛍光誘導体化 (Fig. 2-7) の後、HPLC で測定した。D-Asp のピークは約 18 分に検出された (Fig. 2-8E, G)。このピークは DDO で処理したサンプルでは消失していた (Fig. 2-8F, H) ことから D-Asp 単独のピークであることを確認した。HeLa 細胞の総 D-Asp 含量の経時変化を Fig. 2-9B に示した。HeLa 細胞においても、GH₃ 細胞と同様に経時的に D-Asp 含量が増加しており、D-Asp 生合成能を有することが明らかになった。

2-3-4 ラット *Got1ll* ノックダウン GH₃ 細胞株における Asp 含量の変化

2-3-4-1 ラット *Got1ll* ノックダウン GH₃ 細胞の作製

より詳細な解析を行うために、D-Asp 生合成能を有する GH₃ 細胞においてラット *Got1ll*

をノックダウンし、その Asp 含量への影響を解析した。ラット *Got1l1* 遺伝子の異なる 2 領域を標的配列 (siGOT1L1-1 : +587~+605 および siGOT1L1-2 : +669~+687) とした。また、標的配列をランダムに入れ替えた配列をコントロール配列とした。標的配列に対する siRNA を発現するプラスミド (Fig. 2-10) を導入し、薬剤選択によりノックダウンクローンを単離した。

2-3-4-2 ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞におけるラット *Got1l1* mRNA 発現レベルの解析

2-3-4-1 「ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞の作製」で作製したラット *Got1l1* ノックダウンクローンと wild-type (WT) の GH₃ 細胞におけるラット *Got1l1* mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR により解析した (Fig. 2-11)。

WT および各コントロールクローンと比較して、*Got1l1* ノックダウンクローンで有意にラット *Got1l1* mRNA 発現レベルが低下していることを確認した。

2-3-4-3 ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞株の細胞増殖アッセイ

2-3-4-1 「ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞の作製」で作製したラット *Got1l1* ノックダウンクローンと WT 間で、細胞増殖速度に変化がみられるか否かを経時的に細胞数を計測することで解析した。Day 2 において WT と比較して GH₃.si-2-10 で細胞数が有意に低下していたが、それ以外は WT と各クローン間で細胞数に有意な違いは認められなかった。

(Fig. 2-12)。すなわち、培養 4 日目までは WT と GH₃.si-2-10 以外のクローン間で増殖速度に違いは見られなかった。GH₃.si-2-10 については WT と比較して Day 2 で有意に細胞数が低下していた。しかしながら、Day 1、3 および 4 では有意差は認められなかったことから、Day 2 では実験手技の問題により細胞数が低下したと考えられ、培養 4 日目までは全体的にはやや増殖速度が遅いかほぼ同等であると考えられた。

2-3-4-4 ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞株における細胞内 D,L-Asp 含量の定量

2-3-4-1 「ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞の作製」で作製したラット *Got1l1* ノックダウンクローンと WT の細胞中および培地中の Asp 含量を HPLC により定量した (Fig. 2-13)。ノックダウンクローンでは WT あるいは各コントロールクローンと比較して、細胞内 D-Asp 含量は有意に増加していたが (Fig. 2-13A)、培地中 D-Asp 含量は有意に低下していた (Fig. 2-13B)。また、細胞内および培地中 D-Asp 含量を和した総量は、有意に増加していたか有意差は見られなかった (Fig. 2-13C)。これらの結果から、ラット GOT1L1 はラット細胞における主要な D-Asp 合成酵素ではないことが示唆された。一方、GH₃.si-1-20 および GH₃.si-1-21 では、コントロールクローンと比較して細胞内 L-Asp 含量は有意に低下しており (Fig. 2-13D)、L-Asp 総量および培地中含量は有意に低下していた (Fig. 2-13E, F)。GH₃.si-2-10 および GH₃.si-2-11 では、WT あるいはコントロールクローンと比較して、細胞内 L-Asp 含量

は有意に増加していたが(Fig. 2-13D)、培地中 L-Asp 含量は有意に低下していた(Fig. 2-13E)。また、L-Asp 総量に有意な違いは見られなかった (Fig. 2-13F)。

2-4 考察

2-4-1 ラット由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と *Got1l1* および *Ddo* mRNA 発現量との相関

今回解析を行ったラット由来培養細胞株のうち、特に GH₃ 細胞と NRK-52E 細胞の細胞中 D-Asp 含量とラット *Got1l1* および *Ddo* mRNA の発現レベルに注目すると、NRK-52E 細胞ではラット *Got1l1* mRNA 発現レベルは有意に高いが、細胞内 D-Asp 含量は有意に低く、細胞内 D-Asp 含量と *Got1l1* 発現レベルの間に相関は見られなかった。しかし、GH₃ 細胞と比較して NRK-52E 細胞では、ラット *Ddo* mRNA 発現レベルも有意に高かったことから、DDO によって D-Asp が分解を受けたために、細胞中 D-Asp 含量とラット *Got1l1* mRNA 発現量の間に相関が認められない結果となった可能性も考えられた。

2-4-2 ヒト由来培養細胞株の細胞中 D-Asp 含量と *GOT1L1* および *DDO* mRNA 発現量との相関

今回解析を行ったヒト由来培養細胞株のうち、特に TASK1 細胞と HeLa 細胞の細胞中 D-Asp 含量とヒト *GOT1L1* および *DDO* mRNA の発現レベルに注目すると、HeLa 細胞の方がヒト *GOT1L1* mRNA の発現レベルが低く、分解酵素であるヒト *DDO* mRNA の発現レベルが有意差は認められないが高いにも関わらず、細胞内 D-Asp 含量は高かった。これらの結果より、ヒト *DDO* mRNA の発現レベルを考慮したとしても、細胞中 D-Asp 含量とヒト *GOT1L1* mRNA の発現レベルに相関は得られず、*GOT1L1* はヒト細胞における主要な D-Asp 合成酵素ではないことが示唆された。

2-4-3 ラット *Got1l1* ノックダウン GH₃ 細胞株における Asp 含量の変化

より詳細な解析を行うために、RNA 干渉法によりラット *Got1l1* の発現を抑制した細胞株を作製し、その Asp 含量を HPLC で定量した。ノックダウンクローンでは WT あるいは各コントロールクローンと比較して、細胞内および培地中 D-Asp 含量を和した総量に有意な低下は見られず、むしろ同等か有意に増加していた。このことは、D-Asp 合成能を有する GH₃ 細胞においてラット *GOT1L1* が主要な D-Asp 合成酵素ではなく、他の酵素が D-Asp 生合成を担っていることを示唆している。

ノックダウンクローンにおいて、細胞内 D-Asp 含量は有意に増加した一方で、培地中 D-Asp 含量が有意に低下した理由については、分子機構の詳細は不明であるが、*Got1l1* のノックダウンにより、L-Glu トランスポーター²²⁾ を介した D-Asp の取り込みが促進された可能性が考えられる。また、実際には *GOT1L1* がラセマーゼではなく、*GOT1* のアイソザイムの 1 つであり、ノックダウンにより L-Glu からオキサロ酢酸へのアミノ基転移反応が低下した結果、オキサロ酢酸が蓄積した可能性が考えられる。この場合には、オキサロ酢酸へのアミノ基転移により D-Asp を生成する酵素が存在しており、そのために一部のクローンでは D-Asp

総量の有意な増加が見られた可能性も考えられる。実際、オキサロ酢酸へのアミノ基転移により D-Asp を生成する D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが植物では見出されている。GOT1L1 が GOT1 のアイソザイムであることは、GH₃.si-1-20 および GH₃.si-1-21 で L-Asp の総量および培地中含量が有意に低下し、細胞内含量も低下傾向であったことから示唆される。おそらく、ノックダウンにより L-Glu からオキサロ酢酸へのアミノ基転移反応による L-Asp の生合成が抑制された為、培地中 L-Asp 含量および L-Asp 総量が有意に低下したと考えられる。一方、GH₃.si-2-10 および GH₃.si-2-11 では、培地中 L-Asp 含量は有意に低下していたが、細胞内 L-Asp 含量は有意に増加し、L-Asp 総量に有意な違いは見られなかった。これは、siRNA の標的配列が異なるため、GH₃.si-2-10 および GH₃.si-2-11 のノックダウン効率が GH₃.si-1-20 および GH₃.si-1-21 と比較して低いことに帰因している可能性が考えられる。また、細胞内 L-Asp 含量の有意な増加に関しては、上述したように分子機構の詳細は不明であるが、L-Glu トランスポーターの取り込みの活性が変化し、培地から細胞内への L-Asp の取り込みが亢進した可能性が考えられる。これらの点に関しては、さらに詳細な解析が必要であると思われる。

投稿論文の報告と同時期に、Tanaka-Hayashi らによって *Got1l1* ノックアウトマウスの解析結果が報告された⁴⁰⁾。本研究と矛盾することなく、この論文では、D-Asp が多く分布している組織である精巣および海馬における D-Asp 含量に、*Got1l1* ノックアウトマウスと WT に違いは認められない。また、GOT1L1 高発現 HEK293T 細胞から精製された組換えタンパク質が、Asp ラセマーゼ活性を持たず、GOT1 活性を有していたと報告されている。したがって、GOT1L1 ではない他の酵素が哺乳類における D-Asp の生合成を担っていると考えられた。

2-5 図表

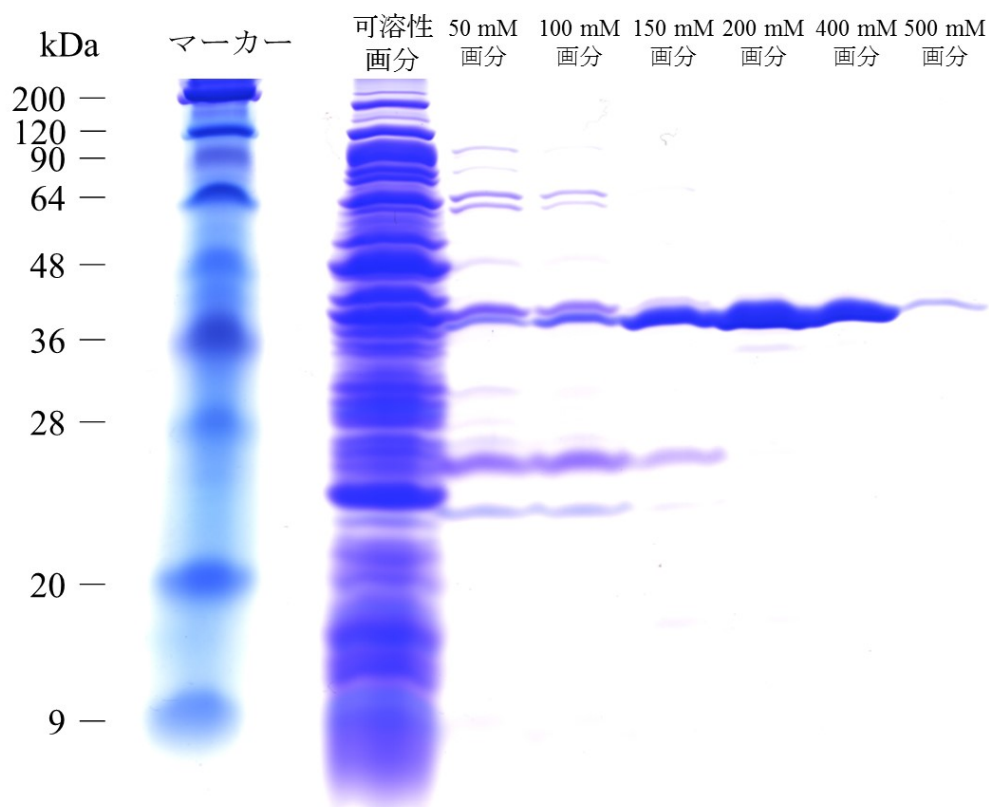


Fig. 2-1. His-ヒト DDO の SDS-PAGE クマシー染色結果

200 mM 画分、400 mM 画分、500 mM 画分において、N 末に His タグが付加されたヒト DDO の推定分子量 (41,692 Da) に相当する位置に明確なバンドがほぼ単一な状態で検出された。

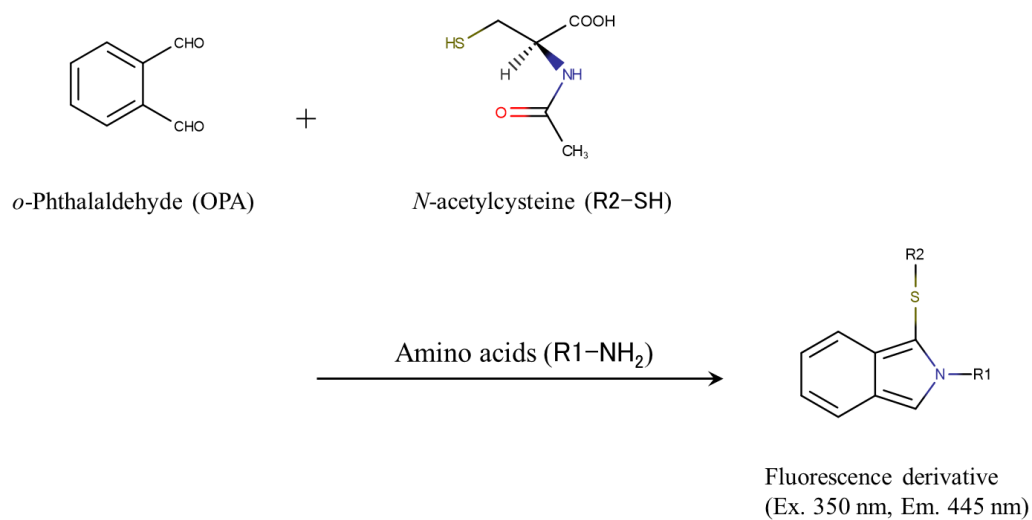


Fig. 2-2. OPA/NAC によるアミノ酸の蛍光誘導体化反応

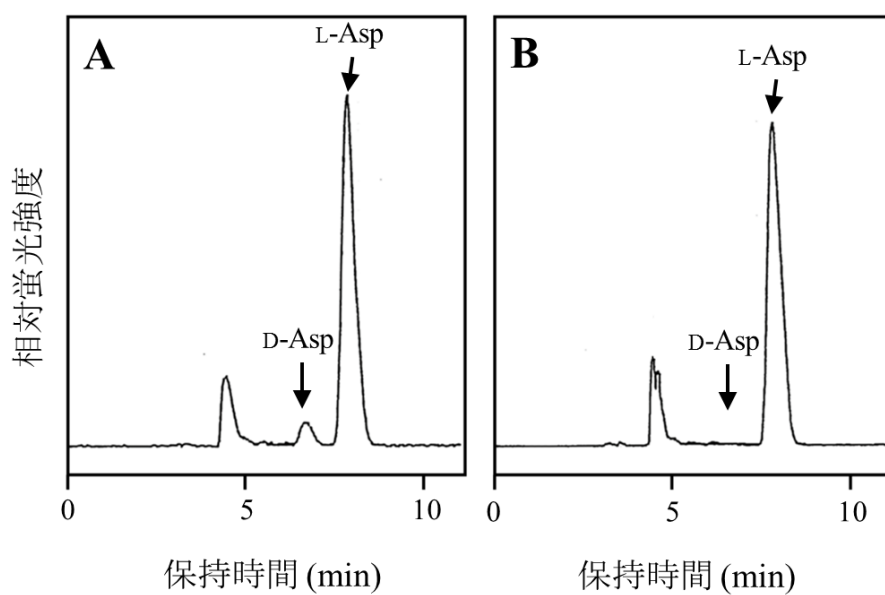


Fig. 2-3. ラット由来培養細胞サンプルの典型的なクロマトグラム
(OPA/NAC 試薬を用いてアミノ酸を蛍光誘導体化したもの)

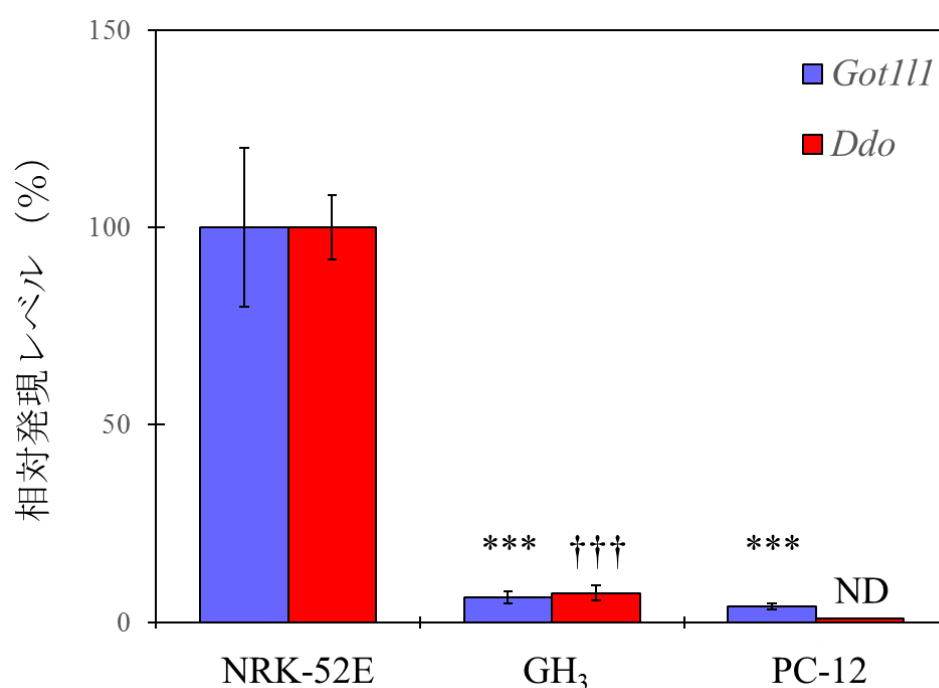
A. DDO 未処理の GH₃ 細胞サンプルのクロマトグラム。

B. DDO 処理した GH₃ 細胞サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-3A のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

Table 2-1. ラット由来培養細胞株の細胞内 Asp 含量

培養細胞株	D-Asp (pmol/well)	L-Asp (pmol/well)	D%
GH ₃	155 ± 26	2,324 ± 408	6.2 ± 0.1
PC-12	111 ± 29	2,359 ± 165	4.5 ± 1.5
NRK-52E	52.5 ± 37.7 *	788 ± 45 ***	6.2 ± 4.5

各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。D% は総 Asp 含量に占める D-Asp の割合であり、 $[\text{D-Asp 含量} / (\text{D-Asp 含量} + \text{L-Asp 含量})] \times 100$ で求めた。統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、GH₃ 細胞株と各細胞株間の有意差を示した。*** は P 値 < 0.001 を、* は P 値 < 0.05 を表す。

Fig. 2-4. ラット由来培養細胞株におけるラット *Got1l1* および *Ddo* mRNA 発現レベルの比較

ラット *Got1l1* および *Ddo* の mRNA の発現レベルを内部標準のラット *Gapdh* で補正し、その値が最も高かった細胞の値を 100%としたときの相対値で示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。ND は検出限界以下を示す。ラット *Got1l1* mRNA 発現レベルの統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、NRK-52E 細胞株と各細胞株間の有意差を示した。*** は P 値 < 0.001 を表す。ラット *Ddo* mRNA 発現レベルはスチューデントの t 検定により統計処理を行い、NRK-52E 細胞株と GH₃ 細胞株間の有意差を検定した。††† は P 値 < 0.001 を表す。

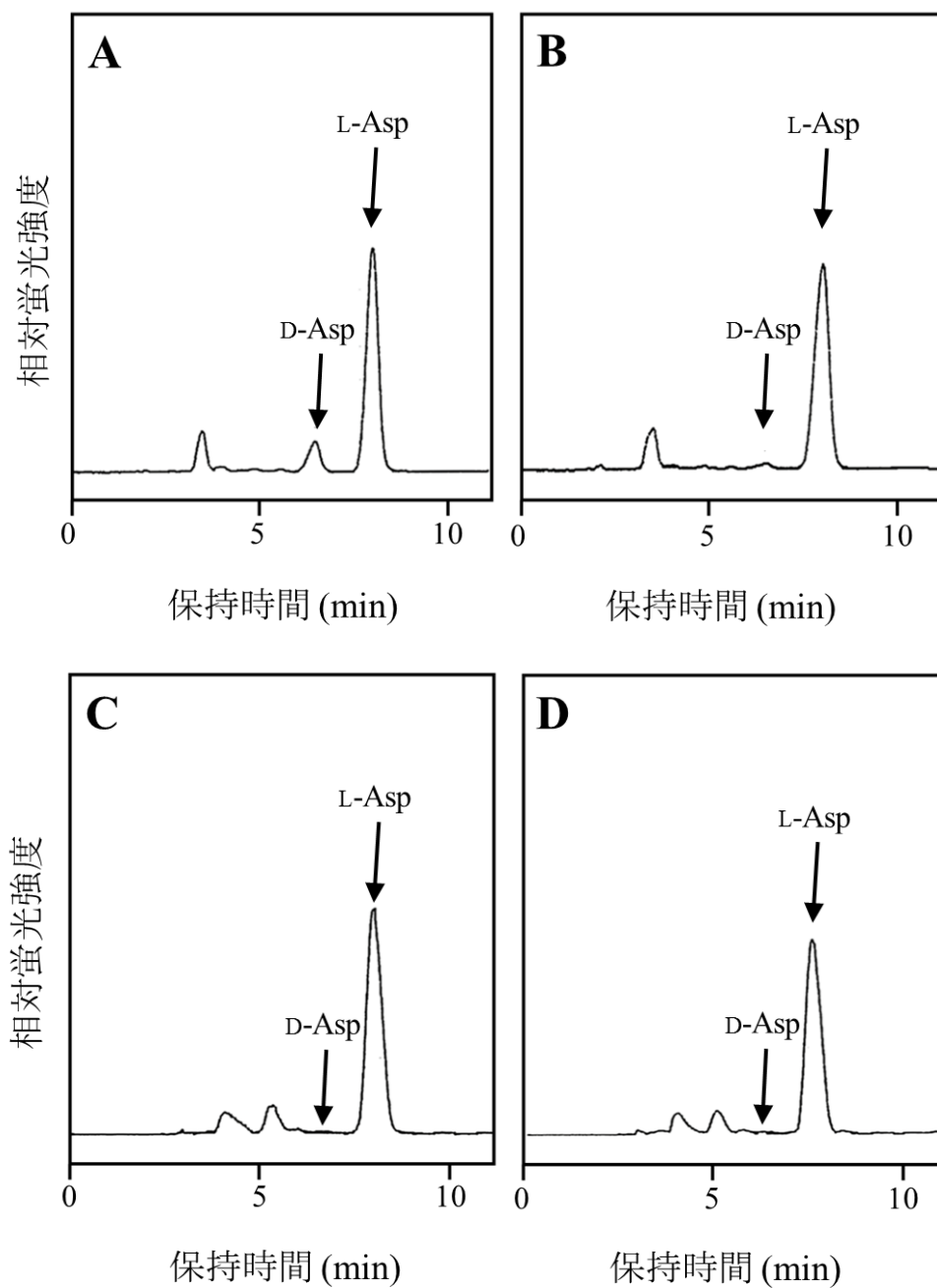


Fig. 2-5. ヒト由来培養細胞サンプルの典型的なクロマトグラム

(OPA/NAC 試薬を用いてアミノ酸を蛍光誘導体化したもの)

A. DDO 未処理の NEC8 細胞サンプルのクロマトグラム。

B. DDO 処理した NEC8 細胞サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-5A のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

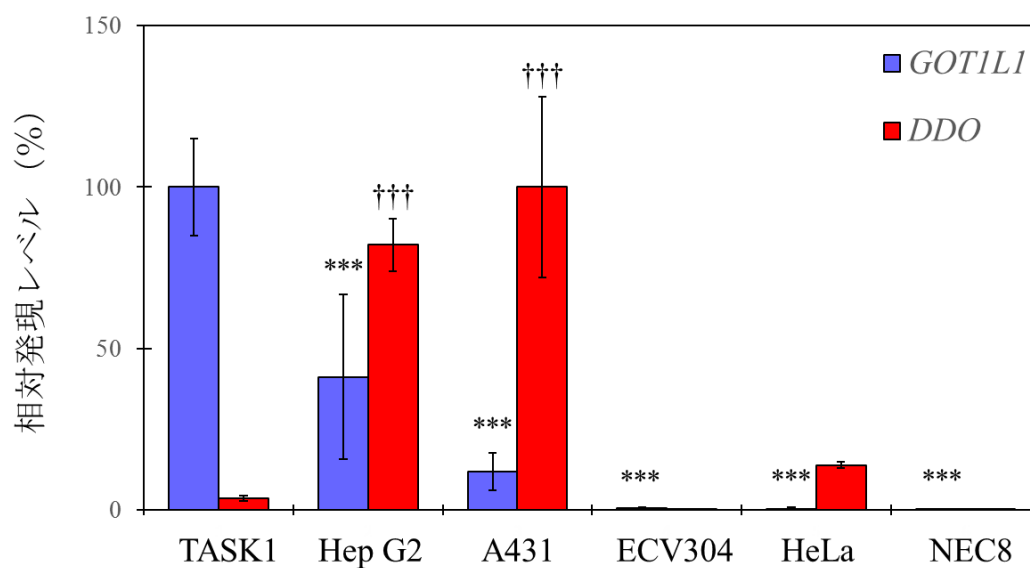
C. DDO 未処理の Hep G2 細胞サンプルのクロマトグラム。D-Asp のピークは検出されなかった。

D. DDO 未処理の A431 細胞サンプルのクロマトグラム。D-Asp のピークは検出されなかった。

Table 2-2. ヒト由来培養細胞株の細胞内 Asp 含量

培養細胞株	D-Asp (pmol/well)	L-Asp (pmol/well)	D%
HeLa	234 ± 48	1,409 ± 360	14.3 ± 0.6
NEC8	227 ± 18	2,173 ± 83 [*]	9.5 ± 0.6 ^{***}
TASK1	48.4 ± 11.5 ^{***}	4,434 ± 366 ^{***}	1.1 ± 0.4 ^{***}
ECV304	33.6 ± 9.1 ^{***}	527 ± 58 ^{***}	6.1 ± 2.0 ^{***}
Hep G2	ND	1,687 ± 98	ND
A431	ND	647 ± 92 [*]	ND

各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。D% は総 Asp 含量に占める D-Asp の割合であり、 $[\text{D-Asp 含量} / (\text{D-Asp 含量} + \text{L-Asp 含量})] \times 100$ で求めた。ND は検出限界以下を示す。統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、HeLa 細胞株と各細胞株間の有意差を示した。*** は P 値 < 0.001 を、* は P 値 < 0.05 を表す。

Fig. 2-6. ヒト由来培養細胞株におけるヒト *GOT1L1* および *DDO* mRNA 発現レベルの比較

ヒト *GOT1L1* および *DDO* の mRNA の発現レベルを内部標準のヒト *GAPDH* で補正し、その値が最も高かった細胞の値を 100%としたときの相対値で示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、TASK1 細胞株と各細胞株間の有意差を示した。*** はヒト *Got1l1* mRNA 発現レベルの結果において P 値 < 0.001 を表す。††† はヒト *DDO* mRNA 発現レベルの結果において P 値 < 0.001 を表す。

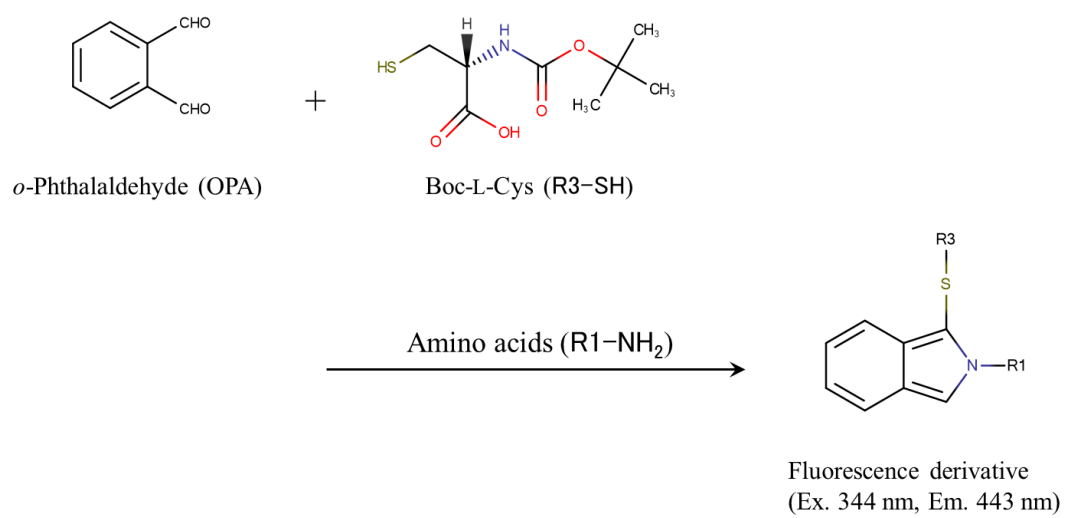


Fig. 2-7. OPA/Boc-L-Cys によるアミノ酸の蛍光誘導体化反応

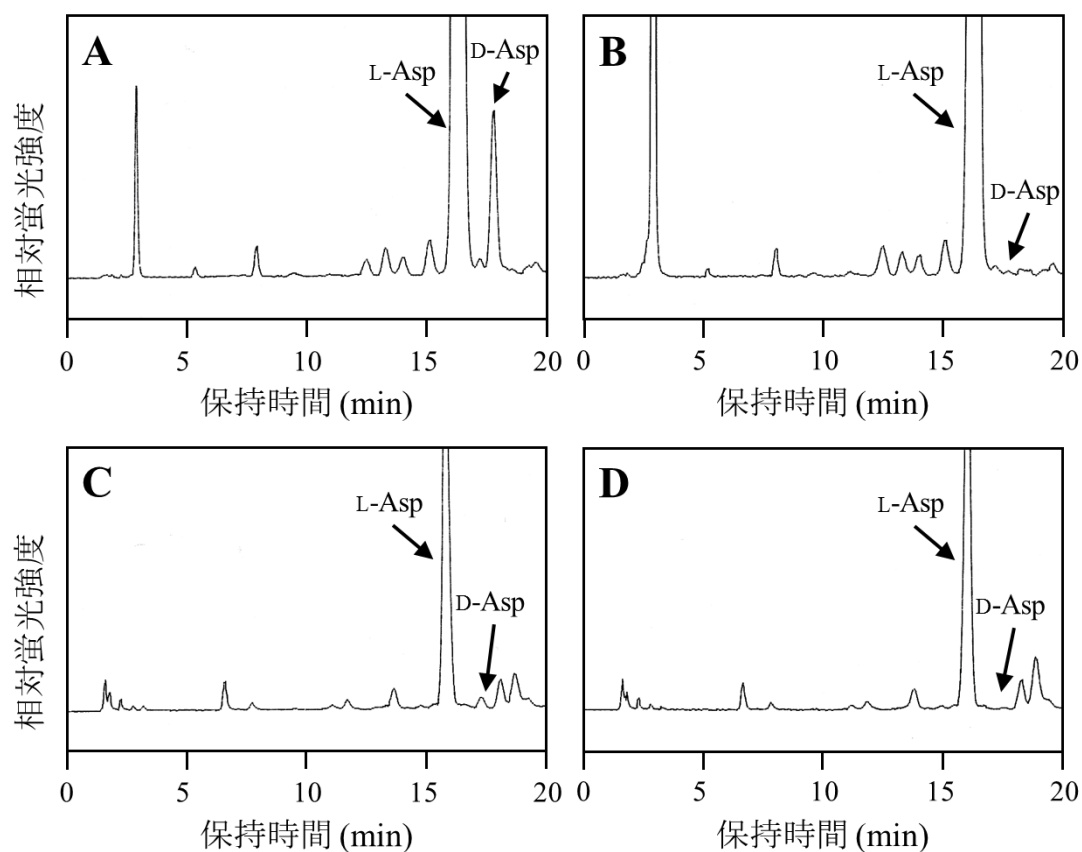


Fig. 2-8. GH₃ および HeLa 細胞の典型的なクロマトグラム

(OPA/Boc-L-Cys 試薬を用いてアミノ酸を蛍光誘導体化したもの)

A. DDO 未処理の GH₃ 細胞サンプルのクロマトグラム。

B. DDO 処理した GH₃ 細胞サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-8A のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

C. DDO 未処理の GH₃ 細胞培養上清サンプルのクロマトグラム。

D. DDO 処理した GH₃ 細胞培養上清サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-8C のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

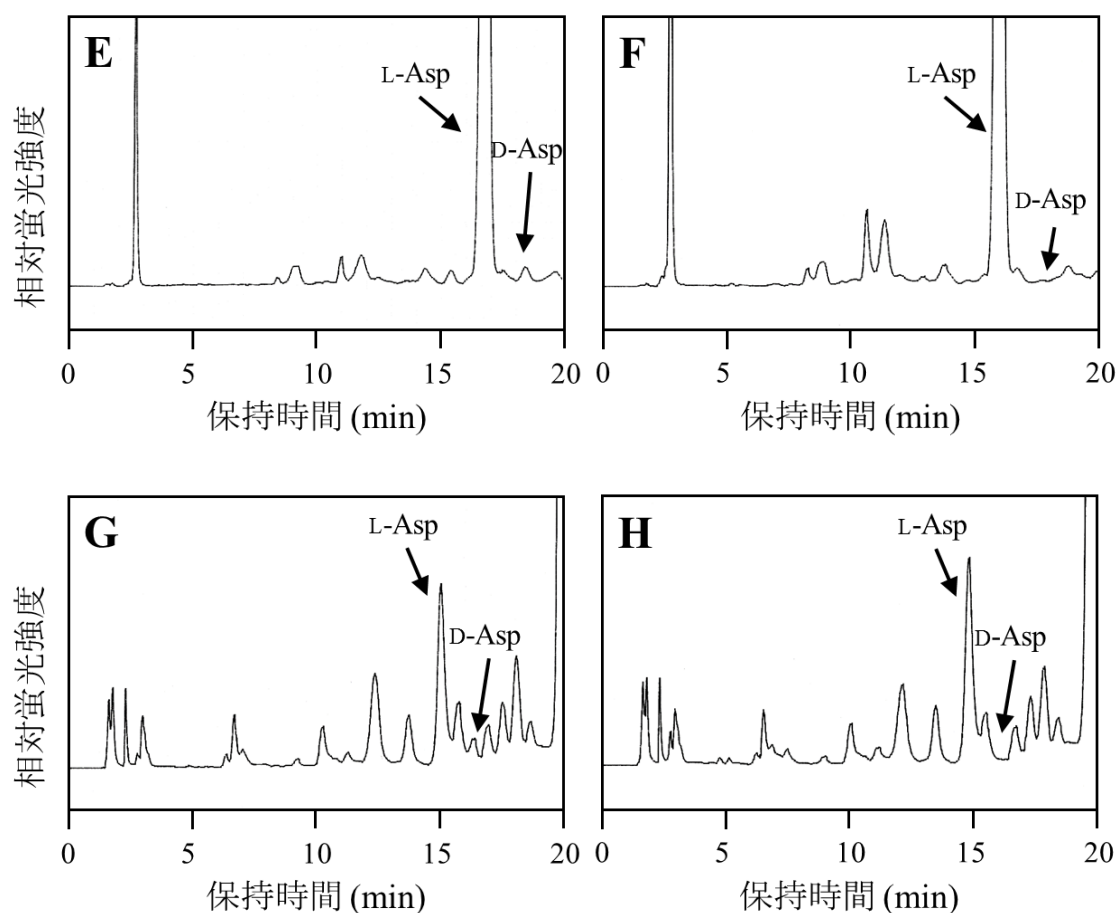


Fig. 2-8. GH₃ および HeLa 細胞の典型的なクロマトグラム

(OPA/Boc-L-Cys 試薬を用いてアミノ酸を蛍光誘導体化したもの)

E. DDO 未処理の HeLa 細胞サンプルのクロマトグラム。

F. DDO 未処理の HeLa 細胞サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-8E のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

G. DDO 未処理の HeLa 細胞培養上清サンプルのクロマトグラム。

H. DDO 未処理の HeLa 細胞培養上清サンプルのクロマトグラム。Fig. 2-8G のクロマトグラムで観察されていた D-Asp のピークがほとんど消失した。

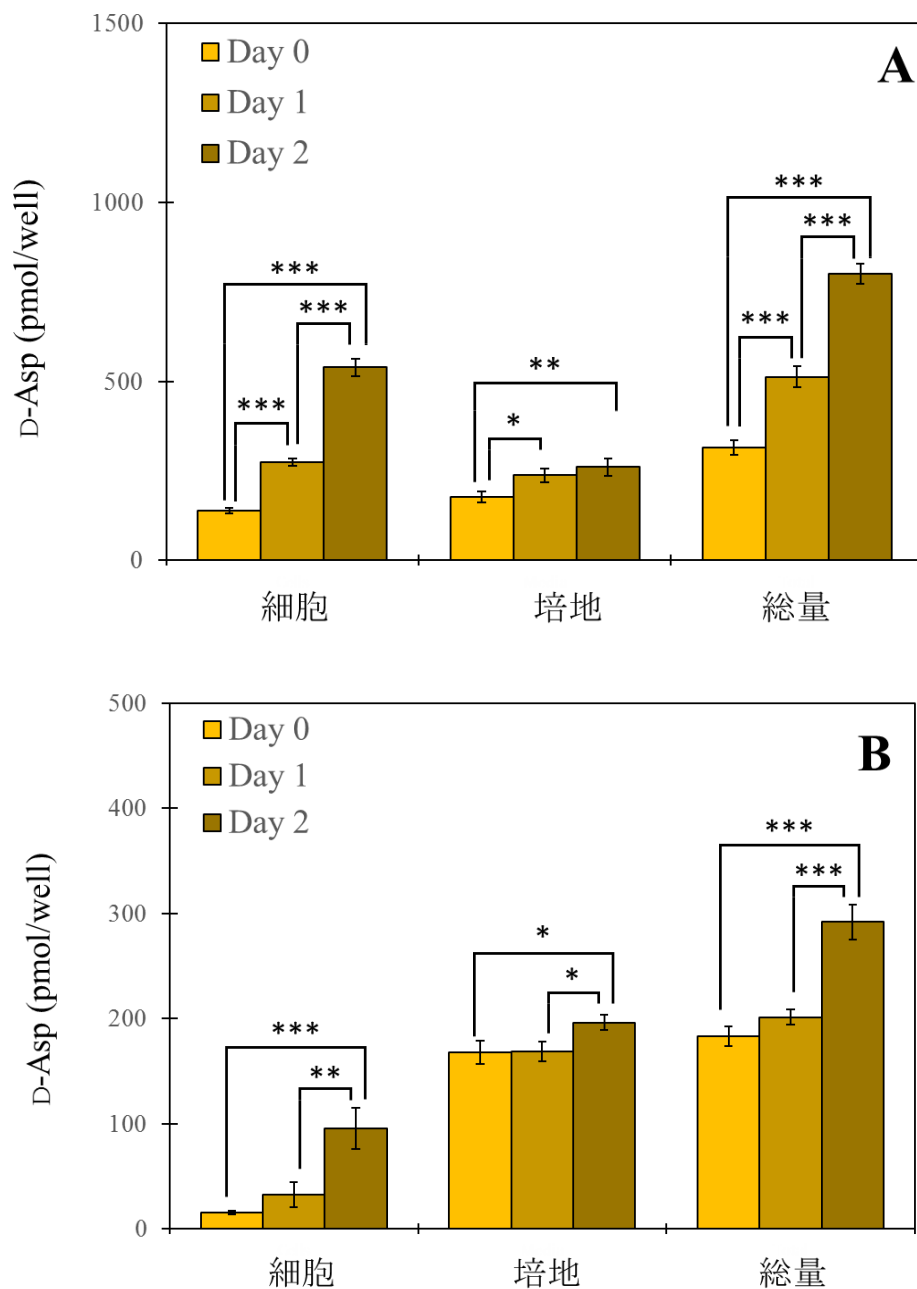


Fig. 2-9. GH₃ 細胞株および HeLa 細胞株における D-Asp 含量の経時的変化

外部から何も添加せずに培養した際の GH₃ 細胞および HeLa 細胞の D-Asp 含量を経時的に解析した。細胞中と培地中の D-Asp 含量を和した値を総量として示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。それぞれ P 値 <0.05 のとき*、 P 値 <0.01 のとき**、 P 値 <0.001 のとき***で示した。

A. GH₃ 細胞培養時の D-Asp 含量の経時変化

B. HeLa 細胞培養時の D-Asp 含量の経時変化

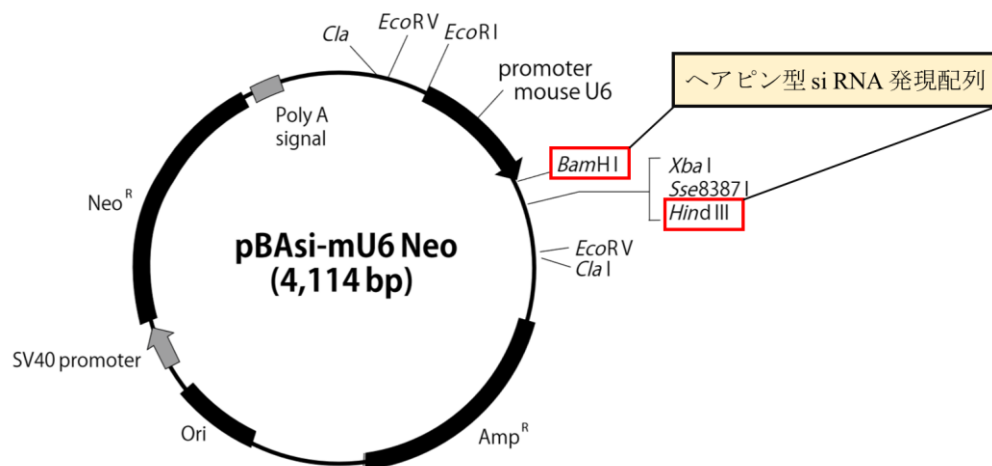


Fig. 2-10. 構築した si RNA 発現用プラスミド

ラット *Got111* を標的とするヘアピン型 si RNA 発現配列が、哺乳類発現用プラスミド pBAsi-mU6 Neo の *Bam*H I サイトと *Hind*III サイトの間にクローニングされている。

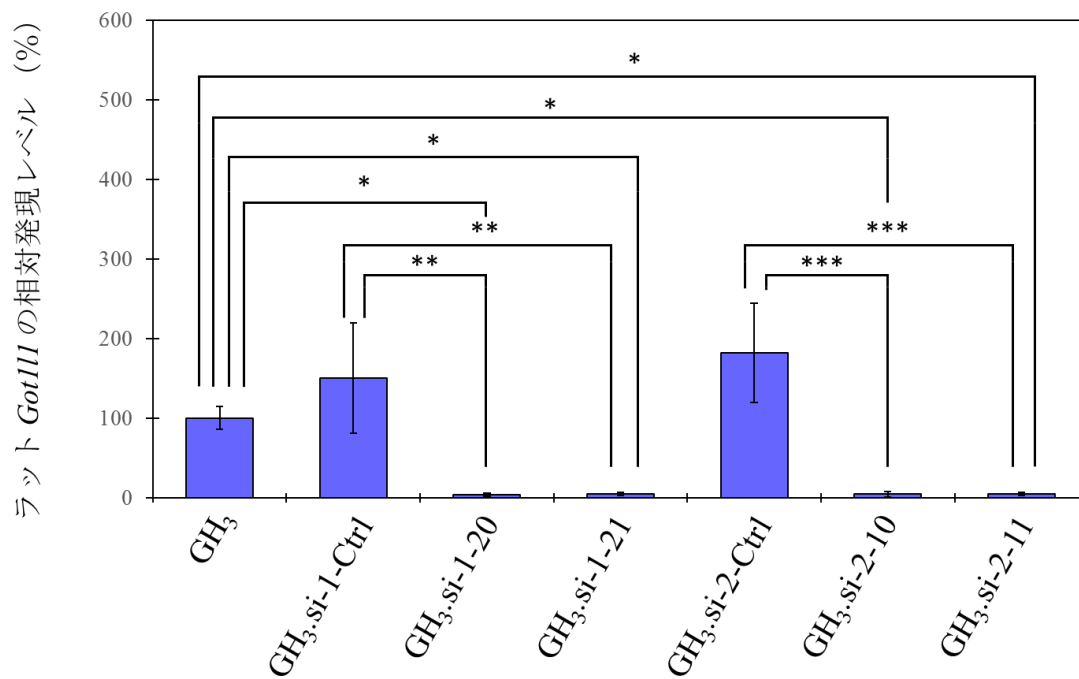


Fig. 2-11. 単離した GOT1L1 ノックダウンクローンにおけるラット *Got1l1* mRNA 発現レベル

GH₃ 細胞 (WT) と作製したクローンにおけるラット *Got1l1* mRNA の発現レベルを内部標準のラット *Gapdh* で補正し、WT を 100% としたときの相対値で示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差で示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。それぞれ P 値 < 0.05 のとき*、 P 値 < 0.01 のとき**、 P 値 < 0.001 のとき***で示した。

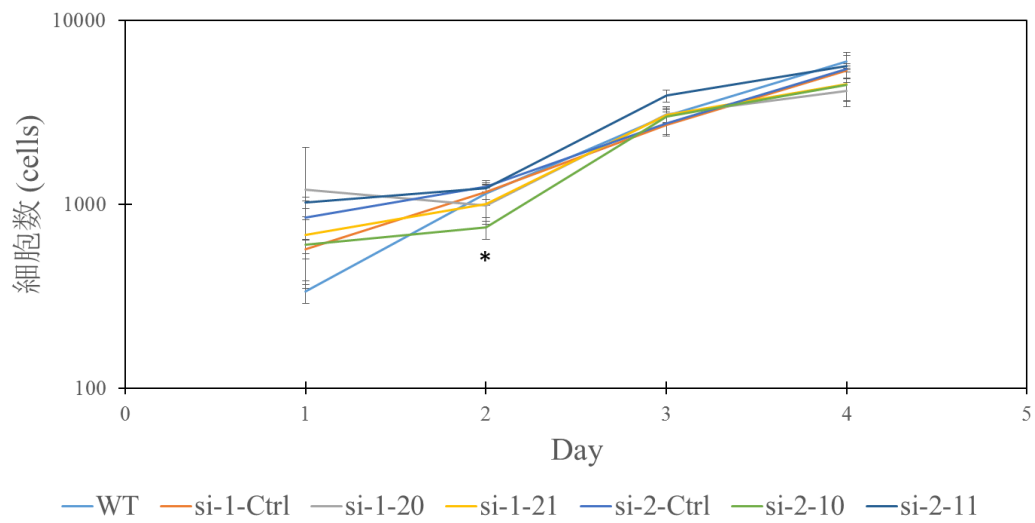


Fig. 2-12. ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株の細胞増殖アッセイ

GH₃ 細胞 (WT) と作製した各細胞株の Day 1 から Day 4 の細胞増殖曲線を示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。 P 値<0.05 のとき*で示した。

Day 2 で、GH₃ 細胞 (WT) と GH₃.si-2-10 (si-2-10) の間でのみ細胞数に有意差が見られたが、それ以外は WT と作製した各細胞株の間で細胞数に有意差は見られなかった。

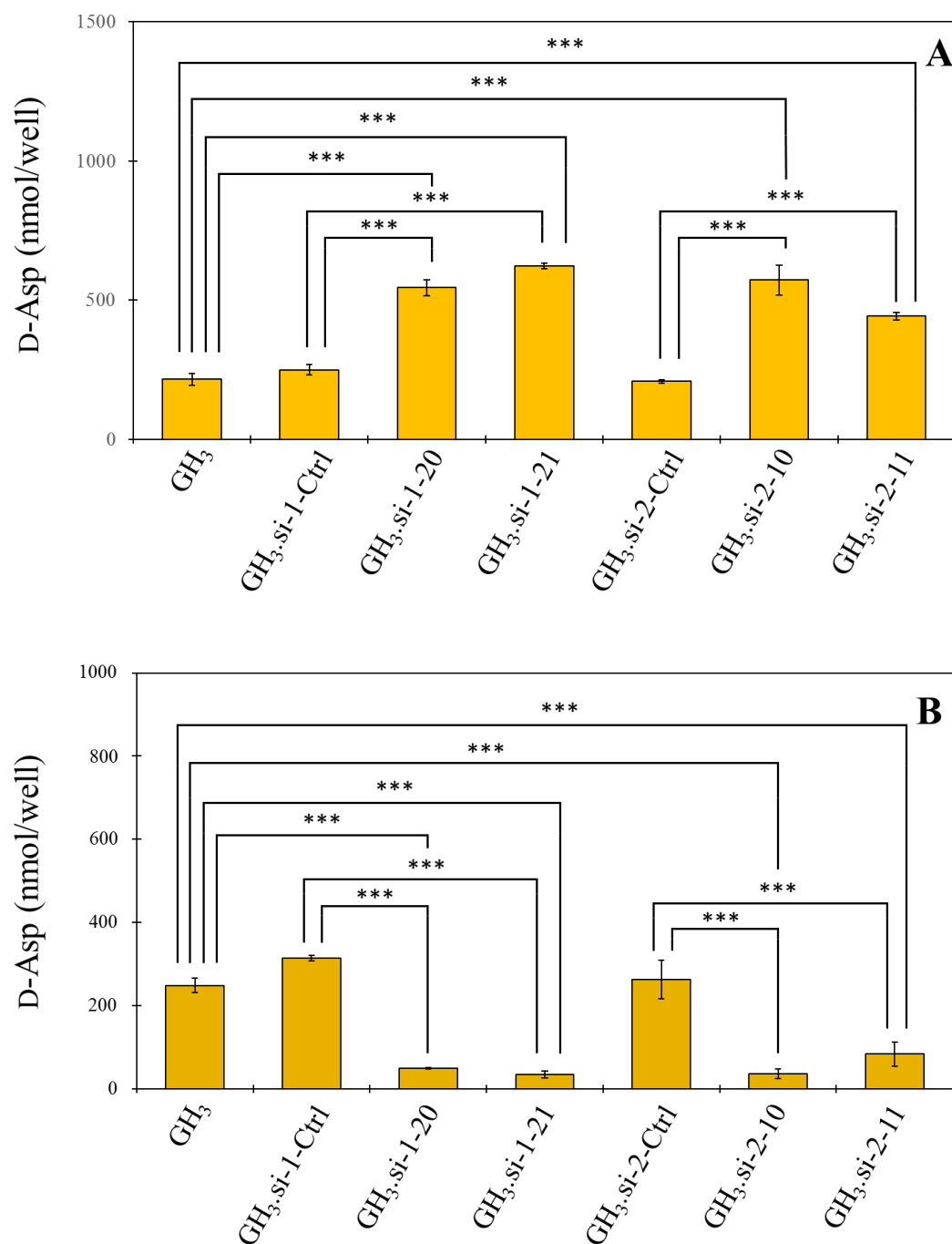


Fig. 2-13. ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株における培養時の Asp 含量
各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。それぞれ P 値<0.05 のとき*、 P 値<0.01 のとき**、 P 値<0.001 のとき***で示した。

A. 各細胞の細胞中 D-Asp 含量の定量結果

B. 各細胞の培地中 D-Asp 含量の定量結果

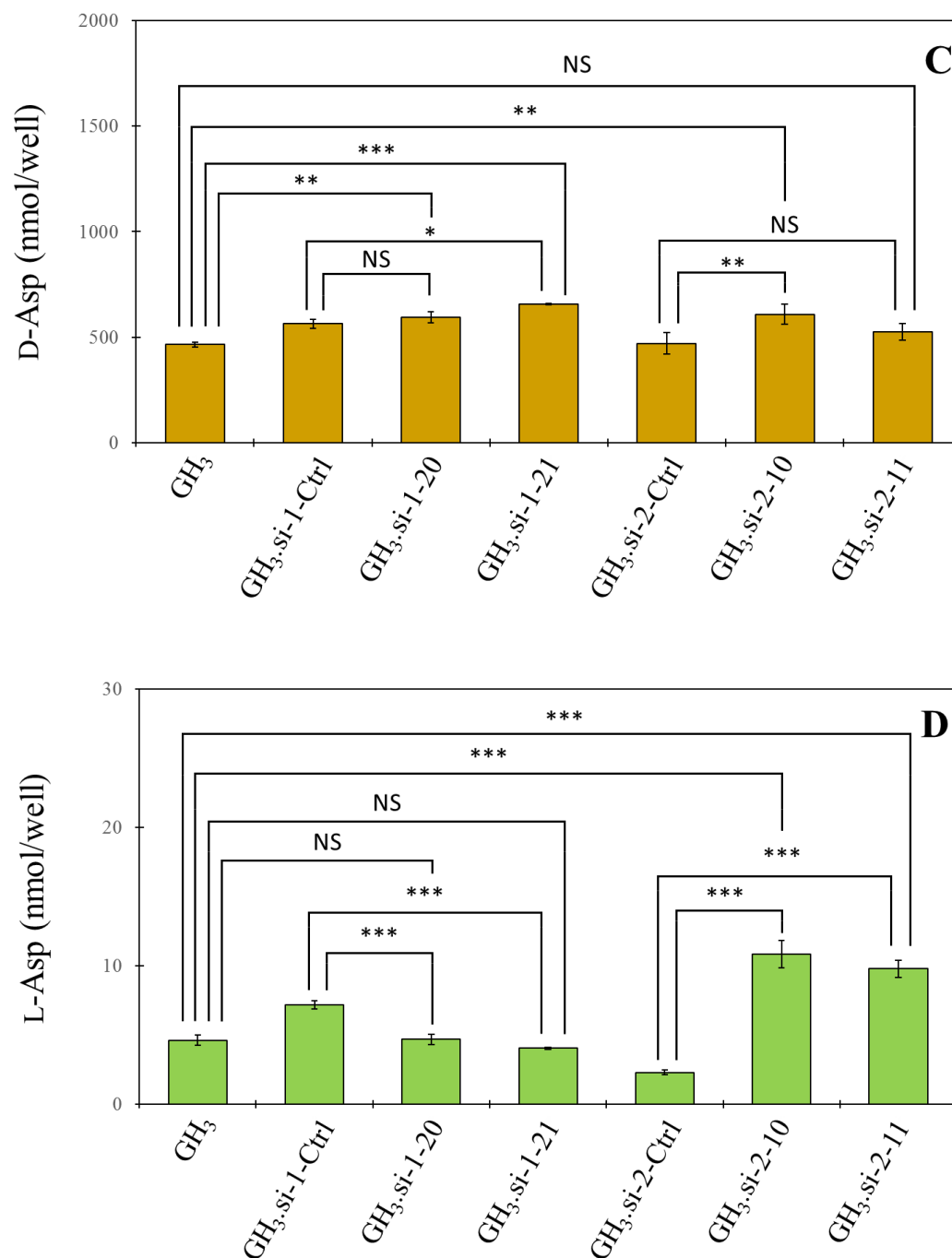


Fig. 2-13. ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株における培養時の Asp 含量
各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。それぞれ P 値<0.05 のとき*、 P 値<0.01 のとき**、 P 値<0.001 のとき***で示した。

C. 各細胞の細胞中および培地中 D-Asp 含量を足し合わせた D-Asp 総量

D. 各細胞の細胞中 L-Asp 含量の定量結果

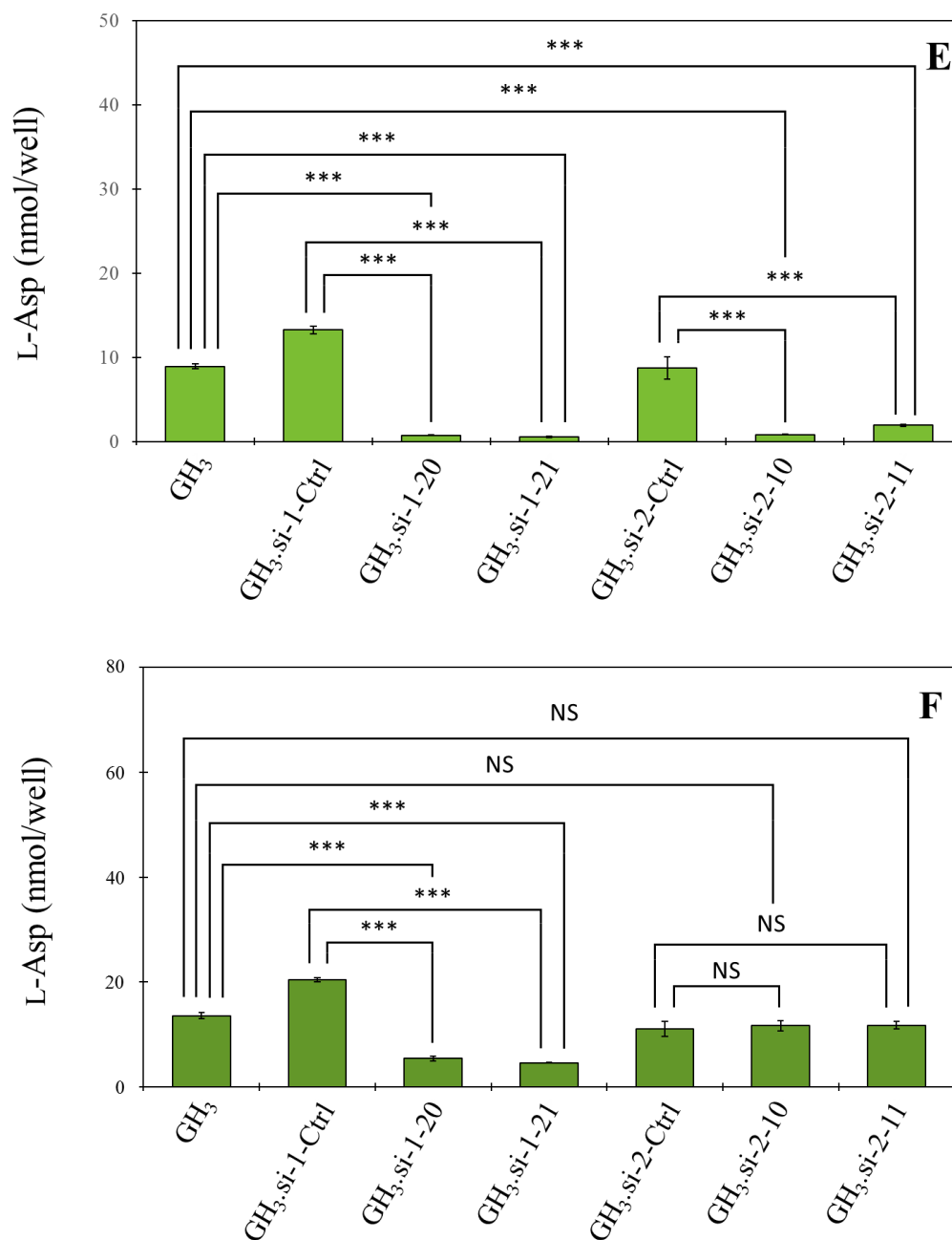


Fig. 2-13. ラット GOT1L1 ノックダウン GH₃ 細胞株における培養時の Asp 含量
各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。

統計解析は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。それぞれ P 値<0.05 のとき*、 P 値<0.01 のとき**、 P 値<0.001 のとき***で示した。

E. 各細胞の培地中 L-Asp 含量の定量結果

F. 各細胞の細胞中および培地中 L-Asp 含量を足し合わせた L-Asp 総量

第3章 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索

3-1 序論

前章で述べた結果から、GOT1L1 以外の酵素が哺乳類細胞における D-Asp 生合成を担っていることが示唆された。そこで、実際に哺乳類細胞において、D,L-Asp の相互変換を触媒するラセマーゼのような D-Asp の生合成を担う酵素の同定を念頭に置き、ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いて、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質の探索を行った (Fig. 3-1)。この際、D-Asp を立体特異的に分解し、副生成物に過酸化水素を生じる DDO を利用した。培養細胞に過酸化水素を暴露させると細胞死が引き起こされることが知られている。そこで、ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列⁴¹⁾を除去し、過酸化水素による細胞死をより容易に生じうるヒト組換え DDO を高発現させた細胞株を作製した。この培養細胞株を利用し、D-Asp の細胞内レベルが低下しなければ細胞が生存不可能なスクリーニング系を作製し、ヒト脳由来 cDNA ライブラリーから D-Asp 代謝関連タンパク質をスクリーニングした。

引き続いて、スクリーニングによって得られた 51 種のヒットタンパク質に対し、バイオインフォマティクスツールを用いた解析を行った。ClustalW^{42, 43)}を用いたアミノ酸配列の解析結果では、残念なことに、ヒットタンパク質のなかに既知の AspR や SerR と配列類似性の高いものは見られなかった。また、GenomeNet で提供されている Motif Search を利用し、Pfam データベースに対してヒットタンパク質に保存されているモチーフ配列の検索を行ったところ、既知の Asp ラセマーゼや SerR に保存されているモチーフ配列 (Pfam ID: PF01177, Asp/Glu/Hydantoin racemase および Pfam ID: PF00291, Pyridoxal-phosphate dependent enzyme)) が保存されているヒットタンパク質は見られなかった。

そこで、1 次構造は類似していないが、立体構造が類似しているタンパク質が選別されている可能性を考慮し、DALI pairwise comparison^{44, 45)}プログラムを用いて、既知の AspR およびヒト SerR とヒットタンパク質間の立体構造比較を行った。その結果、6 つのヒットタンパク質が対照タンパク質と立体構造が類似していることが示唆された。このなかで、最も対照タンパク質と立体構造の重なりが良く、基質の分子構造が似ており、かつアミノ酸代謝に関連する機能を有することが報告されているグリオキシル酸ヒドロキシピルビン酸還元酵素 (glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR)) を候補タンパク質として選別した。

次に、培養細胞での GRHPR の Asp 代謝における役割を解析するため、ヒト組換え GRHPR を安定的に高発現する HeLa 細胞株を作製して解析した。さらに、大腸菌で発現させて調製した組換え GRHPR を用いて機能解析を行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 試薬及び機器

D-Asp, L-Asp, ampicillin, puromycin dihydrochloride from *Streptomyces alboniger* (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA))

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), G418 disulfate, protease inhibitor cocktail, DEPC treated water, Pre-stained Protein Markers (Nacalai Tesque (Kyoto, Japan))

Fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA))

o-Phthalaldehyde (OPA), 100% methanol (for HPLC), boric acid, sodium acetate, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), imidazole, potassium phosphate, Giemsa Stain Solution, Ethachinmate (Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan))

Boc-L-cysteine (Novabiochem (Läufelingen, Switzerland))

100 mm tissue culture dish, collagen type I-coated 100 mm tissue culture dish, 60 mm tissue culture dish, 6 well tissue culture plate (Iwaki/Asahi Glass (Tokyo, Japan))

Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene TEST Tube (Corning (Corning, NY, USA))

MBS Mammalian Transfection Kit, pWL-neo (Agilent Technologies (Santa clara, CA, USA))

TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC (Madison, WI, USA))

Luria-Bertani (LB) medium (Merck (Darmstadt, Germany))

Rosetta(DE3)pLysS, pT7-Blue T-Vector (Novagen)

0.45 μ m Millex-LH filter (Milipore (Bedford, MA, USA))

Dialysis membrane (Viskase (Darien, IL, USA))

HisGraviTrap Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare UK, (Little Chalfont, UK))

0.45 μ m membrane filter (Sartorius (Göttingen, Germany))

Prominence® LC-20AT pump, Gradient Valve Kit for LC-20AD/20AT, Prominence® RF-20A Fluorescence detectors, C-R8A Integrator (Shimadzu (Kyoto, Japan))

Cica Geneous® Plasmid Prep Kit, Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μ m) (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i.d.), Mightysil RP-18 GP 5-4.6 (5 μ m) (5 μ m, 5 mm \times 4.6 mm i.d.), 100% acetonitrile (for HPLC) (Kanto Chemical (Tokyo, Japan))

RNeasy Mini Kit, RNase-Free DNase Set, QIAquick Gel Extraction Kit, EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN (Hilden, Germany))

SuperScript III RT, Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer, dNTPs (10 mM each), pRSET-B (Invitrogen (Carlsbad, CA, USA))

AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase, GeneAmp® dNTP Mix (Applied Biosystems (City of Foster City, CA, USA))

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD (Hercules, CA, USA))

Ligation kit ver2.1, EcoR I, HindIII, Kpn I, Nhe I, Not I, DH5 α , cDNA Library (Plasmid DNA)

Human Brain (Takara Bio (Shiga, Japan))

β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt (β -NADPH), β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form, monosodium salt (β -NADP⁺) (ORIENTAL YEAST CO., LTD. (Tokyo, Japan))

pIRESpuro3, pIRESneo3 (Clontech/Takara Bio (Shiga, Japan))

3-2-2 細胞培養

ヒト胎児腎由来培養細胞株 (HEK293)およびヒト子宮頸がん由来培養細胞株 (HeLa)は、終濃度 10%の FBS を添加した DMEM 培地で培養した。なお、細胞の培養には、通常のディッシュ／プレートを用いた。すべての培養細胞は、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。

3-2-3 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去したヒト組換え DDO 安定高発現培養細胞の作製

3-2-3-1 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去したヒト組換え DDO 発現プラスミドの構築

以前に当研究室で作製した HA タグが N 末に付加されたヒト DDO 発現用プラスミドである pT7-HA-hDDO を鋳型に、下記のプライマーを用いて PCR 反応を行い C 末端にある SNL 配列を除去したヒト DDO 配列を増幅した。プライマーは 5'-側に Nhe I 認識配列、3'-側に SNL 配列直前までのヒト DDO 塩基配列の直後に終始コドンと Not I 認識配列が付加されるように設計した。PCR 反応には、10 ng の鋳型プラスミド DNA、終濃度 200 μ M の GeneAmp® dNTP Mix、20 pmol のフォワードプライマー、20 pmol のリバープライマーおよび 2.5 U の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase を含む反応液を用い、94℃、30 秒の変性、54℃、60 秒のアニーリング、72℃、64 秒の伸長反応のサイクルを 30 サイクル繰り返した。

Forward primer	5'- GCT AGC CAC CAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC -3'
Reverse primer	5'- GCG GCC GCC TAC TTG GGA ATG GGG GTC CTG -3'

PCR 産物はアガロース電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲル抽出し、Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて pT7-Blue T-Vector に 4℃で一晩ライゲーションした。翌日、ライゲーション反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。青白セクションで得られた白いクローンを培養し、Cica Geneous® Plasmid Prep Kit を用いてプラスミド DNA (pT7-SNL(-)_HA-hDDO) を調製した。シーケンシングにより、得られたプラスミド DNA に挿入された配列が目的とする配列であることを確認した。pT7-SNL(-)_HA-hDDO を Nhe I および Not I による制限酵素処理し、SNL 配列を除去したヒト DDO をコードする DNA 断片を精製し、哺乳類細胞用組換えタンパク質発現プラスミドである pIRESpuro3 の Nhe I 認識配列と Not I 認識配列の間に挿入し、目的のプラスミド DNA (pIRESpuro-SNL(-)_HA-hDDO) を構築した。構築したプラスミド DNA を用いて、大腸菌

DH5 α を形質転換した。形質転換した大腸菌を培養し、EndoFree Plasmid Maxi Kit を用いてエンドトキシンプリーのプラスミド DNA を調製した。

3-2-3-2 SNL 配列を除去したヒト組換え DDO 安定高発現培養細胞株 (HEK293.SNL(-)_HA-hDDO) の単離

6 well plate に約 50%コンフルエントまで培養した HEK293 細胞に、前項で調製した SNL 配列を除去したヒト DDO 発現プラスミド 2.5 μg を TransIT®-LT1 試薬を用いて導入した。使用している pIRESpuro3 はピューロマイシン耐性遺伝子を持つ。そこで、導入して約 48 時間後から終濃度 5 $\mu\text{g/mL}$ のを含む培地で薬剤選択を行い、生存した各クローンを単離・培養後に細胞抽出液を調製した。抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロットの結果から、最も濃いバンドが検出されたクローン No. 2 を以降の実験に使用した。

3-2-4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニング

3-2-4-1 エンドトキシンプリー ヒト脳由来 cDNA ライブラリーの調製

本研究では、タカラバイオ社から市販されているプラスミド DNA 型のヒト脳由来 cDNA ライブラリーを使用した。この cDNA ライブラリーは、リンカープライマー法により構築されたベクターを、宿主 XL1-Blue MRF' にエレクトロポレーション法により導入して作成されたものである。作成されたライブラリーはプレート培養法を用いて 1 度だけ増幅された後、プラスミド DNA が抽出・精製された状態で市販されている。増幅前のクローン数 (Primary Library Size (Independent clone)) は 6.8×10^6 で、クローニング後の Average Insert Size は 1.0 kbp である。また、ベクターには pAPneo [GenBank Accession No. AB003468] が使用され、pAPneo は SV40 プロモーターを有するため哺乳動物細胞で発現可能である。

100 μL の大腸菌 DH5 α を購入した cDNA ライブラリー 10 ng で形質転換し、900 μL の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間回復培養した。同様の操作を 7 セット分行い、形質転換した大腸菌液をまとめ、さらに 3 mL の SOC 培地を加えることで 10 mL の大腸菌液とした。この大腸菌液を 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$ で終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地 100 枚に播種し、30°C で一晩培養した。100 μL の大腸菌 DH5 α を 10 ng のプラスミド DNA で形質転換させたときの形質転換効率は 1×10^8 transformants/ 1×10^{-6} μg plasmid DNA 以上である。したがって、この操作では Primary Library Size を十分にカバーできている。

$$\begin{aligned} & (1 \times 10^8 \text{ transformants}/1 \times 10^{-6} \mu\text{g plasmid DNA}) \times 10 \text{ ng plasmid DNA} \times 7 \\ & = 7 \times 10^6 \text{ transformants} \end{aligned}$$

翌日、コロニーを形成した各プレートに終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンを含む LB 液体

培地を加え、コンラージ棒を用いて大腸菌を回収した。回収した大腸菌液はスイングローターにより遠心（20℃、2,330×g、10 分間）し、上清を除去し、10 mL のアンピシリン添加 LB 培地に再懸濁した。調製した大腸菌の懸濁液から、製品のプロトコールに従い EndoFree Plasmid Maxi Kit を用いてエンドトキシンフリーのプラスミド DNA を調製した。

3-2-4-2 トランスフェクション回数の検討

cDNA ライブラリーの Primary Library Size を十分にカバーするトランスフェクション回数を求めるために、Chen らの論文⁴⁶⁾を参考に、トランスフェクション効率を求めた。この際、cDNA ライブラリーの作製に使用されている pAPneo を入手できなかったため、pAPneo と同様にネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド DNA (pWL-neo) を pAPneo の代替品として使用した。また、トランスフェクション試薬には MBS Mammalian Transfection Kit を用いた。

実験は、以下の手順で行った。まず、HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞を 100 mm dish (collagen type I coated) に 2.5×10^6 cells/dish で播種し (Day 0)、37℃で一晩培養した。翌日 (Day 1)、製品のプロトコールに従い MBS Mammalian Transfection Kit を使用して、20 µg のプラスミド DNA を 35℃、3% CO₂ の条件下で 3 時間暴露させ、細胞に導入した。48 時間後 (Day 3)、100 mm dish (collagen type I coated) にトランスフェクション後の細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。ディッシュへの付着効率を測定するディッシュは終濃度 5 µg/mL の puromycin を含む培地で、形質転換体を測定するディッシュは終濃度 800 µg/mL の G418 と終濃度 5 µg/mL の puromycin を含む培地で 2 週間培養した。培養後、ギムザ染色液を用いてコロニーを染色し、ディッシュに形成されたコロニー数を計測した。「形質転換体を測定するディッシュに形成されたコロニー数」を「ディッシュへの付着効率を測定するディッシュに形成されたコロニー数」で除すことで形質転換効率を求めたところ、16.9%であった。この結果より、以下の計算式から、必要なトランスフェクション回数を 17 回と算出した。

$$\begin{aligned}
 & \frac{(\text{プラスミド DNA のクローン数})}{(\text{トランスフェクションした細胞数}) \times \text{形質転換効率}} \\
 = & \frac{(7 \times 10^6)}{(2.5 \times 10^6 \text{ cells}) \times 0.169} \\
 \div & 16.6 \text{ (回)}
 \end{aligned}$$

3-2-4-3 HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞における D-Asp 薬剤選択濃度の決定

まず、HEK293 細胞 (WT) および HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞を 100 mm dish (collagen type I coated) に 2.5×10^6 cells/dish で播種し (Day 0)、37°Cで一晩培養した。翌日 (Day 1)、MBS Mammalian Transfection Kit を使用して、プラスミド DNA の代わりに滅菌水を使用してトランスフェクション操作を行った。48 時間後 (Day 3)、それぞれ 10 枚の 100 mm dish (collagen type I coated) に、トランスフェクションした細胞を 1/10 希釈で播種した。播種した細胞を、濃度の異なる (終濃度 20 mM~200 mM、10 点) D-Asp を添加した培地で 21 日間培養した。

HEK293 細胞 (WT) では、D-Asp の終濃度が 60 mM~200 mM で細胞がほとんど死滅し、D-Asp の終濃度が 20 mM~40 mM では細胞が生存した。HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞では、解析を行ったすべての濃度で細胞が死滅した。この結果より、HEK293 細胞 (WT) の生存に影響がなく、HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞のみで細胞が死滅する濃度として、D-Asp の終濃度を 40 mM にして薬剤選択を行うことにした。

3-2-4-4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニング

まず、HEK293.SNL(-)_HA-hDDO 細胞を 100 mm dish (collagen type I coated) に 2.5×10^6 cells/dish で播種し (Day 0)、37°Cで一晩培養した。翌日 (Day 1)、製品のプロトコールに従い MBS Mammalian Transfection Kit を使用して、20 µg のプラスミド DNA を 35°C、3% CO₂ の条件下で 3 時間暴露させ、細胞に導入した。48 時間後 (Day 3) から、終濃度 40 mM の D-Asp、800 µg/mL の G418 および 5 µg/mL の puromycin を含む培地で薬剤選択を行い、薬剤耐性を獲得し (プラスミド DNA が導入され)、かつ 40 mM D-Asp 存在下でも生存した細胞のクローンを単離・培養した。

細胞に導入された cDNA ライブラリー由来の配列の解析は以下のように行った。まず、2-2-5 「リアルタイム PCR を用いた発現解析」に記載したのと同様の方法で、単離されたクローンから total RNA を調製し、cDNA を合成した。cDNA ライブラリーのプラスミド DNA には挿入配列の上流に T7 promoter 配列、下流に T3 promoter 配列が存在している。そこで、調製した cDNA を鋳型に、フォワードプライマーに T7 promoter 配列、リバープライマーに T3 promoter 配列を使用して PCR 反応を行い、cDNA ライブラリー由来の配列を増幅した。PCR 反応には、1 µL の cDNA 溶液、終濃度 200 µM の GeneAmp® dNTP Mix、20 pmol のフォワードプライマー、20 pmol のリバープライマーおよび 2.5 U の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase を含む反応液を用い、96°C、30 秒の変性、50°C、60 秒のアニーリング、72°C、2 分間の伸長反応のサイクルを 40 サイクル繰り返した。

Forward primer (T7 promoter primer)	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
Reverse primer (T3 promoter primer)	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AG -3'

PCR 反応液をアガロース電気泳動し、増幅されたバンドを QIAquick Gel Extraction Kit を

用いてゲル抽出し、Ligation kit ver2.1 を使用して pT7-Blue T-Vector にライゲーションした。ライゲーション反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。青白セクションで得られた白いクローンを培養し、Cica Geneous® Plasmid Prep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出した。以下のプライマーを用いて、得られたプラスミド DNA をシーケンシングし、cDNA ライブラリー由来配列を解析した。

Forward primer (M13R-pUC(-40))	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'
Reverse primer (M13F-pUC(-40))	5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'

NCBI から提供されている BLAST ツール^{47, 48)} (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用して、ヒトのヌクレオチドコレクションに対し、得られた cDNA ライブラリー由来の塩基配列を問い合わせ配列とした BLAST 検索を行い、ヒットタンパク質を決定した。

3-2-5 ヒットタンパク質の解析

3-2-5-1 配列類似性の解析

ClustalW^{42, 43)} を用いて、アカガイ AspR (SbAspR)、アメフラシ AspR (AcAspR)、超好熱古細菌 AspR (PhAspR)⁴⁹⁾ およびヒト SerR (hSerR) と、ヒットタンパク質 (ヒットタンパク質) の配列類似性を解析した。

3-2-5-2 モチーフ配列の解析

GenomeNet (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Search を利用し、Pfam データベース⁵⁰⁾ に対してヒットタンパク質に保存されているモチーフ配列を検索した。

3-2-5-3 立体構造比較

立体構造比較に用いるタンパク質の立体構造は RCSB Protein Data Bank⁵¹⁾ (www.rcsb.org) から取得した。使用した立体構造の PDB ID は以下の表にまとめた。RCSB Protein Data Bank に立体構造が登録されていないタンパク質については、SWISS-MODEL^{52, 53, 54, 55)} (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いてホモロジーモデリングを行い予測された立体構造を用いた。ただし、COX1 および RPL23AP7 は立体構造が予測できなかったため、立体構造予測から除外した。DALI pairwise comparison^{44, 45)} プログラム (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_lite/start) を用いて、アカガイ AspR (SbAspR)、アメフラシ AspR (AcAspR)、超好熱古細菌 AspR (PhAspR) およびヒト SerR (hSerR) とヒットタンパク質間の立体構造比較を行った。この際、得られた Z-Score が 2 を超えるものを、統計的に有意であるとした。

タンパク質	PDB ID
hSerR	3L6B
PhAspR	1JFL
CABP1	2K7D
CAMK2B	3BHH
CFL1	1Q8G
CMTR1	4N4A
CST3	1G96
DMTN	1QZP、1ZV6
ENO2	3UCD
FURIN	4OMD
GNB1	4KFM
GRHPR	2WWR
GSTP1	14GS
MRPL37	3J7Y
NFASC	3P3Y

タンパク質	PDB ID
P4HB	4EKZ
PEX3	3AJB
PDK2	2BTZ
PFN1	1FIK
PTGDS	2WWP
PUM1	1M8Z
RAPGEFL1	2DHz
RPL23A	4V6X
RPL23AP7	4V6X
RPL27	4V6X
RPL34	4V6X
RPS13	4V6X
SH3KBP1	2BZ8
SQSTM1	1Q02
SYCP3	4CPC

3-2-6 N 末に His タグが付加されたヒト組換え GRHPR (His-hGRHPR) の調製

3-2-6-1 大腸菌用 His-hGRHPR 発現プラスミドの構築

以前に Rumsby らによって、cDNA クローンから作製したヒト組換え GRHPR タンパク質について報告されている⁵⁶⁾。この論文をもとに、HeLa 細胞の cDNA から N 末に His タグが付加されたヒト組換え GRHPR タンパク質発現用プラスミドを構築した。

初めに、2-2-5 「リアルタイム PCR を用いた発現解析」で記載したのと同様の方法で、HeLa 細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に Rumsby らの論文で使用されていたものと同じプライマーを用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応には、1 μL の cDNA 溶液、終濃度 200 μM の GeneAmp® dNTP Mix、10 pmol のフォワードプライマー、10 pmol のリバースプライマーおよび 1.25 U の AmpliTaq Gold® DNA Polymerase を含む反応液を用い、95℃、30 秒の変性、66℃、60 秒のアニーリング、72℃、90 秒の伸長反応のサイクルを 30 サイクル繰り返した。

Forward primer	5'- ATG GTA CCG GGT CGG CGG CTG -3'
Reverse primer	5'- GCA AGC TTC CCT TGG CTC TGC -3'

PCR 産物はアガロース電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲル抽出し、Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて pT7-Blue T-Vector に 4℃で一晩ライゲーションした。翌日、ラ

ライゲーション反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。青白セクションで得られた白いクローンを培養し、Cica Geneous® Plasmid Prep Kit を用いてプラスミド DNA を調製した。シーケンシングにより、得られたプラスミド DNA に挿入された配列を確認したところ、1st Met のコドン ATG の A を 1 番目とした際、579 番目の A が G に置換していた。解析を行ったすべてのクローンでこの変異が見られた。この変異は Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs309458 として登録されている SNP であり、アミノ酸配列の置換は生じないことから、579 番目の A が G に置換したままのプラスミドを以降の実験に使用した。得られたプラスミド DNA を Kpn I および HindIII で制限酵素処理し、同様の制限酵素処理を行った pRSET-B ベクターと Ligation kit ver2.1 を使用してライゲーションし、N 末に His タグが付加されたヒト GRHPR 組換えタンパク質発現プラスミド (pRSET-His-hGRHPR) を構築した。

3-2-6-2 N 末に His タグが付加されたヒト GRHPR (His-hGRHPR) の調製

作製したプラスミド pRSET-His-hGRHPR を用いて大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS を形質転換し、酵素の調製に用いた。前培養として、終濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンおよび 34 $\mu\text{g/mL}$ のクロラムフェニコールを含む 2 mL の LB 培地にフレッシュなコロニーを植菌し、37°C で一晚培養した。翌日、900 μL の前培養液を終濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンおよび 34 $\mu\text{g/mL}$ のクロラムフェニコールを含む 500 mL の LB 培地に添加し、 A_{620} が 0.6 になるまで 37°C で培養した。その後、18°C で 30 分間培養し、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を添加してから 18°C で一晚培養し、発現誘導した。翌日、遠心 (4°C、3,000 \times g、10 分間) により菌体を回収し、破菌バッファー (終濃度 20 mM イミダゾール、終濃度 500 mM 塩化ナトリウムを含む終濃度 20 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5)) を加えて懸濁し、超音波破碎により破菌した。破菌後、遠心 (4°C、12,000 \times g、20 分間) により得られた上清を可溶性画分として回収した。一旦凍結融解した可溶性画分から、オープンニッケルカラム (HisGraviTrap Ni Sepharose 6 Fast Flow) を用いて、製品のプロトコールに従ってヒト GRHPR のニッケルカラムによる精製を行った。イミダゾール濃度の異なる各溶出画分 (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 400 mM, 500 mM) に対し、12% SDS-PAGE とそれに引き続くクマシー染色により精製の純度を確認した。各画分に含まれるイミダゾールを除去するために、1 L の透析バッファー (20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)) に対する 4°C、2.5 時間以上の透析を 2 回行った。透析後に回収した溶液は -80 °C に保存した。

3-2-6-3 His-hGRHPR のグリオキシル酸還元酵素活性の測定

後述したように、GRHPR は NADPH を補酵素としてグリオキシル酸をグリコール酸に還元する反応とヒドロキシピルビン酸を D-グリセリン酸に還元する反応を触媒する。以前に Mdluli らが報告した⁵⁷⁾ のと同様の方法で、今回調製した His-hGRHPR の NADPH を補因子とした際のグリオキシル酸還元酵素活性を測定し、動力学的パラメータを解析した。なお、

ヒドロキシピルビン酸還元酵素活性については、基質阻害のため解析を断念した。今回調製した His-hGRHPR のグリオキシル酸を基質とした際の k_{cat}/K_m は 87.1 /s/mM であった。Mdluli らの報告しているグリオキシル酸を基質とした際の k_{cat}/K_m が 110 /s/mM であることから、今回調製した酵素は機能的な GRHPR であると判断し、以降の実験に用いた。

3-2-7 His-hGRHPR の Asp 代謝活性の測定

10 μ g の精製した His-hGRHPR、終濃度 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)、終濃度 2 mM の NADPH、終濃度 20 μ M のアミノ酸 (D-Asp あるいは L-Asp) を含む 120 μ L の反応液を調製し、37°C で 15 時間反応させた。反応終了後、480 μ L の 100%メタノールを加えてボルテックスにかけ、-80°C に 1 時間以上静置させた (アミノ酸のメタノール抽出および除タンパク)。遠心 (4°C、10,000 \times g、10 分間) し、上清 500 μ L を新しいチューブに移し、遠心エバポレーターで減圧乾固した。減圧乾固したサンプルの残渣を 50 μ L の 400 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0) で再溶解したものを 0.45 μ m フィルターでろ過し、HPLC 用サンプルとした。OPA/Boc-L-Cys 試薬を用い、2-2-3-2 「GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析」に記載したのとほぼ同様の方法でサンプルを蛍光誘導体化し、HPLC で定量した (使用した HPLC を島津製作所の Prominence® に変更した)。移動相の酢酸ナトリウムバッファーは pH 5.8 で調製した。

3-2-8 N 末に HA タグが付加されたヒト GRHPR 安定高発現 HeLa 細胞 (HeLa.HA-hGRHPR) の作製

3-2-8-1 哺乳類培養細胞用 HA-hGRHPR 発現プラスミドの構築

作製した大腸菌用 His-hGRHPR 発現プラスミド (pRSET-His-hGRHPR) を鋳型に以下のプライマーを用いて PCR 反応を行った。使用したフォワードプライマーは、5'-UTR 領域の代わりに Nhe I 認識配列、Kozac 配列、1st Met をコードする ATG コドンおよび HA タグを付加するように設計した。また、リバースプライマーは 3'-UTR 領域の代わりに Not I 認識配列を付加するように設計した。

Forward primer	5'- GCT AGC GTT TAA ACT TAA GCT TGC CAC CAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA CGC TGG TAC CAG ACC GGT GCG ACT CAT G -3'
Reverse primer	5'- GCG GCC GCC TAC AGC TTG AGT TCA CTA G -3'

PCR 産物はアガロース電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲル抽出し、Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて pT7-Blue T-Vector に 4°C で一晩ライゲーションした。翌日、ライゲーション反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。青白セレクションで得られた白いクローンを培養し、Cica Geneous® Plasmid Prep Kit を用いてプラスミド DNA (pT7-HA-hGRHPR) を調製した。シーケンシングにより、得られたプラスミド DNA に挿入さ

れた配列が目的とする配列であることを確認した。pT7-HA-hGRHPR の *Nhe* I および *Not* I による制限酵素処理後、目的とする DNA 断片を精製し、哺乳類細胞用組換えタンパク質発現プラスミドである pIRESneo3 の *Nhe* I 認識配列と *Not* I 認識配列の間に挿入し、目的のプラスミド DNA (pIRESneo- HA-hGRHPR) を構築した。構築したプラスミド DNA を用いて、大腸菌 DH5 α を形質転換した。形質転換した大腸菌を培養し、EndoFree Plasmid Maxi Kit を用いてエンドトキシンフリーのプラスミド DNA を調製した。

3-2-8-2 HeLa.HA-hGRHPR 安定高発現株の単離

100 mm dish に、HeLa 細胞を 5.5×10^5 cells/dish で播種し (Day 0)、一晩 37°C で培養した。翌日 (Day 1)、製品のプロトコールに従い MBS Mammalian Transfection Kit を使用して、20 μ g のプラスミド DNA を 35°C、3% CO₂ の条件下で 3 時間暴露させ、細胞に導入した。48 時間後 (Day 3) から、終濃度 800 μ g/mL の G418 を含む培地で薬剤選択を行い、薬剤耐性になったクローンを単離・培養した (HeLa.HA-hGRHPR)。細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットにより、HA タグが付加されたヒト GRHPR を高レベルで発現することが確認されたクローン No.1 を以降の実験に使用した。また、対照として、空ベクター (pIRESneo3) を導入した細胞も同様に作製した。

3-2-9 HA-hGRHPR 安定高発現株における細胞培養時 Asp 含量の HPLC による定量

作製した HeLa.HA-hGRHPR 細胞の培養時の Asp 含量を、2-2-3-2 「GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析」で述べた Day 2 サンプルの調製法とほぼ同様の方法で解析した (使用した HPLC を島津製作所の Prominence® に変更した)。

3-2-10 HA-hGRHPR 安定高発現株に対する Asp 添加実験

100 mm dish に、作製した HeLa.HA-hGRHPR 細胞を 1×10^6 cells/dish で播種し (Day 0)、一晩 37°C で培養した。翌日 (Day 1)、新鮮な 1080 μ L の培地で培地交換を行い、100 mM の D-Asp あるいは L-Asp を 120 μ L (終濃度 10 mM) 添加した。Asp 添加から 4 時間後に、細胞および培地のサンプルを回収した。サンプルの回収以降は、2-2-3-2 「GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析」で述べたのとほぼ同様の操作により、細胞中および培地中の Asp 含量を HPLC で定量した (使用した HPLC を島津製作所の Prominence® に変更した)。

3-3 結果

3-3-1 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索

3-3-1-1 ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去した組換えヒト DDO 安定高発現培養細胞の作製

Fig. 3-1 に示した戦略でヒト脳由来 cDNA ライブラリーから細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質のスクリーニングを行うため、ペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列⁴¹⁾を除去し、過酸化水素による細胞死をより容易に生じうるヒト組換え DDO を高発現させた細胞株を作製した。HA タグが N 末に付加されたペルオキシソーム局在化シグナル (SNL) 配列を除去したヒト組換え DDO 発現するプラスミドを構築し (Fig. 3-2A)、ヒト由来 HEK293 細胞に導入し薬剤選択によりクローンを単離した。単離したクローンの細胞抽出液に対して抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロットを行い、目的タンパク質の発現を確認した (Fig. 3-2B)。ウェスタンブロットの結果から、最も目的タンパク質の発現が強いクローン No. 2 を以降の実験に使用した。

3-3-1-2 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニング

SNL 配列を除去したヒト DDO を高発現させた培養細胞株に、タカラバイオ社から購入したヒト脳由来 cDNA ライブラリー (Fig. 3-3) を導入後、40 mM D-Asp 存在下で培養し、細胞内 D-Asp レベルを低下させる遺伝子が導入された可能性が高いクローンを単離した。単離したクローンから、導入された cDNA ライブラリー由来配列を解析し、細胞内 D-Asp レベルを低下させる可能性があるヒットタンパク質 51 種が得られた (Table 3-1)。これらのヒットタンパク質のほとんどはすでに機能が報告されていたものであり、機能未知のタンパク質は ZNF664 および ZFUSP の 2 種のみであった。この 2 種のタンパク質は、転写調節因子に多く見出される Zinc finger 構造を持つことから、酵素ではなく転写調節因子である可能性が高いと考えられた。

3-3-2 ヒットタンパク質の解析

3-3-2-1 配列類似性の解析

スクリーニングで得られた 51 種のヒットタンパク質に対して、報告されている機能のほかに、Asp ラセマーゼ (AspR) としての機能を有するかどうかをバイオインフォマティクスツールを用いて解析した。ラセマーゼであるアカガイ AspR (SbAspR)³⁴⁾、アメフラシ AspR (AcAspR)³⁶⁾、超好熱古細菌 AspR (PhAspR)⁴⁹⁾ およびヒト SerR (hSerR)¹²⁾ を

対照タンパク質として、ClustalW^{42, 43)} を用いて 51 種のヒットタンパク質と対照タンパク質の配列相同性を解析したところ、既知のラセマーゼと高い配列類似性を示すヒットタンパク質は見出されなかった。

3-3-2-2 モチーフ配列の解析

モチーフライブラリである Pfam に対し、対照タンパク質 (SbAspR、AcAspR、PhAspR および hSerR) およびヒットタンパク質中に保存されているモチーフ配列を検索した (Table 3-2-1~9)。しかしながら、対照タンパク質に保存されているモチーフ配列 (Table 3-2-1) を有するヒットタンパク質は見出されなかった (Table 3-2-2~9)。

3-3-2-3 立体構造比較

これまでの結果を受けて、1 次構造は類似していないが、立体構造・機能が類似しているタンパク質がヒットしている可能性を考慮し、DALI pairwise comparison プログラム^{44, 45)} を利用し、対照タンパク質 (SbAspR、AcAspR、PhAspR および hSerR) とヒットタンパク質間の立体構造比較を行った。51 種のヒットタンパク質のうち、CMTR1 (Cap methyltransferase 1)⁵⁸⁾、FURIN (Furin (paired basic amino acid cleaving enzyme))⁵⁹⁾、GRHPR (glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase)⁶⁰⁾、MTFMT (mitochondrial methionyl tRNA formyltransferase)⁶¹⁾、P4HB (prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide)⁶²⁾ および TTC3 (tetratricopeptide repeat domain 3)⁶³⁾ の 6 つのタンパク質で Z-Score が 2 を超える結果が得られ、対照タンパク質のいずれかと有意に配列が類似していた (Table 3-3)。分子可視化ソフト UCSF Chimera⁶⁴⁾ の Match Maker 機能を用い、これら 6 つのヒットタンパク質と対照タンパク質の立体構造を重ね合わせたところ (Fig. 3-4)、GRHPR (Fig. 3-4C) で、2 つのタンパク質の重なりが最も良い結果が得られた。また、ヒト GRHPR⁶⁰⁾ およびヒト Ser ラセマーゼ¹²⁾ とともに、2 つのドメイン間の界面で酵素反応が起こることが推測されている。また、ヒト GRHPR の生理的基質であるグリオキシル酸およびヒドロキシピルビン酸 (Fig. 3-5) と、D-Asp の分子構造が比較的類似していることから、ヒト GRHPR が D-Asp の代謝に関与する酵素である可能性が高いと考えられた。そこで、まず初めにヒト GRHPR の D,L-Asp 代謝における機能解析を行った。

3-3-3 ヒト GRHPR の D-Asp 代謝における機能解析

3-3-3-1 HA タグが付加されたヒト組換え GRHPR 安定高発現培養細胞株 (HeLa.HA-hGRHPR) の作製

ヒト GRHPR は、NADPH 依存的にグリオキシル酸をグリコール酸に還元する反応と、ヒドロキシピルビン酸を D-グリセリン酸に還元する反応を触媒する酵素であることが知られている (Fig. 3-5)^{56, 57)}。この酵素は 328 アミノ酸からなる約 40 kDa のタンパク質⁵⁶⁾ で、

細胞内では細胞質およびミトコンドリアに局在し、組織特異性は低く広範な組織に存在していることが報告されている。また、高シュウ酸尿症Ⅱ型の原因遺伝子の1つとして同定されている⁶⁵⁾。

ヒト培養細胞での GRHPR の Asp 代謝における機能解析を行うため、GRHPR 高発現培養細胞株を作製した (HeLa.HA-hGRHPR)。この際、スクリーニング時に用いた HEK293 細胞は、D-Asp の生合成に関する報告がないため、2-3-3 「GH₃ 細胞および HeLa 細胞における D-Asp 生合成の解析」で D-Asp の生合成を確認した HeLa 細胞を使用した。HA タグが N 末に付加されたヒト組換え GRHPR を発現するプラスミド (Fig. 3-6A) を構築後、HeLa 細胞に導入し薬剤選択によりクローンを単離した。また、コントロール細胞として、空ベクターを導入した細胞 (HeLa/EV) を作製した。作製した細胞の細胞抽出液に対して抗 HA タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行い、目的タンパク質の発現を確認した (Fig. 3-6B)。ウェスタンブロットの結果から、最も目的タンパク質の発現が強いクローン No. 1 を以降の実験に使用した。

3-3-3-2 HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の D,L-Asp 含量の定量

3-3-3-1 「HA タグが付加されたヒト組換え GRHPR 安定高発現培養細胞株

(HeLa.HA-hGRHPR) の作製」で作製した HeLa.HA-hGRHPR 細胞株の細胞中および培地中の D,L-Asp 含量を HPLC で定量した (Fig. 3-7)。コントロール細胞 (HeLa/EV) と比較して、ヒト GRHPR 高発現株 (HeLa.HA-hGRHPR) で D,L-Asp 含量が有意に低下していた。この結果から、GRHPR が、D,L-Asp を相互変換するラセマーゼではなく、D-Asp あるいは L-Asp の分解経路に関与する酵素であることが示唆された。

3-3-3-3 D,L-Asp を添加した HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の D,L-Asp 含量の定量

さらなる知見を得るために、作製したヒト GRHPR 高発現細胞株に対して、終濃度 10 mM の D-Asp または L-Asp を 4 時間曝露させた際の細胞および培地中の Asp 含量の変化を解析した (Table 3-4)。予想に反して、D-Asp を添加しても、HeLa/EV 細胞と HeLa.HA-hGRHPR 細胞間で D-Asp 含量に有意差は認められなかった。一方、興味深いことに、D-Asp 添加により細胞中の L-Asp 含量が HeLa.HA-hGRHPR 細胞で有意に低下していた。L-Asp を添加した際には、HeLa/EV 細胞と HeLa.HA-hGRHPR 細胞間で細胞内 L-Asp 含量に有意差は認められなかった。一方、L-Asp 添加により、培地中および総和の D-Asp 含量が HeLa.HA-hGRHPR 細胞で有意に低下していた。

3-3-3-4 His タグが付加されたヒト組換え GRHPR (His-hGRHPR) の調製

以前にヒト組換え GRHPR について報告した Rumsby らの論文⁵⁶⁾をもとに、HeLa 細胞の cDNA から N 末に His タグが付加されたヒト GRHPR 組換えタンパク質発現用プラスミドを構築した (Fig. 3-8A)。作製したプラスミドを用いて大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS を形質転換し

た。得られた大腸菌の培養液から可溶性画分を調製し、オープンニッケルカラムを用いて N 末に His タグが付加されたヒト組換え GRHPR を精製した。精製した酵素の純度を 12% SDS-PAGE とそれに引き続くクマシー染色により確認した (Fig. 3-8B) 400 mM 画分および 500 mM 画分において N 末に His タグが付加されたヒト GRHPR の推定分子量 (40,753 Da) に相当する位置に明確なバンドがほぼ単一な状態で検出された。以降の実験には、400 mM 画分の酵素を使用した。

3-3-3-5 His-hGRHPR の D,L-Asp に対する代謝活性の解析

より詳細な解析を行うために、ヒト組換え GRHPR を用いて、D-Asp および L-Asp に対する活性を調べた。反応液組成は報告されているグリオキシル酸還元 (GR) 活性およびヒドロキシピルビン酸還元 (HPR) 活性測定に用いられた組成をもとに若干の変更を加えた。具体的には、基質として D-Asp または L-Asp を用い、GR 反応および HPR 反応時の補因子である NADPH 存在下で、37°C、15 時間の酵素反応を行った。反応後の D-Asp または L-Asp 量を HPLC で測定し、酵素の代わりに透析バッファーを加えて反応を行ったコントロールを 100% とした際の相対値で示した (Fig. 3-9)。D-Asp を基質とした際、コントロールと比較してサンプルで D-Asp 量が有意に減少していた。また、L-Asp の生成は認められなかった (Fig. 3-10A)。一方、L-Asp を基質とした際は、コントロールとサンプル間で L-Asp 量に有意差は認められなかった。また、D-Asp の生成も認められなかった (Fig. 3-10B)。これらの結果から、ヒト GRHPR は D-Asp を立体特異的に分解する活性を有することが示唆された。

3-4 考察

3-4-1 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質の探索により、細胞内 D-Asp レベルを低下させる機能を持つ可能性が高いヒットタンパク質 51 種が得られた。

3-4-2 ヒットタンパク質の解析

得られたヒットタンパク質の中に、既知の AspR やヒト SerR と配列類似性の高いものは見出されなかった。また、AspR やヒト SerR に保存されているモチーフ配列 (Table 3-2-1) が保存されているものも見出されなかった (Table 3-2-2~9)。これらの結果から、1 次構造が異なるが、立体構造や機能が類似しているタンパク質がヒットしている可能性を考えた。そこで立体構造比較により、これらのヒットタンパク質から既知の AspR および SerR と立体構造が有意に類似しているタンパク質を 6 種選別した。これら 6 種のタンパク質のうち、立体構造比較に用いた既知のラセマーゼとの立体構造の類似性が最も高く (Table 3-3、Fig. 3-4C)、報告されている基質の分子構造が D-Asp と比較的類似している GRHPR について、D-Asp 代謝への関与を解析した。

3-4-3 ヒト GRHPR の Asp 代謝における機能解析

GRHPR 高発現細胞株では、コントロール細胞と比較して D-Asp および L-Asp 含量が有意に低下していた。また、大腸菌で発現させて精製したヒト組換え GRHPR は立体特異的な D-Asp 分解活性を示した。これらの結果から、本実験に用いた Hela 細胞には L-Asp から D-Asp を合成する未同定の経路が存在し、GRHPR 高発現細胞株では、GRHPR による D-Asp の分解により低下した D-Asp レベルを、L-Asp から補う機構が働き、その結果として D-Asp および L-Asp 含量ともに低下した可能性が考えられる。また、GRHPR が触媒する D-Asp 分解反応の生成物については、HPLC での測定時に用いた蛍光誘導体化試薬 OPA/Boc-L-Cys がアミノ酸のアミノ基に反応することで蛍光誘導体を形成することから、脱アミノ化反応による生成物である可能性が考えられる。これらの点に関しては、さらに詳細な解析が必要である。

GRHPR 高発現細胞株に D-Asp または L-Asp を添加した際、コントロール細胞と比較して、添加した Asp 含量に有意差が認められなかった一方で、添加した Asp の鏡像異性体 (D-Asp 添加時の L-Asp、および L-Asp 添加時の D-Asp) 含量の減少が観察された。GRHPR は、細胞内 D-Asp レベルを低下させるタンパク質としてスクリーニングされたタンパク質であるので、D-Asp 添加時には、D-Asp の分解反応による D-Asp 含量の低下が見られると予想していた。予想に反する結果が得られた理由としては、用いた細胞株をスクリーニングの際の HEK293 から HeLa 細胞に変更したこと、および D-Asp の曝露条件がスクリーニングの際とは異なる点などが考えられる。今後、HEK293 細胞を用いて GRHPR 高発現株を作製し、同

様の実験を行う必要があると思われる。また、スクリーニング時には細胞を終濃度 40 mM の D-Asp に 1~2 カ月程度曝露させたが、HeLa 細胞を用いた Asp 添加実験では終濃度 10 mM の D-Asp に 4 時間曝露させた。スクリーニング時の方が、より高濃度で長期間 D-Asp に曝露していたため、GRHPR の発現が誘導され、より強く活性が発揮されていた可能性が考えられる。また、まったく別の可能性として、スクリーニング時、GRHPR は D-Asp の分解によって細胞内 D-Asp レベルを低下させることで細胞を生存させたわけではなく、DDO 反応の生成物である過酸化水素を分解することで細胞の生存に寄与したということが挙げられる。GRHPR は NADPH を補因子に基質を還元する酵素であるため、基質の代わりに過酸化水素が還元される可能性が考えられる。今後、より詳細な実験を行う必要があると考えられる。一方、GRHPR が、上記以外の活性を有する可能性も考えられる。工業的な D-アミノ酸の合成に用いられている微生物由来の酵素⁶⁶⁾の 1 つに、*meso*-diaminopimelate dehydrogenase (*meso*-DAPDH) があるが、この *meso*-DAPDH は、Fig. 3-11 に示した反応を触媒する酵素で、NADP⁺ 依存的に *meso*-2,6-diaminopimelate の D 型不斉炭素に特異的な脱アミノ化反応、および、その逆反応である NADPH 依存的な L-2-amino-6-oxopimelate への還元的アミノ化反応を D 体特異的に行う。この D 体特異的な還元的アミノ化反応を利用した、2-オキソ酸からの 1 ステップ D-アミノ酸合成法が、Vedha-Peters ら⁶⁷⁾のグループなど、いくつかのグループから報告されている。興味深いことに、*Ureibacillus thermosphaericus* DAPDH⁶⁸⁾のアミノ酸配列 (GenBank ID: BAK86217) を問い合わせ配列とし、ヒトのデータベースに対して DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)⁶⁹⁾ 検索を行うと、検索結果の 1 つに GRHPR のアミノ酸配列が得られた (*E*-value: 1.00E-04, Identity: 12%)。今後、GRHPR が *meso*-DAPDH に類似した活性を有するかどうかについても検討する必要があると考えられる。

本研究では、スクリーニングされた D-Asp 代謝関連タンパク質のなかで、まずはヒト SerR やアカガイやアメフラシなどの真核生物型 AspR と類似した機能をもつ酵素タンパク質を念頭に解析を進め、GRHPR を第一の候補としてを解析を行った。選別されたタンパク質の中には、これまでの知見とは全く異なる新奇な機能を発揮して D-Asp 含量に影響するタンパク質をコードするものや機能性遺伝子をコードするものなどが存在する可能性もあり、さらに解析を進める必要があると考えられる。

3-5 図表

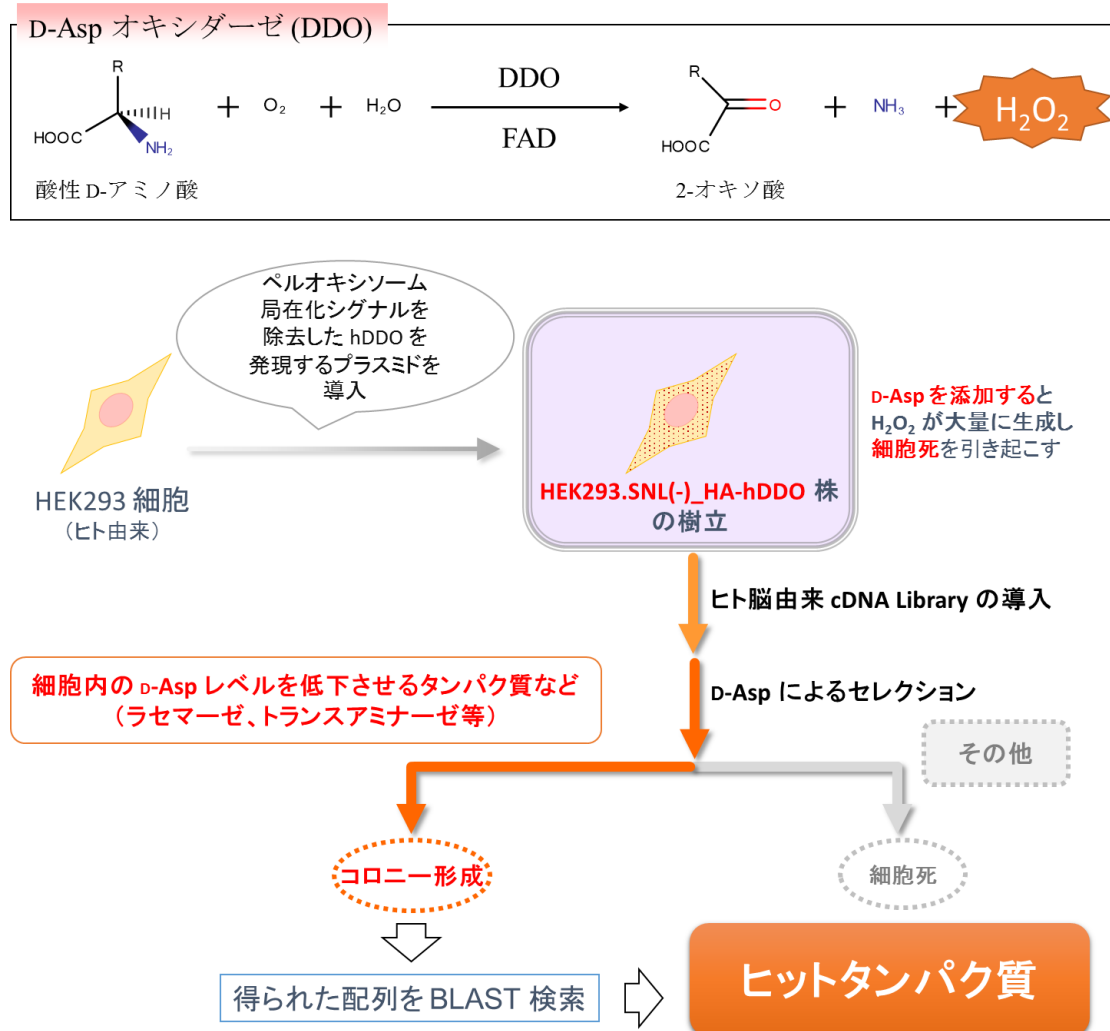


Fig. 3-1. ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質探索のフローチャート

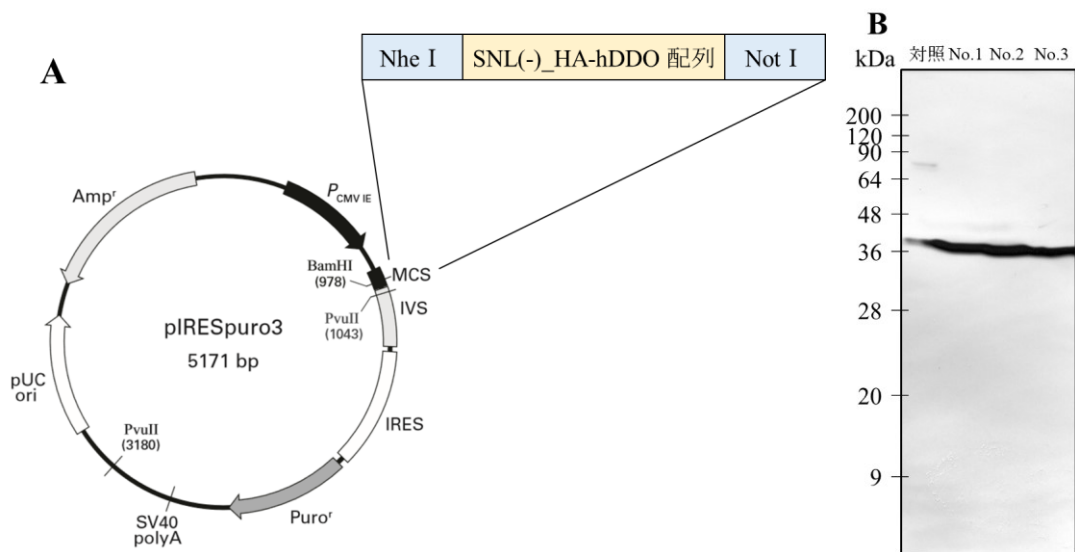


Fig. 3-2. ペルオキシソーム局在化シグナル（SNL）配列を除去したヒト組換え DDO 安定高発現培養細胞株の単離

A. 作製した pIRESpuro-SNL(-)-HA-hDDO のプラスミドマップ

B. 単離した HEK293.SNL(-)-HA-hDDO 細胞株のウェスタンブロットによるタンパク質発現の確認

単離した培養細胞株の細胞抽出液を 12% SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行った。以前に当研究室で作製された HA タグが付加されたヒト DDO を高発現する HeLa.HA-hDDO 細胞株由来の細胞抽出液を対照に用いた。1 次抗体に抗 HA タグ抗体（マウス）を用い、2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を使用した。

対照および単離した細胞株（クローン No.1～3）において、N 末に HA タグが付加された SNL 配列を除いたヒト DDO の推定分子量（38,618 Da）に相当する位置に明確なバンドが確認された。

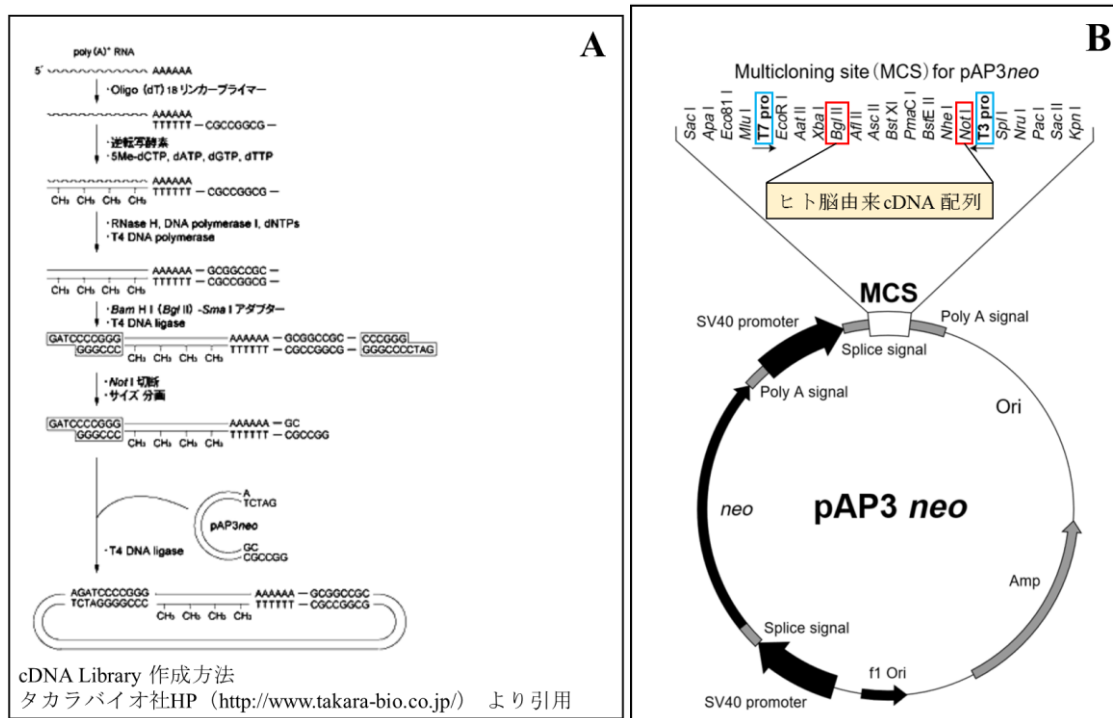


Fig. 3-3. 使用したヒト脳由来 cDNA ライブラリー

A. 購入したヒト脳由来 cDNA ライブラリー作成方法。タカラバイオ社 HP (<http://www.takara-bio.co.jp/>) より引用

B. ヒト脳由来 cDNA 配列が挿入されたベクターのプラスミドマップ

プラスミド構築時に使用した制限酵素サイトを赤枠で示した。また、各クローンの導入配列の解析時の PCR のプライマーには青枠で示した T7 プロモーター配列と T3 プロモーター配列を用いた)

Table 3-1. ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを利用した D-Asp 代謝関連タンパク質のスクリーニングにより得られたヒットタンパク質の一覧

ヒットタンパク質	
ATP6V0A1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a1
CABP1	calcium binding protein 1
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta
CFL1	cofilin 1 (non-muscle)
CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2
CMTR1	cap methyltransferase 1
COX1	cytochrome c oxidase subunit I
COX2	cytochrome c oxidase subunit II
COX3	cytochrome c oxidase subunit III
COX6B1	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1
CST3	cystatin C
DMTN	dematin actin binding protein
ENO2	enolase 2
FURIN	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
GRHPR	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
KIF3A	kinesin family member 3A
MAPK8IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
MRPL37	mitochondrial ribosomal protein L37
MT-ATP6	mitochondrially encoded ATP synthase 6
MT-ND2	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2
MTFMT	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase
MYL12B	myosin light chain 12B
NACC2	NACC family member 2, BEN and BTB (POZ) domain containing
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
NCAN	neurocan
NDUFB7	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B7
NFASC	neurofascin
P4HB	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3
PKD2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
PFN1	profilin 1
PTGDS	prostaglandin D2 synthase
PUM1	pumilio RNA binding family member 1
RAPGEFL1	Rap guanine nucleotide exchange factor like 1
RPL23A	ribosomal protein L23a
RPL23AP7	ribosomal protein L23a pseudogene 7
RPL27	ribosomal protein L27
RPL34	ribosomal protein L34
RPS13	ribosomal protein S13
SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1
SLC46A1	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1
SNCB	synuclein beta
SNCG	synuclein gamma
SQSTM1	sequestosome 1
SYCP3	synaptonemal complex protein 3
TMED10	transmembrane p24 trafficking protein 10
TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3
ZNF664	zinc finger protein 664
ZUFSP	zinc finger with UFM1-specific peptidase domain

Table 3-2-1. 対照タンパク質中のモチーフ配列一覧

生物種	酵素名	PLP 依存性	Pfam ID	Pfam ID Description
<i>P. horikoshii</i> (超好熱古細菌)	AspR	PLP 非依存	PF01177	Asp/Glu/Hydantoin racemase
アカガイ	AspR	PLP 依存	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
アメフラシ	AspR	PLP 依存	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme
ヒト	SerR	PLP 依存	PF00291	Pyridoxal-phosphate dependent enzyme

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、対照タンパク質 (*P. horikoshii* (超好熱古細菌) AspR、アカガイ AspR、アメフラシ AspR および ヒト SerR) のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-2. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
ATPV0A1	PF01496	V-type ATPase 116kDa subunit family
CABP1	PF00036	EF hand
	PF13405	EF-hand domain
	PF13499	EF-hand domain pair
	PF13833	EF-hand domain pair
	PF13202	EF hand
	PF14658	EF-hand domain
	PF10591	Secreted protein acidic and rich in cysteine Ca binding region
	PF08479	POTRA domain, ShlB-type
	PF12763	Cytoskeletal-regulatory complex EF hand
CAMK2B	PF00069	Protein kinase domain
	PF08332	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II Association
	PF07714	Protein tyrosine kinase
	PF14534	Domain of unknown function (DUF4440)
	PF13474	SnoaL-like domain
	PF12680	SnoaL-like domain
	PF01636	Phosphotransferase enzyme family
	PF13577	SnoaL-like domain
	PF06293	Lipopolysaccharide kinase (Kdo/WaaP) family
CFL1	PF00241	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
	PF14766	Replication protein A interacting N-terminal
	PF05405	Mitochondrial ATP synthase B chain precursor (ATP-synt_B)
CHCHD2	PF06747	CHCH domain
	PF09849	Uncharacterized protein conserved in bacteria (DUF2076)

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-3. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
CMTR1	PF01728	FtsJ-like methyltransferase
	PF01585	G-patch domain
	PF12656	DEXH-box splicing factor binding site
	PF01331	mRNA capping enzyme, catalytic domain
	PF01068	ATP dependent DNA ligase domain
	PF00397	WW domain
COX1	PF00510	Cytochrome c oxidase subunit III
COX2	PF00510	Cytochrome c oxidase subunit III
COX3	PF00510	Cytochrome c oxidase subunit III
COX6B1	PF02297	Cytochrome oxidase c subunit VIb
	PF06747	CHCH domain
CST3	PF00031	Cystatin domain
DMTN	PF02209	Villin headpiece domain
ENO2	PF00113	Enolase, C-terminal TIM barrel domain
	PF03952	Enolase, N-terminal domain
	PF13378	Enolase C-terminal domain-like
	PF07476	Methylaspartate ammonia-lyase C-terminus
	PF01188	Mandelate racemase / muconate lactonizing enzyme, C-terminal domain
FURIN	PF00082	Subtilase family
	PF01483	Proprotein convertase P-domain
	PF03302	Giardia variant-specific surface protein
	PF04010	Protein of unknown function (DUF357)
GNB1	PF00400	WD domain, G-beta repeat
	PF08662	Eukaryotic translation initiation factor eIF2A
	PF11094	Membrane-associated tegument protein
	PF04508	Viral A-type inclusion protein repeat

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-4. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
GRHPR	PF02826	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain
	PF00389	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, catalytic domain
	PF03446	NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase
	PF03807	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent
	PF01488	Shikimate / quinate 5-dehydrogenase
	PF07991	Acetohydroxy acid isomeroreductase, catalytic domain
	PF00106	short chain dehydrogenase
	PF08659	KR domain
	PF00899	ThiF family
	PF02254	TrkA-N domain
GSTP1	PF00043	Glutathione S-transferase, C-terminal domain
	PF02798	Glutathione S-transferase, N-terminal domain
	PF14497	Glutathione S-transferase, C-terminal domain
	PF13410	Glutathione S-transferase, C-terminal domain
	PF13417	Glutathione S-transferase, N-terminal domain
KIF3A	PF00225	Kinesin motor domain
MAPK8IP3	PF09744	JNK_SAPK-associated protein-1
	PF05565	Siphovirus Gp157
MRPL37	PF07147	Mitochondrial 28S ribosomal protein S30 (PDCD9)
MT-ATP6	PF00119	ATP synthase A chain
MT-ND2	PF00361	NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I), various chains
	PF06444	NADH dehydrogenase subunit 2 C-terminus
MTFMT	PF00551	Formyl transferase
	PF02911	Formyl transferase, C-terminal domain

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-5. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
MYL12B	PF00036	EF hand
	PF13499	EF-hand domain pair
	PF13405	EF-hand domain
	PF13833	EF-hand domain pair
	PF13202	EF hand
	PF03672	Uncharacterised protein family (UPF0154)
	PF14658	EF-hand domain
	PF08976	Domain of unknown function (DUF1880)
	PF10591	Secreted protein acidic and rich in cysteine Ca binding region
	PF02826	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain
NACC2	PF00651	BTB/POZ domain
	PF10523	BEN domain
NCAM1	PF07679	Immunoglobulin I-set domain
	PF13895	Immunoglobulin domain
	PF00047	Immunoglobulin domain
	PF13927	Immunoglobulin domain
	PF07686	Immunoglobulin V-set domain
	PF00041	Fibronectin type III domain
	PF08205	CD80-like C2-set immunoglobulin domain
	PF07654	Immunoglobulin C1-set domain
	PF02480	Alpha herpesvirus glycoprotein E
	PF13908	Wnt and FGF inhibitory regulator

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-6. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
NCAN	PF00193	Extracellular link domain
	PF00059	Lectin C-type domain
	PF00084	Sushi domain (SCR repeat)
	PF00008	EGF-like domain
	PF07686	Immunoglobulin V-set domain
	PF02535	ZIP Zinc transporter
	PF05966	Chordopoxvirus A33R protein
	PF09096	Baseplate structural protein, domain 2
	PF07974	EGF-like domain
NDUFB7	PF05676	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit (NDUFB7)
	PF08583	Cytochrome c oxidase biogenesis protein Cmc1 like
NFASC	PF07679	Immunoglobulin I-set domain
	PF13895	Immunoglobulin domain
	PF00041	Fibronectin type III domain
	PF13927	Immunoglobulin domain
	PF00047	Immunoglobulin domain
	PF13882	Bravo-like intracellular region
	PF07686	Immunoglobulin V-set domain
	PF08205	CD80-like C2-set immunoglobulin domain
	PF06832	Penicillin-Binding Protein C-terminus Family
P4HB	PF00085	Thioredoxin
	PF13848	Thioredoxin-like domain
	PF13899	Thioredoxin-like
	PF13098	Thioredoxin-like domain
	PF13905	Thioredoxin-like
	PF07912	ERp29, N-terminal domain
	PF00578	AhpC/TSA family
	PF08534	Redoxin
	PF05202	Recombinase F1p protein
	PF07449	Hydrogenase-1 expression protein HyaE

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-7. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
PEX3	PF04882	Peroxin-3
PDK2	PF10436	Mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase
	PF02518	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase
	PF13589	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase
PFN1	PF00235	Profilin
PTGDS	PF00061	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family
	PF03973	Triabin
	PF11032	Apolipoprotein M (ApoM)
PUM1	PF00806	Pumilio-family RNA binding repeat
RAPGEFL1	PF00617	RasGEF domain
	PF00788	Ras association (RalGDS/AF-6) domain
RPL23A	PF03939	Ribosomal protein L23, N-terminal domain
	PF00276	Ribosomal protein L23
	PF14690	zinc-finger of transposase IS204/IS1001/IS1096/IS1165
RPL23AP7	PF03939	Ribosomal protein L23, N-terminal domain
	PF00276	Ribosomal protein L23
	PF14690	zinc-finger of transposase IS204/IS1001/IS1096/IS1165
RPL27	PF01199	Ribosomal protein L34e
	PF14421	A distinct subfamily of CDD/CDA-like deaminases
RPL34	PF01199	Ribosomal protein L34e
	PF14421	A distinct subfamily of CDD/CDA-like deaminases
RPS13	PF08069	Ribosomal S13/S15 N-terminal domain
	PF00312	Ribosomal protein S15
	PF00292	'Paired box' domain
SH3KBP1	PF14604	Variant SH3 domain
	PF00018	SH3 domain
	PF07653	Variant SH3 domain
	PF10267	Predicted transmembrane and coiled-coil 2 protein

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-8. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
SLC46A1	PF07690	Major Facilitator Superfamily
	PF02233	NAD(P) transhydrogenase beta subunit
SNCB	PF01387	Synuclein
SNCG	PF01387	Synuclein
	PF14318	Mononegavirales mRNA-capping region V
	PF10703	Molybdenum cofactor biosynthesis protein F
	PF01442	Apolipoprotein A1/A4/E domain
	PF14643	Domain of unknown function (DUF4455)
	PF02009	Rifin/stevor family
	PF14013	MT0933-like antitoxin protein
SQSTM1	PF00569	Zinc finger, ZZ type
	PF00564	PB1 domain
SYCP3	PF04803	Cor1/Xlr/Xmr conserved region
	PF10275	Peptidase C65 Otubain
TMED10	PF01105	emp24/gp25L/p24 family/GOLD
TTC3	PF13414	TPR repeat
	PF13639	Ring finger domain
	PF00515	Tetratricopeptide repeat
	PF07719	Tetratricopeptide repeat
	PF00097	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
	PF13923	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
	PF13424	Tetratricopeptide repeat
	PF12678	RING-H2 zinc finger
	PF14634	zinc-RING finger domain
	PF13431	Tetratricopeptide repeat
	PF13432	Tetratricopeptide repeat
	PF13181	Tetratricopeptide repeat

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-2-9. ヒットタンパク質中のモチーフ配列一覧

タンパク質名	Pfam ID	Pfam ID Description
ZNF664	PF13465	Zinc-finger double domain
	PF00096	Zinc finger, C2H2 type
	PF13894	C2H2-type zinc finger
	PF13912	C2H2-type zinc finger
	PF09723	Zinc ribbon domain
	PF00130	Phorbol esters/diacylglycerol binding domain (C1 domain)
	PF12773	Double zinc ribbon
	PF12171	Zinc-finger double-stranded RNA-binding
	PF07975	TFIIH C1-like domain
	PF01096	Transcription factor S-II (TFIIS)
ZUFSP	PF07910	Peptidase family C78
	PF13894	C2H2-type zinc finger
	PF05605	Drought induced 19 protein (Di19), zinc-binding
	PF12874	Zinc-finger of C2H2 type
	PF09992	Predicted periplasmic protein (DUF2233)

Genome Net (<http://www.genome.jp/>) で提供されている Motif Finder プログラムを用い、ヒットタンパク質のアミノ酸配列中に保存されているモチーフ配列を解析した。この際、データベースには Pfam を指定した。

Table 3-3. DALI pairwise comparison ^{44, 45)} プログラムにより対照タンパク質と構造が類似していると判断されたヒットタンパク質

	Z-Score			
	VS PhAspR	VS SbAspR	VS AcAspR	VS hSerR
CMTR1	1.8	1.8	2.1*	1.6
FURIN	2.1*	2.1*	2.2*	5.3*
GRHPR	5.6*	5.0*	5.2*	5.6*
MTFMT	3.3*	2.9*	3.1*	2.6*
P4HB	1.2	1.1	0.9	2.1*
TTC3	0.3	0.3	0.2	2.9*

対照タンパク質のうち、PhAspR、SbAspR および AcAspR は、それぞれ超好熱古細菌、アカガイおよびアメフラシの AspR を表し、hSerR はヒト SerR を表す。Z-Score が 2 を超えるものを立体構造が有意に類似しているとした。*は Z-Score が 2 を超えていることを表す。

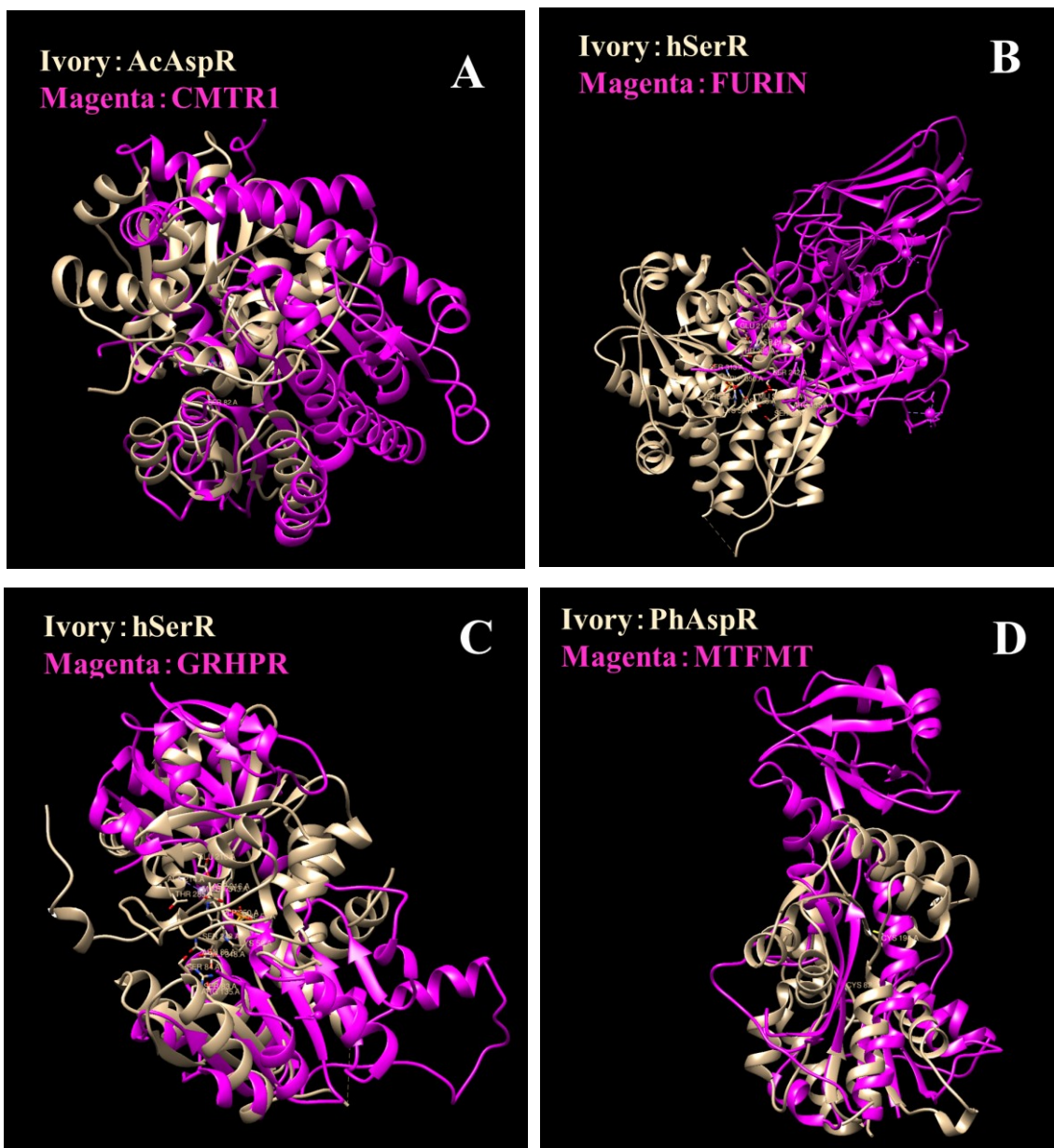


Fig. 3-4. 立体構造比較により選別されたヒットタンパク質と対照タンパク質の立体構造比較

分子可視化ソフト UCSF Chimera⁶⁴⁾ (The Chimera home page, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) の Match Maker 機能により、ヒットタンパク質 (マゼンタ) と対照タンパク質 (アイボリー) の立体構造を重ね合わせた。なお、対照タンパク質は、各タンパク質との立体構造比較で最も高い Z-Score を示したものを使用している。

- A. CMTR1 と AcAspR の立体構造を重ね合わせた図。
- B. FURIN と hSerR の立体構造を重ね合わせた図。
- C. GRHPR と hSerR の立体構造を重ね合わせた図。
- D. MTFMT と PhAspR の立体構造を重ね合わせた図。

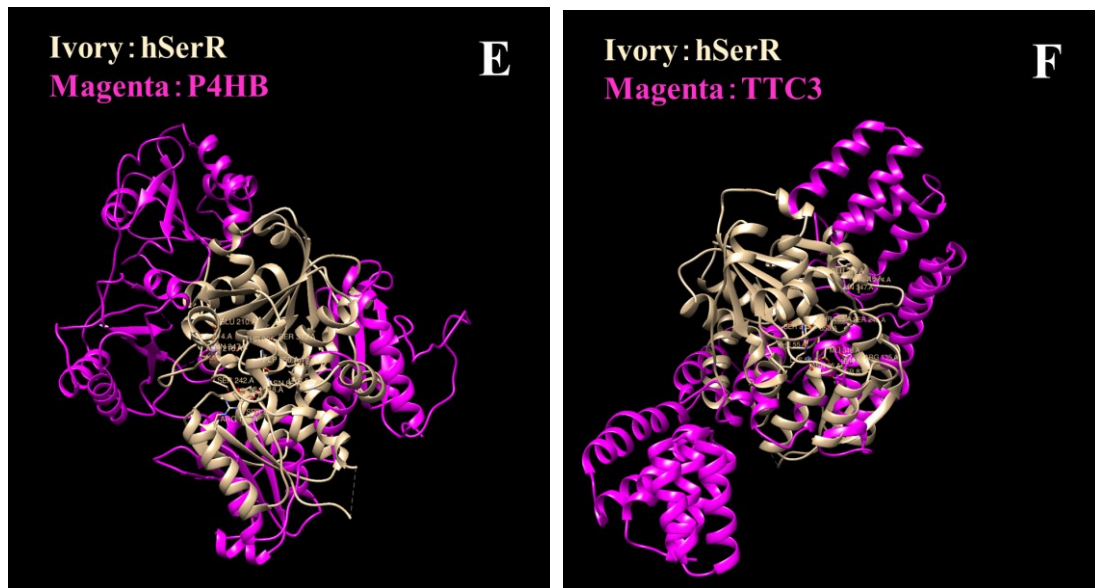


Fig. 3-4. 立体構造比較により選別されたヒットタンパク質と対照タンパク質の立体構造比較

分子可視化ソフト UCSF Chimera ⁶⁴⁾ (The Chimera home page, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) の Match Maker 機能により、ヒットタンパク質 (マゼンタ) と対照タンパク質 (アイボリー) の立体構造を重ね合わせた。なお、対照タンパク質は、各タンパク質との立体構造比較で最も高い Z-Score を示したものを使用している。

E. P4HB と hSerR の立体構造を重ね合わせた図。

F. TTC3 と hSerR の立体構造を重ね合わせた図。

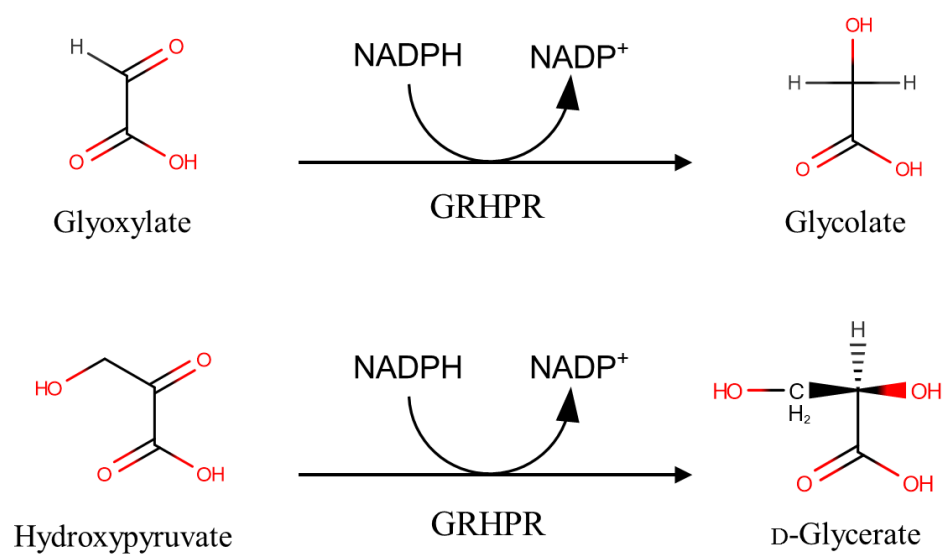


Fig. 3-5. 報告されているヒト GRHPR の反応

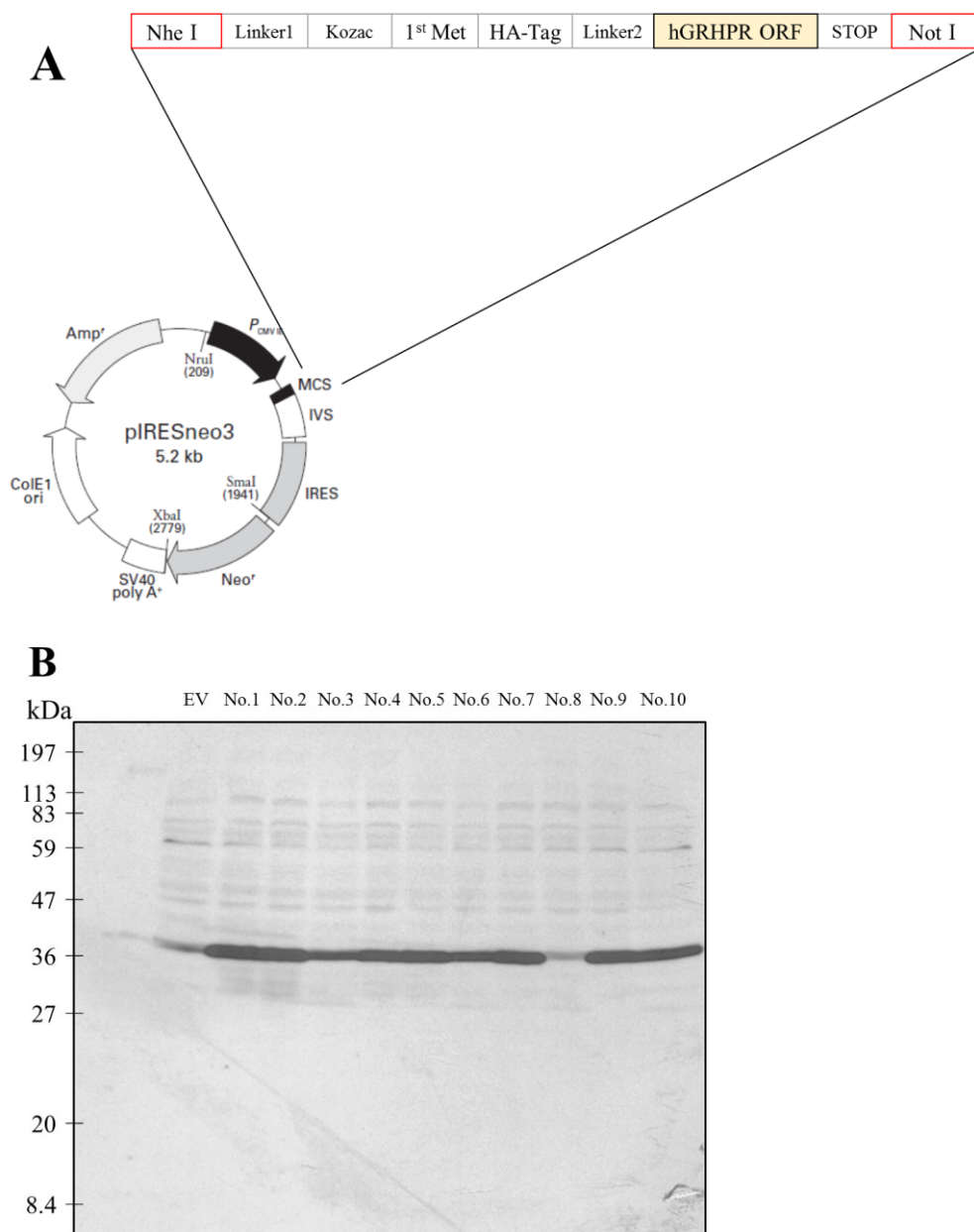


Fig. 3-6. HA タグが付加されたヒト組換え GRHPR 安定高発現培養細胞株の単離

A. 作製した pIRESneo-HA-hGRHPR のプラスミドマップ

B. 単離した HeLa.HA-hGRHPR 細胞株のウェスタンブロットによるタンパク質発現の確認

単離した培養細胞株の細胞抽出液を 12% SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行った。1 次抗体に抗 HA タグ抗体（マウス）を用い、2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を使用した。EV は空ベクターを導入した細胞のサンプルを示す。

単離した細胞株（クローン No.1～7, 9, 10）において、N 末に HA タグが付加されたヒト GRHPR の推定分子量（36,911 Da）に相当する位置に明確なバンドが確認された。以降の実験ではクローン No.2 を使用した。

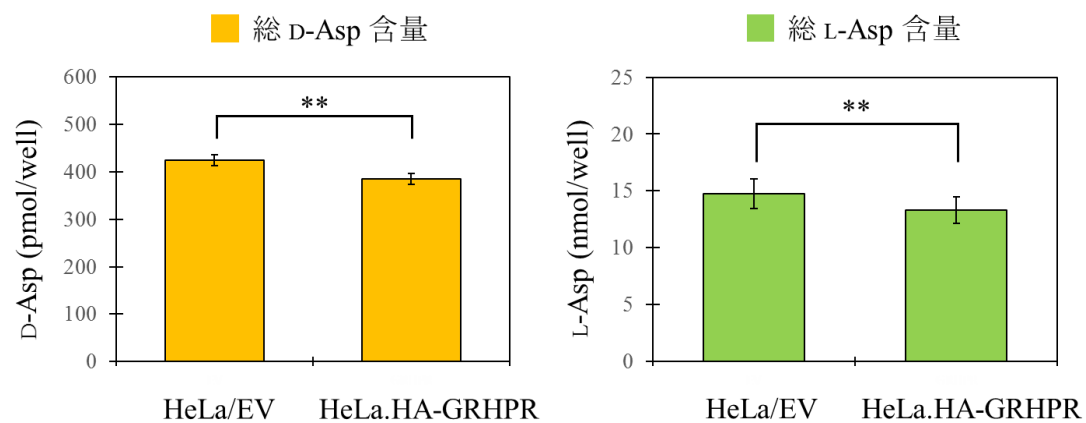


Fig. 3-7. HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の Asp 含量

HA タグが付加されたヒト GRHPR を高発現する細胞株である HeLa.HA-hGRHPR および対照である空ベクターを導入した HeLa/EV の細胞中と培地中の Asp 含量の総和を示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。スチューデントの t 検定により統計処理を行った。** は P 値 < 0.01 を表す。

Table 3-4. Asp を添加した HeLa.HA-hGRHPR 細胞培養時の Asp 含量

A

		L-Asp 添加	D-Asp 添加
細胞	HeLa/EV	22.1 ± 1.1 nmol / dish	11.6 ± 0.8 nmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	19.7 ± 0.6 nmol / dish	9.0 ± 1.0 nmol / dish*
培地	HeLa/EV	9.4 ± 0.3 μmol / dish	17.0 ± 0.8 nmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	9.0 ± 0.3 μmol / dish	18.4 ± 0.8 nmol / dish
総和	HeLa/EV	9.4 ± 0.3 μmol / dish	28.7 ± 1.0 nmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	9.0 ± 0.3 μmol / dish	27.4 ± 1.4 nmol / dish

B

		L-Asp 添加	D-Asp 添加
細胞	HeLa/EV	96.2 ± 14.4 pmol / dish	92.8 ± 5.8 nmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	82.2 ± 4.4 pmol / dish	93.9 ± 8.0 nmol / dish
培地	HeLa/EV	1.7 ± 0.0 nmol / dish	12.0 ± 0.5 μmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	1.6 ± 0.1 nmol / dish*	12.2 ± 0.5 μmol / dish
総和	HeLa/EV	1.8 ± 0.0 nmol / dish	12.1 ± 0.5 μmol / dish
	HeLa.HA-hGRHPR	1.6 ± 0.1 nmol / dish**	12.2 ± 0.5 μmol / dish

D-Asp または L-Asp を添加した際の Asp 含量を HPLC により測定した。細胞および培地中の Asp 含量を和したものを総和とした。各値は 3 回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差で示した。ステューデントの *t* 検定により統計処理を行い、コントロール細胞 (HeLa/EV) と高発現株 (HeLa.HA-hGRHPR) 間の有意差を検定した。** は P 値 < 0.01 を、* は P 値 < 0.05 を表す。

A. D-Asp または L-Asp を添加した際の L-Asp 含量

B. D-Asp または L-Asp を添加した際の D-Asp 含量

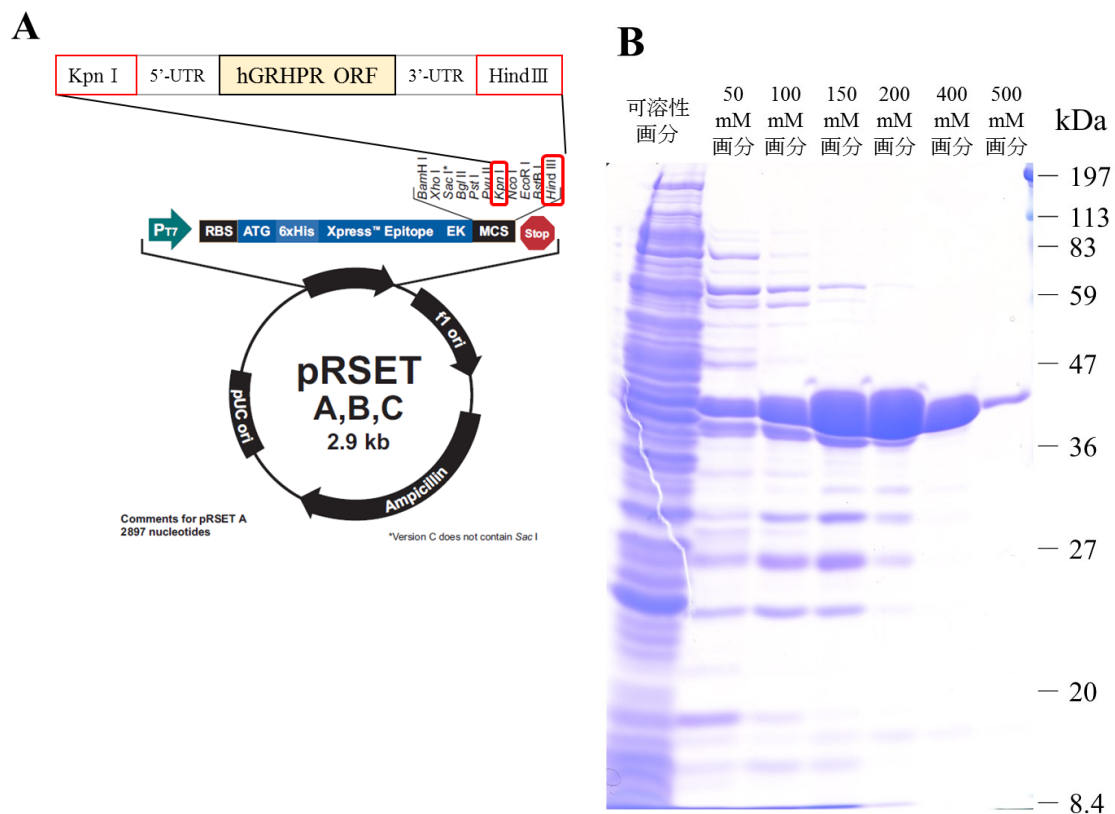


Fig. 3-8. 大腸菌で発現させた His タグが付加された組換え hGRHPR の調製

A. 作製した pRSET-His-hGRHPR のプラスミドマップ

B. His-ヒト GRHPR の SDS-PAGE とクマシー染色の結果。400 mM 画分、500 mM 画分において、N 末に His タグが付加された hGRHPR の推定分子量 (40,753 Da) に相当する位置に明確なバンドがほぼ単一な状態で検出された。

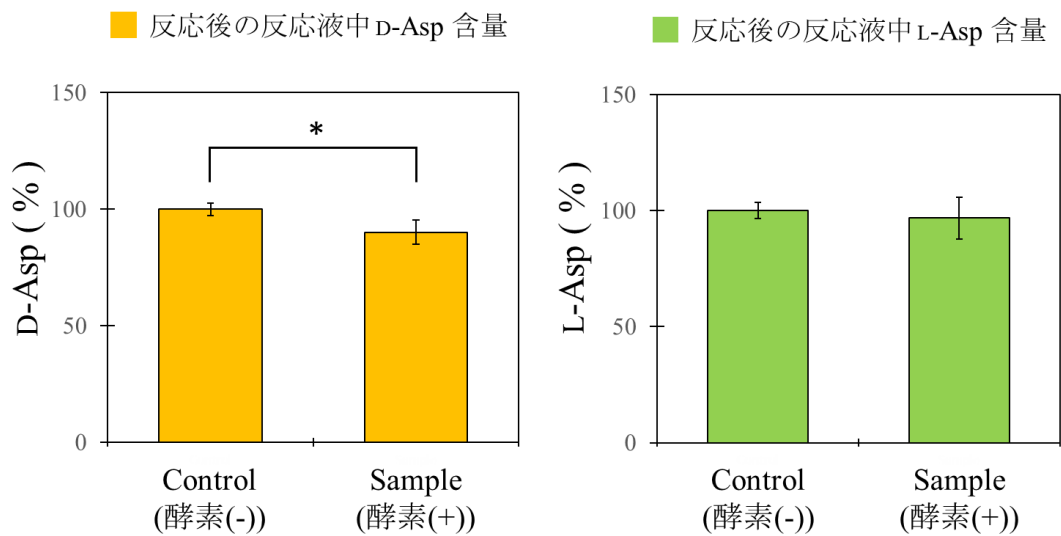


Fig. 3-9. ヒト組換え GRHPR の D-Asp 分解活性

37°Cで 15 時間の酵素反応を行った後の残存 Asp 量を HPLC で測定し、コントロールを 100%とした時の相対値 (%) で示した。各値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。スチューデントの *t* 検定により統計処理を行った。* は *P* 値 < 0.05 を表す。

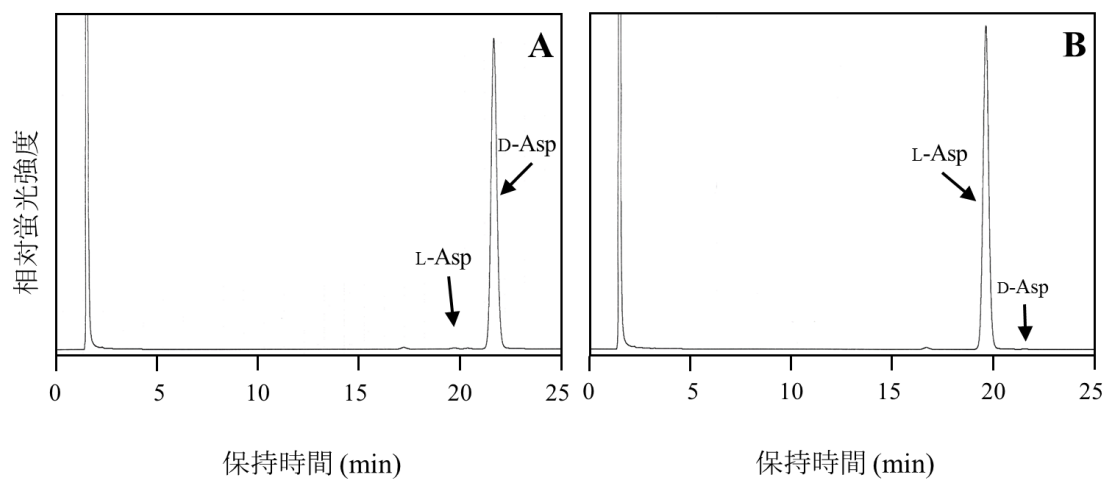


Fig. 3-10. ヒト組換え GRHPR の D-Asp 分解活性測定時のクロマトグラム

A. 基質として D-Asp を添加したサンプルのクロマトグラム

B. 基質として L-Asp を添加したサンプルのクロマトグラム

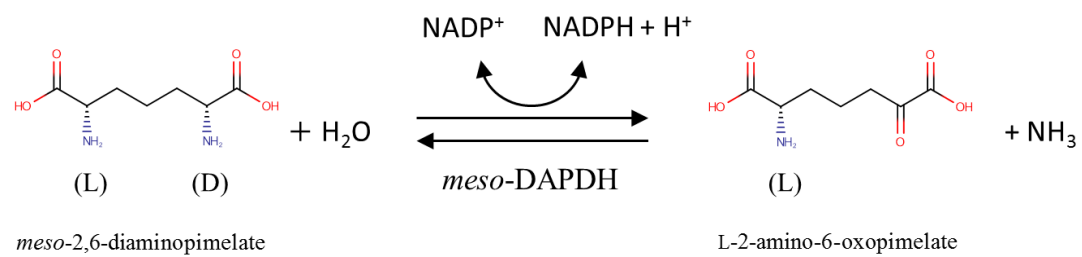


Fig. 3-11. *meso*-diaminopimelate dehydrogenase (*meso*-DAPDH) の反応式

第4章 まとめと今後の展望

4-1 まとめ

本研究では、哺乳類細胞における D-Asp 生合成経路の解明を目的として、まず始めに、種々の哺乳類細胞株を用いて、GOT1L1 が実際に D-Asp の主要な合成酵素であるか否かを解析した。次に、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質のスクリーニングと、それによって選別した候補タンパク質の機能解析を行った。

始めに、種々のラットおよびヒト由来培養細胞株における細胞内の D-Asp 含量と *Got1l1* / *GOT1L1* および *Ddo* / *DDO* mRNA の発現レベルとの相関を解析した。D-Asp 細胞内含量は HPLC により測定し、各 mRNA 発現レベルはリアルタイム PCR により解析した。ラットおよびヒト由来培養細胞株では、*Ddo* / *DDO* の発現レベルを考慮したとしても、細胞内 D-Asp 含量と *Got1l1* / *GOT1L1* の間に明確な相関は見られなかった。次に、D-Asp 生合成能を有する GH₃ 細胞株において、RNA 干渉法によりラット *Got1l1* をノックダウンした細胞株を作製し、D-Asp 生合成への影響を解析した。*Got1l1* のノックダウンにより培養系全体の総 L-Asp 含量が有意に低下する一方で、総 D-Asp 含量に有意な低下は認められなかった。これらの結果から、ラットおよびヒト細胞において、GOT1L1 は D-Asp の生合成にほとんど寄与せず、D-Asp の生合成を担う酵素が他に存在することが示唆された。

次に、哺乳類細胞における D-Asp の主要な合成酵素の同定を念頭に置き、ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用い、細胞内 D-Asp 含量の調節に関与する新規タンパク質の探索を行った。スクリーニングにより 51 種のヒットタンパク質が得られたが、既知の AspR およびヒト SerR と配列類似性が高く共通したモチーフ配列が保存されているヒットタンパク質は見られなかった。そこで、1 次構造は異なるが立体構造および機能が類似しているタンパク質がヒットしている可能性を考慮し、既知の AspR およびヒト SerR との立体構造比較を行った。既知のラセマーゼと立体構造が有意に類似していると判断されたタンパク質のうち、GRHPR の機能解析を行った。GRHPR 高発現 HeLa 細胞では、コントロール細胞と比べて、D,L-Asp 含量が有意に低下していた。また、ヒト GRHPR 組換えタンパク質では、D-Asp に対する分解活性が見られたが、L-Asp に対する活性は見られなかった。これらの結果から、ヒト GRHPR は D-Asp を立体特異的に分解する活性を有することが示唆された。

本研究は、未だ不明な点が多い哺乳類における D-Asp の合成経路の解明のみならず、生体内における D-Asp の生理機能および D-Asp が関与する疾患の研究分野の進展に貢献すると思われる。

4-2 今後の展望

今回、GRHPR を HeLa 細胞に高発現させ、細胞内 D-Asp 代謝における機能を解析した。しかし、GRHPR 高発現 HeLa 細胞に D-Asp を添加した際、D-Asp の減少は見られなかった。このことはスクリーニング時と比較して、使用した細胞を HEK293 から HeLa へ変更したこ

とや、D-Asp への曝露の条件が異なることが影響を与えた可能性が考えられる。今後、HEK293 細胞を用いて、GRHPR 高発現による影響を解析する予定である。また、CRISPR-Cas9 システムにより、GRHPR をノックアウトさせた HeLa 細胞または HEK293 細胞を作製し、D-Asp 代謝における GRHPR の機能をさらに詳細に解析していきたいと考えている。

当初、ラセマーゼ様の活性を持つと期待した GRHPR であったが、前章でも述べたように、細菌で見出される *meso*-DAPDH と弱い配列類似性を持つことが明らかになった。また、今回の組換えタンパク質を用いた実験では、反応条件の検討が不十分であると考えている。そのため、組換え GRHPR を用いた、*meso*-DAPDH 活性の有無も含め、より詳細な解析を行う予定である。

本研究では、スクリーニングされたタンパク質のなかで、まずはヒト SerR やアカガイやアメフラシなどの真核生物型 AspR と類似した機能をもつ酵素タンパク質を念頭に解析を進め、GRHPR を第一の候補とした。選別されたタンパク質の中には、これまでの知見とは全く異なる新奇な機能を発揮して D-Asp 含量に影響するものなどが存在する可能性もあり、さらに解析を進める必要があると考えられる。

謝辞

本研究を行うに際して、培養細胞株を分譲していただきました北里大学大学院薬学研究科衛生化学教室の中川靖一教授ならびに熊谷剛先生、薬剤学教室の伊藤智夫教授ならびに高野修平先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J. Neurochem.* 60: 783-6.
- 2) Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME, Snyder SH (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J. Neurosci.* 17: 1604-15.
- 3) Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4926-31
- 4) Nishikawa T (2011) Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J. Chromatogr. B* 879:3169–3183
- 5) Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol. Neurobiol.* 36:152–164
- 6) Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet J-P, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:721–725
- 7) Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13409–13414
- 8) De Miranda J, Santoro A, Engelender S, Wolosker H (2000) Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. *Gene* 256:183–188
- 9) Konno R (2003) Rat cerebral serine racemase: amino acid deletion and truncation at carboxy terminus. *Neurosci. Lett.* 349:111–114
- 10) Hoffman HE, Jirásková J, Ingr M, Zvelebil M, Konvalinka J (2009) Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog. *Protein. Expr. Purif.* 63:62–67
- 11) Strášovský K, Jirásková J, Mikulová A, Rulišek L, Konvalinka J (2005) Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity decarboxylate substrate and inhibitor and analysis of the β -eliminase activity. *Biochemistry* 44:13091–13100
- 12) Smith MA, Mack V, Ebner A, Moraes I, Felicetti B, Wood M, Schonfeld D, Mather O, Cesura A, Barker J. (2010) The structure of mammalian serine racemase: evidence for conformational changes upon inhibitor binding. *J. Biol. Chem.* 285(17):12873-81.
- 13) Di Fiore MM, Santillo A, Baccari GC (2014) Current knowledge of D-aspartate in glandular tissues. *Amino Acids* 46:1805–1818
- 14) Katane M, Homma H (2011) D-Aspartate—an important bioactive substance in mammals: a

review from an analytical and biological point of view. *J. Chromatogr. B* 879:3108–3121

15) Ota N, Shi T, Sweedler JV (2012) D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. *Amino Acids* 43:1873–1886

16) Fagg GE, Matus A (1984) Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6876–688

17) Olverman HJ, Jones AW, Mewett KN, Watkins JC (1988) Structure/ activity relations of N-methyl-D-aspartate receptor ligands as studied by their inhibition of [3H]D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid binding in rat brain membranes. *Neuroscience* 26:17–31

18) Errico F, Napolitano F, Nisticò R, Usiello A (2012) New insights on the role of free D-aspartate in the mammalian brain. *Amino Acids* 43:1861–1871

19) D’Aniello G, Ronsini S, Guida F, Spinelli P, D’Aniello A (2005) Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertil. Steril.* 84:1444–1449

20) D’Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, Cappiello F, Topo E, D’Aniello E, Ronsini S (2007) Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum. Reprod.* 22:3178–3183

21) Errico F, Napolitano F, Squillace M, Vitucci D, Blasi G, de Bartolomeis A, Bertolino A, D’Aniello A, Usiello A (2013) Decreased levels of D-aspartate and NMDA in the prefrontal cortex and striatum of patients with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 47:1432–1437

22) Pine G, Danbolt NC, Bjøås M, Zheng Y, Bendaham A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464–467

23) Adachi M, Koyama H, Long Z, Sekine M, Furuchi T, Imai K, Nimura N, Shimamoto K, Nakajima T, Homma H (2004) L-Glutamate in the extracellular space regulates endogenous D-aspartate homeostasis in rat pheochromocytoma MPT1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 424:89-96

24) Koyama H, Sekine M, Furuchi T, Katane M, Nimura N, Shimamoto K, Nakajima T, Homma H (2005) A novel L-glutamate transporter inhibitor reveals endogenous D-aspartate homeostasis in rat pheochromocytoma MPT1 cells. *Life. Sci.* 76(25):2933-44.

25) Koyama H, Adachi M, Sekine M, Katane M, Furuchi T, Homma H (2006) Cytoplasmic localization and efflux of endogenous D-aspartate in pheochromocytoma 12 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 446(2):131-9

26) Long Z, Sekine M, Nimura N, Lee J.-A., Imai K, Iwatsubo T, Homma H (2001) Immunocytochemical study of D-aspartate in the 2068 rat pheochromocytoma cell line. *bioimages* 9: 61-67

27) Katane M, Homma H (2010) D-Aspartate oxidase: the sole catabolic enzyme acting on free D-aspartate in mammals. *Chem. Biodivers.* 7:1435–1449

28) Ohide H, Miyoshi Y, Maruyama R, Hamase K, Konno R (2011) D-Amino acid metabolism in

mammals: biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *J. Chromatogr. B* 879:3162–3168

29) Long Z, Homma H, Lee J-A, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Yamada R, Imai K (1998) Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Lett.* 434:231–235

30) Long Z, Lee J-A, Okamoto T, Nimura N, Imai K, Homma H (2000) D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH₃). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:1143–1147

31) Wolosker H, D'Aniello A, Snyder SH (2000) D-Aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* 100:183–189

32) Long Z, Sekine M, Adachi M, Furuchi T, Imai K, Nimura N, Homma H (2002) Cell density inversely regulates D- and L-aspartate levels in rat pheochromocytoma MTP1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 404:92–97

33) Shibata K, Watanabe T, Yoshikawa H, Abe K, Takahashi S, Kera Y, Yamada R (2003) Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134:307–314

34) Abe K, Takahashi S, Muroki Y, Kera Y, Yamada RH (2006) Cloning and expression of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent aspartate racemase gene from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii* and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biochemistry* 139(2):235–44

35) Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming G-L, Song H, Snyder SH (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:3175–3179

36) Wang L, Ota N, Romanova EV, Sweedler JV (2011) A novel pyridoxal 5'-phosphate-dependent amino acid racemase in the *Aplysia californica* central nervous system. *J. Biol. Chem.* 286:13765–13774

37) Nimura N, Kinoshita T (1986) o-Phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J. Chromatogr.* 352:169–177

38) Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T (1992) Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert-buthloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde. *J. Chromatogr.* 582:41–48

39) Katane M, Saitoh Y, Seida Y, Sekine M, Furuchi T, Homma H (2010) Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biodivers.* 7(6):1424–1434.

40) Tanaka-Hayashi A, Hayashi S, Inoue R, Ito T, Konno K, Yoshida T, Watanabe M, Yoshimura T, Mori H (2015) Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got1l1): a

putative aspartate racemase? *Amino Acids*. 47(1):79-86.

- 41) Amery L, Brees C, Baes M, Setoyama C, Miura R, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (1998) C-terminal tripeptide Ser-Asn-Leu (SNL) of human D-aspartate oxidase is a functional peroxisome-targeting signal. *Biochem. J.* 336(2):367-371.
- 42) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-80.
- 43) Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3497-500.
- 44) Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucl. Acids. Res.* 38, W545-549.
- 45) Hasegawa H, Holm L (2009) Advances and pitfalls of protein structural alignment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 341-348.
- 46) Chen C. and Okayama H. (1987) High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* 7(8):2745-2752
- 47) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- 48) Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.
- 49) Liu L, Iwata K, Kita A, Kawarabayasi Y, Yohda M, Miki K (2002) Crystal structure of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its implications for molecular mechanism of PLP-independent racemization. *J.Mol.Biol.* 319: 479-489.
- 50) R.D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E.L.L. Sonnhammer, J. Tate, M. Punta (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42:D222-D230.
- 51) H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.
- 52) Marco Biasini, Stefan Bienert, Andrew Waterhouse, Konstantin Arnold, Gabriel Studer, Tobias Schmidt, Florian Kiefer, Tiziano Gallo Cassarino, Martino Berton, Lorenza Bordoli, Torsten Schwede. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42: W252-W258
- 53) Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22,195-201
- 54) Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009). The SWISS-MODEL Repository

and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37, D387-D392

55) Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30(S1), S162-S173

56) Rumsby G, Cregeen DP (1999) Identification and expression of a cDNA for human hydroxypyruvate/glyoxylate reductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1446(3):383-8.

57) Mdluli K, Booth MP, Brady RL, Rumsby G (2005) A preliminary account of the properties of recombinant human Glyoxylate reductase (GRHPR), LDHA and LDHB with glyoxylate, and their potential roles in its metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1753(2):209-16.

58) Smietanski M, Werner M, Purta E, Kaminska KH, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Nowotny M, Bujnicki JM (2014) Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation. *Nat. Commun.* 5:3004

59) Dahms SO, Hardes K, Becker GL, Steinmetzer T, Brandstetter H, Than ME (2014) X-ray structures of human furin in complex with competitive inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 9(5):1113-8.

60) Booth MP1, Connors R, Rumsby G, Brady RL (2006) Structural basis of substrate specificity in human glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase. *J. Mol. Biol.* 360(1):178-89.

61) Sinha A, Köhrer C, Weber MH, Masuda I, Mootha VK, Hou YM, RajBhandary UL (2014) Biochemical characterization of pathogenic mutations in human mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase. *J. Biol. Chem.* 289(47):32729-41.

62) Wang C, Li W, Ren J, Fang J, Ke H, Gong W, Feng W, Wang CC (2013) Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal.* 19(1):36-45.

63) Suizu F, Hiramuki Y, Okumura F, Matsuda M, Okumura AJ, Hirata N, Narita M, Kohno T, Yokota J, Bohgaki M, Obuse C, Hatakeyama S, Obata T, Noguchi M (2009) The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell.* 17(6):800-10.

64) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13):1605-12.

65) Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP (1999) The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum. Mol. Genet.* 8(11):2063-9.

66) Gao X, Ma Q, Zhu H (2015) Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(8):3341-9.

67) Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, Novick SJ (2006) Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 128(33):10923-9.

- 68) Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T (2011) Highly stable meso-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. *AMB Express*. 1:43.
- 69) Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL (2012) Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct*. 7:12.