

論文内容要旨

題目 Age- and gender-dependent D-amino acid oxidase activity in mouse brain and peripheral tissues: implication for aging and neurodegeneration

(マウス脳および末梢組織における年齢および性別依存的 D-アミノ酸酸化酵素活性：加齢および神経変性への影響について)

著者 Soo Hyeon Kim, Yuji Shishido, Hirofumi Sogabe, Wanitcha Rachadech, Kazuko Yorita, Yusuke Kato, Kiyoshi Fukui
平成 31 年発行 The Journal of Biochemistry 掲載予定

内容要旨

D-アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO)は Hans Krebs によって 1935 年に発見され、Flavin adenine dinucleotide(FAD)を補酵素として持つフラビン酵素であり、中性および塩基性の D-アミノ酸を基質とし、酸化的に分解することにより α -ケト酸およびアンモニア、過酸化水素を生成する。哺乳動物において、DAO は興奮性アミノ酸受容体のサブタイプ (NMDA 受容体) のコアゴニストとして作用する新規神経調節因子 D-セリンの代謝分解を介して、グルタミン酸神経伝達の調節に関与していると想定されている。さらに、DAO の上昇と D-セリンの低下による NMDA 受容体の機能低下は統合失調症との関連が示唆され、また、DAO の発現活性低下が筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の病態悪化と関連づけられているなど、DAO が重要な治療ターゲットとして研究がおこなわれている。しかしながら、哺乳動物における DAO の発現および酵素活性と病態生理学的意義の解明については未だ明らかにされていない。

そこで、我々は新たな DAO 酵素活性評価法を開発し、正常マウスの様々な組織器官における DAO 酵素活性の測定を行った。この方法は DAO による過酸化水素の生成をペルオキシダーゼの反応とカップリングさせて、4-アミノアンチピリンとアニリン系化合物の酸化的縮合反応で生成するキノンジイミン色素の発色反応により測定する方法で、高感度であり簡便性が高い評価法でハイスループットにも適応可能である。さらに、本開発の評価法は、動物の各種組織器官を材料とする上で重要となる界面活性剤含有緩衝液による組織の可溶化を許容し、より高い感度・簡便性をもたらしている。この方法を用いて、若年マウス

様式(8)

(6-7 カ月齢計 16 匹、雄 9 匹／雌 7 匹)と高齢マウス (14-15 カ月齢計 12 匹、雄 7 匹／雌 5 匹) の DAO の酵素活性 (測定値は ‘平均±標準誤差 nmol/min/mg protein’ で示す) を調べた結果、腎臓(6.44±0.51)、小脳(3.06±0.35)、延髄(0.77±0.07)、中脳(0.34±0.05)、脊髄(0.55±0.04)で顕著な活性が検出され、新たに精巣上体に強い DAO 酵素活性(0.55±0.05)が存在することを発見した。さらに、DAO 活性の高い組織を選び、年齢や性別による DAO 活性に変化がないか検討を行った。その結果、小脳と脊髄の DAO 活性は若年マウスに比べて高齢マウスで減少し(小脳: 若年マウス 3.96±0.30, 高齢マウス 1.87±0.56、脊髄: 若年マウス 0.62±0.05, 高齢マウス 0.46±0.05)、腎臓での DAO 活性は雄マウス(7.89±0.51)より雌マウス(4.52±0.67)で活性の低下が認められた。さらに、脊髄を頸椎、胸椎、腰椎領域に分けて年齢による DAO 活性とタンパク質発現量 (ウエスタンブロッティングの結果からデンストメトリック解析を行い発現量とした; DAO/GAPDH) を観察したところ、若年マウスに比べて高齢マウスの胸椎(若年マウス酵素活性 0.79±0.06; タンパク質量 0.145±0.002, 高齢マウス 酵素活性 0.41±0.08; タンパク質量 0.111±0.008)や腰椎領域(若年マウス 0.62±0.05; タンパク質量 0.138±0.003, 高齢マウス 0.27±0.06; タンパク質量 0.099±0.003)で大きな減少が見られた。この結果から、脊髄の DAO 活性の低下が、ALS に見られるような神経変性と強い関連がある可能性が示唆された。次に、我々は新たに発見した雄マウスの精巣上体をより詳細に検討するため精巣上体を頭部(酵素活性 0.756±0.07; タンパク質量 0.108±0.007)、体部(酵素活性 0.297±0.04; タンパク質量 0.050±0.006)、尾部(酵素活性 0.211±0.03; タンパク質量 0.041±0.005)に分けて DAO 活性とタンパク質発現量(DAO/ β -actin で示した)を観察すると、精巣上体の頭部領域に特に強い DAO 活性および発現量が示された。この結果から、精巣に接続する精巣上体頭部に存在する DAO が、精巣および精液中の D-セリンを含む D-アミノ酸の代謝において重要な役割を果たす可能性を提示できた。

結論として、申請者はマウスの脳と末梢組織における DAO 活性の直接測定のための新規の方法を開発した。本研究に基づいて、各組織器官における DAO 活性の重要な特徴は、各器官の機能的発達および性分化に関連している可能性を示すことができた。さらに、この研究は老化と神経変性の病態生理学における DAO の役割への新しい考察を提供することができた。本研究成果は平成 31 年発行の *The Journal of Biochemistry* に掲載予定である。