

Award Accounts

第13回 D-アミノ酸学会奨励賞

共生細菌が乱すアミノ酸ホモキラリティとその制御

権田 裕亮¹⁾²⁾, 笹部 潤平¹⁾

慶應義塾大学医学部¹⁾, 順天堂大学小児科²⁾

Impact of chiral conversion by symbiotic microbes on mammalian homeostasis of chiral amino acids

Yusuke GONDA¹⁾²⁾, Jumpei SASABE¹⁾

Keio University School of Medicine¹⁾,
Dept. of Pediatrics, Juntendo University school of Medicine²⁾

1.はじめに

生命には、様々なホモキラリティが存在する。例えばヒトの体では、心臓が左、肝臓が右と構造上で左右が決められている。分子レベルでは、アミノ酸がその代表例であり、アミノ酸には分子構造や物質量が同じ光学異性体(L体とD体)が存在するが、蛋白質を構成するアミノ酸はすべてL体が利用されている。このようなホモキラリティは、生命の不思議の一つであるが、近年の解析技術の進歩により、哺乳類の体内には微量なD-アミノ酸が存在することが明らかにされた。本稿では、哺乳類がどのようにして体内のアミノ酸ホモキラリティを維持しているかについて概説する。

2. 哺乳類に存在する D-アミノ酸と DAO による調節

これまでの研究によると、哺乳類には内因性と外因性のD-アミノ酸が存在している^{1,2)}。内因

性D-アミノ酸は、D-セリンとD-アスパラギン酸が知られており、これらは内在性に発現する酵素であるアミノ酸ラセマーゼにより、L-体からD-体に変換・合成される³⁾。内因性D-アミノ酸は、哺乳類での神経伝達^{3,4)}や神経発生^{5,6)}、内分泌機能や生殖機能^{7,8)}などにおいて重要な役割を果たしている。一方で、外因性のD-アミノ酸は細菌から合成されるものが知られており、細菌は様々なアミノ酸ラセマーゼによりD-アラニンやD-プロリンなどのD-アミノ酸を合成し、哺乳類の腸内細菌叢や腸内免疫機能に関与している^{2,9)}。また、海産物や発酵食品に含まれる食事由来のD-アミノ酸(D-セリンやD-アラニン、D-アスパラギン酸など)も、外因性のD-アミノ酸として知られている¹⁰⁾。

では哺乳類は、どのようにしてこれら内因性・外因性のD-アミノ酸を代謝・調整しているのか。一つの候補として、腎臓によるD-アミノ酸排泄が考えられる。哺乳類の血液中のアミノ

【責任著者/Corresponding Author】

笹部潤平 慶應義塾大学医学部 〒160-0016 東京都新宿区信濃町 35 TEL: 03-5363-3772
Jumpei Sasabe, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, 160-0016, Tokyo
E-mail: sasabe@keio.jp

酸はほとんどがL-体であり、血液中のD-体はL-体の1%以下しか存在しないが、尿中にはL-体と同等かそれ以上にD-体が含まれており^{11,12)}、哺乳類は腸管で吸収したD-アミノ酸を腎臓から排泄していると考えられる。また、哺乳類にはDAOとD-アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO)の二つのD-アミノ酸分解酵素が存在しており、DDOはD-アスパラギン酸を分解し、DAOはそれ以外の外因性D-アミノ酸のほとんどを分解するため^{13,14)}、DAOによるD-アミノ酸の分解も重要と考えられる。DAO活性を持たないマウスでは、血液や尿、中枢神経、末梢臓器(肝臓や腎臓など)でのD-アミノ酸の濃度が著しく増加することが知られている^{11,15,16)}。

3. 細菌によるアミノ酸ホモキラリティの攪乱とその制御

他の生物とは異なり、細菌は自ら多様なD-アミノ酸を合成し、細菌細胞壁のペプチドグリカン構造への利用やバイオフィーム制御などに役立っている¹⁷⁾。筆者らは、共生細菌が哺乳類のアミノ酸キラルバランスを破壊する可能性があるとして仮定し、共生細菌の存在する(SPF)環境と無菌(GF)環境で飼育した、野生型(WT)マウスとDAO活性欠損(DAO^{G181R})マウスの血液・尿・便のアミノ酸キラル分析を行った。実験の際、食事によるD-アミノ酸の影響を除くために、D-アミノ酸を含まないL-アミノ酸食を与えた。

その結果、SPF環境のWTマウスの便中には、D-アラニン、D-プロリン、D-セリン、D-アルギニンなど多くのD-アミノ酸が含まれており、GF環境になるとそれらのほとんどが検出されなくなるため、哺乳類の消化管内に存在するほとんどが細菌由来のD-アミノ酸であると考えられた。そのうち最も量が多かったD-アラニンは、代表的な細菌性D-アミノ酸と考えられた。一方で、血液中のD-セリンとD-リジンの一部は、GF環境のWTマウスでも検出されたため、これらは哺乳類から合成される内因性D-アミノ酸と考えられた。また、SPF環境のDAO^{G181R}マウスでは、SPF環境のWTマウスと比較して、血液中の全L-アミノ酸濃度に対する全D-アミノ酸濃度比(D/L-AA比)は0.5%以下から2.9%まで上昇し、哺乳類のD/L-アミノ酸バランスに乱れが生じていた。便中ではD/L-AA比に変化はなかったが、尿中でD/L-AA比は23%から200%と著明に増加していた。以上より、DAOは腸内のD-アミノ酸量には影響を及ぼさないが、DAOで代謝しきれない細菌性D-アミノ酸は、腎臓から排泄されていると考えられた。

哺乳類は共生細菌が作るD-アミノ酸により、アミノ酸ホモキラリティのバランスが崩れる可能性があるが、DAOによる代謝と腎排泄により、L-体・D-体のバランスを維持していると推察された(図1)。

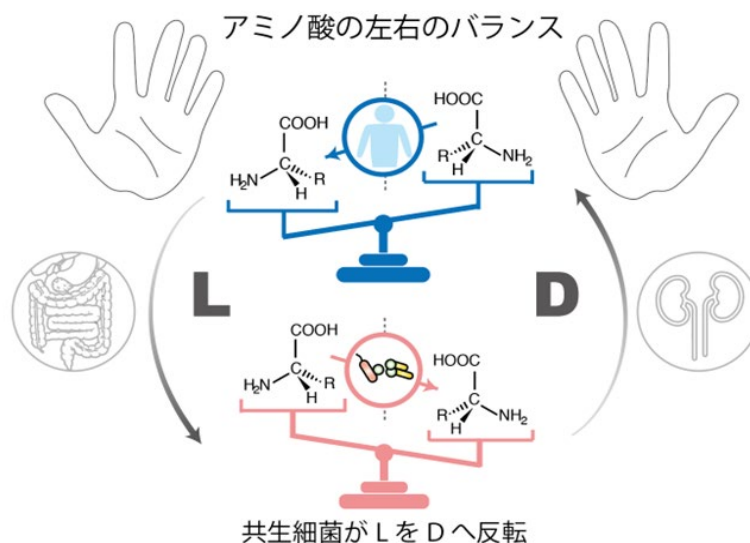


図1 体内で左手型アミノ酸の優位性を維持するためのシステム

4. 母親による胎児のアミノ酸ホモキラリティの維持

では、DAO や腎排泄によるアミノ酸ホモキラリティの制御は、胎児期に遡っても認められるのだろうか。著者らは、WT と DAO^{G181R} の母マウスに、WT と DAO^{G181R} の胎児マウスを移植し、胎生 16 日目のアミノ酸キラル分析を行った (図 2A)。共生細菌由来と哺乳類由来としてアラニンとセリンを解析した。DAO^{G181R} の母マウスは、WT の母マウスに比較して、血液中の D-アラニンと D-セリンがともに増加しており (図 2B)、前述の WT と DAO^{G181R} マウスの結果と同様であった。一方で、胎児の血液中 D/L-アミノ酸比は、胎児の DAO の遺伝子型に依らず、DAO^{G181R} の母マウスでのみ有意に上昇していた (図 2C)。実際、ウエスタンブロットでは胎児腎臓の DAO

の蛋白発現を認めなかったことから、胎児の血液中の D-アミノ酸は母マウスの DAO により制御されていると考えられた。注目すべきは、母が WT マウスの場合、胎児の尿とされる羊水の D/L-アミノ酸比が、血液の D/L-アミノ酸比と同様に非常に低いことであり (図 2D)、胎盤も同様の結果だった (図 2E)。特に、細菌性 D-アミノ酸である D-アラニンが羊水や胎盤で非常に少ないことから、子宮内には共生細菌がほとんどいない環境であることが示唆された。古くから妊娠中のヒトの羊水や胎盤は無菌環境と言われており¹⁸⁾、D-アミノ酸の観点からもこれを支持していると考えられる。つまり、胎児は細菌が共生していない子宮内の環境では、母親の DAO により内因性・外因性 D-アミノ酸を代謝し、アミノ酸キラルバランスを維持していると推察された。

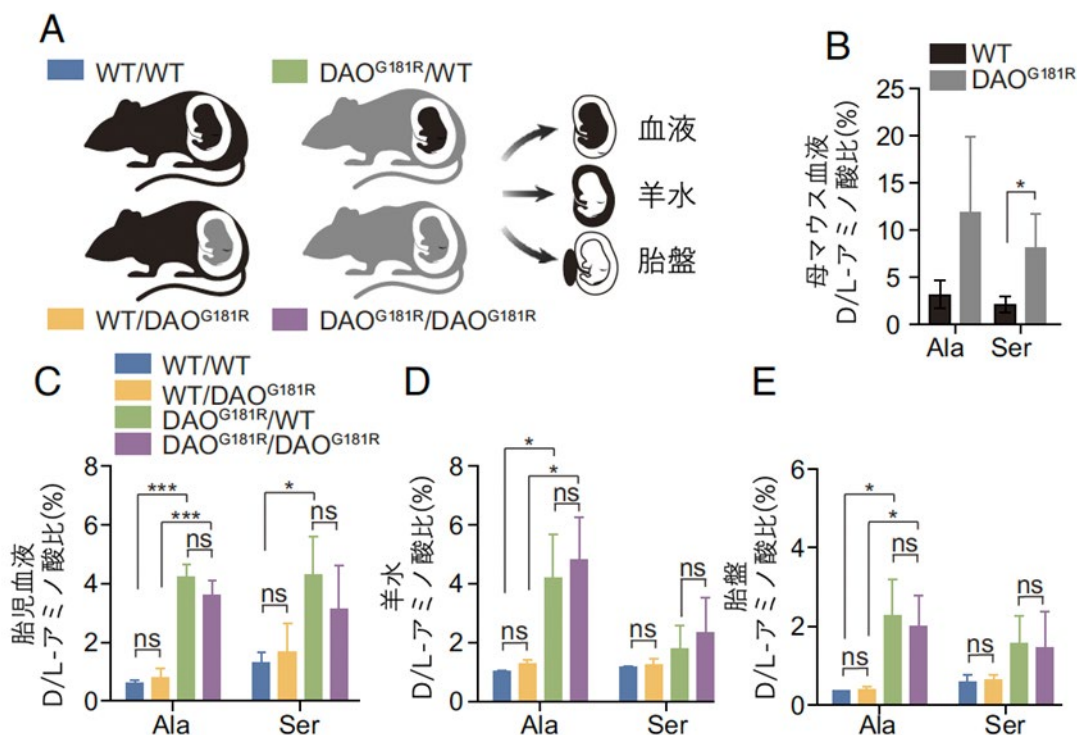


図 2 母マウスによる胎児アミノ酸ホモキラリティの制御

(A) 野生型 (WT) と DAO 活性欠損 (DAO^{G181R}) の胎児マウスを WT もしくは DAO^{G181R} 母マウスに移植した。(B-E) 胎生 16 日目のアラニンとセリンの D/L-アミノ酸濃度比。(B) 母マウス血液。(C) 胎児血液。(D) 羊水。(E) 胎盤。

*P<0.05. **P<0.01. ***P<0.001. 文献 20 より一部改変

5. 発達期の腸内細菌叢形成と DAO 代謝の始まり

さらに筆者らは、出生後の腸内細菌叢の形成と D-アミノ酸代謝の関係について明らかにするため、出生後の WT マウスのアラニンとセリンの D/L-アミノ酸分析と 16s rRNA qPCR による腸内細菌定量を行った。その結果、腸内細菌量は出生後より徐々に増加し、生後 14 日目 (P14) 以降に出生直後の 100~350 倍にまで増加していた (図 3A)。これは、マウスの離乳の時期と一致していた。出生後の全結腸に含まれる D-アラニンと D-セリン量は、腸内細菌量と有意に相関し、特に D-アラニンで強い相関を示した (図 3A・3B)。このことにより、生後のマウスの腸内では、D-アラニンが腸内細菌の存在量を反映していると考えられた。一方で、血液中の D/L-アミノ酸比は、出生後からセリンとアラニンともに一定量で推移しており、出生直後から一貫した L-アミノ酸有意性を維持していた (図 3C)。また、尿の D-アミノ酸排泄率 (FEAA) は、P14 から急激に低下しており (図 3D)、腎臓での D-アミ

ノ酸の再吸収の増加を裏付ける結果と考えられた。実際、腎臓の DAO の発現量は、出生後から徐々に増加し、P14 に成人レベルと同等になった (図 3E)。一般的に、腎臓の糸球体から濾過された L-アミノ酸は、近位尿細管でほぼ 100% が再吸収されるのに対し、効率は相対的に L-アミノ酸より低いものの D-アミノ酸も再吸収を受ける (図 3D)。腎臓の DAO は主に近位尿細管に発現していることから^{13,19)}、離乳時期に腸内細菌量が急激に増えると、近位尿細管での D-アミノ酸再吸収に合わせて、腎臓の DAO 発現量が増加し、出生後の細菌共生によるキラルアミノ酸のバランスの乱れに対応していると考えられた。

また筆者らは、マウスのみならず健康人ボランティア (24 名) の血液、尿、便の D/L-アミノ酸解析と便の菌叢解析も行っており、ヒトの便の D-アミノ酸は、特定の分類の腸内細菌には相関せず、便中の細菌存在量と比例することを明らかにした²⁰⁾。このことから、D-アミノ酸の合成は、ヒトにおいても共生細菌叢の存在そのものを裏付けていると言えるであろう。

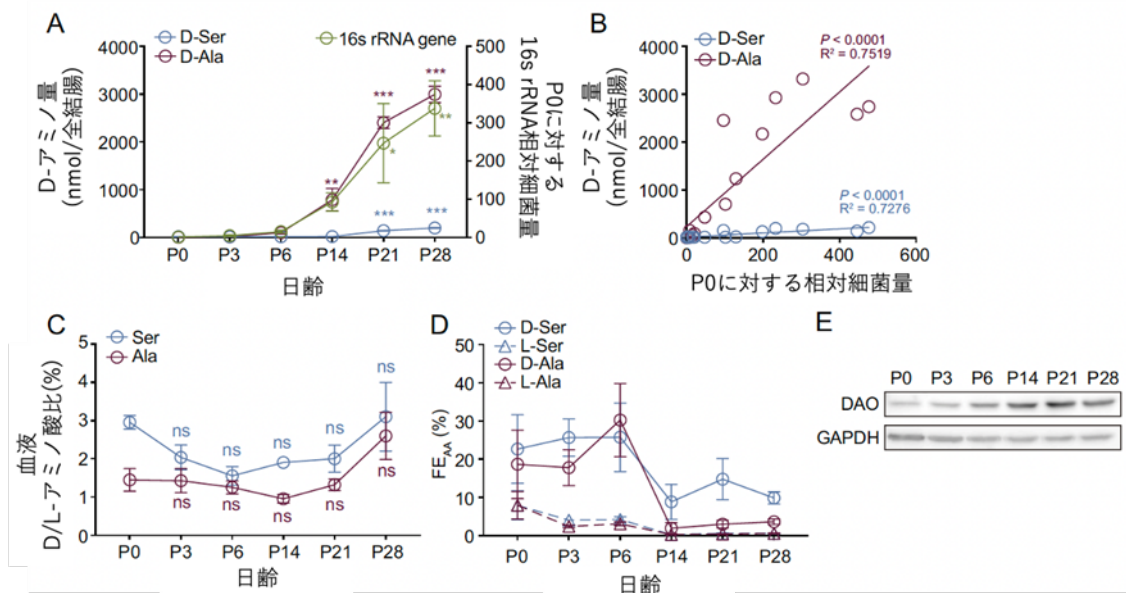


図 3 発達期マウスにおけるアミノ酸キラルバランスの変化

(A) 生後 0 日 (P0) から 28 日 (P28) までの C57BL/6 マウスの全結腸中の D-アミノ酸量 (左軸) と、P0 に対する 16S rRNA 遺伝子量に基づく相対細菌量 (右軸)。 (B) 全結腸中の D-アミノ酸量と相対細菌量の相関関係。 (C-D) P0 から P28 までの血液中の D/L-アミノ酸濃度比 (C) と尿中 D-アミノ酸排泄率 (D)。 (E) P0 から P28 までの腎臓 DAO と GAPDH のウエスタンブロットによるタンパク質発現量。文献 20 より一部改変

6. おわりに

本稿では、哺乳類における細菌の共生と、それに伴う D-アミノ酸代謝の変化とアミノ酸ホモキラリテの維持機構について述べた。DAO は、細菌の共生がない胎児期では働かないが、出生後に細菌が共生し始めると腎臓での DAO 代謝が始まり、アミノ酸キラルバランスを維持していると考えられた。今後、D-アミノ酸の挙動の理解をさらに深めることで、細菌との共生関係の異常に関連する疾患群（免疫・アレルギー性疾患や代謝性疾患、神経疾患など）のメカニズムの理解や新たな治療標的の開発に役立つことが期待される。

参考文献

- 1) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, et al. The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett.* **296(1)**:33-36, 1992
- 2) Sasabe J, Miyoshi Y, Rakoff-Nahoum S, et al. Interplay between microbial d-amino acids and host d-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat Microbiol.* **1(10)**:16125, 2016
- 3) Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96(23)**:13409-13414, 1999
- 4) Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, et al. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(9)**:4926-4931, 2000
- 5) Sakai K, Homma H, Lee JA, et al. Emergence of D-aspartic acid in the differentiating neurons of the rat central nervous system. *Brain Res.* **808(1)**:65-71, 1998
- 6) Wolosker H, D'Aniello A, Snyder SH. D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience.* **100(1)**:183-189, 2000
- 7) Schell MJ, Cooper OB, Snyder SH. D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(5)**:2013-2018, 1997
- 8) Sakai K, Homma H, Lee JA, et al. Localization of D-aspartic acid in elongate spermatids in rat testis. *Arch Biochem Biophys.* **351(1)**:96-105, 1998
- 9) Suzuki M, Sujino T, Chiba S, et al. Host-microbe cross-talk governs amino acid chirality to regulate survival and differentiation of B cells. *Sci Adv.* **7(10)**, 2021
- 10) Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids.* **49(9)**:1521-1533, 2017
- 11) Miyoshi Y, Hamase K, Tojo Y, Mita M, Konno R, Zaitso K. Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **877(24)**:2506-2512, 2009
- 12) Suzuki M, Shimizu-Hirota R, Mita M, Hamase K, Sasabe J. Chiral resolution of plasma amino acids reveals enantiomer-selective associations with organ functions. *Amino Acids.* **54(3)**:421-432, 2022
- 13) Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci.* **64(11)**:1373-1394, 2007
- 14) Katane M, Homma H. D-aspartate oxidase: the sole catabolic enzyme acting on free D-aspartate in mammals. *Chem Biodivers.* **7(6)**:1435-1449, 2010
- 15) Nagata Y, Konno R, Yasumura Y, Akino T. Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of free D-amino acids in mice. *Biochem J.* **257(1)**:291-292, 1989
- 16) Miyoshi Y, Hamase K, Okamura T, et al. Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879(29)**:3184-3189, 2011
- 17) Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci.* **68(5)**:817-831, 2011
- 18) Segata N. No bacteria found in healthy placentas. *Nature.* **572(7769)**:317-318, 2019
- 19) Perotti ME, Gavazzi E, Trussardo L, Malgaretti N, Curti B. Immunoelectron microscopic localization of D-amino acid oxidase in rat kidney and liver. *Histochem J.* **19(3)**:157-169, 1987
- 20) Gonda Y, Matsuda A, Adachi K, et al. Mammals sustain amino acid homochirality against chiral conversion by symbiotic microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **120(15)**:e2300817120, 2023



権田 裕亮 (ごんだ ゆうすけ) 氏

略歴

- 2006-2012 杏林大学医学部
- 2012-2014 済生会川口総合病院初期臨床研修
- 2014-2017 順天堂大学医学部附属順天堂医院 小児科
- 2017-2021 順天堂大学大学院医学研究科 小児思春期発達・病態学
- 2019-2021 慶應義塾大学医学部薬理学 共同研究員
- 2021-2022 順天堂大学医学部附属浦安病院 小児科 助手
- 2022-2023 埼玉県立小児医療センター 腎臓科
- 2023-2024 順天堂大学医学部附属浦安病院 小児科 助教
- 2024-現在 権田医院キッズニイクリニック 院長