

グリア細胞に存在するシスチン-グルタミン酸アンチポーターを選択的に阻害し、システインを含む抗酸化物質グルタチオンの蓄積を減少させるためにグリア傷害的に作用する、L- $\alpha$ -アミノアジピン酸を、ダイアリシチューブを通して内側前頭葉皮質に持続的に灌流すると、細胞外液中 D-セリン濃度が軽度であるが有意に減少した。同時に測定した細胞外液中の L-グルタミン酸濃度は有意に上昇し、シスチン-グルタミン酸アンチポーターに作用していることが確認された。これらとは異なり、細胞外液中の L-セリンおよびグリシンの濃度は変化しなかった。

#### D. 考察

今年度は、ラット大脳新皮質から、新たに D-セリンに立体選択的に応答する遺伝子 *dsr-3* が見出された。また、主任研究者が D-セリンのアフリカツメガエル卵母細胞内への蓄積を抑制する遺伝子としてクローニングした *dsm-1* が、卵母細胞に負荷した D-セリン放出を促進することが示唆された。一方、神経細胞やグリア細胞が傷害を受けた場合に細胞外液中 D-セリン濃度が変化することが明らかになった。

*dsr-3* mRNA の基礎的発現は、成熟期において脳に多く、脳内では前脳部優位であり、肝臓に少ない特徴があった。さらに小脳では、幼若期の方が成熟期より発現レベルが高いことがわかった。これらの発現分布と生後発達に伴う変化は、D-セリンおよび NMDA 受容体 R2B サブユニットと比較的類似していることから、*dsr-3* や産生蛋白は、NMDA 受容体、D-セリンの機能、代謝およびそれらの相互作用の調節に関与する可能性があり、現在詳細な解析を続けている。

*dsm-1* は、アフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させると、卵母細胞に予め取り込ませた D-セリンの放出が上昇した。COS 細胞に強制発現させた場合には、*dsm-1* 産生蛋白がゴルジ装置を中心とする細胞質に優位に検出されることより、*dsm-1* 産生蛋白は D-セリンの細胞小器官への輸送を促進し、D-セリンを含んだ小胞器官が細胞膜に移行して膜の融合等を介して、D-セリンが細胞

外へ放出されるメカニズムも考えられる。動物の個体レベルで、*dsm-1* が D-セリンの細胞外放出に関与する可能性を検討するため、*dsm-1* 遺伝子ノックアウトマウスを作製中である。

高次脳機能障害を来す、さまざまな大脳皮質の局所的病変では、神経細胞死やグリア細胞の傷害が見られる。そこで、このときの D-セリンの病態を明らかにするため、神経細胞体選択的な毒素のキノリン酸によって局所の神経細胞体を破壊した部位における細胞外 D-セリン濃度を測定し、著明に減少することをはじめて明らかにした。前脳部では、D-セリンが主要な NMDA 受容体コ・アゴニストと考えられていることから、このような D-セリンシグナルの減少によって、NMDA 受容体の機能低下が生ずるまたは増強されることが示唆された。

一方、グリア選択的な毒性をもつことが報告されている、L- $\alpha$ -アミノアジピン酸により、軽度ながら、内側前頭葉皮質の細胞外液中 D-セリン濃度が有意に減少した。この所見は、グリアの傷害時にも D-セリンシグナルが減弱することを示唆している。また、可逆性の選択的グリア毒であるフルオロクエン酸が細胞外 D-セリン濃度を低下させるという昨年度の結果とともに、細胞外液中への D-セリンの放出にグリア細胞が関与することを支持している。実際に、培養したアストログリアでは、予め取り込ませた D-セリンが細胞外へ遊離されることが観察されている。今後は、どのような種類のグリア細胞が、D-セリンの細胞外シグナルの調節に関係するのかを明らかにすることが、D-セリンの病態を理解する上できわめて重要と考えられる。

#### E. 結論

内在性 D-セリンの代謝および機能を調節する候補分子として、新たに D-セリンに立体選択的に応答を示し、D-セリンと分布が比較的類似している遺伝子 *dsr-3* を検出した。昨年度までにクローニングした *dsm-1* の産生蛋白は、D-セリンの細胞外放出を促進し、脳内における D-セリン遊離の分子機構に関係すると推測された。さらに、グリ

アまたは神経細胞が脳の局所で傷害されると、細胞外 D-セリンシグナルが低下することが明らかになった。これらの所見は、高次脳機能障害をもたらす局所的脳病変における D-セリンの病態の手がかりとなると考えられ、D-セリンシグナルを増強することが、高次脳機能障害の改善や進行遅延、増悪予防等に役立つ可能性を示唆している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakurai S, Nishikawa T. Inhibition of d-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as d-serine modulator-1. *J Neurochem* 2006; 96: 30-42.
2. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a d-serine-regulated transcript dsr-2 from rat cerebral neocortex. *J Neurochem* 2005; 95: 1541-1549.
3. Nishikawa T. Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1561-1565.

#### (2) 著書

1. Nishikawa T. Neuroanatomical and molecular changes in stress responses. Kato N, Kawata M and Pitman RK (eds.) PTSD brain mechanisms and clinical implications. Tokyo: Springer-Verlag; 2006. pp. 3-11.
2. 西川 徹: 1. 統合失調症. 第7章 神経・精神疾患の分子機構. 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編. 脳神経科学イラストレイテッド (改訂第2版). 東京: 羊土社; 2006. pp. 276-283.

#### (3) 総説

1. 西川 徹. ヒトの脳に存在する遊離型 D-セリンの機能と病態- 精神神経疾患の治療への応用-. *ファルマシア* 2005; 41: 863-868.

#### (4) その他

1. 山本直樹, 谷口 豪, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 竹内 崇, 金子雄二郎, 竹林裕直, 柏 淳, 新垣浩, 車地暁生, 土田英人, 西川 徹. 脳の D-セリンシステムを標的とした統合失調症の新規薬物療法開発に関する研究. *精神科薬療研究年報* 2005; 37: 62-68

### 2. 学会発表

#### (1) 特別講演・シンポジウム

##### (海外)

1. Nishikawa T, Kurumaji A, Ito T, Umino A, Ishii S. Molecular basis of developmental changes in stress responses. PTSD: Brain Mechanisms and Clinical implications. Tokyo, 2.17, 2005.
2. Nishikawa T. Glutamate dysregulation in schizophrenia. Recent Progress in Basic and Clinical Research of Neuropsychiatric Diseases, Seoul, 2.25, 2005.
3. Nishikawa T. A molecular pharmacological approach to the vulnerability to schizophrenia. Society of Biological Psychiatry 60th Annual Scientific Convention, Atlanta, 5.26, 2005.
4. Nishikawa T. NMDA receptor, D-serine and Schizophrenia. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.1, 2005.
5. Nishikawa T. NMDA receptor, D-serine system and the pathophysiology of schizophrenia. Tokyo Medical and Dental University 21st Century COE Program Brain Integration and Its Disorders Second International Symposium: Molecular and cellular mechanisms of schizophrenia and mood disorders - Recent progress -, Tokyo, 7.24, 2005.

##### (国内)

1. 西川 徹. 統合失調症の病因 - グルタミン酸系回路. Lilly Scientific Academy 3rd Draft, 東京, 4.8, 2005.
  2. 西川 徹: 統合失調症の病態仮説. ヤンセンファーマ CNS フォーラム 2005, 東京, 7.10, 2005
  3. 車地暁生. 統合失調症の神経科学研究 - review と introduction. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
  4. 山本直樹, 西川 徹. D-セリンの脳内代謝調節による新規抗精神病薬の開発. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
  5. 西川 徹. 脳の内在性D-セリンの代謝・機能と精神神経疾患における意義. 第1回D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
  6. 西川 徹. ストレスが誘発する精神疾患の発症・再発の分子機構. ヒューマンストレス産業技術研究会: 第7回講演会「ストレスと精神疾患」. 東京, 9.20, 2005.
  7. 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未, 石井澄和, 西川 徹. Novel candidate genes for stress responses in the brain. 第48回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.28, 2005.
  8. 西川 徹. Developmentally regulated psychotomimetic-inducible genes: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. 第48回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.29, 2005.
  9. 西川 徹. 脳の発達障害としての統合失調症. 第8回若手研究者のための生命科学セミナー ストレス ストレスから精神疾患に迫る - ストレスが脳を変える - . 東京, 10.14, 2005.
  10. 西川 徹. 統合失調症の病態への分子薬理学的アプローチ. 第15回Neuroscience Seminar Tokushima. 徳島, 3.6, 2006.
  11. 西川 徹. 治療薬開発研究の焦点. 日本統合失調症学会創立記念第1回大会: 記念シンポジウム「統合失調症研究の焦点」. 東京, 3.21, 2006
- (2) 国際学会
- 一般学会
1. Takeuchi T, Furuta K, Hirasawa T, Masaki H, Yukizane T, Atsuta H, Arakaki H, Nishikawa T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. 158th APA Annual Meeting, Atlanta, 5.26, 2005.
  2. Yukizane T, Arakaki H, Oshima K, Matsuda H, Hanamura S, Nishikawa T. Further analysis of regional cerebral blood flow in schizophrenia. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.1, 2005.
  3. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Sakurai S, Nishikawa T. Molecular cloning of a D-serine modulator gene dsm-1. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 6.29, 2005.
  4. Kuroda Y, Motohashi N, Ito S, Takano A, Astuta H, Terada T, Suhara S, Nishikawa T. rTMS failed to change [11C]raclopride binding in depressed patients. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 6.29, 2005.
  5. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a novel and D-serine-inducible transcript dsr-2. 8th World Congress of Biological Psychiatry, Vienna, 7.2, 2005.
- (3) 国内学会
- 一般学会
1. 竹内 崇, 古田 光, 平沢俊行, 正木秀和, 行実知昭, 山本真基子, 新垣 浩, 西川 徹. せん妄に対するリスペリドン内用薬の使用経験. 第101回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
  2. 古田 光, 竹内 崇, 正木秀和, 行実知昭, 黒田裕子, 山本真基子, 新垣 浩, 寺田 倫,

- 大島一成, 本橋伸高, 車地暁生, 西川 徹. 短パルス矩形波治療器による認知機能の変化. 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
3. 山本真基子, 竹内 崇, 正木秀和, 行実知昭, 古田 光, 新垣 浩, 西川 徹. リエゾン・コンサルテーション精神医療における適応障害の治療. 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
4. 黒田裕子, 本橋伸高, 新垣 浩, 寺田 倫, 竹内 崇, 古田 光, 行実知昭, 正木秀和, 西川 徹. うつ病に対する経頭蓋磁気刺激療法の有効性の検討. 大宮, 第 101 回日本精神神経学会総会, 大宮, 5.20, 2005.
5. 竹内 崇, 上里彰仁, 新垣 浩, 西川 徹. 下垂体鞍上部・松果体部胚細胞腫治療中に混迷状態と睡眠リズムの異常(過眠)を呈した器質性精神障害の一例. 日本睡眠学会第 30 回定期学術集会, 宇都宮, 6.30, 2005.
6. 黒田裕子, 本橋伸高, 伊藤滋朗, 高野晶寛, 熱田秀範, 寺田倫, 須原哲也, 西川徹. うつ病に対する反復性経頭蓋磁気刺激療法の有用性と脳内ドーパミンに与える影響. 第 35 回日本神経精神薬理学会・第 27 回日本生物学的精神医学会合同年会, 大阪, 7.7, 2005.
7. 嶋津 奈, 山本直樹, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 西川 徹. D-serine modulator 遺伝子 *dsm-1* による細胞内への D-セリン蓄積の制御. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.27, 2005.
8. 金子雄二郎, 柏 淳, 伊藤 卓, 西川 徹. フルオキセチンによるメタンフェタミン逆耐性の減弱. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 7.28, 2005.
9. 谷口 豪, 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津 奈, 竹林裕, 西川 徹. D-セリンに選択的応答を示す新規遺伝子 *dsr-2*. 第 1 回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
10. 山本直樹, 嶋津 奈, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 富田 麗, 西川 徹. 脳内 D-セリンの膜輸送動態に関する研究. 第 1 回 D-アミノ酸研究会学術講演会. 東京, 9.2, 2005.
11. 兼松宗太郎, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 原 論吉, 西川 徹. Effects of a glial toxin fluorocitrate on extracellular D-serine contents in the medial prefrontal cortex of the rat. 第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡, 9.28, 2005.
12. 山本直樹, 筒井啓太, 新垣 浩, 山本真基子, 車地暁生, 西川 徹. 青年期に異常行動を繰り返し長期予後良好であったシトルリン血症 II 型の一例. 東京精神医学会第 75 回学術集会. 東京, 11.5, 2005.
13. 竹内 崇, 古田 光, 正木秀和, 行実知昭, 平沢俊行, 熱田英範, 西川 徹. せん妄に対する非定型抗精神病薬の使用経験. 第 18 回日本総合病院精神医学会総会, 松江, 11.12, 2005.
14. 古田 光, 竹内 崇, 杉村 舞, 筒井啓太, 高木俊輔, 横溝美緒, 小澤いぶき, 熱田英範, 平沢俊行, 正木秀和, 行実知昭, 大島一成, 黒田裕子, 本橋伸高, 西川 徹. 気分障害患者における短パルス矩形波治療器による ECT の認知機能への影響. 第 18 回日本総合病院精神医学会総会, 松江, 11.12, 2005.
15. 車地暁生, 行実知昭, 熱田英範, 武田充弘, 藤田宗久, 山本真基子, 渋谷治男, 西川 徹. 身体表現性障害を経過中に双極 II 型障害を呈し、リチウム投与によって寛解に至った一症例. 第 4 回 Bipolar Disorder 研究会. 東京, 11.19, 2005.
16. 柏 淳, 金子雄二郎, 伊藤 卓, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹. セロトニン作動性薬物によるメタンフェタミン逆耐性の減弱- 統合失調症の再発予防

へ向けて- . 第 37 回精神神経系薬物治療研究報告会, 豊中, 12.9、2005.

その他

1. 柏 淳, 谷口 豪, 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津 奈, 竹林裕, 西川 徹. 未規制を含む依存性薬物による精神障害の分子病態の解明—覚せい剤によって形成された逆耐性現象の発現に対する SSRI の作用—. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 「依存性薬物および未規制薬物による神経毒性と精神病の発現機序に関する研究」班 平成 17 年度研究成果報告会, 2.23, 2006.
2. 柏 淳, 金子 雄二郎, 伊藤 卓, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹. セロトニン作動性薬物によるメタンフェタミン逆耐性の減弱- 統合失調症の再発予防へ向けて- . 第 37 回精神神経系薬物治療研

究報告会, 豊中, 12.9、2005.

3. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 石井澄和, 嶋津 奈, 谷口 豪, 兼松宗太郎, 藤平隆久, 金子雄二郎, 竹林裕直, 小方茂弘, 白久博史, 柏 淳, 車地暁生. 脳内 D-セリン濃度の調節機構解明による統合失調症の新規治療法開発に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「精神疾患の分子病態解明による新しい治療・予防法の開発に関する研究」班 平成 17 年度研究成果報告会, 東京, 12.14, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
本分担課題と直接関係するものはない
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特記すべきことなし

## 神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明

分担研究者 福井 清  
徳島大学分子酵素学研究センター・教授

**研究要旨** 本研究では D-アミノ酸酸化酵素を、中枢神経内在性の遊離 D-セリンの代謝と動態を制御する因子であるとの作業仮説に基づき、本酵素に関する分子酵素学的研究を基盤として、神経系を構成する細胞レベルにおける、本酵素の構造と活性制御の解析を行い、神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明と、脳虚血後神経細胞死の克服に向けた医学応用を目指す。

### A. 研究目的

本研究は『中枢神経系において D-アミノ酸酸化酵素が、脳内 D-セリンの代謝を司るキーエンザイムであり、NMDA 受容体のコアゴニストである D-セリンの代謝調節を介して、脳虚血後神経細胞死に密接に関与する』との仮説の検証を行う。D-アミノ酸酸化酵素(DAO)と細胞死との関連はほとんど知られておらず、本研究が先導的な役割を果たすと考えられる。タンパク質レベルでのプロテオーム解析並びにヒト酵素の活性に関する構造機能相関の解析は、神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明に重要な意義を有すると考えられる。

### B. 研究方法

本研究では、D-アミノ酸酸化酵素に関する分子酵素学的研究を基盤として、分子のレベルから、中枢神経組織を構成する細胞・組織レベル、さらに個体レベルに至る解析を行い、脳の発生・分化及び老化の過程や病態における D-セリンとその代謝酵素の生理的・病態生理学的意義の解明を目指す。

#### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験に関しては、動物愛護上のガイドラインに沿って行い、実施施設である徳島大学の動物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

我々は既にラット C6 細胞と mouse DAO 遺伝子を恒常的に発現する C6 細胞を用いて、D-セリン添加実験を行い、DAO 遺伝子の発現量が高い細胞では、細胞外 D-セリンがアストログリア細胞で代謝された結果、細胞死が誘導されることを観察している。この現象は、D-セリンの代謝により生成された過酸化水素の作用であると考えられたが、この細胞死は DAO の阻害剤である安息香酸とともに、フェノチアジン系を代表する向精神薬であるクロルプロマジンの添加により抑制された。

そこでヒト DAO 精製酵素標品を用いてクロルプロマジンによる酵素阻害効果の検討を行った。解析に用いる酵素タンパク質は、ヒト DAO の cDNA を発現ベクターに組み込み大腸菌で発現させた後、熱処理と二段階のカラムクロマトグラフィを用いて精製したもので、D-セリン等の中性アミノ酸に対する  $K_m$  値、阻害剤である安息香酸ナトリウムに対する  $K_i$  値はブタ DAO のパラメータとほぼ同等であった。クロルプロマジンを酵素溶液に加えて、酸素電極にて酵素活性の阻害、また蛍光・吸光を用いた光学的観測手法にて水溶液中における酵素分子の状態変化の有無等を観察し、ヒト DAO に対する影響を調べた。その結果、活性測定において、クロルプロマジンがヒト

DAO に対して、阻害効果を有することを見出した。

#### D. 考察

以上から、観察された細胞死が D-セリンの D-アミノ酸酸化酵素による代謝の結果引き起こされた現象であることが予想され、脳においては、D-セリンの代謝にアストログリア細胞に存在する DAO が積極的に関与することが示唆された。

またクロルプロマジンの示す薬理作用に D-アミノ酸酸化酵素活性阻害の作用が寄与する可能性が示唆された。

#### E. 結論

中枢神経系において、D-アミノ酸酸化酵素は、脳内在性 D-セリンの代謝を司るキ-エンザイムとして、D-セリンシステムの生理的また病態生理学意義に寄与すると考えられた。本研究が NMDA 受容体の機能異常に基づく神経・グリア細胞死などの神経疾患の病態に対する新規治療薬としての酵素阻害剤開発の基盤研究となる展開が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) X. Teng, T. Saka, L. Liu, R. Sakai, R. Kaji, K. Fukui : Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J. Neurochemistry* : in press
- 2) H. Park, Y. Shishido, S. Ichise-Shishido, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-Amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Cytotoxicity. *J. Biochem.*: 139, 295-304 (2006)
- 3) K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, Y. H. Kim: Functional Roles and Pathophysiology of Brain D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 853-860 (2005)
- 4) K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, K. Yorita, T. Sakai: Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of N-methyl-D-aspartate receptor. *Amino Acids* 29 : 61-62 (2005)
- 5) T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, H. Park, K. Yorita, Y. Tomita, H. Tsuge, K. Fukui: Purification and Crystal Structure of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 33-36 (2005)
- 6) G. Molla, M. S. Pilone, S. Sacchi, M. Barnasconi, K. Fukui, L. Pollegioni: Molecular Basis of Schizophrenia: Characterization of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 861-866 (2005)
- 7) Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, M. Abe, A. Kita, K. Fukui, T. Tsukihara, Y. Morimoto: Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of L-lactate oxidase (LOX), R181M mutant, from *Aerococcus viridans*. *Acta Cryst F* 61: 439-441 (2005)
- 8) K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou, M. Abe, A. Kita, T. Tsukihara, Y. Morimoto, K. Fukui: Crystal Structures of Wild-type and R181M L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 43-48 (2005)
- 9) K. Yorita, T. Matsuoka, D. P. Ballou, K. Fukui: H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 37-41 (2005)
- 10) 岩名沙奈恵、福井 清 : D-アミノ酸代謝システムによる脳機能制御の医化学. *ファルマシア* 41 : 857-861 (2005)

##### 2. 学会発表

- 11) K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, K. Yorita, T. Sakai, H. Tsuge : Potential roles for Astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity: Molecular approach to schizophrenia. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005 (2005年11月 東浦町)
- 12) K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, K. Yorita, T. Sakai : Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of N-methyl-D-aspartate receptor. 9th International Congress on Amino Acids and Proteins (2005年8月ウィーン(オーストリア))
- 13) K. Fukui, H. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, Y. H. Kim: Functional Roles and Pathophysiology of Brain D-Amino Acid Oxidase. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005年4月 葉山町)
- 14) T. Kawazoe, S. Iwana, K. Ono, H. Park, K. Yorita, Y. Tomita, H. Tsuge, K. Fukui : Purification and Crystal Structure of Human D-Amino Acid Oxidase. The 15th International

- Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005年4月 葉山町)
- 15) G. Molla, M. S. Pilone, S. Sacchi, M. Barnasconi, K. Fukui, L. Pollegioni : Molecular Basis of Schizophrenia: Characterization of Human D-Amino Acid Oxidase. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005年4月 葉山町)
- 16) K. Yorita, T. Matsuoka, D. P. Ballou, K. Fukui : H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005年4月 葉山町)
- 17) K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou, M. Abe, A. Kita, T. Tsukihara, Y. Morimoto, K. Fukui : Crystal Structures of Wild-type and R181M L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. The 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2005年4月 葉山町)
- 18) Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, M. Abe, A. Kita, K. Fukui, T. Tsukihara, Y. Morimoto : Structures of Arg-181 mutant and wild type of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans*. XX Congress of the International Union of Crystallography (2005年8月 フローレンス (イタリア))
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許出願
- 「新規アポトーシス誘導タンパク質及びそれをコードする遺伝子」福井 清、坂井隆志  
特願 2001-326784



## 脊髄小脳変性症に対するサイクロセリンの用量依存性試験

分担研究者 川井 充

国立病院機構東埼玉病院・副院長

**研究要旨** サイクロセリンはNMDA 結合型のグルタミン酸受容体のグリシンサイトにアゴニストとして作用する。これまで脊髄小脳変性症患者のモデル動物、脊髄小脳変性症患者において抗結核薬として使用される用量のおよそ10分の1で失調症状の改善効果が確認されており、脊髄小脳変性症の治療薬としての期待がもたれている。しかしプルキンエ細胞に対する過剰な興奮刺激は細胞の障害をもたらす危険もある。本年度は従来の用量の2倍の用量を脊髄小脳変性症患者に投与したとき、確実な効果の増強が認められるかどうかを検証することを目的として、用量依存性試験を実施中である。臨床試験は二重盲検のクロスオーバー試験で、20名の患者の参加を予定しており、現在17名の患者の投与が進行中あるいは投与が終了して長期投与に移行している。この臨床試験の結果は脊髄小脳変性症に対するサイクロセリンの推奨投与量を決定するのに有用な情報を提供するであろう。なお以前に行った50mg投与の臨床試験のあと長期投与に移行した症例の経過をあわせて報告した。

### A. 研究目的

脊髄小脳変性症は小脳の神経細胞の変性脱落により運動失調を主体とする神経症状を呈する一群の疾患の総称である。人口10万人あたりの有病率7-10人程度であり、進行性の経過をとって日常生活に著しい支障をきたすため、難病に指定されている。神経細胞の変性脱落に対する治療は研究段階であり、本邦では運動失調症状の改善を目的として甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンとその誘導体（タルチレリン）が治療薬として承認されているがその効果は十分ではない。

サイクロセリンは抗結核薬として用いられてきた抗生物質であるが、血液脳関門を容易に通過して、N-methyl-D-aspartate (NMDA)結合型グルタミン酸受容体のグリシンサイトにアゴニストとして作用することが知られている。我々は脊髄小脳変性症のモデル動物である *reeler mice* および *Ara-C treated mice* でサイクロセリンが症状改善に有効であったことをふまえ、ヒトの患者

に動物実験とほぼ同等の用量である50mgを投与し、失調症状の改善に有効であったことを報告した。この用量は結核に用いる用量の10分の1である。昨年度はこの用量で長期投与を行ったところ効果は3ヶ月持続したことを報告した。

以上の結果はサイクロセリンが脊髄小脳変性症の失調症状の改善に対して有効な治療薬であることを示しているが、一部の脊髄小脳変性症においてNMDA結合型グルタミン酸受容体を介した興奮刺激が過剰になると神経細胞の障害を加速する可能性が示された。この点をかんがみて、投与量を増やしても効果の増加がみられなければ、安易な投与量はひかえるべきである。本年度は50mgと100mgの2つの投与量を設定し、2重盲検クロスオーバー試験を開始した。分担研究者の異動によりあらたに倫理委員会の承認を得て、臨床試験実施体制を構築する必要が生じたため、臨床試験は進行中であり、いまだキーオープンとはなっていない。

## B. 研究方法

20名の歩行可能な脊髄小脳変性症患者を無作為に1日50mg投与群と100mg投与群のいずれかに割り付ける。てんかんや精神障害を有する患者は除外する。サイクロセリン以外の薬剤とリハビリテーションは変更しない。投与量は朝夕食後に2分割する。2群とも偽薬とのクロスオーバー試験とする。クロスオーバーの間は最低11日間の休薬期間を設定する。薬剤の調剤は国立精神・神経センター武蔵病院薬剤部と国立病院機構東埼玉病院薬剤科が担当する。評価項目は国際運動失調評価尺度(ICARS)、Barthel指数、機能的自立評価法、10m往復平地歩行時間、EQ-5D、VASによるQOL評価、自覚症状記録。主要評価項目はICARSとする。

研究計画は国立精神・神経センター武蔵地区倫理委員会および国立病院機構東埼玉病院倫理委員会の承認を得たものである。また被験者は説明文書を用いて説明を受け、十分な質問の機会を持ち、文書で同意する。研究に参加意思を表明したあといつでも参加を取りやめることができる。また個人情報保護される。

## C. 研究結果

現在17名の患者が登録されサイクロセリンの投与を終了あるいは投与中である(表)。キーオープンして効果を解析するためにはさらに3名の患者を登録し、投与を終了する必要がある。

表 サイクロセリン用量依存性試験登録患者

症例	年齢	性	病型
1	56	M	OPCA
2	77	F	OPCA
3	62	M	OPCA
4	69	F	CCA
5	53	F	OPCA
6	59	F	SCA6
7	35	M	CCA
8	67	M	CCA
9	75	M	OPCA

10	52	F	?
11	61	F	OPCA
12	65	M	OPCA
13	44	M	MJD
14	39	M	MJD
15	57	M	MJD
16	56	F	MJD
17	68	M	MJD

OPCA オリーブ橋小脳変性症

MJD Machado-Joseph 病

CCA 小脳皮質変性症

追加：長期投与試験へ移行した症例の経過報告

ダブルブラインド投与が終了した症例のうち希望があった8例で一日50mg二分分割の長期投与に移行した。3例は通院が困難であるなどの理由でドロップアウトした。CCA?女69歳, SCA6女59歳, OPCA男75歳, CCA?男35歳, MSA男56歳の5例で一年間の投与をおこなった。可能な限りICARSで3ヶ月ごとに評価した。すべての例で一ヶ月ではICARSの得点はあまりかわらず、少なくとも効果のあった例がすぐに効果消失することはないとおもわれた。MSAの56歳症例ではパーキンソニズムや自律神経症状の悪化もありADLやICARSの得点は低下した。CCA男35歳とMSA男75歳の症例は比較的ADLが一年後も保たれておりICARSの得点も変化があまりなかった。これは原病の進行が遅いためかサイクロセリンが少しでも効果があったのか判定は困難であるが長期でも有効なことがある可能性が考えられた。採血等で副作用は認められず、有害事象のため中止した例はなかった。

## D. 考察

小脳皮質で唯一の興奮性ニューロンである小脳顆粒細胞は平行線維と呼ばれる軸索により、グルタミン酸を神経伝達物質として小脳プルキンエ細胞の樹状突起にシナプスを形成する。脊髄小脳変性症の一型であるオリーブ橋小脳変性症でNMDA結合型グルタミン酸受容体を介した

興奮刺激が過剰になり神経細胞が障害されるという推定をした報告がある。一方顆粒細胞から放出されるグルタミン酸が病的に減少すればブルキンエ細胞の興奮は抑制され、小脳機能に障害がおこると考えられる。遺伝性脊髄小脳変性症で glutamate dehydrogenase(GDH)の減少が報告されている。GDH はグルタミン酸の生成と分解のどちらにも働くが、平行常数からグルタミン酸合成側に偏っていると考えられており、GDH の減少はグルタミン酸の欠乏を引き起こすと考えられる。実際に一部の遺伝性脊髄小脳変性症で小脳皮質のグルタミン酸が減少していることが報告されている。以上の議論よりグルタミン酸アゴニストは少量投与で小脳性失調症状の改善に有効であるが、過剰に投与した場合は細胞毒性を呈する可能性がある。これまでの一日 50mg という投与量が至適であるかどうかは現在のところ確実でないが、増量により効果に著しい差がなければ、現在の一日 50mg を推奨投与量とすることが妥当であると考えられる。

## E. 結論

サイクロセリン用量依存性試験は現在進行中である。50mg と 100mg の間で効果に顕著な差がなければ、興奮性アミノ酸の細胞毒性の観点から 50mg を推奨投与量とすることが妥当である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

<英文>

1. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokohama K, Ota K, Kanda T, Fukuzawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005

<和文>

1. 村上泰生、大矢寧、小川雅文、川井充：筋強直性ジストロフィーでの息こらえによる息苦しきの検討 *臨床神経* 45:117-120,2005

2. 山本敏之、大矢寧、磯部建夫、白藤俊彦、尾方克久、小川雅文、川井充：Pioglitazone 長期投与による筋強直性ジストロフィーの糖尿病治療 *臨床神経* 45:287-292,2005

鈴木幹也、川井充：進行性核上性麻痺と鑑別すべき疾患 *医療* 59(9)：482-485, 2005

3. 多田羅勝義、福永秀敏、川井充：国立病院機構における筋ジストロフィー医療の現状 *医療* 60(2)：112-118,2006.2

## 2. 学会発表

### (1) 講演

1. 川井充：筋ジストロフィー治療に関する最近の治療の進歩 第19回筋ジストロフィー対策埼玉研修会 2005年2月6日 蓮田

2. 川井充：介入の効果判定のための QOL 評価尺度 MDQOL60 の開発 平成16年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 筋ジストロフィー総合班会議 2005年1月21日 東京

3. 川井充：筋疾患の病理 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 教育コース 2005年5月14日 宇都宮

4. 川井充：「どのようにして新しい治療薬が市販されるようになるのか」ー新しい治療のしくみー 第4回日本 ALS 協会埼玉県支部総会 講演会 2005年6月18日 大宮

5. 川井充：筋ジストロフィーの医学的管理と治療ー最近の進歩 第23回三国立病院筋ジス保護者会交流研修会 2005年10月22日 春日部

6. 川井充：「難病患者と家族を地域で支える」難病事例検討会ー難病患者を支える地域連携ー 2006年2月21日 春日部

7. 川井充：「筋萎縮性側索硬化症の診療と在宅療養支援」平成17年度難病講演会（さいたま市保健所） 2006年2月28日 さいたま

8. 川井充:「筋疾患の診断 筋病理と画像診断を中心に」 神経筋疾患講演会(日本医師会生涯教育講座 学術講演会) 2006年3月10日 旭川

9. 川井充:筋ジストロフィーの診療 日本神経学会 2005年度北海道地区生涯教育講演会 2006年3月12日 札幌

(2) 国際学会

1. M Kawai: Clinical Management of Myotonic Dystrophy. The 4th Annual Scientific Meeting of Asian & Oceanian Myology Center Kaohsiung, Taiwan, March 3rd-4th, 2005

(3) 国内学会

1. 宮武聡子、谷田部可奈、川井充、\*石原傳幸、\*\*榎中征哉: ビタミンB12の組織内欠乏によるミオパチーを合併した亜急性連合性変性症の59歳男性例 第172回日本神経学会関東地方会 2005年3月5日 東京

2. 大友学、布施滋、尾方克久、谷田部可奈、宮武聡子、川井充: 左上肢の進行性の筋萎縮と筋力低下で発症し、呼吸全を伴ってNPPVを装着した75歳男性例 第25回 Spinal Cord Club 2005年3月25日 東京

3. 大矢寧、中村治雅、小川雅文、大出貴士、有馬邦正、川井充: 筋強直性ジストロフィーでのアミロイド沈着:白血球DMPK遺伝子異常の軽度の68歳男性例 第46回日本神経病理学会総会学術研究会

4. 尾方克久、小川雅文、川井充: パーキンソン病における効用値QOL測定の妥当性 第46回日本神経学会総会 2005年5月25日 鹿児島

5. 鈴木幹也、大矢寧、村上善勇、尾方克久、小川雅文、川井充: 筋強直性ジストロフィーの

低酸素血症時における鼻翼呼吸の有無 第46回日本神経学会総会 2005年5月26日 鹿児島

6. 村上善勇、鈴木幹也、大矢寧、川井充: Duchenne型筋ジストロフィーにおける胸郭容積と最大強制吸気量の関連 第46回日本神経学会総会 2005年5月26日 鹿児島

7. 大矢寧、村上善勇、鈴木幹也、小川雅文、川井充: Becker型筋ジストロフィーでの腹直筋残存 第46回日本神経学会総会 2005年5月27日 鹿児島

8. 宮武聡子、岡橋里美、鈴木幹也、大友学、谷田部可奈、尾方克久、布施滋、川井充、竹内恵、榎中征哉: cytoplasmic bodyを小径筋線維に多数認める先天性ミオパチーの41歳女性例 第56回 Neuromuscular Conference 2005年8月20日 東京

9. 饗場郁子、今清覚、千田圭二、吉岡勝、岡伸幸、乾俊夫、橋口修二、尾方克久、川井充、湯浅龍彦: 神経疾患における転倒・転落の発生頻度—政策医療神経総合湯浅班。転倒グループ共同研究— 第59回国立病院総合医学会 2005年10月14日 広島

10. 吉岡勝、饗場郁子、今清覚、千田圭二、岡伸幸、乾俊夫、橋口修二、尾方克久、川井充、湯浅龍彦: 神経疾患における転倒の合併症—政策医療神経総合湯浅班共同研究— 第59回国立病院総合医学会 2005年10月14日 広島

11. 大友学、川井充、川城丈夫: 頚椎症として治療されているうちに呼吸不全が出現して非侵襲的人工呼吸を実施した筋萎縮性側索硬化症の75歳男性 第43回埼玉県医学会総会 2006年1月15日 さいたま市

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

## 【西川 徹】

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakurai S, Nishikawa T. Inhibition of d-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as d-serine modulator-1. *J Neurochem* 2006; 96: 30-42.
2. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a d-serine-regulated transcript *dser-2* from rat cerebral neocortex. *J Neurochem* 2005; 95: 1541-1549.
3. Nishikawa T. Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1561-1565.

#### (2) 著書

1. Nishikawa T. Neuroanatomical and molecular changes in stress responses. Kato N, Kawata M and Pitman RK (eds.) PTSD brain mechanisms and clinical implications. Tokyo: Springer-Verlag; 2006. pp. 3-11.
2. 西川 徹: 1. 統合失調症. 第7章 神経・精神疾患の分子機構. 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編. 脳神経科学イラストレイテッド(改訂第2版). 東京: 羊土社; 2006. pp. 276-283.

#### (3) 総説

1. 西川 徹. ヒトの脳に存在する遊離型 D-セリンの機能と病態-精神神経疾患の治療への応用-. *ファルマシア* 2005; 41: 863-868.

#### (4) その他

1. 山本直樹, 谷口 豪, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 竹内 崇, 金子雄二郎, 竹林裕直, 柏 淳, 新垣浩, 車地暁生, 土田英人, 西川 徹. 脳のD-セリンシステムを標的とした統合失調症の新規薬物療法開発に関する研究. *精神科薬療研究年報* 2005; 37: 62-68

【福井 清】

1. 論文発表

(1) 原著

1. Teng X, Sakai T, Liu L, Sakai R, Kaji R, Fukui K: Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J. Neurochemistry* : in press
2. Park H, Shishido Y, Ichise-Shishido S, Kawazoe T, Ono K, Iwana S, Tomita Y, Yorita K, Sakai T, Fukui K: Potential Role for Astroglial D-Amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Cytotoxicity. *J. Biochem.*: 139, 295-304 (2006)
3. Fukui K, Park H, Kawazoe T, Ono K, Iwana S, Tomita Y, Yorita K, Sakai T, Kim Y. H.: Functional Roles and Pathophysiology of Brain D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005*: 853-860 (2005)
4. Fukui K, Park H, Kawazoe T, Ono K, Iwana S, Yorita K, Sakai T: Astroglial D-amino acid oxidase is the key enzyme to metabolize extracellular D-serine, a neuromodulator of N-methyl-D-aspartate receptor. *Amino Acids* 29 (1): 61-62 (2005)
5. Kawazoe T, Iwana S, Ono K, Park H, Yorita K, Tomita Y, Tsuge H, Fukui K: Purification and Crystal Structure of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005*: 33-36 (2005)
6. Molla G, Pilone M S, Sacchi S, Barnasconi M, Fukui K, Pollegioni L: Molecular Basis of Schizophrenia: Characterization of Human D-Amino Acid Oxidase. *Flavins and Flavoproteins 2005* : 861-866 (2005)
7. Yorita K, Umena Y, Matsuoka T, Ballou D. P, Abe M, Kita A, Tsukihara T, Morimoto Y, Fukui K: Crystal Structures of Wild-type and R181M L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins 2005*: 43-48 (2005)
8. Yorita K., Matsuoka T, Ballou D. P, Fukui K: H265Q L-Lactate Oxidase from *Aerococcus viridans*. *Flavins and Flavoproteins 2005*: 37-41 (2005)
9. Umena Y, Yorita K, Matsuoka T, Abe M, Kita A, Fukui K, Tsukihara T, Morimoto Y: Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of L-lactate oxidase (LOX), R181M mutant, from *Aerococcus viridans*. *Acta Cryst F* 61: 439-441 (2005)
10. 岩名沙奈恵、福井 清 : D-アミノ酸代謝システムによる脳機能制御の医化学. *ファルマシア* 41 : 857-861 (2005)

## 【川井 充】

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokohama K, Ota K, Kanda T, Fukuzawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
2. 村上泰生, 大矢寧, 小川雅文, 川井充: 筋強直性ジストロフィーでの息こらえによる息苦しきの検討. *臨床神経* 45: 117-120, 2005.
3. 山本敏之, 大矢寧, 磯部建夫, 白藤俊彦, 尾方克久, 小川雅文, 川井充: Pioglitazone 長期投与による筋強直性ジストロフィーの糖尿病治療. *臨床神経* 45: 287-292, 2005.
4. 鈴木幹也, 川井充: 進行性核上性麻痺と鑑別すべき疾患. *医療* 59(9): 482-485, 2005.
5. 多田羅勝義, 福永秀敏, 川井充: 国立病院機構における筋ジストロフィー医療の現状. *医療* 60(2): 112-118, 2006.

#### (2) 著書

1. ピーター・ハーパー (著), 川井充, 大矢寧 (訳): 筋強直性ジストロフィー. 診断と治療社, 東京, 2005.
2. 川井充: 筋強直性ジストロフィー. 神経疾患 最新の治療 2006-2008. pp264-266, 南江堂, 東京, 2006.

#### (3) 総説

1. 川井充: 筋ジストロフィーの研究の進歩と臨床への応用. *MEDICAL REHABILITATION* 51: 1-8, 2005.
2. 川井充: 筋ジストロフィーの心筋障害—序論. *神経内科* 62(6): 525-529, 2005.
3. 川井充: 神経疾患における患者の訴え. *診断と治療* 93(8): 18-22, 2005.
4. 川井充: 骨格筋量の測定. *Annual Review 神経* 27-33, 2006.



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Inhibition of D-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as D-serine modulator-1

Dai Shimazu, Naoki Yamamoto, Asami Umino, Sumikazu Ishii, Shin-ichiro Sakurai and Toru Nishikawa

Section of Psychiatry and Behavioral Sciences, Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan

## Abstract

D-Serine in mammalian brains has been suggested to be an endogenous co-agonist of the NMDA-type glutamate receptor. We have explored the molecules regulating D-serine uptake and release from the rat neocortex cDNA library using a *Xenopus* oocyte expression system, and isolated a cDNA clone designated as *dsm-1* (D-serine modulator-1) encoding a protein that reduces the accumulation of D-serine to the oocyte. *dsm-1* is the rat orthologue of the human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter 1 (*PAPST1*) gene. The hydrophathy analysis of the deduced amino acid sequence of the Dsm-1 protein predicts the 10 transmembrane domains with a long hydrophobic stretch in the C-terminal like some amino acid transporters. The *dsm-1* mRNA is predominantly expressed in the forebrain areas that are enriched with D-serine

and NMDA receptors, and in the liver. The transient expression of *dsm-1* in COS-7 cells demonstrates a partially Golgi apparatus-related punctuate distribution throughout the cytoplasm with a concentration near the nucleus. *dsm-1*-expressing oocytes diminishes the sodium-dependent and -independent accumulation of D-serine and the basal levels of the intrinsic D-serine and increases the rate of release of the pre-loaded D-serine. These findings indicate that *dsm-1* may, at least in part, be involved in the D-serine translocation across the vesicular or plasma membranes in the brain, and thereby control the extra- and intracellular contents of D-serine.

**Keywords:** brain, D-serine modulator-1 gene, D-serine, transporter, NMDA receptor, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, *Xenopus* oocyte.

*J. Neurochem.* (2006) **96**, 30–42.

D-Serine, a co-agonist for the NMDA receptor (Danysz and Parsons 1998), has now been well documented to be present at high contents throughout life in mammalian brains by using a variety of detection methods for chiral amino acids (Hashimoto *et al.* 1992a,b; Nagata *et al.* 1992; Hashimoto *et al.* 1993a,b,c; Nagata *et al.* 1994; Chouinard *et al.* 1993; Kumashiro *et al.* 1995), although amino acids had long been assumed to exclusively exist as the homochiral L-form in mammalian tissues in proteins and free amino acid pools (Fujii 2002). Endogenous D-serine is predominantly concentrated in the brain (Hashimoto *et al.* 1993c) with an NMDA receptor R2B subunit-like distribution (Hashimoto *et al.* 1993c, 1995b; Kumashiro 1995; Schell *et al.* 1995, 1997), whereas the peripheral tissues contain far lower levels of the D-amino acid (Hashimoto *et al.* 1993c, 1995b).

These neuroanatomical and functional relationships between D-serine and the NMDA receptor imply that endo-

genous D-serine may regulate the NMDA receptor-mediated glutamate neurotransmission. This hypothesis is supported by our *in vivo* microdialysis study demonstrating the presence of extracellular D-serine in the NMDA receptor-rich brain

Received April 19, 2005; revised manuscript received July 19, 2005; accepted August 22, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Toru Nishikawa, Section of Psychiatry and Behavioral Sciences, Tokyo Medical and Dental University Graduate School, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: tnis.psy@tmd.ac.jp

**Abbreviations used:** AP, alkaline phosphatase; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate; DIG, digoxigenin; DMEM, Dulbecco's modified minimum essential medium; *dsm-1*, D-serine modulator-1; FBS, fetal bovine serum; FR, Frog Ringer; MBM, modified Barth's medium; NBT, nitro blue tetrazolium; NGF, nerve growth factor; PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate.

regions (Hashimoto *et al.* 1995a). Furthermore, selective depletion of the endogenous D-serine by D-amino acid oxidase without changes in the levels of glycine, another NMDA co-agonist, has indeed been shown to attenuate the NMDA receptor functions in the rat hippocampal slice preparations (Mothet *et al.* 2000).

Consequently, together with the involvement of the NMDA receptor in divergent higher brain functions and an anti-schizophrenic property of D-serine (Tanii *et al.* 1994; Javitt 2004), the extracellular D-serine levels should be under fine control by a specific molecular system. Neurochemical studies have so far indicated the processes of biosynthesis (Dunlop and Neidle. 1997; Takahashi *et al.* 1997), release (Hashimoto *et al.* 1993c; Schell *et al.* 1995), uptake (Wako *et al.* 1995; Hayashi *et al.* 1997; Yamamoto *et al.* 2001; Javitt *et al.* 2002; Ribeiro *et al.* 2002), and degradation by D-amino acid oxidase (Hashimoto *et al.* 1993c; Urai *et al.* 2002) for D-serine in the brain. Wolosker *et al.* (1999) reported the isolation of the serine racemase catalyzing conversion of L- to D-serine with serine dehydratase activity from rodent and human tissues. Interestingly, a sodium-independent neutral amino acid transporter encoded by Asc-1 exhibits a high affinity for D-serine as well as L-serine (Fukasawa *et al.* 2000), while D-serine has also been found to be taken up into the brain tissues in a sodium-dependent manner (Yamamoto *et al.* 2001; Javitt *et al.* 2002; Ribeiro *et al.* 2002).

However, the exact molecules comprising the uptake and release machinery for the regulation of the extracellular D-serine and their relation to the D-serine metabolism in the intracellular structures are largely unknown. Therefore, to obtain insight into the D-serine carrier proteins or their regulators, we have explored molecules that modify tritiated or non-radiolabelled D-serine accumulation into the *Xenopus* oocyte.

## Materials and methods

### Materials

Type I collagenase from *Clostridium histolyticum* was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). [<sup>3</sup>H]D-Serine (20–25 Ci/mmol) and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) were purchased from Moravak Biochemicals Inc. (Brea, CA, USA) and Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA), respectively. [<sup>3</sup>H]D-Serine was purified using columns packed with Dowex 1-X 8 (100–200 mesh) resin as previously described (Matoba *et al.* 1997). All other chemicals were ultra-pure grade and commercially available.

### Animals

The animal experiments were performed in strict accordance with the guidance of the Tokyo Medical and Dental University, and approved by the Committee for Animal Experiment Ethics of the University.

### Construction and screening of rat cerebral neocortex cDNA library

From the male Wistar rat (PD 56) cerebral neocortex, poly(A)<sup>+</sup> RNA was purified and size-fractionated by 5–20% sucrose density gradient centrifuge at the SW41Ti rotor (Beckman, Palo Alto, CA, USA) at 25 000 r.p.m. (107 000 g) for 12 h. Directional cDNA libraries were constructed from these fractions using pSPORT1 SuperScript Plasmid System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each library was subdivided into 50 pools, each containing 10 000 clones. The respective cDNA pool was transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase (mMESSAGE mMACHINE, Ambion, Austin, TX, USA), and used for microinjection into *Xenopus* oocytes.

### Expression screening in *Xenopus* oocytes

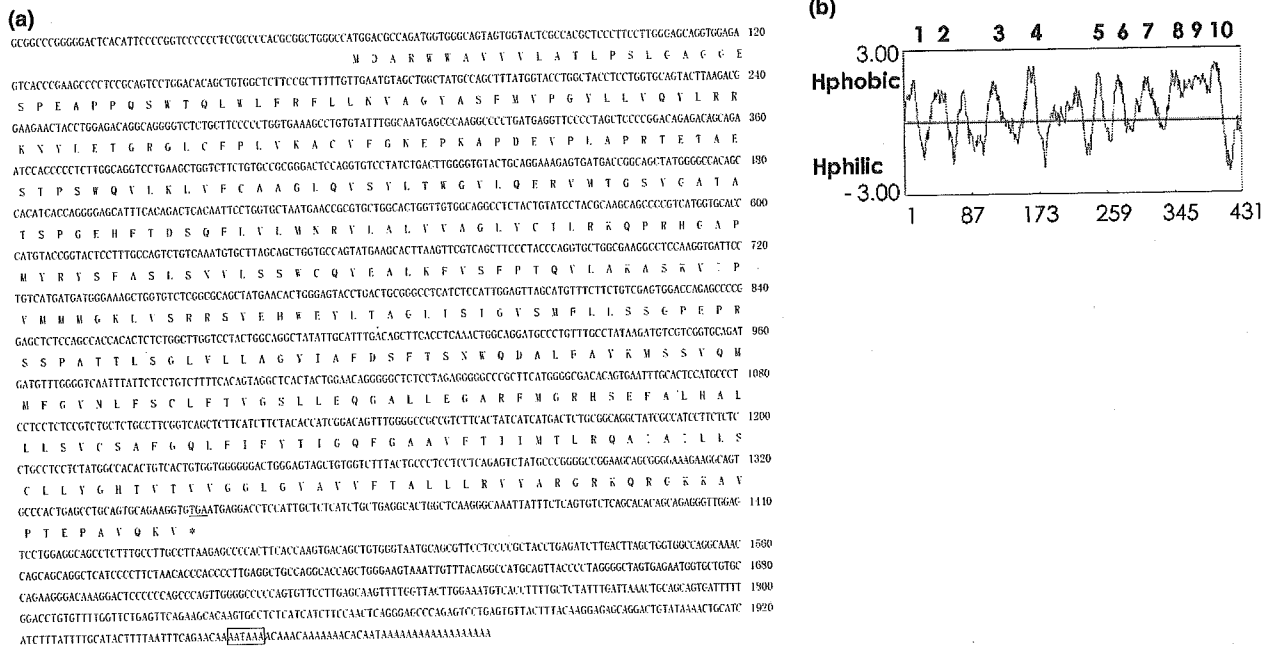
The expression screening assay was performed using collagenase-treated and manually defolliculated oocytes. The cells were microinjected with 50 nL (1 ng/nL dissolved in Rnase-free H<sub>2</sub>O) of poly(A)<sup>+</sup> RNA, or *in vitro* transcribed cRNA as mentioned above. The same volume of distilled H<sub>2</sub>O was used for microinjection as a control. The oocytes were incubated at 20°C in modified Barth's medium (MBM: 80 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 15 mM HEPES, pH 7.4) for 2 days before the assay.

### Uptake assay of D-serine

The uptake of D-serine was traced with [<sup>3</sup>H]D-serine. Groups of 12–20 oocytes were incubated at 26°C for 60 min in 1.5 mL of Frog Ringer (FR: 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, and 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 10 mM of [<sup>3</sup>H]D-serine (Utsunomiya-Tate *et al.* 1996) based on the preliminary data that the uptake of [<sup>3</sup>H]D-serine was found to be linear for at least 4 h and to approach a plateau 8 h after the start of the reaction. At the end of the incubation, non-specific binding of the radiolabelled compound on the cell surface was removed by six times of brief wash with each 10 mL of ice-cold FR solution. Individual oocytes were transferred to a microtube and completely lysed in 100  $\mu$ L of 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) in FR by intensive vortex mixing. One millilitre of scintillation fluid (Packard Ultima Gold XR, Parkin-Elmer, Boston, MA, USA) was added to each lysate solution, and the radioactivity was determined by liquid-scintillation counting (LS6500, Beckman). Some fractions induced a 1.5–2-fold increase, while some other fractions a 20–40% decrease in the uptake activity of D-serine into the oocytes. The positive fractions of cDNA library were further sequentially subdivided into the next 50 pools, each of 500–1000 clones. After repeating the same step, one pool containing 100 clones exhibited decreased D-serine uptake reproducibly. Then colonies from the positive pools were seeded individually into the well of 96-well plate to produce a grid system. From the combined testing of rows and columns for D-serine uptake activity, a single positive colony was isolated.

### Southern and northern blot analyses

Southern and northern hybridization analyses were performed as previously described (Tsuchida *et al.* 2001.) For the Southern hybridization, 1323 bases of <sup>32</sup>P-labelled RNA probe for *dsm-1* (probe 1, corresponding to nucleotide 674–1997 in Fig. 1a) was utilized. The hybridized filter was washed in 0.1  $\times$  saline sodium



**Fig. 1** Structure of *dsm-1*. (a) Nucleotide sequence of *dsm-1* cDNA. The amino acid sequence of the predicted open reading frame is shown below the nucleotide sequence. The poly(A) signal sequence is indicated by the open box. (b) Hydrophobicity plot of Dsm-1 protein. The hydrophobicity plot was obtained by the computer-aided calculation based on the Kyte-Doolittle analysis. (c) Sequence alignment of Dsm-1 protein with human PAPST1 and *Drosophila* SLL. The asterisks indicate the positions of amino acids identical among all the three proteins and the dots indicate the conserved amino acids between two proteins. The membrane-spanning regions predicted by the SOSUI program (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/welcomeE.html>, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan) are shown as numbered peaks in (b), and underlined in (c). This cDNA sequence has been deposited at the Centre for Information Biology and DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (accession no. AB197928).