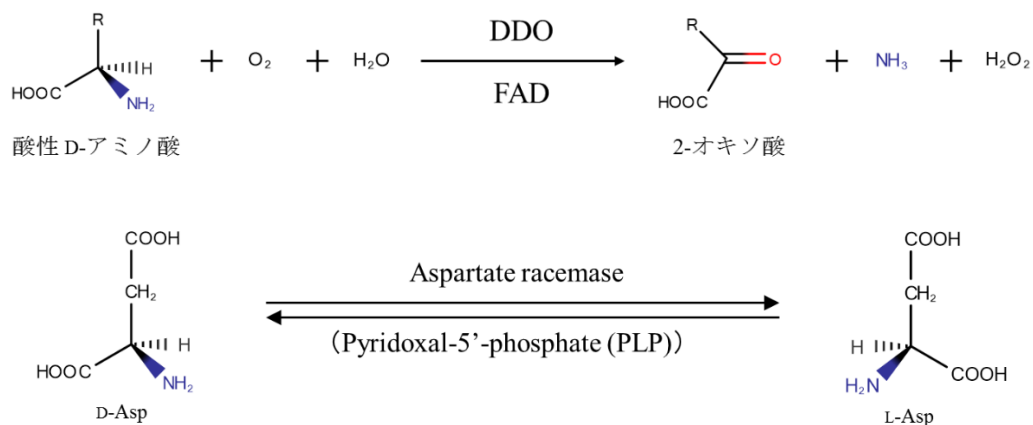


1. 背景と目的

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



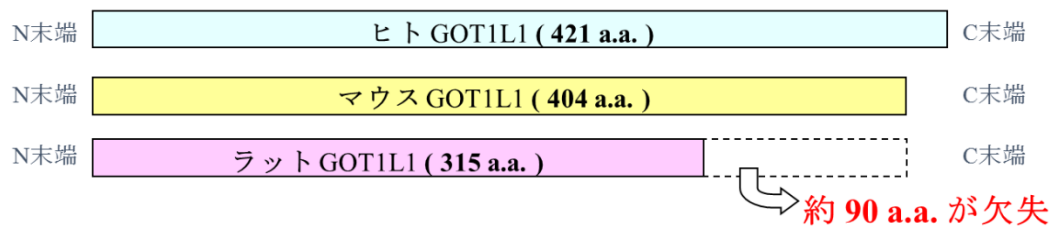


図2 ヒト、ラットおよびマウス GOT1L1 ホモログ

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。

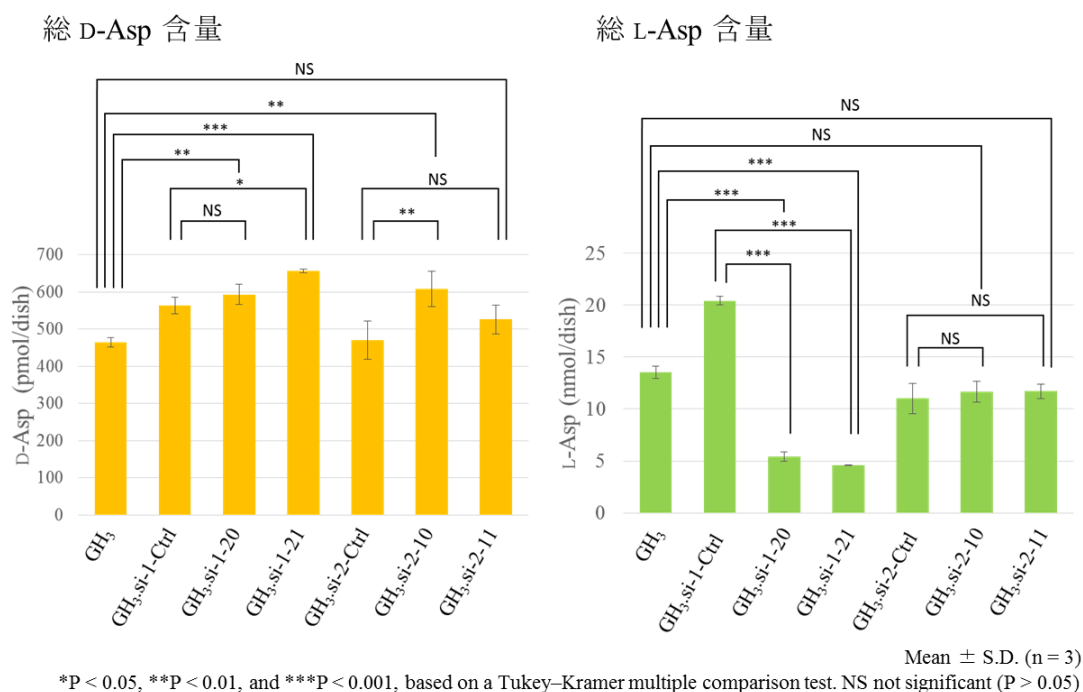


図3 GOT1L1 ノックダウンの D,L-Asp 含量への影響

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)。

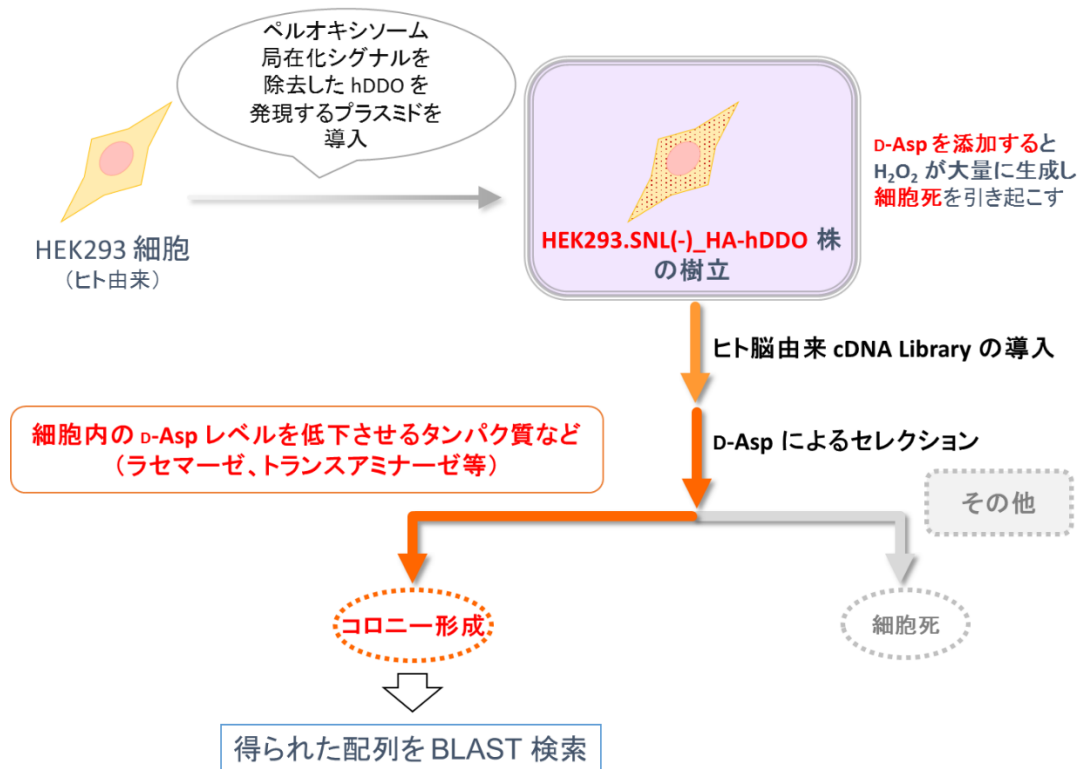


図4 ヒト脳由来 cDNA ライブラリーを用いた D-Asp 代謝関連タンパク質探索のフローチャート

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。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。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つ得られた。このうち、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最も高いタンパク質1種を候補タンパク質として選別し、以降の実験を行った。

D-Asp の代謝における候補タンパク質の機能を解析するために、HeLa 細胞から全 RNA を調製し、RT-PCR により候補タンパク質の 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 タグが付加された候補タンパク質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、候補タンパク質の組換えタンパク質を精製した。

また、細胞内 D-Asp 含量の調節における候補タンパク質の役割を解析するために、上述の組換えタンパク質の発現プラスミドを鋳型にした PCR により、N 末に HA タグが付加された候補タンパク質配列を増幅した。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 タグが付加された候補タンパク質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、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、候補タンパク質を安定的に高発現する細胞株 (HeLa.HA-Sample) 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 (HeLa/EV) 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、候補タンパク質高発現細胞株では、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、候補タンパク質は細胞内 D-Asp を減少させる機能を有することが示唆された。

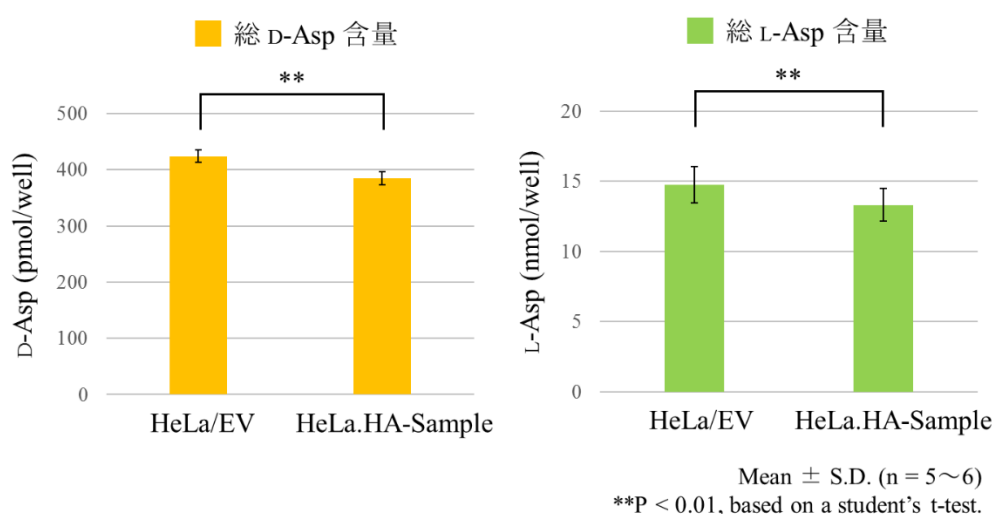


図 5 候補タンパク質高発現 HeLa 細胞培養時の D,L-Asp 含量

より詳細な解析を行うために、精製した組換えタンパク質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、候補タンパク質は 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。

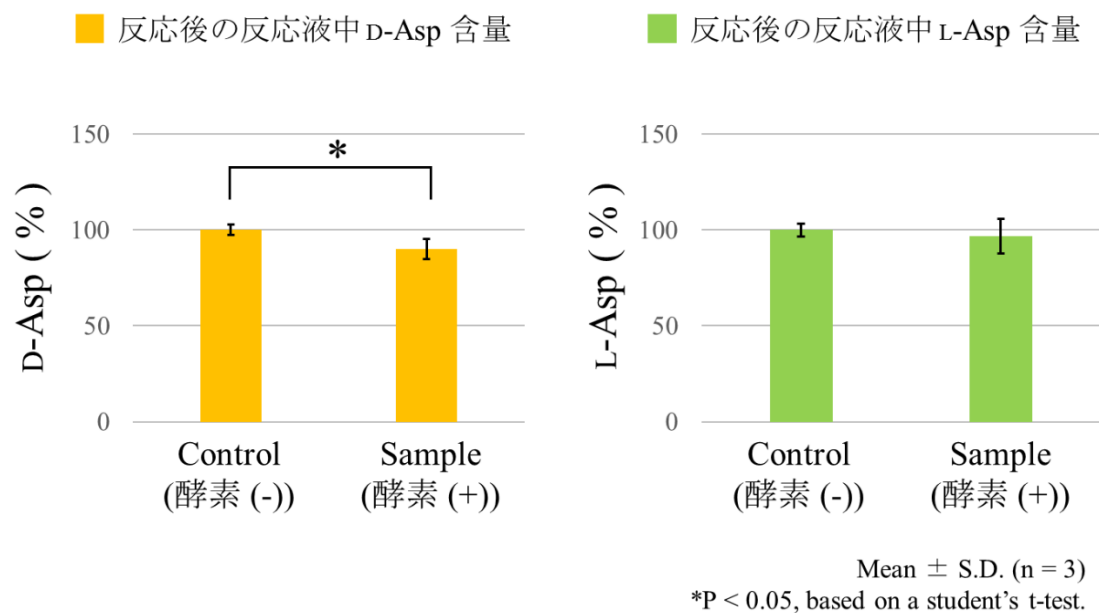


図6 組換えタンパク質の D,L-Asp に対する活性

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を選別した。候補タンパク質は少なくとも 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。

