

Award Accounts

第3回 D-アミノ酸学会奨励賞

乳酸菌の D-アミノ酸生産と 新規アミノ酸異性化酵素の同定

牟田口 祐太

秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科

1.はじめに

食品中のアミノ酸は栄養成分、呈味性・香気成分として、栄養学・食品学において古くから膨大な研究がなされてきた。しかし、これらの研究の殆どは L-アミノ酸を対象として行われ、D-アミノ酸は殆ど注目されてこなかった。その理由として、自然界に存在する D-アミノ酸の量が希少であると考えられていたことに加え、D型とL型のアミノ酸の分離分析が困難であったことが挙げられる。ところが、D-アミノ酸分析技術の進歩に伴い、多くの食品に様々な D-アミノ酸が遊離や結合状態で見つかり、私達は日常的に D-アミノ酸を食品から摂取していることが明らかとなった^(1,2)。さらに、ヒトを含む哺乳類において、D-セリン (D-Ser) や D-アスパラギン酸 (D-Asp) といった遊離 D-アミノ酸が重要な生理的機能を担うことが分かってきており、ヒトの健康と D-アミノ酸の関係について盛んに研究が行われている。この近年の D-アミノ酸研究の進展の中で、食品における D-アミノ酸の機能が注目されている。そこで、我々は D-アミノ酸の食品機能を向上した新規食品の開発・実用化への展開を図ることを主な目的として、様々な発酵食品と発酵微生物における D-アミノ酸含量と動態の解析、D-アミノ

酸代謝関与酵素の生化学的機能と制御機構の解析などに取り組んできた。本稿では、まず D-アミノ酸に期待される食品機能について簡単に紹介した後、我々の研究で見出された発酵食品中 D-アミノ酸と乳酸菌の関係、乳酸菌から同定された新規アミノ酸異性化酵素について紹介する。

2. D-アミノ酸の食品機能

2.1 第二次機能（呈味性、保存性、香気性などの機能）

タンパク質構成アミノ酸の L型と D型ではそれぞれ異なる味を呈することが以前から知られている。例えば、D-アラニン (D-Ala)、D-フェニルアラニン (D-Phe)、D-トリプトファン (D-Trp) などはそれらの L型アミノ酸とは異なり、かなり強い甘味性を持つことが知られている^(3,4)。D-アミノ酸の甘味が食品の呈味性にどの程度関与しているかについては、まだ研究が必要な分野であるが、D-アミノ酸が実際に食品の味に影響を与えている可能性を示唆する例も報告されている。老川らのグループは 141 種類の日本酒について D-及び L-アミノ酸の濃度分析を行い、D-Ala、D-Asp、D-グルタミン酸 (D-Glu) が含まれている日本酒では官能評価試験において好評価が得られることを明らかにしている⁽⁵⁾。また、キリン協和フーズ

株式会社は D-Ala を強化することで、熟成によって生じる独特の旨味を再現できるとし、新しい食品調味料（こく味調味料）を 2013 年に販売している。

2.2 第三次機能（健康維持・改善、老化防止などの機能）

食品の D-アミノ酸に期待される第三次機能として、まず D-Asp の美容効果が挙げられる。ヒト皮膚の角層には遊離の D-Asp が存在し、コラーゲン産生促進作用と抗酸化作用を示すことが報告されている。この角層の D-Asp は D-Asp を多く含む食品（食酢）を 2 ヶ月間毎日摂取することで有意に増加し、角層水分量も有意に増加することが確認されている⁽⁶⁾。また、D-Asp には生殖機能の維持や改善の効果がある可能性が示唆されている。D-Asp はヒトの精巣に局在しているが、奇形精子症患者では精子・精漿中の D-Asp 量が低下していることが報告されている⁽⁷⁾。そして、ウサギでの実験ではあるが、DL-Asp を食餌に混入して与えた場合、精漿中の D-Asp 濃度が一過的に大きく上昇することに加え、運動能を有する精子の割合や精子の運動速度が有意に上昇することが報告されている⁽⁸⁾。

D-Ser は哺乳類脳内に存在し、記憶や学習等の脳の高次機能に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型受容体のコアゴニストとして機能する。NMDA 型受容体の機能低下と統合失調症の関連が示唆されたことから、脳脊髄液や血清中の D-Ser と統合失調症と関係が研究されている。その中で、統合失調症患者に D-Ser を投与すると一部の症状が改善されたという報告があり⁽⁹⁾、D-Ser は食品機能成分としてだけでなく創薬のターゲットとしても注目されている⁽¹⁰⁾。

上記した様な食品中 D-アミノ酸に期待される第二・三次機能については、さらなる研究が必要な分野であるが、ヒトにおける D-アミノ酸の特異的機能がより詳細に明らかになることで、食事で摂取される D-アミノ酸がもつ機能についても明らかになることが期待できる。

3. 食酢中 D-アミノ酸の分析

ここまで、D-アミノ酸に期待される食品機能について簡単に紹介した。しかし、現在、食品添加物として認可されている D-アミノ酸は Ala、メチオニン (Met)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp) のみである。しかも、この 4 種のアミノ酸も D 型単独での使用は認められておらず、DL 型でのみ添加が認められている。したがって、D-アミノ酸を直接添加しての食品開発は難しい。そこで我々は D-アミノ酸を多く含む事が知られている発酵食品に注目した。発酵食品の D-アミノ酸は、発酵微生物によって主に生産されていると考えられている⁽¹¹⁾。この D-アミノ酸を多く含むとされている点、また原核微生物という比較的シンプルな生物が D-アミノ酸の生産に関与しているという点から、発酵食品が D-アミノ酸の生産制御を行う上で適した食品であると考えた。しかし、発酵過程における D-アミノ酸の生成メカニズムについて詳細な研究は行われていなかった。そこでまず、どのような発酵微生物が D-アミノ酸の生産に主に関与しているかを調べるため、我々は味噌や醤油、魚醤、食酢といった様々な発酵食品の D-アミノ酸分析を行った。本稿では、著者が主な解析を担当した食酢の D-アミノ酸分析から見出された知見について紹介する。

醸造酢は、米や麦などの穀類、果実、野菜などを原料として酢酸発酵によって製造される。例えば、米酢は米を材料にまず麹菌によってデンプンを糖化した後、アルコール発酵（酒精発酵）が行われ、最後に酢酸発酵によりエタノールが酢酸に変換され製造される。我々は、原料や製造法の異なる 10 種類の食酢中の 16 種類の D 及び L-アミノ酸（合計 32 種）の分析を行った。その結果、乳酸発酵純トマト酢という食酢に D-アミノ酸が高濃度含まれることが分かった。この食酢の生産工程には、アルコール発酵、酢酸発酵に加え、乳酸菌による乳酸発酵が含まれている。そこで、乳酸発酵純トマト酢の生産段階のうち、どの工程において D-アミノ酸が生産されるかを分析した。その結果、原料であるトマト果汁と酒精発酵後、

酢酸発酵後のサンプルでは、D-アミノ酸の濃度に差異は無かったが、乳酸発酵後のサンプルではD-アミノ酸濃度が顕著に増加し、またその種類も増えることが分かった。これにより、D-アミノ酸の生産に乳酸菌が大きく関わるということが明確になった。本研究と同様に、発酵食品中のD-アミノ酸の生産・増加に乳酸菌が関与していることを示す報告がビールやワインでなされており^(12,13)、発酵食品の種類を問わず乳酸菌がD-アミノ酸生産に関与していることが考えられる。そこで、代表的な乳酸菌8種類(*Lactobacillus* 属7種、*Lactococcus* 属1種)を用いて、培養液中のD-アミノ酸濃度の分析を行った。その結果、分析した全ての乳酸菌が、D-Ala、D-Asp、D-GluといったD-アミノ酸を細胞外に高濃度生産することが分かった。これら3種のD-アミノ酸の合成酵素としては、アラニンラセマーゼ⁽¹⁴⁾、アスパラギン酸ラセマーゼ⁽¹⁵⁾、グルタミン酸ラセマーゼ⁽¹⁶⁾がそれぞれ報告されている。一方、D-Ser、D-アルギニン(D-Arg)、D-フェニルアラニン(D-Phe)、D-バリン(D-Val)、D-ロイシン(D-Leu)、D-アロイソロイシン(D-allo-Ile)を生産する種もあり、生産されるD-アミノ酸の種類や割合は乳酸菌によってかなり異なることが分かった。いずれにせよ、種類の異なる食酢のアミノ酸分析により、乳酸菌がD-アミノ酸の生産に大きく関わるという重要な知見が得られた⁽¹⁷⁾。乳酸菌は漬物、ヨーグルト、チーズ、ワイン、日本酒、熟れずしなど多くの発酵食品の製造に深く関わっている。それ故に、乳酸菌が生産するD-アミノ酸が発酵食品特有の呈味性や保存性、ヒトの健康維持などに関与している可能性が考えられ、種々の食品機能とD-アミノ酸の関係に興味を持たれる。そこで我々は、乳酸発酵食品中のD-アミノ酸の生成メカニズムをより詳細に調べるため、乳酸菌のD-アミノ酸代謝関連酵素(ラセマーゼ、アミノトランスフェラーゼ等)の研究を行った。次項では、その成果の内、*Lactobacillus* 属乳酸菌から見出された新規アミノ酸異性化酵素について紹介する。

4. 新規アミノ酸異性化酵素

4.1 分岐鎖アミノ酸ラセマーゼの同定

先の実験結果の中で、我々は *Lactobacillus otakiensis* が生産するD-アミノ酸に注目した。*L. otakiensis* はD-Ala、D-Asp、D-Gluに加えて、D型の分岐鎖アミノ酸を培地中に顕著に生産していた(各濃度: D-Leu, 約200 μM; D-Val, 約50 μM; D-allo-Ile, 約150 μM)。*Lactobacillus* 属を含む全ての乳酸菌において、このようなD-分岐鎖アミノ酸の生産とそれに関与する酵素については全く知見がなかったため、その解明に取り組むことにした。まず、*L. otakiensis* の細胞抽出液を用いて、分岐鎖アミノ酸に対するラセマーゼ活性の検出を試みた。その結果、ValとLeuに対するラセマーゼ活性に加え、L-IleとD-allo-Ile間のエピメラーゼ(イソロイシン2-エピメラーゼ、Ile 2-E)活性を見出した(本稿ではこれらの活性をまとめて分岐鎖アミノ酸ラセマーゼ活性と呼ぶ)。これまでに、L-Ileに対して活性を示す唯一の異性化酵素として *Pseudomonas putida* 由来のアラニンラセマーゼが報告されていた⁽¹⁸⁾。しかし、*P. putida* 由来アラニンラセマーゼのL-Ileに対する比活性はL-Alaに対する比活性よりもかなり低い(38.7%)のに対し、*L. otakiensis* の細胞抽出液におけるIle 2-Eの比活性はアラニンラセマーゼの比活性よりも高いものであった(117%)。このことは *L. otakiensis* が新規のアミノ酸異性化酵素を有している可能性を示していた。そこで、*L. otakiensis* の菌体破砕液からIle 2-E活性を指標として、目的酵素の精製を試み、最終的にSDS-PAGEで確認される主なタンパク質バンドが2本(分子質量90 kDa及び50 kDa相当)になるまで精製を行った。これらの2種類のタンパク質バンドのN末端アミノ酸配列をそれぞれ決定した後、Protein-Protein-BLASTを用いてGeneBankデータベースから相同性の高いタンパク質を検索した。その結果、90kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列は *Lactobacillus buchneri* が持つX-prolyl-dipeptidylaminopeptidaseと推定されるタンパク質の配列と同一であることが分かった。一

方、50 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示すものとして、*L. buchneri* の γ -aminobutyrate aminotransferase (GABA-AT) と推定されるタンパク質を見出した。*L. otakiensis* から検出された分岐鎖アミノ酸ラセマーゼ活性はピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存的事であることを確認していたので、目的酵素をコードする遺伝子は、一次構造において特徴的な PLP 結合サイトを有する推定 GABA-AT 遺伝子であると予想した。また、*L. buchneri* JCM 1115 の増殖に伴う培養液中 D-分岐鎖アミノ酸の経時的濃度分析を行ったところ、*L. otakiensis* の場合と同様の D-分岐鎖アミノ酸濃度の顕著な増大が認められた。そこで、*L. buchneri* JCM 1115 の GABA-AT 推定遺伝子を常法に従って大腸菌で発現させた後、均一に精製した目的タンパク質を用いて酵素活性を調べた。その結果、この精製酵素は GABA-AT 活性を示さず、分岐鎖アミノ酸ラセマーゼ活性を示すことを確認した。

4.2 イソロイシン 2-エピメラーゼの性質

続いて、*L. buchneri* 由来分岐鎖アミノ酸ラセマーゼの酵素学的機能解析を行った。本酵素は Ile、Leu、Val に加え、2-アミノ酪酸 (2-Abu)、ノルバリン (Nva)、ノルロイシン (Nle) などの非極性アミノ酸に対して幅広くラセマーゼまたはエピメラーゼ活性を示したのに対して、Glu などの極性アミノ酸には殆ど活性を示さなかった。また、本酵素反応では、L-Ile と D-allo-Ile 間の異性化反応に対する活性が最も高かったことから、本酵素を Ile 2-E と呼ぶこととした。このような非極性アミノ酸に対して特異的な活性を示す異性化酵素は、全ての生物種において報告例のない新規酵素である。また、プロリンラセマーゼを例外とした多くのアミノ酸ラセマーゼの最適 pH がアルカリ性側の pH 8.0 付近に認められるのに対し、本酵素の最適 pH は L-Ile から D-allo-Ile への反応で pH 5.0、逆反応で pH 6.0 と酸性側に認められた。この酵素の分子質量はゲル濾過クロマトグラフィー法で 200 kDa と算出され、サブユニットはアミノ酸配列から 49,422 Da と算出されたので、本酵素

はホモ四量体構造をとることが判明した。多くのアミノ酸ラセマーゼが一量体またはホモ二量体構造をとることから、本酵素はラセミ化反応を触媒する酵素としては珍しいサブユニット構造をとることが分かった。また、ラセマーゼには PLP 依存性のものと非依存性のものが存在するが⁽¹⁹⁾、本酵素は種々の PLP 酵素阻害剤によって著しく反応が阻害されたことから、PLP を補酵素とすることを改めて確認した。これらの酵素学的解析から、本酵素は α -アミノ酸の α -炭素における光学異性の相互置換を触媒する異性化酵素として、多くの特徴的な性質を持つ新規酵素であることが判明した⁽²⁰⁾。

加えて、この Ile 2-E は PLP 酵素の中でもユニークな酵素である。PLP 酵素は、二次構造予測や立体構造に基づいて、少なくとも 5 つのグループ (fold-type) に分けられる⁽²¹⁾。この fold-type と酵素機能の間に相関は無く、PLP 依存性のラセマーゼは fold-type I、II、III のものが存在し、さらに、細菌由来のラセマーゼは fold-type I と III に存在する。改めて、ここで見出した Ile 2-E のアミノ酸配列を基に Blast を用いてホモログ遺伝子を探索すると、本酵素は fold-type I に分類されることが予測された。これまでに、fold-type I に分類されている細菌由来のラセマーゼは *Achromobacter obae* 由来 α -amino- ϵ -caprolactam racemase (ACLR) のみであり⁽²²⁾、本酵素は 2 例目となる。よって、Ile 2-E のアミノ酸配列情報は *A. obae* 由来 ACLR のものと合わせて、PLP 酵素の機能と構造の関係性のさらなる解明に寄与するものと考えられる。

5. おわりに

我々は発酵食品中 D-アミノ酸の生産メカニズム解明に取り組む中で、*L. otakiensis* や *L. buchneri* といった一部の乳酸菌が遊離の D-分岐鎖アミノ酸を生産・分泌することを見出し、また、その合成を担っている可能性が高い酵素 Ile 2-E を同定した。Ile 2-E のホモログ遺伝子は乳酸菌に広く分布しており⁽²⁰⁾、多くの乳酸菌が D-分岐鎖アミノ酸を含む様々な D-アミノ酸を生産している可能

性がある。しかし、この D-分岐鎖アミノ酸が、乳酸菌においてどのような生理的意義を持つのかは、現在のところ不明である。2009 年、Lam らは、多くの原核微生物が細胞壁の構成成分ではない D-アミノ酸 (D-Met、D-Leu、D-Val、D-Tyr、D-Phe 等) を遊離状態で細胞外に分泌し、細胞間の相互作用に利用している可能性を示した⁽²³⁾。L. *otakiensis* や L. *buchneri* が生産する D-分岐鎖アミノ酸についても、同様の機能を持つのか、もしくは、異なる新規機能を持つのか興味深い。乳酸菌は環境、食品、医療等の幅広い分野に関連する細菌であるため、乳酸菌と D-アミノ酸の関係性の解明は重要な意義を持つと考えており、今後はこのテーマについて取り組んでいきたいと考えている。

謝辞: 本稿にて紹介した我々の研究成果は「生研センターイノベーション創出事業」の助成を受けて得られたものである。

文 献

- 1) Csapó J, Albert Cs, Csapó-Kiss Zs. 2009. The D-amino acid content of foodstuffs. *Acta Univ Sapientiae, Alimentaria* 2:5-30.
- 2) Friedman M. 2010. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers* 7:1491-1530.
- 3) 小俣靖. 1986. 美味しさと味覚の科学. 日本工業新聞社出版局.
- 4) 野平博之. 1989. 光学活性体-その有機工業化学-. 朝倉書店 17-46.
- 5) Okada K, Gogami Y, Oikawa T. 2013. Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids* 44:489-498.
- 6) 芦田豊, 東條洋介, 島田正一郎, 岡村智恵子, 三田真史, 浜瀬健司. 2011. 皮膚における D-アミノ酸の存在とその生理活性. *Bio Industry* 28:40-44.
- 7) D'Aniello G, Ronsini S, Guida F, Spinelli P, D'Aniello A. 2005. Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertil Steril* 84:1444-1449.
- 8) Macchia G, Topo E, Mangano N, D'Aniello E, Boni R. 2009. DL-Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. *Anim Reprod Sci* 118:337-343.
- 9) Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT. 1998. D-Serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:1081-1089.
- 10) 上里彰仁. 2013. グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患. *D-アミノ酸研究会誌* 1:1-6.
- 11) Brückner H, Becker D, Lüpke M. 1993. Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. *Chirality* 5:385-392.
- 12) Erbe T, Brückner H. 2000. Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *J Chromatogr A* 881:81-91.
- 13) Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H, Yoshimura T. 2011. Alternations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J Biosci Bioeng* 111:104-108.
- 14) Bron PA, Hoffer SM, Van Swam II, De Vos WM, Kleerebezem M. 2004. Selection and characterization of conditionally active promoters in *Lactobacillus plantarum*, using alanine racemase as a promoter probe. *Appl Environ Microbiol* 70:310-7.
- 15) Okada H, Yohda M, Giga-Hama Y, Ueno Y, Ohdo S, Kumagai H. 1991. Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1078:377-382.
- 16) Nakajima N, Tanizawa K, Tanaka H, Soda K. 1988. Distribution of glutamate racemase in lactic acid bacteria and further characterization of the enzyme from *Pediococcus pentosaceus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52:3099-3104.

- 17) Mutaguchi Y, Ohmori T, Akano H, Doi K, Ohshima T. 2013. Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus* 2:691.
- 18) Liu JL, Liu XQ, Shi YW. 2012. Expression, purification, and characterization of alanine racemase from *Pseudomonas putida* YZ-26. *World J Microbiol Biotechnol* 28:267-274.
- 19) Yoshimura T, Esaki N. 2003. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *J Biosci Bioeng* 96:103-109.
- 20) Mutaguchi Y, Ohmori T, Wakamatsu T, Doi K, Ohshima T. 2013. Identification, purification, and characterization of a novel amino acid racemase, isoleucine 2-epimerase, from *Lactobacillus* species. *J Bacteriol* 195:5207-5215.
- 21) Eliot AC, Kirsch JF. 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73:383-415.
- 22) Okazaki S, Suzuki A, Mizushima T, Kawano T, Komeda H, Asano Y, Yamane T. 2009. The novel structure of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent fold-type I racemase, α -amino- ϵ -caprolactam racemase from *Achromobacter obae*. *Biochemistry* 48:941-950.
- 23) Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA, Waldor MK. 2009. D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325:1552-1555.



牟田口 祐太(むたぐち ゆうた)氏

略 歴

- 2010-2013 九州大学大学院生物資源環境科学
府博士後期課程修了 博士(農学)
- 2012-2014 日本学術振興会特別研究員
- 2014-現在 秋田県立大学生物資源科学部
応用生物科学科 助教