

株化培養細胞における D-アスパラギン酸の
細胞内濃度調節機構ならびにテストステロン産生促進機構の解析

高野 友輔

目次

略語と記号	…1
諸言	…4
第一章 キラル誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた D,L-アミノ酸測定のバリデーション	…8
第一節 小諸言	…8
第二節 実験方法	…13
1-2-1 実験試薬	…13
1-2-2 FDLA 誘導体化試薬による D,L-アミノ酸の誘導体化	…13
1-2-3 LC/MS/MS の測定条件	…13
1-2-4 検量線の直線性と定量限界の算出	…13
1-2-5 日内日間変動試験	…14
1-2-6 添加回収試験	…14
第三節 結果	…15
1-3-1 検量線の直線性と定量限界	…15
1-3-2 日内日間変動試験	…17
1-3-3 添加回収試験	…20

第四節 考察	…23
第五節 小括	…25
第二章 細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構の解析	…26
第一節 小諸言	…26
第二節 実験方法	…28
2-2-1 実験試薬	…28
2-2-2 I-10 細胞中 D,L-アミノ酸の分析	…28
2-2-3 HepG2 細胞中 D,L-アミノ酸の分析	…28
2-2-4 統計解析	…28
第三節 結果	…29
2-3-1 FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた HepG2 細胞ならびに I-10 細胞中 D,L-アミノ酸分析の解析	…29
2-3-2 DDO 阻害剤ならびに DAO 阻害剤が HepG2 細胞中 D,L-アミノ酸量に及ぼす影響の解析	…30
第四節 考察	…33
第五節 小括	…35

第三章 マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いた実験系の確立	…36
第一節 小諸言	…36
第二節 実験方法	…39
3-2-1 実験試薬	…39
3-2-2 サンプルの前処理方法	…39
3-2-3 LC/MS/MS の測定条件	…39
3-2-4 検量線	…40
3-2-5 日内日間変動試験	…40
3-2-6 添加回収試験	…40
3-2-7 薬物添加時における I-10 細胞中 D,L-アスパラギン酸の測定	…40
3-2-8 薬物添加時における I-10 細胞培地中各種ステロイドホルモンの測定	…40
3-2-9 統計解析	…40
第三節 結果	…41
3-3-1 LC/MS/MS を用いた培地中ステロイドホルモンの検出	…41
3-3-2 検量線の直線性	…42
3-3-3 日内日間変動試験	…43
3-3-4 添加回収試験	…44
3-3-5 D-アスパラギン酸添加時における I-10 細胞中 D,L-アスパラギン酸量の解析	…45

3-3-6 D-アスパラギン酸がステロイドホルモン産生へ及ぼす影響の解析	…46
第四節 考察	…47
第五節 小括	…49
第四章 D-アスパラギン酸によるテストステロン産生促進機構の解析	…50
第一節 小諸言	…50
第二節 実験方法	…52
4-2-1 実験試薬	…52
4-2-2 各種阻害剤を用いた D-Asp によるテストステロン産生促進への影響の解析	…52
4-2-3 RT-PCR を用いた D-Asp による StAR mRNA 発現への影響の解析	…52
4-2-4 ウェスタンブロットを用いた D-Asp による StAR タンパク質発現への影響の解析	…52
4-2-5 StAR promoter reporter 遺伝子の構築	…53
4-2-6 D-Asp による StAR promoter 活性への影響の解析方法	…54
4-2-7 ゲルシフトアッセイを用いた StAR promoter 領域の解析方法	…54
4-2-8 統計解析	…54
第三節 結果	…56
4-3-1 D-Asp によるテストステロン産生促進への各種阻害剤の影響	…56

4-3-2 D-Asp による StAR mRNA ならびにタンパク質発現への影響と各種阻害剤の効果 果	…59
4-3-3 D-Asp による StAR promoter 活性への影響	…61
4-3-4 ゲルシフトアッセイを用いた StAR promoter 領域の解析結果	…63
第四節 考察	…65
第五節 小括	…67
総括	…68
謝辞	…71
参考文献	…72

本論文で用いた略語

AC: Adenylate cyclase
Ala: Alanine
Asc-1: Asc-type amino acid transporter 1
Asn: Asparagine
Asp: Aspartic acid
ASCT 1, 2: Alanine-serine-cysteine transporter 1, 2
Arg: Arginine
BTCC: *N*-(*tert*-Butylthiocarbamoyl)-L-cysteine ethyl ester
C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein β
cAMP: Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate
CRE: cAMP-responsive element
CREB: cAMP response element binding protein
CREM: CRE modulator
CYP11A1: Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
Cys: Cysteine
db-cAMP: Dibutyryl-cAMP
DDO: D-Aspartate oxidase
DAO: D-Amino acid oxidase
ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
ESI: Electrospray ionization
F: Forward
FAD: Flavin adenine dinucleotide
FDAA: 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-1-L-alanineamide
FDLA: *N*^α-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide
FSH: Follicle stimulating hormone
GC: Gas chromatograph
Gln: Glutamine
Glu: Glutamic acid
Gly: Glycine
GnRH: Gonadotropin releasing hormone
His: Histidine

HPLC: High performance liquid chromatography
Ile: Isoleucine
LC/MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Leu: Leucine
LH: Luteinizing hormone
LOH: Late-onset hypogonadism
LOQ: Limit of quantitation
LTP: Long-term potentiation
Lys: Lysine
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
Met: Methionine
MK-4: Menaquinone-4 (Vitamine K2)
MRM: Multiple reaction monitoring
MS: Mass spectrometry
NAC: *N*-Acetyl-L-cysteine
NBD-F: 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
NMDA: *N*-Methyl-D-aspartic acid
ODS カラム: Octa-decyl silyl (ODS) silica gel column
OPA: *o*-Phthalaldehyde
P450c17: 17 α -Hydroxylase/17, 20-lyase
Phe: Phenylalanine
PKA: Protein kinase A
PLP: Pyridoxal phosphate
Pro: Proline
QOL: Quality of life
R: Reverse
Ras: Rat sarcoma virus
Raf: Rapidly accelerated fibrosarcoma
S/N: Signal-to-noise ratio
Ser: Serine
SF-1/Ad4BP: Steroidogenic factor-1/ Adrenal 4 binding protein binding protein
Srr: Serine racemase
StAR: Steroidogenic acute regulatory protein
TEA: Triethylamine
Thr: Threonine

Trp: Tryptophan

Tyr: Tyrosine

Val: Valine

VSOC: Volume-sensitive organic anion channel

2D: Two dimensional

3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

17 β -HSD: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

諸言

日本は 2021 年推計で、65 歳以上の人口が 28.9%の超高齢社会である¹。超高齢社会が抱える課題として、高齢者の生活の質 (Quality of life; QOL) の低下²がある。高齢男性の QOL 低下につながる原因のひとつとして、加齢性腺機能低下症候群 (Late-onset hypogonadism; LOH 症候群) が挙げられる³⁻⁵。LOH 症候群の原因はテストステロン分泌量減少による性腺機能の低下である³⁻⁵。精巣で生合成されるテストステロンは性腺の分化や筋肉量の増加、判断力・記憶力を高めるといった生理機能を持つ。そのため、精巣より分泌されるテストステロンは男性の性腺機能の維持や QOL の維持に重要である。テストステロンの生合成は遊離型の D-アスパラギン酸 (D-Asp) によって促進することが報告されている^{6,7}。よって、D-Asp によるテストステロン産生促進機構のメカニズムを解明することは、これらの問題解決につながることを期待される。

D-Asp はアミノ酸の一種である。アミノ酸は、タンパク質の構成成分であるほか、神経伝達物質やホルモン生合成の前駆体としても機能する生命維持に必須な化合物である。生体の主要なアミノ酸は 20 種類存在する。グリシンを除く 19 種類のアミノ酸は不斉炭素中心を持つため、D 体と L 体の鏡像異性体が存在する。生体を構成するアミノ酸は L 体がほとんどであり、タンパク質を構成するアミノ酸もほぼ L-アミノ酸からなる。生体内に存在する D-アミノ酸は L-アミノ酸に比べて微量である⁸。D-アミノ酸と L-アミノ酸は旋光度以外の物理化学的性質は同じであり、一般的な分析方法では生体試料中の D-アミノ酸を測定するのが困難であった。しかし、光学異性体の分析技術の発展に伴い、ヒトを含めた哺乳類の体内 D-アミノ酸を測定することが可能となってきた⁷。

タンパク質は水素結合やイオン結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用によって複雑な立体構造をとる。その複雑な立体構造は、特定の分子や立体構造を認識して生理機能を発揮する。互いにキラルな関係にある分子は旋光度以外の物理化学的性質が同じであるが、立体構造を持つタンパク質との相互作用においては区別される。そのため、キラルな分子の立体的な違いは生理的作用の違いとして現れる。例えば、抗ヒスタミン薬であるレボセチリジンは、ラセミ体であるセチリジンの R-エナンチオマーである。レボセチリジンはもう 1 つのエナンチオマーであるデキストロセチリジンと比べ、ヒスタミン H₁ 受容体に対する親和性が 30 倍高く、抗ヒスタミン作用が強い⁹。生体内に存在する D-アミノ酸も光学的な差から L-アミノ酸とは異なった生理機能を持つことが考えられる。哺乳類の体内に比較的多く存在している D-Ser と D-Asp の生理機能について、これまでの報告を Table 1 に示す¹⁰⁻¹⁹。

Table 1 哺乳類体内における D-アミノ酸の分布と生理学的役割

組織分布	アミノ酸	生理学的役割
脳	D-Asp	発生と分化への影響
	D-Ser	NMDA受容体を介した神経伝達の調節
松果体	D-Asp	メラトニンの合成・分泌の制御
下垂体前葉		プロラクチン分泌の促進
下垂体中葉		プロオピオメラノコルチンの産生調節
下垂体後葉		オキシトシン・バソプレシンの産生調節
精巣		テストステロン産生の亢進

D-Ser はイオンチャネル型 L-グルタミン酸 (L-Glu) 受容体の一種である N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-Methyl-D-Asp; NMDA) 受容体のグリシン (Gly) 結合部位に結合する。NMDA 受容体に D-Ser が結合した状態でグルタミン酸が結合すると、より強い神経細胞の興奮を起こす²⁰。D-Ser による NMDA 受容体の活性化は、グルタミン酸作動性神経を介した情報伝達において重要な役割を果たす。NMDA 受容体は神経細胞のシナプス後膜に存在する。グルタミン作動性神経では、シナプス前神経細胞が興奮すると末端からグルタミン酸がシナプス間隙に放出される。このグルタミン酸がシナプス後神経細胞の表面にあるグルタミン酸受容体に結合するとシナプス後神経細胞の興奮が起こり、神経伝達が行われる (シナプス伝達)。シナプスでの情報の伝わりやすさは経験に依存して変化するため、シナプス可塑性と呼ばれ、学習・記憶形成における重要な生理的機能を示す。学習・記憶を司る海馬において、NMDA 受容体の活性化はシナプス伝達効率の長期増強 (Long-term potentiation; LTP) の誘導に必須である。よって、脳内に存在する D-Ser による NMDA 受容体を介した神経伝達の調節は、シナプス可塑性、学習・記憶形成などの重要な生理機能を持つことが示唆されている²¹。

哺乳類の体内に存在する D-Ser は、体内でセリンラセマーゼ (Serine racemase; Srr) によって L-Ser から生合成されている²²。Srr は肝臓や脳に存在することが報告されている²²。D-Ser は神経細胞内で Srr によって生合成され、シナプス間隙に放出される。また、D-Ser は D-アミノ酸酸化酵素 (D-Amino acid oxidase; DAO) によって代謝されている²³。DAO は主に中性・塩基性 D-アミノ酸を代謝し、2-オキソ酸とアンモニア、過酸化水素を生じる。シナプス間隙に放出された D-Ser は中性アミノ酸トランスポーターである Asc-type amino acid transporter 1 (Asc-1) および Alanine-serine-cysteine transporter 1, 2 (ASCT1, 2) により神経細胞やアストロサイトに取り込まれ²⁴⁻²⁶、一部はペルオキシソームに存在する DAO により分解される。このように、細胞内外における D-Ser の濃度は、酵素やトランスポーター

によって調節され、神経細胞の機能維持に関わっていると考えられる。よって、D-Serの濃度ならびにこれら調節因子を解析することは生理的機能を解明するうえで重要である。実際にセリンラセマーゼノックアウトマウスを作成すると、脳の組織中および細胞外液中のD-Ser濃度が野生型マウスに比べて減少する。D-Ser濃度の低下がNMDA受容体機能不全を引き起こし、統合失調症の症状を引き起こすことが示唆されている^{27,28}。このように、生体内のD-アミノ酸濃度調節機構の解析は、生理機能の解明のみならず、今まで判明していなかった病態のメカニズムの解明や治療法の確立につながる可能性を秘めている。

一方、哺乳類の体内に存在するD-Aspは、D-Serよりも早期に確認されているにも関わらず^{18,19}、細胞内濃度調節機構や生理機能の解明に向けた研究はD-Serと比べて遅れている。細胞内D-Asp濃度調節機構ではD-アスパラギン酸酸化酵素 (D-Aspartate oxidase; DDO) による代謝²⁹、L-グルタミン酸トランスポーターを介した細胞内への取り込み^{30,31}、エキソサイトシスによる細胞外への放出によって調節されることが報告されている^{32,33}。しかし、培養細胞を用いた研究において、D-Aspが生合成されていることが確認されているものの、アスパラギン酸ラセマーゼの存在は確認できておらず^{34,35}、D-Aspの生合成経路や濃度調節機構については不明な点が多い。また、D-Aspによるテストステロン産生亢進では、ラットLeydig初代培養細胞においてLH (Luteinizing hormone) 存在下、細胞内に取り込まれたD-Aspがテストステロン生合成の律速因子であるSteroidogenic acute regulatory protein (StAR)の発現を促進することにより、テストステロン産生を促進することが報告されている¹⁵⁻¹⁷。しかし、D-AspによるStAR発現促進の詳細なメカニズムについてはほとんど解明されていない。D-Aspによるテストステロン産生促進機構のより詳細な解明には、StAR遺伝子発現機構におけるD-Aspの作用機序を解析する必要がある。

D-Aspによるテストステロン産生促進機構のこれまでの研究報告では、ラットLeydig初代培養系を用いたものがほとんどであり、株化された細胞ではほとんど検討されていないのが現状である^{6,7}。初代培養細胞は動物の組織を直接取り出して培養した細胞で、より生体に近い状態の解析ができる。しかし、初代培養細胞を用いた解析では、細胞の樹立技術や実験動物が必要であり、技術誤差や動物の個体差が生じやすい。また、初代培養細胞は限られた回数しか細胞分裂せず、細胞を増やすことがほとんどできないほか、目的遺伝子の導入や機能、発現解析には不向きな細胞である。一方、がん化された継代可能な株化細胞は半永久的に培養することが可能であり、遺伝子の導入が容易で、目的遺伝子の機能や発現解析に汎用される細胞である。したがって、D-Aspによるテストステロン産生促進機構のより詳細な解明には、株化細胞を用いた実験系が有用であると考えられる。

以上のことから、本研究ではD-Aspによるテストステロン産生亢進機構を分子レベルで解明するため、D-Aspを含めたD-アミノ酸の高感度かつ高選択的で簡便な測定法を確立し、細胞内D-Asp濃度調節機構を明らかにし、さらに株化細胞を用いた実験系によるD-Aspによるテストステロン産生亢進機構の解析を行うこととした。第一章ではキラル誘導体化LC/MS/MS法を用いたD,L-アミノ酸測定のパリデーションを行うことにより、生体試料中

の D,L-アミノ酸の測定法としての妥当性を評価した。また、第二章では第一章で確立した本測定法を用いて、D-Asp が生合成されている細胞株のさらなる検索と細胞内濃度調節機構の解析を行った。第三章では D-Asp によるテストステロン産生亢進機構を解明するため、株化された培養細胞で解析が可能な実験系の構築を行い、第四章では構築した実験系を用いて解析を行った。

第一章 キラル誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた D,L-アミノ酸測定のパリデーション

第一節 小諸言

生体内に存在する D-アミノ酸は L-アミノ酸に比べて微量である⁸。そのため、細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構や D-アミノ酸の生理機能を解明するためには D-アミノ酸の高感度かつ高選択的な測定法が必要である。よって第一章では、生体試料中の D,L-アミノ酸を高感度かつ高選択的で簡便に測定する方法を確立することを目的とした。具体的には、①D,L-Asp を含め 20 種類すべての D,L-アミノ酸を分離分析することが可能であること、②測定時間が 1 時間以内であること、③培養細胞ならびに培地中の D,L-アミノ酸を連続的に定量することが可能であること、④高価な測定機器を必要としない測定法であることを目標とした。

ヒトを含めた哺乳類の体内に存在する D-アミノ酸を測定するにはいくつかの手法がある。生体試料中の D,L-アミノ酸を高感度かつ高選択的で簡単に測定するためには測定方法の選択や検討が必要である。D,L-アミノ酸は互いに鏡像異性体であり、光学活性以外の物理化学的性質が同じである。よって、通常のクロマトグラフィー操作における、Octa-decyl silyl (ODS) silica gel column (ODS カラム) のような単純な構造の固定相カラムでは分離することはできない。そこで、キラルカラムを用いることで D,L-アミノ酸を分離測定^{36, 37}する方法や、キラル中心をもつ誘導体化試薬を用いて D,L-アミノ酸をジアステレオマーに誘導体化し、ODS カラムで分離して測定する方法³⁸⁻⁴³の 2 つの方法が主に用いられる。

キラルカラムを用いた D,L-アミノ酸の測定に汎用されている方法として、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) 誘導体化 Two dimensional (2D)-HPLC 法があげられる^{44, 45}。2D-HPLC 法では、2 つのカラムを直列に接続し分離分析が行われる。まずアキラルな蛍光誘導体化試薬である NBD-F を用いてアミノ酸を誘導体化し、一次元目の逆相系カラムでアミノ酸ごとに分離する。一次元目のカラムでは D 体と L 体の分離は行わず、特定のアミノ酸を含む溶出液を分画する。次に一次元目で得られた分画を、二次元目のキラルカラムへ注入する。ここで D,L-アミノ酸の分離が行われ、アミノ酸ごとに D 体と L 体を定量することができる。2D-HPLC 法では、長時間の測定が必要となるものの、適切なキラルカラムを選択することにより、特定のアミノ酸を選択的かつ高感度で測定することができる。しかし、装置が煩雑かつ非常に高価であり、また測定に経験を要する。よって、第一章の目的を達成するために、2D-HPLC 法による測定は困難であると判断した。

ジアステレオマー誘導体化法を用いた測定法では、*o*-Phthalaldehyde (OPA) を用いた蛍光 HPLC 法、あるいは質量分析計 (Mass spectrometry; MS) を用いた測定法がある。まず、OPA/*N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) や OPA/*N*-(*tert*-Butylthiocarbamoyl)-L-cysteine ethyl ester (BTCC) のような蛍光誘導体化試薬を用いた方法 (Fig. 1) では、誘導体化後に高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) で分離し蛍光検出を行う。これらの試薬を用いて生体試料を測定した場合、蛍光検出で測定することで、高感

度に D,L-アミノ酸を測定することができるが、生体試料由来の夾雑ピークの影響を受けやすく、20種類すべての D,L-アミノ酸の同時測定は困難である。しかし、特定のアミノ酸をターゲットとして測定する場合、比較的短時間で良好なクロマトグラムを得ることが可能であるため、特定のアミノ酸に絞って測定を行っていることが多い。次に、質量分析計 (Mass spectrometry; MS) を用いた測定法では、特定のフラグメントイオンを生成するような誘導体化試薬を用いることにより、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry; LC/MS/MS) で、高感度かつ選択的に D,L-アミノ酸を検出することができる。キラル誘導体化 LC/MS/MS 法はキラル誘導体化試薬を用いて D,L-アミノ酸を誘導体化し、ODS カラムを用いて分離する。分離された D,L-アミノ酸は、エレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization; ESI) でイオン化され、MS/MS で検出される。MS/MS は質量分析計 (MS) を 2 つ直列につなげた装置で、その間に衝突室 (コリジョンセル) を持つ。MS/MS を用いた測定では、1 つ目の質量分析部 (Q1) で目的物質の質量電荷比 (m/z) を選択する。続くコリジョンセルで不活性ガスと衝突させることで、目的物質はフラグメント化を引き起こす。そこで生じたフラグメントイオンを 2 つ目の質量分析部 (Q3) で検出する。よって、MS/MS は夾雑物の多い生体試料の測定において、目的物質を選択的に検出することができる。そのため、MS/MS を用いた測定法は生体試料中の D,L-アミノ酸をより選択的に検出できる測定法だと考えられる。

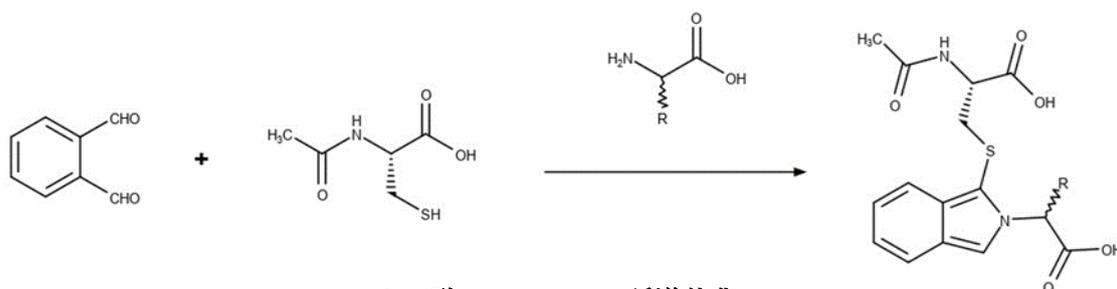


Fig. 1 アミノ酸の OPA/NAC 誘導体化

以上のことから、生体試料中の D,L-アミノ酸を高感度かつ高選択的で簡便な測定法を確立するためには、キラル誘導体化 LC/MS/MS 法が有用であると考えた。また、誘導体化試薬には *N*^ε-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide (FDLA) を選択した。FDLA は Marfey 試薬と呼ばれる 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanineamide (FDAA) を基に作られた。Marfey 試薬の特徴は、アミノ酸を単離することなしに簡便な操作のみで、一度に分析・同定が可能なことである⁴⁶。欠点として、質量分析計で測定する場合、FDAA によるアミノ酸の誘導体化体のイオン化効率が高くないことが挙げられる。そこで原田らは、イオン化効率の向上を検討した。その結果、FDLA は FDAA より検出感度が向上し (Fig. 2)、改良 Marfey 法で用いられている^{47, 48}。FDLA による D,L-アミノ酸の誘導体化はアルカリ性条件下 (1 M NaHCO₃) で行われる。NaHCO₃ のような不揮発性塩は LC/MS 測定中にイオン化抑制を引き起こす。そのため、検出感度が低下することから、高感度化には測定前にサンプルの脱塩が必要となる。したがって、脱塩処理を必要としない方法で誘導体化が可能となれば、誘導体化後の前処理が不要となる。そこで脱塩処理なしで測定を行うため、誘導体化反応の溶媒として NaHCO₃ の代わりにトリエチルアミン (Triethylamine; TEA) を用いて誘導体化し、誘導体化反応溶液を直接 LC/MS/MS で測定することを試みた⁴⁹。その結果、NaHCO₃ を TEA に置き換えることで、ピークの検出量が向上し、測定の簡便化に成功した⁵⁰。

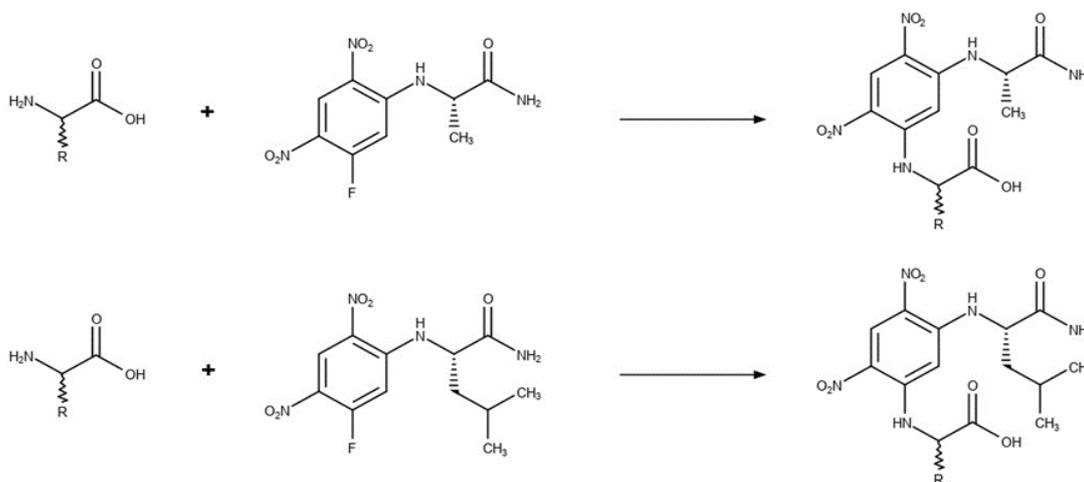


Fig. 2 アミノ酸の FDAA (上図) ならびに FDLA (下図) 誘導体化

FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法における各アミノ酸の保持時間と MS 測定条件を Table 2 に示す。確立した測定法では 20 種類すべての D,L-アミノ酸を 35 分で測定することが可能である。しかし、本測定法を用いて生体試料中の D,L-アミノ酸を測定するためには、検量線を作成し、直線性や定量限界、精度、回収率について解析し、分析法の評価（バリデーション）を実施する必要がある。そこで第一章では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた D,L-アミノ酸測定のバリデーションを行った。

Table 2 FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法での各アミノ酸の保持時間と MS 測定条件

Amino acid	Elution order	TL(min)	TD(min)	Rs	Q1	Q3	DP	CE	CXP
Alanine	L→D	16.4	18.9	6.1	384.1	338.6	61	15	8
Cysteine	L→D	4.8	6.5	6.1	416.1	371.1	66	21	10
Aspartic acid	L→D	15.8	16.7	1.6	428.1	383	66	19	10
Glutamic acid	L→D	15.5	16.4	1.9	442.1	397.1	71	21	10
Phenylalanine	L→D	20.2	23.9	11.3	460.2	414	66	17	32
Glycine	-	16	-	-	370.1	325.1	66	19	18
Histidine	D→L	4	3.2	2.4	450.2	298.2	66	29	16
Isoleucine	L→D	19.5	24.1	9.8	426.2	380.2	76	15	10
Lysine	L→D	25.9	27.3	4	735.4	645.3	111	37	18
Leucine	L→D	19.9	24.4	8.9	426.2	380.1	61	19	26
Methionine	L→D	18.5	22	11.2	444.2	398	66	15	10
Asparagine	L→D	12.3	13.1	1.8	427.2	382.1	61	19	10
Proline	L→D	15.5	17.4	6.7	410.2	365.1	71	23	34
Glutamine	L→D	14.3	14.6	1.1	441.2	396	131	21	26
Arginine	D→L	4.2	3.5	2.1	469.3	362.2	121	35	8
Serine	L→D	13.5	14.2	1.8	400.2	355.1	96	21	10
Threonine	L→D	13.3	16.7	8.5	414.2	369.1	61	21	10
Valine	L→D	17.8	22.1	13	412.1	365.9	46	15	30
Tryptophan	L→D	19.6	21.9	8	499	188.1	46	19	30
Tyrosine	L→D	9.8	10.3	1.4	476.2	430	61	17	12

Elution order: 溶出順序

TL: Retention times of l-amino acid compound derivatives (min),

TD: Retention times of d-amino acid compound derivatives (min), Rs: Resolution,

Q1: Precursor ion (m/z), Q3: Product ion (m/z), DP: Declustering potential,

CE: Collision energy, CXP: Collision cell exit potential

第二節 実験方法

1-2-1 実験試薬

アミノ酸の標準溶液（タイプ H、17 種類の L-アミノ酸）、アセトニトリル（HPLC グレード）、ギ酸（~99%、LC/MS グレード）は、富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から購入した。FDLA は、東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入した。D,L-アミノ酸、トリエチルアミン（TEA）は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入した。ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）は、ナカライテスク（京都、日本）から購入した。ウシ胎児血清（FBS）は、ニチレイ バイオサイエンス（東京、日本）から購入した。超純水の精製は、Direct-Q UV（Merck、ダルムシュタット、ドイツ）を用いた。LC/MS/MS 分析には、超純水で希釈したアミノ酸（タイプ H）の標準溶液または超純水に溶解したアミノ酸試薬を使用した。

1-2-2 FDLA 誘導体化試薬による D,L-アミノ酸の誘導体化

アミノ酸のサンプル 50 μL を 1.5 mL チューブに取り、トリエチルアミン 5 μL を加え、1% FDLA 溶液 50 μL を加えて室温 30 分で反応させた。反応後、2.5%ギ酸/50%アセトニトリル水溶液 195 μL を加えて反応を止め、測定試料とした。

1-2-3 LC/MS/MS の測定条件

LC/MS/MS の機器は LC-20AD ポンプ、CBM-20A 通信モジュール、SIL-20AC サーモスタットオートサンプラー、CTO-20AC カラムオーブン、API4000 システムを使用した。移動相は 0.1%ギ酸水溶液（A）及び 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液（B）を用い、B の濃度が 0.1-3.0 min: 30%、3.0-31.5 min: 30-90%、31.5-32.0 min: 90-30%、32.0-40.0 min: 30% のグラジエント条件に設定し、流速は 0.2 mL/min で測定した。試料の注入量は 1 μL とし、カラム温度を 40°C に設定した。クロマトグラフィー分離は、CAPCELL PAK C18（2.0 I.D.×150 mm、5 μm ）分析カラムで行った。イオン源はポジティブモードで測定し、インターフェースパラメータを最適化した（カーテンガス: 20 L min⁻¹; イオンスプレー電圧: 5500 V; 温度: 500 °C; イオン源ガス 1: 40 L min⁻¹; イオン源ガス 2: 80 L min⁻¹; 衝突セル出口電位: 7 V）。データの取得と処理には、LC/MS/MS 分析用の Analyst Software（AB Sciex）を使用した。

1-2-4 検量線の直線性と定量限界の算出

各アミノ酸濃度が 2.5 mM となるように調製したアミノ酸溶液を用いて、L-アミノ酸については（0.5, 1.0, 5, 10, 50 μM ）、D-アミノ酸については（0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μM ）に希釈し、それぞれ誘導体化したものを LC/MS/MS で測定し、検量線を作成した。定量限界（LOQ）は、低濃度の各種アミノ酸を誘導体化して測定し、ピーク高さから作成した検量線を用いてシグナル対ノイズ比（S/N）が 10 となるピークの高さを求めて算出した。

1-2-5 日内日間変動試験

L-アミノ酸について (0.5, 5.0, 50 μM) の濃度に調製した試料を作製し、日内及び日間において同一試料を繰り返し測定し、結果の変動について解析を行った。変動の大きさは、標準偏差 (S.D.) 及び以下の式を用いて算出した Accuracy (%) 値を用いて評価した。

$$\text{Accuracy (\%)} = (\text{測定平均値}/\text{標準液濃度}) \times 100$$

1-2-6 添加回収試験

HepG2 細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地を用い、10 cm シャーレ中、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。培地を回収した後、細胞に 0.3% NP-40 を 1 mL 加え溶解し、セルスクレーパーを用いてシャーレから細胞を剥がして回収し細胞抽出液とした。回収した細胞抽出液ならびに培地を 140 μL ずつ 1.5 mL チューブへ分注し、L-アミノ酸は終濃度 (0, 8, 40, 400 μM) となるように、D-アミノ酸は終濃度 (0, 4, 8, 40 μM) となるよう 10 μL ずつ添加し、-30°Cで一晩保存した。翌日、アセトニトリル 150 μL を加えて除タンパクを行い、遠心 (4°C、12000 x g、5 min) 後、その上清 50 μL を誘導体化し LC/MS/MS で測定した。

第三節 結果

1-3-1 検量線の直線性と定量限界

生体試料中の D,L-アミノ酸を定量するため、L-アミノ酸は 0.5~100 μM 、D-アミノ酸は 0.01~5.0 μM の範囲で検量線を作成したところ、D,L-Tyr、L-Gln、D,L-Cys を除いて相関係数 0.995 以上の直線性を確認することができた (Table 3)。L-Tyr の相関係数は 0.987、D-Tyr では 0.979、L-Gln は 0.965、L-Cys は 0.966、D-Cys は 0.543 であった。これらの結果から D,L-Tyr、L-Gln、D,L-Cys を除く D,L-アミノ酸について、L-アミノ酸は 0.5~100 μM 、D-アミノ酸は 0.01~5.0 μM の範囲において生体試料中の D,L-アミノ酸を定量することができるとを示した。

定量限界 (Limit of quantitation; LOQ) は低濃度の各種アミノ酸を誘導体化して測定し、シグナル対ノイズ比 (Signal-to-noise ratio; S/N) を 10 として算出したところ、各種アミノ酸の定量限界は 32.5~1768 pM の範囲にあった (Table 3)。

Table 3 各種 D,L-アミノ酸の検量線の直線性と定量限界

L-アミノ酸	標品濃度 (μM)						検量線	r	LOQ (pmol/L)
	0.5	1	5	10	50	100			
	Accuracy (%)								
Ala	106	102	91	93.2	98	105	$y=2.41 \times 10^4x+1.59 \times 10^3$	0.998	96.7
Asn	101	99.7	102	98.4	107	96.3	$y=4.84 \times 10^4x-7.15 \times 10^2$	0.999	43.4
Leu	115	99.6	100	101	107	105	$y=1.23 \times 10^5x+7.17 \times 10^3$	0.997	79.9
Glu	94.8	98.7	104	104	105	96.6	$y=5.41 \times 10^4x+1.49 \times 10^3$	0.997	179.3
Met	99.2	101	94.9	95.7	104	106	$y=5.61 \times 10^4x+6.85 \times 10^2$	0.999	86.1
Tyr	109	95.4	126	90.8	115	102	$y=4.61 \times 10^4x-4.31 \times 10^2$	0.987	99.7
Ser	116	100	99.3	97.8	108	107	$y=3.24 \times 10^4x+1.48 \times 10^3$	0.996	34.5
Thr	98.5	101	98.7	92.9	101	98.6	$y=3.43 \times 10^4x+7.23 \times 10^2$	0.999	484.9
Arg	103	102	91.9	91.4	104	103	$y=9.78 \times 10^3x+2.41 \times 10^2$	0.999	327.7
Asp	95	100	99.9	99.5	105	97.9	$y=4.99 \times 10^4x+3.90 \times 10^2$	0.998	125.5
Val	100	100	96.8	100	106	107	$y=1.66 \times 10^5x+5.06 \times 10^3$	0.999	56.0
Phe	103	99.8	101	98.7	104	105	$y=1.19 \times 10^5x+3.85 \times 10^3$	0.999	54.4
Ile	98.2	99.7	101	100	107	106	$y=1.71 \times 10^5x+4.56 \times 10^3$	0.999	40.1
Gln	151	98.8	106	98.6	108	103	$y=3.03 \times 10^3x-6.35 \times 10^1$	0.965	1315.3
Pro	111	103	93.5	85.4	96	103	$y=4.62 \times 10^4x+2.30 \times 10^3$	0.997	366.7
Trp	98.1	100	100	96.8	107	106	$y=1.61 \times 10^5x+9.03 \times 10^2$	0.999	66.8
His	102	101	95.7	94.2	99.3	99.7	$y=5.14 \times 10^1x+5.41 \times 10^1$	0.999	179.9
Lys	101	94.1	118	121	118	98.1	$y=5.10 \times 10^4x+7.90 \times 10^2$	0.998	45.6
Cys	56	95.5	121	106	94.3	85.3	$y=4.62 \times 10^4x+1.49 \times 10^3$	0.966	1711.3
Gly	94.1	101	96.7	94.8	104	106	$y=1.07 \times 10^5x+5.66 \times 10^3$	0.999	32.5

D-アミノ酸	標品濃度 (μM)						検量線	r	LOQ (pmol/L)
	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5			
	Accuracy (%)								
Ala	283	94.4	111	101	96.6	96.2	$y=5.28 \times 10^4x+3.08 \times 10^2$	0.997	98.3
Asn	102	90.7	99.1	96.9	108	104	$y=4.50 \times 10^4x+5.81 \times 10^2$	0.999	42.9
Leu	88	93.8	104	94.6	104	103	$y=2.08 \times 10^5x+6.72 \times 10^2$	0.999	79.0
Glu	99.1	104	102	93.1	102	99.9	$y=1.02 \times 10^5x+5.41 \times 10^2$	0.999	191.9
Met	97.2	92.1	102	103	105	108	$y=1.02 \times 10^5x+1.71 \times 10^3$	0.999	74.6
Tyr	221	99.6	101	105	86.3	108	$y=3.90 \times 10^4x-1.13 \times 10^2$	0.979	96.8
Ser	103	85.3	99.4	94.6	106	111	$y=4.48 \times 10^4x-1.42 \times 10^2$	0.999	36.3
Thr	295	106	87.2	96.2	108	102	$y=6.42 \times 10^4x+1.56 \times 10^2$	0.999	490.8
Arg	108	105	103	86.2	109	92.6	$y=9.63 \times 10^3x-2.14 \times 10^2$	0.998	327.4
Asp	103	93.4	86.3	103	109	106	$y=7.03 \times 10^4x+7.47 \times 10^2$	0.999	174.5
Val	101	93.3	100	96	103	106	$y=1.68 \times 10^5x+2.28 \times 10^3$	0.999	58.8
Phe	115	102	101	93.8	96.3	99.5	$y=1.87 \times 10^5x+4.16 \times 10^2$	0.999	50.4
Ile	99.4	103	99.9	97.9	98.6	101	$y=2.78 \times 10^5x+4.61 \times 10^3$	0.999	40.4
Gln	N/A	103	95.1	91.9	102	108	$y=5.21 \times 10^3x+4.48 \times 10^2$	0.997	1315.3
Pro	102	90.6	102	97.3	99.3	109	$y=1.18 \times 10^5x+4.25 \times 10^3$	0.999	392.4
Trp	90.9	96.1	101	101	106	108	$y=2.12 \times 10^5x+6.34 \times 10^2$	0.999	59.9
His	101	97.1	99.8	101	103	98.3	$y=5.02 \times 10^4x+1.40 \times 10^3$	0.999	173.9
Lys	99.1	101	108	88.1	103	100	$y=6.22 \times 10^4x+6.21 \times 10^2$	0.999	51.0
Cys	2180	472	257	97	105	105	$y=1.81 \times 10^2x+1.61 \times 10^2$	0.543	1767.9

Accuracy: 正確さ, r: 相関係数, LOQ: 定量限界

1-3-2 日内日間変動試験

繰り返し測定時の精度を検証するため、日内及び日間変動試験を行った (Table 4, 5)。0.5, 5, 50 μM D,L-アミノ酸溶液を調製し、作製した試料溶液を測定し解析を行ったところ、日内変動において、0.5 μM では L-Ala、D-Asn、L-Leu、L-Met、Gly、L-Thr、L-Val、L-Phe、L-Ile、D,L-Trp、L-Lys は Accuracy が 80~120%の範囲内であったが、その他の D,L-アミノ酸はその範囲外であった。5 μM では D-Ala、D-Leu、D-Thr、D-Phe、D-Gln、D-Pro、D,L-Cysを除く D,L-アミノ酸で Accuracy が 80~120%の範囲内であった。50 μM では L-Cys、D-Leuを除くアミノ酸で Accuracy が 80~120%の範囲内であったが、L-Cys は 20%、D-Leu は 45.6%であった。

日間変動は 0.5 μM において D-Ala、D,L-Asn、D,L-Leu、L-Glu、L-Met、Gly、L-Thr、L-Arg、D,L-Asp、L-Val、L-Phe、L-Ile、L-Gln、L-His、L-Lys では Accuracy が 80~120%の範囲内であった。5 μM では D-Leu、L-Tyr、L-Trp、L-His、D-Lys、D,L-Cysを除くアミノ酸で Accuracy が 80~120%の範囲内であった。50 μM では D-Ala、D-Leu、L-Tyr、D-Ile、D-His以外のアミノ酸で Accuracy が 80~120%の範囲内であった。日内及び日間変動試験において、アミノ酸の濃度が高濃度であると、多くのアミノ酸において良好な Accuracy を示した。しかし、日内変動試験では D-Leu、L-Cys が、日間変動試験では L-Tyr が濃度にかかわらず十分な Accuracy を示すことができなかった。

Table 4 各種 L-アミノ酸の日内及び日間変動試験

Amino Acid	Intra-day												Inter-day																	
	Average \pm S.D.				Precision (RSD%)				Accuracy (%)				Average \pm S.D.				Precision (RSD%)				Accuracy (%)									
	Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)		Concentration (μ M)									
	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50						
L-Ala	0.56 \pm 0.11	4.8 \pm 0.06	50 \pm 0.71	19.64	1.25	1.42	112	112	95	100	0.69 \pm 0.18	4.9 \pm 0.62	50 \pm 7.23	26.09	12.65	14.46	138	138	99	100	0.69 \pm 0.18	4.9 \pm 0.62	50 \pm 7.23	26.09	12.65	14.46	138	138	99	100
L-Asn	0.33 \pm 0.04	4.7 \pm 0.17	49 \pm 0.85	12.1	3.62	1.73	65	65	94	97	0.52 \pm 0.11	4.9 \pm 0.18	50 \pm 0.69	21.2	3.67	1.38	105	105	99	100	0.52 \pm 0.11	4.9 \pm 0.18	50 \pm 0.69	21.2	3.67	1.38	105	105	99	100
L-Leu	0.56 \pm 0.12	5 \pm 0.16	49 \pm 0.99	21.4	3.2	2.02	112	112	100	98	0.56 \pm 0.03	4.6 \pm 1.45	49 \pm 16.3	5.36	30.2	33.3	113	113	96	98	0.56 \pm 0.03	4.6 \pm 1.45	49 \pm 16.3	5.36	30.2	33.3	113	113	96	98
L-Glu	0.4 \pm 0.08	4.8 \pm 0.02	48 \pm 0.99	20	0.42	2.06	79	79	95	96	0.56 \pm 0.12	4.6 \pm 0.54	46 \pm 7.11	21.4	11.7	15.5	112	112	92	92	0.56 \pm 0.12	4.6 \pm 0.54	46 \pm 7.11	21.4	11.7	15.5	112	112	92	92
L-Met	0.5 \pm 0.01	4.9 \pm 0.01	50 \pm 0.21	2	0.2	0.42	99	99	99	100	0.44 \pm 0.08	4.5 \pm 0.9	47 \pm 8.33	18.2	20	17.7	88	88	89	89	0.44 \pm 0.08	4.5 \pm 0.9	47 \pm 8.33	18.2	20	17.7	88	88	89	89
L-Tyr	0.62 \pm 0.05	5.2 \pm 0.15	51 \pm 1.77	8.06	2.88	3.47	124	124	103	101	0.26 \pm 0.26	2.1 \pm 2.38	21 \pm 24.4	100	113	116	51	51	42	42	0.26 \pm 0.26	2.1 \pm 2.38	21 \pm 24.4	100	113	116	51	51	42	42
L-Ser	0.24 \pm 0.06	4.8 \pm 0.03	49 \pm 0.35	20.8	0.63	0.71	48	48	96	99	0.74 \pm 0.28	4.9 \pm 0.14	49 \pm 3.23	37.8	2.86	6.59	148	148	99	97	0.74 \pm 0.28	4.9 \pm 0.14	49 \pm 3.23	37.8	2.86	6.59	148	148	99	97
L-Thr	0.4 \pm 0.06	4.6 \pm 0.06	49 \pm 0.07	15	1.3	0.14	81	81	92	99	0.56 \pm 0.1	5.2 \pm 0.11	53 \pm 3.41	17.9	2.12	6.43	111	111	104	107	0.56 \pm 0.1	5.2 \pm 0.11	53 \pm 3.41	17.9	2.12	6.43	111	111	104	107
L-Arg	0.3 \pm 0.05	4.8 \pm 0.06	49 \pm 0.57	16.7	1.25	1.16	60	60	96	99	0.52 \pm 0.15	4.9 \pm 0.69	54 \pm 8.58	28.8	14.1	15.9	103	103	99	107	0.52 \pm 0.15	4.9 \pm 0.69	54 \pm 8.58	28.8	14.1	15.9	103	103	99	107
L-Asp	0.36 \pm 0.08	4.8 \pm 0.17	49 \pm 1.63	22.2	3.54	3.33	71	71	96	99	0.58 \pm 0.14	4.8 \pm 0.54	49 \pm 6.35	24.1	11.3	13	116	116	95	97	0.58 \pm 0.14	4.8 \pm 0.54	49 \pm 6.35	24.1	11.3	13	116	116	95	97
L-Val	0.46 \pm 0.06	4.8 \pm 0.01	50 \pm 1.27	13	0.21	2.54	92	92	96	100	0.54 \pm 0.07	4.4 \pm 0.72	45 \pm 8.91	13	16.4	19.8	108	108	88	89	0.54 \pm 0.07	4.4 \pm 0.72	45 \pm 8.91	13	16.4	19.8	108	108	88	89
L-Phe	0.4 \pm 0.04	4.9 \pm 0.08	50 \pm 1.34	10	1.63	2.68	80	80	98	101	0.48 \pm 0.06	4.3 \pm 1.2	43 \pm 12.7	12.5	27.9	29.5	96	96	86	86	0.48 \pm 0.06	4.3 \pm 1.2	43 \pm 12.7	12.5	27.9	29.5	96	96	86	86
L-Ile	0.44 \pm 0.05	4.9 \pm 0.01	49 \pm 0.21	11.4	0.2	0.43	89	89	97	98	0.55 \pm 0.1	4.5 \pm 1.15	44 \pm 12.1	18.2	25.6	27.5	111	111	89	87	0.55 \pm 0.1	4.5 \pm 1.15	44 \pm 12.1	18.2	25.6	27.5	111	111	89	87
L-Gln	0.28 \pm 0.02	4.8 \pm 0.11	48 \pm 2.47	7.14	2.29	5.15	55	55	96	96	0.52 \pm 0.21	4.4 \pm 0.28	43 \pm 3.03	40.4	6.36	7.05	104	104	87	85	0.52 \pm 0.21	4.4 \pm 0.28	43 \pm 3.03	40.4	6.36	7.05	104	104	87	85
L-Pro	0.72 \pm 0.07	4.7 \pm 0.02	50 \pm 0.14	9.72	0.43	0.28	144	144	94	101	0.91 \pm 0.53	4.4 \pm 0.94	45 \pm 16.7	58.2	21.4	37.1	182	182	88	90	0.91 \pm 0.53	4.4 \pm 0.94	45 \pm 16.7	58.2	21.4	37.1	182	182	88	90
L-Trp	0.57 \pm 0.02	4.9 \pm 0.05	49 \pm 0.85	3.51	1.02	1.73	114	114	98	99	0.39 \pm 0.16	3.9 \pm 1.12	39 \pm 9.57	41	28.7	24.5	78	78	79	80	0.39 \pm 0.16	3.9 \pm 1.12	39 \pm 9.57	41	28.7	24.5	78	78	79	80
L-His	0.35 \pm 0.03	4.5 \pm 0.06	47 \pm 1.2	8.57	1.33	2.55	70	70	91	95	0.43 \pm 0.14	3.9 \pm 1.12	39 \pm 9.58	32.6	28.7	24.6	86	86	79	80	0.43 \pm 0.14	3.9 \pm 1.12	39 \pm 9.58	32.6	28.7	24.6	86	86	79	80
L-Lys	0.46 \pm 0.01	5.3 \pm 0.12	48 \pm 0.42	2.17	2.26	0.88	91	91	106	97	0.46 \pm 0.08	4.5 \pm 1.05	42 \pm 13.4	17.4	23.3	31.9	92	92	90	84	0.46 \pm 0.08	4.5 \pm 1.05	42 \pm 13.4	17.4	23.3	31.9	92	92	90	84
L-Cys	0.14 \pm 0.01	1 \pm 0.03	10 \pm 0.49	7.14	3	4.9	27	27	20	20	0.29 \pm 0.3	3.4 \pm 2.9	41 \pm 21	103	85.3	51.2	58	58	67	82	0.29 \pm 0.3	3.4 \pm 2.9	41 \pm 21	103	85.3	51.2	58	58	67	82
Gly	0.4 \pm 0.07	4.9 \pm 0.04	50 \pm 0.07	17.5	0.82	0.14	80	80	98	100	0.55 \pm 0.07	4.6 \pm 1.29	45 \pm 14.6	12.7	28	32.4	110	110	92	90	0.55 \pm 0.07	4.6 \pm 1.29	45 \pm 14.6	12.7	28	32.4	110	110	92	90

S.D.: 標準偏差、Precision: 精度、RSD: 相対標準偏差、Accuracy: 正確さ

Table 5 各種D-アミノ酸の日内および日間変動試験

Amino Acid	Intra-day						Inter-day										
	Average ± S.D.		Precision(RSD%)		Accuracy(%)		Average ± S.D.		Precision(RSD%)		Accuracy(%)						
	Concentration(μM)		Concentration(μM)		Concentration(μM)		Concentration(μM)		Concentration(μM)		Concentration(μM)						
	0.5	5	50	5	50	5	50	0.5	5	50	0.5	5	50				
D-Ala	0.9±0.09	6.42±0.89	57.7±4.51	10	13.9	7.8	180	115	0.44±0.06	5.37±0.13	61.6±0.98	13.45	2.39	1.59	89	107	123
D-Asn	0.59±0.1	5.16±0.4	52.2±3.41	16.1	7.82	6.53	118	103	0.52±0.08	4.44±0.1	50.8±0.36	15.7	2.19	0.7	105	89	102
D-Leu	0.36±0.09	3.7±2	22.8±3.56	24.2	54.1	15.6	73	74	0.49±0.01	3.19±0.07	38.7±1.43	1.78	2.09	3.69	98	64	78
D-Glu	0.84±0.12	5.8±0.62	57.5±3.38	14.1	10.7	5.88	168	116	0.63±0.02	4.7±0.03	51.6±0.8	2.97	0.61	1.55	125	94	103
D-Met	0.4±0.08	5.36±0.54	58.5±4.71	19.9	10.1	8.05	80	107	0.26±0.01	4.32±0.02	52.7±0.91	3.26	0.53	1.73	53	87	105
D-Tyr	0.85±0.04	5.65±0.57	56.3±4.05	4.62	10.1	7.18	170	113	0.77±0.03	5.01±0.03	56.7±1.24	4.01	0.67	2.19	153	100	113
D-Ser	0.84±0.12	5.68±0.63	58.8±5.97	13.9	11.1	10.2	168	114	0.65±0.02	4.93±0.09	51.3±1.14	2.68	1.88	2.22	129	99	103
D-Thr	1.46±0.08	6.4±0.58	56.8±4.56	5.54	9.09	8.04	292	128	1.3±0.01	5.39±0.13	51.4±0.14	0.77	2.48	0.27	261	108	103
D-Arg	1.15±0.09	5.85±0.42	54.4±2.07	7.84	7.11	3.81	230	117	1.14±0.1	4.69±0.08	55.2±0.39	8.93	1.79	0.71	227	94	110
D-Asp	0.67±0.11	5.67±0.47	57.2±2.23	16.3	8.21	3.91	133	113	0.43±0.01	4.88±0.03	57.6±0.71	3.42	0.58	1.23	87	98	115
D-Val	0.86±0.12	5.84±0.76	58.6±5.84	14.1	13.1	9.98	171	117	0.69±0.01	5.24±0.03	58±1.8	1.73	0.54	3.11	138	105	116
D-Phe	1.37±0.08	6.19±0.6	56±6.19	5.61	9.76	11.1	273	124	1.2±0	5.38±0.04	53.3±0.41	0.15	0.83	0.77	240	108	107
D-Ile	1.77±0.11	5.6±0.35	50±15.4	5.97	6.3	30.8	353	112	1.53±0.08	4.24±0.1	37.5±0.17	5.43	2.29	0.45	305	85	75
D-Gln	1.94±0.13	7.29±0.15	58±5.8	6.79	1.99	9.99	387	146	1.92±0.06	5.94±0.22	53.3±1.41	3.16	3.62	2.64	384	119	107
D-Pro	3.89±0.49	7.6±0.12	49.7±3.52	12.7	1.61	7.08	777	152	2.13±0.1	5.49±0.05	46.5±0.36	4.88	0.89	0.77	426	110	93
D-Trp	0.6±0.06	5.36±0.51	54.4±3.34	9.47	9.54	6.13	120	107	0.41±0	4.15±0.03	46.8±0.89	1.03	0.62	1.89	83	83	94
D-His	1±0.11	5.54±0.7	58.1±5.34	10.6	12.6	9.19	200	111	0.85±0.02	5.3±0.12	62.4±0.37	1.84	2.2	0.59	169	106	125
D-Lys	0.02±0.08	5.21±0.29	54.3±1.95	303	5.59	3.59	5	104	-	3.54±0.03	45.5±0.9	-	0.85	1.97	-	71	91
D-Cys	4.01±0.17	6.42±1.04	55.2±4.37	4.29	16.2	7.91	802	128	3.65±0.11	7.13±0.47	59±0.96	2.9	6.53	1.63	729	143	118

S.D.: 標準偏差、Precision: 精度、RSD: 相対標準偏差、Accuracy: 正確さ

1-3-3 添加回収試験

細胞あるいは培地中には D,L-アミノ酸以外の夾雑物があり、夾雑物が D,L-アミノ酸の分析に影響を与える可能性がある。そこで、細胞及び培地中の D,L-アミノ酸を正確に測定できるかを検証するため、添加回収実験を行った。検証には、本研究の過程で新たに D-Asp が検出されることが判明した HepG2 細胞を採用した。HepG2 細胞を培養したのち培地と細胞を回収し、濃度既知の D,L-アミノ酸を添加し試料溶液としたものを測定した。細胞抽出液を用いた添加回収実験では L-Tyr (8, 40 μ M)、L-Lys (8 μ M)、Gly (8 μ M)、D-Met (4, 8 μ M)、D-Tyr (4, 8, 40 μ M)、D-Cys (4, 8, 40 μ M) を除く D,L-アミノ酸で 80~120%の回収率が得られた (Table 6)。

培地を用いた添加回収実験では、L-Tyr (8 μ M)、D-Tyr (4 μ M)、D-Thr (4 μ M)、L-Gln (8 μ M)、D-Gln (4, 8 μ M)、L-Trp (8 μ M)、L-Cys (8, 40, 400 μ M)、D-Cys (4, 8, 40 μ M) を除く D,L-アミノ酸で 80~120%の回収率が得られた (Table 7)。

Table 6 HepG2 細胞抽出液での各アミノ酸の回収率

Amino acid	試料中添加濃度 (μM)				回収濃度 (μM)				回収率 (%)			
	0	8	40	400	0	8	40	400	0	8	40	400
L-Ala	8.24	16.47	48.67	428.67	-	8.23	40.43	420.43	-	103	101	105
L-Asn	2.2	9.45	40.73	361.67	-	7.24	38.53	359.46	-	91	96	90
L-Leu	2.32	11.1	45.97	366.67	-	8.78	43.64	364.34	-	110	109	91
L-Glu	43.07	51.53	82.97	383	-	8.47	39.9	339.93	-	106	100	85
L-Met	0.55	8.55	42.13	397	-	7.99	41.58	396.45	-	100	104	99
L-Tyr	0	12.17	60.87	411.67	-	12.16	60.86	411.66	-	152	152	103
L-Ser	5.5	14.2	48.03	352.67	-	8.7	42.53	347.17	-	109	106	87
L-Thr	15.23	22.7	54.57	416.67	-	7.47	39.33	401.43	-	93	98	100
L-Arg	1.19	8.48	39.2	395.33	-	7.28	38.01	394.14	-	91	95	99
L-Asp	2.56	9.85	39.87	358.67	-	7.29	37.31	356.11	-	91	93	89
L-Val	3.07	11.83	46.97	384.33	-	8.77	43.9	381.27	-	110	110	95
L-Phe	0.99	9.77	45.03	400	-	8.78	44.04	399.01	-	110	110	100
L-Ile	2.32	11.2	46.63	372.33	-	8.88	44.32	370.02	-	111	111	93
L-Gln	15.9	24.87	58.27	341.33	-	8.97	42.37	325.43	-	112	106	81
L-Pro	21.1	30.33	66.07	508.33	-	9.23	44.97	487.23	-	115	112	122
L-Trp	0.31	9	45.77	403	-	8.69	45.46	402.69	-	109	114	101
L-His	1.07	8.6	40.97	410	-	7.53	39.9	408.93	-	94	100	102
L-Lys	2.67	12.97	49.5	250.33	-	10.3	46.83	247.67	-	129	117	62
L-Cys	15.8	22.2	52.63	375	-	6.4	36.83	359.2	-	80	92	90
Gly	23.67	34.33	70.2	433	-	10.67	46.53	409.33	-	133	116	102

Amino acid	試料中添加濃度 (μM)				回収濃度 (μM)				回収率 (%)			
	0	4	8	40	0	4	8	40	0	4	8	40
D-Ala	-	3.73	7.81	41.94	-	3.73	7.81	41.94	-	93	98	105
D-Asn	-	3.69	7.53	39.66	-	3.69	7.53	39.66	-	92	94	99
D-Leu	-	3.89	6.62	38.38	-	3.89	6.62	38.38	-	97	83	96
D-Glu	-	4.03	9.15	47.38	-	4.03	9.15	47.38	-	100	114	118
D-Met	-	5.31	10.41	47.16	-	5.31	10.41	47.16	-	132	130	118
D-Tyr	-	1.46	3	22.77	-	1.46	3	22.77	-	37	38	57
D-Ser	2.91	6.63	10.96	47.93	-	3.72	8.05	45.02	-	93	101	113
D-Thr	-	4.09	6.99	42.31	-	4.09	6.99	42.31	-	102	87	106
D-Arg	-	4.13	8.47	38.6	-	4.13	8.47	38.6	-	103	106	97
D-Asp	0.74	5.44	8.66	45.57	-	4.7	7.92	44.83	-	118	99	112
D-Val	-	4.16	7.49	40.58	-	4.16	7.49	40.58	-	104	94	101
D-Phe	-	4.74	8.52	45.82	-	4.74	8.52	45.82	-	118	107	115
D-Ile	-	4.37	8.65	40.35	-	4.37	8.65	40.35	-	109	108	101
D-Gln	-	1.55	7.76	38.63	-	1.55	7.76	38.63	-	39	97	96
D-Pro	-	4.05	7.67	39.8	-	4.05	7.67	39.8	-	101	96	100
D-Trp	-	3.91	7.17	39.88	-	3.91	7.17	39.88	-	98	90	100
D-His	-	4.57	9.12	39.14	-	4.57	9.12	39.14	-	114	114	98
D-Lys	-	4.56	8.17	48.56	-	4.56	8.17	48.56	-	114	102	115
D-Cys	-	2.15	3.27	9.98	-	2.15	3.27	9.98	-	54	41	25

Table 7 HepG2 細胞を培養した培地での各アミノ酸の回収率

Amino acid	試料中添加濃度 (μM)				回収濃度 (μM)				回収率 (%)			
	0	8	40	400	0	8	40	400	0	8	40	400
L-Ala	265	271	312	686	-	6.33	47.0	421	-	79.2	118	105
L-Asn	76.5	84.5	120	494	-	7.97	43.5	418	-	99.6	109	104
L-Leu	183	192	225	543	-	8.33	41.3	360	-	104.2	103	89.9
L-Glu	535	542	572	957	-	7.33	37.3	422	-	91.7	93.3	105
L-Met	29.7	37.6	74.5	352	-	7.90	44.8	322	-	98.8	112	80.6
L-Tyr	12.0	27.5	56.4	398	-	15.5	44.4	386	-	193.3	111	96.4
L-Ser	72.2	80.4	117	401	-	8.23	45.2	329	-	102.9	113	82.3
L-Thr	407	416	453	880	-	9.00	46.3	473	-	112.5	116	118
L-Arg	0.0	8.7	44.5	367	-	8.70	44.5	367	-	108.8	111	91.8
L-Asp	127	134	160	519	-	6.67	33.0	392	-	83.3	82.5	98.0
L-Val	184	192	225	525	-	8.00	40.3	341	-	100.0	101	85.2
L-Phe	164	171	203	532	-	7.33	38.7	368	-	91.7	96.7	91.9
L-Ile	159	167	206	562	-	8.67	47.3	403	-	108.3	118	101
L-Gln	62.5	64.0	98.9	497	-	1.50	36.4	435	-	18.8	91.0	109
L-Pro	121	130	157	537	-	8.67	36.0	416	-	108.3	90.0	104
L-Trp	5.6	15.4	53.3	387	-	9.81	47.7	381	-	122.7	119	95.3
L-His	83.6	90.9	122	534	-	7.33	38.8	451	-	91.7	96.9	113
L-Lys	312.33	320	354	731	-	7.33	41.3	418	-	91.7	103	105
L-Cys	20.6	20.7	20.9	84.9	-	0.07	0.33	64.3	-	0.83	0.83	16.1
Gly	163	170	196	554	-	6.67	33.3	391	-	83.3	83.3	97.7

Amino acid	試料中添加濃度 (μM)				回収濃度 (μM)				回収率 (%)			
	0	4	8	40	0	4	8	40	0	4	8	40
D-Ala	-	4.36	6.62	43.3	-	4.36	6.62	43.3	-	109	82.7	108
D-Asn	-	3.42	7.85	39.1	-	3.42	7.85	39.1	-	85.6	98.2	97.6
D-Leu	-	3.89	7.91	43.6	-	3.89	7.91	43.6	-	97.2	98.9	109
D-Glu	-	4.07	7.99	42.3	-	4.07	7.99	42.3	-	102	99.9	106
D-Met	-	4.75	7.14	46.0	-	4.75	7.14	46.0	-	119	89.3	115
D-Tyr	-	5.09	8.13	42.0	-	5.09	8.13	42.0	-	127	102	105
D-Ser	-	4.15	8.61	43.3	-	4.15	8.61	43.3	-	104	108	108
D-Thr	-	4.87	7.72	39.2	-	4.87	7.72	39.2	-	122	96.6	98.1
D-Arg	-	3.95	7.52	40.3	-	3.95	7.52	40.3	-	98.7	94.0	101
D-Asp	-	4.46	6.68	40.1	-	4.46	6.68	40.1	-	111.5	83.5	100
D-Val	-	4.74	7.45	47.3	-	4.74	7.45	47.3	-	118.4	93.1	118
D-Phe	-	4.66	7.58	45.1	-	4.66	7.58	45.1	-	116.5	94.8	113
D-Ile	-	3.89	7.91	43.6	-	3.89	7.91	43.6	-	97.2	98.9	109
D-Gln	-	0.57	1.57	43.8	-	0.57	1.57	43.8	-	14.2	19.6	109
D-Pro	-	3.67	7.49	39.6	-	3.67	7.49	39.6	-	91.7	93.7	99.1
D-Trp	-	4.51	7.00	45.1	-	4.51	7.00	45.1	-	113	87.6	113
D-His	-	4.58	6.97	47.8	-	4.58	6.97	47.8	-	114	87.1	120
D-Lys	-	4.08	8.04	46.9	-	4.08	8.04	46.9	-	102	100	117
D-Cys	-	0.24	0.29	1.92	-	0.24	0.29	1.92	-	5.92	3.58	4.81

第四節 考察

第一章ではFDLA誘導体化LC/MS/MS法のバリデーションを行なった。まず検量線作成について、D,L-Tyr、L-Gln、D,L-Cysを除いて相関係数0.995以上の直線性を確認することができた (Table 3)。L-Glnについて相関係数が0.995以上の直線性を得ることができなかった理由として、0.5 μM においてAccuracyが120%を超えていたことから (Table 3)、0.5 μM におけるバラつきが良好な直線性を得られなかった原因の1つだと考えられる。一方、D,L-Tyr、D,L-Cysが相関係数0.995以上の直線性を得られなかった原因の1つとして、側鎖にフェノール性のヒドロキシ基やチオール基があり、誘導体化の過程で副反応が起こったことが考えられる。

次に、繰り返し測定を行ったときの測定誤差を検証するため、日内及び日間変動試験を行った。日内変動試験ではD-Leu、L-Cysが、日間変動試験ではL-Tyrが濃度にかかわらず十分な精度を示すことができなかった。アミノ酸の側鎖の構造や官能基の違いによって誘導体化後の安定性が異なることによる測定誤差が考えられる。一方、0.5 μM の低濃度では、夾雑イオンピークやノイズの影響により、多くのD,L-アミノ酸において十分な精度が得られなかったと考えられた。

細胞あるいは培地中にはD,L-アミノ酸以外の夾雑物があり、夾雑物がD,L-アミノ酸の分析に影響を与える可能性がある。そこで、細胞及び培地中のD,L-アミノ酸を正確に測定できるかを検証するため、添加回収試験を行った。細胞を用いた添加回収試験について、40 μM 以上のアミノ酸溶液ではD,L-Tyr、D-Cysを除いて良好な回収率が得られたが、4, 8 μM のアミノ酸溶液では、D-Met、D,L-Tyr、D-Gln、L-Lys、D-Cys、Glyについて良好な回収率を得ることができなかった。これは低濃度においては細胞由来の夾雑物の影響が相対的に大きくなり、良好な回収率が得られないことが原因と考えられた。Tyr及びCysは高濃度でも良好な回収率は得られなかったが、日内及び日間変動試験から測定値の測定誤差が大きいアミノ酸であったことから、測定値に問題があり、良好な回収率を得ることができなかったと考えられる。培地中の添加回収実験では、D,L-Cysは濃度に関わらず良好な回収率を得ることができなかった。また、4, 8 μM のアミノ酸溶液ではL-Ala、D,L-Tyr、D-Thr、D,L-Gln、L-Trpについて良好な回収率を得ることができなかった。培地中においても、夾雑物の影響により低濃度において良好な回収率が得られないことが考えられる。一方、D-SerやD-Aspについて、低濃度でも良好な回収率を得ることができた (Table 6, 7)。

以上のことから、本測定法を用いて生体試料中のTyrやCysを定量することは困難であることが考えられる。これらアミノ酸の側鎖にはフェノール性水酸基やチオール基があり、FDLAがこれらの側鎖と反応する可能性があることや最適なMS/MS条件ではないことなどが考えられる。Fig. 2に示した通り、FDLAは各種アミノ酸のアミノ基と反応し、ジアステレオマーであるシングルラベル体となる。本研究では、TyrやCysはシングルラベル体を測定している。また、側鎖にアミノ基があるLysでは、FDLAが2つ結合したダブルラベル体を測定している。Lysの測定におけるバリデーションの結果はTyrやCys結果に比べて良好

である。よって、Tyr や Cys の測定では、ダブルラベル体の生成に適した誘導体化反応や測定条件を検討することにより、良好な結果が得られる可能性が考えられる。一方、D-Asp と D-Ser のバリデーション結果について、検量線は良好な直線性を示し、定量限界はそれぞれ 174.5 pM、36.3 pM であった。よって、D-Asp と D-Ser は 174.5 pM、36.3 pM 以上の濃度で定量が可能であることが明らかとなった。また、日内日間変動試験では 5 μ M 以上で精度良く測定できることを示し、添加回収試験では 4 μ M においても良好な回収率を得ることができた。よって、本測定法は生体試料中の D-Asp ならびに D-Ser を定量することが可能であると考えられる。

第五節 小括

FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた D,L-アミノ酸測定バリデーションを行うことにより、生体試料中の Tyr や Cys の定量は困難であることが明らかとなった。一方、D-Asp と D-Ser のバリデーション結果について、検量線は良好な直線性を示し、定量限界はそれぞれ 174.5 pM、36.3 pM であった。よって、D-Asp と D-Ser は 174.5 pM、36.3 pM 以上の濃度で定量が可能であることを明らかにした。また、日内日間変動試験では 5 μ M 以上で精度良く測定できることを示し、添加回収試験では 4 μ M でも良好な回収率を得ることができた。よって、本測定法は生体試料中の D-Asp ならびに D-Ser を定量することが可能であると考えられる。

以上のことから、本測定法は生体試料中の D-Ser ならびに D-Asp の定量が可能であり、D-Asp の細胞内濃度調節機構や生理機能の解明においても有用な測定法であると考えられる。

第二章 細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構の解析

第一節 小諸言

第一章では、確立したキラル誘導体化 LC/MS/MS 法の検証を行い、生体試料中の D-Ser ならびに D-Asp を定量することが可能であること示した。そこで第二章では、第一章で確立した FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法が細胞内 D-Asp 濃度調節機構の解析に有用な測定法であるかを検討するため、これまで D-Asp が検出されてこなかった細胞の探索とその濃度調節機構の解明を目的とした。

生体内における D-アミノ酸を生合成している酵素はアミノ酸ラセマーゼである。アミノ酸ラセマーゼは L-アミノ酸と D-アミノ酸の相互変換を触媒する酵素である。アミノ酸ラセマーゼはピリドキサル-5'-リン酸 (Pyridoxal phosphate; PLP) を補因子とするものと、PLP 非依存的に酵素活性をもつものに分類される。PLP 依存性のラセマーゼには、アラニンラセマーゼ⁵¹、アルギニンラセマーゼ⁵²、セリンラセマーゼ⁵³、アスパラギン酸ラセマーゼ^{54, 55} が存在し、細菌のみならず、真核生物からも見出されている。PLP 非依存性のラセマーゼは細菌から見出されており、アスパラギン酸ラセマーゼ⁶¹、グルタミン酸ラセマーゼ⁶²、プロリンラセマーゼ⁶³ の存在が確認されている。哺乳類では、D-アミノ酸を生合成している酵素としてセリンラセマーゼが唯一同定されており、本酵素は脳や肝臓で発現していることが報告されている²²。一方で、アスパラギン酸ラセマーゼは真核生物であるアカガイ (*Scapharca broughtonii*) とアメフラシ (*Aplysia californica*) で見出されているものの^{59, 60}、哺乳類ではその存在が確認できていない³⁴。これまでに、ラット胎児神経細胞の初代培養系において、¹⁴C]-L-Asp を添加すると ¹⁴C]-D-Asp が生合成され、PLP 阻害剤であるアミノオキシ酢酸の添加により阻害されることが報告されている³⁵。したがって、哺乳類の体内にも PLP 依存的なアスパラギン酸ラセマーゼ活性を持つ酵素が存在することが示唆される。しかし、哺乳類におけるアスパラギン酸ラセマーゼの同定には未だ至っていない。

哺乳類における D-アミノ酸の代謝酵素は DDO と DAO が存在することが報告されている^{23, 29}。DDO は D-Asp や D-Glu といった酸性 D-アミノ酸を 2-オキシ酸とアンモニア、過酸化水素に分解する。DAO は D-Ser など中性・塩基性 D-アミノ酸を 2-オキシ酸とアンモニア、過酸化水素に分解する。DDO および DAO はフラビンアデニンジヌクレオチド (Flavin adenine dinucleotide ; FAD) を補酵素とするフラビタンパク質である。両酵素ともに立体特異的で L-アミノ酸には作用しない。哺乳類では、DDO および DAO は脳、腎臓および肝臓に多く存在し、細胞内ではペルオキシソームに局在する。両酵素は、内在性 D-アミノ酸の代謝のみならず、食事や腸内細菌に由来する D-アミノ酸の分解・除去を担っていると考えられている⁵⁹。

D-Ser ならびに D-Asp では、細胞内外で取り込みや放出による細胞内濃度調節機構が存在する。脳内で生合成された D-Ser は開口分泌により細胞外に放出され、NMDA 受容体に作

用することが示唆されている。D-Serを特異的に取り込むトランスポーターは検出されていないものの、脳内において中性アミノ酸トランスポーターである Asc-1 および ASCT1, 2 により、細胞内へ取り込まれることが示唆されている²⁴⁻²⁶。D-Asp の細胞内濃度調節機構はラット副腎褐色細胞腫細胞由来の PC12 細胞ならびにその亜株 (MPT 1 細胞や 2068 細胞) による解析が行われている^{30-33, 60}。これらの細胞株において、D-Asp はエキソサイトーシスや容積感受性有機アニオンチャンネル (Volume-sensitive organic anion channel; VSOC) を介した細胞外への放出、L-Glu トランスポーターを介した細胞外から細胞内への取り込みが存在することが示唆されている^{30-33, 60}。

このように、D-Asp の合成、分解、取り込み、放出について様々な解析が行われているが、その濃度調節に関わるメカニズムの詳細に関しては未だ不明な点が多い。さらなる解析を進める上で、まず D-Asp が存在する細胞種を広く見出すことが重要であると考えられる。これまでに、ラット副腎褐色細胞腫細胞由来培養細胞株 (PC12 細胞) やラット脳下垂体腫瘍由来培養細胞株 (GH3 細胞)、ヒト神経外胚葉性腫瘍由来培養細胞株 (TASK1 細胞)、ヒト胎児腎由来培養細胞株 (HEK293 細胞)、ヒト子宮頸部がん由来培養細胞株 (Hela 細胞)、ヒト睾丸胚細胞腫瘍由来培養細胞株 (NEC 8 細胞) など、哺乳類の培養細胞を用いた研究において D-Asp が検出されている^{12, 32, 61, 62}。しかし、ヒト肝がん由来培養細胞株 (HepG2 細胞) やヒト類表皮がん由来培養細胞株 (A431 細胞) では検出されていない。これらの研究は主に NBD 蛍光誘導体化 LC 法や OPA 蛍光誘導体化 LC 法を用いた蛍光検出により行われている。そのため、夾雑物の妨害ピークや検出感度の問題により検出できていない可能性も否定できない。また、まだ解析されていない細胞種も多く、テストステロン産生細胞などでもほとんど検討がなされていないのが現状である。そこで第二章では、第一章で確立した FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて、HepG2 細胞およびマウス精巣腫瘍 Leydig 細胞由来培養細胞株 (I-10 細胞) の細胞内及び培地中の D,L-アミノ酸を測定し、細胞内濃度調節機構の解析を行った。

第二節 実験方法

2-2-1 実験試薬

アミノ酸の標準溶液（タイプ H、17 種類の L-アミノ酸）、アセトニトリル（HPLC グレード）、ギ酸（~99%、LC/MS グレード）、ウマ血清（HS）は富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）を使用した。FDLA、安息香酸は、東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入した。D,L-アミノ酸、トリエチルアミン（TEA）、5-Aminopyridine-3-carboxylic acid は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入した。ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）は、ナカライテスク（京都、日本）から購入した。ウシ胎児血清（FBS）は、ニチレイ バイオサイエンス（東京、日本）から購入した。Ham's F-10 Nutrient Mix は Thermo Fisher Scientific（東京、日本）から購入した。超純水は、Direct-Q UV（Merck、ダルムシュタット、ドイツ）から供給した。LC/MS/MS 分析には、水で希釈したアミノ酸（タイプ H）の標準溶液または水に溶解したアミノ酸試薬を使用した。

2-2-2 I-10 細胞中 D,L-アミノ酸の分析

I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 2×10^5 cell/well となるように 6 well plate に 2 mL ずつ播種した。細胞を播種して 2 日後、無血清培地に入れ替え、24 時間培養した。その後、0.3% NP-40 を 100 μ L 加え、セルスクレーパーを用いて細胞回収し、アセトニトリル 100 μ L を加えて除タンパクを行い、遠心（4°C、12000 x g、5 min）後、その上清 50 μ L を FDLA で誘導体化し、LC/MS/MS で測定した。

2-2-3 HepG2 細胞中 D,L-アミノ酸の分析

HepG2 細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地を用い、 2×10^5 cell/well となるように 6 well plate に 2 mL ずつ播種した。細胞を播種して 2 日後に 10 mM の DDO 阻害剤 5-Aminopyridine-3-carboxylic acid 10 μ L を 2 mL の培地に加えて終濃度を 50 μ M、または 60 mM の DAO 阻害剤 Benzoic acid 10 μ L を 2 mL の培地に加えて終濃度を 300 μ M となるように調製して培養した。細胞を播種してから 2、4、6、8 日目に培地を回収した後、0.3% NP-40 を 200 μ L 加え、セルスクレーパーを用いて細胞回収し、アセトニトリル 200 μ L を加えて除タンパクを行い、遠心（4°C、12000 x g、5 min）後、その上清 50 μ L を FDLA で誘導体化し、LC/MS/MS で測定した。培地は回収後、等量のアセトニトリルを加えて除タンパクを行い、遠心（4°C、23000 x g、10 min）後、その上清 50 μ L を誘導体化し LC/MS/MS で測定した。

2-2-4 統計解析

統計解析には、Mac 用 GraphPad Prism バージョン 8（GraphPad Software、La Jolla、CA、USA、www.graphpad.com）を使用した。コントロールと各処理群のアミノ酸量は、二元配置分散分析（Two way ANOVA）と Sidak の多重比較検定を使用して比較した。

第三節 結果

2-3-1 FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた HepG2 細胞中 D,L-アミノ酸分析の解析

小緒言で述べたように、これまで D-アミノ酸が検出されてこなかった HepG2 細胞やマウス精巣腫瘍 Leydig 細胞由来培養細胞株 (I-10 細胞) を用いて、第一章で確立した FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法による D-アミノ酸の検出を試みた。その結果、HepG2 細胞及びその培地において D-Asp と D-Ser が検出された (Fig. 3)。一方、I-10 細胞では、D-アミノ酸は検出されなかった (Fig. 4)。

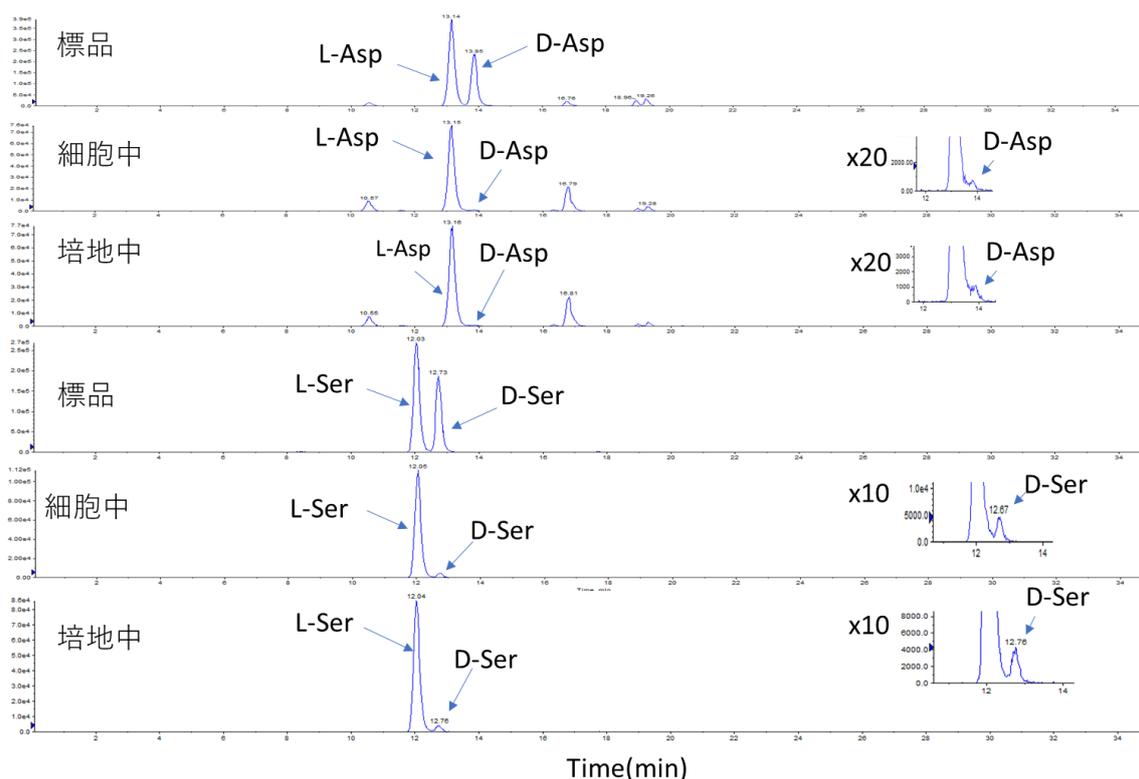


Fig. 3 FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法による HepG2 細胞細胞抽出液ならびに培地中の D,L-アミノ酸の分析

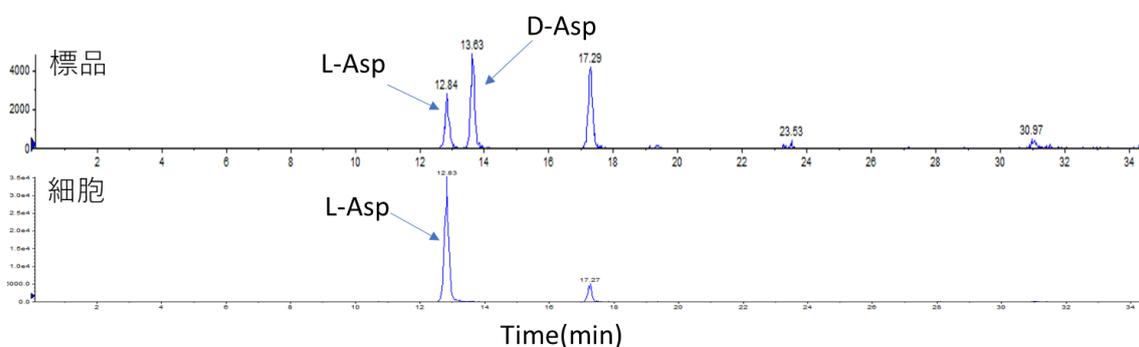
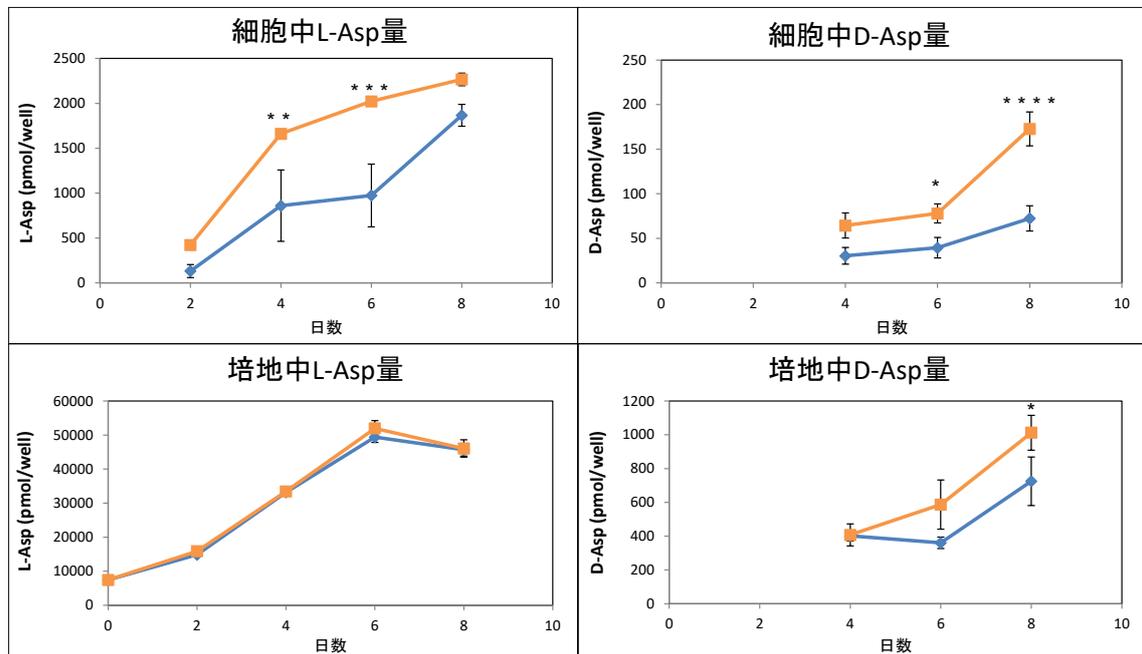


Fig. 4 FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法による I-10 細胞細胞抽出液の D,L-アミノ酸の分析

2-3-2 DDO 阻害剤ならびに DAO 阻害剤が HepG2 細胞中 D,L-アミノ酸量に及ぼす影響の解析

今回新たに発見された HepG2 細胞中の D-Asp と D-Ser は、細胞内での生合成および D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) や D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) による代謝、トランスポーターを介した細胞内外への輸送による調節を受けている可能性がある。そこで、DDO 阻害剤 5-Aminopyridine-3-carboxylic acid および DAO 阻害剤 Benzoic acid を用いて、HepG2 細胞ならびに培地中の D,L-アミノ酸を経時的に測定した。その結果、HepG2 細胞中の D-Asp 量、D-Ser 量は経時的に増加した。また、DDO 阻害剤の存在下では、細胞中の D,L-Asp 量、D,L-Ser 量及び培地中の D-Asp 量はコントロールに比べて有意に増加した (Fig. 5)。一方、DDO 阻害剤の存在下における培地中の L-Asp 量と D,L-Ser 量はコントロールと比べて有意な差はなかった (Fig. 5)。DAO 阻害剤の存在下では、細胞及び培地中の D,L-Asp 量、D,L-Ser 量はコントロールと比べて有意な差はなかった (Fig. 6)。なお、2 日目の細胞ならびに培地中 D-Asp 量は検出限界以下であった。

A.



B.

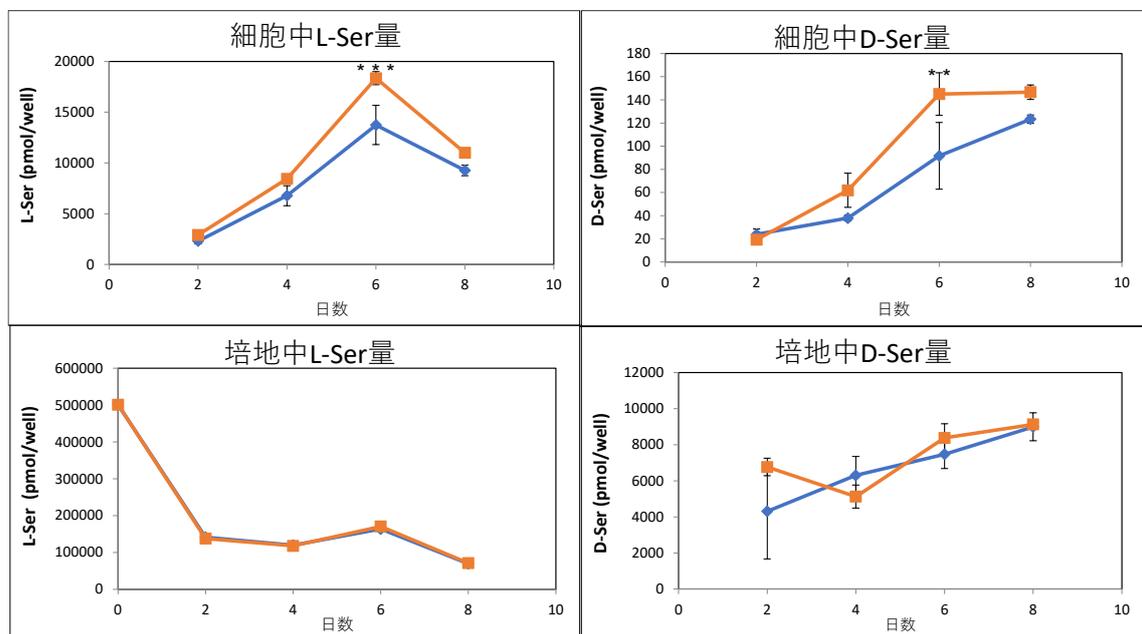
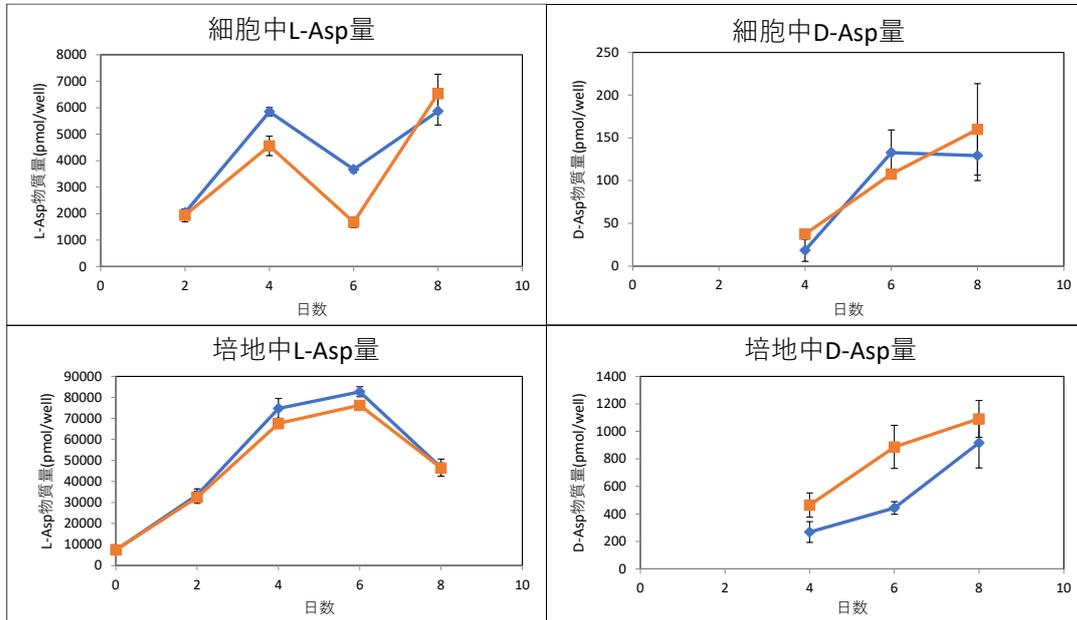


Fig. 5 HepG2 細胞内ならびに培地中の (A) D,L-Asp および (B) D,L-Ser 量の経時変化に及ぼす DDO 阻害剤の影響

(■) DDO 阻害剤あり, (◆) DDO 阻害剤なし, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$, ****: $P < 0.001$ ($n=3$, Average \pm S.D., ANOVA, Sidak)

A.



B.

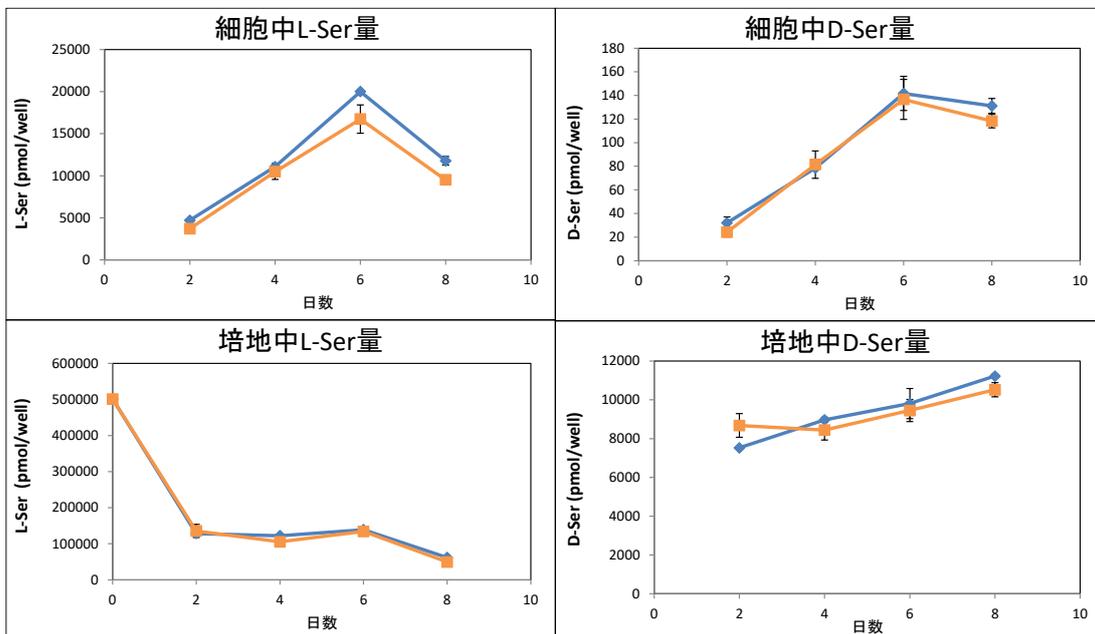


Fig. 6 HepG2細胞内ならびに培地中の (A) D,L-Aspおよび (B) D,L-Ser量の経時変化に及ぼすDAO阻害剤の影響

(■) DAO阻害剤あり, (◆) DAO阻害剤なし, *: P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.005、 ****: P<0.001 (n=3, Average ± S.D., ANOVA, Sidak)

第四節 考察

第二章では、第一章で確立した FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法が細胞内 D-Asp 濃度調節機構の解析に有用な測定法であるかを検討するため、これまで D-アミノ酸が検出されてこなかった HepG2 細胞、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いて細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構の解析を行った。

FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて HepG2 細胞・培地中の D,L-アミノ酸を分析することにより、D-Asp と D-Ser を HepG2 細胞・培地中に新たに検出することができた (Fig. 3)。本測定法を用いた選択的かつ高感度な測定により、これまで D-アミノ酸を検出されてこなかった細胞・組織において、D-アミノ酸を検出することが可能であることを示した。培地中の D,L-アミノ酸の測定では、培地中の不純物が多く、測定対象物質のピークが干渉されることが多い。そのため、蛍光検出で培地中の D,L-アミノ酸を測定するためには、多段階の前処理を施す必要がある。本解析法における培地の前処理は比較的簡便である。さらに、本測定法では、MS/MS を検出器に用いているため、測定対象物を選択的に測定することが可能である。よって、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法は、生体試料中の D,L-アミノ酸を測定するための高感度かつ高選択的で簡便な測定法であることが示された。

今回新たに発見された HepG2 細胞中の D-Asp、D-Ser はラセマーゼなどによる L-Asp、L-Ser からの生合成、DDO や DAO による代謝、トランスポーターを介した細胞内外への輸送によって濃度調節されている可能性がある。よって、HepG2 細胞中 D-Asp、D-Ser 濃度調節機構の解析には、培地を含めた D,L-Asp、D,L-Ser の解析が必要である。そこで本研究では、HepG2 細胞・培地中の D,L-アミノ酸を経時的に測定したところ、D-Asp 量、D-Ser 量は経時的に増加した。また、HepG2 細胞培地中の D,L-アミノ酸を測定したところ、細胞と同様に D-Asp 量、D-Ser 量は経時的に増加した。このことから、HepG2 細胞は D-Asp ならびに D-Ser を生合成していることが示唆された。次に、DDO 阻害剤の存在下では、細胞中の D,L-Asp 量がコントロールに比べて有意に増加した (Fig. 5)。このことから、HepG2 細胞中の D-Asp は DDO によって代謝されている可能性が示唆された。仮にアスパラギン酸ラセマーゼが存在し、L-Asp と D-Asp の可逆的なラセミ化反応が生じていると考えた場合、DDO による D-Asp 量の増加がラセミ化酵素による L-Asp 量の増加につながる事が考えられる。よって、今回の研究結果から、HepG2 細胞中にアスパラギン酸ラセマーゼが存在する可能性が示唆された。また、DDO 阻害剤の存在下では培地中の D-Asp 量が増加した。メカニズムについては不明であるものの、DDO 阻害剤存在下で増加した HepG2 細胞内の D-Asp が細胞外へ放出されている可能性が考えられる。更に DDO 阻害剤により D,L-Ser 量も増加することが明らかとなった。DDO は D-Ser の代謝分解は行わず、また哺乳類の組織の一部では、セリンラセマーゼが D-Asp 生合成に関与しているという報告もあることから⁶³、D,L-Asp が D,L-Ser の代謝や生合成になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、DAO 阻害剤の存在下では、細胞及び培地中の D,L-Asp 量、D,L-Ser 量はコントロールと比べて有意差は認められなかった (Fig. 6)。したがって、HepG2 細胞には DAO 活性がないも

のと考えられる。

一方、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来培養細胞株である I-10 細胞では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法でも D-アミノ酸は検出されなかったことから、I-10 細胞では D-Asp は産生されないことが示唆された (Fig. 4)。これまでのラットを用いた解析では、Leydig 細胞では D-Asp は生合成されておらず、精細管の内側に存在する後期精子細胞から放出された D-Asp が、精細管の外側に放出され Leydig 細胞に作用してテストステロンの産生を促進することが示唆されている⁷。よって、今回の I-10 細胞で得られた結果とは矛盾しない。おそらく D-Asp は、生殖細胞に加えて、脳、肝臓、腎臓といった臓器で生合成され、精巣 Leydig 細胞でテストステロンの生合成を促進するエンドクリンないしパラクリンとして機能しているのではないかと考えらえる。

第五節 小括

FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて細胞中 D,L-アミノ酸を測定することにより、これまで D-アミノ酸が検出されてこなかった HepG2 細胞において D-Asp、D-Ser を検出することができた。さらに、本測定法を用いて HepG2 細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構の解析した結果、D-Asp が DDO によって代謝されている可能性やアスパラギン酸ラセマーゼが存在する可能性が示唆された。以上の結果より、本測定法を用いることで細胞内 D-Asp 濃度調節機構を解析することが可能であることを示した。

今後は、本測定法を用いて新たな D-Asp 産生細胞の同定とその細胞における細胞内 D-Asp 濃度調節機構、ならびに、D-Asp の標的細胞である Leydig 細胞における細胞内 D-Asp の局在について解析することで、D-Asp を介した臓器間ネットワークやテストステロン産生亢進へと繋がるメカニズムの解明へとつながることが期待される。

第三章 マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いた実験系の確立

第一節 小諸言

これまでに D-Asp はラット Leydig 初代培養細胞において、LH 存在下、L-Glu トランスポーターによって細胞内に取り込まれること、またラット Leydig 初代培養細胞内に取り込まれた D-Asp はテストステロン生合成の律速因子である StAR の発現を mRNA レベルで促進し、テストステロン産生を上昇させることが報告されている⁷ (Fig. 7)。しかし、D-Asp による StAR 発現促進機構についてはほとんどわかっていない。緒言でも述べたように、目的遺伝子の機能や発現解析には株化細胞を用いた実験系が有用である。しかし、これまでの研究報告では、ラット Leydig 初代培養細胞を用いた研究がほとんどである^{6,7}。そこで第三章では、株化細胞であるマウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いた実験系を確立することを目的とした。

I-10 細胞はテストステロン生合成のメカニズム解明に用いられているマウス精巣 Leydig 由来の株化細胞である。I-10 細胞を用いたテストステロン生合成の解析では、Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) や Menaquinone-4 (MK-4; Vitamin K2) がテストステロン生合成を促進することが報告されている⁶⁴。I-10 細胞において MK-4 はテストステロン生成の前段階にあるプロゲステロン産生を促進する⁶⁴。また、テストステロンの産生も MK-4 によって増加することが確認されている⁶⁴。この作用は Vitamin K1 では認められないことから、MK-4 特有の作用であることが報告されている⁶⁴。さらに、MK-4 はプロテインキナーゼ A (Protein kinase A; PKA) の活性化を介して、その下流の cAMP 応答エレメント結合タンパク質 (cAMP response element binding protein; CREB) を活性化する⁶⁴。その結果、テストステロン生合成酵素の一つであるコレステロール側鎖切断酵素 (Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1; CYP11A1) の遺伝子発現が活性化され、CYP11A1 タンパク質の発現量が増加する^{65,66} (Fig. 8)。よって、株化細胞を用いた D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解析には、I-10 細胞を用いることが有用であると考え、本研究で用いることとした。

テストステロンは、精巣 Leydig 細胞においてコレステロールがミトコンドリアと小胞体で代謝を受けて生合成される。テストステロン生合成の最初の段階はミトコンドリア内に取り込まれたコレステロールがコレステロール側鎖切断酵素 (CYP11A1) によってプレグネノロンとなる反応である⁶⁷。しかし、コレステロールはミトコンドリア内膜を通過することができないため、ミトコンドリア内膜に存在する StAR によってミトコンドリア内へと輸送される必要がある⁶⁸⁻⁷¹。この StAR タンパク質を介したミトコンドリア内へのコレステロールの輸送が、テストステロン生合成の律速段階となっている。ミトコンドリアで合成されたプレグネノロンは小胞体へと移動し、そこで 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) によってプロゲステロンに代謝され⁶⁷、17 α -Hydroxylase/17,20-lyase (P450c17) によりアンドロステンとなり、17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) による代謝を受け

でテストステロンとなる^{72,73}。このように、テストステロンはコレステロールから多段階の酵素反応による代謝を受けて生合成される。したがって、I-10細胞を用いたD-Aspによるテストステロン産生促進機構のより詳細な解析を行うためには、細胞内D-Asp濃度の測定とテストステロンならびにその生合成経路中間体であるプロゲステロン、アンドロステンジオンの測定が必要である。

ステロイドホルモンの定量はEnzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)を用いた測定法が汎用されている。しかしELISAでは、1回の測定で1種類のステロイドホルモンしか測定できないことや、測定キットが高価であることが欠点である。これらの問題を解決するためには、LC/MS/MSを用いた測定法の確立が有用であることが考えられる。よって、第三章では、これらステロイドホルモンの測定法の確立し、本測定法を用いて、マウス精巣腫瘍Leydig由来I-10細胞における各種ステロイドホルモン産生へのD-Aspの影響について解析した。

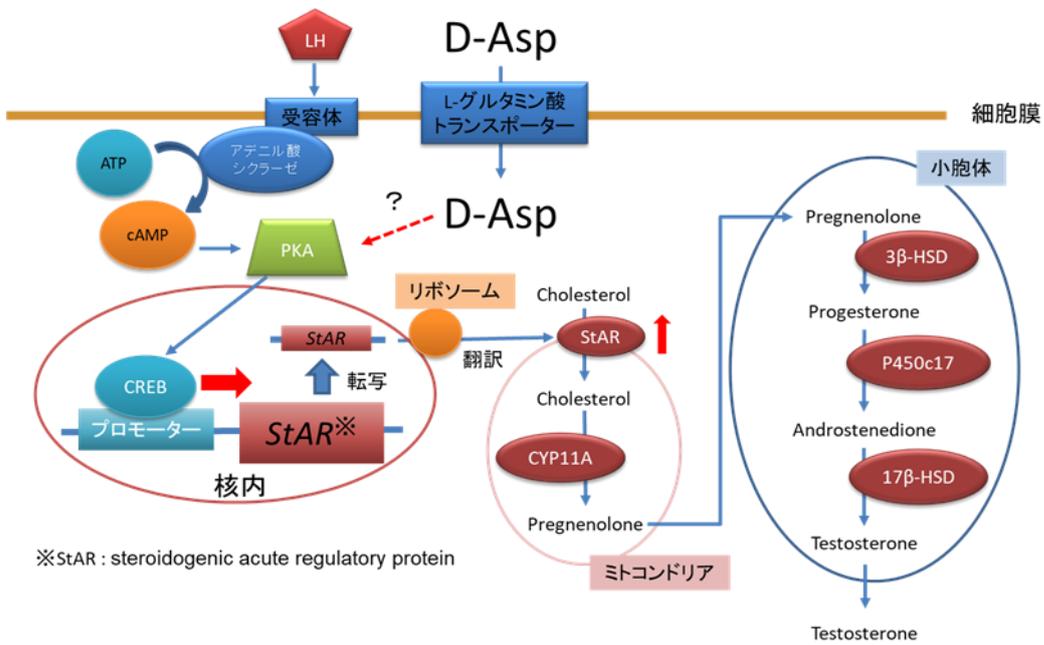


Fig. 7 初代培養細胞における D-Asp によるステロイドホルモン産生促進機構

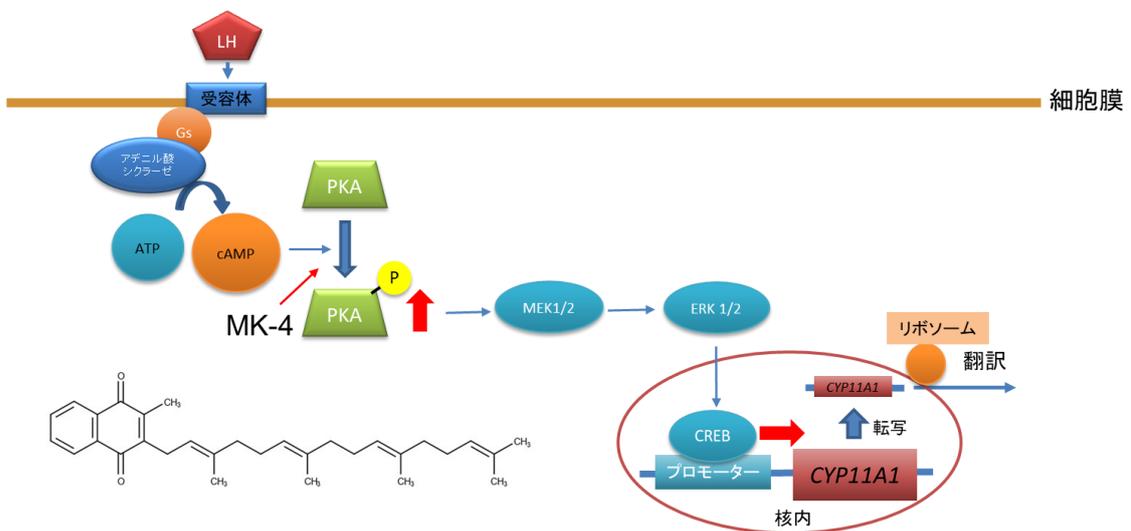


Fig. 8 I-10 細胞のテストステロン合成酵素に対する MK-4 の作用

第二節 実験方法

3-2-1 実験試薬

アミノ酸 (タイプ H、17 種類の L-アミノ酸)、アセトニトリル (HPLC グレード)、ギ酸 (~99%、LC/MS グレード)、メタノール (HPLC グレード)、Menaquinone-4、ウマ血清 (HS) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) を使用した。FDLA、アンドロステンジオン、プロゲステロン、db-cAMP は、東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。D,L-アミノ酸、トリエチルアミン (TEA) は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入した。テストステロンは、ナカライテスク (京都、日本) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、ニチレイバイオサイエンス (東京、日本) から購入した。Ham's F-10 Nutrient Mix は Thermo Fisher Scientific (東京、日本) から購入した。超純水は、Direct-Q UV (Merck、ダルムシュタット、ドイツ) で調製した。LC/MS/MS 分析には、超純水で希釈したアミノ酸 (タイプ H) の標準溶液または超純水に溶解したアミノ酸試薬を使用した。

3-2-2 サンプルの前処理方法

Bond Elut Plexa 30 mg を用いて 0.5%ギ酸メタノール溶液 1 mL、0.5%ギ酸水溶液 1 mL、サンプル 800 μ L + 0.5%ギ酸水溶液 400 μ L、30%メタノール水溶液 1 mL の順に流し、1 時間乾燥後、3000 r.p.m. で 1 分遠心、ガラスを移し替えてメタノール 250 μ L とメタノール 500 μ L の 2 回で溶出させた。溶出液を遠心乾固し、移動相 100 μ L で溶解し、LC/MS/MS で測定を行った。

3-2-3 LC/MS/MS の測定条件

LC/MS/MS 分析は、LC-20AD ポンプ、CBM-20A 通信モジュール、SIL 20AC サーモスタット オートサンプラー、および CTO-20AC カラム オープン (島津製作所、京都、日本)、API4000 システム (AB Sciex、コンコード、カナダ) で構成される HPLC システムを使用した。移動相は、1 mM フッ化アンモニウム水溶液 (A) および アセトニトリル (B) で構成され、流速は 0.4 mL min⁻¹ に設定した。溶媒プログラムは、20% B の最初のステップで開始し、その後 20~90% B (9 分) のランプと 30% B (1 分) に戻すことで、合計分析サイクル時間を 15 分未満にすることができた。分注量は 10 μ L で、オートサンプラーの温度は 40°C に設定した。クロマトグラフィー分離は、InfinityLab Poroshell HPH-C8 (2.1 I.D.×50 mm) 分析カラムで行った。イオン源はポジティブ モードで測定し、インターフェースパラメータを最適化した (カーテンガス: 20 L min⁻¹; イオンスプレー電圧: 5500 V; 温度: 500 °C; イオン源ガス 1: 40 L min⁻¹; イオン源ガス 2: 80 L min⁻¹; 衝突セル出口電位: 7 V)。データの取得と処理には、LC/MS/MS 分析用の Analyst Software (AB Sciex) を使用した。

3-2-4 検量線

プロゲステロン、アンドロステンジオン、テストステロンの濃度が 50, 100, 500, 1000, 2000 pg/mL となるよう F-10 培地に溶解し、3-2-2 と同様に Bond Elut Plexa 30 mg を用いて固相抽出を行い、LC/MS/MS で測定を行い、検量線を作製した。

3-2-5 日内日間変動試験

各種ステロイドホルモンの濃度を 100, 500, 1000 pg/mL となるように F-10 培地に溶解して前処理し、日内及び日間変動試験を行った。

3-2-6 添加回収試験

添加回収試験では I-10 細胞を 1×10^6 cells/dish となるよう 10 cm シャーレに播種し、2 日後無血清培地に入れ替え、24 時間後無血清培地を回収したのち、100, 500, 1000 pg/mL となるよう各種ステロイドホルモンを溶解して前処理を行った。

3-2-7 薬物添加時における I-10 細胞中 D,L-アスパラギン酸の測定

I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 2×10^5 cells/well となるように 6 well plate に 2 mL ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。細胞を播いてから 2 日後無血清培地に入れ替え、D-Asp、Menaquinone-4 (MK-4, Vitamin K2)、Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) の終濃度が 200 μM、30 μM、3 μM となるよう添加し、添加から 24 時間後、氷上で培地を回収、1×PBS 1 mL で細胞を洗浄後、0.3% NP-40 100 μL で細胞を回収した。培地は回収後、等量のアセトニトリルを加えて除タンパクを行い、遠心 (4°C、23000 x g、10 min) 後、その上清 50 μL を FDLA で誘導体化し、LC/MS/MS で測定した。回収した細胞はアセトニトリル 100 μL を加えて除タンパクを行い、遠心 (4°C、12000 x g、5 min) 後、その上清 50 μL を FDLA で誘導体化し、LC/MS/MS で測定した。

3-2-8 薬物添加時における I-10 細胞培地中各種ステロイドホルモンの測定

I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 2×10^5 cells/well となるように 6 well plate に 2 mL ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。細胞を播いてから 2 日後無血清培地に入れ替え、H-89 の終濃度を 3 μM となるよう添加し、プレインキュベートを 1 時間行った。プレインキュベート後、D-Asp、MK-4、db-cAMP の終濃度が 200 μM、30 μM、3 μM となるよう添加し、添加から 24 時間後、氷上で培地を回収し、3-2-2 と同様に Bond Elut Plexa 30 mg を用いて固相抽出を行い、LC/MS/MS で測定を行った。

3-2-9 統計解析

結果は平均±標準誤差 (S.E.) として表した。本研究で得られたデータは、一元配置分散分析 (one way ANOVA) と Tukey の検定を使用して多重比較を行った。

第三節 結果

3-3-1 LC/MS/MS を用いた培地中ステロイドホルモンの検出

I-10 細胞培地中の各種ステロイドホルモンを LC/MS/MS で測定するためには、誘導体化試薬を用いて検出感度の向上を図る、あるいは、固相濃縮を行ってステロイドホルモンを濃縮するなどの操作が必要である。本研究では、各種ステロイドホルモンを Bond Elut Plexa 30 mg を用いて固相抽出し、LC/MS/MS の測定条件を検討した (Table 8)。決定した条件に基づいて測定を行い、各種ステロイドホルモンを測定したところ、それぞれのピークが確認できた (Fig. 9)。保持時間はプロゲステロンで 8.49 分、アンドロステンジオンは 6.15 分、テストステロンでは 5.56 分であった。確立した測定方法では各種ステロイドホルモンを 10 分以内に分離分析することが可能であった。次に、I-10 細胞の培地を用いて固相濃縮を行い、I-10 細胞培地中の各種ステロイドホルモンの測定が可能かどうか検討したところ、各種ステロイドホルモンのピークを確認することができた (Fig. 9)。

Table 8 ステロイドホルモン測定のための MS 測定条件

	Q1	Q3	DP	CE	CXP
Progesterone	315.1	97	71	35	16
Androstenedione	286.8	97	71	33	16
Testosterone	288.8	97	71	33	16

Q1: Precursor ion (m/z), Q3: Product ion (m/z), DP: Declustering potential,
CE: Collision energy, CXP: Collision cell exit potential

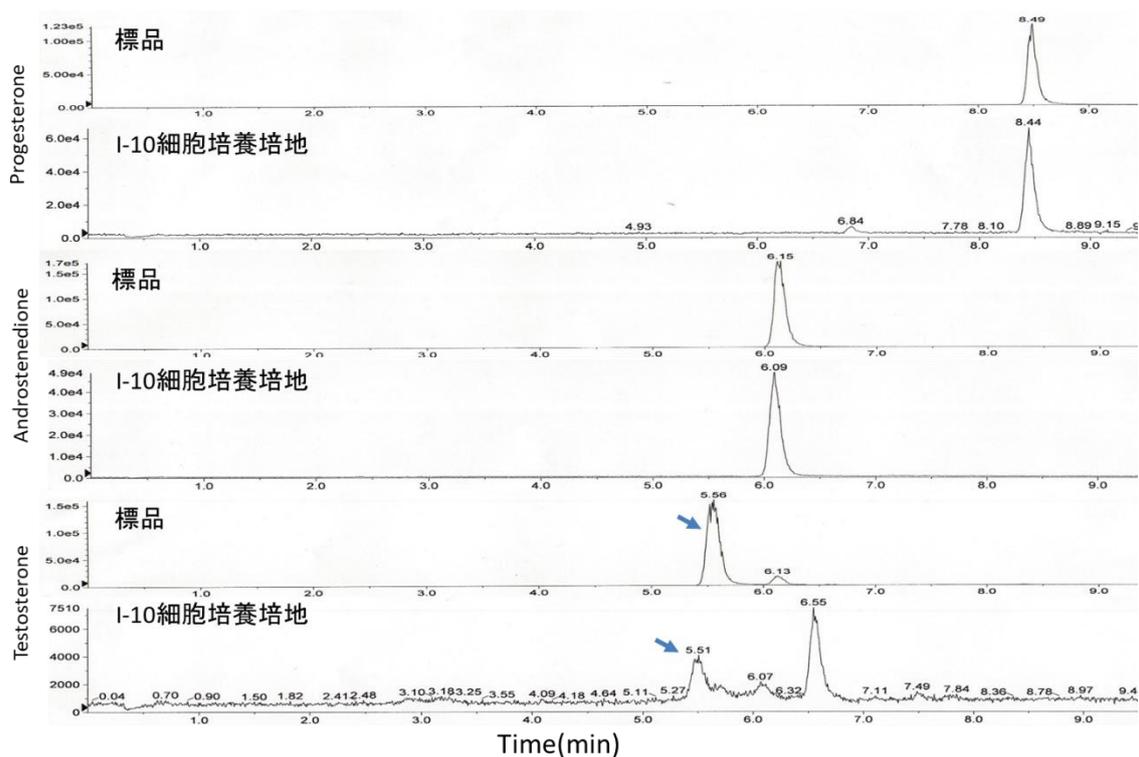


Fig. 9 LC/MS/MS法によるステロイドホルモンの分析

3-3-2 検量線の直線性

各種ステロイドホルモンの濃度を 50, 100, 500, 1000, 2000 pg/mL となるように調製し、固相濃縮して、確立した測定方法を用いて検量線を作成したところ、Accuracyは80~120%の範囲内にあり、相関係数が0.995以上と良好な直線性を示した (Table 9)。

Table 9 各種ステロイドホルモンの検量線の直線性

	標品の濃度(pg/mL)					検量線	r
	50	100	500	1000	2000		
	Accuracy (%)						
Progesterone	93.7	112	100	112	81.5	$y = 216x + 1.59 \times 10^4$	0.9962
Androstenedione	104	92.1	100	105	98.9	$y = 210x + 1.23 \times 10^4$	0.9981
Testosterone	105	88.8	100	106	99.2	$y = 280x + 1.52 \times 10^4$	0.9965

Accuracy: 正確さ, r: 相関係数

3-3-3 日内日間変動試験

測定法の精度を検証するため、各種ステロイドホルモンの濃度を 100, 500, 1000 pg/mL と なるように調製して前処理し、日内及び日間変動試験を行った。すべての濃度で Accuracy が 80~120%の範囲内にあった (Table 10, 11)。

Table 10 各種ステロイドホルモン測定の日内変動

	Intra-day								
	Average ± S.D.			Precision(RSD%)			Accuracy(%)		
	Concentration(pg/mL)			Concentration(pg/mL)			Concentration(pg/mL)		
	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000
Progesterone	104 ± 7.90	576 ± 164	1010 ± 35.6	7.90	32.8	3.56	104	115	101
Androstenedione	101 ± 9.51	580 ± 183	1090 ± 43.2	9.51	36.7	4.32	101	116	109
Testosterone	105 ± 9.86	560 ± 182	1009 ± 17.6	9.86	36.5	1.76	105	112	101

S.D.: 標準偏差、Precision: 精度、RSD: 相対標準偏差、Accuracy: 正確さ

Table 11 各種ステロイドホルモン測定の日間変動

	Inter-day								
	Average ± S.D.			Precision(RSD%)			Accuracy(%)		
	Concentration(pg/mL)			Concentration(pg/mL)			Concentration(pg/mL)		
	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000
Progesterone	89 ± 38.2	494 ± 27.0	1022 ± 30.2	38.2	5.40	3.02	89	99	102
Androstenedione	106 ± 44.4	486 ± 8.8	1040 ± 21.6	44.4	1.76	2.16	106	97	104
Testosterone	103 ± 29.6	507 ± 33.2	1043 ± 34.0	29.6	6.65	3.40	103	101	104

S.D.: 標準偏差、Precision: 精度、RSD: 相対標準偏差、Accuracy: 正確さ

3-3-4 添加回収試験

生体試料中に含まれる成分が確立された測定法に干渉するかどうか調べるため、添加回収試験を行った。I-10細胞を 1×10^6 cells/dishとなるよう10 cmシャーレに播種し、2日後無血清培地に入れ替え、24時間後無血清培地を回収した。100, 500, 1000 pg/mLとなるよう各種ステロイドホルモンを回収した無血清培地に溶解し、固相抽出による前処理を行い、LC/MS/MSで測定を行った。その結果、すべての濃度において回収率が80~120%の範囲内であった (Table 12)。

Table 12 各種ステロイドホルモンの回収率

	試料中添加濃度(pg/mL)				回収濃度(pg/mL)				回収率(%)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000
Progesterone	1180	1290	1640	2070	-	110	460	890	-	110	92	89
Androstenedione	41.5	132	537	1040	-	90.5	495.5	998.5	-	90.5	99.1	99.85
Testosterone	409	524	905	1530	-	115	496	1121	-	115	99.2	112.1

3-3-5 D-アスパラギン酸添加時における I-10 細胞中 D,L-Asp 量の解析

I-10 細胞を用いた D-Asp によるテストステロン産生亢進機構を解明するために、D-Asp、MK-4、db-cAMP 添加時における I-10 細胞内 D-アミノ酸濃度を解析した。その結果、D-Asp 添加時した群では細胞内に D-Asp が取り込まれていることが確認できた (Fig. 10)。さらに、MK-4 添加時に細胞内 L-Asp 量が有意に減少した (Fig. 10)。

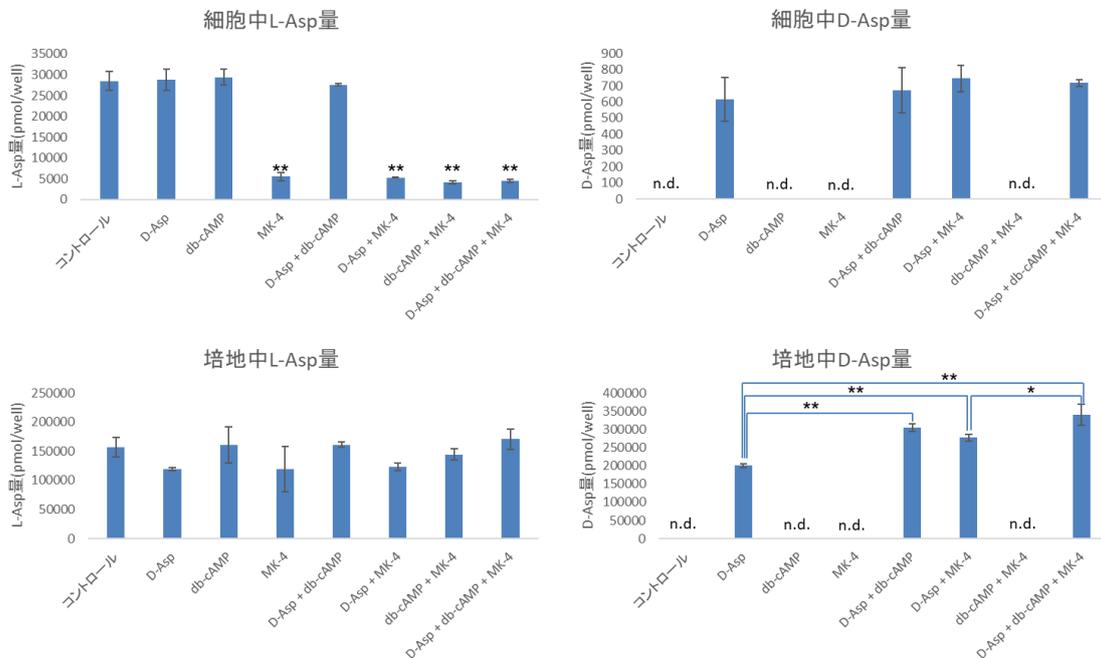


Fig. 10 各種化合物が I-10 細胞内ならびに培地中 D,L-Asp 量へ及ぼす影響

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +db-cAMP, レーン 4: +MK-4,
 レーン 5: +D-Asp, db-cAMP, レーン 6: +D-Asp, MK-4, レーン 7: +db-cAMP, MK-4,
 レーン 8: +D-Asp, db-cAMP, MK-4,

*P<0.05、**：P<0.01、***：P<0.005、****：P<0.001

(n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey, n.d.は検出限界以下)

3-3-6 D-アスパラギン酸がステロイドホルモン産生へ及ぼす影響の解析

次に D-Asp、MK-4、ならびに db-cAMP を用いて、I-10 細胞培地中の各種ステロイドホルモンを解析した。その結果、プロゲステロンは MK-4 単独添加ならびに db-cAMP 単独添加において上昇し、MK-4 と db-cAMP の共存下で更なる増加が見られた。一方、アンドロステンジオンならびにテストステロンは、コントロールと比べて D-Asp 単独添加による影響は認められなかったものの、MK-4 単独添加ならびに db-cAMP 単独添加において上昇し、D-Asp と MK-4 同時添加により更なる増加が認められた (Fig. 11)。

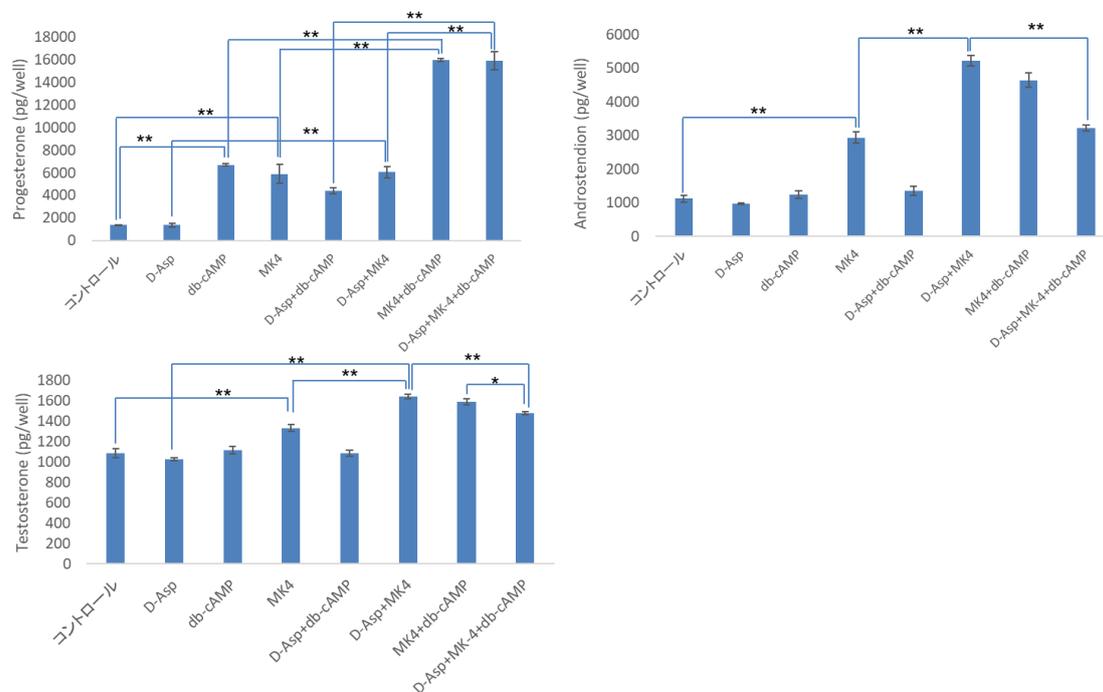


Fig. 11 各種化合物が I-10 細胞におけるステロイドホルモン産生量へ及ぼす影響

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +db-cAMP, レーン 4: +MK-4,

レーン 5: +D-Asp, db-cAMP, レーン 6: +D-Asp, MK-4, レーン 7: +db-cAMP, MK-4,

レーン 8: +D-Asp, db-cAMP, MK-4,

*P<0.05、**: P<0.01、***: P<0.005、****: P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

第四節 考察

第三章では、株化された継代可能な培養細胞を用いての D-Asp によるステロイドホルモン産生促進機構を解析可能な実験系の構築を目的とし、細胞培地中のステロイドホルモンの測定法の確立と、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞における各種ステロイドホルモン産生への D-Asp の影響について解析を行った。

LC/MS/MS を用いて各種ステロイドホルモンの測定法を確立するため、まず LC/MS/MS のバリデーションを行った。その結果、検量線の作成について、50-2000 pg/mL の濃度の範囲では相関係数が 0.995 以上と良好な直線性を示した (Table 9)。よって、これらの濃度の範囲において生体試料中の各種ステロイドホルモンを定量することができると考えた。次に、日内日間変動試験ならびに添加回収試験を行い、生体試料中の各種ステロイドホルモンを定量するための測定法の妥当性を評価した。その結果、確立した測定法の精度は 80 ~ 120% の範囲内であり、良好な結果を示した (Table 10, 11)。また、添加回収試験について、回収率が 80~120% の範囲内であり、I-10 細胞において他の成分による各種ステロイドホルモン検出に干渉はないと考えられた (Table 12)。以上のことから、確立した測定法は I-10 細胞中の各種ステロイドホルモンを測定することが可能であることが示された。

ラット Leydig 初代培養細胞を用いた解析では、D-Asp が LH 存在下で細胞内に取り込まれ、テストステロン産生を促進することが報告されている⁷。しかし、株化された培養細胞では初代培養細胞で得られた結果の再現性が得られていない。これが分子生物学的解析が進まない要因の1つである。つまり、株化細胞を用いて D-Asp によるテストステロン産生促進作用が見られる実験条件を見出すことが、さらなる解析を進めるうえで重要である。すでに小緒言でも述べたように、I-10 細胞において MK-4 がテストステロン産生を促進することが報告されている⁶⁴。そこで、I-10 細胞に D-Asp、MK-4、db-cAMP を添加し、細胞・培地中の D,L-Asp を測定した。その結果、D-Asp 添加時した群では明らかに細胞内に D-Asp が取り込まれていることが確認できた (Fig. 10)。これらの結果から、細胞内に取り込まれた D-Asp が各種ステロイドホルモン産生促進機構に関わっている可能性が示唆された。また、これらの結果はラット Leydig 初代培養細胞を用いた研究報告と矛盾しない⁷。しかし、D-Asp によるテストステロン産生を促進には細胞膜上に存在する NMDA 受容体が関与しているとの報告もあることから、D-Asp の作用点が細胞膜上 (細胞外) なのか細胞内なのかは議論の余地が残されている⁷⁴。この点に関しては、今後のさらなる解析が必要であると考えられる。一方、MK-4 添加時に細胞内 L-Asp 量が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 10)。この MK-4 による L-Asp 量の減少は、D-Asp によるテストステロン産生促進作用に関与しているかは不明であるが、今後の解析を進める上で重要な現象の1つである。

次に、確立した LC/MS/MS による各種ステロイドホルモン測定法を用いて、I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生亢進作用の解析を試みた。まず、I-10 細胞を培養し、D-Asp、db-cAMP、MK-4 を添加してから 24 時間後に培地を回収して前処理し、

LC/MS/MS を用いて各種ステロイドホルモンを測定した。プロゲステロンでは MK-4 単独添加ならびに db-cAMP 単独添加において上昇し、MK-4 と db-cAMP の共存下で更なる増加が見られた。アンドロステンジオンならびにテストステロンでは、コントロールと比べて D-Asp 単独添加による影響は認められなかったものの、MK-4 単独添加において上昇した。さらに、アンドロステンジオンならびにテストステロンでは、MK-4 単独添加と比べて D-Asp と MK-4 同時添加により更なる増加が認められた (Fig. 11)。これらの結果から、I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生促進作用には MK-4 による細胞内応答が必要であることが示唆された。しかし、第三章の結果では I-10 細胞における D-Asp と MK-4 の相乗効果的なテストステロン産生促進作用について関係性を明らかにすることはできなかった。テストステロン産生における D-Asp と MK-4 の関係性については今後の検討課題である。これまでのラット Leydig 初代培養細胞を用いた研究報告では、D-Asp によるテストステロン産生促進時における MK-4 の関与については解析されていない⁷。一方、ラット個体を用いた研究では、MK-4 の欠乏でテストステロン産生を減少することから⁶⁵、ラット Leydig 細胞においても MK-4 がテストステロン産生を促進すると考えられる。したがって、ラット Leydig 初代培養細胞では、ラット精巣から細胞を樹立した時点ですでに細胞内に MK-4 が存在しており、その内在性の MK-4 が D-Asp によるテストステロン産生促進に関与している可能性がある⁷。その場合、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞に MK-4 を添加することで、結果としてより初代培養細胞に近い状態となり、D-Asp によるテストステロン産生促進作用が見られた可能性もある。

第五節 小括

第三章では、LC/MS/MS による各種ステロイドホルモンの測定法を確立し、本測定法を用いて I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生亢進を解析することが可能となった。また、I-10 細胞に D-Asp を添加した場合、細胞内に D-Asp が取り込まれることが明らかとなった。I-10 細胞を用いて、D-Asp が MK-4 存在下でテストステロン産生を促進していることを明らかにした。これらの結果から、株化細胞である I-10 細胞を用いた解析可能な実験系を確立できたと考えられる。さらに、本実験系を用いることにより、初代培養細胞では困難であった分子細胞生物学的な解析が可能となり、D-Asp による StAR 発現のより詳細なメカニズムの解明につながると考えられる。

第四章 D-アスパラギン酸によるテストステロン産生促進機構の解析

第一節 小諸言

第三章で述べたように、D-Asp はラット Leydig 初代培養細胞において、テストステロン生合成の律速因子である StAR の発現を促進することにより、テストステロン産生を促進させることが報告されている⁷ (Fig. 7)。第三章では、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来の株化細胞株である I-10 細胞を用いて、D-Asp が MK-4 存在下でテストステロン産生を促進することを明らかにした。D-Asp によるテストステロン産生促進機構のより詳細な解明には StAR 遺伝子発現に及ぼす影響の解析が必要である。そこで第四章では、I-10 細胞を用いて D-Asp が StAR 遺伝子の発現に及ぼす影響について解析することを目的とした。

StAR 遺伝子の発現はプロモーター領域 (DNA 上の塩基配列) に、転写因子が結合することによって制御されている。StAR 遺伝子の発現に関わっている転写因子として、Steroidogenic factor-1 (SF-1) /Adrenal 4 binding protein binding protein (Ad4BP)⁷⁵⁻⁷⁹、CCAAT/Enhancer-binding protein β (C/EBP β)^{78,80,81}、転写因子 GATA^{81,82}、CREB^{83,84} が報告されている。いずれも cAMP 量の増加によって活性化されることから、StAR プロモーター領域の活性化には cAMP による PKA の活性化 (cAMP/PKA 経路) が重要であると考えられている。また、Leydig 細胞では、StAR 発現を調節する cAMP/PKA 経路に加えて、ステロイド産生因子、プロテインキナーゼ C 経路、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (Mitogen activated protein kinase; MAPK)、別名: 細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular signal-regulated kinase; ERK) などの他の因子も関与していることが報告されている⁸⁵。そのため、D-Asp によるテストステロン産生促進機構の解明にはこれらの因子も含めた解析も必要になる⁸⁵。

I-10細胞では、MK-4はPKAを活性化し、その下流のCREBが活性化する⁶⁴。その結果、コレステロール側鎖切断酵素 CYP11A1 をコードしている遺伝子の転写が活性化され、CYP11A1 タンパク質の発現量が増加する^{65,66} (Fig. 8, 12)。一方、ステロイドホルモン生合成律速因子に対し、D-Asp は LH 存在下、ラット Leydig 初代培養細胞内に取り込まれて StAR 発現を促進する⁷。LH は Leydig 細胞の LH 受容体 (LHR) へ結合し、Gs タンパク質を活性化する。Gs タンパク質の活性化はアデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化させる。AC の活性化は細胞内の cAMP 量を増加させる。細胞内の cAMP 量の増加は PKA を活性化し、CREB および cAMP 応答配列 (cAMP-responsive element; CRE) モジュレータータンパク質 (CRE modulator; CREM) を活性化する。よって LH は cAMP/PKA 経路を活性化し、CREB/CREM の活性化を介して StAR や CYP11A1 といったステロイド産生に関連する遺伝子の発現を増加させる⁸⁶⁻⁹¹。しかし、ラット Leydig 初代培養細胞内に取り込まれた D-Asp はどのようにして StAR 発現を促進しているかについては解明できていない。

また別の研究報告では、D-Asp が NMDA 受容体のアゴニストとして作用することも示唆されている⁷⁴。Leydig 細胞においても、D-Asp が NMDA 受容体を刺激することで、テスト

ステロン産生を促進している可能性もあり、細胞外で機能しているのか細胞内で機能しているのかという点についても不明なままである⁷⁴。以上のことから、I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生促進機構を解明するため、NMDA 受容体の関与の有無も含め、D-Asp による StAR 発現への影響を解析し、StAR 遺伝子の転写調節機構を明らかにする必要があると考えた。

第四章では、第三章で確立した実験系を用いて、①D-Asp による各種ステロイドホルモン産生促進機構に対する阻害剤の影響、②D-Asp による StAR 発現に対する影響と阻害剤を用いた解析、③レポータージーンアッセイならびにゲルシフトアッセイを用いた D-Asp による StAR 遺伝子の発現調節機構の解析を行った。

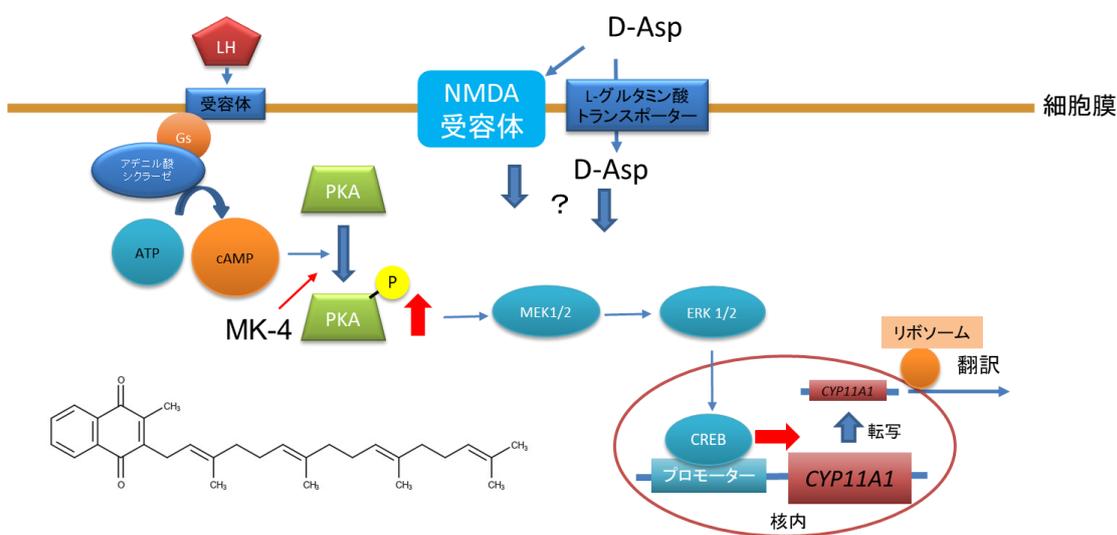


Fig. 12 I-10 細胞の MK-4 によるステロイドホルモン産生促進機構と D-Asp の関わり

第二節 実験方法

4-2-1 実験試薬

アセトニトリル (HPLC グレード)、ギ酸 (~99%、LC/MS グレード)、メタノール (HPLC グレード)、Menaquinone-4、(+)-MK801、ウマ血清 (HS) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) を使用した。アンドロステンジオン、プロゲステロン、db-cAMP は、東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。D,L-アミノ酸は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入した。テストステロンは、ナカライテスク (京都、日本) から購入した。H-89、D-AP5 はフナコシから購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、ニチレイ バイオサイエンス (東京、日本) から購入した。Ham's F-10 Nutrient Mix は Thermo Fisher Scientific (東京、日本) から購入した。超純水は、Direct-Q UV (Merck、ダルムシュタット、ドイツ) から供給した。

4-2-2 各種阻害剤を用いた D-Asp によるテストステロン産生への影響の解析

I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 2×10^5 cells/well となるように 6 well plate に 2 mL ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。細胞を播いてから 2 日後無血清培地に入れ替え、H-89、U0126、MK801、D-AP5 のそれぞれの終濃度を 3 µM、15 µM、1 µM、5 µM となるよう添加し、プレインキュベートを 1 時間行った。プレインキュベート後、D-Asp、MK-4 の終濃度が 200 µM、30 µM となるよう添加し、添加から 24 時間後、氷上で培地を回収し、3-2-2 と同様に Bond Elut Plexa 30 mg を用いて固相抽出を行い、LC/MS/MS で測定を行った。

4-2-3 RT-PCR を用いた D-Asp による StAR mRNA 発現への影響の解析

D-Asp による StAR 遺伝子の発現への影響を TaqMan[®] assay に基づいて定量的 RT-PCR を用いて解析した。I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 8.0×10^4 cells/well となるように 24 well plate に 500 µL ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。細胞を播いてから 2 日後無血清培地に入れ替え、H-89 の終濃度を 3 µM となるよう添加し、プレインキュベートを 1 時間行った。プレインキュベート後、D-Asp、MK-4、db-cAMP の終濃度が 200 µM、30 µM、3 µM となるよう添加し、添加から 16 時間後、氷上で培地を回収し、1×PBS で洗浄後、Buffer RLT 350 µL を用いて細胞回収を行った。その後、RNeasy[®] Mini のプロトコルに従って mRNA を抽出し、cDNA に逆転写して RT-PCR を行った。

4-2-4 ウェスタンブロットを用いた D-Asp による StAR タンパク質発現への影響の解析

StAR タンパク質は、抗 StAR モノクローナル抗体を用いて、Western blot 解析法により測定した。I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用い、 8.0×10^4 cells/well となるように 24 well plate に 500 µL ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。細胞を播

いてから 2 日後無血清培地に入れ替え、H-89 の終濃度を 3 μM となるよう添加し、プレインキュベートを 1 時間行った。プレインキュベート後、D-Asp、MK-4、db-cAMP の終濃度が 200 μM 、30 μM 、3 μM となるよう添加し、添加から 24 時間後、氷上で培地を回収し、1 \times PBS で洗浄後、ウェスタン用サンプルバッファー 100 μL を用いて細胞回収を行った。そのサンプル 20 μL を 15% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。その後、Anti StAR Rabbit IgG と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。そして、ECL kit を用いて測定及び解析を行った。尚、StAR は β -Actin を用いて基準化補正を行った。

4-2-5 StAR promoter reporter 遺伝子の構築

MagExtractor™ Genome (TOYOBO) を用い、プロトコルに従ってゲノム DNA を抽出し、0.2 mL チューブに抽出した DNA の 10 倍希釈液、StAR pro-F3、StARpro-R4 を各 0.4 μL 、PrimeSTAR Max Premix (2X) を 10 μL 、滅菌水を 8.8 μL 入れたもの (以下 F3R4 とする) と、抽出した DNA の 10 倍希釈液、StARpro-F4、StAR pro-R3 を各 4 μL 、PrimeSTAR Max Premix (2X) を 10 μL 、滅菌水を 8.8 μL 入れたもの (以下 F4R3 とする) を作製し、C1000 サーマルサイクラー (BIO-RAD) を用いて熱変性を 98°C で 10 sec、アニーリングを F3R4 が 55°C、F4R3 が 62°C で 15 sec、伸長反応を 72°C で 15 sec の条件下で 35 サイクル PCR を行った。その後、0.2 mL チューブに F3R4 で PCR した DNA の 1000 倍希釈液、pGL4.10-StAR pro-F1、StAR pro-R4 を各 0.4 μL 、PrimeSTAR Max Premix (2X) を 10 μL 、滅菌水を 8.8 μL を入れたものと、F4R3 で PCR した DNA の 1000 倍希釈液、StARpro-F4、StARpro-Luci-R を各 0.4 μL 、PrimeSTAR Max Premix (2X) を 10 μL 、滅菌水を 8.8 μL 入れたものを作製し、C1000 サーマルサイクラーを用いて熱変性を 98°C で 10 sec、アニーリングを 55°C で 15 sec、伸長反応を 72°C で 15 sec の条件下で 35 サイクル PCR を行った。Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (promega) を用い、プロトコルに従ってゲル抽出を行い、PCR で増幅させた DNA を精製し、結合することで StAR promoter reporter vector を作製した。

各 StAR promoter deletion mutant の作製は、0.2 mL チューブに滅菌水 8.8 μL 、STAR Max Premix (2X) 10 μL 、StARpro-pGL4.10 0.4 μL 、pGL4.10-R1 0.4 μL (40 pmol) ならびに、del1 は StARproF4 0.4 μL (40 pmol)、del2 は StARproF4+1 0.4 μL (40 pmol)、del3 は StARproF5 0.4 μL (40 pmol)、del5 は StARproF6 0.4 μL (40 pmol) を入れ、C1000 サーマルサイクラーを用いて熱変性を 98°C で 10 sec、アニーリングを 55°C で 15 sec、伸長反応を 72°C で 180 sec の条件下で 35 サイクル PCR を行った。各 PCR 産物 1 μL を 0.5 mL チューブに取り、Nuclease-free water 3 μL 、KLD Reaction Buffer (2X) 5 μL 、KLD Enzyme MIX (10X) 1 μL を加え、25°C、5 分間加熱し、プラスミド DNA を作製した。

作製した StAR promoter reporter vector ならびに各 deletion mutant を大腸菌にトランスフォーメーションし、寒天培地で培養し、大腸菌のコロニーから少量培養してプラスミドを精製し、各プラスミド DNA のサイズの確認を行った。その後、液体培地 200 mL で大量培養

を行い、PureYield™ Plasmid Midiprep System を用いてプラスミド DNA を精製した。なお、使用した各プライマー配列は Table 12 に示した。

4-2-6 D-Asp による StAR promoter 活性への影響の解析方法

I-10 細胞を 2.5% FBS 及び 15% HS を含む F-10 培地を用いて、 8×10^4 cells/well となるように 24 well plate に 500 μ L ずつまき、37°C、5.0% CO₂ の条件下で培養した。翌日、1.5 mL チューブに無血清培地 447 μ L、ViaFect™ Transfection Reagent (promega) 25 μ L、StAR-pGL4.10 5 μ g/13 μ L、pGL4.75 5 μ g/15 μ L を添加し転倒混和した。20 分室温で放置後再度転倒混和をし、50 μ L ずつ 12 well に添加してトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 時間後に培地を無血清培地 500 μ L に入れ替え、各種薬剤 (D-Asp 200 μ M、MK-4 30 μ M) を添加した。薬剤添加から 30 時間後に Dual-Luciferase® Reporter Assay System (promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

4-2-7 ゲルシフトアッセイを用いた StAR promoter 領域の解析方法

I-10 細胞を 2.3×10^6 cells/dish となるように 10 cm シャーレに播種し、48 時間後に培地を無血清培地 10 mL に入れ替え、各種薬物 (終濃度 MK-4 30 μ M、D-Asp 200 μ M) を添加した。薬物添加から 16 時間後に Nuclear Extract Kit (ACTIVE MOTIF) を用いてキットのプロトコルに従って細胞を回収し、核抽出液を調整し、Gelshift™ Chemiluminescent EMSA (ACTIVE MOTIF) を用いてキットのプロトコルに従ってゲルシフトアッセイを行った。

長鎖 Probe DNA (252 bp) は、0.2 mL チューブに滅菌水 8.2 μ L、STAR Max Premix (2X) 10 μ L、StARpro F4 0.4 μ L (4 pmol)、Bio-StARpro-R5 0.4 μ L (4 pmol)、StARpro-pGL4.10 1 μ L を入れ、C1000 サーマルサイクラーを用いて熱変性を 98°C で 10 sec、アニーリングを 55°C で 15 sec、伸長反応を 72°C で 1 sec の条件下で 35 サイクル PCR を行い作製した。また短鎖 Probe DNA (50 bp) は、biotin-StAR-GS compDNA F1 と StAR-GS compDNA R1、biotin-StAR-GS compDNA F2 と StAR-GS compDNA R2、biotin-StAR-GS compDNA F4 と StAR-GS compDNA R4 をそれぞれ等量で混合し、99°C、10 分間熱変性し、徐々に温度を下げながらアニーリングして作製した。競合 DNA は、Biotin ラベルなしの各オリゴヌクレオチドを同様にアニールさせることで作製した。なお、使用した各オリゴ DNA の配列は Table 13 に示した。

4-2-8 統計解析

結果は平均±標準誤差 (S.E.) として表した。本研究で得られたデータは、一元配置分散分析 (ANOVA) ならびに Tukey の検定を使用して多重比較を行った。

Table 12 StAR promoter 領域の増幅と deletion mutant 作成に用いたプライマーの配列

Forward	
pGL4.10-StARpro-F1	5'-ACTGTTGGTAAAGCCACAGAATGGCAACAGCAAG-3'
StARpro-F3	5'-TGCTCAGAGGAACAGCAAGAG-3'
StARpro-F4	5'-AAGAAGAGATCTTGGCAGGGC-3'
StARpro-F4+1	5'-GCCAGTACCACAGGGATCA-3'
StARpro-F5	5'-GTGAGCTTGCAGGGTGGAA-3'
StARpro-F6	5'-AACCAAGGCCAGCTAGAGGA-3'
Reverse	
StARpro-Luci R1	5'-AATGTTTTTGGCATCTCCATGCTGAGTGCTGAGGTGCT-3'
StARpro-R3	5'-TTCTGCTGCTCAACTCTCCTG-3'
StARpro-R4	5'-GCCCTGCCAAGATCTCTTCTT-3'
p-pGL4.10-R1	5'-PHO-GTGGCTTACCAACAGT-3'

Table 13 Gel shift assay の probe ならびに competitor の作成に用いた DNA 配列

Forward	
StARpro-F4	5'-AAGAAGAGATCTTGGCAGGGC-3'
StAR-GScompDNA-F1	5'-AAGAAGAGATCTTGGCAGGGCAGGGCTGGGTGGTAGAGCTTTCCCTGCC-3'
StAR-GScompDNA-F2	5'-TTTCCTGCCTGGTGTGTCTGGGAGCAACTGAGGCAATTAATTCTAAGGT-3'
StAR-GScompDNA-F3	5'-ATTCTAAGGTTCCCTGGATCTGCCAGTACCACAGGGATCACATACCTGC-3'
StAR-GScompDNA-F4	5'-ACATACCTGCAGGACTGACAACAGTCAATGTCCAATGATTGTGTTTC-3'
StAR-GScompDNA-F5	5'-TTTGTGTTTCTCACCTTGTGCACAGGTGAGGACTGTAGCAGGGCAGGC-3'
StAR-GScompDNA-F6	5'-CAGGGCAGGCCAGCCTTAGCTGCATGAGGAAAGGGTGAAGCTTGCAGGGTG-3'
biotin-StAR-GScompDNA-F1	5'-AAGAAGAGATCTTGGCAGGGCAGGGCTGGGTGGTAGAGCTTTCCCTGCC-3'
biotin-StAR-GScompDNA-F2	5'-TTTCCTGCCTGGTGTGTCTGGGAGCAACTGAGGCAATTAATTCTAAGGT-3'
biotin-StAR-GScompDNA-F4	5'-ACATACCTGCAGGACTGACAACAGTCAATGTCCAATGATTGTGTTTC-3'
Comp2-1F	5'-TTTCCTGCCTGGTGTGTCTGGGAG-3'
Comp2-2F	5'-GTGTGTCTGGGAGCAACTGAGGCAA-3'
Comp2-3F	5'-CAACTGAGGCAATTAATTCTAAGGT-3'
Reverse	
Bio-StARpro-R5	5'-TTCCACCCTGCAAGCTCAC-3'
StAR-GScompDNA-R1	5'-GGCAGGGAAAAGCTTACCACCCAGCCCTGCCCTGCCAAGATCTCTTCTT-3'
StAR-GScompDNA-R2	5'-ACCTTAGAATTAATTGCCTCAGTTGCTCCAGACACACCAGGCAGGGAAA-3'
StAR-GScompDNA-R3	5'-GCAGGTATGTGATCCCTGTGGTACTGGGAGTCCAGGGAACCTTAGAAT-3'
StAR-GScompDNA-R4	5'-GAAACACAAATCATTTGGACATTGACTGTTGTGTCAGTCCCTGCAGGTATGT-3'
StAR-GScompDNA-R5	5'-GCCTGCCCTGCTACAGGCTGACCTGTGCACAAGGTGAGAAACACAAA-3'
StAR-GScompDNA-R6	5'-CACCTGCAAGCTCACCTTTCTCATGCAGCTAAGGCTGGCCTGCCCTG-3'
Comp2-1R	5'-CTCCAGACACACCAGGCAGGGAAA-3'
Comp2-2R	5'-TTGCCTCAGTTGCTCCAGACACAC-3'
Comp2-3R	5'-ACCTTAGAATTAATTGCCTCAGTTG-3'

第三節 結果

4-3-1 D-Aspによるテストステロン産生促進への各種阻害剤の影響

D-Aspによるテストステロン産生促進機構の解明を目的とし、プロテインキナーゼ A (PKA) の阻害剤である H-89 を用いて、D-Asp による各種ステロイドホルモン産生促進への影響について解析した。まずプロゲステロンでは、MK-4 単独添加時における産生量の増加が H-89 で抑制され、さらに D-Asp と MK-4 の共存下における産生量増加も H-89 で抑制された。アンドロステジオンならびにテストステロンでは MK-4 単独添加による産生量の増加が H-89 によって抑制され、さらに D-Asp と MK-4 共存下における産生量の増加も抑制された (Fig. 13)。

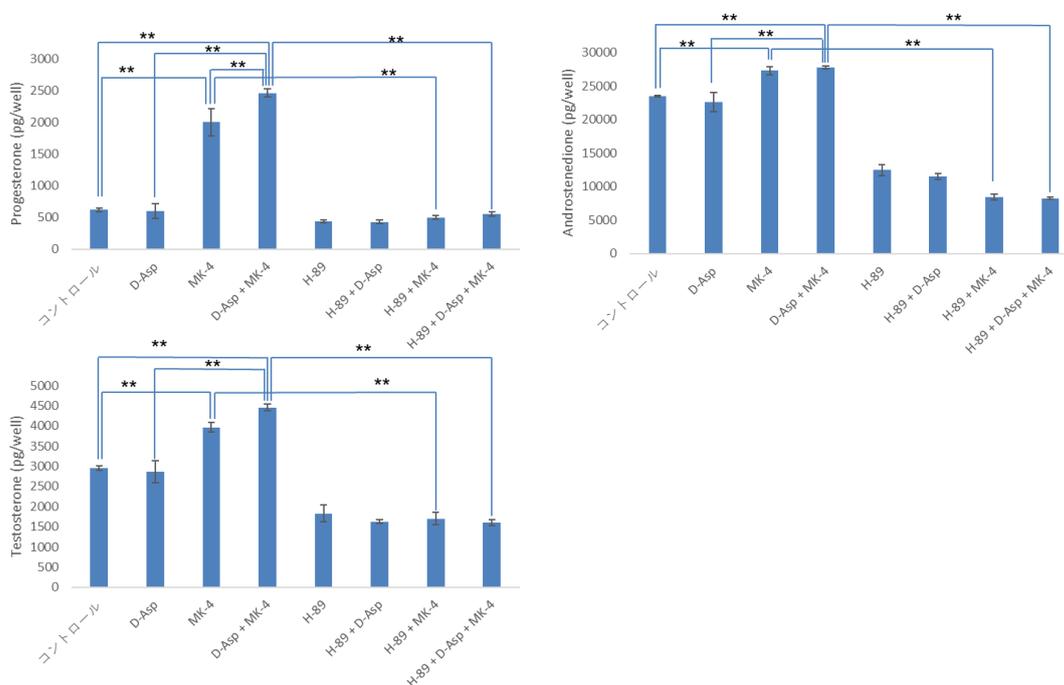


Fig. 13 I-10 細胞におけるD-Asp ならびに MK-4 によるステロイドホルモン産生促進に及ぼす PKA 阻害剤 H-89 の効果

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +MK-4, レーン 4: +D-Asp, MK-4,

レーン 5: +H-89, レーン 6: +H-89, D-Asp, MK-4, レーン 7: +H-89, MK-4,

レーン 8: +H-89, D-Asp, MK-4,

*P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.005、 ****: P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

次に、MAPK カスケードである Rat sarcoma virus (Ras) /Rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf) /Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) /ERK (MAPK) において、Raf によりリン酸化を受けて活性化され、ERK をリン酸化する MEK の阻害薬である U0126 を用いて解析を行った。その結果、U0126 添加により D-Asp と MK-4 共存下におけるプロゲステロン産生量の増加が抑制された。また、アンドロステンジオン、テストステロンにおいても MK-4 単独添加、D-Asp と MK-4 共存下における産生量の増加が U0126 の存在下で抑制された (Fig. 14)。

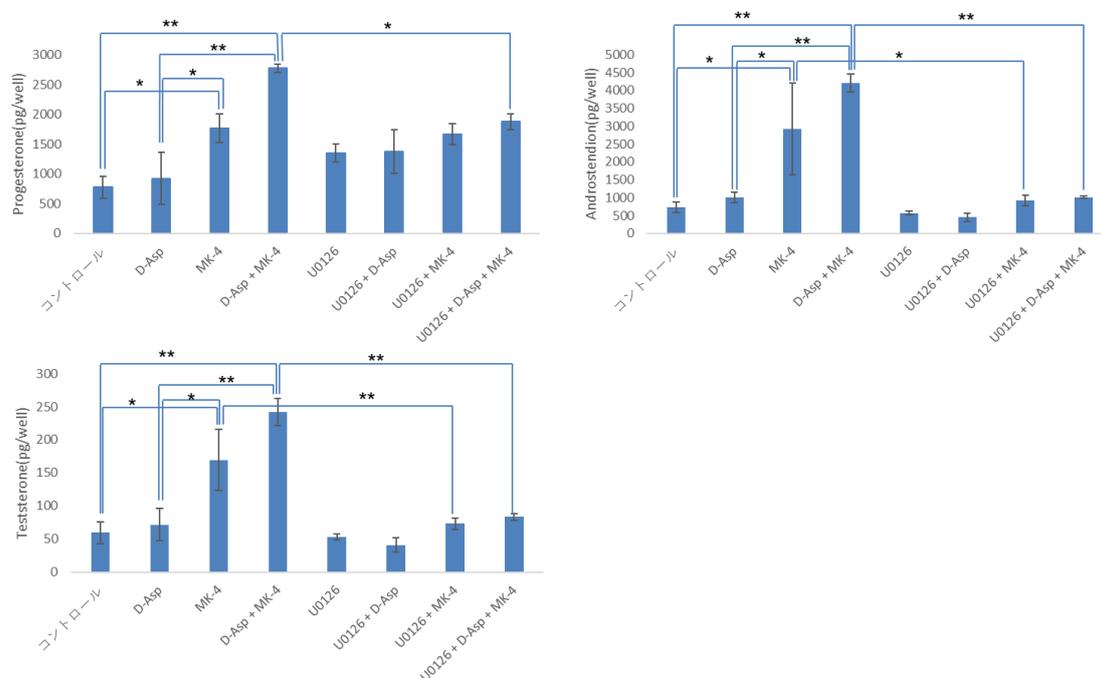


Fig. 14 I-10 細胞におけるD-Asp ならびに MK-4 によるステロイドホルモン産生促進に及ぼす MEK 阻害剤 U0126 の効果

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +MK-4, レーン 4: +D-Asp, MK-4,

レーン 5: +U0126, レーン 6: + U0126, D-Asp, MK-4, レーン 7: + U0126, MK-4,

レーン 8: + U0126, D-Asp, MK-4,

*P<0.05、**：P<0.01、***：P<0.005、****：P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

次に、D-Asp による MK-4 を介した各種ステロイドホルモン産生促進における NMDA 受容体の関与について調べる目的で、NMDA 受容体グルタミン酸結合部位の競合阻害薬である D-AP5 ならびに NMDA 受容体イオンチャネル阻害薬である MK801 を用いて解析を行ったところ、D-Asp と MK-4 共存下におけるプロゲステロン、アンドロステジオン、テストステロン産生量増加はいずれの阻害剤でも抑制されなかった (Fig. 15)。

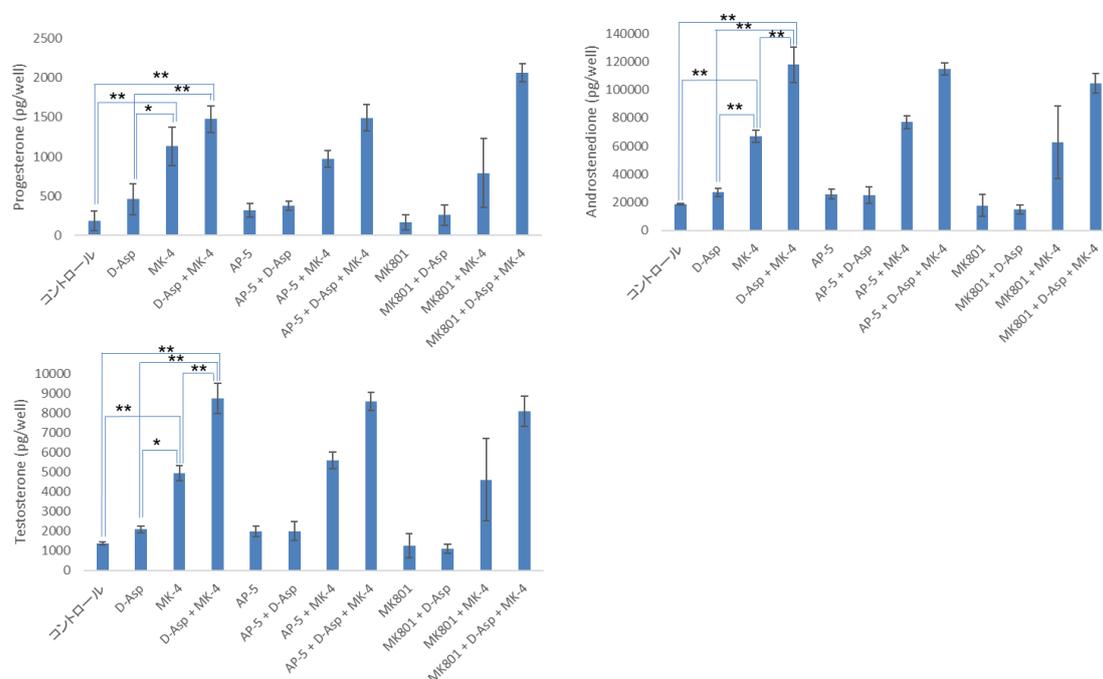


Fig. 15 I-10 細胞におけるD-Asp ならびに MK-4 によるステロイドホルモン産生促進に及ぼす NMDA 受容体阻害剤 D-AP5 ならびに MK801 の効果

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +MK-4, レーン 4: +D-Asp, MK-4,

レーン 5: +AP-5, レーン 6: +AP-5, D-Asp, レーン 7: +AP-5, MK-4,

レーン 8: +AP-5, D-Asp, MK-4, レーン 9: +MK801, レーン 10: + MK801, D-Asp,

レーン 11: + MK801, MK-4, レーン 12: + MK801, D-Asp, MK-4,

*P<0.05、**：P<0.01、***：P<0.005、****：P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

4-3-2 D-Asp による StAR mRNA ならびにタンパク質発現への影響と各種阻害剤の効果

I-10 細胞を用いて MK-4 存在下において D-Asp によるテストステロン産生の促進が確認できたことから、次にステロイドホルモン合成の律速因子である StAR の発現について、RT-PCR ならびにウエスタンブロットを用いて解析を行った。その結果、StAR mRNA 発現について、コントロールと比べて MK-4 単独添加で増加傾向を示し、D-Asp と MK-4 の共存下では有意な増加を示した (Fig. 16A)。次に、ウエスタンブロットを用いて StAR タンパク質発現を解析したところ、コントロールと比べて MK-4 単独添加ならびに D-Asp と MK-4 の共存下で有意な増加が見られた。また、D-Asp と MK-4 の共存下では MK-4 の単独添加に比べて増加傾向を示した (Fig. 16B)。

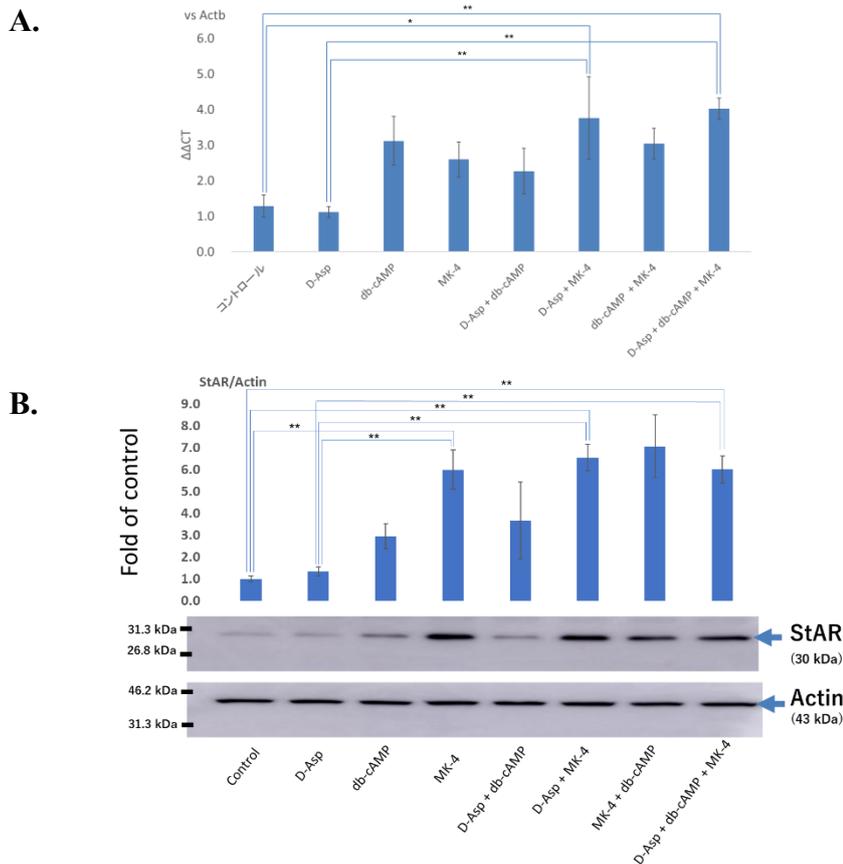


Fig. 16 各種化合物が I-10 細胞における StAR mRNA (A) ならびにタンパク質 (B) 発現へ及ぼす影響

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +db-cAMP, レーン 4: +MK-4,
 レーン 5: +D-Asp, db-cAMP, レーン 6: +D-Asp, MK-4, レーン 7: +db-cAMP, MK-4,
 レーン 8: +D-Asp, db-cAMP, MK-4,

*P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.005、 ****: P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

次に、PKA 阻害剤 H-89 を用いて、D-Asp による StAR mRNA ならびにタンパク質発現への影響について解析を行った。その結果、MK-4 単独添加ならびに D-Asp と MK-4 の共存下における StAR mRNA 発現の増加は H-89 の存在下で減少傾向となった (Fig. 17A)。また、StAR タンパク質発現についてウエスタンブロットを用いて解析したところ、MK-4 単独添加ならびに D-Asp と MK-4 の共存下における StAR タンパク質発現の増加は、H-89 の存在下で減少傾向となった (Fig. 17B)。

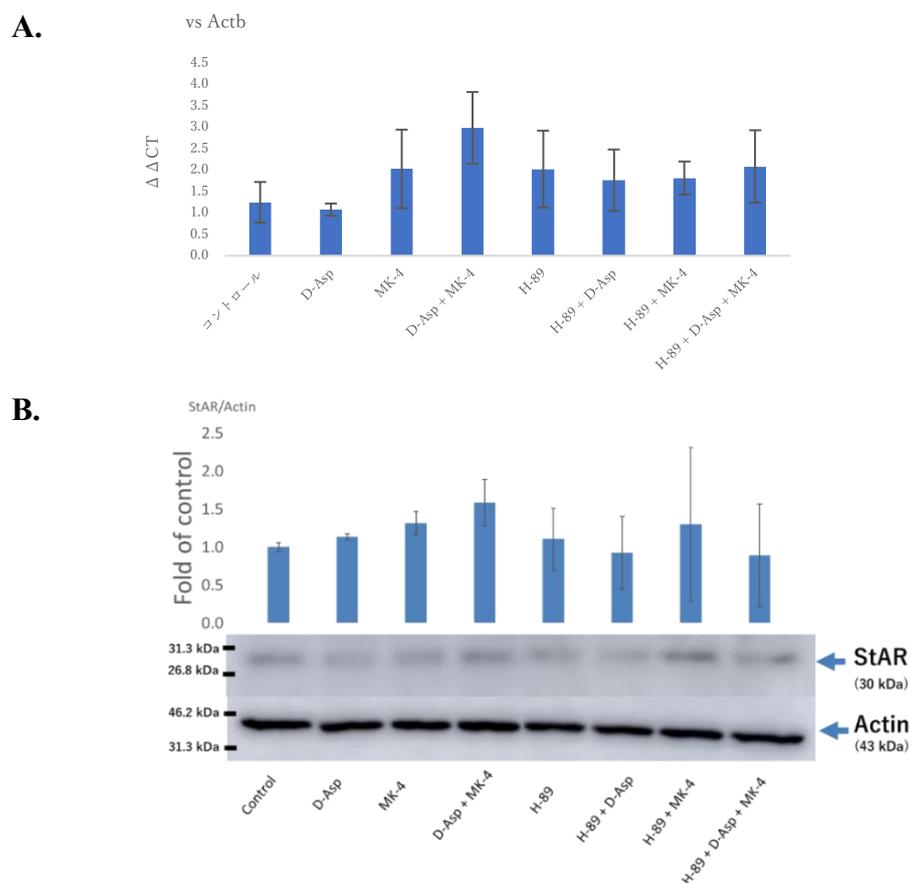


Fig. 17 I-10 細胞における D-Asp ならびに MK-4 による StAR mRNA (A) ならびにタンパク質 (B) 発現促進に及ぼす PKA 阻害剤 H-89 の効果

レーン 1: Control, レーン 2: +D-Asp, レーン 3: +MK-4, レーン 4: +D-Asp, MK-4,

レーン 5: +H-89, レーン 6: + H-89, D-Asp, レーン 7: + H-89, MK-4,

レーン 8: + H-89, D-Asp, MK-4,

*P<0.05、**：P<0.01、***：P<0.005、****：P<0.001 (n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

4-3-3 D-Asp による StAR promoter 活性への影響

D-Asp による StAR 遺伝子発現機構の解析を行う目的で、StAR promoter 領域に当たる翻訳開始点より上流約 2200 bp を luciferase reporter plasmid pGL4.10 の Firefly luciferase の翻訳開始点部位に合わせて組み込んだレポーター遺伝子を作成し、I-10 細胞に導入したのち、各種薬物を添加し、30 時間培養後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、プロモーター領域を挿入していない空ベクターを導入した I-10 細胞（ネガティブコントロール）と比較して、StAR promoter 領域を組み込んだレポーター遺伝子を導入した細胞では活性の上昇が確認できた (Fig. 18, 19)。

次に、MK-4 ならびに D-Asp の影響について調べたところ、StAR promoter を組み込んだレポーター遺伝子を導入した細胞では、コントロールと比較して D-Asp 単独添加ではプロモーター活性に変化が認められなかったものの、MK-4 単独添加でプロモーター活性が上昇し、D-Asp と MK-4 の共存下でさらにその活性が上昇することが確認できた (Fig. 19)。次に、D-Asp による StAR promoter 活性上昇に必要な領域を調べる目的で、promoter 領域を段階的に短くして再度解析を行ったところ、翻訳開始点から -1143 bp 上流～-1042 bp 上流の領域を欠損させると、コントロールと比較して、MK-4 単独でプロモーター活性の上昇が認められるが、D-Asp との同時添加では MK-4 単独添加と比較し有意な差が認められなくなった (Fig. 20)。

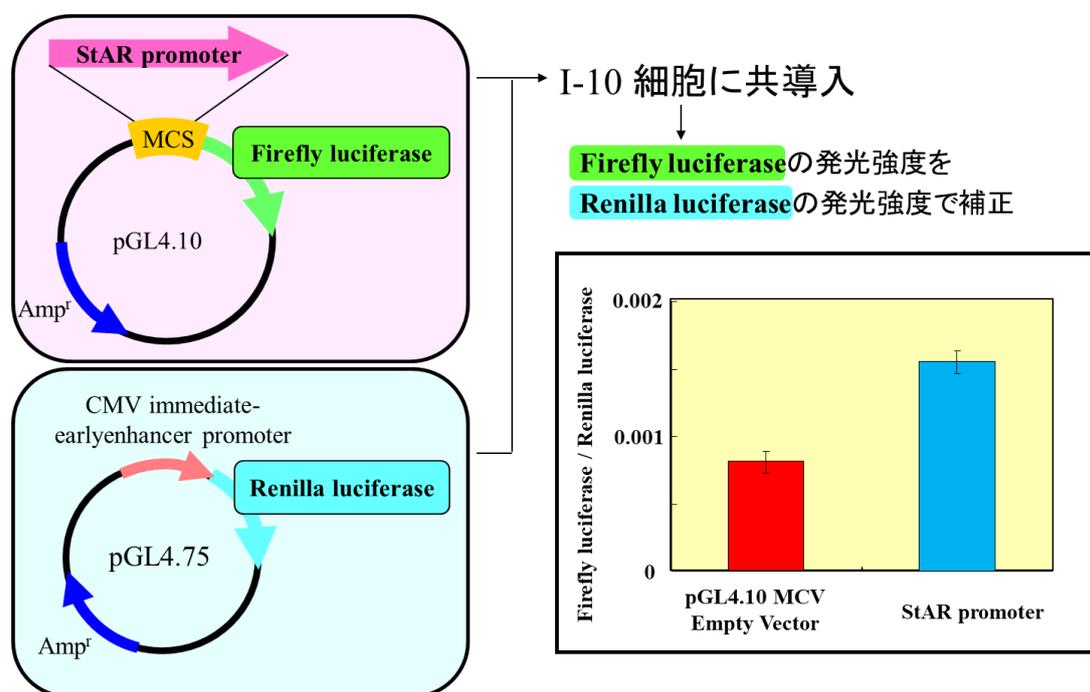


Fig. 18 StAR promoter reporter 遺伝子の構築と本 reporter 遺伝子を用いた活性測定法の開発

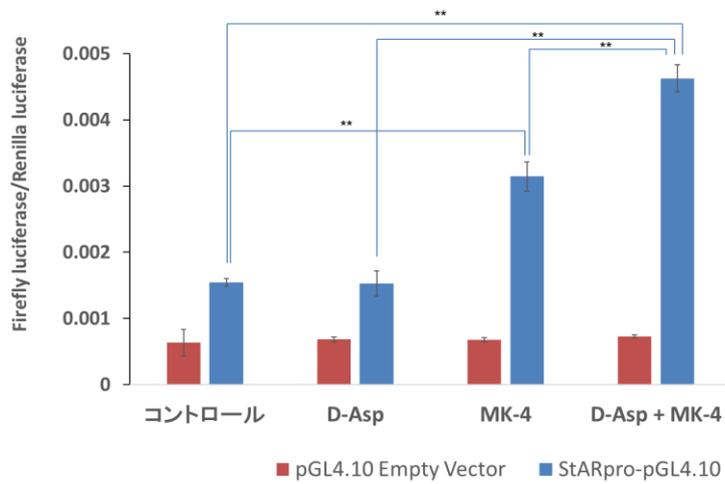


Fig. 19 StAR promoter 活性に及ぼす D-Asp ならびに MK-4 の影響

*P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.005、 ****: P<0.001

(n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

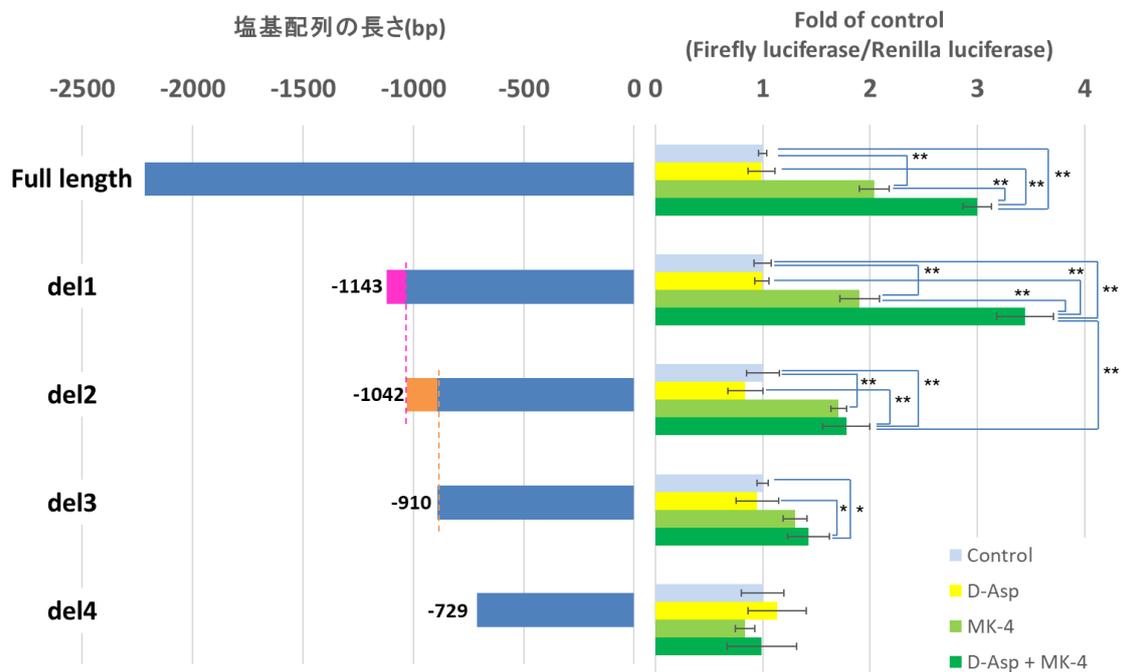


Fig. 20 StAR promoter 各種 deletion mutant の promoter 活性に及ぼす D-Asp ならびに MK-4 の影響

*: P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.005、 ****: P<0.001

(n=3, Average ± S.E., ANOVA, Tukey)

4-3-4 ゲルシフトアッセイを用いた StAR promoter 領域の解析結果

ルシフェラーゼアッセイの結果から重要であると考えられた領域に結合する因子を探索するために、ゲルシフトアッセイを行った。核抽出液を加えたものでは、コントロール、D-Asp、MK-4 でゲル上方に薄いバンドが確認され、D-Asp と MK-4 の共存下ではわずかに異なる位置に濃いバンドが確認できた (Fig. 21A)。ここで競合 DNA を添加したところ、①、②を添加したものでコントロールレベルまでバンドが薄くなった。また④の領域に対する競合 DNA を添加したものでは僅かにバンドが薄くなることが確認された (Fig. 20A)。①、②、④に対応する領域を新たに probe DNA として調製し、更なる解析を進めたところ、②の領域に D-Asp と MK-4 の共存下においてのみ特異的に結合する因子の存在が確認された (Fig. 21B)。

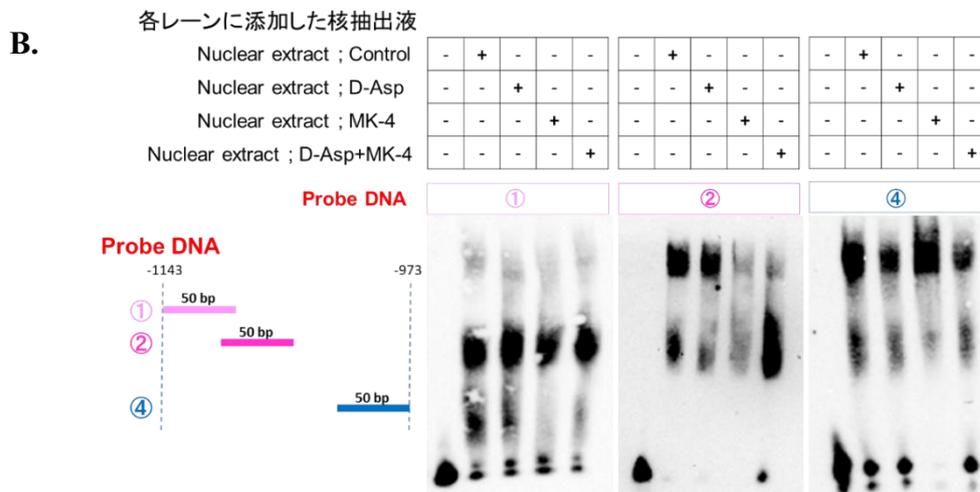
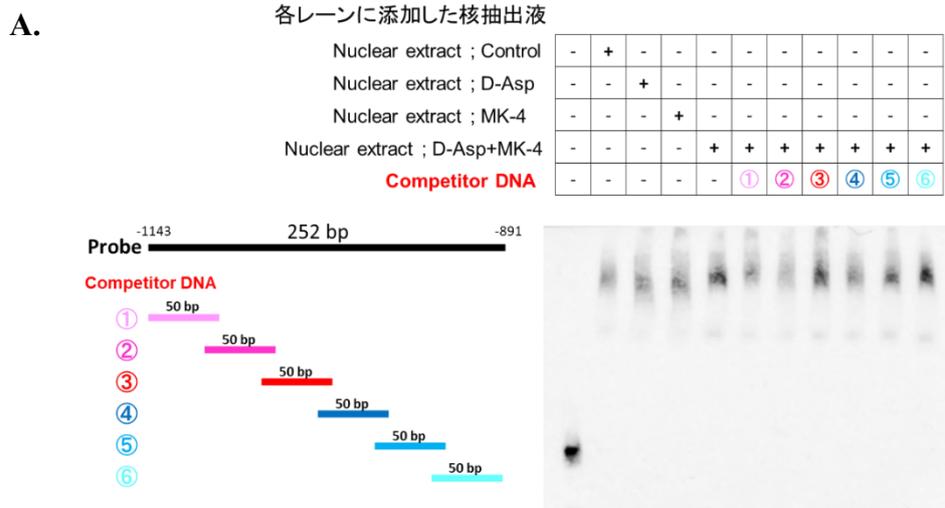


Fig. 21 ゲルシフトアッセイを用いての D-Asp と MK-4 の共存下 StAR promoter 領域に結合する因子の探索

(A) StAR promoter 領域 252bp (-1143~-891) を probe DNA として、probe DNA 内の異なる短い 6 つの領域各 50 bp (①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥) を競合 DNA として使用した。

(B) StAR promoter 領域 252bp (-1143~-891) 内の短い 3 つの領域 50 bp (①, ②, ④) を probe DNA として使用した。

第四節 考察

第四章では、第三章で確立した実験系を用いて、①D-Aspによる各種ステロイドホルモン産生促進機構に対する阻害剤の影響、②D-AspによるStAR発現に対する影響と阻害剤を用いた解析、③レポータージーンアッセイならびにゲルシフトアッセイを用いたD-AspによるStAR遺伝子の発現調節機構の解析を行った。

ラット Leydig 初代培養細胞を用いた解析で、D-Aspによるテストステロン産生促進作用はD-Aspの細胞内への取込みを阻害することで抑制されることが報告されている¹²。よってテストステロン生合成におけるD-Aspの作用点は細胞内であると考えられる。一方で、細胞膜上のNMDA受容体を刺激することによる効果であるとの報告もある⁷⁴。そこで、NMDA受容体拮抗薬を用いて解析を行った結果、I-10細胞におけるNMDA受容体の発現については不明であるものの、NMDA受容体はD-Aspによるステロイドホルモン産生促進機構に関与していないことが示唆された。次に、PKA阻害剤H-89を用いて解析したところ、MK-4単独添加ならびにD-AspとMK-4共存下における各種ステロイドホルモン産生量の増加は抑制された。このことから、I-10細胞におけるD-Aspによるテストステロン産生促進機構では、MK-4によるPKAの活性化が重要であることが考えられる。一方、MEK阻害剤U0126を用いた解析では、MK-4単独添加におけるアンドロステンジオンならびにテストステロン量の増加はU0126によって抑制されている。しかし、MK-4単独添加におけるプロゲステロン量の増加は抑制していない。このことから、プロゲステロンからアンドロステンジオンへ代謝するP450c17の発現はMEKの活性によって変化する可能性が考えられる。さらに、MK-4はMEKを活性化している可能性が考えられる。P450c17については解析していないものの、MK-4はMEKを活性化してP450c17の発現を促進していることが考えられる。

次にテストステロン生合成の律速因子であるStAR発現について、RT-PCRならびにウエスタンブロットを用いて解析を行った。その結果、StAR発現はコントロールと比較してD-AspとMK-4の共存下において増加することが明らかとなった (Fig. 16)。よって、I-10細胞におけるD-Aspによるテストステロン産生促進機構は、StAR発現の促進を介したものであると考えられる。さらに、PKA阻害剤H-89を用いて解析したところ、D-AspとMK-4共存下におけるStAR発現の促進作用は抑制傾向を示した。以上のことから、D-Aspによるテストステロン産生促進機構では、MK-4で活性化されたPKAによるStAR発現の促進が重要であると考えられる。

StARの発現量は転写調節因子によって制御されている。転写調節因子はDNAのプロモーター領域に結合し、mRNAへの転写を促進する。よって、D-AspによるStAR発現に対するメカニズムを解明するため、StAR promoter領域の解析を行った。まず、StAR promoter reporter 遺伝子を構築し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、StAR promoter 活性は、コントロールと比較してD-Asp単独添加ではプロモーター活性に変化が認められなかったが、MK-4単独添加でプロモーター活性が上昇し、D-AspとMK-4の

共存下でさらにその活性が上昇することが確認できた (Fig. 19)。また、翻訳開始点から -1143~-1042 bp 上流の promoter 領域を欠損させると、コントロールと比較して MK-4 単独でプロモーター活性の上昇が認められるが、D-Asp との同時添加では MK-4 単独添加と比較し有意な差が認められなくなった (Fig. 20)。これらの結果から、StAR promoter 領域に対する D-Asp の応答領域は、MK-4 の応答領域とは異なった領域であることが示唆された。よって、D-Asp は MK-4 とは異なった StAR promoter 領域に作用し、MK-4 と相乗的に StAR 発現を促進する可能性が示唆された。次に、D-Asp によって活性化される転写調節因子を探索するため、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、D-Asp によって活性化される転写因子を発見することはできなかったものの、StAR promoter 領域の -1103~-1053 bp の領域において、D-Asp と MK-4 の共存下においてのみ特異的に結合する因子の存在が示唆された (Fig. 21B)。当該領域には cAMP 応答配列 (CRE) は存在しない。データベースを用いた解析により結合する可能性のある転写因子を調べたところ、候補として Smad4 が挙げられた。Smad4 は I-10 細胞で発現しているかは不明であるものの、マウス精巣の Leydig 細胞において発現しており⁹²、D-Asp による StAR 発現調節機構を解析するうえでも重要な転写因子の一つである可能性も考えられる。この点については今後のさらなる解析に期待される。また、第三章の小緒言で述べたように、I-10 細胞において MK-4 は PKA の活性化を介して、その下流の CREB を活性化し、CYP11A1 の発現量を増加させることが報告されている^{64, 65, 66} (Fig. 8)。本研究では CYP11A1 について解析は行わなかったものの、D-Asp は CYP11A1 の promoter 領域に影響を及ぼしている可能性もある。

第五節 小括

I-10 細胞を用いて D-Asp によるテストステロン産生亢進機構を解析したところ、D-Asp は MK-4 の存在下で StAR 発現を促進し、テストステロン産生を増加させることを明らかにした。さらに、StAR promoter 領域に対する D-Asp の応答領域は MK-4 の応答領域とは異なった領域であることを明らかにした。このことから、D-Asp は MK-4 とは異なった StAR promoter 領域に作用し、MK-4 と相乗的に StAR 発現を促進することを明らかにした。今後、StAR promoter の -1103 ~ -1053 bp 領域に結合する転写因子を同定し、当該因子の活性化に及ぼす D-Asp の影響を解析することにより、D-Asp による StAR 発現調節機構の解明につながることが期待される。

総括

高齢男性のテストステロン分泌量減少による性腺機能の低下は、加齢性腺機能低下症候群（Late-onset hypogonadism; LOH 症候群）を引き起こし、生活の質（QOL）の低下につながる。テストステロン生合成を促進する分子の一つに D-Asp がある。D-Asp はラット Leydig 初代培養細胞において、StAR 発現の促進を介してテストステロン産生を促進させる^{6,7}。しかし、D-Asp による StAR 発現の促進機構についてはほとんど明らかになっていない。D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明は、これらテストステロンの関連疾患の解明につながることを期待される。

D-Asp による StAR 発現の促進を介したテストステロン産生促進作用について、これまでの研究報告では、ラット Leydig 初代培養系を用いたものがほとんどであり、株化された細胞ではほとんどない^{6,7}。D-Asp による StAR 発現の促進機構を解明するためには、目的遺伝子の機能や発現解析に有用な株化細胞を用いた実験系を確立する必要がある。株化細胞であるマウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いた解析では、MK-4 がプロテインキナーゼ A（PKA）を活性化することにより、テストステロン生合成酵素の発現を促進し、テストステロン産生を促進することが見出されている⁶⁴。以上のことから、D-Asp による StAR 発現促進機構を解明するため、I-10 細胞を用いた実験系の確立が有用である。

I-10 細胞を用いて D-Asp によるテストステロン産生亢進機構のより詳細な解析を行うため、細胞内 D-Asp 濃度調節機構も明らかにする必要がある。哺乳類の培養細胞における細胞内 D-Asp 濃度調節機構では、その生合成酵素アスパラギン酸ラセマーゼの存在は確認できていないものの、D-アスパラギン酸酸化酵素（D-Aspartate oxidase; DDO）による代謝²⁹、L-グルタミン酸トランスポーターを介した細胞内への取り込み^{30,31}、エキソサイトーシスによる細胞外（培地中）への放出によって調節されることが報告されている^{32,33}。そのため、細胞内 D-Asp 濃度調節機構の解析には細胞内ならびに培地中の D-Asp 量の測定が必要であり、また高感度かつ高選択的で簡便な測定法が望まれる。

D,L-アミノ酸の測定では、*o*-Phthalaldehyde（OPA）を用いた蛍光 HPLC 法や 2D-HPLC 法が汎用されている^{7,44,45}。OPA を用いた蛍光 HPLC 法で生体試料を測定した場合、生体試料由来の夾雑ピークの影響を受けやすいため、細胞や培地中の D,L-アミノ酸を測定するには多段階の前処理が必要となる。2D-HPLC 法では、長時間の測定が必要となるものの、適切なキラルカラムを選択することにより、特定のアミノ酸を選択的かつ高感度で測定することができる。しかし、装置が煩雑かつ非常に高価であり、また測定に経験を要する。そこで、生体試料中の D,L-アミノ酸を高感度かつ高選択的で簡便に測定するため、以前から確立を試みていたキラル誘導体化 LC/MS/MS 法が有用である。

本研究では D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明を目的とした。第一章では FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて生体試料中の D,L-アミノ酸を測定するため、検量線

を作成し、直線性や定量限界、精度、回収率について解析し、分析法の評価（バリデーション）を行った。第二章では、第一章で確立した本測定法を用いて、これまで D-アミノ酸が検出されていない HepG2 細胞、I-10 細胞の細胞内及び培地中の D,L-アミノ酸を測定し、細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構を解明するために有用な測定方法であるか検討した。第三章では、D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明に有用な株化細胞を用いた実験系を確立するため、LC/MS/MS によるステロイドホルモンの測定法を確立し、本測定法を用いてマウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞における各種ステロイドホルモン産生への D-Asp の影響について解析した。第四章では、D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明を目的とし、第三章で確立した実験系を用いて、D-Asp による StAR 遺伝子の発現調節機構の解析を行った。以下、本研究で得られた知見を各章ごとに総括する。

第一章

第一章では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法のバリデーションを行ったところ、D-Asp と D-Ser について、検量線は良好な直線性を示し、定量限界はそれぞれ 174.5 pM、36.3 pM であることが明らかとなった。よって、D-Asp と D-Ser は 174.5 pM、36.3 pM 以上の濃度で定量が可能であることを示した。また、日内日間変動試験では 5 μ M 以上で精度良く測定できることを示し、添加回収試験では 4 μ M でも良好な回収率を得ることができた。よって、本測定法は生体試料中の D-Asp ならびに D-Ser を定量することが可能であると考えられる。以上のことから、本測定法は生体試料中の D-Ser ならびに D-Asp を簡便かつ効率的に定量するために有用であり、D-Asp の細胞内濃度調節機構や生理機能の解析に利用可能な測定法であると考えられる。

第二章

第二章では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて HepG2 細胞、I-10 細胞の細胞内及び培地中の D,L-アミノ酸を測定したところ、I-10 細胞では D-アミノ酸が検出されなかったものの、HepG2 細胞において D-Asp、D-Ser を検出することができた。さらに、HepG2 細胞において、D-Asp が DDO によって代謝されている可能性やアスパラギン酸ラセマーゼによって生合成されている可能性が示唆された。よって本測定法を用いることにより、細胞内 D-Asp 濃度調節機構を解析することが可能であることを示した。つまり、新たな D-Asp 産生細胞の同定とその細胞における細胞内 D-Asp 濃度調節機構、ならびに、D-Asp の標的細胞である Leydig 細胞における細胞内 D-Asp の局在について解析することで、D-Asp を介した臓器間ネットワークやテストステロン産生促進機構の解明へとつながることが期待される。

第三章

第三章では、LC/MS/MS による各種ステロイドホルモンの測定法を確立し、本測定法を用いて I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生亢進を解析することが可能とな

った。本実験系を用いた解析により、I-10細胞において、D-AspがMK-4存在下でテストステロン産生を促進していることを明らかにした。また、第二章で確立したFDLA誘導体化LC/MS/MS法を用いてD-Asp量を解析したところ、I-10細胞にD-Aspを添加した場合、細胞内にD-Aspが取り込まれることが明らかとなった。これらの結果は、ラットLeydig初代培養細胞を用いた報告と矛盾しない。以上の結果から、株化細胞であるI-10細胞を用いた解析可能な実験系を確立することができた。今後は、本実験系を用いることにより、初代培養細胞では困難である分子細胞生物学的な解析が可能となり、D-AspによるStAR発現促進機構のより詳細な解明につながると考えられる。

第四章

第四章では、第三章で確立した実験系を用いて、D-AspによるStAR遺伝子の発現調節機構の解析を行った結果、D-AspはMK-4の存在下でStAR発現を促進し、テストステロン産生を増加させることが明らかとなった。さらに、StAR promoter領域に対するD-Aspの応答領域はMK-4の応答領域とは異なった領域であることが明らかとなった。以上の結果から、D-AspはMK-4とは異なったStAR promoter領域に作用し、StAR遺伝子の発現を促進することを明らかにした。今後、StAR promoter上のD-Asp応答領域に結合する転写因子を同定し、当該因子の活性化に及ぼすD-Aspの影響を解析することにより、D-AspによるStAR発現調節機構の解明につながることが期待される。

以上、本研究では、FDLA誘導体化LC/MS/MS法を用いることにより、これまでD-アミノ酸が検出されてこなかった細胞株におけるD-Aspの検出、細胞内濃度調節機構の解析を可能にし、さらにマウス精巣腫瘍Leydig由来I-10細胞を用いることで、D-Aspによるテストステロン産生促進機構の解明に貢献できることを示した。よって、これらの研究のさらなる進展により、D-Aspの細胞内濃度調節機構ならびテストステロン産生促進機構を解明することができると考えられる。そして、テストステロン分泌量の低下によって引き起こされるLOH症候群の病態解明や治療法の確立、高齢男性のQOL向上につながることが期待できる。

謝辞

本研究に際し、主研究指導員としてご指導ご鞭撻を受け賜りました城西大学薬学研究科生体分析化学講座教授 古地壯光 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、実験のご指導やご助言を賜りました城西大学薬学研究科生体分析化学講座准教授 植村武史 先生に深甚なる謝意を表します。

本論文作成、学位論文審査にあたり、ご教授とご校閲賜りました城西大学薬学研究科有機薬化学講座教授 山ノ井孝 先生、城西大学薬学研究科薬物治療学講座教授 宮本嘉明 先生、城西大学薬科学研究科生物有機化学講座教授 杉田義昭 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を賜りました城西大学薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎真理 先生、城西大学薬学研究科栄養治療学教授 井上裕 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご支援、ご協力頂きました城西大学薬学部生体分析化学研究室学生諸氏に心より感謝いたします。

最後に、博士課程へ進学する機会を与えてくれた両親、祖父母に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) 総務省, 人口推計, 令和 3 年 10 月 1 日
- 2) 厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業) 「高齢者に対する適切な医療提供に関する研究」研究班, 高齢者に対する適切な医療提供の指針, 日老医誌, 51, 89-96, 2014
- 3) Nieschlag E., Swerdloff R., Behre H.M., Gooren L.J., Kaufman J.M., Legros J.-J., Lunenfeld B., Morley J.E., Schulman C., Wang C., Weidner W., Wu F.C.W., Investigation, Treatment, and Monitoring of Late-Onset Hypogonadism in Males, ISA, ISSAM, and EAU Recommendations, *J. Androl.*, 27 (2), 135-137, 2006
- 4) Üçer O., Gümüő B., The treatment of late-onset hypogonadism, *Turk. J. Urol.*, 40 (3), 170-179, 2014
- 5) Kaufman J.-M., Diagnosis of hypogonadism in ageing men, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23 (6), 1139-1150, 2022
- 6) Di Fiore M.M., Santillo A., Falvo S., Longobardi S., Chieffi Baccari G., Molecular Mechanisms Elicited by d-Aspartate in Leydig Cells and Spermatogonia, *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (7), 1127, 2016
- 7) 本間 浩, 哺乳類体内の遊離型 D-アスパラギン酸の振舞いと機能, 生化学, 第 80 巻, 第 4 号, 277-286, 2008
- 8) 浜瀬健司, 財津潔, 哺乳類体内微量 D-アミノ酸の選択的分析法の開発, *BUNSEKI KAGAKU*, 53, 7, 677-690, 2004
- 9) 武田テバファーマ株式会社, レボセチリジン, 医薬品インタビューフォーム
- 10) Takigawa Y., Homma H., Lee J.-A., Fukushima T., Santa T., Iwatsubo T., Imai K., D-aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248 (3), 641-647, 1998
- 11) Ishio S., Yamada H., Hayashi M., Yatsushiro S., Noumi T., Yamaguchi A., Moriyama Y., D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes, *Neurosci. Lett.*, 249 (2-3), 143-146, 1998
- 12) Long Z., Lee J.-A., Okamoto T., Nimura N., Imai K., Homma H., D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH3), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276 (3), 1143-1147, 2000
- 13) D'Aniello G., Tolino A., D'Aniello A., Errico F., Fisher G. H., Di Fiore M.M., The role of D-aspartic acid and *N*-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release, *Endocrinology*, 141 (10), 3862-3870, 2000
- 14) Wang H., Wolosker H., Pevsner J., Snyder S.H., Selkoe D.J., Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring

- free D-amino acid in mammals, *J. Endocrinol.*, 167 (2), 247-252, 2000
- 15) Nagata Y., Homma H., Lee J.-A., Imai K., D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells, *FEBS Lett.*, 444 (2-3), 160-164, 1999
 - 16) D'Aniello A., Di Cosmo A., Di Cristo C., Annunziato L., Petrucelli L., Fisher G., Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes, *Life Sci.*, 59 (2), 97-104, 1996
 - 17) Nagata Y., Homma H., Matsumoto M., Imai K., Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by d-aspartate in rat Leydig cells, *FEBS Lett.*, 454 (3), 317-320, 1999
 - 18) Dunlop D.S., Neidle A., McHale D., Dunlop D.M., Lajtha A., The presence of free D-aspartic acid in rodents and man, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141 (1), 27-32, 1986
 - 19) Hashimoto A., Nishikawa T., Hayashi T., Fujii N., Harada K., Oka T., & Takahashi K., The presence of free D-serine in rat brain, *FEBS Lett.*, 296 (1), 33-36, 1992
 - 20) Matsui T., Sekiguchi M., Hashimoto A., Tomita U., Nishikawa T., Wada K., Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration, *J. Neurochem.*, 65 (1), 454-458, 1995
 - 21) Oliet S.H.R., Mothet J.-P., Regulation of *N*-methyl-d-aspartate receptors by astrocytic d-serine, *Neuroscience*, 158 (1), 275-283, 2009
 - 22) Wolosker H., Blackshaw S., Snyder S.H., Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-*N*-methyl-D-aspartate neurotransmission, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (23), 13409-13414, 1999
 - 23) Hashimoto A., Nishikawa T., Konno R., Niwa A., Yasumura Y., Oka T., Takahashi K., Free d-serine, d-aspartate and d-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking d-amino acid oxidase, *Neurosci. Lett.*, 152 (1-2), 33-36, 1993
 - 24) Ishiwata S., Ogata S., Umino A., Shiraku H., Ohashi Y., Kajii Y., Nishikawa T., Increasing effects of S-methyl-L-cysteine on the extracellular D-serine concentrations in the rat medial frontal cortex, *Amino acid*, 44 (5), 1391-1395, 2013
 - 25) Kaplan E., Zubedat S., Radziszewsky I., Valenta A.C., Rechnitz O., Sason H., Sajrawi C., Bodner O., Konno K., Esaki K., Derdikman D., Yoshikawa T., Watanabe M., Kennedy R.T., Billard J.-M., Avital A., Wolosker H., ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 115 (38), 9628-9633, 2018
 - 26) Hayashi F., Takahashi K., Nishikawa T., Uptake of D- and L-serine in C6 glioma cells, *Neurosci. Lett.*, 239 (2-3), 85-88, 1997
 - 27) Inoue R., Hashimoto K., Harai T., Mori H., NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice, *J. Neurosci.*, 28 (53), 14486-14491, 2008
 - 28) Labrie V., Fukumura R., Rastogi A., Fick L.J., Wang W., Boutros P.C., Kennedy J.L., Semeralul

- M.O., Lee F.H., Baker G.B., Belsham D.D., Barger S.W., Gondo Y., Wong A.H.C., Order J.C., Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model, *Mol. Genet.*, 18 (17), 3227-3243, 2009
- 29) Still J.L., Buell M.V., Knox W.E., Green D.E., Studies on the cyclophorase system: D-aspartic oxidase, *J. Biol. Chem.*, 179 (2), 831-837, 1949
- 30) Adachi M., Koyama H., Long Z., Sekine M., Furuchi T., Imai K., Nimura N., Shimamoto K., Nakajima T., Homma H., L-Glutamate in the extracellular space regulates endogenous D-aspartate homeostasis in rat pheochromocytoma MPT1 cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 424 (1), 89-96, 2004
- 31) Koyama H., Sekine M., Furuchi T., Katane M., Nimura N., Shimamoto K., Nakajima T., Homma H., A novel L-glutamate transporter inhibitor reveals endogenous D-aspartate homeostasis in rat pheochromocytoma MPT1 cells, *Life Sci.*, 76 (25), 2933-2944, 2005
- 32) Nakatsuka S., Hayashi M., Muroyama A., Otsuka M., Kozaki S., Yamada H., Moriyama Y., D-Aspartate is stored in secretory granules and released through a Ca²⁺-dependent pathway in a subset of rat pheochromocytoma PC12 cells, *J. Biol. Chem.*, 276 (28), 26589-26596, 2001
- 33) Long Z., Sekine M., Nimura N., Lee J.-A., Imai K., Iwatsubo T., Homma H., Immunocytochemical study of D-aspartate in the 2068 rat pheochromocytoma cell line, *Bioimages*, 9 (2), 61-67, 2001
- 34) Matsuda S., Katane M., Maeda K., Kaneko Y., Saitoh Y., Miyamoto T., Sekine M., Homma H., Biosynthesis of D-aspartate in mammals: the rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of D-aspartate, *Amino Acids*, 47 (5), 975-985, 2015
- 35) Wolosker H., D'Aniello A., Snyder S.H., D-Aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release, *Neuroscience*, 100 (1), 183-189, 2000
- 36) Hamase K., Morikawa A., Zaitso K., D-Amino acids in mammals and their diagnostic value, *J. Chromatogr. B*, 781 (1-2), 73-91, 2002
- 37) Long Z., Nimura N., Adachi M., Sekine M., Hanai T., Kubo H., Homma H., Determination of D- and L-aspartate in cell culturing medium, within cells of MPT1 cell line and in rat blood by a column-switching high-performance liquid chromatographic method, *J. Chromatogr. B*, 761 (1), 99-106, 2001
- 38) Reischl R.J., Lindner W., Methoxyquinoline labeling-A new strategy for the enantioseparation of all chiral proteinogenic amino acids in 1-dimensional liquid chromatography using fluorescence and tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 1269, 262-269, 2012
- 39) Harada K., Fujii K., Hayashi K., Suzuki M., Ikai Y., Oka H., Application of D,L-FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method, *Tetrahedron Lett.*, 37, 3001-3004, 1996

- 40) Sakamoto T., Kuwabara R., Takahashi S., Onozato M., Ichiba H., Iizuka H., Fukushima T., Determination of d-serine in human serum by LC-MS/MS using a triazole-bonded column after pre-column derivatization with (*S*)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408 (2), 517-526, 2016
- 41) Yokoyama T., Tokuda M., Amano M., Mikami K., Simultaneous determination of primary and secondary d- and l-amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with two-step labelling method, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81 (9), 1681-1686, 2017
- 42) Miller K.J., Gal J., Ames M.M., High-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers of 1-phenyl-2-aminopropanes (amphetamines) with four chiral reagents, *J. Chromatogr. B*, 307 (2), 335-342, 1984
- 43) Xie Y., Alexander G.M., Schwartzman R.J., Singh N., Torjman M.C., Goldberg M.E., Wainer I.W., Moaddel R., Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for the determination of d-serine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 89, 1-5, 2014
- 44) Hamase K., Homma H., Takigawa Y., Fukushima T., Santa T., Imai K., Regional distribution and postnatal changes of d-amino acids in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1334 (2-3), 214-222, 1997
- 45) Miyoshi Y., Nagano M., Ishigo S., Ito Y., Hashiguchi K., Hishida N., Mita M., Lindner W., Hamase K., Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes, *J. Chromatogr. B*, 966, 187-192, 2014
- 46) Marfey P., Determination of d-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene, *Carlsberg. Res. Commun.*, 49, 591-596, 1984
- 47) Fujii K., Ikai Y., Mayumi T., Oka H., Suzuki M., Harada K., A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism, *Anal. Chem.*, 69, 3346-3352, 1997
- 48) Bhushan R., Brückner H., Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review, *Amino Acids*, 27 (3-4), 231-247, 2004
- 49) Bhushan R., Vashistha V.K., Synthesis of variants of Marfey's reagent having d-amino acids as chiral auxiliaries and liquid chromatographic enantioseparation of (*RS*)-Mexiletine in spiked plasma: assessment and comparison with l-amino acid analogs, *J. Chromatogr. A*, 1379, 43-50, 2015
- 50) Kobayashi M., Takano Y., Takishima H., Sakaitani S., Niitsu M., Furuchi T., Simplification of FDLA Pre-Column Derivatization for LC/MS/MS Toward Separation and Detection of d,l-Amino Acids, *Chromatographia*, 82, 705-708, 2019
- 51) Marr A.G., Wilson P.W., The alanine racemase of *Brucella abortus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49

- (2), 424-433, 1954
- 52) Soda K., Yorifuji T., Ogata K., Occurrence of arginine racemase in bacterial extract, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (2), 606-608, 1967
- 53) Arias C.A., Martín-Martínez M., Blundell T.L., Arthur M., Courvalin P., Reynolds P. E., Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174, *Mol. Microbiol.*, 31 (6), 1653-1664, 1999
- 54) Shibata K., Watanabe T., Yoshikawa H., Abe K., Takahashi S., Kera Y., Yamada R., Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*, *Comp. Biochem. Physiol. B*, 134 (2), 307-314, 2003
- 55) Wang L., Ota N., Romanova E.V., Romanova E.V., Sweedler E.V., A novel pyridoxal 5'-phosphate-dependent amino acid racemase in the *Aplysia californica* central nervous system, *J. Biol. Chem.*, 286 (15), 13765-13774, 2011
- 56) Lamont H.C., Staudenbauer W.L., Strominger J.L., Partial purification and characterization of an aspartate racemase from *Streptococcus faecalis*, *J. Biol. Chem.*, 247 (16), 5103-5106, 1972
- 57) Diven W.F., Studies on amino acid racemases. II. Purification and properties of the glutamate racemase from *Lactobacillus fermenti*, *Biochim. Biophys. Acta*, 191 (3), 702-706, 1969
- 58) Cardinale G.J., Abeles R.H., Purification and mechanism of action of proline racemase, *Biochemistry*, 7 (11), 3970-3978, 1968
- 59) Sasabe J., Miyoshi Y., Seth Rakoff-Nahoum, Ting Zhang, M. Mita, Brigid M. Davis, Hamase K., Matthew K., Waldor, Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defense and gut microbiota, *Nat. Microbiol.*, 1 (10), 16125-16142, 2016
- 60) Furuchi T., Suzuki T., Sekine M., Katane M., Homma H., Apoptotic inducers activate the release of D-aspartate through a hypotonic stimulus-triggered mechanism in PC12 cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 490 (2), 118-128, 2009
- 61) Long Z., Homma H., Lee J.-A., Fukushima T., Santa T., Iwatsubo T., Yamada R., Imai K., Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells, *FEBS Lett.*, 434 (3), 231-235, 1998
- 62) Matsuda S., Katane M., Maeda K., Kaneko Y., Saitoh Y., Miyamoto T., Sekine M., Homma H., Biosynthesis of D-aspartate in mammals: the rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of D-aspartate, *Amino Acid*, 47 (5), 975-985, 2015
- 63) Ito T., Hayashida M., Kobayashi S., Muto N., Hayashi A., Yoshimura T, Mori H., Serine racemase is involved in D-aspartate biosynthesis, *J. Biochem.*, 160 (6), 345-353, 2016
- 64) Ito A., Shirakawa H., Takumi N., Minegishi Y., Ohashi A., Howlader ZH, Ohsaki Y., Sato T., Goto T., Komai M., Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived

- tumor cells, *Lipids in Health and Disease*, 10, 158-166, 2011
- 65) Shirakawa H., Ohsaki Y., Minegishi Y., Takumi N., Ohinata K., Furukawa Y., Mizutani T., Komai M., Vitamin K deficiency reduces testosterone production in the testis through down-regulation of the Cyp11a, a cholesterol side chain cleavage enzyme in rats, *B.B.A.-General Subjects*, 1760 (10), 1482-1488, 2006
 - 66) Takumi N., Shirakawa H., Ohsaki Y., Ito A., Watanabe T., Giriwono P.E., Sato T., Komai M., Dietary vitamin K alleviates the reduction in testosterone production induced by lipopolysaccharide administration in rat testis, *Food & Function*, 2 (7), 406-41, 2011
 - 67) Papadopoulos V., Miller W.L., Role of mitochondria in steroidogenesis, *Best Practice Res Clin Endocrinol. Metab.*, 26 (6), 771-790, 2012
 - 68) Clark B.J., Wells J., King S.R., Stocco D.M., The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Biol. Chem.*, 269 (45), 28314-28322, 1994
 - 69) Clark B. J., ACTH action on StAR biology, *Front. Neurosci.*, 10, 547-553, 2016
 - 70) Miller W.L., Bose H.S., Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking, *J. Lipid Res.*, 52 (12), 2111-2135, 2011
 - 71) Rone M.B., Midzak A.S., Issop L., Rammouz G., Jagannathan S., Fan J., Ye X., Blonder J., Veenstra T., Papadopoulos V., Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones, *Mol. Endocrinol.*, 26 (11), 1868-1882, 2012
 - 72) Miller W.L., Auchus R.J., The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders, *Endocr. Rev.*, 32 (1), 81-151, 2011
 - 73) Payne A.H., Hales D.B., Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.*, 25 (6), 947-970, 2004
 - 74) Santillo A., Falvo S., Chieffi P., Burrone L., Baccari G.C., Longobardi S., Di Fiore M.M., D-aspartate affects NMDA receptor-extracellular signal-regulated kinase pathway and upregulates androgen receptor expression in the rat testis, *Theriogenology*, 81 (5), 744-751, 2014
 - 75) Sugawara T., Kiriakidou M., McAllister J.M., Kallen C.B., Strauss JF III, Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness, *Biochemistry*, 36 (23), 7249-7255, 1997
 - 76) Sugawara T., Saito M., Fujimoto S., Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression, *Endocrinology*, 141 (8), 2895-2903, 2000
 - 77) Rust W., Stedronsky K., Tillmann G., Morley S., Walther N., Ivell R., The role of SF-1/Ad4BP

- in the control of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, *J. Mol. Endocrinol.*, 21 (2), 189-200, 1998
- 78) Reinhart A.J., Williams S.C., Clark B.J., Stocco D.M., SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter, *Mol. Endocrinol.*, 13 (5), 729-741, 1999
 - 79) Wooton-Kee C.R., Clark B.J., Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene, *Endocrinology*, 141 (4), 1345-1355, 2000
 - 80) Christenson L.K., Johnson P.F., McAllister J.M., Strauss J.F. III, CCAAT/enhancer-binding proteins regulate expression of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene, *J. Biol. Chem.*, 274 (37), 26591-26598, 1999
 - 81) Silverman E., Eimerl S., Orly J., CCAAT enhancerbinding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells, *J. Biol. Chem.*, 274 (25), 17987-17996, 1999
 - 82) Tremblay J.J., Hamel F., Viger R.S., Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity, *Endocrinology*, 143 (10), 3935-3945, 2002
 - 83) Manna P.R., Dyson M.T., Eubank D.W., Clark B.J., Lalli E., Sassone-Corsi P., Zeleznik A.J., Stocco D.M., Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family, *Mol. Endocrinol.*, 16 (1), 184-199, 2002
 - 84) Manna P.R., Eubank D.W., Lalli E., Sassone-Corsi P., Stocco D.M., Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1, *J. Mol. Endocrinol.*, 30 (3), 381-397, 2003
 - 85) Stocco D.M., Wang X., Jo Y., Manna P.R., Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: More complicated than we thought, *Mol. Endocrinol.*, 19 (11), 2647-2659, 2005
 - 86) Dufau M. L., Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell, *Annu. Rev. Physiol.*, 50, 483-508, 1988
 - 87) Manna P. R., Dyson M. T., Eubank D. W., Clark B. J., Lalli E., Sasson-Corsi P., Zeleznik A. J., Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family, *Mol. Endocrinol.*, 16 (1), 184-199, 2002
 - 88) Zirkin B.R., Papadopoulos V., Leydig cells: Formation, function, and regulation, *Biol. Reprod.*, 99 (1), 101-111, 2018
 - 89) Stocco D.M., Clark B.J., Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, *Endocr. Rev.*, 17 (3), 221-244, 1996

- 90) Hasegawa T., Zhao L., Caron K.M., Majdic G., Suzuki T., Shizawa S., Sasano H., Parker K.L., Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice, *Mol. Endocrinol.*, 14 (9), 1462-1471, 2000
- 91) Stocco D.M., Clark B.J., The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis, *Steroids*, 62 (1), 29-36, 1997
- 92) Archambeault D.R., Yao H.H., Loss of smad4 in Sertoli and Leydig cells leads to testicular dysgenesis and hemorrhagic tumor formation in mice, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 90 (3), 62, 1-10, 2014