

哺乳動物における D- アミノ酸代謝

加藤 志郎¹⁾, 老川 典夫^{2,3)}(¹⁾香川大学国際希少糖研究教育機構*, ²⁾関西大学化学生命工学部**, ³⁾関西大学先端科学技術推進機構***)

(受付 2019年9月7日, 受理 2019年9月19日)

D-Amino acids metabolism in mammals

Shiro KATO¹⁾, Tadao OIKAWA^{2,3)}¹⁾*International Institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kagawa 761-0795, Japan*²⁾*Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-Cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan*³⁾*Kansai University High Technology Research Core, 3-3-35 Yamate-Cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan*

Summary

D-Amino acids, enantiomers of corresponding L-amino acids, play various biological roles not only in bacteria but also in eukaryotes. In mammals, they are synthesized from L-amino acids by the action of amino acid racemase or derived from dietary foods and intestinal bacterial products, and contribute to significant biological events such as neurotransmission, hormone biosynthesis, and so on. The main enzyme involved in degradation of D-amino acids in mammals is D-amino acid oxidase. The enzyme relates to degradation of excess and/or unnecessary D-amino acids and to production of corresponding 2-keto acids, ammonia, and hydrogen peroxide. The regulation of D-amino acids level is considered to be quite important for life; however, there are still many unknown aspects. In this minireview, we summarize the D-amino acids metabolism in mammals.

1. D- アミノ酸とは

グリシンを除く 19 種のタンパク源性アミノ酸にはキラ中心 (α 炭素) が存在し, 互いに鏡像関係にある 2 種類のエナンチオマーが存在する。これらのエナンチオマーのうち, α 位の絶対配置が S 体 (システインのみ R 体) のエナンチオマーが L-アミノ酸 (L 型) であり, R 体 (システインにおいては S 体) のエナンチオマーは D-アミノ酸 (D 型) と呼ばれる。両者は旋光性を除いて同一の物理化学的性質を有するにも関わらず, 天然に存在するアミノ酸の大部分は L-アミノ酸であり, また, 2 つのエナンチオマーの生物における生理的役割もまた全く異なるものである。L-アミノ酸がタンパク質の構成要素等の生物における主要なアミノ酸である一方で, D-アミノ酸は細菌における限定的な役割を担うのみであると考えられていた。D-アラニン, D-グルタミン酸が細胞壁ペプチドグリカンの

の構成成分であること¹⁾, ある種の *Bacillus* 属細菌が産生するポリ- γ -グルタミン酸が D-グルタミン酸から成ること²⁾, などが古くから知られており, 加えて近年では, D-アミノ酸が細菌バイオフィルムの分散³⁾および定常細菌の細胞壁構造の再構築⁴⁾に関与することなどが新たに報告されている。また, 植物^{5,6)}, 甲殻類や二枚貝などの海生生物^{7,8)}, 哺乳動物に至る幅広い真核生物体内およびアーキア細胞内⁹⁾にも D-アミノ酸の存在が見出されており, 現在では, D-アミノ酸は多様な原核および真核生物において重要な生理的役割を担うと考えられている。

2. 哺乳動物生体内の D- アミノ酸とその由来

ヒトを含む様々な哺乳動物生体内において, D 型の存在量および存在比が高いアミノ酸としてセリンおよびアスパラギン酸が挙げられる。D-セリンは哺乳動物脳内に存

*所在地: 香川県木田郡三木町池戸2393 (〒761-0795)

**所在地: 大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

***所在地: 大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

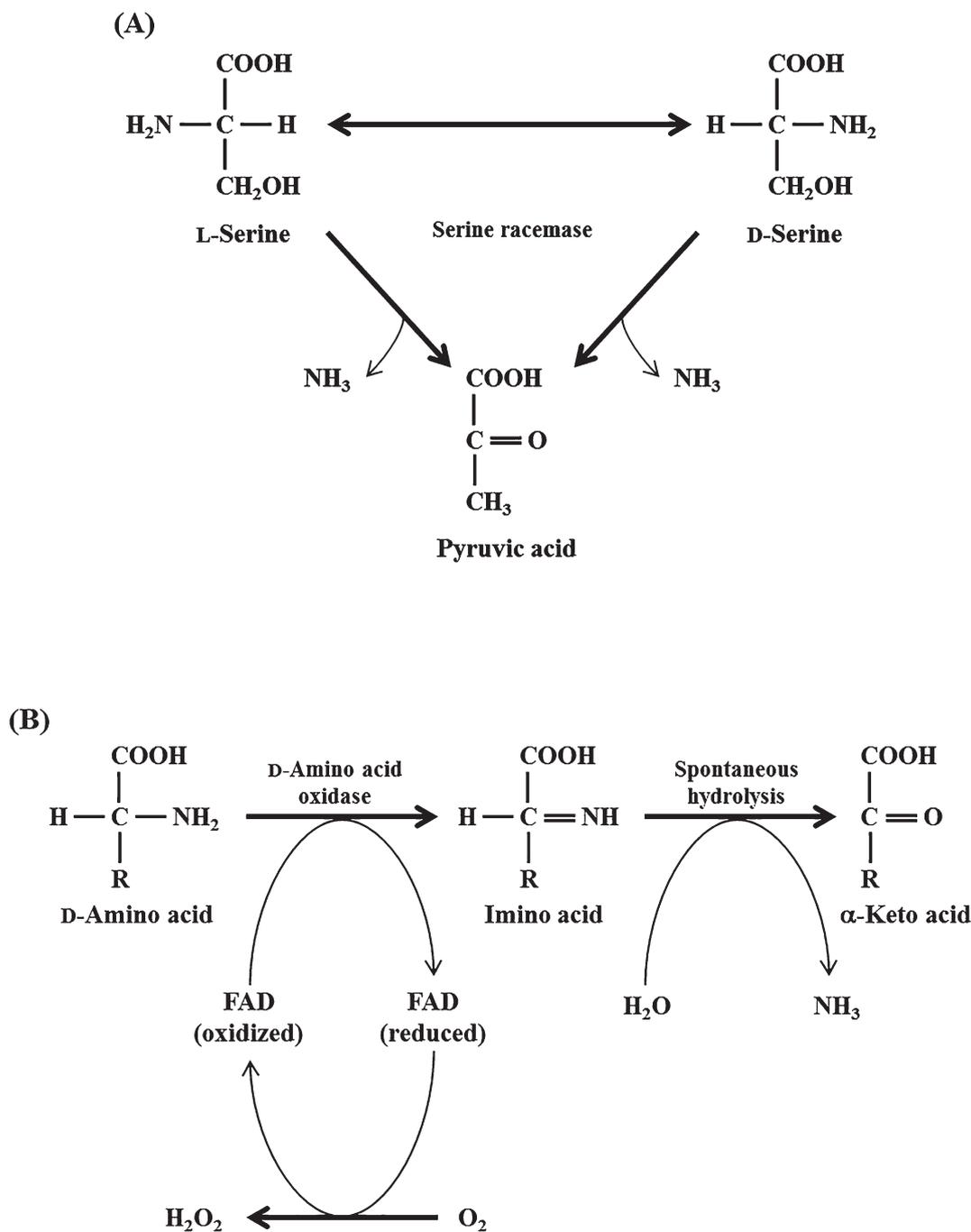


Fig. 1 Reactions catalyzed by serine racemase (A) and D-amino acid oxidase (B)
 Serine racemase catalyzes interconversion between L-serine and D-serine and dehydration of L- and D-serine. D-Amino acid oxidase degrades D-amino acid, and then the formed imino acid is spontaneously hydrolyzed into 2-keto acid.

在し、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体のグリシンサイトに結合することで同受容体を活性化するコアゴニストとして作用し、記憶や学習などの脳の高次機能に関与する¹⁰。D-アスパラギン酸は精巣、松果体、下垂体、副腎等の内分泌組織中に存在し¹¹、テストステロン、メラトニン、プロラクチン等のホルモンの合成または分泌の制御に関与し¹²⁻¹⁴、また、脳内においては神経伝達物質として作用する¹⁵。D-セリンおよびD-アス

パラギン酸は疾病への関与も示唆されており、健常者と比して、脳脊髄液や血清中D-セリンの統合失調症患者¹⁶における減少および筋萎縮性側索硬化症患者¹⁷における上昇が、奇形精子症患者¹⁸においては精子および精漿中D-アスパラギン酸の減少が認められている。他にも、その生理的役割は不明かつ微量ではあるがD-アラニン、D-プロリン、D-ロイシン、D-グルタミン酸、D-グルタミン、D-アスパラギン、D-アルギニンなどが哺乳動物組織、組織

液、細胞または尿中に見出されている¹⁹⁻²³⁾。

これらのD-アミノ酸のうちで、哺乳動物体内における生合成系の解明がなされているのはごく一部である。D-セリンはL-セリンとの相互変換を触媒する酵素であるセリンラセマーゼ (EC 5.1.1.18) の作用により生合成される。本酵素はラセミ化反応に加えて、D-セリンおよびL-セリンに対する脱水素酵素活性を有する二機能酵素である (Fig. 1A)。1999年にラット由来の酵素が哺乳動物として初のセリンラセマーゼとして同定され²⁴⁾、その後、遺伝子ノックアウトマウスの解析からD-セリンの主要な供給源であることが明らかにされている^{25, 26)}。D-アスパラギン酸もまた酵素的ラセミ化反応により生合成されると考えられており、アミノ基転移酵素様タンパク質であるマウス由来 Got111 がアスパラギン酸のラセミ化活性を示すことが報告されたものの²⁷⁾、後に主要な供給源ではないこと²⁸⁾ およびヒトとラットにおける同酵素のホモログがラセミ化活性を示さないことが明らかにされた²⁹⁾。セリンラセマーゼによるD-アスパラギン酸生合成への一定の寄与は認められるものの³⁰⁾、依然として哺乳動物生体中の主要なD-アスパラギン酸生合成系は不明なままである。

生体中に見出されるD-アミノ酸の一部は食餌および腸内細菌由来のアミノ酸が小腸より吸収された結果であると考えられている。様々な食品中にアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジンなどのD型のアミノ酸が検出されており³¹⁻³³⁾、また、無菌マウス腸内用物中のアミノ酸組成分析の結果、腸内D-アミノ酸の一部は腸内細菌が産生することが明らかとなっている³⁴⁾。鶏における実験ではあるが、小腸各部位 (十二指腸、回腸および空腸) において、D型のアラニン、グルタミン酸、リジン、メチオニン、フェニルアラニンがL型と比して同等または有意に吸収されることが示されている³⁵⁾。また、ウサギにおいて食餌とともにD-アスパラギン酸を経口摂取させることで精漿中のD-アスパラギン酸含量の一過の上昇と精子運動性の向上が見られること³⁶⁾、神経障害モデルマウスにおいてD-アスパラギン酸経口摂取により痛みおよび認識機能障害の軽減が認められること³⁷⁾ から、哺乳動物においても同様に腸管から吸収され、生体中における生理的役割を担う可能性が示唆される。

3. 哺乳動物におけるD-アミノ酸分解系

哺乳動物においてD-アミノ酸の分解を担う主要な酵素はD-アミノ酸酸化酵素 (EC 1.4.3.3) である。D-アミノ酸酸化酵素はD-アミノ酸、分子状酸素および水分子から、対応する2-オキソ酸、過酸化水素およびアンモニアを産生する酸化的脱アミノ化反応 (Fig. 1B) を触媒する酵素であり、補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を要求する。D-アミノ酸酸化酵素はD-プロリンなどの中性D-アミノ酸に対して高い活性を示す一方で、酸性D-アミノ酸を基質としないという特徴を有する。本

酵素は以前、ヒトをはじめとする哺乳動物や酵母等にものみ存在すると考えられていたが、現在ではトウモロコシ³⁸⁾ および耐熱性放線菌³⁹⁾ 由来の酵素が同定され、植物や細菌もまたD-アミノ酸に対する酸化的脱アミノ化系を有することが示された。哺乳動物、酵母、植物および細菌の同酵素の配列を比較すると (Fig. 2)、哺乳動物間においてFADや基質結合に関与する残基が高度に保存され、高い相同性を示す。

哺乳動物におけるD-アミノ酸酸化酵素の存在は1935年にブタ肝臓より見出され⁴⁰⁾、現在ではヒト、マウス、ラットなど多様な哺乳動物由来の酵素が同定・解析されている。D-アミノ酸酸化酵素が発見された当初、哺乳動物体内にはD-アミノ酸は存在しないと考えられており、哺乳動物生体内における役割は謎であるとされていた⁴¹⁾。しかしながら、近年の分析技術の向上に伴い哺乳動物体内にD-アミノ酸の存在が見出され、ついで哺乳動物由来のD-セリン生合成酵素が同定された²¹⁾ ことなどが契機となり精力的な研究が展開され、脳内アストロサイトに発現するD-アミノ酸酸化酵素によるD-セリンの分解を介した神経伝達調節への関与など、生体内各所における多様な生理的役割が解き明かされてきた⁴²⁾。現在もなお、哺乳動物D-アミノ酸酸化酵素の新たな生理的役割および生体内代謝への関与の発見が相次いでおり、2013年には脳内における硫化水素産生の新規経路の存在が見出された。D-アミノ酸酸化酵素によるD-システインの分解産物である3-メルカプトピルビン酸が3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼの作用により硫化水素へと変換される経路であり、*in vivo*における産生活性は既知のL-システインを出発物質とする経路よりも高いと考えられている⁴³⁾。2016年には腸内細菌が産生するD-アミノ酸により小腸上皮におけるD-アミノ酸酸化酵素発現が誘導され、D-アミノ酸が分解される過程で産生する過酸化水素により病原性細菌の増殖抑制をする、という機構から成る哺乳動物-腸内細菌間の相互作用の存在が示唆され、小腸上皮からのD-アミノ酸酸化酵素分泌モデルが提唱されている³⁴⁾。また、今年に入って、老化細胞特異的に発現上昇したD-アミノ酸酸化酵素がD-アミノ酸の分解に伴い活性酸素種を発生させることで老化が促進されることが示唆された⁴⁴⁾。

類似の酵素としては、酸性D-アミノ酸特異的に酸化的脱アミノ化反応を触媒するFAD依存性酵素であるD-アスパラギン酸酸化酵素 (EC 1.4.3.1) がある。本酵素もまた哺乳動物や酵母等より見出されており⁴⁵⁻⁴⁷⁾、その基質特異性の違いからD-アミノ酸酸化酵素とは異なる生理機能を担うと考えられている。ノックアウトマウスの解析により、生体内D-アスパラギン酸レベルの上昇や体重上昇、性行動の欠如などの表現型が観察されており^{48, 49)}、D-アスパラギン酸酸化酵素による分解を介した制御系の存在が示唆される。

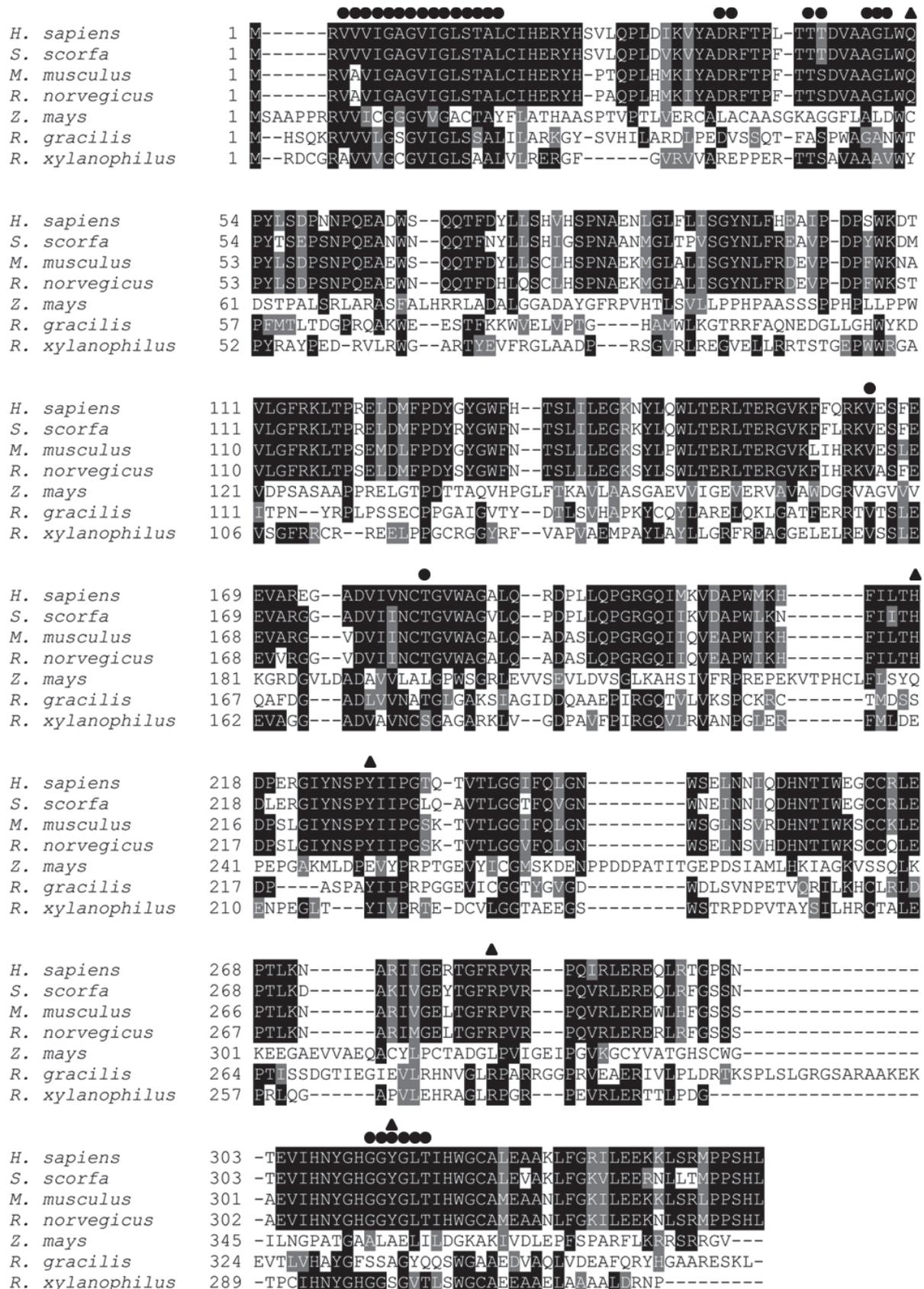


Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of D-amino acid oxidases

Amino acid sequences of D-amino acid oxidase from *Homo sapiens* (accession number: NP_001908), *Sus scorfa* (NP_999231), *Mus musculus* (NP_001273325), *Rattus norvegicus* (NP_446078), *Zea mays* (CAL58663), *Rhodotorula gracilis* (AAB51107), and *Rubrobacter xylanophilus* (BAP18969) were aligned using the CrustalW program and the multiple alignment was created using BOXSHADE ver. 3.21 (URL: https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Circles or triangles in the alignment indicate residues relate to FAD or substrate binding sites in human D-amino acid oxidase, respectively.

4. おわりに

哺乳動物におけるD-アミノ酸酸化酵素の存在は古くから知られていたものの、その生理的役割の解明が進み始めたのは比較的最近のことである。D-アミノ酸の生合成系もまた未だ解明の途上であり、哺乳動物生体内D-アミノ酸の制御は不分明な点が多い。近年の多くの研究によりD-アミノ酸は哺乳動物においても多様かつ重要な生理的役割を担う事が明らかにされており、酵素機能解析を含む生体内D-アミノ酸制御系の解明は、生命現象の一層の理解へ寄与するものと期待される。

謝 辞

本ミニレビューは、関西大学研究拠点形成支援経費「D-アミノ酸を新たな生物系素材とする新規機能性食品開発拠点の形成」および関西大学先端科学技術推進機構「機能性食品開発研究グループ」の研究経費の支援による研究の一環として執筆されたものである。

参考文献

- 1) Heilmann HD (1972) On the peptidoglycan of the cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Biochem 31: 456-463.
- 2) Hanby WE, Rydon HN (1946) The capsule substance of *Bacillus anthracis*. Biochem J 40:297-309.
- 3) Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R (2010) D-Amino acids trigger biofilm disassembly. Science 328: 627-629.
- 4) 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.
- 5) Brückner H, Weathauer T (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids 24: 43-5.
- 6) Oikawa T (2008) Occurrence of D-amino acids in higher plants and foods and the enzymes related to their metabolism. Seikagaku 80: 300-307.
- 7) Okuma E, Fujita E, Amano H, Noda H, Abe H (1995) Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans. Fish Sci 61: 157-160.
- 8) Felbeck H, Wiley S (1987) Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves. Bio Bull 173: 252-259.
- 9) Washio T, Kato S, Oikawa T (2016) Molecular cloning and enzymological characterization of pyridoxal 5'-phosphate independent aspartate racemase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* DSM 5473. Extremophiles 20: 711-21.
- 10) Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. Mol Neurobiol 36: 152-164.
- 11) Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T (1995) Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. Eur J Neurosci 7: 657-1663.
- 12) Nagata Y, Homma H, Lee JA, Imai K (1999) D-Aspartate administration of testosterone synthesis in rat Leydig cells. FEBS Lett 444: 160-164.
- 13) Takigawa Y, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Imai K (1998) D-Aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. Biochem Biophys Res Commun 248: 641-647.
- 14) Long Z, Lee JA, Okamoto T, Nimura N, Imai K, Homma H (2000) D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH(3)). Biochem Biophys Res Commun 276: 1143-114.
- 15) D'Aniello S, Somorjai I, Garcia-Fernández J, Topo E, D'Aniello A (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. FASEB J 25: 1014-102.
- 16) Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, Agam G (2007) A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. Schizophr Res 90: 41-51.
- 17) Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S (2007) D-Serine is a key determinant of a glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. EMBO J 26: 4149-4159.
- 18) 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.
- 19) Hamase K, Inoue T, Morikawa A, Konno R, Zaitzu K (2001) Determination of free D-proline and D-leucine in the brains of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. Anal Biochem 298: 253-258.
- 20) Hamase K, Morikawa A, Etoh S, Tojo Y, Miyoshi Y, Zaitzu K (2009) Analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. Anal Sci 25: 961-968.
- 21) Hamase K, Miyoshi Y, Ueno K, Han H, Hirano J, Morikawa A, Mita M, Kaneko T, Lindner W, Zaitzu K (2010) Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully

- automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept. *J Chromatogr A* 1217: 1056–1062.
- 22) Han H, Miyoshi Y, Ueno K, Okamura C, Tojo Y, Mita M, Lindner W, Zaitzu K, Hamase K (2011) Simultaneous determination of D-aspartic acid and D-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. *J Chromatogr B* 879: 3196–3202.
 - 23) Kato S, Masuda Y, Konishi M, Oikawa T (2015) Enantioselective analysis of D- and L-amino acids from mouse macrophages using high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 116: 101–104.
 - 24) Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuro-modulator D-serine. *PNAS* 96: 721–725.
 - 25) Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510: 641–654.
 - 26) Basu AC et al. (2009) Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol Psychiatry* 14: 719–727.
 - 27) Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H, Snyder SH (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *PNAS* 107: 3175–3179.
 - 28) Tanaka-Hayashi A, Hayashi S, Inoue R, Ito T, Konno K, Yoshida T, Watanabe M, Yoshimura T, Mori H (2015) Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-I like I (Got111): a putative aspartate racemase?. *Amino acids* 47: 79–86.
 - 29) Matsuda S, Katane M, Maeda K, Kaneko Y, Saitoh Y, Miyamoto T, Sekine M, Homma H (2015) 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: 975–985.
 - 30) Ito T, Hayashida M, Kobayashi S, Muto N, Hayashi A, Yoshimura T, Mori H (2016) Serine racemase is involved in D-aspartate biosynthesis. *J Biochem* 160: 345–353.
 - 31) Gogami Y, Okada K, Oikawa T (2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake. *J Chromatogr B* 879: 3259–3267.
 - 32) Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H, Yoshimura T (2011) Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J Biosci Bioeng* 111: 104–108.
 - 33) 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.
 - 34) Sasabe J, Miyoshi Y, Rakoff-Nahoum S, Zhang T, Mita M, Davis BM, Hamase K, Waldor MK (2016) Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nature Microbiol* 1: 16125.
 - 35) Yokota H, Tasaki I (1970) Site and rate of intestinal absorption of various amino acids in the chicken in situ. *Jap J Zootech Sci* 41: 209–215.
 - 36) 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.
 - 37) Palazzo E et al. (2016) D-Aspartate drinking solution alleviates pain and cognitive impairment in neuropathic mice. *Amino Acids* 48: 1553–1567.
 - 38) Gholizadeh A, Kohnhrouz BB (2009) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused *Zea mays* L. D-amino acid oxidase. *Biochemistry (Moscow)* 74: 137–144.
 - 39) Takahashi S, Furukawara M, Omae K, Tadokoro N, Saito Y, Abe K, Kera Y (2014) A highly stable D-amino acid oxidase of the thermophilic bacterium *Rubrobacter xylanophilus*. *Appl Environ Microbiol* 80: 7219–7229.
 - 40) Krebs HA (1935) Metabolism of amino-acids: determination of amino-acids. *Biochem J* 29: 1620–1644.
 - 41) Neims AH, Zieverink WD, Smilack JD (1966) Distribution of D-amino acid oxidase in bovine and human nervous tissues. *J Neurochem* 13: 163–168.
 - 42) Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G (2007) Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* 64: 1373–1394.
 - 43) Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H (2013) A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Comm* 4: 1366.
 - 44) Nagano T et al. (2019) D-Amino acid oxidase promotes cellular senescence via the production of reactive oxygen species. *Life Sci Alliance* 2: e201800045.

- 45) Setoyam C, Miura R (1997) Structural and functional characterization of the human brain d-aspartate oxidase. *J Biochem* 121: 798-803.
- 46) Yamada R, Ujiie H, Kera Y, Nakase T, Kitagawa K, Imasaka T, Arimoto K, Takahashi M, Matsumura Y (1999) Purification and properties of D-aspartate oxidase from *Cryptococcus humicola* UJ1. *BBA* 1294: 153-158.
- 47) Katane M, Furuchi T, Sekine M, Homma H (2007) Molecular cloning of a cDNA encoding mouse D-aspartate oxidase and functional characterization of its recombinant proteins by site-directed mutagenesis. *Amino Acids* 32: 69-78.
- 48) Huang AS, Beigneux A, Weil ZM, Kim PM, Molliver ME, Blackshaw S, Nelson RJ, Young SG, Snyder SH (2006) D-Aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. *J Neurosci* 26: 2814-2819.
- 49) Errico F, Pirro MT, Affuso A, Spinelli P, De Felice M, D'Aniello A, Di Lauro R (2006) A physiological mechanism to regulate D-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by D-aspartate oxidase deficient mice. *Gene* 374: 50-57.