

野菜および果物中のD-アミノ酸の定量分析と植物におけるD-アミノ酸の生合成機構

郷上佳孝^{1,2)}, 伊藤克佳¹⁾, 老川典夫^{1,2)}

(¹⁾関西大学工学部生物工学科*, (²⁾関西大学ハイテクリサーチセンター**)

Studies on Biosynthesis of D-Amino Acid in Plant: The Quantitative Analysis of D-Amino Acids in Vegetables and Fruits

Yoshitaka GOGAMI^{1,2)}, Katsuyoshi ITO¹⁾ and Tadao OIKAWA^{1,2)}

¹⁾*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University, Suita Osaka 564-8680*

²⁾*Kansai University High Technology Research Center, Suita, Osaka 564-8680*

Summary

Various free- and bound- forms of D-amino acids occur not only in bacteria but also in yeast, plants, insects, and mammals. For example, D-alanine and D-glutamate are found as the essential amino acid residues of peptidoglycan in a bacterial cell wall. The bacterial enzymes participating in D-amino acid metabolism, in particular amino acid racemases and D-amino acid aminotransferase, have been studied in detail. Recently the analytical techniques for D-amino acid measurement have developed, and we can rapidly determine various D-amino acids contents in organisms and tissues with high sensitivity to investigate their physiological roles. In marine and euryhaline invertebrates, D-alanine was shown to be involved in the osmotic stress response. In mammals, D-serine acts as a neuro-modulator whereas D-aspartate plays various neuronal and endocrine roles. Several D-amino acids were also found in plants, *i.e.* D-alanine and D-glutamate occur in pea seedling, but their metabolisms and physiological roles are not clarified at all. In this study, we analyzed D-amino acids contents in various vegetables and fruits and examined the biosynthetic pathway of D-amino acid in plant.

D-アミノ酸はかつて非天然型と考えられていたが、近年の分析技術の向上に伴い、細菌のみならず、昆虫、植物および動物においてもその存在が明らかにされてきた。D-アラニンやD-グルタミン酸は細菌細胞壁のペプチドグリカンの必須構成成分として知られ、またD-バリンは、ペプチド性抗生物質や農薬の原料として用いられている。微生物のD-アミノ酸の生合成には、アミノ酸ラセマーゼの触媒するL-アミノ酸からD-アミノ酸への直接変換およびD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの触媒するアミノ基転移による相互変換など、主にピリドキサル酵素が関与することが分かっている。植物では遊離および結合態で数種類のD-アミノ酸が存在することが明らかになっており、さらにD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの存在も報告されているが、植物のD-アミノ酸の生理的役割や生合成機構は不明のままである。最近、動物の脳内にD-セリンやD-アスパラギン酸の存在が明らかとなり、神経系や内分泌系の調節などの重要な生理機能への関与が示唆されている。ヒトの体内に存在するD-アミノ酸は、体内で生合成されるかあるいは食物から摂取されるかのいずれかの可能性が高い。そこで本研究では、野菜および果物中に含まれるD-アミノ酸の定量分析を行うとともに、植物におけるD-アミノ酸の生合成機構を解明することを目的とする。

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

実験方法

1. 野菜, 果物, スプラウト中のD-アミノ酸の定量分析

試料を乳鉢に入れ, 氷冷下で70%エタノールを加えて磨砕後, 4℃で24時間抽出した。得られたホモジネートを遠心分離後, 上清にトリクロロ酢酸を添加し夾雑タンパク質を変性後, 水酸化ナトリウムを加えて中和し, 遠心分離後の上清のアミノ酸含量をHPLCで分析した¹⁾。

2. イネ (*Oryza sativa* L.) のセリンラセマーゼおよびセリンデヒドラターゼ活性の測定

米のD-セリンの生合成機構を解明するために, イネのセリンラセマーゼホモログをクローニングし, セリンラセマーゼおよびセリンデヒドラターゼ活性を測定した^{2, 3)}。活性測定はD, およびL-セリンを基質として用い, 30℃で酵素反応後, 生成物をHPLCを用いて定量し測定した。

結果および考察

1. 野菜および果物のD-アミノ酸の定量

HPLC分析の結果, かぼちゃ, トマト, アボガド, バナナなど分析した数十種類のすべての野菜および果物中に, D-Ala, D-Ser, D-Asp, D-Glu, D-Tyr, D-MetなどのさまざまなD-アミノ酸が含まれていることが明らかになった (Table 1)。またかぼちゃ, たまねぎ, りんごにおいては部位 (根, 実, 皮など) によって含まれているD-アミノ酸の種類や量が異なることがわかった。

2. スプラウトのD-アミノ酸の定量

市販の食用スプラウトのD-アミノ酸含有割合を調べたところ, すべてのスプラウトにD-Alaが含まれていることが明らかとなった。とくにアルファルファのスプラウトではD-Alaの割合が19.7%と高い値を示した (Table 2)。

3. セリンラセマーゼホモログのセリンラセマーゼおよびセリンデヒドラターゼ活性

大腸菌で発現させたセリンラセマーゼホモログをNi-NTA-アガロースカラムクロマトグラフィーで精製後, 酵素活性を測定した。その結果, 本酵素はセリンラセマーゼとセリンデヒドラターゼの機能をあわせ持つ酵素であることが明らかとなった。D-セリンを基質とした場合はD-セリンの減少とともに, L-セリン, ピルビン酸の生成が確認された。またL-セリンを基質とした場合はL-セリンの減少とともにD-セリン, ピルビン酸の生成が確認された (Table 3)。本酵素はラセマーゼ活性よりデヒドラターゼ活性の方が高く, セリンラセマーゼというよりはD, L-セリンデヒドラターゼと命名されるべき存在である。

まとめ

HPLC分析の結果, 野菜, 果物, スプラウトにはさまざまなD-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。このことから, 私たちは日常の食事から無意識に多種多様なD-アミノ酸を摂取していると考えられる。アルファルファのスプラウトにはD-アラニンが多量に存在しており, アラニンラセマーゼ活性も検出することができた。イネのセリンラセマーゼホモログの酵素科学的性質を調べたところ, 本酵素はDおよびL-セリンを基質としてLおよびD-セリンとピルビン酸の生成を触媒する酵素であることがわかった。D-セリンは哺乳類の脳内に存在し, NMDA受容体のアゴニストであり, 統合失調症などの治療薬として期待されている。今後食物中のD-アミノ酸とヒトの体内での生理作用との関連が明らかになれば, D-セリンなどのD-アミノ酸含有量を高めた野菜, 果物, スプラウトを調製することにより, 健康食品としての応用が期待される。

Table 1 D-Amino acids contents in vegetables and fruits

| | D-Amino acids content in vegetables and fruits (mg/l) | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | D-Asp | D-Glu | D-Ser | D-Thr | D-Arg | D-Ala | D-Tyr | D-Val | D-Met | D-Phe | D-Ile | D-Leu |
| Bamboo shoot | 23.9 | 2.9 | 5.7 | 0 | 0 | 13.2 | 5.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cucumber | 40.6 | 10.1 | 14.3 | 0 | 0 | 19.5 | 13.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48.4 |
| Punpkin (furuit) | 108.1 | 0 | 10.9 | 0 | 0 | 53.2 | 0 | 0 | 255.1 | 0 | 0 | 0 |
| Punpkin (seed) | 0 | 0 | 17.0 | 0 | 0 | 23.1 | 11.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pumpkin (skin) | 0 | 0 | 49.2 | 0 | 0 | 41.6 | 11.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pumpkin (cotton) | 12.9 | 0 | 14.0 | 0 | 0 | 21.3 | 5.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Welsh onion (root) | 0.0 | 0 | 78.4 | 0 | 0 | 37.1 | 122.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13.1 |
| Welsh onion (sheath) | 0.0 | 0 | 5.4 | 0 | 0 | 13.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13.7 |
| Welsh onion (leaf) | 35.1 | 0 | 6.4 | 0 | 0 | 14.2 | 6.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Avocado (fruit) | 23.8 | 0 | 0.0 | 0 | 0 | 21.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Avocado (seed) | 24.2 | 0 | 0.0 | 0 | 0 | 15.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Avocado (skin) | 25.8 | 0 | 5.1 | 0 | 0 | 19.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Apple (fruit) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.3 | 0 | 0 | 23.0 | 0 | 0 | 0 |
| Apple (skin) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 102.2 | 0 | 0 | 178.9 | 0 | 0 | 0 |
| Tomato (fruit) | 16.1 | 0 | 5.0 | 0 | 0 | 12.7 | 8.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tomato (seed) | 119.2 | 0 | 0 | 95.2 | 0 | 126.5 | 0 | 0 | 0 | 11.3 | 0 | 224.2 |
| Onion | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ginkgo tree (fruit) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Burdock | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lotus root | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| White peach | 19.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wakame seaweed | 0 | 0 | 5.9 | 0 | 0 | 6.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Banana | 0 | 6.8 | 0 | 0 | 0 | 24.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Shiitake mushroom | 0 | 0 | 13.2 | 0 | 0 | 12.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pear | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Persimmon | 20.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kiwi | 22.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lettuce | 0 | 0 | 22.8 | 0 | 0 | 32.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 2 D-Amino acids contents in sprouts

| Organism | D-Amino acid content $\{(D\text{-Amino acid})/(D\text{-Amino acid} + L\text{-Amino acid})\}$ (%) | | | | | | | | | | |
|----------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | D-Asp | D-Glu | D-Ser | D-Thr | D-Arg | D-Ala | D-Val | D-Phe | D-Met | D-Leu | |
| Broccoli | 0 | 0 | 23.60 | 8.42 | 0 | 5.32 | 3.59 | 0 | 0 | 10.00 | |
| Cabbage | 0 | 0.69 | 0 | 1.46 | 3.37 | 2.40 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| White radish sprouts | 7.23 | 0 | 13.50 | 8.75 | 0 | 14.60 | 1.47 | 0 | 0 | 17.70 | |
| Soybean sprout | 3.40 | 2.14 | 2.00 | 0 | 0 | 11.60 | 0 | 0.10 | 0 | 0.75 | |
| Alfalfa | 1.23 | 12.00 | 4.30 | 0 | 0 | 19.70 | 0 | 0.08 | 0 | 0.76 | |

Table 3 Time course of D-serine, L-serine, and pyruvate contents in the reaction mixtures of serine racemase homologue from *Oryza sativa* L

| Substrate Reaction time (h) | D-Serine | | | L-Serine | | |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | D-Serine (%) | L-Serine (%) | Pyruvate (%) | D-Serine (%) | L-Serine (%) | Pyruvate (%) |
| 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 89.7 | 2.7 | 7.6 | 22.1 | 58.3 | 19.6 |
| 2 | 83.4 | 4.4 | 12.2 | 22.6 | 48.2 | 29.2 |
| 3 | 78.4 | 5.3 | 16.4 | 23.5 | 43.6 | 32.9 |
| 4 | 73.9 | 6.4 | 19.7 | 21.9 | 37.9 | 40.2 |
| 5 | 72.2 | 7.1 | 20.7 | 20.3 | 32.1 | 47.6 |

参考文献

- 1) Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K. (2006) *Phytochemistry* 67: 856-860.
- 2) Strisovsky K, Jiraskova J, Barinka C, Majer P, Rojas C, Slusher BS, Konvalinka J. (2003) *FEBS Letters* 535: 44 - 48.
- 3) Xia M, Liu Y, Figueroa DJ, Chiu CS, Wei N, Lawlor AM, Lu P, Sur C, Koblan KS, Connolly TM. (2004) *Molecular Brain Research* 125: 96 - 104.