

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：  
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

## 高等植物及び食品中の D-アミノ酸とその代謝関連酵素

老 川 典 夫

地球上で最も多い生物である植物に D-アミノ酸が存在していることは案外知られていない。植物に D-アミノ酸が存在することは今から約 50 年前に既に確認されている。裸子植物、被子植物、単子葉植物、双子葉植物、C<sub>3</sub> 植物、C<sub>4</sub> 植物、CAM (crassulacean acid metabolism) 植物などの分類学的特性に関わらず、D-アミノ酸は植物に普遍的に存在している。このことは D-アミノ酸が果たして重要な生理的役割を植物中で担っていることを意味するのだろうか、それとも環境から単に取り込まれた D-アミノ酸が植物に広く存在しているだけなのだろうか。最近 D-Ala と D-Ser について植物中でその生成または分解を担うと考えられる酵素の存在が明らかになった。このことは植物が D-アミノ酸を合目的に代謝していることを示していると考えられ、その生理的機能の解明が期待される。

### 1. はじめに

高等植物中の L-アミノ酸に含まれる窒素原子は、すべてアンモニアに由来する。アンモニア中の窒素原子は、グルタミンシンターゼ及びグルタミン酸シンターゼによってまずグルタミン酸に取り込まれ、他のアミノ酸へ転移する<sup>1)</sup>。この反応は一般にアミノトランスフェラーゼによって触媒される。これらのアミノ酸の生合成経路は光学特異的であり、このことは高等植物中に多量の L-アミノ酸が存在することからも理解できる。ところが D-アミノ酸も高等植物中に存在することが知られている。注目すべきことに 1960 年代に、単子葉及び双子葉植物に共通の D-Trp の N-マロニル化について既に報告されている<sup>2,3)</sup>。1970 年以降、D-Ala, D-Asp, D-Glu が遊離及び結合態でエンドウマメ (*Pisum sativum*) の芽生え<sup>4)</sup>、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) 種子、ホップ (*Humulus lupulus* L.) の花<sup>5)</sup>中に、

また D-Ala 及び D-Ala-D-Ala が牧草 (*Phalaris tuberosa* L.)<sup>6)</sup> や野生種のイネ (*Oryza australiensis* Domin)<sup>7)</sup> 中に存在することが報告されている。また D- $\alpha$ -アミノ-n-酪酸が結合態で 9 種のマメ科植物<sup>8)</sup> に存在していることや様々な遊離型 D-アミノ酸がタバコの葉の細胞<sup>9)</sup> 中に存在していることが報告されている。その後高等植物の D-アミノ酸に関する研究の多くは、特定の D-アミノ酸を植物に与えた場合の代謝や取り込み機構の解明に焦点が当てられた。

効率の良いガス (GC) 及び液体 (LC) クロマトグラフィー (HPLC) による D-及び L-アミノ酸の高感度分析法の開発は、植物中の D-アミノ酸の研究に大きな進展をもたらした<sup>10)</sup>。これらの分析方法では、野菜や果物中に存在する D-アミノ酸を L-アミノ酸に対する存在比約 0.5-3% で検出することが可能である<sup>11)</sup>。その結果、リンゴ、パイナップル、スイカ、パパイヤ、マンゴー、ココナッツミルク、ココアなど様々な野菜、果物、食品中に D-アミノ酸が存在することが明らかにされた<sup>12,13)</sup>。またこれらの D-及び L-アミノ酸の高感度分析法の開発は、酵素反応の結果生成する微量の D-アミノ酸の検出をも可能にし、アルファルファの芽生えの無細胞抽出液中に L-Ala から D-Ala, D-Ala から L-Ala を生成するアラニンラセマーゼの存在が初めて明らかにされた<sup>14)</sup>。

そこで本総説では、高等植物及び食品中の D-アミノ酸

関西大学化学生命工学部生命・生物工学科 (〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35)

Occurrence of D-amino acids in higher plants and foods, and the enzymes related to their metabolism

Tadao Oikawa (Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-Cho, Suita-Shi, Osaka-Fu, 564-8680, Japan)

とその代謝関連酵素について紹介し、高等植物とD-アミノ酸との関係について、これまでのわれわれの研究成果や最近の知見に基づき考察する。

2. 植物中のD-アミノ酸の定量的解析と分布

植物中のD-アミノ酸の定量には、一般に*o*-フタルアルデヒドと*N*-イソブチリル-L-システインや*N*-アセチル-L-システインを用いて試料中のD-及びL-アミノ酸をキラル誘導体化後、逆相カラムを用いたHPLCが用いられる<sup>15)</sup>。表1にH. Brücknerらによる果汁あるいは植物1kgあたりの遊離型D-またはL-アミノ酸の定量結果とD-アミノ酸の総アミノ酸含有量に対する相対含有率(%D)を示す<sup>12)</sup>。リンゴ(ゴールドデリシャス種)果汁中には、D-Asp(0.4%)、D-Asn(0.7%)、D-Glu(0.5%)、D-Ser(1.7%)、D-Ala(2.7%)が検出された。このリンゴの樹の葉には、D-Asp(7.9%)、D-Glu(3.1%)、D-Ser(11.7%)、D-Ala(1.5%)が含まれており、またこの樹の周囲の果樹園の土には、D-Asp(8.5%)、D-Glu(7.1%)、D-Ser(8.3%)、D-Ala(15.5%)が含まれていた。興味深いことに遊離型のD-Asp、D-Glu、D-Alaはすべての植物に含まれており、D-Lysは数種の植物に、またD-Val、D-Leuはココナツミルクとパイナップルにのみ含まれていた。さらにH. Brücknerらは、裸子植物であるGingoaceae科(イチヨウ)、Taxodiaceae科(メタセコイア)、Pinaceae科(トウヒ)ファミリー中に含まれる遊離型D-アミノ酸の研究を行っている。イチヨウやメタセコイアは「生きた化石」として知られ、進化的に非常に古い裸子植物に分類される。また遊離型D-アミノ酸は、Arecaceae科(ココナツ)、Bromeliaceae科(パイナップル)、Poaceae科(牧草)などの単子葉植物ファミリーや、Aceraceae科(カエデ)、Anacardiaceae科(マンゴー)、Brassicaceae科(カラシナ)、Cactaceae科(ヒラウチワサボテン)、Caricaceae科(パパイヤ)、Cucubritaceae科(スイカ)、Fabaceae科(マメ)、Passifloraceae科(パッションフルーツ)、Rosaceae科(リンゴ)などの双子葉植物ファミリーにも含まれている。一方代謝経路の違いに基づき植物を分類した場合、D-アミノ酸は、C<sub>3</sub>植物のみならずC<sub>4</sub>植物(牧草やトウモロコシなど)やCAM植物(crassulacean acid metabolism植物:サボテンなど気温が低下して水分を失う心配の少ない夜間に気孔を開いて二酸化炭素を吸収して貯蔵しておき、昼間は気孔を開かず光合成を行うことができる植物)中にも含まれている。このようにD-アミノ酸は、植物に普遍的に存在しており、植物は進化の早い段階から遊離型及び結合態のD-アミノ酸を含有していると考えられる。

表1 果物中のD-アミノ酸の定量的解析

アミノ酸	リンゴ			パイナップル			スイカ			パパイヤ			マンゴー			パッションフルーツ		
	L体 μmol/l	D体 μmol/l	%D	L体 μmol/l	D体 μmol/l	%D	L体 μmol/l	D体 μmol/l	%D									
Asp	797.0	3.2	0.4	382.0	3.6	0.9	1611.0	8.8	0.5	217.0	3.1	1.4	263.0	3.9	1.5	3065.0	16.2	0.5
Glu	677.0	3.4	0.5	723.0	3.0	0.4	215.0	—	—	n.d.	n.d.	n.d.	1169.0	4.9	0.4	3558.0	17.1	0.5
Asn	2071.0	14.6	0.7	3109.0	24.7	0.8	731.0	—	—	5034.0	33.9	0.7	93.0	—	—	195.0	—	—
Ser	197.0	3.4	1.7	795.0	—	—	916.0	—	—	375.0	3.1	0.8	266.0	—	—	2962.0	17.1	0.6
Gln	33.0	—	—	929.0	—	—	4045.0	8.5	0.2	456.0	1.7	0.4	2439.0	7.3	0.3	4336.0	—	—
Thr	64.0	—	—	145.0	—	—	472.0	—	—	292.0	—	—	49.0	—	—	297.0	—	—
Gly	18.0	—	—	177.0	—	—	280.0	—	—	1528.0	—	—	12.0	—	—	1317.0	—	—
His	8.0	—	—	143.0	—	—	—	—	—	70.0	—	—	72.0	—	—	480.0	—	—
Ala	105.0	2.9	2.7	1247.0	—	—	667.0	4.0	0.6	402.0	3.6	0.9	1920.0	8.4	0.4	975.0	12.0	1.2
Arg	12.0	—	—	98.0	—	—	3122.0	12.5	0.4	584.0	5.5	0.9	2100.0	6.8	0.3	752.0	5.9	0.8
Tyr	4.0	—	—	155.0	—	—	410.0	—	—	63.0	—	—	29.0	—	—	142.0	—	—
Val	24.0	—	—	202.0	2.3	1.1	520.0	—	—	103.0	—	—	127.0	—	—	456.0	—	—
Met	3.0	—	—	72.0	—	—	187.0	—	—	34.0	—	—	12.0	—	—	113.0	—	—
Trp	2.0	—	—	22.0	—	—	174.0	—	—	26.0	—	—	11.0	—	—	92.0	—	—
Phe	17.0	—	—	122.0	—	—	375.0	—	—	126.0	—	—	38.0	—	—	344.0	—	—
Ile	13.0	—	—	93.0	—	—	434.0	—	—	76.0	—	—	47.0	—	—	346.0	—	—
Leu	9.0	—	—	100.0	2.5	2.4	313.0	—	—	125.0	—	—	79.0	—	—	186.0	—	—
Lys	15.0	—	—	96.0	—	—	407.0	—	—	104.0	—	—	138.0	—	—	356.0	—	—

n.d.: 検出限界以下 文献12) から引用

### 3. 高等植物における D-アミノ酸の起源

高等植物に多種多様な D-アミノ酸が存在することが明らかにされると、次にこれらの D-アミノ酸がどのようにして植物体内で生合成されるのかということに研究対象は移行する。そこで植物 D-アミノ酸の生合成に関する様々な先駆的な基礎的研究が 1970 年代以降行われてきた。小川らは、植物アミノ酸ラセマーゼがある種のマメ科植物 (*Pisum sativum*) の芽生え中に存在し、L-アミノ酸から D-アミノ酸を生成することを明らかにした<sup>8)</sup>。さらに D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが同芽生え中に存在することを明らかにし、本酵素によって種々の D-アミノ酸のアミノ基がピルビン酸または 2-ケトグルタル酸に転移され、D-アラニンと D-グルタミン酸が生成することを確認している<sup>16)</sup> (表 2)。真鍋は、イネの浮遊培養細胞に D-アラニンを添加すると、細胞中で D-Asp と D-Glu に変換されることを見出している<sup>7)</sup>。植物への D-アミノ酸の投与実験から、N-マロニル化はすべての D-アミノ酸に共通であり、一方  $\gamma$ -L-グルタミル化は D-アラニンに特異的であることが明らかとなっている<sup>17)</sup>。1960 年代にリンゴ (ゴールデンデリシャス) から N-マロニル-D-Trp が単離されたと報告されているが<sup>9)</sup>、植物の内生的な N-マロニル-Trp の立体構造については最近再び議論が必要であると考えられている<sup>18,19)</sup>。また結合態 D-アミノ酸では、 $\gamma$ -L-Glu-D-Ala がエンドウマメ、レンズマメ (*Lens culinaris*) 中に<sup>20,21)</sup>、D-Ala-Gly,

D-Ala-D-Ala が野生種及び栽培種のイネ (*Oryza*) 中に<sup>7)</sup>、1-[(N- $\gamma$ -L-グルタミル) アミノ]-D-プロリンがアマ (亜麻) の種子 (*Linum utisatissimum*) 中に<sup>22)</sup>それぞれ含まれていることが報告されている。さらにテトラペプチドである L-Val- $\gamma$ -L-Glu-D-Arg-Gly がヤクヨウニンジン中で検出されている<sup>23)</sup>。このような高等植物中で遊離型及び結合態の D-アミノ酸の生成は、D-アミノ酸に作用する特異な酵素によって触媒されると考えられるが、その酵素科学的特性の詳細は明らかになっていない。また高等植物中の D-アミノ酸の生成には別の経路も考えられている。たとえば結合態 D-アミノ酸が脱アセチル化やペプチド結合の切断によって遊離し蓄積したり、L-アミノ酸や反応性の高いカルボニル化合物の非酵素的反応の結果 D-アミノ酸が生成したりするとも考えられる<sup>24)</sup>。さらに外生的な D-アミノ酸が高等植物に取り込まれ蓄積することも考えられる。ダイズ、サヤインゲン、アルファルファなど、共生根瘤菌である *Rhizobium* sp. や *Bradyrhizobium* sp. と密接な関わりのある植物の場合、これらの微生物が生産した遊離型及び結合態 D-アミノ酸から生成した D-アミノ酸を根から吸収することも考えられる。一般に微生物には遊離及びペプチドグリカンなどの結合態 D-アミノ酸が豊富に存在しており<sup>25,26)</sup>、また担子菌類の菌糸と高等植物の根との共生体 (菌根) も良く知られている。植物は D-アミノ酸を容易に取り込むことができるので、植物中の D-アミノ酸を解析する場合微生物や環境に由来する D-アミノ酸の植物体内への移行についても考慮する必要がある<sup>10)</sup>。先に述べたように、リンゴの葉や果実中に含まれている D-アミノ酸とその木が育てられた土壤中の D-アミノ酸の種類は良く一致している。

表 2 エンドウマメ (*Pisum sativum*) 中のアミノトランスフェラーゼ活性による D-アラニン及び D-グルタミン酸の生成

アミノ基供与体	アミノ基受容体	
	ピルビン酸	2-ケトグルタル酸
	生成した D-Ala 量 ( $\mu\text{mol}$ )	生成した D-Glu 量 ( $\mu\text{mol}$ )
D-Glu	61.9	—
D-Ala	—	44.0
D- $\alpha$ -アミノ酪酸	64.4	16.3
D-Asp	54.2	75.3
D-Tyr	25.7	14.8
D-Met	10.9	3.9
D-Phe	3.6	3.2
D-Lys	8.8	0.0
D-Leu	0.0	0.0
D-Val	0.0	0.0
L-Ala	0.0	0.0
L-Glu	0.0	0.0
L-Asp	0.0	0.0

反応液 (3ml) 組成は次の通り：アミノ基供与体 (40 $\mu\text{mol}$ )、アミノ基受容体 (40mmol)、Tris 緩衝液 (pH8.3, 300 $\mu\text{mol}$ )、PLP (20mmol)、酵素液 (0.002U)。反応は 37 $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間行った。生成したアミノ酸はアミノ酸分析計で定量した。文献 16) から引用。

### 4. アルファルファ (*Medicago sativa* L.) のアラニンラセマーゼ

上記のように高等植物中には多種多様な D-アミノ酸が存在しているが、その生合成に関与する酵素の分子レベルでの研究はほとんど進展していない。そこでわれわれはまずこれまで様々な D-アミノ酸が検出されている植物芽生えに着目した。アルファルファ、ダイコン (*Raphanus sativus*)、ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*) の種子を発芽させ、無細胞抽出液中のアラニンラセマーゼ活性を測定した<sup>14)</sup>。酵素活性は HPLC 及び D-アミノ酸オキシダーゼを用い、酵素反応の結果生成する D-, L-アラニンを定量し測定した。その結果、アルファルファ、ダイコン、ブロッコリーの芽生えの無細胞抽出液中にそれぞれ  $1.42 \times 10^{-5}$ 、 $7.67 \times 10^{-6}$ 、 $1.06 \times 10^{-6}$  kat/kg のアラニンラセマーゼ活性が検出された。最も活性の高いアルファルファのアラニンラセマーゼ (Ms-AlaR) についてさらに酵素科学的性質を検討した。Ms-AlaR はアルファルファの芽生えを 20 mM D-または L-Ala と 0.5% (W/V) D-グルコースを含む誘

導液に浸漬すると誘導され、活性は1,500倍に増加した。この点は植物由来のアラニンラセマーゼの特色である。アルファルファ芽生えを誘導液に浸漬する時間とMs-AlaR活性の関係を検討したところ、Ms-AlaR活性は誘導開始8時間後までに顕著に増加し、12時間後に最大となり、その後徐々に減少した(図1)。しかしピリドキシンや他のビタミンB<sub>6</sub>誘導体の添加では、Ms-AlaRは誘導されない。またアルファルファ芽生えの無細胞抽出液を分画遠心分離したところ、Ms-AlaR活性は1,000-5,000gの沈殿画分に検出され、約95%の活性が10,000gの沈殿画分に検出された。このことはMs-AlaRが何らかの細胞器官に局在していることを示唆している。さらにわれわれは、アルファルファ芽生えの無細胞抽出液からEther-Toyopearl, Phenyl-Toyopearl, DEAE-ToyoperlカラムクロマトグラフィーでMs-AlaRを高純度に精製し精製酵素標品を用いて酵素科学的性質を検討した。D-及びL-アラニンのラセミ化は酵素量及び反応時間の増加に伴って増加した。またD-及びL-アラニンを基質とした場合の酵素反応の経時的変化は対称性を示し、典型的なラセマーゼ反応の様相を呈した(図2)。Ms-AlaRはアラニンに特異的であり、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、アルギニンには全く作用しない。D-及びL-アラニンに対する見かけの $K_m$ 及び $V_{max}$ 値はそれぞれ $12.0 \times 10^{-3}M$ 、 $0.44mol/s/kg$ と $29.6 \times 10^{-3}M$ 、 $1.02mol/$

s/kgであった。またD-及びL-アラニンに対する $V_{max}/K_m$ 値はそれぞれ36.7、 $36.7mol/s/kg/M$ であり、 $K_{eq}$ は約1となる。したがってMs-AlaRはBriggsとHaldaneによって示されたラセミ化反応の理論を満たし<sup>27)</sup>、アミノ酸ラセマーゼであることが実証された。

一般にアミノ酸ラセマーゼは①ピリドキサル5'-リン酸(PLP)依存型と②PLP-非依存型に大別される。既報のアラニンラセマーゼはすべて前者のPLP依存型である<sup>28)</sup>。Ms-AlaRはヒドロキシルアミン(阻害率:97%)、フェニルヒドラジン(59%)、アミノオキシ酢酸(100%)、水素化ホウ素ナトリウム(97%)などのPLP-酵素阻害剤(1mM)で阻害された。Ms-AlaRは1mMヒドロキシルアミンに対して18時間透析すると完全に失活し、30 $\mu$ M PLPを含む緩衝液に対して透析すると約55%の活性が回復する。Ms-AlaRを、PLPを含まない緩衝液に対して透析すると約95%の活性が消失するが、これを、PLPを含む緩衝液に対して透析すると約80%の活性が回復する(表3)。したがってPLPはMs-AlaRに緩く結合しており、アポ酵素はホロ酵素より不安定であることがわかる。

アルファルファ芽生え中に存在するD-アラニンやMs-AlaRはアルファルファ芽生えの生育や代謝に関与すると考えられるが、不分明のままである。Ms-AlaRは酵素科学的性質が明らかにされた最初の植物アミノ酸ラセマーゼである。

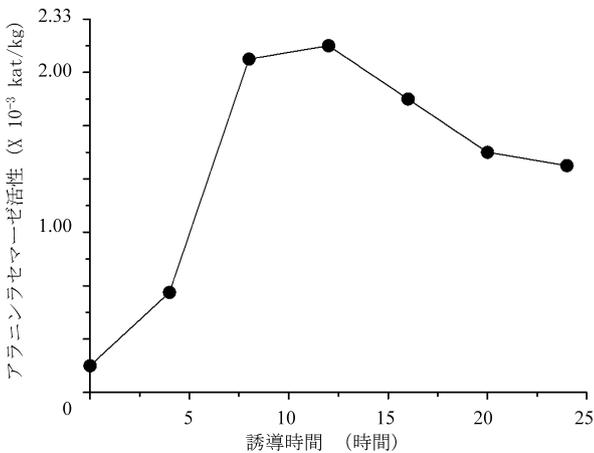


図1 アルファルファ (*Medicago sativa* L.) の芽生え中のアラニンラセマーゼの誘導

約800gのアルファルファの芽生えを5倍容の誘導用溶液(20mM L-アラニン, 0.5% (W/V) D-グルコース, 2mM リン酸カリウム, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM FeSO<sub>4</sub>, 70mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 14mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl, 1mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.5mM CuSO<sub>4</sub>, 0.2mM NaMoO<sub>4</sub>, 0.2mM CoCl<sub>2</sub>, 100mg/ml アンピシリン, pH6.5)に室温で24時間浸漬した。芽生えのサンプリングは4時間ごとに行い、その際誘導液を交換した。芽生えを1mM DTT, 1mM EDTA, 20mM PLP, 10mM PMSF, 1mg/ml ロイペプチン, 0.5mg/ml ペプスタチンを含む100mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.2)に懸濁後、超音波破碎し超遠心後の上清のアラニンラセマーゼ活性を測定した。

## 5. イネのセリンラセマーゼ

1991年、農林水産省は国家プロジェクトとしてイネゲノムの計画的な解析を開始した。1997年までのプロジェ

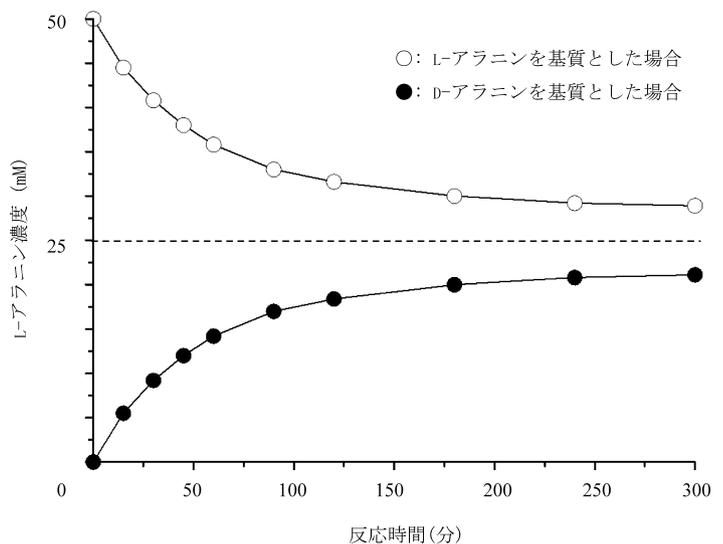


図2 アルファルファ (*Medicago sativa* L.) の芽生え中のアラニンラセマーゼによるD-アラニンとL-アラニンのラセミ化

反応液組成は次の通り: 100mM CHES (pH9.0), 50mM D-またはL-アラニン, 30mM PLP, 酵素液。反応温度: 37℃。

表3 アルファルファ (*Medicago sativa* L.) のアラニンラセマーゼ活性に及ぼす PLP の影響

透 析 (1 回目)	透 析 (2 回目)	比 活 性 (kat/kg)	相 対 活 性 (%)
実施せず	実施せず	0.278	100
-ヒドロキシルアミン	-PLP	0.0145	5
-ヒドロキシルアミン	+PLP	0.242	87
+ヒドロキシルアミン	-PLP	0	0
+ヒドロキシルアミン	+PLP	0.154	55

酵素溶液は、2,500 倍 (体積比) の 1mM DTT, 1mM EDTA を含む 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) (緩衝液 A) に対して、あるいはこの緩衝液 A に 50mM ヒドロキシルアミンを添加した緩衝液に対して 4°C で 18 時間透析した (透析 (1 回目))。さらに透析 (2 回目) では、透析 (1 回目) の酵素液を、緩衝液 A または緩衝液 A に 30 $\mu$ M PLP を添加した緩衝液に対して 12 時間透析した。

クトの第 1 期には、遺伝子地図や物理地図の作成が中心に行われた。1998 年以降日本の主導で結成された国際イネゲノム塩基配列解析プロジェクト (IRGSP) により塩基配列の解読が行われ、2004 年 12 月にはイネゲノムの完全解読が成し遂げられた<sup>29)</sup>。上記のようにイネには D-Ala や 1-[(N- $\gamma$ -L-グルタミル)アミノ]-D-プロリンなどの遊離及び

結合態 D-アミノ酸が存在することが古くから知られている。そこでわれわれはイネゲノムに着目し、本ゲノム中にセリンラセマーゼ/デヒドラターゼ (Os-SerR) のホモログが存在するを見出した。Os-SerR はヒト<sup>30)</sup>、マウス<sup>31)</sup> のセリンラセマーゼ (SerR) と一次構造上それぞれ 46.7, 42.2% の相同性を示した。また Os-SerR は大腸菌<sup>32)</sup>、サルモネラ菌<sup>33)</sup> のスレオニンデヒドラターゼと一次構造上それぞれ 33.9, 33.3% の相同性を示した (図 3)。まず Os-SerR をコードする遺伝子 (*Os-serr*) を大腸菌で大量発現した。Os-SerR の精製酵素標品は、ゲル濾過で分子量 87,000, SDS-PAGE で分子量 40.900 として挙動した。したがって Os-SerR はホモダイマー構造を有していることが明らかになった。Os-SerR の四次構造はシロイヌナズナ<sup>34)</sup>、マウス<sup>30)</sup> の SerR と一致した。Os-SerR の基質特異性を検討したところ、本酵素は Ser のラセミ化反応を特異的に触媒した。また Os-SerR は動物型セリンラセマーゼ同様 Ser デヒドラターゼ活性をも触媒した。本酵素の Ser ラセマーゼ、Ser デヒドラターゼ活性の最適反応温度は共に 35°C であった。さらに各種金属イオンなどの Os-SerR の Ser ラセマーゼ、Ser デヒドラターゼ活性に及ぼす影響を

<i>O. sativa</i> SR	1	MGSRGGSGGDGAESHGYAAD IHSIREA QARIAPYVHKTPVLSSSTSIDAIVGKQLFFKCECFQKAGAFKIRGASNSIFALD	80
<i>A. thaliana</i> SR	1	-----MEANREKYAAD ILSIKEAHDRIPKPIYHRTPLVLTSESLNSISGRSLFFKCECLQKGGAFKFRGACNAVLSLD	71
<i>S. pombe</i> SR	1	-----MSDNLVLP-TYDDVASASERIKKFKANKTPVLSSSTVNKEFVAEVFFKCEENFQKMGAFKFRGALNALSQLN	69
<i>M. musculus</i> SR	1	-----MCAQYCSFADVEKAHINIQDSIHLTPVLSSSILNQIAGRNLFKCELFQKTSFKIRGALNAIRGLI	68
<i>H. sapiens</i> SR	1	-----MCAQYCSFADVEKAHINIRDSIHLTPVLSSSILNQLTGRNLFKCELFQKTSFKIRGALNAVRSLV	68
<i>S. typhimurium</i> TDH	1	-----MHI TYDLPVAIED ILEAKKRLAGKIYKIGMPRSNYFSERCKGEIIEKLFENMQRTGSEFKIRGAFMKLSSLT	70
<i>O. sativa</i> SR	80	---DDEASKGVVTHSSGNHAAAVLAALKRGIPAYIVIPRNAPACKVDNVKRYGGHIWSDVSIERSRESVAKRVQEETGA	157
<i>A. thaliana</i> SR	71	---AEQAAKGVVTHSSGNHAAALSIAAKIQGIPAYIVVPGKAPCKVDNVIRYGGKVIWSEATMSSREEIASKVLQETGS	148
<i>S. pombe</i> SR	69	---EAQRKAGVLTFSGNHQAIALSAKILGIPAKIIMPLDAPEAKVAATKGYGGQVIMYDRYKDDREKMAKEISEREGL	146
<i>M. musculus</i> SR	69	PDTPEEKPKAVVTHSSGNHQAALTYAAKLEGIPAYIVVPPQAPNCKKLAIQAYGASIVYCDPDESREKVTQRIMQETEG	148
<i>H. sapiens</i> SR	69	PDALERKPKAVVTHSSGNHQAALTYAAKLEGIPAYIVVPPQAPNCKKLAIQAYGASIVYCEPDESRENVAKRVTEETEG	148
<i>S. typhimurium</i> TDH	70	---EAEKRGVAVCSAGNHAQGVSLSCAMLGIDGKVVMPKGAAPSKVAATCDYSAEVVLHGDHFNQDIKRVSEIVETEGR	147
<i>O. sativa</i> SR	158	ILVHPFNKNTISGGQGTVLELLEEVPEIDTIIIVPISGGGLISGVLAALAAKINPISIRILAAEFKGGADDSAAQSKAAGKIIT	237
<i>A. thaliana</i> SR	149	VL IHPYNDGRIISGGQGTIALELLEQIQEIDAIIVVPIISGGGLISGVLAALAAKSIKPSIRILAAEFKGGADDAASKVAAGKIIT	228
<i>S. pombe</i> SR	147	TIIPYDHPHVLGAGQTAELFEVGGPLDALFVCLGGGGLSBSALAAHFAPNCEVYGVPEAGNDGQSPFRKGSIVH	226
<i>M. musculus</i> SR	149	ILVHPNQEPAVIAGQGTIALFVNLQVPLVDALVVPVGGGGMVAIGIATITKALKPSVKVYAAEFENSNADDQYQSKLKGELTP	228
<i>H. sapiens</i> SR	149	IMVHPNQEPAVIAGQGTIALFVNLQVPLVDALVVPVGGGGMVAGIATITVVKALPKSVKVYAAEFENSNADDQYQSKLKGELTP	228
<i>S. typhimurium</i> TDH	148	IFIPYDHPKVIAGQGTIGLEIMEDLYDQVNVIVPIGGGGLIAGIILAIKSNPTIKVIGVQAEVNHGMAASYYTGEIT	227
<i>O. sativa</i> SR	237	-LPSTNTIADGLRAF-LGDLTWPVVRDLVDDIIVVDDNATVDAMKMCYEMLVAVVPSGAIGLAAALSDFEQSSAWHES	315
<i>A. thaliana</i> SR	228	-LPVNTIADGLRAS-LGDLTWPVVRDLVDDVVFLEECEIIEAMKMCYEILKVSVEPSGAIGLAAVLSNSFRNPNSCRDC	306
<i>S. pombe</i> SR	226	-IDTPKT IADGAQTQHLGNYTF SIIKEKVDLILTVSDEELIDCLKFYAARMKIVVEPTGCLSFQAARA--MKEKL---KN	300
<i>M. musculus</i> SR	229	NLHPPEIADGVKSS-IGLNTWPIIRDVDDVFTVTEDEIKYATQLVWGRMKLLIEPTAGVALAAVLSQHFQTVS--PEV	305
<i>H. sapiens</i> SR	229	NLYPPEIADGVKSS-IGLNTWPIIRDVDDVFTVTEDEIKYATQLVWGRMKLLIEPTAGVAAVLSQHFQTVS--PEV	305
<i>S. typhimurium</i> TDH	227	-HRTTGLADGCDVSRPBNLTYEIVRELVDIVLVSEDEIRNSMIALIQRNKIVITGAGALACAALLSGKLDSHI---QN	303
<i>O. sativa</i> SR	316	SKIGIIVSGGNVDLGV--LWESLYKR-----	339
<i>A. thaliana</i> SR	307	KNIGIVLSSGNVDLGS--LWSEKSSK-----	331
<i>S. pombe</i> SR	301	KRIIGIISGGHVDIERYAHFLSQ-----	323
<i>M. musculus</i> SR	306	KNVCIVLSSGNVDLTS-LNHWGQAERPAPYQTVSV	339
<i>H. sapiens</i> SR	306	KNICIVLSSGNVDLTSSTIHWKQAERPASYQSVSV	340
<i>S. typhimurium</i> TDH	304	RKTVSIISGGHIDL SRVSIITGLVDA-----	329

図3 イネ (*Oryza sativa* L.) のセリンラセマーゼと既報のセリンラセマーゼ及びスレオニンデヒドラターゼの一次構造の比較  
●: PLP 結合 Lys 残基 (推定), ○: Mg<sup>2+</sup> 結合に關与するアミノ酸残基 (推定)  
*Arabidopsis thaliana*\_SerR (Accession No. BAE72067); *Shizosaccharomyces pombe*\_SerR (Accession No. 1V71\_A); *Mus Musculus* (Accession No. NP\_038789); *Homo Sapiens*\_SerR (Accession No. NP\_068766); *Shizosaccharomyces typhimurium*\_TDH (Accession No. AAL22117).

検討したところ、Os-SerR の Ser ラセマーゼ活性は  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  によって活性化され  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , ATP によって阻害された。これは動物型 Ser ラセマーゼと良く一致する。また Os-SerR の Ser デヒドラターゼ活性は  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , ATP によって活性化され、 $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  によって阻害された。動物型 Ser ラセマーゼの場合、 $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  存在下では Ser デヒドラターゼ活性は活性化されると報告されており<sup>35)</sup>、Os-SerR の Ser デヒドラターゼ活性に及ぼす  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  の影響は動物型 Ser ラセマーゼの場合と正反対である。この点は Os-SerR の大きな特色と言えよう。しかし  $Mg^{2+}$  と ATP 共存下では、Os-SerR の Ser ラセマーゼ、Ser デヒドラターゼ活性は共に阻害された。そこで Os-SerR の Ser ラセマーゼ、Ser デヒドラターゼ活性に及ぼす  $Mg^{2+}$  と ATP の影響を検討するため、 $Mg^{2+}$ , ATP,  $Mg^{2+}$  と ATP 存在下で基質として L-Ser を用い反応速度論的解析を行った。 $Mg^{2+}$  または ATP 存在下では、Os-SerR の Ser ラセマーゼ活性の  $k_{cat}$  に大きな変化はないが L-Ser に対する  $K_m$  は大きく減少し、その結果触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は上昇した。また  $Mg^{2+}$  と ATP 共存下では、L-Ser に対する  $K_m$  とともに  $k_{cat}$  も減少しその結果  $k_{cat}/K_m$  には大きな変化はみられなかった (表4)。一方、Os-SerR の Ser デヒドラターゼ活性は、 $Mg^{2+}$  または  $Mg^{2+}$  及び ATP 存在下では、 $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$  はいずれも減少したが、ATP 存在下では、 $k_{cat}$  は著しく増加し L-Ser に対する  $K_m$  は増加し、その結果  $k_{cat}/K_m$  は増加した (表4)。これらの結果から、 $Mg^{2+}$  は基質 L-Ser に対する  $K_m$  を減少させ Os-SerR の Ser ラセマーゼ活性を上昇させるとともに基質 L-Ser に対する  $k_{cat}$  を減少させることにより Ser デヒドラターゼ活性を減少させると考えられる。玄米中には  $Ca^{2+}$  (約 100ppm) よりも  $Mg^{2+}$  (約 1300 ppm) の方がより高濃度で含まれていることが報告されており<sup>36)</sup>、また酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のセリンラセマーゼ<sup>37)</sup> の立体構造解析の結果明らかにされた  $Mg^{2+}$  結合モチーフが本酵素にも存在していることなどから、 $Mg^{2+}$  は Os-SerR の二つの酵素反応を制御している可能性が示唆

されている。このようなゲノム情報に基づく植物 D-アミノ酸代謝関連酵素の研究は、シロイヌナズナ<sup>34)</sup>などにおいても行われている。

## 6. 食品中の D-アミノ酸

上記のように植物中にはさまざまな D-アミノ酸が含まれており、植物 (野菜, 果物, 穀物など) を原料とする食品中にも当然 D-アミノ酸が含まれている。しかし食品中の D-アミノ酸は必ずしも原料に由来するとは限らず、製造工程における加熱による L-アミノ酸の D-アミノ酸への転換 (この過程はしばしばラセミ化とよばれるが、厳密には D-アミノ酸と L-アミノ酸が等量生成する場合はラセミ化であり正しくない) や用いられる様々な微生物によって生産される場合、原料の微生物による汚染などに起因する場合などがある。たとえばビールでは、オオムギ, コムギ, トウモロコシ, コメ, アワなどが発酵可能な糖源として用いられる。上面発酵では *Saccharomyces cerevisiae* Hansen<sup>38)</sup>、下面発酵では *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen<sup>39)</sup> などが用いられアルコール発酵が行われる。地ビールの場合、*Saccharomyces* 以外に様々な野生の酵母や乳酸菌が用いられる。たとえばベルギーのランビック (自然発酵) ビールの場合、*Brettanomyces lambicus*<sup>40)</sup>、*Brettanomyces bruxellensis*<sup>41)</sup> などの野生酵母に、主として *Pedicoccus* 属の乳酸菌を混合して用いる<sup>42)</sup>。ドイツのベルリナーヴァイスビールの刺激的な酸味は *Lactobacillus delbrueckii*<sup>43)</sup> を用いる乳酸発酵によるものである。またビールの製造工程ではモルトの熱処理も行われる。Brückner らはドイツ及びベルギー産の代表的なビール及びビール原料の D-アミノ酸の定量的解析を行っている<sup>44)</sup> (表5)。D-Ala, D-Pro, D-Asp, D-Glu はいずれのビールにも含まれていた。D-Lys はベルリナーヴァイスビールに、D-Tyr は木苺のランビックビールとババリアンヴァイスビールにのみ含まれていた。ビールに含まれる D-, L-アミノ酸の割合は、ビールの原料と製造に用いられる微生物の種類に大きく依存していた。

表4 イネ (*Oryza sativa* L.) のセリンラセマーゼのキネティックパラメーター

ラセマーゼ活性	$K_{cat}$ ( $S^{-1}$ )	L-Ser に対する $K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $S^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
$Mg^{2+}$ , ATP なし	$3.6 \times 10^{-1}$	18.0	$2.0 \times 10^{-2}$
+ $Mg^{2+}$	$3.1 \times 10^{-1}$	10.0	$3.1 \times 10^{-2}$
+ ATP	$3.2 \times 10^{-1}$	13.0	$2.5 \times 10^{-2}$
+ $Mg^{2+}$ + ATP	$2.0 \times 10^{-1}$	9.30	$2.2 \times 10^{-2}$
デヒドラターゼ活性	$K_{cat}$ ( $S^{-1}$ )	L-Ser に対する $K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $S^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
$Mg^{2+}$ なし	$6.1 \times 10^{-1}$	27.7	$2.2 \times 10^{-2}$
+ $Mg^{2+}$	$3.6 \times 10^{-1}$	18.4	$1.9 \times 10^{-2}$
+ ATP	1.9	56.3	$3.4 \times 10^{-2}$
+ $Mg^{2+}$ + ATP	$4.2 \times 10^{-1}$	58.2	$7.0 \times 10^{-3}$

+  $Mg^{2+}$  及び ATP の濃度は共に 1mM.

表5 ビール中のD-アミノ酸の定量的解析

アミノ酸	ベルリナーヴァイスビール			木苺のランビックビール			ピルスナー			ペールエール			ババリアンヴァイスビール			ストロングビール		
	L体 mg/l	D体 mg/l	%D	L体 mg/l	D体 mg/l	%D	L体 mg/l	D体 mg/l	%D	L体 mg/l	D体 mg/l	%D	L体 mg/l	D体 μmol/l	%D	L体 mg/l	D体 mg/l	%D
Ala	52.2	22.5	30.1	61.2	10.9	17.3	273.5	4.2	1.5	72.1	2.4	3.2	83.5	2.6	3.0	250.0	6.7	2.6
Val	30.9	n.d.	—	44.5	n.d.	—	128.3	n.d.	—	22.6	n.d.	—	73.2	n.d.	—	188.0	n.d.	—
Gly	47.8	—	—	29.6	—	—	99.6	—	—	58.2	—	—	51.3	—	—	145.5	—	—
Thr	13.3	n.d.	—	20.2	n.d.	—	9.3	n.d.	—	9.2	n.d.	—	7.9	n.d.	—	15.5	n.d.	—
Ile	22.9	n.d.	—	24.7	n.d.	—	35.6	n.d.	—	9.0	n.d.	—	26.3	n.d.	—	44.5	n.d.	—
Pro	194.3	51.9	21.1	91.7	0.6	0.7	623.7	1.7	0.3	381.7	1.5	0.4	393.8	0.8	0.2	662.5	2.0	0.3
Ser	12.0	n.d.	—	22.1	n.d.	—	30.2	n.d.	—	41.1	n.d.	—	15.5	n.d.	—	38.9	n.d.	—
Leu	45.2	n.d.	—	41.6	n.d.	—	60.7	n.d.	—	19.9	n.d.	—	68.4	n.d.	—	84.8	n.d.	—
GABA	77.0	—	—	28.1	—	—	123.5	—	—	30.6	—	—	83.8	—	—	193.6	—	—
Asp	30.1	5.2	14.7	622.2	10.3	1.6	43.3	3.9	8.3	27.6	4.3	13.5	33.2	3.1	8.5	68.3	7.3	9.7
Met	9.7	n.d.	—	13.6	n.d.	—	14.4	n.d.	—	5.4	n.d.	—	11.5	n.d.	—	21.1	n.d.	—
Phe	39.3	1.3	3.2	27.2	n.d.	—	75.7	n.d.	—	18.5	1.5	7.5	84.7	1.2	1.4	101.9	3.4	3.2
Glu	53.9	6.6	10.9	36.4	2.2	5.7	96.1	3.1	3.1	41.0	2.5	5.7	70.0	4.6	6.2	116.5	5.9	4.8
Tyr	5.7	n.d.	—	14.6	1.0	6.4	70.0	n.d.	—	20.9	n.d.	—	55.4	1.7	3.0	71.3	n.d.	—
Orn	6.5	n.d.	—	3.1	n.d.	—	6.1	n.d.	—	7.1	n.d.	—	5.8	n.d.	—	10.2	n.d.	—
Lys	31.6	1.3	4.0	8.6	n.d.	—	85.4	n.d.	—	19.9	n.d.	—	15.5	n.d.	—	52.4	n.d.	—

n.d. : 検出限界以下 文献44) から引用

しかしD-アミノ酸の含有量には、原料(穀物、モルト、ホップ)はほとんど影響しないことが明らかになった。測定試料中では、ベルリナーヴァイスビールに最もD-アミノ酸が多量に含まれていた。このビールは長期に熟成されそして乳酸菌による瓶内二次発酵が行われる点が特徴である。このビール中の例外的に高いD-Proは微生物のラセマーゼによって生産されたものであると考えられる。ベルギー産のランビックビールにも多量のD-アミノ酸が含まれているが、これらのD-アミノ酸も製造工程で添加されるさまざまな果物の種類によって大きく変化する。したがってビールに含まれるD-アミノ酸含量を測定することにより、ビールの品質や製品の均一性を確認することができる。同様にオレンジジュースの場合、高品質な製品にはL-アミノ酸しか含まれていないが劣化した製品にはD-アミノ酸が含まれていることが知られている<sup>45)</sup>。また合成アミノ酸の添加や様々な果物が混合された粗悪品中にもD-アミノ酸が含まれており、オレンジジュースに含まれるD-アミノ酸含量を測定することにより、オレンジジュースの品質や製品の均一性を確認することができる。

このようにD-アミノ酸は食品中に、特に発酵食品中に多量に含まれているが、通常食事として摂取される食品に含まれるD-アミノ酸は、腎臓などに存在しているD-アミノ酸オキシダーゼによって2-オキソ酸に変換されさらに代謝分解された後、最終的には尿中に排泄されるので、人体に悪影響を及ぼす心配は全くない<sup>46)</sup>。むしろ今後さまざまなD-アミノ酸の生理的機能が解明されれば、D-アミノ酸を多量に含む食品は健康増進機能などを有する可能性も考えられる。

## 7. おわりに

植物中にD-アミノ酸が存在することが発見されて以来約50年の年月が経っているが、いまだその明確な生理的機能は明らかになっていない。植物及び食品中のD-アミノ酸の生理的機能の解明は筆者の研究の柱の一つであり、今後も精力的に研究を展開していきたいと考えている。

## 謝辞

当研究室における植物及び食品中のD-アミノ酸の研究は、平成11年、筆者が筆者の大学院時代の恩師であり当時関西大学の教授であった左右田健次先生(京都大学名誉教授)とともに小川正先生(現:関西福祉科学大学教授)とアルファルファ芽生え中のD-Alaの定量的解析とアラニンラセマーゼの共同研究を開始したことに端を発する<sup>47-49)</sup>。アルファルファのアラニンラセマーゼの研究は、当時、関西大学の大学院生であった小野和利君が中心となり精力的に行われたものである。またイネのセリンラセマーゼの研究は、筆者が平成17年、関西大学の大学院生

であった郷上佳孝君, 伊藤克佳君, 紙谷雄志君, 吉田雅博君とともに研究を開始し, 現在も継続的に研究を行っている<sup>50-57</sup>。これらの研究遂行にご協力いただいた関係各位に心から感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Singh, B.K. (ed.) (1999) *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker Inc, New York Basel.
- 2) Zenk, M.H. & Scherf, H. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 737-738.
- 3) Zenk, M.H. & Scherf, H. (1964) *Planta*, **62**, 350-354.
- 4) Ogawa, T., Kimoto, M., & Sasaoka, K. (1977) *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1811-1812.
- 5) Erbe, T. & Brückner, H. (2000) *J. Chromatogr. A*, **881**, 81-91.
- 6) Frahn, J.L. & Illman, R.J. (1975) *Phytochemistry*, **14**, 1464-1465.
- 7) Manabe, H. (1985) *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1203-1204.
- 8) Ogawa, T., Kawasaki, Y., & Sasaoka, K. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 1275-1276.
- 9) Kullman, J.P., Chen, X., & Armstrong, D.W. (1999) *Chirality*, **11**, 669-673.
- 10) Aldag, R.W., Young, J.L., & Yamamoto, M. (1971) *Phytochemistry*, **10**, 267-274.
- 11) Brückner, H. & Westhauser, T. (1994) *Chromatographia*, **39**, 419-426.
- 12) Brückner, H. & Westhauser, T. (2003) *Amino Acids*, **24**, 43-55.
- 13) Pätzold, R. & Brückner, H. (2006) *Amino Acids*, **31**, 63-72.
- 14) Ono, K., Yanagida, K., Oikawa, T., Ogawa, T., & Soda, K. (2006) *Phytochemistry*, **67**, 856-860.
- 15) Brückner, H., Langer, M., Lüpke, M., Westhauser, T., & Godel, H. (1995) *J. Chromatogr. A*, **697**, 229-245.
- 16) Ogawa, T. & Fukuda, M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 998-1002.
- 17) Kawasaki, Y., Ogawa, T., & Sasaoka, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1-5.
- 18) Markova, T.A. & Gamburg, K.Z. (1997) *Plant. Sci.*, **122**, 119-124.
- 19) Rekoslavskaya, N.I., Yurjeva, O.V., Salyaev, R.K., Mapelli, S., & Kopytina, T.V. (1999) *Bulg. J. Plant Physiol.*, **25**, 39-49.
- 20) Fukuda, M., Tokumura, A., & Ogawa, T. (1973) *Phytochemistry*, **12**, 2593-2595.
- 21) Rozan, P., Kuo, Y.H., & Lambein, F. (2001) *Amino Acids*, **20**, 319-324.
- 22) Klosterman, H.J., Lamoureux, G.L., & Parsons, J.L. (1967) *Biochemistry*, **6**, 170-177.
- 23) Yagi, A., Ishizu, T., Okamura, N., Noguchi, S., & Itoh, H. (1995) *Planta. Med.*, **62**, 115-118.
- 24) Brückner, H., Justus, J., & Kirschbaum, J. (2001) *Amino Acids*, **21**, 429-433.
- 25) Schleifer, K.H. & Kandler, O. (1972) *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.
- 26) Brückner, H., Langer, M., & Lüpke, M. (1993) *Chirality*, **5**, 385-392.
- 27) Briggs, G.E. & Haldane, J.B.S. (1925) *Biochem. J.*, **72**, 248-254.
- 28) Soda, K. & Esaki, N. (1994) *Pure Appl. Chem.*, **66**, 709-714.
- 29) Kikuchi, S., Satoh, K., Nagata, T., Kawagashira, N., Doi, K., Kishimoto, N., Yazaki, J., Ishikawa, M., Yamada, H., Ooka, H., Hotta, I., Kojima, K., Namiki, T., Ohneda, E., Yahagi, W., Suzuki, K., Li, C.J., Ohtsuki, K., Shishiki, T., Otomo, Y., et al. (2003) *Science*, **301**, 376-379.
- 30) Wolosker, H., Blackshaw, S., & Snyder, S.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13409-13414.
- 31) Stríšovský, K., Jirásková, J., Barinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B.S., Konvalinka, J. (2003) *FEBS Lett.*, **535**, 44-48.
- 32) Feldman, D.A. & Datta, P. (1975) *Biochemistry*, **14**, 1760-1767.
- 33) Simanshu, D.K., Savithri, H.S., & Murthy, M.R. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 39630-39641.
- 34) Fujitani, Y., Nakajima, N., Ishihara, K., Oikawa, T., Ito, K., & Sugimoto, M. (2006) *Phytochemistry*, **67**, 668-674.
- 35) Foltyn N.V., Bendikov, I., Miranda, J.D., Panizzutti, R., Dumin, E., Shleper, M., Li, P., Toney, M.D., Kartvelishvily, E., & Wolosker, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1754-1763.
- 36) Shindoh, K. & Yasui, A. (2003) *Food Science and Technology Research*, **9**, 193-196.
- 37) 宮原 郁子, 広津 建, 三原久明, 江崎信芳 (2007) 構造生物学 (倉光成紀, 杉山政則編), pp. 125-132, 共立出版, 東京.
- 38) Hansen, R., Pearson, S.Y., Brosnan, J.M., Meaden, P.G., & Jamieson, D.J. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 116-125.
- 39) Wikwn, T. & Pfennig, N. (1959) *Antonie Van Leeuwenhoek*, **25**, 193-229.
- 40) Kumara, H.M., De Cort, S., & Verachtert, H. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2352-2358.
- 41) Yahara, G.A., Javier, M.A., Tulio, M.J., Javier, G.R., & Guadalupe, A.U. (2007) *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **30**, 389-395.
- 42) Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D.S., Møller, P.L., Traoré, A.S., & Jakobsen, M. (2007) *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 765-777.
- 43) Mussatto, S.I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I.M., & Roberto, I.C. (2007) *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1973-1976.
- 44) Erbe, T. & Brückner, H. (2000) *J. Chromatography A*, **881**, 81-91.
- 45) Simó, C., Barbas, C., & Cifuentes, A. (2002) *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5288-5293.
- 46) Brückner, H., Haasmanm, S., & Friedrich, A. (1994) *Amino Acids*, **6**, 205-211.
- 47) 小野和利, 老川典夫, 小川 正, 左右田健次 (2001) 生化学, **73**, 900.
- 48) 宮田智子, 老川典夫, 左右田健次 (2002) 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集, p. 36.
- 49) 宮田智子, 老川典夫, 左右田健次 (2003) 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集, p. 258.
- 50) 紙谷雄志, 郷上佳孝, 吉田雅博, 左右田健次, 老川典夫 (2006) 日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集, p. 148.
- 51) 伊藤克佳, 紙谷雄志, 郷上佳孝, 吉田雅博, 老川典夫 (2006) 日本ビタミン学会第 58 回大会講演要旨, p. 207.
- 52) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫 (2006) 第 23 回微量栄養素研究会シンポジウム講演要旨集, p. 11.
- 53) 伊藤克佳, 郷上佳孝, 老川典夫 (2006) 第 2 回 D-アミノ酸研究会学術講演会要旨集, p. 54.
- 54) 郷上佳孝, 老川典夫, 小野和利, 左右田健次 (2006) 第 2 回 D-アミノ酸研究会学術講演会要旨集, p. 60.
- 55) 伊藤克佳, 郷上佳孝, 岸本勝也, 老川典夫 (2007) 日本農芸化学会 2007 年度大会講演要旨集, p. 213.
- 56) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫 (2007) 第 24 回微量栄養素研究会シンポジウム講演要旨集, p. 18.
- 57) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 松島由貴, 老川典夫 (2007) 第 59 回日本生物工学会講演要旨集, p. 63.