

参考資料

資生堂、慶応義塾大学、九州大学 ”D-アミノ酸”の分析技術を神経難病の解明に応用

～ D-アミノ酸の一種である D-セリンを標的にした新規診断・治療法開発に期待 ～

株式会社資生堂フロンティアサイエンス事業部(以下 資生堂)は、慶應義塾大学医学部解剖学教室の研究グループ(笹部潤平助教、相磯貞和教授ら、以下 慶應大学)、および九州大学大学院薬学研究院生体分析化学分野(浜瀬健司准教授ら、以下 九州大学)と共同で、運動神経が選択的に変性してしまう神経難病のひとつである筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)において、D-セリン分解酵素(D-Amino acid Oxidase;DAO)(注1)の異常が、脊髄のD-セリン(注2)量の変化を引き起こし、運動神経変性の制御に深く関与することを初めて明らかにしました。

この研究は、資生堂と九州大学が開発した、二次元高速液体クロマトグラフィー(2D-HPLC)(注3)による高感度アミノ酸分析技術を基盤に、脳組織中に極微量存在しているD-セリンの分析を可能にしたことによって大きく前進しました。

この高感度アミノ酸分析技術は、医療だけでなく美容、化粧品の開発にも積極的に活用しています。

※D-アミノ酸とその分析方法については、別添資料にて解説。

1. 研究背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、筋肉を動かし運動をつかさどる運動神経が障害をうけ、多くはわずか数年で全身の筋肉が痩せて力が入らなくなる神経難病です。一方で、体の感覚や知能などは通常障害を受けないことも特徴の一つです。主に中年で発症し、1年間で10万人に約1～2人が新たにこの病気にかかり、国内では現在約8,500人がALSを患っています。しかし、未だ原因は十分に解明されておらず、進行を止める根治的な治療法は開発されていません。従来からグルタミン酸による運動神経の興奮異常が病態に関与していると考えられ、現在のところ、神経からグルタミン酸放出を阻害する薬が唯一認可されていますが芳しい効果が得られておらず、新しい治療法の開発が待たれています。

これまでに、共同研究チームは運動神経の過剰興奮にはグルタミン酸のみならず、D-セリンが関与していることを発見し、さらに開発した2D-HPLC技術により脳内の極微量なD-セリンを定量しその制御メカニズムを究明することで、新しい治療へと繋がるのではないかと考えて研究を進めてきました。また、近年DAOの変異体が家族性(遺伝的)ALSの原因の一つであることを英国の研究グループが報告し、運動神経変性との関わりが注目を浴びていますが、DAOの変異体がD-セリン量の変化や運動神経変性にどのように関与するかは分かっていませんでした。

2. 主要な研究成果

資生堂は、慶應大学および九州大学と共同で、D-セリン分解に重要な DAO に注目してその ALS における役割を検討しました。本研究では、(1)2D-HPLC、および(2)DAO の高感度組織活性染色法(注 4)を応用し、これまで困難であった組織中微量 D-アミノ酸の高感度測定および DAO 活性の組織局在解析を行いました。その結果、DAO は小脳、脳幹、脊髄に豊富な酵素で、脊髄では特に上位運動神経路で D-セリンを低く保つ働きをしていることが明らかとなりました。DAO 酵素活性を欠損したマウス(注 5)では、脊髄で D-セリンの著明な蓄積を認め、組織学的な運動神経の変性と筋肉の萎縮を引き起こすことが示されました。さらに、ALS に類似した症状を引き起こす遺伝子改変マウス(注 6)の上位運動神経路におけるアストログリア細胞で著明に DAO 活性が低下していることを発見し、このことが脊髄における進行性の D-セリン蓄積の主要な原因であることを明らかにしました。これらのことから、通常 DAO は D-セリンを低く保つことで脊髄運動神経の過剰興奮を防ぐ役割を果たし、ALS では DAO 酵素活性の低下が D-セリン蓄積を促し、運動神経変性へと導くのではないかと考えられます。

本研究成果は、DAO 活性の低下に伴う D-セリン上昇が ALS の運動神経変性に深く関わっていることを示すものであり、このメカニズムに基づいた新規 ALS の早期診断法、治療薬の開発に繋がることが期待されます。

また、本研究成果は 2011 年 12 月 26 日発行(現地時間、15:00)の米国科学アカデミー紀要「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America」に掲載されます。

3. 論文について

D-Amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine

[D-アミノ酸酸化酵素は D-セリンを介して運動神経変性を制御する]

Jumpei Sasabe, Yurika Miyoshi, Masataka Suzuki, Masashi Mita, Ryuichi Konno, Masaaki Matsuoka, Kenji Hamase, and Sadakazu Aiso

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, in press

(注 1)D-セリン分解酵素

複数の D-アミノ酸を分解する D-Amino acid oxidase(DAO)。中枢神経系においては小脳、脳幹、脊髄で発現し、D-アミノ酸の含量調節に関与している。

(注 2)D-セリン

L-セリンの光学異性体。1990 年代に中枢神経系に多量に存在することが発見された D-アミノ酸の一種。中枢神経系において L-セリンから生合成され、小脳、脳幹、脊髄では DAO によって分解され調節されている。イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである N-メチル D-アスパラギン酸(NMDA)受容体に結合し、グルタミン酸と協調して神経細胞の興奮性を調節している。

(注 3)二次元高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、様々な有機化合物の分離や定量のための代表的な手法。二次元 HPLC は2つの異なる分離モードを組み合わせることで、複雑な組成を持つ試料の成分を分離するシステム(2D-HPLC)。本研究では、新開発モノリス型逆相カラムとセミマイクロ光学異性体分離カラムを組み合わせ、生体試料中の D-アミノ酸を分離し、高感度かつ高特異度で定量解析した。

(注 4)DAO の高感度組織活性染色法

DAO の酵素活性を保持することができる特殊な条件で凍結組織切片を作成し、D-プロリンを組織中の DAO の活性と反応させ、反応産物を蛍光標識して可視化する手法。DAO の活性が組織中でどこに分布するかを解析するのに有用。

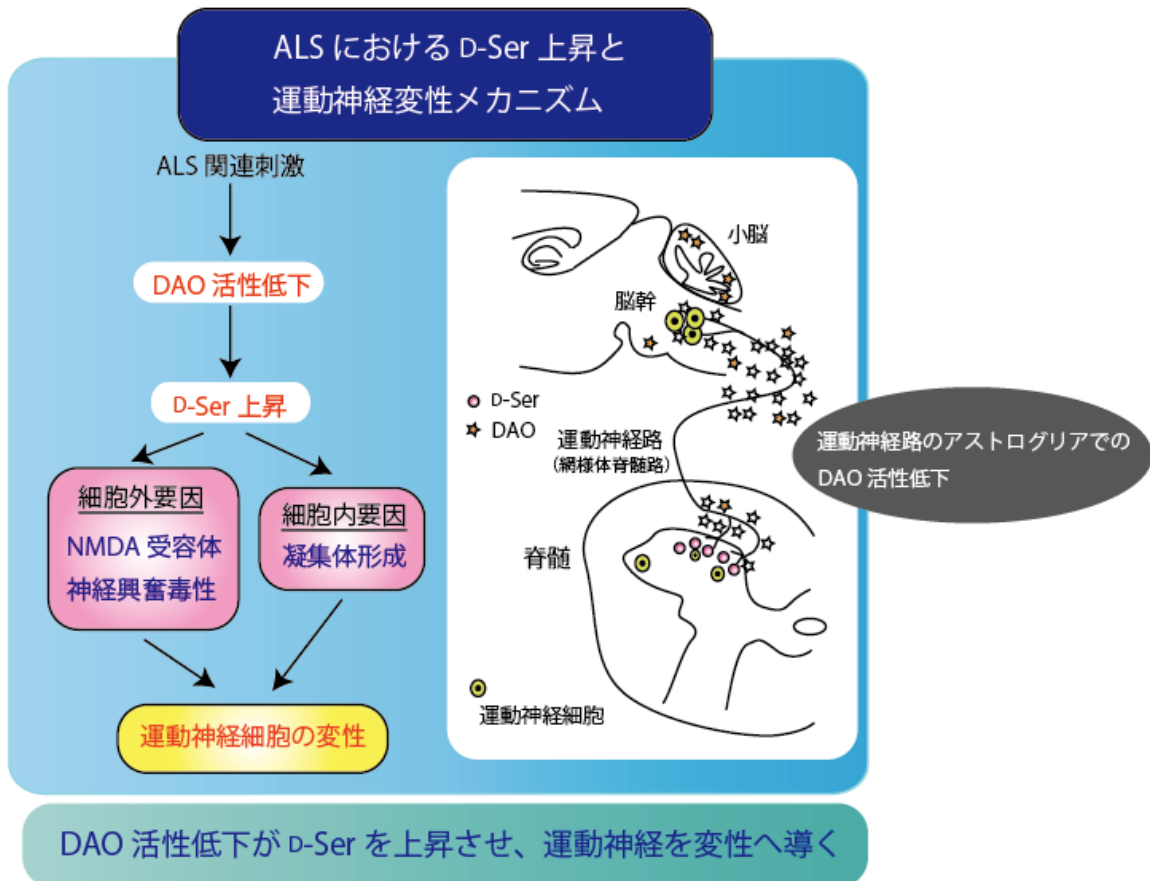
(注 5)DAO 酵素活性欠損マウス

遺伝子変異によって D-アミノ酸分解ができないマウス。国際医療福祉大学の金野柳一教授のご好意に

より供与。

(注6) ALS 類似の症状を有する遺伝子改変マウス

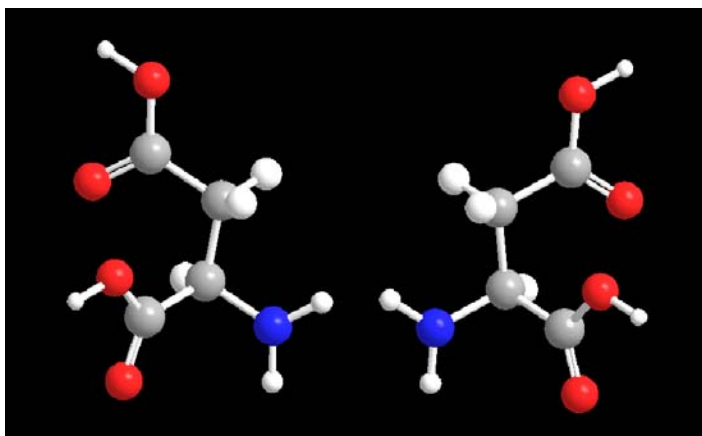
変異したスーパーオキシドディスムターゼ1を多く発現したマウス。



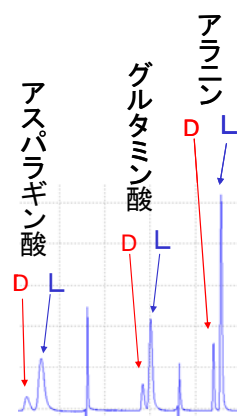
D-アミノ酸とその分析方法について

タンパク質のもととなるアミノ酸は20種類あり、最も単純な構造のグリシンを除き、同じ組成成分でありながら右手と左手の関係のように、互いに鏡に映したような光学異性体と言われるD型（D-アミノ酸）とL型（L-アミノ酸）があります（図1）。生体中のD-アミノ酸はL-アミノ酸に比べて存在量が非常に少ないうえに、タンパク質の構成成分となっている結合型アミノ酸が原則的にL-アミノ酸であること、さらに全てのD,L-アミノ酸を精密に定量分析できる方法が確立されていなかったこともあり、長い間生理機能研究の対象になっていませんでした。

資生堂と九州大学は、高感度D,L-アミノ酸同時一斉分析技術を開発し、極微量のD-アミノ酸も検出できる技術を確認しました（図2）。（詳細は、2010年5月に配信した「資生堂、D-アミノ酸に美肌効果を発見」のニュースリリースをご参照ください。）



（図1） アミノ酸の立体構造モデルの例
（D-アスパラギン酸（左）とL-アスパラギン酸（右））



（図2） 高感度D,L-アミノ酸同時一斉分析装置
（資生堂と九州大学が開発した分析装置一式と分析例）