



知ってる？ D-アミノ酸

大森 勇門

私が高校生、大学生だった頃の教科書では“アミノ酸には2つのエナンチオマーであるL体とD体が存在するものの、高等生物は選択的にL体のみを利用しD体に生理的な機能はない”と紹介され、そのように学習してきた。大学院に進学し、最初に与えられた研究テーマが「マウス由来セリンラセマーゼのクローニングと機能解析」であった。哺乳類の生体内でもD-アミノ酸が合成されており、さらには重要な生理機能を有していることをこの時初めて知って、驚きと共に大変興味を引かれた。以来、細々とではあるがD-アミノ酸に関する研究に携わっている。現在では高校の教科書でもD-アミノ酸が生体で利用されているという記述があるし、D-アミノ酸を機能性成分として利用した食品なども販売されているため、D-アミノ酸という言葉を目にする機会は増えているように思う。ただ「目にしたことはあるけれども詳しくは…」や「興味はあるけれども…」という人もいるのではないだろうか。そこで本稿では、D-アミノ酸についてその生理機能や応用例、それから分析法について紹介していきたい。

D-アミノ酸、どうやって分析する？

D-アミノ酸について書かれた記述では、その多くにおいて「分析技術の進歩によりD-アミノ酸を解析できるようになった」という旨の文章が記載されている。それでは一体どのような方法で分析されているのだろうか。

基本的に使用されるのは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。エナンチオマーは立体異性体のうち、互いに鏡像関係にある化合物のことで、鏡像異性体とも呼ばれる。構成する原子や、それら原子のつながり方は同じであるため、光学活性が異なる以外はその物理的、化学的な性質はほぼ同じである。そのため、エナンチオマーの分離はODSカラム（C18とも呼ばれ、炭素数18からなる炭素鎖が修飾された樹脂が充填された逆相カラムの一種）やイオン交換カラムなどでは基本的に困難である。そこでカラム側にも光学活性を持った分子を充填し、光学活性を持つ化合物同士の相互作用の違いにより分離する、いわゆるキラルカラムが用いられる。ただし、キラルカラムではアミノ酸ごとに分離する

ことはできないため、酵素反応解析など反応系に1種類のアミノ酸しか存在しないような場合であれば有効な手段となるが、生体試料や食品など複数のアミノ酸が存在する系では一体どのアミノ酸のD体が存在しているのか分からない。そこで、アミノ酸をo-フタルアルデヒドとアミノ基をブロックしたL-システイン誘導體によりジアステレオマー誘導體化し、ODSカラムに供することでアミノ酸とエナンチオマーの分離を両立する方法が1980年代後半に開発された。そして1992年にHashimotoらがラット脳のアミノ酸分析に本法を応用し、脳内アミノ酸の一斉分析が行われD-Serが高い割合（24.6%）で存在することが示された¹⁾。その後、本法は生体試料や食品に含有するD-アミノ酸の一斉分析法として広く利用されるようになった。なおHashimotoらの報告では、ProとCysを除く17種類のアミノ酸のDL分割が1ラン120分で行われていたが、2004年にWaters社が開発した超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）の登場により、より高速化したD-アミノ酸分析が可能となり、1ラン18分で14～15種類のアミノ酸のDL分割が行えるようになっていく。

HPLCを使用したDL-アミノ酸の一斉分析法としては、他に2010年に九州大学の浜瀬らと資生堂が共同開発した二次元HPLC法がある²⁾。この方法では、2つのカラムがカラムスイッチングバルブを挟んで配置されている。一次元目のカラムは逆相マイクロカラムであり、ここでアミノ酸ごとの分離が行われる。目的アミノ酸が溶出してきたのを確認したら、バルブを切り替え分取ループへと目的アミノ酸を導入する。分取が終了したら再びバルブを切り替えることで、分取したアミノ酸は二次元目のキラルカラムへとアプライされDL分割が行われる。この方法では一次元目のカラムとしてマイクロカラムを使用していることで、一次元目の移動相流速が二次元目の10分の1程度になる。これにより分取した全量を二次元目に供することができ、分取によるサンプルロスを起こすことなく高感度かつ選択的な分析が可能になっている。また生体試料中の夾雑成分は一次元目で分離され、二次元目のキラルカラムには目的アミノ酸のみが導入されることになるので夾雑物の影響をほとんど受けずに

DL分割を行うことができる。これまでに分岐鎖アミノ酸一斉分析法, Pro類縁アミノ酸一斉分析法, 親水性アミノ酸一斉分析法, それからタンパク質構成全アミノ酸に *allo*-Thrと *allo*-Ileを加えた22種を一斉に分析する方法が開発されている。

最後に2017年に大阪大学の福崎らと島津製作所により共同開発されたHPLCと質量分析計 (MS) を用いるLC/MS/MS法³⁾について紹介する。本法では, キラルカラムであるCROWNPAK CR-Iが使用されている。先にも述べたようにキラルカラムは光学分割能に優れている反面, アミノ酸ごとの分離には向いていない。検出に吸光度計や蛍光検出器を用いた場合では, D体のピークが重なったり隣接したりして検出されるため, ピークの同定を行うことは非常に困難である。そこでこの方法では, MSを用いて質量を測定することでアミノ酸の同定を行っている。つまり, キラルカラムで光学分離を行い, MSでの質量測定によりアミノ酸ごとの検出を行うことで光学分割とアミノ酸ごとの分離を達成しているのである。さらに本法が優れている点として, 誘導体化を必要としないこと, 1ラン10分でPro以外の21種のアミノ酸の一斉分析が可能であることがあげられる。

以上三種類のD-アミノ酸分析法を紹介した。二次元HPLCとLC/MS/MS解析はどちらも21~22種類のアミノ酸を一斉分析可能で感度にも優れた方法であるため, D-アミノ酸解析において非常に強力なツールとなる。しかし, どちらも高価な機器を使用するため研究室への導入には高いハードルがあると言える。UPLCも高価ではあるが, HPLCでも分析が可能なジアステレオマー誘導体をODSカラムで分離する一つ目の方法がD-アミノ酸研究を新たに立ち上げようとする研究室には最適な方法ではないだろうか。

哺乳類生体内における遊離D-アミノ酸

ここまで紹介してきたような分析法により遊離D-アミノ酸が検出され, これまでにさまざまな生理機能が明らかになってきた。ヒトを含む高等生物において生理機能を示す遊離D-アミノ酸としてまず紹介されるのは, やはりD-Serであろう。D-Serは脳内, 特に大脳皮質や海馬などに局在し, これらの部位で記憶や学習に関係すると言われる *N*-methyl-D-Aspartate (NMDA) レセプターのコアゴニストとして機能している⁴⁾。NMDAレセプターは, 陽イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つであり, その活性化により細胞内への陽イオン流入を引き起こす。レセプターの活性化にはGluの結合だけでなく, Gly結合サイトへのGlyの結合が必要となる。

当初, Glyが生体内におけるコアゴニストであると考えられていたが, D-Serがコアゴニストとして機能すること, D-Serの局在がNMDAレセプターのそれと一致することなどからGlyではなくD-Serが内在性コアゴニストであると言われている。D-Serの合成はSerラセマーゼ (SerR) が担っている。脳内におけるD-Ser量の変化やD-アミノ酸酸化酵素 (DAO) の変異は, 筋萎縮性側索硬化症や統合失調症などさまざまな疾患との関連が指摘されており, これらの疾患を検査するためのバイオマーカーとしてD-Serを利用する研究が進められている⁵⁾。

哺乳類の生体内での機能がよく知られているD-アミノ酸として, もう一つD-Aspを紹介する。D-Aspは神経系や生殖系の組織や器官に局在することが知られており, 海馬においてはD-Serと同様にNMDAレセプターへの関与が指摘されている⁶⁾。また, 成長ホルモンやプロラクチンなどの下垂体前葉ホルモンの分泌調整に関係しており, 精巣においては精子形成に関係することが報告されている⁶⁾。多くの生理機能が明らかにされている反面, その生合成経路については未だ不明な点が多い。2010年にKimらがマウスの *glutamate-oxaloacetate 1-like 1* 遺伝子の発現産物がAspラセマーゼ (AspR) として機能することを報告したが⁷⁾, その後, Tanaka-Hayashiらにより大腸菌で発現させた本遺伝子の組換え体酵素にはAspR活性が認められない⁸⁾ことが指摘されるなど, 本遺伝子産物が本当にAspRであるかについては議論が続いている。一方で, ItoらはSerRノックアウトマウスの海馬においてD-Asp量が減少していること, そして精巣や小脳においては変化がないことを報告しており, 少なくとも一部の臓器や組織においてはSerRがD-Aspの合成に関与しているのではないかと述べている⁹⁾。ただし, SerRによらないD-Asp合成も依然として示唆されていることから, 未だ発見されていないAspRの存在が期待される。

もう一つ, 哺乳類生体内におけるD-アミノ酸の興味深い事例を紹介する。2016年にSasabeらの研究により, D-アミノ酸を介した哺乳類と腸内細菌との相互作用が明らかになった¹⁰⁾。コレラや腸炎ビブリオの原因となるビブリオ属細菌はD-Metを特徴的に産生するが, D-Metはマウス腸管で発現しているDAOの良い基質である。DAOはD-アミノ酸を基質として過酸化水素を生産する反応を触媒する。この反応により生産された過酸化水素がビブリオ属細菌に対して殺菌効果を示し, 生体防御作用を発揮することが示された。また, DAOによるD-アミノ酸量の変化が腸内細菌叢の組成に影響を与えることも示唆されている。このように細菌の生産するD-アミ

ノ酸が哺乳類の生体内で重要な働きを示す一例が示されたことで、D-アミノ酸を介した細菌との新しい関係が今後明らかになっていくのではないだろうか。

食品とD-アミノ酸、呈味性・生理機能強化

前項では哺乳類生体内での遊離D-アミノ酸について述べてきたが、食品中の遊離D-アミノ酸についても少し触れておく。発酵食品だけでなく、さまざまな食品中に遊離D-アミノ酸が含まれていることが報告されている。また発酵食品の中でも、特に乳酸菌が発酵に関係する食品にはAla, Aspなど高濃度のD-アミノ酸が存在することが報告されている¹¹⁻¹²⁾。乳酸菌はD-アミノ酸を菌体内外に高濃度生産することが見いだされ、ある乳酸菌に至っては細胞内の遊離Alaの8~9割がD体であることが明らかになっている¹³⁾。乳酸菌はこのようにD-アミノ酸を高生産し、菌体内にとどめるだけでなく菌体外にも分泌しているようだが、その生理的意義については不明な点が多い。大腸菌の培養液中にD-アミノ酸を添加すると、その種類によって効果は異なるが生育が完全に阻害されたり、生育速度の遅延を引き起こしたりするという報告がある¹⁴⁾。ある種の抗菌を目的としてD-アミノ酸を分泌している可能性も考えられるが、今後の更なる研究に期待したい。

乳酸菌が何故D-アミノ酸を大量に生産するのかについては不明であるが、生産されたD-アミノ酸は、私たちにとっては食品の味という観点で意味を持つ。アミノ酸の呈味性という点、真っ先に思い浮かぶのは旨味のL-Gluナトリウム塩だと思いが、L-Glu以外のアミノ酸の味についてはご存知だろうか。実はL-Glu以外のL-アミノ酸の多くは苦みを呈する。それに対して、D-アミノ酸の多くは甘味を呈し、特にD-Ala, D-Phe, D-Trpはそれぞれ砂糖の3, 5, 35倍もの甘味を呈する¹⁵⁾。浸透圧調整のため生体内に高濃度のD-Alaを蓄積することが知られている甲殻類や貝類などの甘味は、このD-Alaに由来するものであると言われている¹⁶⁾。またOkadaらの研究により、D-アミノ酸を多く含む日本酒の方が官能評価において高く評価される傾向にあることが明らかになった¹⁷⁾。現在は販売されていないが、その成果はD-アミノ酸の生産性が高い乳酸菌を利用したお酒「にぎりん(菊正宗酒造)」として応用された。さらに煮込み料理などを寝かせた時に感じる「こく」にもD-アミノ酸が関係することが見いだされ、D-アミノ酸を含有したこく味調味料MD-400やPD-400がMCフードスペシャリティーズから市販されている。

D-アミノ酸は呈味性を高める以外にも、食品に生理機

能を付与することを目的として利用されている。資生堂の研究により、角層中のD-Aspが加齢により減少すること、D-Aspを経口摂取すると角層中のD-Asp量が増加することが見いだされた¹⁸⁾。またD-Aspの摂取は肌の保湿性を高め、肌の状態改善に効果があることが明らかになった¹⁸⁾。この効果を期待してD-アミノ酸を含有させたサプリや化粧品が販売されるようになり、資生堂の「綺麗のススめ」はその先駆けとなった商品である。

これまでの膨大なデータ蓄積があるL-アミノ酸に比べてまだまだ研究例が少ないこともあり、D-アミノ酸は食品添加物として認められていない(Ala, Thr, Met, Trpの4種はDL体での使用が認められている)。そこで現状においてD-アミノ酸含有食品は、D-アミノ酸を高生産する食品関連微生物(特に乳酸菌)を利用したり、黒酢などD-アミノ酸を高含有する食品を添加したりすることで開発されている。今後D-アミノ酸が食品添加物として認められるようになれば、D-アミノ酸強化食品がさらに多く店頭に並ぶ日が来るかもしれない。

結合態D-アミノ酸のあれこれ

最後に、結合態D-アミノ酸、つまりペプチドやタンパク質中にアミノ酸残基として存在するD-アミノ酸について述べる。ペプチドグリカンなど微生物が生産するペプチド中にD-アミノ酸が含まれることは古くから知られているが、ヒトを含めた真核生物のペプチドやタンパク質中にも結合態D-アミノ酸が存在することをご存知だろうか? ヒトにおいては、老化による結合態D-アミノ酸の蓄積が加齢性疾患に関係することが報告されている。たとえば、目の水晶体を構成する α -クリスタリンの特定のAsp残基が加齢によりD体化し、さらに白内障の患者ではそれが顕著であることが報告されている¹⁹⁾。これはアミノ酸残基がD体化することでタンパク質の立体構造が変化し、正常な機能が保てなくなるというものである。同様の加齢によるD体化はエラスチンなどの皮膚や動脈壁を構成するタンパク質でも報告されている¹⁹⁾。つまりこれらの結合態D-アミノ酸は、ターンオーバーの低いタンパク質が長年体温で保温されることにより起こる異性化の産物であり、プラスの機能をもたらすものではない。また、角層中のD-Aspが加齢により減少することを先に述べたが、これは遊離アミノ酸の話であることと間違えないで頂きたい。

結合態D-アミノ酸が存在することで、ペプチドとしての機能が高まる例としてクモ毒、 ω -アガトキシ-TKが知られている²⁰⁾。このペプチドは48残基のアミノ酸からなり、C末端から3つ目のSer残基がD体として存在して

いる。このペプチドは初めL体のみでのペプチドとして合成され、翻訳後修飾としてイソメラーゼによりSerがD体へと変換される。このD体化により、本ペプチドの毒性はL体のみの時よりも5倍も上昇することが知られている。哺乳類が生産するペプチド毒素にも、結合態D-アミノ酸が含まれる例が知られており、それはカモノハシの毒液に含まれる2つのペプチド、C-type natriuretic hormone様ペプチド²¹⁾と defencin様ペプチド²²⁾である。これらのペプチドはN末端から2番目のアミノ酸残基がD体化（それぞれD-LeuとD-Met）しており、このD体化も翻訳後修飾により行われる。他にもアメフラシ心臓から単離された心拍動増強ペプチドにもD-Trpを構造中にもつものが発見されている²³⁾。さらに面白いことに、カモノハシイソメラーゼの酵素活性を調べるために合成されたオリゴペプチドを、マウス心臓の破碎液とインキュベートしたところ、異性化が認められた²⁴⁾。これは哺乳類の心臓にもイソメラーゼが発現し、アメフラシのように結合態D-アミノ酸を含有する神経ペプチドが存在・機能していることを示唆しており非常に興味深い。今後、哺乳類からも結合態D-アミノ酸を含む生理活性ペプチドが多数発見されてくるのかもしれない。

ペプチドやタンパク質ではないが、構造中にD-アミノ酸を含む化合物としてリン脂質の一つ、ホスファチジルセリン (PS) を紹介する。これは筆者が大学院生の時にその存在を報告したものであるが、生理的意義があるのかなどその詳細は明らかになっていない。ここではあくまでもD-PSなるリン脂質が生体内に存在することを知って頂ければと思ひ述べさせて頂く²⁵⁻²⁶⁾。筆者が大学院生になった2003年にはすでにマウス脳からSerRが発見されており、脳内におけるD-Ser合成を担っていると考えられていたが、同時にSer分解活性を有することも報告されていた。そのため脳内D-Serの別の供給源、あるいは貯蔵物質が存在するのではないかと当時の指導教員であった江崎信芳先生から提言があった。いくつかの候補の中で、一段階反応でSerが生成されること、それから脳や神経系の細胞に多く存在するリン脂質であることなどから、PSに注目した。マウスやラット大脳から抽出、精製したPSを酸加水分解してHPLCに供したところ、D-Serのピークが検出された。結合態D-アミノ酸の研究を行うときは、酸加水分解を行い遊離アミノ酸としてから分析する必要がある。ただ酸加水分解時にはアミノ酸の異性化が起こるため、検出されたD-アミノ酸は酸加水分解時の副産物に過ぎないのではないかとこの問題が常に付きまとう中、重塩酸・重水中で酸加水分解し、LC/MSで解析を行う方法がこの問題をクリアに

する手法であることをMiyamotoらが報告している²⁷⁾。PSに関しては、二種類のリパーゼを用いて分解したサンプルを分析することで検出されたD-Serが酸加水分解時に生成されたものではないことを示した。具体的にはホスホリパーゼD (PLD) とC (PLC) である。PLDはリン脂質のリン酸と塩基の間のエステル結合を切断する酵素であり、PSの場合Serが遊離してくる。また、PLCはグリセロールとリン酸の間のエステル結合を切断する酵素で、ホスホセリンが遊離してくる。これらの酵素を使用して大脳から抽出したPSを処理したところ、どちらの分析でもD体のピークが検出された。これにより哺乳類脳内にD-PSが存在することを示した。また、ラット大脳の破碎液と³HラベルしたD-Serをインキュベートしたところ、PS画分にD-Serが取り込まれることを見だし、D-PSが生合成されることが示唆された。遊離D-Serが存在しないことが知られている小脳から抽出したPSからはD-PSが検出されなかったことを考えると、SerRにより合成されたD-Serの一部がPSの塩基部分として取り込まれ、D-PSが合成されているのではないかと考えられた。D-PSは大脳に存在するPSの1%程度にしか過ぎないが、特定の細胞に局在している可能性もあり、その細胞で何らかの生理機能を持っているのかもしれない。単なる副産物に過ぎないのか、それとも何らかの生理的意義があるのか、さらに研究を進めたいと思っているテーマの一つである。

さいごに

今回D-アミノ酸について、トピックス的にさまざまな内容を紹介させていただいた。また筆者の不勉強もありそれぞれの内容については、消化不良で物足りなさを感じた方も多いと思うが、本稿が多くの方にD-アミノ酸に興味を持っていただくための入口、機会になれば幸いである。今後もD-アミノ酸に関するさまざまな現象、機能が明らかになっていくことを期待しながら、自身も研究を進めていきたい。

文 献

- 1) Hashimoto, A. *et al.*: *J. Chromatogr.*, **582**, 41 (1992).
- 2) 浜瀬健司ら: *生化学*, **82**, 150 (2010).
- 3) Konya, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 349 (2016).
- 4) 西川 徹: *生化学*, **80**, 267 (2008).
- 5) 鈴木将貴ら: *生物工学*, **92**, 661, (2014).
- 6) 片根真澄: *D-アミノ酸学会誌*, **4**, 1, (2016).
- 7) Kim, P. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3175 (2010).
- 8) Tanaka-Hayashi, A. *et al.*: *Amino Acids*, **47**, 79 (2015).
- 9) Ito, T. *et al.*: *J. Biochem.*, **160**, 345 (2016).

- 10) Sasabe, J. *et al.*: *Nat. Microbiol.*, **1**, 16125 (2016).
- 11) Mutaguchi, Y. *et al.*: *SpringerPlus*, **2**, 691 (2013).
- 12) 郷上佳孝ら: *Trace Nutrients Res.*, **29**, 1 (2012).
- 13) 牟田口祐太ら: *化学と生物*, **53**, 18 (2015).
- 14) 大森勇門ら: 第7回D-アミノ酸研究会学術講演会要旨集, p. 53 (2011).
- 15) 左右田健次: *化学*, **32**, 57 (1977).
- 16) Kawai, M. *et al.*: *Amino Acids*, **43**, 2349 (2012).
- 17) Okada, K. *et al.*: *Amino Acids*, **44**, 489 (2013).
- 18) 芦田 豊ら: *BIO INDUSTRY*, **28**, 40 (2011).
- 19) 藤井紀子ら: *生化学*, **80**, 287 (2008).
- 20) Teramoto, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 134 (1993).
- 21) Torres, A. M. *et al.*: *FEBS Lett.*, **524**, 172 (2002).
- 22) Torres, A. M. *et al.*: *Biochem. J.*, **391**, 215 (2005).
- 23) 森下文浩ら: *比較生理化学*, **28**, 308 (2011).
- 24) Koh, J. M. *et al.*: *Chem. Biodivers.*, **7**, 1603 (2010).
- 25) Omori, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 415 (2009).
- 26) Omori, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1953 (2010).
- 27) Miyamoto, T. *et al.*: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **116**, 105 (2015).