

## Award Accounts

### 第7回 D-アミノ酸学会奨励賞

# 細菌における多機能型 D-アミノ酸代謝酵素

宮本 哲也

北里大学 薬学部

## 1. はじめに

これまで生体を構成するタンパク質中には D-アミノ酸残基（結合型 D-アミノ酸）は含まれていないと考えられてきた。しかし近年、加齢や老化にともなって水晶体のクリスタリンや脳内  $\beta$ -アミロイド中の L-アスパラギン酸 (L-Asp) 残基が非酵素的に異性化し、D-Asp 残基が形成されることが知られており、これらは疾病との関連が指摘されている<sup>1-3)</sup>。また、鶏卵白オボアルブミンにおいては、3 つの L-セリン (L-Ser) 残基の異性化が、タンパク質の熱安定性に寄与することが示唆されている<sup>4, 5)</sup>。このようにタンパク質中に含まれる D-アミノ酸残基が、確かに存在していることが示されている。著者らは D-アミノ酸残基の存在の普遍性を調べるために、大腸菌体内で生合成させた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ中に D-アミノ酸残基が含まれるかどうかを解析したが、D-アミノ酸残基は検出されなかった<sup>6)</sup>。したがって、D-アミノ酸残基の存在は普遍的ではなく、またリボソーム依存的に D-アミノ酸残基がタンパク質に導入される可能性は低いと考えられる。すなわち、結合型 D-アミノ酸の大部分は非酵素的異性化、あるいはイソメラーゼなどによる非リボソーム依存的な導入によるものであると考えられる（なお、上記内容の詳細については著者らの他の文献を参照されたい<sup>7-12)</sup>）。

一方で、細菌は細胞壁にあるペプチドグリカ

ンや抗生物質の構成成分として D-アミノ酸を利用している<sup>13, 14)</sup>。このように D-アミノ酸を積極的に利用している点では、細菌は非常にユニークな生物であるといえる。細菌のペプチドグリカンには、D-アラニン (D-Ala) と D-グルタミン酸 (D-Glu) が普遍的に含まれている。これらの D-アミノ酸は、アミノ酸ラセマーゼによって対応する L-アミノ酸から合成される。また、これらの D-アミノ酸以外にも多様な D-アミノ酸（非標準的 D-アミノ酸）がペプチドグリカンに導入されることが明らかとなっているが、これらの生合成経路に関する知見は乏しい<sup>15, 16)</sup>。ペプチドグリカンに含まれる D-アミノ酸は、細菌の環境適応において重要な役割を果たしていると考えられている<sup>15)</sup>。最近では特に、細菌が形成するバイオフィルムの解体を促進し、またその形成を抑制することで注目を集めている<sup>17-19)</sup>。各種の D-アミノ酸は病原性細菌に対する宿主への感染を阻害すること、また免疫応答や腸内細菌叢に対しても影響を与えることが示唆されており、D-アミノ酸は我々ヒトにとっても重要な機能分子であることが伺える<sup>20-24)</sup>。さらに、腸内細菌叢が合成する D-Ser が腎障害に対して保護作用があることが最近明らかとなった<sup>25)</sup>。本稿では、著者らが明らかにした細菌における多様な D-アミノ酸の生合成経路について概説し、さらに多機能型酵素による D-アミノ酸代謝について紹介する。

## 2. 細菌における多様な D-アミノ酸の存在

前述したように、細菌のペプチドグリカンには通常、D-Ala と D-Glu が含まれているが、乳酸菌においては D-Asp、バンコマイシン耐性菌では D-Ser、ある種の超好熱菌では D-リシン (D-Lys) がその構成成分となっている<sup>26-28)</sup>。これらだけにとどまらず、実際には様々な D-アミノ酸が各種細菌によって生合成されていることが明らかとなってきた<sup>15)</sup>。大腸菌 (*Escherichia coli*) を最少培地、あるいはこれに種々の L-アミノ酸を添加した最少培地で生育させ、その細胞内の D-アミノ酸含量を解析すると、D-Ala と D-Glu 以外にも D-Ser、D-Asp、D-ロイシン (D-Leu) および D-バリン (D-Val) といった様々な D-アミノ酸が検出された (表 1)<sup>7)</sup>。最少培地中には D-アミノ酸が一切含まれていないため、これらの D-アミノ酸は大腸菌が生合成したものであると考えられる。また、大腸菌や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の培養上清中にも様々な D-アミノ酸が検出されることが報告されている<sup>15)</sup>。そこで、著者らは大腸菌および枯草菌を対象に多様な D-アミノ酸の生合成経路を探索し、機能未知であった推定アミノ酸ラセマーゼの D-アミノ酸合成能を解析した。

## 3. 細菌における多様な D-アミノ酸の生合成

細菌において、D-アミノ酸は主にアミノ酸ラ

セマーゼによって生合成される。このアミノ酸ラセマーゼは、ピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素とする PLP 依存型酵素と PLP を必要としない PLP 非依存型酵素に大別される<sup>29)</sup>。例えば、ペプチドグリカンに通常含まれる D-Ala と D-Glu は、それぞれ PLP 依存型の Ala ラセマーゼ、PLP 非依存型の Glu ラセマーゼによって生合成される。これら以外にも、細菌は様々なアミノ酸ラセマーゼを有しているが、その詳細については他の総説を参照されたい<sup>14, 30)</sup>。興味深いことは、細菌は特定の D-アミノ酸のみを合成するアミノ酸ラセマーゼだけでなく、多様な D-アミノ酸を合成することができるアミノ酸ラセマーゼも有していることである。最近になって、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) やシュードモナス属 (*Pseudomonas putida*) において、このような基質特異性の幅広いアミノ酸ラセマーゼが発見されている<sup>31, 32)</sup>。

著者らは、以上のような経緯で大腸菌および枯草菌からそれぞれ YgeA、RacX という基質特異性の幅広い PLP 非依存型のアミノ酸ラセマーゼを見出した<sup>33)</sup>。大腸菌由来 YgeA は、15 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示し、その中でもタンパク質構成アミノ酸ではないホモセリン (Hse) に対して最も高い活性を示した。また、枯草菌由来 RacX では、16 種類のアミノ酸に対して活性を示し、Lys、アルギニン、オルニチンといった塩基性アミノ酸に対する活性

表 1 大腸菌細胞内の D-アミノ酸含量

| 培養条件       | 標準的 D-アミノ酸 |       | 非標準的 D-アミノ酸 |       |       |       |
|------------|------------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|            | D-Ala      | D-Glu | D-Ser       | D-Asp | D-Leu | D-Val |
| 最少培地       | 44         | 25    | 0.6         | 0.2   | 0.3   | ND    |
| L-アミノ酸添加培地 | 52         | 38    | 1.3         | 0.2   | ND    | 0.3   |

ND: not detected

D-アミノ酸含量 (D% = D/(D+L)) は、総アミノ酸量に対する D-アミノ酸量の割合として示した。文献 7 を基に作成。詳しくは文献 7 を参照。

が高いことが明らかとなった。両酵素間における至適 pH、至適温度およびホモ二量体といった高次構造についてはよく似ていた。両酵素のラセマーゼ活性の動力学定数を解析すると、既知のアミノ酸ラセマーゼと比較して低レベルであることが明らかとなった。細菌において D-アミノ酸は、前述したような重要な機能があるものの、高濃度で存在する場合は、タンパク質合成阻害を引き起こすため、生育など各種の活動に悪影響を与える<sup>34, 35</sup>。そのため、細菌は非標準的な D-アミノ酸の細胞内レベルを低く保ちつつ、ペプチドグリカンの構成成分として適宜利用している可能性が考えられる。

#### 4. シスタチオニンβ-リアーゼ

シスタチオニンβ-リアーゼは、細菌の L-メチオニン (L-Met) 生合成経路においてシスタチオニンをホモシステイン、ピルビン酸およびアンモニアへと分解する反応を触媒する PLP 依存型の酵素である (図 1)。また、L-システイン (L-Cys) をピルビン酸、硫化水素およびアンモニアへと分解する。大腸菌においては、2 つのシスタチオニンβ-リアーゼ、MetC および MalY が存在している。著者らの解析において、両酵素は D-Cys に対してはリアーゼ活性を示さなかった。

両酵素の L-Cys に対するリアーゼ活性の触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は、MetC の方が約 40 倍高いことが確認された<sup>36</sup>。また、至適 pH は両酵素とも 7.0 であり、全体的に類似したプロファイルを示した。その一方で、至適温度は MetC が 37°C、MalY が 45°C であり、MetC は 50°C 以降も同程度の活性を有していたが、MalY は 50°C 以降急激に活性が低下した。

#### 5. シスタチオニンβ-リアーゼによる D-アミノ酸代謝

最近になって、このシスタチオニンβ-リアーゼ (MetC あるいは MalY) を D-Ala 要求性の大腸菌株 (2 つの Ala ラセマーゼを欠損させた大腸菌株) に供給すると、培地中に D-Ala を添加せずとも生育できるようになることが報告された<sup>37</sup>。このことから、シスタチオニンβ-リアーゼは D-Ala を合成する能力を有すると考えられた。そこで著者らは、大腸菌の有する 2 つのシスタチオニンβ-リアーゼ (MetC および MalY) の D-アミノ酸合成能 (アミノ酸ラセマーゼ活性) を解析した<sup>36</sup>。その結果、両酵素は Ala に対するラセマーゼ活性以外にも、MetC は 13 種類、MalY は 12 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を有することが初めて明らかとなった。両酵素とも

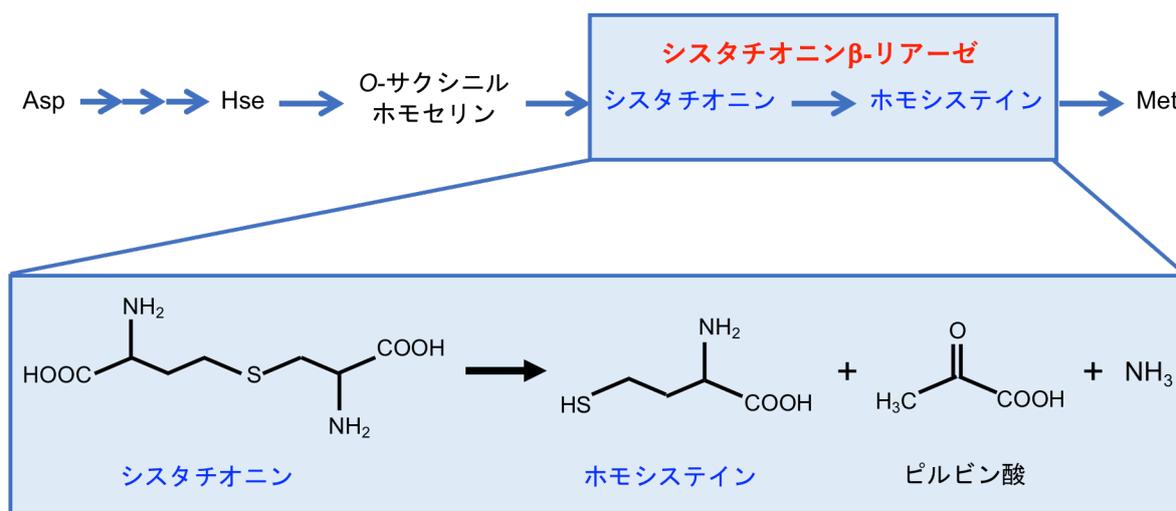


図 1 細菌における L-Met 生合成経路

シスタチオニンβ-リアーゼは、シスタチオニンをホモシステイン、ピルビン酸およびアンモニアへと分解する反応を触媒する。

に Ala に対するラセマーゼ活性が最も高く、その  $k_{cat}/K_m$  は MetC の方が約 260 倍高かった。MetC においては、2-アミノ酪酸や Ser に対しても比較的高いラセマーゼ活性を有することが確認され、 $k_{cat}/K_m$  は Ala に対するラセマーゼ活性に比べて、それぞれ約 25 倍、約 40 倍程度低かった。また、至適 pH は MetC が 9.0、MalY が 10.0 であり、至適温度は MetC が 50~55°C、MalY が 37°C であった。これらは上記のリアーゼ活性における至適 pH および至適温度とは異なるものであった。その他、乳酸菌由来の MalY においても、アミノ酸ラセマーゼ活性を有することが報告されている<sup>38)</sup>。

さらに、著者らはシスタチオンβ-リアーゼが Ser デヒドラターゼ活性を有していることを新たに見出した<sup>36)</sup>。MetC は、D-Ser および L-Ser に対するデヒドラターゼ活性を有しており、MalY は微弱ではあるものの L-Ser に対してのみデヒドラターゼ活性を有していた。スレオニンや Hse に対しては、活性を示さなかった。MetC のデヒドラターゼ活性における至適 pH は 10.0、至適温度は 50°C であり、上記のリアーゼ活性やラセマーゼ活性のものとは異なっていた。MetC の L-Ser に対する  $k_{cat}/K_m$  は、D-Ser に対するものと比べて、約 14 倍高かった。さらに、MetC の 3 つの反応における  $k_{cat}/K_m$  を比較してみると、Ala ラセマーゼ活性と Ser デヒド

ラターゼ活性は、ほぼ同程度であり、Cys リアーゼ活性はこれらより約 1.5 倍だけ高いことが明らかとなった(表 2)。すなわち、MetC のこれら 3 つの反応を司る活性は、ほぼ同レベルであることが伺える。したがって、シスタチオンβ-リアーゼは、異なる 3 つの活性を有する多機能型酵素であり、L-Met 生合成経路に關与するだけでなく、多様な D-アミノ酸の生合成や D-Ser および L-Ser 代謝に關与している可能性が示唆された(図 2)。

## 6. おわりに

細菌における D-アミノ酸の生合成経路は、よく知られている Ala ラセマーゼや Glu ラセマーゼによる合成だけではなく、その他にも複数存在していることが明らかとなった。シスタチオンβ-リアーゼのように、D-アミノ酸代謝能を持ち合わせている酵素もあり、このような多機能型酵素の存在を考慮すると、D-アミノ酸代謝能を有する酵素は予想以上に数多く存在するのではないかと期待される。また、細菌が合成する多様な D-アミノ酸がもたらす生理的影響については、今後さらに明らかにしていかなければならない。これらは細菌自身に与える影響だけでなく、我々ヒトを含めた宿主に対する影響についても、十分に精査する必要がある。

表 2 MetC における各種酵素活性

| 酵素活性    | 基質    | $K_m$<br>(mM)    | $k_{cat}$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_m$<br>( $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ) |
|---------|-------|------------------|------------------------------------|---|
| ラセマーゼ   | L-Ala | $5.9 \pm 0.7$    | $353 \pm 10$                       | $60.2 \pm 7.0$  |
|         | D-Ala | $13.6 \pm 1.0$   | $727 \pm 36$                       | $53.7 \pm 1.5$  |
| デヒドラターゼ | L-Ser | $1.24 \pm 0.08$  | $69.2 \pm 2.2$                     | $55.7 \pm 1.7$  |
|         | D-Ser | $15.26 \pm 2.72$ | $60.1 \pm 3.9$                     | $4.0 \pm 0.5$   |
| リアーゼ    | L-Cys | $2.1 \pm 0.2$    | $192 \pm 14$                       | $92.1 \pm 2.7$  |

それぞれの値は、平均値 ± 標準偏差 ( $n = 3$ ) として示した。文献 36 を基に作成。詳しくは文献 36 を参照。



- of peptides detected by the liquid chromatography/tandem mass spectroscopy. *Chemistry & Biodiversity*. 7: 1644–1650.
- 9) Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, Hidaka M, Watanabe H, Homma H, Masaki H. 2016. Detection of diastereomer peptides as the intermediates generating D-amino acids during acid hydrolysis of peptides, *Amino Acids*. 48: 2683–2692.
  - 10) 宮本哲也, 本間 浩. 2018. D-アミノ酸残基を含むペプチド及びタンパク質：新規精密検出法の開発. *化学と生物*. 56: 18–25.
  - 11) Miyamoto T, Homma H. 2018. Detection and quantification of D-amino acid residues in peptides and proteins using acid hydrolysis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 1866: 775–782.
  - 12) Ishii C, Miyamoto T, Ishigo S, Miyoshi Y, Mita M, Homma H, Ueda T, Hamase K. 2017. Two-dimensional HPLC-MS/MS determination of multiple D-amino acid residues in the proteins stored under various pH conditions, *Chromatography*. 38: 65–72.
  - 13) Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. 2011. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci*. 68: 817–831.
  - 14) Radkov AD, Moe LA. 2014. Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 5363–5374.
  - 15) 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.
  - 16) Cava F, de Pedro MA, Lam H, Davis BM, Waldor MK. 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J*. 30: 3442–3453.
  - 17) Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. 2010. D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*. 328: 627–629.
  - 18) Leiman SA, May JM, Lebar MD, Kahne D, Kolter R, Losick R. 2013. D-Amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. *J Bacteriol*. 195: 5391–5395.
  - 19) Aliashkevich A, Alvarez L, Cava F. 2018. New insights into the mechanisms and biological roles of D-amino acids in complex eco-systems. *Front Microbiol*. 9: 683.
  - 20) Connolly JP, Goldstone RJ, Burgess K, Cogdell RJ, Beatson SA, Vollmer W, Smith DG, Roe AJ. 2015. The host metabolite D-serine contributes to bacterial niche specificity through gene selection. *ISME J*. 9: 1039–1051.
  - 21) Connolly JP, Gabrielsen M, Goldstone RJ, Grinter R, Wang D, Cogdell RJ, Walker D, Smith DG, Roe AJ. 2016. A highly conserved bacterial D-serine uptake system links host metabolism and virulence. *PLoS Pathog*. 12: e1005359.
  - 22) 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. *Nat Microbiol*. 1: 16125.
  - 23) Kepert I, Fonseca J, Müller C, Milger K, Hochwind K, Kostic M, Fedoseeva M, Ohnmacht C, Dehmel S, Nathan P, Bartel S, Eickelberg O, Schloter M, Hartmann A, Schmitt-

- Kopplin P, Krauss-Etschmann S. 2016. D-Tryptophan from probiotic bacteria influences the gut microbiome and allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 139: 1525–1535.
- 24) Lee RJ, Hariri BM, McMahon DB, Chen B, Doghramji L, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Jiang P, Margolskee RF, Cohen NA. 2017. Bacterial D-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells. *Sci Signal.* 10: eaam7703.
- 25) Nakade Y, Iwata Y, Furuichi K, Mita M, Hamase K, Konno R, Miyake T, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Kamikawa Y, Sato K, Oshima M, Yoneda-Nakagawa S, Yamamura Y, Kaneko S, Miyamoto T, Katane M, Homma H, Morita H, Suda W, Hattori M, Wada T. 2018. Gut microbiota-derived D-serine protects against acute kidney injury. *JCI Insight.* 3: e97957.
- 26) Bellais S, Arthur M, Dubost L, Hugonnet JE, Gutmann L, van Heijenoort J, Legrand R, Brouard JP, Rice L, Mainardi JL. 2006. Asl<sub>fm</sub>, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem.* 281: 11586–11594.
- 27) Grohs P, Gutmann L, Legrand R, Schoot B, Mainardi JL. 2000. Vancomycin resistance is associated with serine-containing peptidoglycan in *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol.* 182: 6228–6232.
- 28) Boniface A, Parquet C, Arthur M, Mengin-Lecreulx D, Blanot D. 2009. The elucidation of the structure of *Thermotoga maritima* peptidoglycan reveals two novel types of cross-link. *J Biol Chem.* 284: 21856–21862.
- 29) 吉村 徹. 2008. アミノ酸ラセマーゼの構造と機能. *生化学.* 80: 324–330.
- 30) Hernández SB, Cava F. 2016. Environmental roles of microbial amino acid racemases. *Environ Microbiol.* 18: 1673–1685.
- 31) Espaillat A, Carrasco-López C, Bernardo-García N, Pietrosevoli N, Otero LH, Álvarez L, de Pedro MA, Pazos F, Davis BM, Waldor MK, Hermoso JA, Cava F. 2014. Structural basis for the broad specificity of a new family of amino-acid racemases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 70: 79–90.
- 32) Radkov AD, Moe LA. 2013. Amino acid racemization in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* 195: 5016–5024.
- 33) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Homma H. 2017. Identification and characterization of novel broad-spectrum amino acid racemases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Amino Acids.* 49: 1885–1894.
- 34) Soutourina J, Plateau P, Blanquet S. 2000. Metabolism of D-aminoacyl-tRNAs in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biol Chem.* 275: 32535–32542.
- 35) Soutourina O, Soutourina J, Blanquet S, Plateau P. 2004. Formation of D-tyrosyl-tRNA<sup>Tyr</sup> accounts for the toxicity of D-tyrosine toward *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 279: 42560–42565.
- 36) Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M, Homma H. 2018. Cystathionine β-lyase is involved in D-amino acid metabolism. *Biochem J.* 475: 1397–1410.
- 37) Kang L, Shaw AC, Xu D, Xia W, Zhang J, Deng J, Wöldike HF, Liu Y, Su J. 2011. Upregulation

of MetC is essential for D-alanine-independent growth of an *alr/dadX*-deficient *Escherichia coli* strain. J Bacteriol. 193: 1098–1106.

- 38) Kato S, Oikawa T. 2018. A novel bifunctional amino acid racemase with multiple substrate specificity, MalY from *Lactobacillus sakei* LT-13: Genome-based identification and enzymological characterization. Front Microbiol. 9: 403.



宮本 哲也 (みやもと てつや)

略歴

2002–2006 東京薬科大学生命科学部  
分子生命科学科

2006–2011 東京大学大学院農学生命科学研究科  
博士(農学)

2013-現在 北里大学薬学部 助教