

乳酸菌のゲノム解析： 現状と D-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用へ向けて

加藤 志郎¹⁾, 老川 典夫^{1,2)}

(¹⁾ 関西大学 先端科学技術推進機構*, (²⁾ 関西大学 化学生命工学部**)

Genome analysis of lactic acid bacteria: current status and perspective of D-amino acid researches

Shiro KATO¹⁾ and Tadao OIKAWA^{1,2)}

¹⁾ High Technology Research Core, Kansai University

²⁾ Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

Recent exponential progress in next-generation DNA sequencing technology enables researchers to sequence entire genome of various organisms for the first time at a reasonably low cost. Nowadays, there are a lot of reports concerning sequenced genome information, and they considerably contribute to understanding of the biological functions of unknown genes at molecular level. In this manuscript, we describe the current status of genome analysis of lactic acid bacteria and the perspective of D-amino acid researches targeting lactic acid bacteria based on their genome information.

1. はじめに

ゲノムは生命の設計図であり、生命体はゲノムに刻み込まれた情報に基づいて構築される。したがって、ある生物のゲノムを解読し配列情報を得ることは、その生物の設計図を得ることであると言い換えることができる。生命の設計図を得んとする試みは以前から為されてきたが、次世代型シーケンス技術の登場以降ゲノム解読の速度は加速的に向上し、現在では解読されたゲノム情報に基づく多様な研究が各所で展開されている。本稿では乳酸菌およびそのゲノム解析の概説とともに、ゲノム情報を活用した乳酸菌における D-アミノ酸研究への展望を記す。

2. 乳酸菌のゲノム解析

乳酸菌とは代謝により乳酸を生産する多種多様な菌群の総称であり、グラム陽性、カタラーゼ陰性、芽胞を形成しないなどの共通した性質を有する。また、その発酵様式や形態による分類が可能であり、細胞形態に着目すると乳酸球菌と乳酸桿菌とに分類され、乳酸球菌には *Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Streptococcus* 属、*Pediococcus* 属などが、乳酸桿菌には *Lactobacillus* 属などが含まれる。発

酵様式に着目すると、最終産物として乳酸のみを生産するホモ乳酸発酵菌と、乳酸と同時に酢酸やアルコール等を生産するヘテロ乳酸発酵菌に分類される。*Leuconostoc* 属はヘテロ乳酸発酵を、*Streptococcus* 属はホモ乳酸発酵をとったように、乳酸球菌の発酵様式が属ごとに一定であるのに対して、100 を優に超える種から成る乳酸菌最大のグループである *Lactobacillus* 属乳酸菌にはホモ型の発酵を行う種とヘテロ型の発酵を行う種が混在する。また、1980年代から2000年代にかけて遺伝的系統解析による新属の認定や、新たな乳酸菌属の単離・同定の報告が相次ぎ、乳酸菌を構成する細菌群は多様かつ複雑なものとなっており、個々の乳酸菌の理解のためには学名による分類が不可欠である。

乳酸菌は植物表面やヒトを含む動物腸管内など自然界に広く分布している。ヒトの営みに目を向けると、チーズスターターとして *Lactococcus lactis* が、ヨーグルトスターターとして *Streptococcus thermophilus* および *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が古くから用いられており、また、ワイン、日本酒および醤油の発酵にはそれぞれ *Oenococcus oeni*、*Lactobacillus sakei* および *Tetragenococcus halophilus* といった乳酸菌が用いられ、ヒトの生活と多様な乳酸菌との密接な関連がうかがえる。

*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)

Table 1 General properties of published lactic acid bacterial genome sequences

Genus/Species/Strain	Genome length (Mbp)	Gene number	GC content (%)	Plasmid number	Reference or GenBank assembly accession number
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCSF1	3.31	3124	44.5	3	2
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	1.99	1900	34.6	0	4
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	1.88	1889	41.3	0	5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	1.99	1927	34.7	0	6
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	1.89	1865	35.3	0	3
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	2.90	2902	46.6	1	3
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	2.29	2256	46.2	2	3
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	1.87	1931	49.7	0	7
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	2.00	2018	38.9	0	GCA_000016825.1
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	2.10	2099	51.5	0	8
<i>Lactobacillus buchneri</i> CD034	2.50	2393	44.4	3	9
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	2.37	2406	35.3	0	1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	2.53	2583	35.7	0	10
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311	1.80	1887	39.1	0	11
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	3.22	3257	37.5	3	GCA_000007785.1
<i>Enterococcus faecium</i> DO	2.70	2795	38.2	3	12
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	1.78	1799	37.9	0	3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	2.04	2016	37.7	1	3
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	1.83	1795	37.4	0	3
<i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172	2.56	2540	36.0	0	GCA_000283615.1

また近年では、腸内環境改善作用等を有する乳酸菌に着目したプロバイオティクス利用、さらに乳酸菌を含む腸内細菌の生育促進やヒトの健康の維持・向上を志向したプレバイオティクスの利用が広がりを見せており、乳酸菌はますます身近な存在となっている。

初めて乳酸菌のゲノムが解読・公表されたのは2001年のことであり、対象は *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403であった¹⁾。細菌のゲノム解読が開始された当初、その対象となるのは病原菌や感染症菌などが中心であったが、現在では食品発酵菌や土壌細菌など、その対象が大幅に拡大している。*Lactobacillus* 属乳酸菌として最初に *Lactobacillus plantarum* WCSF1 のゲノム解読が為されたのは2003年であるが²⁾、近年の分析技術の著しい進展と相まって、現在では数十株にもおよぶ多様な乳酸菌ゲノムの全配列情報を容易に入手可能であり（一部の代表例に関する情報を Table 1 に記載）、未公開の情報も含めると膨大なゲノム情報の解読が為されている。乳酸菌のゲノムサイズはおよそ 1.8 ~ 3.4 Mbp と比較的小さく、またその遺伝子数はおよそ 1800 ~ 3300 程度でありゲノムサイズを反映したコンパクトな設計図により構成された生物であると言える。乳酸菌はアミノ酸・金属イオン・核酸等に対する栄養要求性の高い細菌として知られているが、ゲノムサイズが小さい（保持遺伝子数が少ない）がために TCA 回路をはじめとする多くの重要な代謝関連遺伝子の欠失があることで説明が付く。乳酸菌の栄養要求性は株間による差異が非常に大きいといった特徴があり、ゲノム解析から各株個々の性質を裏付ける情報を得ることができ一方で、ゲノム情報の活用は特定の菌株の機能解析のみならず、複数の菌株間での比較解析において極めて強力なツールとなり得

る。一例に触れると、2006年 Makarova らは *Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Streptococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Oenococcus* 属から各1種および *Lactobacillus* 属から4種の合計9種もの乳酸菌のゲノム解読を行い、それらの配列を比較ゲノム解析することで乳酸菌の芽胞形成能喪失に関する知見の獲得に至った³⁾。2007年には、Wegmann らによって *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 および *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 の比較ゲノム解析が行われ、オリゴペプチド代謝関連遺伝子の保存性の違いが見いだされた¹⁰⁾。また、2011年には森田らによる2株の *Lactobacillus garveiae* の比較ゲノム解析から、同種のブリ属魚類に対する病原性因子遺伝子の特定が為された¹³⁾。このような比較ゲノム解析からの有用な知見の獲得には、適切な比較対象の組み合わせを得ることが重要である。現在も日々乳酸菌ゲノムの解読が進められていることを鑑みると、今後ますます多様な組み合わせによる比較解析が可能となり、重要な知見の獲得が期待できるであろう。

3. D-アミノ酸とは

α -位に不斉中心を有するアミノ酸にはL-アミノ酸とその鏡像異性体の関係にあるD-アミノ酸が存在する。両者は旋光性を除く全ての物理化学的性質が共通しているにも関わらず、生命体の構成要素であるタンパク質は（一部の例外を除き）専らL-アミノ酸のみによって構成されている。生物におけるD-アミノ酸の利用は、D-アラニンやD-グルタミン酸が細菌細胞壁のペプチドグリカンの、D-バリンなどが細菌由来抗生物質の構成要素となることは古くから知られていた。一方で、真核生物においては無用な

存在であり、D-アミノ酸は原核生物における限られた役割を担うのみであると長い間考えられてきた。しかし、近年の分析技術の向上に伴い真核生物の組織や体液中にD-アミノ酸が存在し、様々な生理機能を担うことが明らかにされつつある。D-アラニンには甲殻類や二枚貝などの水棲動物においては浸透圧調節を担うオスモライトとしての役割を担い¹⁴⁾、哺乳動物においてはその生理的役割は不明ではあるが膵臓においてインシュリンと逆相関した変動を示す¹⁵⁾。最も単純な側鎖構造を有するD-アラニンにあってさえ、ところ（対象となる生物が）変わればその担う役割も異なることが示されており、垣間見えたD-アミノ酸が担う生理機能の奥深さに興味が尽きない。

哺乳動物において最も活発に研究が為されているD-アミノ酸はD-セリンとD-アスパラギン酸であろう。D-セリンは哺乳動物脳内に存在し、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コアゴニストとして結合し、受容体機能を増強することで記憶や学習など脳の高次機能に関与する¹⁶⁾。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¹⁷⁾、種々のホルモンの合成または分泌の制御に関与すると考えられている。例えば、精巣では男性ホルモンであるテストステロンの合成や分泌を促進することが知られており¹⁸⁾、他に松果体ホルモンであるメラトニンの分泌抑制¹⁹⁾や下垂体ホルモンであるプロラクチンの分泌促進²⁰⁾などに寄与する。2011年にはD-アスパラギン酸が哺乳動物脳内における新規の神経伝達物質であるとの報告もなされ²¹⁾、今なおD-アミノ酸の新たな生理機能の解明が為され続けている。また、研究の進展に伴いD-セリンおよびD-アスパラギン酸の種々の疾病への関与も示唆されている。D-セリンにおいては、脳脊髄液や血清中の濃度が統合失調症患者では低下し²²⁾、筋萎縮性側索硬化症患者では上昇すること²³⁾が示されており、D-アスパラギン酸においては、奇形精子症患者や無精子症患者の精子や精漿中のD-アスパラギン酸量が低下していることが示され²⁴⁾、受精への関与もまた示唆されている。

4. ゲノム情報を活用した乳酸菌における

D-アミノ酸研究の意義

D-アミノ酸は生物体内において対応するL-アミノ酸からのラセミ化によって生合成され、その反応は個々のアミノ酸に特異的なアミノ酸ラセマーゼによって触媒される。哺乳動物においてはD-セリンの生合成を担うPLP依存性セリンラセマーゼの同定がなされており、他の真核生物では一部の水棲動物において同じくPLP依存型のアスパラギン酸ラセマーゼが同定されている。一方で、細菌において同定が為されているアミノ酸ラセマーゼとして、PLP依存性のアラニンラセマーゼ、細菌型セリンラセマーゼ、低基質特異性ラセマーゼのほかPLP非依存性のアスパラギン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ、プロリンラ

セマーゼが挙げられる。乳酸菌においてもアラニンラセマーゼおよびグルタミン酸ラセマーゼが全ての種に共通して保存され、また一部の種ではアスパラギン酸ラセマーゼを保持している。しかしながら、乳酸菌の培養上清および乳酸菌細胞内のアミノ酸組成を解析すると、これらのアミノ酸ラセマーゼに起因しないと考えられる種々のD-アミノ酸が検出されることがある。これは、乳酸菌が既知のアミノ酸ラセマーゼとは別のD-アミノ酸生合成機構を有する可能性を示唆するものであったが、実際に2010年代に入って以降、乳酸菌由来の新規アミノ酸ラセマーゼの発見が相次いで為されている^{25, 26)}。乳酸菌培養上清および乳酸菌細胞内に見出されるD-アミノ酸の由来は、現在同定が完了しているアミノ酸ラセマーゼのみで説明が付くとは言い難く、ゲノム情報を有効に活用することで乳酸菌におけるD-アミノ酸生合成装置のさらなる解明が期待できるであろう。

D-アミノ酸の生理作用の解明に伴い、その応用可能性が浮かび上がる。即ち外因性D-アミノ酸を用いた疾病症状の緩和等である。モデル動物を用いた研究において、D-セリンまたはその類縁体の投与により統合失調症の症状が緩和すること²⁷⁾、D-アスパラギン酸を含有する食餌を与えた場合、精漿中のD-アスパラギン酸濃度が一過的に上昇し、精子の運動性能が向上することが示されている²⁸⁾。これらの報告は、外因性D-アミノ酸が生理作用を示すことおよびD-アミノ酸高含有食品のサプリメントとしての利用可能性を示唆するものである。

現在私たちは、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年~平成29年):次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究の一環として、D-アミノ酸高生産乳酸菌のゲノム解析を行っている。対照としてD-アミノ酸生産能の低い基準株乳酸菌ゲノムを同時に解読し、得られたゲノム情報を用いた比較ゲノム解析を通して乳酸菌におけるD-アミノ酸高生産の分子機構の解明を目指している。今日我が国で食品添加物としての利用が認可されているD-アミノ酸はD-アラニン、D-メチオニン、D-トリプトファン、D-トレオニンの4種のみであり、他のD-アミノ酸を摂取するためには食餌に頼らざるをえない。乳酸菌は様々な食品製造に寄与する細菌であり、そのD-アミノ酸高生産機構の解明は学術的知見の蓄積のみに留まらず、D-アミノ酸高配合食品の開発といった応用研究へ扉を開くと期待できるであろう。

謝 辞

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年~平成29年)により実施している研究である。

参考文献

- 1) Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malmalm K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11: 731-753.
- 2) Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1990-1995.
- 3) Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15611-15616.
- 4) Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2512-2517.
- 5) Chaillou S, Champomier-Verges MC, Cornet M, Crutz-Le Coq AM, Dudev AM, Martin V, Beaufile S, Darbon-Rongere E, Bossy R, Loux V, Zagorec M (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol* 23: 1527-1533.
- 6) Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3906-3912.
- 7) van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto JM, Walunas T, Gibrat JF, Bessieres P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9274-9279.
- 8) Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshumira T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M (2008) Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production. *DNA Res* 15: 151-161.
- 9) Heinla S, Wibberg D, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Blom J, Linke B, Goesmann A, Grabherr R, Schwab H, Puhler A, Schluter A (2012) Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *J Biotech* 161: 153-166.
- 10) Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* 189: 3256-3270.
- 11) Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 1554-1558.
- 12) Qin X, Galloway-Peña JR, Sillanpaa J, Roh JH, Nallapareddy SR, Chowdhury S, Bourgogne A, Choudhury T, Muzny DM, Buhay CJ, Ding Y, Dugan-Rocha S, Liu W, Kovar C, Sodergren E, Highlander S, Petrosino JF, Worley KC, Gibbs RA, Weinstock GM, Murray BE (2012) Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiol* 12: 135-154.
- 13) Morita H, Toh H, Oshima K, Yoshizaki M, Kawanishi M, Nakaya K, Suzuki T, Miyauchi E, Ishii Y, Tanabe S, Murakami M, Hattori M (2011)

- Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Plos One 6: e23184.
- 14) Nomura T, Yamamoto I, Morishita F, Furukawa Y, Matsushima O (2001) Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. J Exp Zool 289: 1-9.
 - 15) Hamase K, Morikawa A, Etoh S, Tojo Y, Miyoshi Y, Zaitu K (2009) Analysis of Small Amounts of D-Amino Acids and the Study of Their Physiological Functions in Mammals. Anal Sci 25: 961-968.
 - 16) Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. Mol Neurobiol 36: 152-164.
 - 17) 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.
 - 18) Nagata Y, Homma H, Lee JA, Imai K (1999) D-Aspartate administration of testosterone synthesis in rat Leydig cells. FEBS Lett 444: 160-164.
 - 19) 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.
 - 20) 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: 1143-1147.
 - 21) 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: 1014-1027.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) Kato S, Hemmi H, Yoshimura T (2012) Lysine racemase from a lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*: structural basis of substrate specificity. J Biochem 152: 505-508.
 - 26) Mutaguchi Y, Ohmori T, Wakamatsu U, Ohshima T (2013) Identification, purification, and characterization of a novel amino acid racemase, isoleucine 2-epimerase, from *Lactobacillus* species. J Bacteriol 195: 5207-5215.
 - 27) 西川 徹 (2008) 脳の内在性 D-セリンの代謝・機能と精神神経疾患における意義. 生化学 80 : 267-276.
 - 28) 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.