

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

哺乳類体内の遊離型 D-アスパラギン酸の振舞いと機能

本 間 浩

哺乳類体内には、主な D-アミノ酸として、D-セリンと D-アスパラギン酸 (D-Asp) が見出される。D-Asp が、全アスパラギン酸のおよそ 40% に達する組織もある。さまざまな研究結果から、D-Asp が内分泌活動の調節作用を有することが明らかにされてきた。本稿では、まず、我々が用いている D-アミノ酸の HPLC による定量法を概説した。次に、D-Asp の内分泌調節作用の例として、我々が行った、精巣におけるテストステロン合成の調節作用についての研究結果をまとめた。さらに、PC12 細胞をモデルとして用いた、D-Asp の細胞外への放出経路についての研究結果をまとめた。

1. はじめに

高感度な光学分割法の進歩により、植物、下等動物、哺乳類など、さまざまな生物体内に幾種類もの D-アミノ酸が存在することが明らかにされてきた。哺乳類体内には、D-セリンと D-アスパラギン酸 (D-Asp) が主な D-アミノ酸として見出される。1980 年代の中頃に遊離型の D-Asp が発見され、1990 年代の初めに遊離型の D-セリンが見出された。D-セリンに関しては近年大きく研究が進み、哺乳類の神経系において重要な生理的役割を果たしていることが明らかにされた (西川, 金野, 福井の項参照)。一方、D-Asp については、研究が大きく立ち遅れている。我々は、D-Asp に着目して研究を続けている。本稿では、1) D-アミノ酸 (特に D-Asp) の定量法、2) 哺乳類体内の遊離型 D-Asp (D-Asp の哺乳類体内での生理活性)、3) D-Asp の細胞外放出に分けてまとめた。

2. D-アミノ酸の定量法

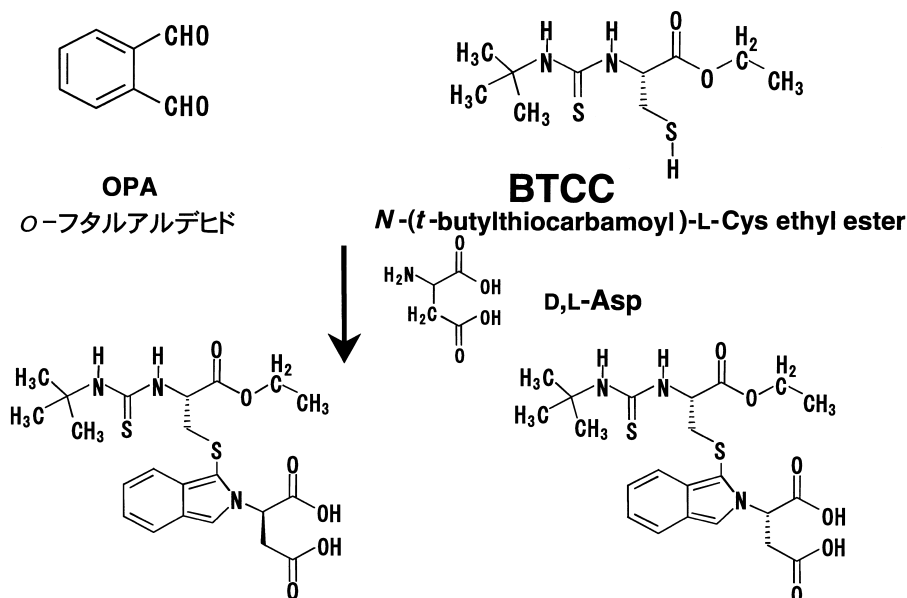
D-アミノ酸を定量する方法として汎用されるものには、

1) D-アミノ酸に特異的な酵素を用いる方法と、2) D,L-アミノ酸をクロマトグラフィーや電気泳動で分離して定量する方法とがある¹⁻³⁾。本稿では、我々が用いている方法を中心に簡潔に述べることにする。

酵素を用いる方法では、D-アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase, DAO, EC 1.4.3.3) と D-アスパラギン酸酸化酵素 (D-aspartate oxidase, DDO, EC 1.4.3.1) とが汎用されている。DAO は、FAD の存在下に、塩基性と中性の D-アミノ酸に対してのみ酸化的脱アミノ化活性を示し、対応するケト酸 (2-オキソ酸) とアンモニア、過酸化水素を生成する (図 1a)。DDO は、酸性 D-アミノ酸 (D-Asp や D-グルタミン酸など) に同様の活性を有している。したがって、これらの酵素を用いた定量では、予めアミノ酸を分離しないかぎり、混合試料中の個々の D-アミノ酸を定量することは難しい。測定しようとする D-アミノ酸に対応する酵素を試料に作用させ、生成するケト酸、または過酸化水素を定量して D-アミノ酸の定量を行うことが多い。ケト酸は、ヒドラジンとの反応で生成するヒドラゾンの吸光度を測定して定量する方法が最も一般的である (図 1b)。過酸化水素は、ペルオキシダーゼと各種の試薬とともに反応を行い、生成する物質の発光 (または蛍光・吸光) を測定して定量することができる。一般に、吸光よりも蛍光や発光を検出の方が高感度なので、試薬を使い分けることによって検出感度を選択できる。この他、消費される酸素を酸素電極で定量する方法や、酵素を用いたバイオセン

北里大学薬学部 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1)
Biochemical behavior and function of free D-aspartate in the mammalian body
Hiroshi Homma (Kitasato University, School of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Biomolecular Science, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan)

a)



b)

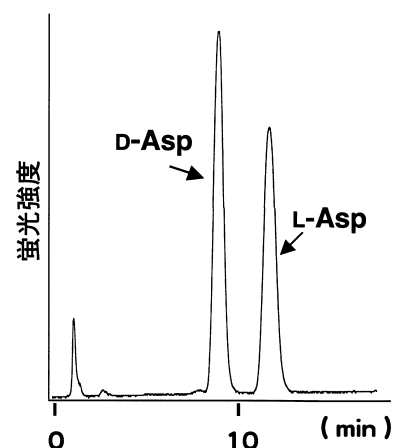
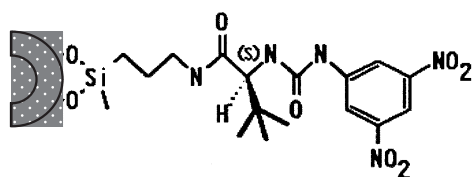


図2 新規蛍光誘導体化試薬 BTCC を用いた蛍光誘導体化とアミノ酸の分離定量

a) BTCC は、OPA および D,L-アミノ酸と反応して蛍光性のジステレオマーを生成する。b) これを ODS カラムで分離して、D,L-アミノ酸の定量を行う。

a)



SUMICHIRAL OA-3200

c)

d)

b)

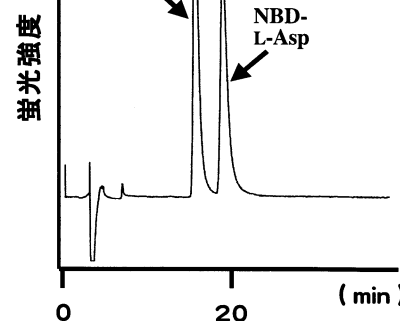
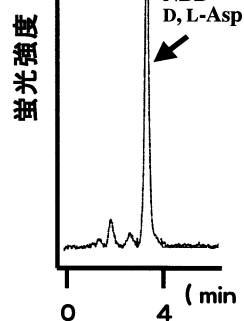
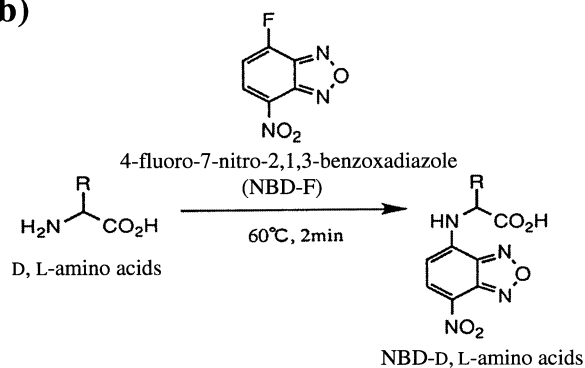


図3 NBD-F による蛍光誘導体化とアミノ酸の定量

a) Pirkle 型のキラルカラム。b) NBD-F によるアミノ酸の蛍光誘導体化。c) 蛍光誘導体化されたアミノ酸を、まず C₈ の逆相カラムで Asp の画分を分離し、d) Pirkle 型のキラルカラム (a) で D,L-Asp を分離定量する。

効率の良い分離システムを構築した⁵⁾。

最近、NBD 化されたアミノ酸を別なタイプのキラルカラムを用いて分析する方法が報告された⁶⁾。重水素で標識されたアミノ酸を内部標準品に用いてタンデム質量分析計で定量する方法で、高感度で正確な定量が可能になっている。また、電気泳動法を用いる D-アミノ酸の定量法として、高感度な方法が報告された⁷⁾。アミノ酸を naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) で蛍光誘導体化し、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) と β -シクロデキストリンを緩衝液に含んだキャピラリー電気泳動法 (ミセル導電クロマトグラフィーと呼ばれる) により分離する方法である。キラルな試薬を含む移動相 (溶出溶媒) を用いるクロマトグラフィーによって D, L-アミノ酸を分離する方法 (上記 3) の方法) に相当する方法といえる。レーザーを光源にして蛍光を検出するため高感度な検出が可能で、アメフラシの単一ニューロンの突起や細胞体中の D-Asp が定量されている。

3. 哺乳類体内の遊離型 D-アスパラギン酸

ヒトを含めた哺乳類体内に遊離型の D-Asp が見出されて以来^{8~10)}、D-Asp の組織内含量^{11,12)}、成長過程における組織内含量の変化と調節^{13,14)}、組織内の局在性^{15~17)}などの研究が行われてきた。また、これまでの研究では、遊離型 D-Asp には以下のような生理活性があると報告されている。1) 松果体実質細胞のメラトニン合成・分泌の抑制^{18,19)}、2) 下垂体前葉のプロラクチン分泌の促進^{20,21)}、3) 視床下部や下垂体後葉のバソプレッシン・オキシトシンの産生調節²²⁾、4) 精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生の亢進^{23~25)}、5) *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) の前駆体²⁶⁾。このうち、精巣における D-Asp の役割について、我々の研究を中心に以下にまとめてみたいと思う。

ラット精巣内の D-Asp の含量を、上記の HPLC を用い

る分析法で定量すると、図 4a のように成熟期に著しい増加が認められた。その後ほぼ一定の含量に維持され、D-Asp は全 Asp (D 体と L 体の和) のおよそ 40% に相当した。その他の D-アミノ酸は誕生直後には微量検出されたが、その後急速に減少した²⁷⁾ (図 4b)。次に、D-Asp が精巣内のどこに存在するのかを、抗 D-Asp 抗体を用いた免疫組織染色で解析した。抗体は、架橋剤であるグルタルアルデヒドを用いて、ハプテンである D-Asp と BSA とを結合させ、家兎に免疫して調製した。精巣内には、精子が成熟する精細管が存在し、管内周囲の精原細胞が内腔側へ移動しながら減数分裂を経て精子細胞へと分化・成熟している。D-Asp は、精細管中心部に存在していて、最も成熟してべん毛を有するようになった後期精子細胞の細胞質に存在していた²⁷⁾ (図 5)。精細管内には精子の成熟を助けるセルトリ細胞が存在し、精細管外にはテストステロンを合成・分泌するライディッヒ細胞などが存在するが、抗 D-Asp 抗体による染色は、後期精子細胞に比べて非常に弱かった。

D-Asp の局在性は、精巣に毒性を有する化合物を用いた解析でも確認された²⁷⁾。メトキシ酢酸は、成熟過程のうちの特定のステージの精子細胞群 (後期精子細胞よりも未成熟な細胞群) に特異的に毒性を示す。メトキシ酢酸の経口投与 3 日後では、この特定の細胞群が破壊され、精巣のタンパク質量や L-Asp 含量が減少したが、D-Asp 含量は変化しなかった。一方、投与後 20 日目では、精子の成熟が進行して、破壊された細胞群が後期精子細胞に相当する時期になる。すなわち、後期精子細胞群が特異的に破壊された状態になる。その時の D-Asp 含量は、タンパク質量や L-Asp 含量とともに有意に減少していた。以上の結果から、精巣内では D-Asp は後期精子細胞に局在していると考えられる。

精巣の静脈内の D-Asp 濃度は、他の静脈内の濃度よりも常に高いと報告されていることから、精細管中の D-Asp は

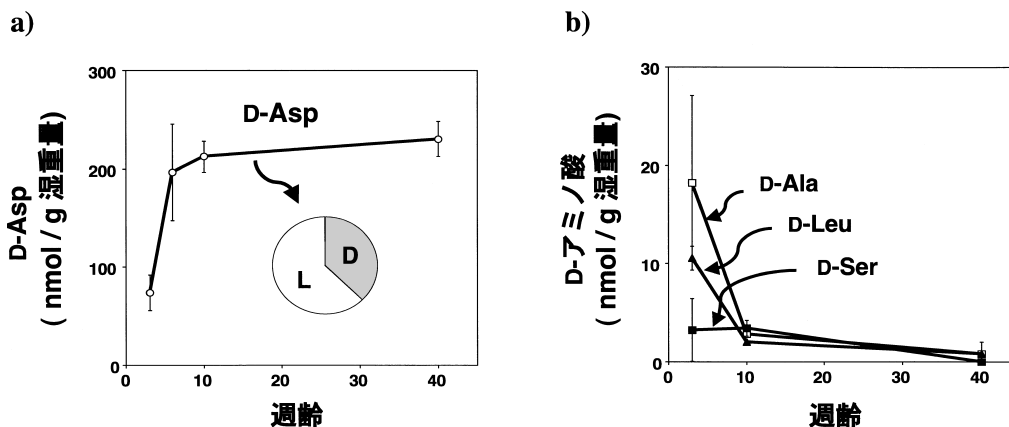


図 4 ラット精巣中 D-Asp 含量の生後の成長過程での変化

a) D-Asp の含量変化。D% (=D-Asp/全 Asp) を円グラフで示した。b) D-アラニン (D-Ala)、D-ロイシン (D-Leu)、D-セリン (D-Ser) の変化。

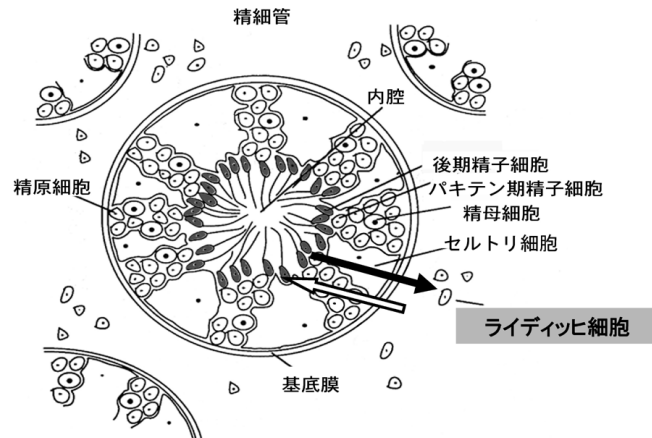


図5 精巣内の精細管の模式図

精細管の内壁側に存在する精原細胞が分化・成熟して、べん毛を有する後期精子細胞になる。D-Aspはこの細胞に局在する。D-Aspが分泌されて(→)管外のライディッヒ細胞へ働き、生成したテストステロンはフィードバックされて(←)精子の分化・成熟を促進すると考えられる。

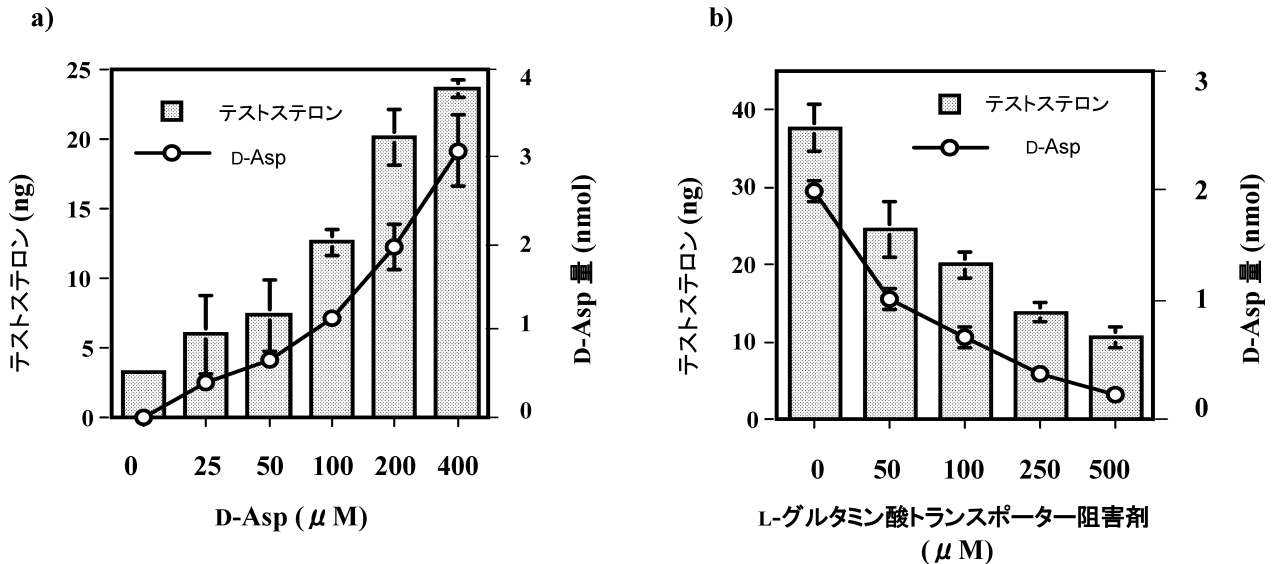


図6 D-Aspによるラットライディッヒ細胞からのテストステロン合成・分泌の促進

a) ライディッヒ細胞の初代培養系に、性腺刺激ホルモン (hCG) と種々の濃度の D-Asp を加えると、テストステロンの合成・分泌量が増加した (■)。細胞内の D-Asp 含量も同時に測定した (○)。b) D-Asp は L-グルタミン酸トランスポーターによって細胞内へ取り込まれる。この阻害剤を加えると、細胞内 D-Asp 含量が減少し (○), 同時にテストステロンの分泌量が減少した (■)。文献 23 参照。

管外へ分泌されていると考えられる²⁸⁾。また、腹腔内へ投与された D-Asp は精細管内へは取り込まれにくいことから、管内の後期精子細胞に存在する D-Asp は体液循環とは独立していて、精細管内で生成されているのではないかと考えられる^{15, 29)}。後期精子細胞に存在する D-Asp は管外へ分泌されて、以下に述べるように、精細管の外に存在するライディッヒ細胞に作用して、テストステロンの合成・分泌を促進していると我々は考えている。ラット精巣ライディッヒ細胞の初代培養系に性腺刺激ホルモン (実験ではヒト絨毛性性腺刺激ホルモン; hCG) を与えると、テスト

ステロンの合成・分泌が認められる。この時 D-Asp を共存させると、その用量依存的にテストステロンの合成・分泌がさらに増強されることが明らかになった²³⁾ (図 6a)。この増強作用は、D-Asp での処理時間に依存し、また立体特異的で L-Asp や L-Glu, D-Glu では認められなかった。また、ライディッヒ細胞内に取り込まれた D-Asp の量とテストステロンの分泌量との間に相関が認められたため (図 6a), D-Asp は細胞内に取り込まれて作用するのではないかと考えて、取り込みの阻害剤を用いて解析した。すなわち、L-グルタミン酸 (Glu) トランスポーターは、L-Glu の

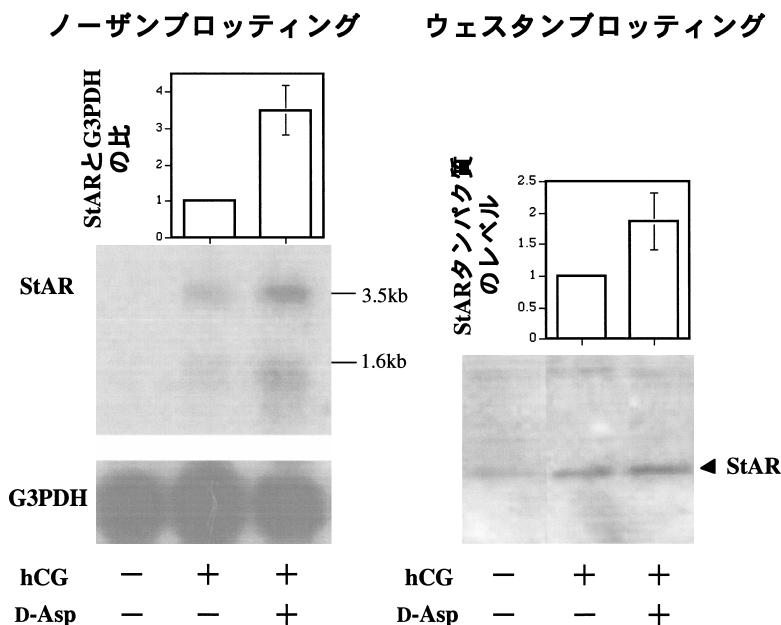


図7 D-AspによるSteroidogenic acute regulatory protein (StAR)発現の増加
ラットライディッヒ細胞において、性腺刺激ホルモン (hCG) によって増加するStARのmRNAレベルとタンパク質レベルが、D-Aspによってさらに増加した。文献25参照。

ほか、L-AspとD-Aspを効率よく細胞内に取り込むことができるので、このトランスポーター阻害剤を用いて、D-Aspの取り込みを阻害した。すると、阻害剤の用量依存的に細胞内のD-Asp量が減少し、テストステロンの分泌量も減少することが明らかになった(図6b)。これらのことから、D-Aspはライディッヒ細胞内に取り込まれてテストステロンの合成・分泌を増強すると考えられる²³⁾。

ライディッヒ細胞内では、テストステロンはコレステロールから合成される。コレステロールは、ミトコンドリア内部へ運び込まれ、内膜のコレステロール側鎖切断酵素によってプレグネノロンに代謝される。その後小胞体でさらに代謝されてテストステロンとなり、貯蔵されることなく細胞外へ分泌される。その際、コレステロールのミトコンドリア内部への取り込み過程がテストステロン合成全体の律速過程であり、この過程をsteroidogenic acute regulatory protein (StAR)と呼ばれるタンパク質が促進することが知られている。ライディッヒ細胞に性腺刺激ホルモンを与えると、StARの発現が誘導されてテストステロンの合成・分泌が促進される。このとき、D-Aspを加えると、StARの発現が、タンパク質とmRNAのレベルで増強されることが明らかになった²⁵⁾(図7)。以上の結果をまとめると、精子細胞内で生成されと考えられるD-Aspは、精細管外へパラ分泌されてライディッヒ細胞内に取り込まれ、StARの発現を増強してテストステロンの合成・分泌を促進していると考えられる(図5)。また、生成したテストステロンは、精細管内へフィードバックされ精子の成熟を

促進しているのではないかと考えられる。

最近、ヒトの精子や精液(精漿)、卵巣の卵胞液中にD-Aspが存在すると報告された^{30,31)}。我々は、D-Asp抗体を用いた免疫染色で、ラット卵巣内の卵子に強い反応を見出している(加藤-酒井、未発表)。D-Aspは生殖細胞中に存在し、上記のように内分泌系を調節してその成熟に関与しているのではないかとと思われる。興味深いことに、精子無力症患者(oligoasthenoteratospermic donor)や無精子症患者の精漿中や精子内のD-Asp含量は、健常人よりも有意に低いと報告されている³⁰⁾。また、卵胞液中のD-Asp濃度は、体外受精のプログラムを受けている患者のうち、形態的に良好で受精率の高い卵子を提供した若い患者の方が、形態的に非良質で受精率の低い卵子を提供した年齢の高い患者よりも有意に高かったと報告されている³¹⁾。

4. D-アスパラギン酸の細胞外放出

細胞内に存在するD-Aspが細胞外へどのようにして放出(分泌)されるのかは興味深い。我々は、ラット副腎褐色細胞腫細胞由来のPC12細胞を用いてこの点を解析した。上述したHPLCを用いる分析法で定量すると、PC12細胞内では全Aspの約12~14%がD体であった³²⁾。D-Asp以外のD-アミノ酸はほとんど検出されなかった。PC12細胞を培養して細胞内と培地中のD-Aspを定量してみると、培養時間とともに増加し、その増加量は播種した細胞数に依存することが明らかになった(図8)。培養にあたってはD-Aspを外から加えていないので、これらの結果は、PC12

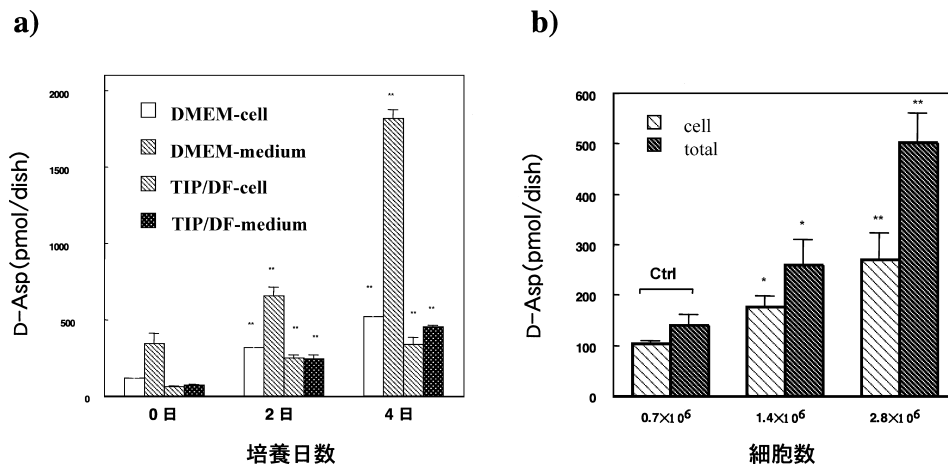


図8 PC12細胞内のD-Asp

a) PC12細胞をDMEM培地やTIP/DF培地で培養すると、細胞内と培地中のD-Asp含量が培養時間とともに増加した。b) TIP/DF培地で3日間培養した後のD-Asp含量(細胞内含量と全量(細胞内+培地中))は、播種した細胞数に依存して増加した。文献32参照。

細胞が何らかの経路で遊離のD-Aspを合成していることを示唆していた³²⁾。この他に、GH₃細胞³⁰⁾やPC12細胞の亜株であるMPT1細胞³³⁾でも同様の結果が観察されたが、マウス3T3細胞やNB-1細胞では、D-Aspの生成は認められなかった。D-Aspの生合成には、1) ラセマーゼ(D, L-アミノ酸を相互に変換する酵素)による生成、2) D-アミノ酸アミノ基転移酵素による生成、3) D-Asp残基を有するタンパク質からの遊離による生成の三通りの経路が考えられている。哺乳類由来のアミノ酸ラセマーゼとしては、セリンに特異的なラセマーゼがクローニングされて現在盛んに研究されている(吉村, 西川, 福井の章参照)。しかし、哺乳類由来のAsp特異的なラセマーゼはまだ見出されておらず、細菌以外ではアカガイからのクローニングが報告されているだけである³⁴⁾。D-アミノ酸アミノ基転移酵素については、最近植物からクローニングされたが³⁵⁾、哺乳類からの報告はまだ無い。また、D-Asp残基はさまざまなタンパク質中に自発的に生成するが(藤井の章参照)、これを特異的に認識するタンパク質分解酵素が見出されている³⁶⁾。したがって、D-Asp含有タンパク質の分解によって遊離のD-Aspが生成する可能性も考えられる。このように、哺乳類でのD-Aspの生成経路はまだ不明な点が多いが、PC12細胞はD-Aspを生成していると考えられ、我々はこの内在性D-Aspがどのように細胞外へ放出されるのかを検討した。

PC12細胞やその亜株(MPT1細胞や2068細胞)を用いた解析の結果^{33, 37~39)}、以下の三つの経路が示唆された(図9)。すなわち、1) 刺激の無い条件下で、細胞質に存在するD-Aspが自発的・継続的に放出される経路(図9-1)、2) 開口分泌(exocytosis)によって放出される経路(図9-2)、3) 細胞質に存在するD-Aspが、容積感受性有機アニオン

チャンネル(volume-sensitive organic anion channel: VSOC)を介して放出される経路(図9-3)の三つである。上記のように、PC12細胞を培養していると、細胞内と培地中のD-Asp量が培養時間とともに増加する^{32, 33)}。このことは、D-Aspが特別な刺激の無い条件下でも自発的・継続的に細胞外へ放出されていることを示している。この放出をドーパミンの放出と比較してみたところ非常に対照的であった³⁹⁾。ドーパミンは、PC12細胞内で有芯小胞(large dense-core vesicle: LDCV)に存在して、開口分泌により放出されるといわれている。高濃度のK⁺イオン存在下で両者の放出を比較すると、ドーパミンの放出は急速で2分以内に終結し、カルシウムチャンネル阻害剤によって阻害されたのに対して、D-Aspの放出は緩やかで、阻害剤には影響されなかった。また、開口分泌に関与するSNAREタンパク質(SNAP-25)をRNA干渉法でノックダウンすると、ドーパミンの放出は有意に阻害されたのに対してD-Aspの放出はむしろ増加した。抗D-Asp抗体を用いてPC12細胞を染色すると、内在性のD-Aspは細胞質に均一に分布していた。また、生化学的には、ドーパミンはLDCV画分に回収されたのに対して、D-Aspはほとんど細胞質画分に回収された。したがって、D-Aspの自発的・継続的放出は、開口分泌とは異なり、細胞質に存在するD-Aspが何らかの経路を介して放出されると考えられる。

自発的に放出されたD-Aspは、L-Gluトランスポーターを発現している細胞(MPT-1細胞)の場合には、図9-1'のようにこのトランスポーターを介して細胞内へ継続的に取り込まれていることが明らかになった^{37, 38)}。上記のように、L-Gluトランスポーターは、L-AspとD-Aspに対してもL-Gluと同等の親和性を有しており、同じように取り込むことができる。したがって図9-1'の場合には、D-Aspは細

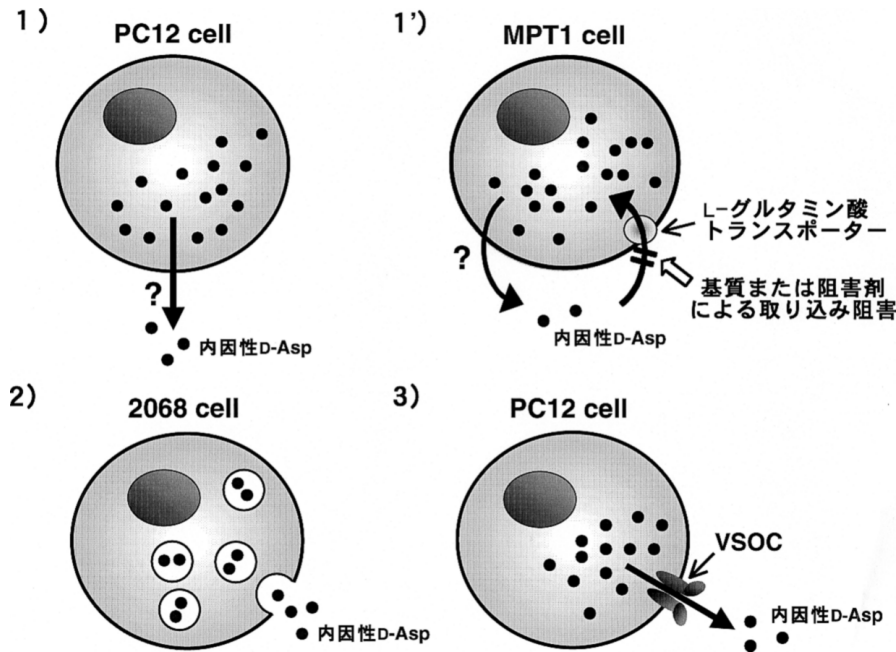


図9 PC12細胞およびその亜株からのD-Aspの放出

胞外へ自発的に放出され、同時に継続的にL-Gluトランスポーターを介して細胞内へ取り込まれていることになる。つまり、細胞内と細胞外との間でD-Aspの動的な相互交換が成り立っていることを示している^{37,38)}。実際、MPT1細胞の培地にL-Glu（またはL-Gluトランスポーター阻害剤）を加えると、D-Aspの取り込みを（競合的に）阻害するためD-Aspが培地中に蓄積した。すなわち、図9-1'のようなD-Aspの動的なホメオスタシスにおいては、L-Gluトランスポーターの基質（または阻害剤）が細胞外のD-Asp濃度を調節することを意味している。このような自発的・継続的放出（図9-1）、および細胞内外での動的な相互交換（図9-1'）は、他の物質（L-Gluやアセチルコリン）でも報告されている（37）と（38）の引用文献参照）。

PC12細胞の亜株である2068細胞を抗D-Asp抗体で染色すると、上記のPC12細胞とは異なり、核周辺に顆粒状の構造が観察された⁴⁰⁾。2068細胞はL-Gluトランスポーターを発現しているので、放射性のD-Aspを取り込ませてその放出を観察すると、細胞外のCa²⁺イオンに依存し、高濃度のKClやカルシウムイオノフォアによって促進された。これらの結果は、D-Aspの放出が開口分泌で行われている可能性を示唆している（図9-2）。同様な結果がPC12細胞（おそらく、2068細胞と同種の、PC12細胞の亜株と思われる）でも報告されている⁴¹⁾。この報告では、D-Aspはドーパミンとともに有芯小胞（LDCV）に存在し、高濃度のKClや神経毒によってドーパミンと同様な様式で細胞外に放出されている。上記のPC12細胞の結果とは著しい相違がある。2068細胞は、PC12細胞の継代培養中に見出された平坦な（flat）形状を示す亜株である。D-Asp含量が、PC12

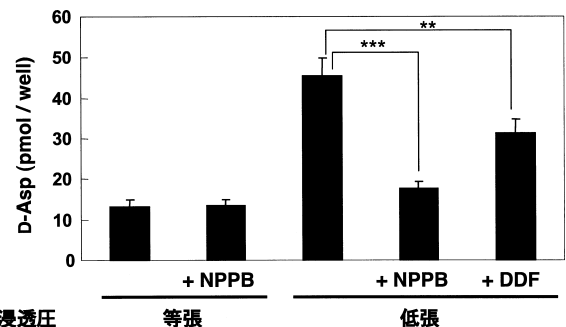


図10 低張処理によるPC12細胞からのD-Aspの放出
低張条件下（216mOsm, 20分）で観察されたD-Aspの放出は、NPPBやDDFによって阻害された。文献39参照。

細胞の2倍以上あり、種々の形質が異なっている。2068細胞（及び同種の細胞）においては、PC12細胞にはない分子装置（例えば、小胞輸送体：vesicular transporterなど）が発現していて、D-Aspが細胞内の小胞に蓄積され、刺激に応じて開口分泌により放出されているのではないかと考えられる。

PC12細胞での詳しい解析からは、上記のように、D-Aspの細胞外放出に関して三つ目の経路も明らかになった³⁹⁾（図9-3）。すなわち、細胞膜に存在して細胞質と外界とを連絡する容積感受性有機アニオンチャンネルを介する放出経路である。このチャンネルは、浸透圧の変化により開口する。PC12細胞を低浸透圧（低張）条件下におくと、細胞質に存在する内因性D-Aspが放出され（図10）、浸透圧の減少の程度に依存して放出量が増加した。ドーパミンはこのような低張刺激では放出されなかった。容積感受性有

機アニオンチャンネルの阻害剤 (NPPB や DDF) は、この放出を著しく阻害した (図 10)。図 9-1 で述べた D-Asp の自発的・継続的放出は、これらの阻害剤では阻害されなかったもので、容積感受性有機アニオンチャンネルを介する放出とは異なるメカニズムによると考えられる。

浸透圧変化による D-Asp の細胞外への放出は、以下のような例で生理的意義があると考えられる。D-Asp は、視床下部の視索上核や室傍核に存在する巨大神経細胞の細胞質や核に見出されている。容積感受性有機アニオンチャンネルは広範に発現しており、神経にも存在すると考えられるので、この領域での浸透圧変化が神経細胞からの D-Asp の放出を引き起こすと考えられる。上記のように、D-Asp には視床下部や下垂体後葉でバソプレッシンとオキシトシンの産生調節作用が認められるので²²⁾、浸透圧の変化により放出された D-Asp がバソプレッシンとオキシトシンの産生を調節し、体内の水バランスを通じて浸透圧をフィードバック制御しているのではないかと考えられる。視床下部の星状細胞 (astrocyte) に存在するタウリンについては、浸透圧の減少により容積感受性有機アニオンチャンネルを介して放出され、巨大神経細胞のグリシン受容体を刺激してバソプレッシンとオキシトシンの分泌を調節し、体内の水バランスを調節しているというメカニズムが示唆されている (42) および (42) の引用文献参照)。

D-Asp の細胞外放出の経路が、図 9 に示したように哺乳類体内には複数存在すると考えられる。星状細胞からの ATP の放出についても、開口放出と細胞膜に存在するチャンネルを介する放出の両者が機能していることが示唆されており、おそらく生理的・病理的状況に応じて異なる放出が起こるのではないかと考えられている。D-Asp の場合も、同様に生理的・病理的状況に対応して異なる経路を介した放出が起きているのではないかと考えられる。

図 5 では、精巣における D-Asp の役割について、精細管内の精子細胞から放出され、管外のライディッヒ細胞へ働きかけてテストステロンの合成・分泌を促進しているのではないかと述べた。精子細胞は、精細管内での正常な成熟の過程で、その大多数がアポトーシスによって消滅しているといわれている。そこで、アポトーシス刺激が D-Asp の細胞外放出に影響するかを検討してみた。PC12 細胞にアポトーシスを惹起するスタウロsporin、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、セラミドや過酸化水素を与えると、D-Asp の細胞外放出が促進されることが明らかになった (鈴木ら、未発表)。この放出促進は、容積感受性有機アニオンチャンネルの阻害剤 (NPPB や DIDS) によって、ほぼ完全に阻害されたことから、容積感受性有機アニオンチャンネルを介する経路 (図 9-3) によると考えられる。不思議なことに、このアポトーシス刺激による D-Asp の放出促進は、すべて低張条件下で観察され、等張条件下では認められな

かった。細胞の種類によっては、容積感受性有機アニオンチャンネルがほぼ等張条件下でも開口することが報告されているので、精細管中の精子細胞の場合にも、アポトーシス刺激が D-Asp の放出を促進しているのではないかと思われる。したがって、精細管中の精子細胞が成熟する過程で起きているアポトーシスが D-Asp の放出を促進し、放出された D-Asp がライディッヒ細胞に作用してテストステロンの合成・分泌を促進していると考えられる。生成したテストステロンは、正のフィードバック制御により精子の成熟を促しているのではないかと考えられる。実際、精子のアポトーシスが亢進すると、精子の分化・成熟が早まることが知られている。

5. お わ り に

D-Asp は、D-セリンよりも早くに哺乳類体内に見出されたにもかかわらず、研究はたいへん遅れている。D-Asp の合成経路や酵素の解析が進展していないことや、D-Asp の標的タンパク質が同定されていないことが主な原因であると思われる。最近、上記の D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) のノックアウトマウスの解析結果が報告された^{43,44)}。分解系の欠損のため、予想通り体内の D-Asp 濃度が増加している。興味深いことに、主に下垂体中葉から産生されるプロオピオメラノコルチン (proopiomelanocortin) およびその限定分解で生じる α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) の産生が野生型に比べて減少しており、 α -MSH に依存する行動 (性行動や毛づくろい、体重など) に変化が観察されている。これらの結果からも、上述のように D-Asp が内分泌系の調節に深く関わっていることが示唆される。今後、哺乳類における遊離 D-Asp の研究が進展することが期待される。

文 献

- 1) Konno, R., Brückner, H., D'Aniello, A., Fisher, G., Fujii, N., & Homma, H. (2007) D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acids and Protein Research, Practical Methods and Protocols, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- 2) Hamase, K. (2002) *J. Chromatogr. B.*, **781**, 73-91.
- 3) Imai, K., Fukushima, T., Santa, T., Homma, H., Hamase, K., Sakai, K., & Kato, M. (1996) *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 303-312.
- 4) Nimura, N., Fujiwara, T., Watanabe, A., Sekine, M., Furuchi, T., Yohda, M., Yamagishi, A., Oshima, T., & Homma, H. (2003) *Anal. Biochem.*, **315**, 262-269.
- 5) Long, Z., Nimura, N., Adachi, M., Sekine, M., Hanai, T., Kubo, H., & Homma, H. (2001) *J. Chromatogr. B.*, **761**, 99-106.
- 6) Song, Y., Feng, Y., LeBlanc, M.H., Zhao, S., & Liu, Y.-M. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 8121-8128.
- 7) Miao, H., Rubakhin, S.S., & Sweedler, J.V. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 7190-7194.

- 8) Dunlop, D.S., Neidle, A., McHale, D., Dunlop, D.M., & Lajtha, A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 27–32.
- 9) Man, E.H., Fisher, G.H., Payan, I.L., Cadilla-Perezrios, R., Garcia, N.M., Chemburkar, R., Arends, G., & Frey, W.I. (1987) *J. Neurochem.*, **48**, 510–515.
- 10) Man, E.H., Sandhouse, M., Burg, J., & Fisher, G.H. (1983) *Science*, **220**, 1407–1408.
- 11) Hashimoto, A. & Oka, T. (1997) *Prog. Neurobiol.*, **52**, 325–353.
- 12) D'Aniello, A. (2007) *Brain Res. Rev.*, **53**, 215–234.
- 13) Hashimoto, A., Oka, T., & Nishikawa, T. (1995) *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 1657–1663.
- 14) Homma, H. (2005) *ファルマシア*, **41**, 841–845.
- 15) Homma, H. (2002) Viva Origino (freely available online at <http://www.origin-life.gr.jp/3004/3004204/3004204.pdf>), **30**, 204–215.
- 16) Schell, M.J., Cooper, O.B., & Snyder, S.H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2013–2018.
- 17) Homma, H. (2005) *ビタミン*, **79**, 285–294.
- 18) Takigawa, Y., Homma, H., Lee, J.-A., Fukushima, T., Santa, T., Iwatsubo, T., & Imai, K. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 641–647.
- 19) Ishio, S., Yamada, H., Hayashi, M., Yatsushiro, S., Noumi, T., Yamaguchi, A., & Moriyama, Y. (1998) *Neurosci. Lett.*, **249**, 143–146.
- 20) Long, Z., Lee, J.-A., Okamoto, T., Nimura, N., Imai, K., & Homma, H. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 1143–1147.
- 21) D'Aniello, G., Tolino, A., D'Aniello, A., Errico, F., Fisher, G. H., & Di Fiore, M.M. (2000) *Endocrinology*, **141**, 3862–3870.
- 22) Wang, H., Wolosker, H., Pevsner, J., Snyder, S.H., & Selkoe, D.J. (2000) *J. Endocrinol.*, **167**, 247–252.
- 23) Nagata, Y., Homma, H., Lee, J.-A., & Imai, K. (1999) *FEBS Lett.*, **444**, 160–164.
- 24) D'Aniello, A., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Annunziato, L., Petrucelli, L., & Fisher, G. (1996) *Life Sci.*, **59**, 97–104.
- 25) Nagata, Y., Homma, H., Matsumoto, M., & Imai, K. (1999) *FEBS Lett.*, **454**, 317–320.
- 26) D'Aniello, A., Di Fiore, M.M., Fisher, G.H., Milone, A., Seleni, A., D'Aniello, S., Perna, A.F., & Ingrosso, D. (2000) *FASEB J.*, **14**, 699–714.
- 27) Sakai, K., Homma, H., Lee, J.-A., Fukushima, T., Santa, T., Tashiro, K., Iwatsubo, T., & Imai, K. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **351**, 96–105.
- 28) D'Aniello, A., Di Fiore, M.M., D'Aniello, G., Colin, F.E., Lewis, G., & Setchell, B.P. (1998) *FEBS Lett.*, **436**, 23–27.
- 29) Lee, J.-A., Long, Z., Nimura, N., Iwatsubo, T., Imai, K., & Homma, H. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.*, **385**, 242–249.
- 30) D'Aniello, G., Ronsini, S., Guida, F., Spinelli, P., & D'Aniello, A. (2005) *Fertil. Steril.*, **84**, 1444–1449.
- 31) D'Aniello, G., Grieco, N., DiFilippo, M.A., Cappiello, F., Topo, E., D'Aniello, E., & Ronsini, S. (2007) *Hum. Reprod.*, **22**, 3178–3183.
- 32) Long, Z., Homma, H., Lee, J.-A., Fukushima, T., Santa, T., Iwatsubo, T., Yamada, R., & Imai, K. (1998) *FEBS Lett.*, **434**, 231–235.
- 33) Long, Z., Sekine, M., Adachi, M., Furuchi, T., Imai, K., Nimura, N., & Homma, H. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **404**, 92–97.
- 34) Abe, K., Takahashi, S., Muroki, Y., Kera, Y., & Yamada, R.-h. (2006) *J. Biochem.*, **139**, 235–244.
- 35) Funakoshi, M., Sekine, M., Katane, M., Furuchi, T., Yohda, M., Yoshikawa, T., & Homma, H. (2008) *FEBS J.*, **275**, 1188–1200.
- 36) Kinouchi, T., Ishiura, S., Mabuchi, Y., Urakami-Manaka, Y., Nishio, H., Nishiuchi, Y., Tsunemi, M., Takada, K., Watanabe, M., Ikeda, M., Matsui, H., Tomioka, S., Kawahara, H., Hamamoto, T., Suzuki, K., & Kagawa, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 730–736.
- 37) Adachi, M., Koyama, H., Long, Z., Sekine, M., Furuchi, T., Imai, K., Nimura, N., Shimamoto, K., Nakajima, T., & Homma, H. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **424**, 89–96.
- 38) Koyama, H., Sekine, M., Furuchi, T., Katane, M., Nimura, N., Shimamoto, K., Nakajima, T., & Homma, H. (2005) *Life Sci.*, **76**, 2933–2944.
- 39) Koyama, H., Adachi, M., Sekine, M., Katane, M., Furuchi, T., & Homma, H. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **446**, 131–139.
- 40) Long, Z., Sekine, M., Nimura, N., Lee, J.-A., Imai, K., Iwatsubo, T., & Homma, H. (2001) *Bioimages*, **9**, 61–67.
- 41) Nakatsuka, S., Hayashi, M., Muroyama, A., Otsuka, M., Kozaki, S., Yamada, H., & Moriyama, Y. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 26589–26596.
- 42) Hussy, N., Brès, V., Rochette, M., Duvold, A., Alonso, G., Dayanithi, G., & Moos, F. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 7110–7116.
- 43) Huang, A.S., Beigneux, A., Weil, Z.M., Kim, P.M., Molliver, M.E., Blackshaw, S., Nelson, R.J., Young, S.G., & Snyder, S. H. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 2814–2819.
- 44) Weil, Z.M., Huang, A.S., Beigneux, A., Kim, P.M., Molliver, M.E., Blackshaw, S., Young, S.G., Nelson, R.J., & Snyder, S. H. (2006) *Behav. Brain Res.*, **171**, 295–302.