

# 博士論文

## D-アスパラギン酸高生産乳酸菌の単離と 高生産機構の解析

令和 5 年 1 月

梶谷 賢吾

[指導教員：高橋 祥司 印]

長岡技術大学大学院

工学研究科 生物統合工学専攻

## 要旨

D-アスパラギン酸 (D-Asp) は抗生物質の原料として有用であり、ヒトに有益な生理作用を示すことから、その生産方法が重要となっている。ある種の乳酸菌は細胞質でアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) により L-Asp から D-Asp を生産し、D-Asp を細胞壁構成成分として使用している。実際に、乳酸菌 *Levilactobacillus brevis* JCM1170 株の培養液上清中に約 317  $\mu\text{M}$  の D-Asp が確認されている。したがって、多量の D-Asp を生産する乳酸菌は、D-Asp の工業的発酵生産に有用であると考えられる。

D-Asp を含む D-アミノ酸の測定は HPLC 用いて行われるが、測定のために蛍光誘導体化などの前処理が必須であること、1 回に 1 試料しか測定できないことから、多数の乳酸菌培養液の D-Asp を測定することが困難である。一方、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) を使用した酵素学的な測定法では、前処理を必要とせず、1 度の測定で多数の試料を測定できるため、多数の乳酸菌培養液の D-Asp 定量に有用と考えられる。DDO は酸性 D-アミノ酸を基質とするため D-Glu にも作用してしまうが、当研究室では、D-Asp に対してのみ高い特異性を有する、酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来の DDO (ChDDO) の単離に成功しており、ChDDO を使用することによって D-Asp 特異的な測定法の開発が可能であると考えられる。そこで本研究では、ChDDO を用いた D-Asp 高生産乳酸菌の酵素学的スクリーニング法の開発を行い、スクリーニングによって得られた D-Asp 高生産乳酸菌の高い D-Asp 生産能にかかわる因子の解明を目的とした。

ChDDO を使用して D-Asp を測定するため、発色試薬の選定を行ったところ、*N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOOS) と 4-aminoantipyrine (TOOS/4AAP) の組み合わせが最も感度が良好であった。加えて、乳酸菌の汎用的な培地である MRS 培地による干渉を受けず、D-Asp 濃度が 0–2 mM の範囲で検出限界と定量限界がそれぞれ、13  $\mu\text{M}$  と 40  $\mu\text{M}$  であった。D-Asp 生産乳酸菌と非生産菌の培養液上清を使用した対照試験では、D-Asp 生産乳酸菌の培養液上清でのみ高い濃度の D-Asp が検出されたことから、D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングに有用であると考えられた。新潟県内の野菜・果物や発酵食品から D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングを行い、キャベツの塩漬けから既知の D-Asp 高生産乳酸菌である *Lv. brevis* JCM1170 の約 2.6 倍の D-Asp 生産能を有する WDN19 株の取得に成功した。WDN19 株を含む D-Asp 生産が見られた乳酸菌に対して分子系統解析を行ったところ、乳酸菌の D-Asp 生産能は属や種ではなく、株レベルで異なることが示唆された。

WDN19 株の同定を行ったところ、WDN19 株は *Latilactobacillus curvatus* DSM 20019 に近縁であった。WDN19 株と *Lt. curvatus* DSM 20019 の D-Asp 細胞外生産能の比較から、WDN19 株の D-Asp 細胞外生産能は DSM 20019 株よりも 13.7 倍高く、高い D-Asp 生産能は WDN19 株のみに見出された。D-Asp は RacD により L-Asp から生産されることから、両株の L-Asp 細胞外濃度を測定したところ、D-Asp 細胞外濃度の増加に応答して L-Asp 細胞外濃度が減少し、RacD による D-Asp 生産が示唆された。WDN19 株における L-Asp 細胞外濃度の低下速度と D-Asp 細胞外

濃度の増加速度は、DSM 20019株よりも著しく速かったことから、WDN19株の高いD-Asp生産能は高いRacD活性に起因する可能性が示唆された。さらに、WDN19株ではL-Asp細胞外濃度が減少した後に、L-Asp細胞外濃度の増加が見られたことから、L-Asp生産能も高い可能性が示された。両株の粗抽出液におけるRacD活性を測定したところ、WDN19株の対数増殖期初期のRacD活性はDSM 20019よりも12.9倍高かった。両株の対数増殖期初期の *racD* 遺伝子の転写量を測定したところ、WDN19株はDSM20019株よりも3.1倍高かった。さらに、両株のRacD分子活性を測定したところ、WDN19株はDSM20019よりも1.8倍高かった。以上のことから、WDN19株は *racD* 遺伝子転写量とRacD活性の双方が高いことが示された。L-Aspを含まない化学合成培地（CDM）で両株を培養し、D, L-Asp細胞外濃度を測定したところ、WDN19株でのみD, L-Asp細胞外濃度の増加が見られたことから、WDN19株はDSM20019株よりも高いL-Asp生産能を有していることが示唆された。CDMにL-Asp前駆体を添加して両株を培養したところ、L-Asn添加時に両株においてL-Asp生産が確認され、特にWDN19株では顕著なL-Asp細胞外濃度の増加が観察された。L-Aspはアスパラギナーゼ（AnsA）によってL-Aspから生合成されると推定されることから両株の粗抽出液のAnsA活性を測定したところ、対数増殖期中期と定常期初期においてWDN19株のAnsA活性がDSM 20019株よりも高かった。さらに両株の遺伝情報から、WDN19株ではL-Asp代謝酵素遺伝子が破壊されていることが推定された。以上のことから、WDN19株の高いD-Asp生産能はD-Asp生産を担うRacDの分子活性と発現量が高いことと、高AnsA活性とアスパラギン酸代謝酵素遺伝子破壊によるRacDへの高いL-Asp供給量によることを明らかにした。

## 目次

序論.....	3
1. D-アミノ酸と L-アミノ酸.....	3
2. 細菌細胞壁における D-アミノ酸.....	3
3. 細菌における D-アミノ酸の分布と機能.....	6
4. 動物における D-アミノ酸の分布と機能.....	10
5. 食品中の D-アミノ酸.....	11
6. D-アミノ酸の応用的利用.....	12
7. D-アミノ酸の生産方法.....	12
8. 乳酸菌.....	15
9. 乳酸菌における D-Asp 生産.....	16
10. <i>Latilactobacillus</i> 属.....	17
10.1. <i>Latilactobacillus curvatus</i> .....	17
11. アミノ酸ラセマーゼ.....	18
11.1. アスパラギン酸ラセマーゼ.....	18
12. D-アミノ酸分析技術.....	19
13. D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO).....	20
14. 酵素を用いた酸性 D-アミノ酸の検出・定量.....	22
15. 乳酸菌における L-Asp 代謝酵素.....	24
16. 研究目的.....	26
第一章 酵素を用いた D-Asp 高生産乳酸菌スクリーニング法の開発.....	27
1. 緒言.....	27
2. 結果.....	28
2.1. 大腸菌粗抽出液 ChDDO を用いた D-Asp 検出.....	28
2.2. 精製 ChDDO を用いた D-Asp 検出.....	30
2.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 検出試薬の検討.....	31
2.4. MRS 培地成分の D-Asp 検出に及ぼす影響.....	34
2.5. 乳酸菌培養液の D-Asp 検出.....	39
2.6. 食品からの乳酸菌単離と D-Asp 高生産乳酸菌スクリーニング.....	41
2.7. D-Asp 分泌生産および非分泌生産乳酸菌の分子系統解析.....	43
3. 考察.....	46
3.1. 酵素法と HPLC 法による D-Asp 検出の比較.....	46
3.2. ChDDO 発現大腸菌粗抽出液を用いた D-Asp 検出.....	47

3.3.	発色試薬の検討.....	47
3.4.	MRS 培地成分の D-Asp 検出への影響.....	48
3.5.	乳酸菌の単離.....	49
3.6.	D-Asp 分泌生産乳酸菌 .....	49
4.	材料と方法.....	51
第二章	<i>Latilactobacillus</i> sp. WDN19 株における D-Asp 高生産機構の解析 .....	56
1.	緒言 .....	56
2.	結果.....	57
2.1.	WDN19 株の全ゲノム配列解析 .....	57
2.2.	WDN19 株の同定 .....	59
2.3.	WDN19 株と DSM 20019 株の D-Asp 生産量の比較.....	61
2.4.	WDN19 株と DSM 20019 株における D,L-Asp 生産.....	62
2.5.	WDN19 株と DSM 20019 株の RacD 活性.....	63
2.5.1.	乳酸菌粗抽出液における RacD 活性 .....	63
2.5.2.	WDN19 株と DSM 20019 株における <i>racD</i> 遺伝子の転写量 .....	64
2.5.3.	WDN19 株と DSM 20019 株の組換え RacD の分子活性.....	65
2.6.	WDN19 株と DSM 20019 株における L-Asp 生産 .....	69
2.6.1.	化学合成培地での L-Asp 生産.....	69
2.6.2.	L-Asp 生合成.....	70
2.6.3.	L-Asn 生合成と取り込み能.....	72
2.6.4.	AnsA 活性 .....	74
2.7.	細胞内 Asp 濃度 .....	75
3.	考察.....	76
3.1.	WDN19 株と DSM 20019 株の D-Asp 生産量 .....	76
3.2.	WDN19 株と DSM 20019 株 RacD の構造比較.....	77
3.3.	WDN19 株と DSM 20019 株における RacD と AnsA 活性の相違 .....	80
3.4.	WDN19 株と DSM 20019 株における L-Asp 生産能の相違 .....	82
3.5.	WDN19 株における D-Asp 高生産の生理的意義.....	84
4.	材料と方法.....	85
	謝辞.....	93
	引用文献.....	94

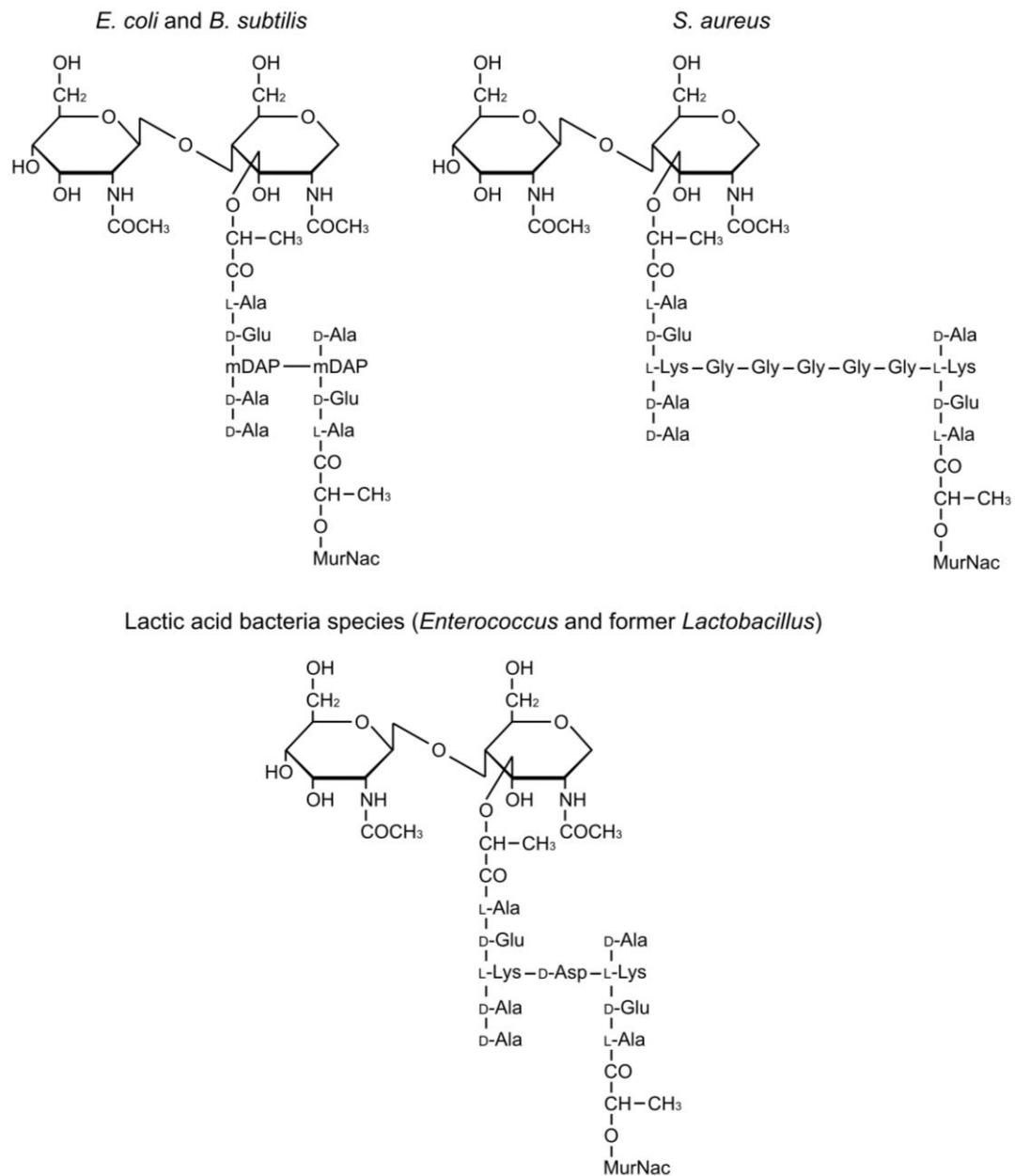
## 序論

### 1. D-アミノ酸と L-アミノ酸

アミノ酸はグリシンを除いて、 $\alpha$  炭素に 4 つの異なる官能基が結合しており、互いに重ね合わせることのできない D-体と L-体の鏡像異性体が存在する。D-体と L-体では分子量、融点・沸点や等電点などの物理化学的性質は全く同じであるが、平面偏光が左右逆となるという光学的性質が異なる[1]。L-アミノ酸は生体内のタンパク質の構成成分として生体で重要な働きをしているのに対し、D-アミノ酸は細菌細胞壁ペプチドグリカン (PG) や一部の機能的なペプチドに使用されていることが知られていたが、生体内における機能は不明であった[2]。しかし、近年の分析技術の発達によって、D-アミノ酸が細菌から動物にいたる様々な生物に存在し、その機能が明らかとなってきた。

### 2. 細菌細胞壁における D-アミノ酸

多くの細菌において、D-アミノ酸は細胞壁構成成分として利用されている。細菌細胞壁ペプチドグリカン (PG) において、*N*-アセチルグルコサミン (GluNac) と *N*-アセチルムラミン酸 (MurNac) が  $\beta 1 \rightarrow 4$  結合した糖鎖の MurNac 部分から、4 または 5 つのアミノ酸からなるペプチド鎖が生じる。*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* を代表として、ペプチド鎖は MurNac 側から、L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (mDAP)-D-Ala-D-Ala であり、D-Glu と D-Ala が含まれる (Fig. 1) [3]。細菌細胞壁 PG はペプチド鎖同士が互いに結合することにより多層構造をとる。*E. coli* や *B. subtilis* では mDAP 同士が直接結合するが、菌種によって結合の仕方は異なり、*Staphylococcus aureus* では 5 つの Gly が、*Lactobacillus* 属と分類されていた乳酸菌や *Enterococcus* 属に分類される乳酸菌の多くでは D-Asp がペプチド間の架橋として機能している (Fig. 1) [3,4]。さらに、ペプチド鎖と架橋構造による分類分けがなされており、D-Ala や D-Glu の他に D-Asp, D-Ser や D-Lys などの D-アミノ酸がペプチド架橋部分に利用されている (Table 1) [5]。



**Fig. 1. 細菌における細胞壁ペプチドグリカン構造**

グラム陰性菌（*E. coli*）とグラム陽性菌（*B. subtilis*, *S. aureus* と *Lactobacillus* 属に分類されていた乳酸菌や *Enterococcus* などの乳酸菌）における細胞壁構造ペプチドグリカンの構造を示した．略語：mDAP, *meso* - diaminopimelic acid; MurNac, *N*-acetylmuramic acid.

**Table 1. D-アミノ酸を含む細菌細胞壁ペプチド構造**

Subtypes <sup>a</sup>		Compositions <sup>b</sup>
A11.31	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Asp <sup>c</sup>
A11.32	A4 $\alpha$	[L-Lys/L-Orn]-D-Asp
A11.33	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Glu
A11.34	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ala-D-Asp
A11.36	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ser-D-Asp
A11.37	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Ser-D-Asp
A11.38	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Ser-D-Glu
A11.39	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ser <sub>2</sub> -D-Glu
A11.40	A4 $\alpha$	[L-Lys]-Gly-D-Glu
A11.42	A4 $\alpha$	[L-Lys]-Gly-D-Asp
A11.43	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Glu <sub>2</sub>
A11.45	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Thr-D-Asp
A11.48	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ser-D-Glu
A11.51	A5 $\alpha$	[L-Lys]-L-Lys-D-Glu
A11.52	A5 $\alpha$	[L-Lys]-L-Lys-D-Asp
A11.53	A5 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ala-L-Lys-D-Glu
A11.55	A5 $\alpha$	[L-Lys/L-Orn]-L-Lys-D-Glu
A11.57	A4 $\alpha$	[L-lys]-L-Thr-D-Glu
A11.59	A4 $\alpha$	[L-Lys]-L-Ala-D-Glu
A11.60	A4 $\alpha$	[L-Lys]-D-Asp; $\alpha$ -carboxyl group of D-Glu substituted by Gly
A12.2	A4 $\alpha'$	[L-Lys]-D-Glu
A12.3	A4 $\alpha'$	[L-Lys]-Gly-D-Asp
A21.4	A4 $\beta$	[L-Orn]-D-Asp
A21.5	A4 $\beta$	[L-Orn]-D-Glu
A21.6	A4 $\beta$	[L-Orn/L-Lys]-D-Glu
A21.7	A4 $\beta$	[L-Orn]-D-Ser-D-Asp
A21.8	A4 $\beta$	[L-Orn/L-Lys]-D-Ser-D-Asp
A21.9	A4 $\beta$	[L-Orn]-L-Ser-D-Glu
A21.11	A4 $\beta$	[L-Orn]-L-Lys-D-Glu
A21.12	A4 $\beta$	[L-Orn]-D-Ser-D-Glu
A21.13	A4 $\beta$	[L-Orn]-Gly <sub>2</sub> -D-Glu
A21.14	A4 $\beta$	[L-Orn]-L-Ala-Gly-D-Asp
A22.1	A4 $\beta'$	[L-Orn]-D-Asp
A31.1	A4 $\gamma$	[mDAP]-D-Glu <sub>2</sub>
A31.2	A4 $\gamma$	[mDAP]-D-Glu <sub>2</sub> ; $\alpha$ -carboxyl group of D-Glu substituted by Gly
A31.3	A4 $\gamma$	[mDAP]-D-Asp-D-Glu ; $\alpha$ -carboxyl group of D-Glu substituted by Gly
B4	B2 $\alpha$	{L-Ser} [L-Orn]-D-Glu-D-Lys/D-Orn <sup>d</sup>
B5	B2 $\beta$	{Gly} [L-Hse]-D-Glu-D-Orn
B6	B2 $\beta$	{Gly} [L-Hse]-D-Glu(Hyg)-Gly-D-Orn
B7	B2 $\gamma$	{Gly} [L-Dab]-D-Glu-D-Dab
B8	B1 $\beta$	{Gly} [L-Hse]-D-Glu-Gly-D-Dab
B9	B2 $\alpha$	{Gly} [L-Orn]-D-Glu-D-Orn
B10	B2 $\beta$	{Gly} [L-Hse]-D-Glu-D-Dab
B11	B2 $\delta$	{Gly} [L-Ala]-D-Glu-D-Dab-L-Thr
B12	B2 $\alpha$	{Gly} [L-Orn]-D-Glu-Gly-D-Orn
B13	B1 $\delta$	{L-Ser} [L-Ala]-D-Glu-L-Asp-L-Lys
B14	B2 $\beta$	{Gly} [L-Hse]-D-Glu-D-Lys
B15	B1 $\delta$	{L-Ser} [L-Ala]-D-Glu-Gly-L-Lys <sub>2</sub>

文献[5]. 略語 : Orn, ornithine; mDAP, *meso*-diaminopimelic acid; Hse, homoserine; Glu (Hyg) , threo-3-hydroxy-glutamic acid; Dab, 2,4-diaminobutyric acid.

a 左, Schumann (2011) による分類[5]; 右, Schleifer と Kandler (1972) による分類[6].

b A タイプ, ペプチド鎖 3 番目のアミノ酸とそれに結合する架橋成分; B タイプ, ペプチド鎖 1 番目と 3 番目のアミノ酸とそれに結合する架橋成分. A タイプではペプチド鎖の 1 番目のアミノ酸は L-Ala である.

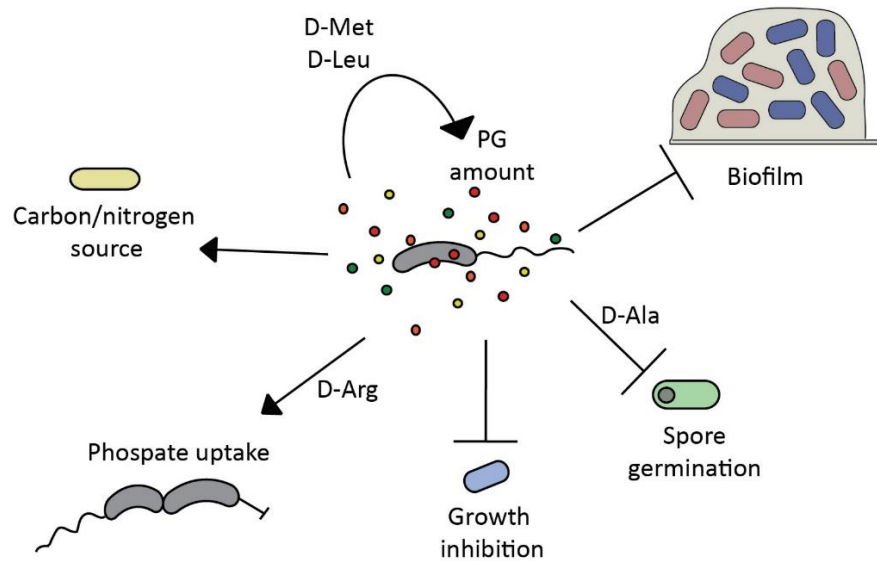
c []内のアミノ酸はペプチド鎖 3 番目のアミノ酸.

d {}内のアミノ酸はペプチド鎖 1 番目のアミノ酸.



### 3. 細菌における D-アミノ酸の分布と機能

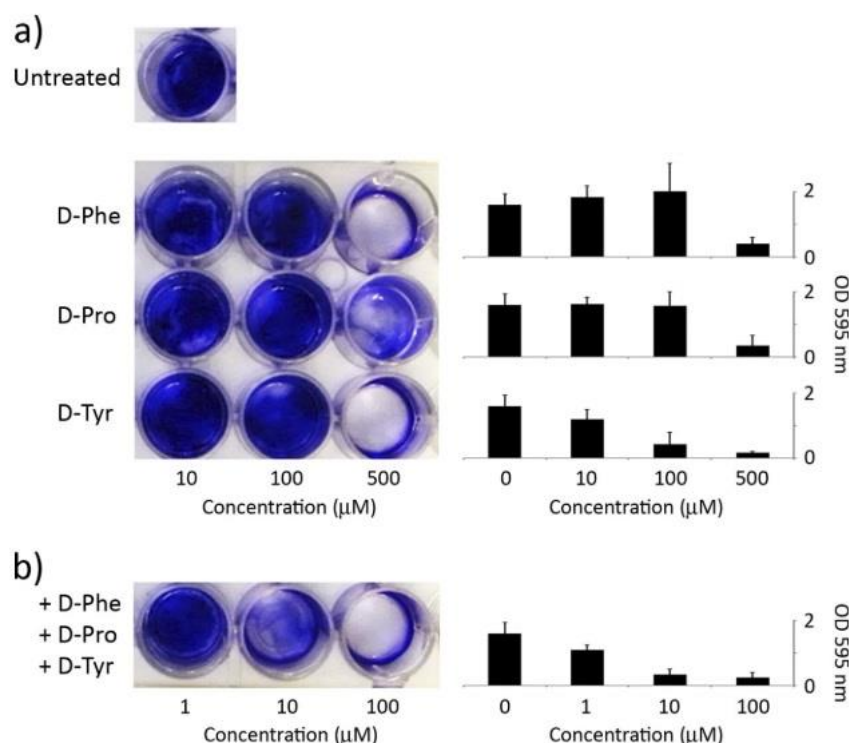
細菌において D-アミノ酸は、細胞壁 PG の構成成分以外にも、機能性ペプチドの構成成分としての役割も果たしている。 *Bacillus brevis* が生産する抗菌ペプチド gramicidin S の 4 番目と 9 番目の位置に D-Phe が、gramicidine D の 4, 10 と 12 番目の位置に D-Leu が、6 と 8 番目の位置に D-Val が含まれている[7, 8]。さらに、同じく *B. brevis* が生産する抗菌ペプチド tyrocidine A と B の 1 と 4 番目に D-Phe が、tyrocidine C と D の 1 番目と 4 番目にそれぞれ D-Phe と D-Trp が含まれている。さらに、軟体動物の幼生培養液から単離された細菌株 CF-20 と C-148 が生産する、 *V. anguillarum* に対して高い抗菌活性を示す 5 種類の異なる構造を有する全ての D,D-diketopiperazine が D-アミノ酸により構成されていた[9]。これらの D-アミノ酸を含有するペプチドは、主にリボソームによらないペプチド合成により生産される[1]。また、これらのペプチドは L-体で構成されたペプチドと比較してプロテアーゼに対して耐性を示すことが知られている[1]。



**Fig. 2. 細菌における遊離 D-アミノ酸の生理機能**

細菌における遊離 D-アミノ酸の機能. 図は[10]より引用.

近年, 細菌において, non-canonical D-amino acids (NCDAAs) と呼ばれる細胞壁 PG 構成成分以外の多様な D-アミノ酸が遊離型として見いだされ, 様々な生理機能を有していることが報告されている (Fig. 2) [10]. 例えば, D-アミノ酸が細菌のバイオフィーム形成を阻害することが報告されている. 具体的には, 2 mM の D-Cys, D-Trp と D-His が臨床細菌株 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 株のバイオフィーム形成をそれぞれ 86%, 70%と 35%阻害し, 4 mM の D-Cys と D-Trp の混合物が 95%阻害した[11]. 加えて, 4 mM の D-Cys, D-Tyr と D-Trp が緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株のバイオフィーム形成をそれぞれ 30%, 16%と 10%阻害し, 4 mM の D-His, D-Thr, D-Trp と D-Ser の混合物が 42%阻害した[11]. また, 500  $\mu$ M の D-Tyr, D-Pro と D-Phe が黄色ブドウ球菌 *S. aureus* SC01 のバイオフィーム形成を大きく阻害し, これら 3 種の D-アミノ酸混合物は 100  $\mu$ M においてバイオフィーム形成を大きく阻害した (Fig. 3) [12]. これは D-アミノ酸が細胞間付着タンパク質の局在化を阻害しているためであると考えられている[12].



**Fig. 3 D-アミノ酸添加による *S. aureus* SC01 株のバイオフィーム形成阻害**

[12]より引用. D-Phe, D-Pro または D-Tyr を含む培地 (a), または 3 種の D-アミノ酸を全て含む培地 (b) で培養した *S. aureus* SC01 株の付着細胞をクリスタルバイオレットにより染色した写真と, OD<sub>595</sub> によりバイオフィーム量を定量した図を示す.

また, D-アミノ酸が細菌細胞壁の再構築にも関与することが知られている. コレラ菌 *Vibrio cholerae* の定常期の培養液上清に D-Met と D-Leu が他の D-アミノ酸よりも多く見出され, D-Met と D-Leu 生合成に関与する BsrV の破壊株では PG 含有量が野生型の 2 倍になり, D-Met と D-Leu の添加により PG 含有量が野生株と同等となったことから, D-Met と D-Leu が細胞壁合成を負に調節していると考えられた[13]. 加えて, D-Met は細胞壁に取り込まれ, PG の長さや柔軟性に影響を与えることが示された[13]. さらに, D-アミノ酸がペニシリン結合タンパク質 (PBPs) に結合し, 細胞壁合成の調節因子として機能することも示唆されている[13].

加えて, いくつかの D-アミノ酸は細菌の生育を阻害することが明らかにされている. 具体的には, D-Arg と D-Ser は *B. subtilis* の生育を大きく阻害し, D-Ala, D-Arg, D-Met, D-Ser, D-His, D-Gln と D-Phe の 7 種のアミノ酸は  $\alpha$ -Proteobacteria に属する *Caulobacter crescentus*, *Agrobacterium tumefaciens* と *Angulomicrobium tetraedale* の生育を阻害する[14]. さらに, D-Arg は Firmicutes と Proteobacteria に属する多くの細菌の生育を強力に阻害する[14].

いくつかの細菌では、D-アミノ酸が単一栄養源として生育に利用される。例えば、グラム陽性菌 *Raineyella antarctica* LZ-22T 株は D-His, D-Leu, D-Met と D-Val を代謝できる[15]。また、*Halomonas titanicae* SM1922 株は D-Tyr, D-Phe, D-Asp, D-Thr, D-Ser, D-Leu と D-Met の 7 種の D-アミノ酸を、*Pseudoaltermonas neustonica* SM 1927 株は D-Tyr, D-Phe, D-Thr, D-Leu と D-Met の 5 種の D-アミノ酸を生育に利用でき、これらの株に D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ (DAD), D-アミノ酸トランスアミナーゼ (DAAT) や D-セリンアンモニアリアーゼなどの D-アミノ酸代謝酵素が見出されている[16]。

他にも、D-Ala が *Bacillus anthracis* の胞子の発芽を阻害することが知られており、アラニンラセマーゼ (Alr) によって生合成された D-Ala が胞子形成過程における発芽の制御に関与していることが示されている[17, 18]。また、グラム陰性細菌の *Caulobacter crescentus* や *Agrobacterium tumefaciens* の D-Arg 耐性株がリン酸取り込みに関与する遺伝子に変異を有していたことから、D-Arg のリン酸取り込みへの関与が示唆されている[14]。また、D-Asp は *P. saccharophila* タンパク質合成を阻害するが、これは D-Asp による AMP 合成の低下が原因と考えられている[19, 20]。

#### 4. 動物における D-アミノ酸の分布と機能

動物において見いだされている機能性ペプチドにも D-アミノ酸が見出されている。例えば、アルゼンチンに生息するカエル *Pollymedusa sauvagei* の皮ふから分泌される、オピオイド活性を有するペプチド demorphin には D-Ala が含まれており、オピオイド活性に重要であることが明らかにされている[1, 21]。また、海洋性のカタツムリである *Conus purpurascens* の毒から単離されたペプチド contryphan には D-Trp や D-Leu が含まれており、D-Trp は構造の安定化に寄与していると考えられている[22, 23]。

長年、動物に見いだされた遊離 D-アミノ酸は生体外異物として考えられてきたが、近年の分析技術の発達により、その局在と生理機能が明らかになりつつある。例えば、遊離 D-Ser は哺乳動物脳内に高濃度に見出されており、特に大脳皮質で最も高濃度で見いだされており、次いで海馬、線条体、辺縁系前脳部、間脳と中脳の順に高い濃度で見出されている[24]。また、D-Ser の分布が脳内 *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) の分布と一致し、D-Ser が NMDAR の Gly 結合部位へ結合するコアゴニストとして機能し、神経伝達に関与することが明らかとなった[24][25]。さらに、D-Ser が脳の成長、シナプスの可塑性や認知や社会性相互作用にも影響することが示されている[26-29]。遊離 D-Asp も脳内において高濃度で見出され、NMDAR の Glu 結合部位に結合するアゴニストとして作用し、NMDAR を活性化させ、神経伝達や統合失調症に関連する行動に影響を与えることが示されている[30, 31]。

他にも、ヒト血漿には D-Ala, D-Ser と D-Pro が検出されている[32, 33]。これらの D-アミノ酸のうち、D-Ser 濃度が血中クレアチニンレベルや糸球体ろ過量 (GFR) と相関があったことから、腎障害の程度を評価するバイオマーカーとして使用できる可能性が示されている[33]。尿、血漿、脳脊髄液や羊水といった組織液には、D-Phe, D-Pro, D-Trp や D-Tyr が検出されており、特に尿に多く見出されている[34]。唾液には、D-Ala, D-Asp と D-Pro が多く見出されており、D-Ala と D-Asp は唾液腺と口内の上皮細胞で生産されていると考えられている[35]。このように、生体内の様々なところで D-アミノ酸が検出されているが、その生理的な役割が明らかになっていないものも多い。

## 5. 食品中の D-アミノ酸

近年の D-アミノ酸の分析から、D-アミノ酸は乳製品、野菜、果物、酒、酢、肉、魚や漬物などの様々な食品にも見出されている[36]。D-アミノ酸と L-アミノ酸では物理化学的性質は同じであるが、異なる味を呈し、D-アミノ酸の多くは甘みを呈することが報告されている (Table 2) [37]。食品中の D-アミノ酸には、植物、果物や野菜にもともと含まれていたものと細菌によって生産されたものがある[38]。前者は、植物中のアミノ酸ラセマーゼやアミノトランスフェラーゼにより生産されたものや、細菌由来の D-アミノ酸が植物に取り込まれたものである[39-41]。一方、後者は乳酸菌などの細菌により、食品発酵中に生産されたものである。乳酸発酵させたトマト酢には種々の D-アミノ酸の濃度が増加したことから、乳酸菌が D-アミノ酸生産に寄与すると考えられている[42]。さらに、ワインのマロラクティック発酵中に D-Ala, D-Glu や D-Lys 濃度が上昇することから、ワイン乳酸菌 *Oenococcus oeni* によるこれら D-アミノ酸の生産が示唆されている[43]。

Table 2. L-アミノ酸と D-アミノ酸の味の違い

アミノ酸	L-型アミノ酸	D-型アミノ酸
Ala	甘味	強甘
Val	苦味/無味	強甘
Leu	苦味	強甘
Ile	苦味	甘味
Ser	微甘	強甘
Thr	微甘 (後味悪い)	弱甘
Cys	苦味/甘味	甘味/苦味/酸味
Met	苦味	甘味
Phe	微苦	甘味
Trp	苦味	強甘
Tyr	微苦/無味	甘味
Pro	弱甘	微苦
Gln	弱旨味	甘味
Asn	苦味/無味	弱甘
Glu・Na	旨味	甘味/無味
Asp・Na	微苦	無味
Lys・HCl	弱甘→苦味	弱甘
Arg・HCl	微苦 (後味良し)	弱甘
His	苦味	甘味

文献[37]を基に作成。緑で強調した部分は甘味を呈する。

## 6. D-アミノ酸の応用的利用

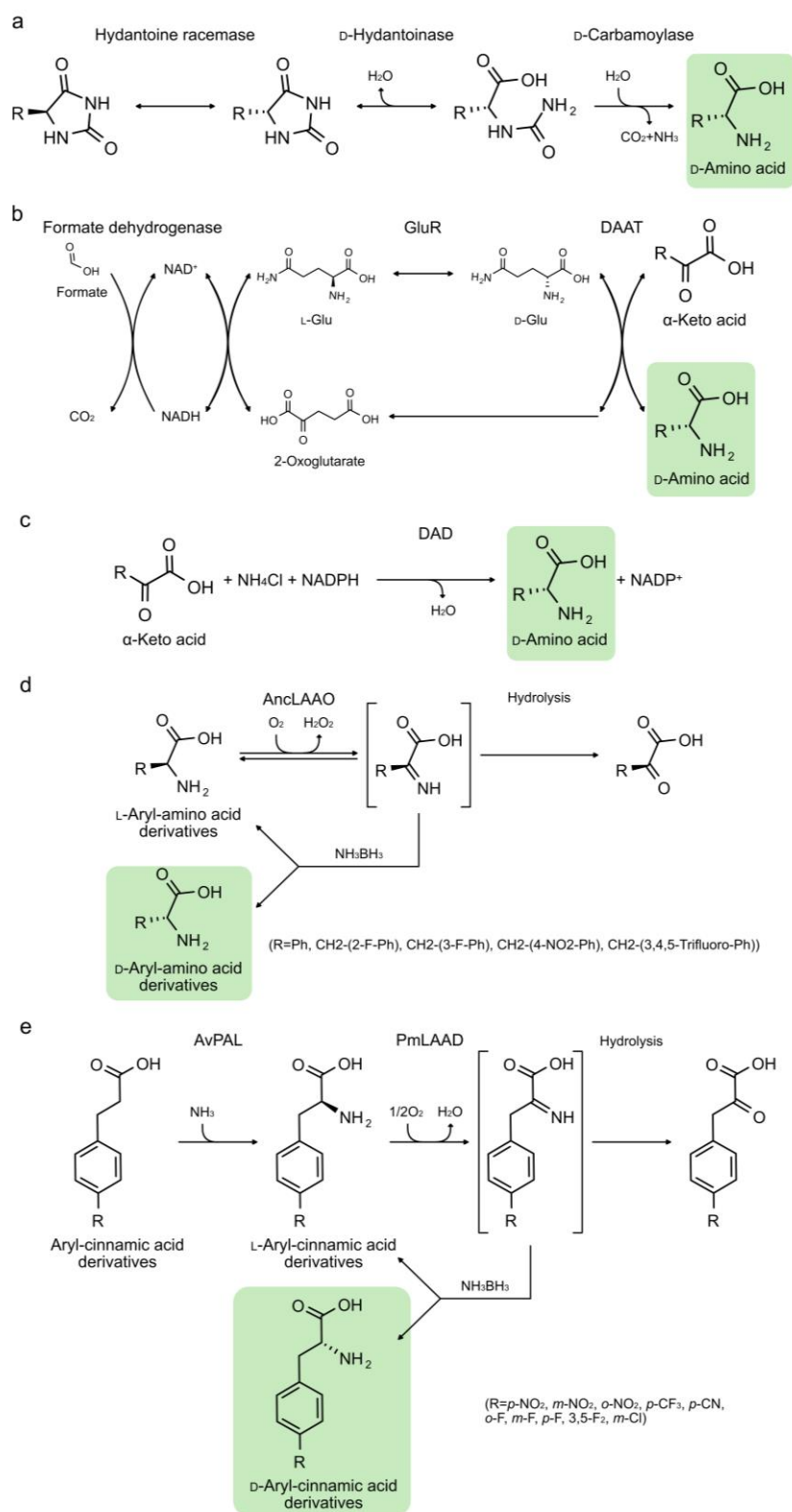
D-アミノ酸は様々な抗生物質の原料として重要である。D-*p*-hydroxyphenylglycine, D-phenylglycine と D-Asp はそれぞれ合成ペニシリン剤である amoxicillin, ampicillin と aspoxicillin の原料として使用されている[44, 45]。また, D-Cys は  $\beta$ -lactam 系薬剤である TM-141 の原料として使用されている[46]。抗生物質以外にも, インテグリン  $\alpha 5\beta 1$  阻害剤 Pro-His-Ser-Cys-Asn ペプチド (ATN-161) の His と Cys を D-体に置換したものは, L-体のみのものと比較して, 前立腺癌細胞の血管外漏出を数百-数千倍, 肺でのコロニー化を数十万倍阻害する効果が見出され, 前立腺がんの効果的な治療薬となりうることを示されている[47]。食品の分野でも D-アミノ酸は使用されており, スクロースの 200 倍の甘さを有する人工甘味料 alitame には D-Ala が含まれている[48]。米国では D-アミノ酸の食品への直接添加が認められているため, D-Asp や D-Ser がサプリメントとして販売されている (<https://nutricost.com/collections/amino-acids> と <https://www.predatornutrition.com/shop-by-brand/prototype-nutrition>)。一方, 日本では, D-アミノ酸の食品への直接添加は, D-Ala, D-Met, D-Thr と D-Trp の D,L ラセミ体混合物しか認められていないため, D-アミノ酸を多く含む黒酢などの食品を他の食品へ添加することによって, D-アミノ酸の機能性を利用した食品が開発されている (<https://www.shiseido.co.jp/kiresusu/>) [49]。さらに, D-Asp が抗酸化作用やコラーゲン形成促進効果を有すること, D-Glu が皮膚のバリア機能を回復させシワの形成や肌荒れを抑える効果を有すること, D-Ser が紫外線による皮膚ダメージの低減作用を有することから, D-アミノ酸を含有した化粧品が開発されている (国際特許番号 WO2011158678A1) [50]。

## 7. D-アミノ酸の生産方法

D-アミノ酸の生産方法には化学的な方法と酵素学的方法が存在する。化学的な方法では, 高コスト, 低収量, 反応が多段階, 反応速度が遅い, 選択性が低いことや, 目的物の精製に手間がかかるという欠点がある[51-53]。これに対して, 酵素学的方法では, 効率的, 反応条件が緩い, 選択性が高い, 省エネルギーであり環境に優しいという利点がある[51-53]。D-アミノ酸生産に使用される酵素には, D-ヒダントイナーゼ (EC 3.5.2.2) および D-カルバモイラーゼ (EC 3.5.1.77), D-アミノサントランスフェラーゼ (DAAT, EC 2.6.2.21), D-アミドヒドロラーゼ, L-アミノ酸オキシダーゼ (LAAO), D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ (DAD, EC 1.4.99.1) および D-アンモニアリアーゼ (EC 4.3.1.X) などがある (Fig. 4) [44, 51, 52]。D-ヒダントイナーゼおよび D-カルバモイラーゼを使用した方法では, はじめに L-hydantoin をヒダントインラセマーゼによって D-hydantoin に変換し, ついで D-ヒダントイナーゼにより D-hydantoin を加水分解して D-*N*-carbamoyl-amino acid に変換する。最後に, D-カルバモイラーゼによって D-*N*-carbamoyl-amino acid からカルバモイル基を脱離させること D-アミノ酸へと変換させる[44] (Fig. 4a)。Nakajima らは DAAT とギ酸デヒドロゲナーゼ, グルタミン酸デヒドロゲナーゼおよびグルタミン酸ラセマーゼ (GluR) の 4 種の酵素

を組み合わせた D-アミノ酸生産法を開発している (Fig. 4b) [54, 55]. Vedha-Peter らは 2,6-D-ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼにランダム変異導入して広基質特異性の D-アミノ酸デヒドロゲナーゼを開発し, 各種  $\alpha$ -ケト酸から種々の D-アミノ酸の生産を可能にした (Fig. 4c) [53, 56]. Nakano らは渦鞭毛藻 *P. piscicida* の L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO)から ancestral LAAO (AncLAAO)を開発し,  $\text{NH}_3\text{BH}_3$  による還元反応を組み合わせて用いることで, アミノ酸ラセミ体混合物から D-体のみを効率的に合成する方法を開発した (Fig. 4d) [57]. Parmeggiani らは, シアノバクテリア *Anabena variabilis* のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (AvPAL) を用いてケイヒ酸から D,L-フェニルアラニン誘導体を合成し, ついで細菌 *Proteus mirabilis* の L-アミノ酸デイミナーゼ (PmLAAD)による酸化反応と  $\text{NH}_3\text{BH}_3$  による還元反応を組み合わせることで D-体のフェニルアラニン誘導体のみを合成する方法を開発した (Fig. 4e) [58].





**Fig. 4. 酵素を用いた D-アミノ酸生産**

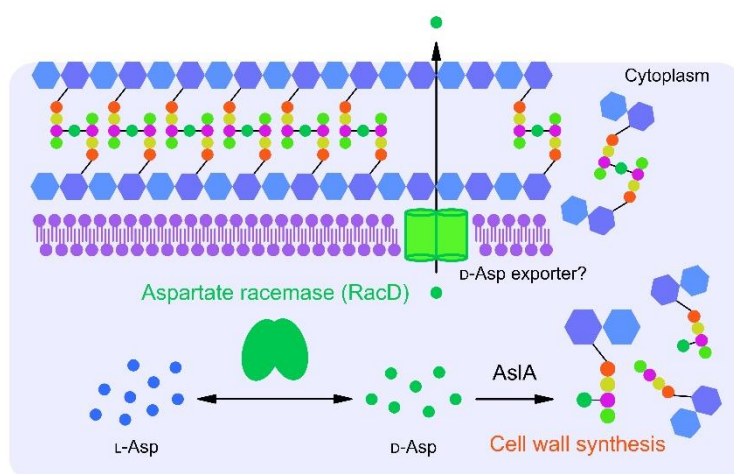
様々な酵素を用いた D-アミノ酸の生産方法. 緑色は目的物である D-アミノ酸を表す. 図は引用文献[44]を基に作成し, 一部変更を加えた. 略語: GluR, グルタミン酸ラセマーゼ; DAAT, D-アミノサントランスフェラーゼ; DAD, D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ; AncLAO, ancestral L-アミノ酸オキシダーゼバリエント; AvPAL, *A. variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ; PmLAAD, *P. mirabilis* L-アミノ酸デイミナーゼ.

## 8. 乳酸菌

分類学的に乳酸菌は Firmicutes 門, Bacilli 綱, Lactobacillales 目に属し, Lactobacillales 目は Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae と Streptococcaceae の 6 科に分けられる[59]. 属は 40 属あると報告されているが, 2019 年に *Lactobacillus* 属の分類が見直され, 以前の *Lactobacillus* 属を含む 25 の属に再分類された[59, 60]. なお, ビフィズス菌である *Bifidobacterium* は Actinobacteria 門であるが, 乳酸菌の一員と考えられている[61]. 乳酸菌の一般的な特徴として, グラム陽性菌であり, 芽胞を形成せず, カタラーゼ陰性, シトクロムを有さず, 嫌気的な環境に生息し, 栄養要求性が高く, 糖の主要な代謝産物として乳酸を生産する細菌の総称と定義されている[62]. 乳酸菌は古くから発酵食品の製造に利用されており, 食品の風味や保存性に寄与することが知られている[63]. 乳酸菌は幅広い環境に見出されているが, 野菜や果物, ヒトを含む動物, 土壌や肉製品, チーズや漬物などの発酵食品から主に単離されている[64-72]. また, 乳酸菌はプロバイオティクスとして知られている. プロバイオティクスは,「適正量を摂取したときに, 宿主に健康効果をもたらす生きた微生物」として 2002 年に国際連合食糧農業機関 (FAO) および世界保健機構 (WHO) によって定義された. 乳酸菌は病原性細菌の除去, 免疫機能の改善, 血中コレステロールレベルの維持, 乳糖不耐症の改善, 腸内細菌叢の調節や腸の恒常性の維持などの生理効果を有することが報告されている[73-78].

## 9. 乳酸菌における D-Asp 生産

*Enterococcus* 属, *Lactococcus* 属や *Lactobacillus* 属に分類されていた一部の乳酸菌では, テトラペプチド鎖の D-Glu や D-Ala に加え, ペプチド架橋部分に D-Asp または D-Asp がアミド化された D-Asn が使用されている[4]. 乳酸菌細胞質内において, D-Asp はアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR または RacD, EC 5.1.1.13) によって L-Asp から生産され, アスパラギン酸リガーゼ (AslA, EC 6.3.1.12) によって, ペンタペプチドの 3 番目の L-Lys と結合する (Fig. 5) [4]. また, いくつかの乳酸菌培養液上清中に遊離 D-Asp が見出されており, 高濃度のもので, *Levilactobacillus brevis* JCM 1170 株では 317  $\mu$ M, *Latilactobacillus sakei* DSM 20017 株では 270  $\mu$ M の D-Asp が見出されている (Table 3) [42, 79]. したがって, 高濃度の D-Asp を生産する乳酸菌は D-Asp の発酵的生産に有用であると考えられる. しかしながら, どのような乳酸菌がどの程度の D-Asp を生産するのか, また D-Asp の細胞外への排出機構は不明である.



**Fig. 5. 乳酸菌における D-Asp の生合成および細胞壁への取り込み**

乳酸菌における D-Asp 生合成と細胞壁への取り込み. 乳酸菌細胞質において, アスパラギン酸ラセマーゼ RacD により L-Asp から D-Asp が生合成され, D-Asp はアスパラギン酸リガーゼ AslA によって, 細胞壁ペプチドグリカンのペンタペプチドの 3 番目の L-Lys と結合する.

**Table 3. 乳酸菌による D-Asp 分泌生産**

Strain	D-Asp production	References
	( $\mu$ M)	
<i>Latilactobacillus sakei</i> DSM 20017	270	[81]
<i>Lctobacillus gasser</i> DSM 20243	225	[44]
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016	150	[44]
<i>Lentilactobacillus kisonensis</i> DSM 19906	120	[44]
<i>Lentilactobacillus otakinensis</i> DSM 19908	129	[44]
<i>Lentilactobacillus rapi</i> DSM 19907	110	[44]
<i>Levilactobacillus brevis</i> JCM 1170	317	[44]
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> DSM 20555	118	[44]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20481	75	[44]

乳酸菌培養はすべて MRS 培地で行われ、[81]は最大一定濃度、[44]は定常期初期の培地上清の濃度を示す。

## 10. *Latilactobacillus* 属

*Latilactobacillus* 属は 2019 年に *Lactobacillus* 属から分離した属であり、*Latilactobacillus sakei*, *L. sakei* subsp. *carnosus*, *L. graminis*, *L. curvatus* および *L. fuchiensis* の 5 種から構成される[60]. *Latilactobacillus* 属はホモ乳酸発酵を行い、ゲノムは 1.82 – 2.12 Mbp のサイズであり、GC%は 40 – 42%である。乳酸は、*L. fuchiensis* を除いて、D-乳酸と L-乳酸の両方を生産できる。これらの乳酸菌は中温性であるが、多くの株で耐冷性があり、8℃以下でも生育できる。なかでも、*L. curvatus* と *L. sakei* は肉製品のスターターとして商業的に重要である[60].

### 10.1. *Latilactobacillus curvatus*

*L. curvatus* は、家禽製品や発酵肉製品と関連する主要な乳酸菌の一つであり、主に肉製品から多数単離されている[63, 80]. また、*L. curvatus* はチーズ、キムチ、白菜の塩漬け、サワードウやはちみつからも単離されているとともに、環境中にも広く見出されている[81-85]. さらに、ヒトの顔や鶏の盲腸といった生体からも単離されている[86, 87]. 基準株は *L. curvatus* DSM 20019 株であり、牛乳から単離された。

*L. curvatus* は、その優れたバクテリオシン産生能により、腐敗菌の増殖を抑制することができるため、発酵肉製品の抗菌剤として用いられている[88]. また、バクテリオシンに加え、*L. curvatus* によって生産される有機酸は発酵肉製品の pH を低下させるため、製品中に菌の発芽を抑えるために添加されている亜硝酸塩の含有量を低減させることができる。さらに、*L. curvatus* による脂

脂肪酸加水分解は製品に好ましい風味を付与することができるため、発酵肉製品に有用とされている[88].

*L. curvatus* の食品産業への応用に加え、近年の研究により、*L. curvatus* はヒトの健康に有益であることが最近の研究で明らかになっている[88]. 例えば、大腸炎低減効果、肥満や高脂血症の緩和作用、筋萎縮の抑制効果などである。したがって、*L. curvatus* はプロバイオティクスの候補として有用と考えられている。

## 11. アミノ酸ラセマーゼ

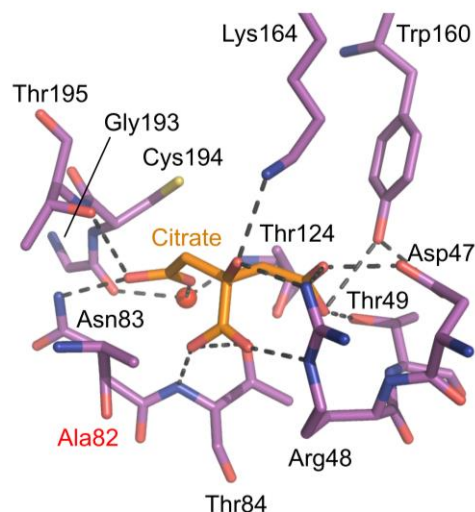
アミノ酸のラセミ化を行う酵素は標的となるキラル炭素の数によって2つに分けられ、1つのキラル炭素を標的にするものはラセマーゼ、2つ以上のキラル炭素を標的とするものはエピメラーゼと区別される。アミノ酸ラセマーゼによるアミノ酸のラセミ化はキラル炭素に結合している水素原子( $\alpha$ -水素)の引き抜きによって進行する[89]。 $\alpha$ -水素の引き抜き機構の違いにより、“one-base 機構”と“two-base 機構”の2つに大別される。前者は補酵素ピリドキサール-5'-リン酸 (PLP) が基質とシッフ塩基を形成することで $\alpha$ -水素を不安定化し、酵素側の塩基が $\alpha$ -水素を引き抜くことでラセミ化反応が進行する。後者では2つのアミノ酸残基が反応に関与し、一つは塩基として、他方は酸として作用することで基質のラセミ化反応が行われる。細菌では、PLP 依存型のアミノ酸ラセマーゼとしてアラニンラセマーゼ (Alr, EC 5.1.1.1)、リシンラセマーゼ (Lyr, EC 5.1.1.5)、セリンラセマーゼ (SR, EC 5.1.1.18) と広基質特性ラセマーゼ (BsrV, E.C. 5.1.1.10) が、PLP 非依存型ではアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR または RacD, EC 5.1.1.13)、グルタミン酸ラセマーゼ (MurI, EC 5.1.1.3) とプロリンラセマーゼ (ProR, EC 5.1.1.4) が報告されている[90].

### 11.1. アスパラギン酸ラセマーゼ

アスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) は L-Asp と D-Asp の相互変換を担う酵素である。細菌性の AspR は PLP 非依存型であるが、海洋性軟体動物には PLP 依存型の AspR が見出されている[65]. PLP 非依存型の AspR の結晶構造は、好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の AspR (PhAspR) で明らかにされている[91,92]. PhAspR の活性部位には、触媒残基である2つの Cys 残基 (Cys82 と Cys185) が向かい合って位置しており、また他の AspR でも保存されている、基質主鎖の認識に関わる Arg 残基 (Arg48) と反応中間体の安定化と休止状態の構造安定化に不可欠な Lys 残基 (Lys164) が明らかにされている (Fig. 6) [92].

グラム陰性細菌 *Vibrio fischeri* などの Proteobacteria において、AspR 遺伝子 (*racD*) の転写は、LysR-type transcriptional regulator (LTTR) である DarR により、D-Asp の存在で活性化される[93]. また、海洋性細菌 *Pseudoaltermonas elyakovii* SM1926 株では、D-Asp を含む培地で培養することにより、*racD* の転写量が 104 倍に上昇することが報告されている[16]. 一方、グラム陽性細菌の乳

酸菌において *racD* 遺伝子の転写に影響を与える因子は不明である。



**Fig. 6. PhAspR の基質類似体結合時の活性部位構造**

触媒残基である Cys82 を Ala に置換した PhAspR の基質類似体（クエン酸）結合時の結晶構造（2DX7）。参考文献 [92] の Fig. 3c を基に、PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org>) を使用して作成。赤色の球は水分子を表す。点線は水素結合を表す。スティックの配色：青、窒素原子；赤、酸素原子；黄色、硫黄原子。

## 12. D-アミノ酸分析技術

D-アミノ酸の分析方法には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、キャピラリー電気泳動や酵素を用いた方法がある[94-98]。なかでも、HPLC による分析は信頼性や感度が高く、最も数多く使用されている[99]。しかし、HPLC による測定では、D-アミノ酸の検出や D-体と L-体分離のために蛍光誘導体化する必要がある。また 1 度の分析において 1 つのサンプルしか測定できない欠点がある。また、アミノ酸にもよるが、D-Asp の分析の溶出には 10-30 分程度の比較的長い時間を要する[100-104]。したがって、多数の試料を分析する場合には HPLC を用いた D-アミノ酸測定は非常に煩雑であるといえる。一方、酵素を用いた D-アミノ酸分析方法には、呈色反応、蛍光やバイオセンサーによる方法などがある[97, 98, 105]。酵素法は、HPLC 法に比べ感度が低く、酵素の基質特異性が問題となる場合があるが、測定に特別な前処理を必要としないことや 96-well プレートなどを使用することにより、一度に多数のサンプルを分析できることから、D-アミノ酸生産菌のスクリーニングに有用と考えられる。

### 13. D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO)

D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO または DASPO, EC 1.4.3.1) は、酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素とするフラビン酵素である。一方、中性及び塩基性 D-アミノ酸は進化的に関係のある D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO または DAAO, EC 1.4.3.3) により脱アミノされる。DAO と DDO による反応による、基質 D-アミノ酸と等量の  $\alpha$ -ケト酸、アンモニアと過酸化水素が生成する (Fig. 7)。

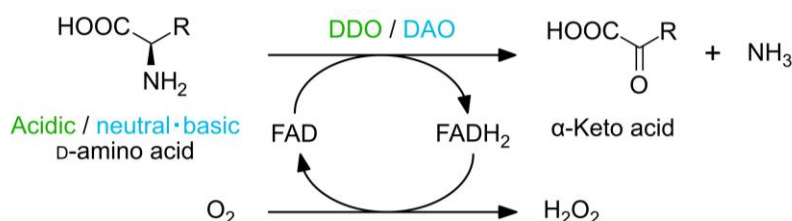


Fig. 7. DDO と DAO による D-アミノ酸酸化反応

DDO と DAO は D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒し、それぞれ酸性と塩基性および中性の D-アミノ酸を基質とする。D-アミノ酸が DDO または DAO により触媒されることによって、等量の  $\alpha$ -ケト酸、アンモニアと過酸化水素が生じる。

DDO は 1949 年に初めてウサギの腎臓と肝臓で見出された[106]。その後、タコ、エビ、ニジマス、ニワトリ、ハト、ラット、ウシ、ヒツジ、線虫や真菌など、細菌を除く幅広い生物種に見出されている[107-115]。酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株の DDO 遺伝子欠損株は、野生型と異なり、D-Asp を単一栄養源とする培地で生育できなかったことから、真菌において DDO が D-Asp の資化利用を担っていることが示された[116]。また、UJ1 株の DDO 遺伝子破壊株は、D-Asp による生育阻害に対して野生型よりも高い感受性を示したことから、真菌において DDO が D-Asp 毒性の解毒を担っていることも示唆された[116]。DDO は酸性 D-アミノ酸を基質とするため、D-Asp だけでなく D-Glu や NMDA に対しても活性を示す。しかし、各酸性 D-アミノ酸に対する活性は DDO によって異なる (Table 3) [99]。これまでに見いだされた DDO のなかで、当研究室で見出された酵母 *C. humicola* UJ1 株の DDO (ChDDO) は D-Asp に対してのみ高い活性を示し、D-Glu や NMDA にはほとんど活性を示さない (Table 3) [117]。したがって、ChDDO は、D-Asp 特異的な検出・定量に有用と考えられている。

**Table.3. DDO の動力学的定数**

Enzyme source	$K_m$ (mM)			$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )			$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> /M <sup>-1</sup> )			Reference
	D-Asp	D-Glu	NMDA	D-Asp	D-Glu	NMDA	D-Asp	D-Glu	NMDA	
<i>Cryptococcus humicola</i> UJ1	29.2	62.6	85.3	82.6	2.0	38.1	28,300	25.0	447	[118]
<i>Candida boidinii</i> 2201	12.9	20.1	182	19.2	60.0	21.0	1,490	2,980	115	[119]
<i>Thermomyces dupontii</i> NRRL 2115	8.77	2.16	103	123	217	155	14,000	100,100	1,500	[115]
<i>Fusarium sacchari</i> var. <i>elongatum</i> Y-105 <sup>a</sup>	1.6	1.3	-	-	-	-	-	-	-	[120]
Pig kidney	2.52	66.9	0.853	37.5	9.36	45.1	14,900	140	52,900	[121]
Human <sup>b</sup>	2.14	40	5.0	70.6	5.54	47.8	33,033	139	9,778	[122]
Bovine kidney	3.7	5.6	1.5	22.5	1.19	30.9	6,090	213	20,600	[123]
Mouse	7.37	-	-	9.83	-	-	1,354	-	-	[124]
Rat	2.26	-	-	31.1	-	-	14,104	-	-	[124]
<i>O. vulgaris</i>	4.3	9.7	47.7	6.8	11.0	2.4	1,581	1,134	50	[125]
<i>Caenorhabditis elegans</i> DDO-1	5.54	1.06	14.6	26.1	35.4	84.5	4,712	33,437	5,787	[122]
DDO-2	4.2	0.8	9.23	9.49	3.01	6.04	2,258	3,759	654	[122]
DDO-3	3.81	0.68	8.87	2.51	0.76	1.52	658	1,117	172	[122]

表は[99]を基に作成した.

<sup>a</sup> 部分精製標品

<sup>b</sup> DDO-1[126]



#### 14. 酵素を用いた酸性 D-アミノ酸の検出・定量

酵素を用いた D-アミノ酸の検出・定量では、酸性 D-アミノ酸の酵素反応生成物を発色物質や蛍光物質に変換することで分光学的に測定する方法が用いられている。DDO と酸性 D-アミノ酸の反応では、生成物として  $\alpha$ -ケト酸、アンモニアと過酸化水素が生じる (Fig. 7)。 $\alpha$ -ケト酸を利用した検出・定量系では、生成した  $\alpha$ -ケト酸を発色基質である 2,4-dinitrophenylhydrazine と反応させることで発色物質 2,4-dinitrophenylhydrazine に変換して定量する (Fig. 8a) [107]。また、DDO と D-Asp や D-Glu との反応により生成するオキサロ酢酸やコハク酸を NADH 依存的なリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) やグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) と反応させることで、NADH の吸光度減少量から測定する方法もある (Fig. 8b) [127]。また、D,L-Asp を含む試料中の L-Asp を L-アスパラギン酸オキシダーゼ (L-AO) によって分解して残存する D-Asp を AspR によって L-Asp へ変換し、NAD<sup>+</sup> 依存的なアスパラギン酸デヒドロゲナーゼ (AspDH) と反応させることで生成する NADH の吸光度から測定する方法がある (Fig. 8c) [128]。さらに、D-Asp の DDO 反応により生じるオキサロ酢酸をオキサロ酢酸デヒドロゲナーゼ (OAD) でピルビン酸に変換したのち、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (MDB) と反応させて生じる蛍光物質 (MDB-Py) の発光量をもとに定量する方法がある (Fig. 8d) [97]。酸性 D-アミノ酸と DDO の反応で生じる  $\alpha$ -ケト酸の他に、生成する過酸化水素を測定することで定量することも可能である。過酸化水素を測定する場合、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) により過酸化水素と発色基質を反応させ発色物質へと変換することで酸性 D-アミノ酸を間接的に定量できる。HRP の基質となる発色基質には、*o*-dianisidine、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (TMB) や *o*-phenylenediamine (OPD) などがある [129-131]。また、発色基質として 4-aminoantipyrine (4AAP) と phenol の 2 種類の試薬を使用し、HRP による酸化還元縮合反応によって発色物質へと変化させる方法もある [129]。酸化還元縮合反応による呈色では、4AAP と phenol の組み合わせよりも、4AAP と *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline (TOOS) などのアニリン系の化合物との組み合わせが感度がより高いと報告されており、新トリンダー試薬と呼ばれている [132]。

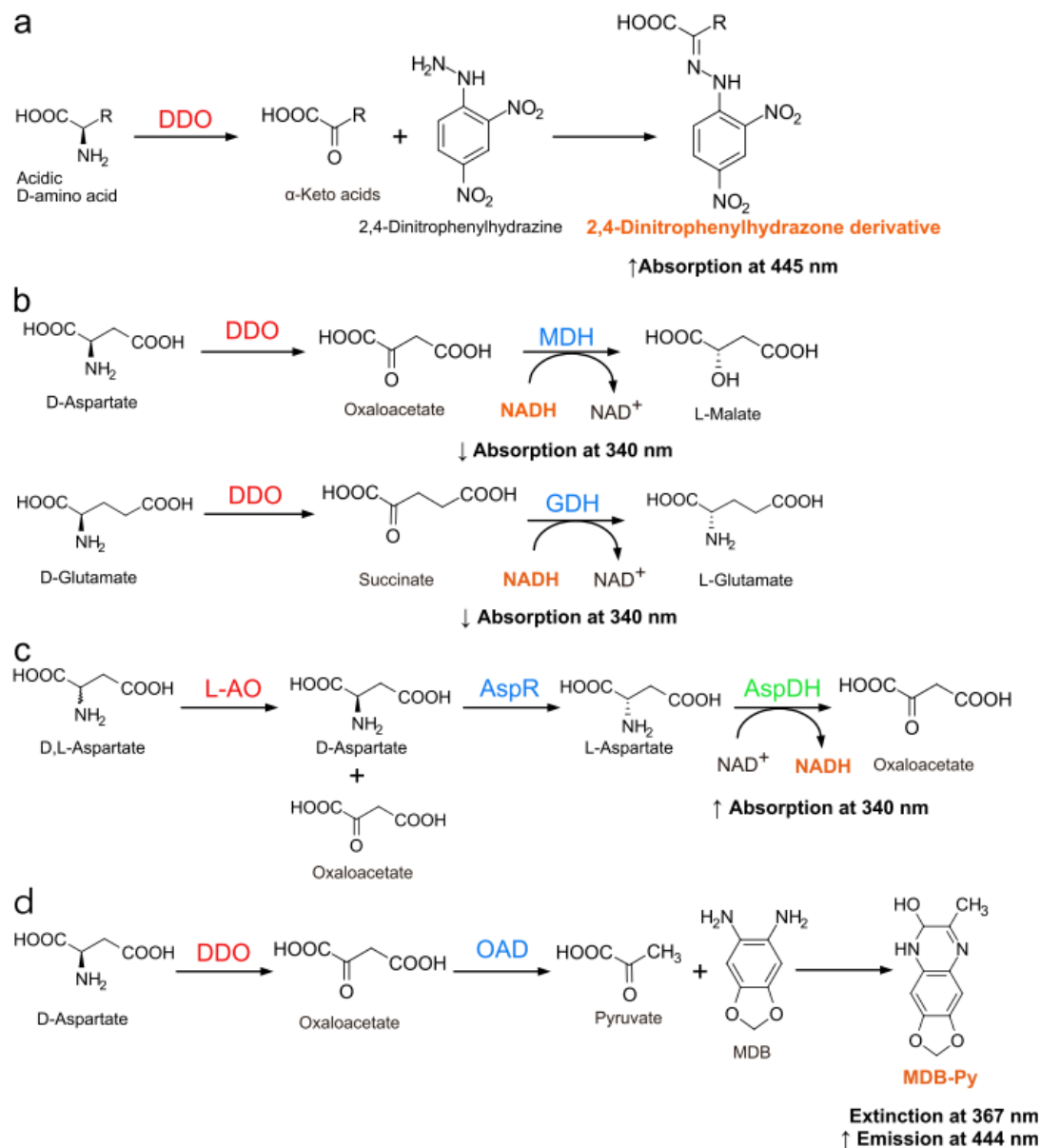


Fig. 8. 酸性 D-アミノ酸の酵素定量法

様々な酵素を用いた酸性 D-アミノ酸の検出・定量方法を示す。図は[99]より引用した。略語：DDO, D-アスパラギン酸オキシダーゼ；MDH, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ；GDH, グルタミン酸デヒドロゲナーゼ；L-AO, L-アスパラギン酸オキシダーゼ；AspR, アスパラギン酸ラセマーゼ；AspDH, アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ；OAD, オキサロ酢酸デヒドロゲナーゼ；MDB, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzen；MDB-Py, MDB-pyruvate conjugate。

## 15. 乳酸菌における L-Asp 代謝酵素

乳酸菌においては、D-Asp は RacD による L-Asp のラセミ化反応によって生産されるため、L-Asp の供給と消費のバランスが D-Asp の生産に大きく影響すると考えられる。L-Asp は乳酸菌の細胞質において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC, EC 2.6.1.1) によってオキサロ酢酸 (OAA) と L-Glu から、アスパルターゼ (AspA, EC 4.3.1.1) によってフマル酸から、もしくはアスパラギナーゼ (AsnA, EC 3.5.1.1) によって L-Asn から生産される (Fig. 9) [133, 134]。生産された L-Asp は RacD によって D-Asp へ変換されて細胞壁に取り込まれるほか、アスパラギン酸-4-または-1-デカルボキシラーゼ (AspD と PanD) によってそれぞれ、L-Ala と  $\beta$ -Ala に、AspC と AspA の逆反応により、それぞれ OAA とフマル酸に変換される (Fig. 9) [133, 134]。また、*Lactococcus lactis* においては、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ (PyrB, EC 2.1.3.2) により L-Asp が N-カルバモイル-L-アスパラギン酸に変換されピリミジン合成に利用される。PyrB 機能欠損株では細胞壁が厚くなることから、PyrB と細胞壁生合成の関係性も指摘されている (Fig. 9) [135]。乳酸菌種によっては他の L-Asp 代謝酵素の存在も確認されている。*Lactopantibacillus plantarum* ではアスパラギン酸キナーゼ (TyrA2, EC 2.7.2.4) によって L-Asp がアスパルチルリン酸に代謝され、L-Lys の生産に使用されることが報告されている [136]。また、*Lactocaseibacillus casei* では、酸ストレス条件下で L-Asp がアルギニノコハク酸シンターゼ (ArgG) とアルギニノコハク酸リアーゼ (ArgH) によって L-Arg に変換され、L-Arg がアルギニンデイミナーゼ (ADI) 経路によって代謝されることで、酸ストレス耐性に関与すると考えられている [137]。

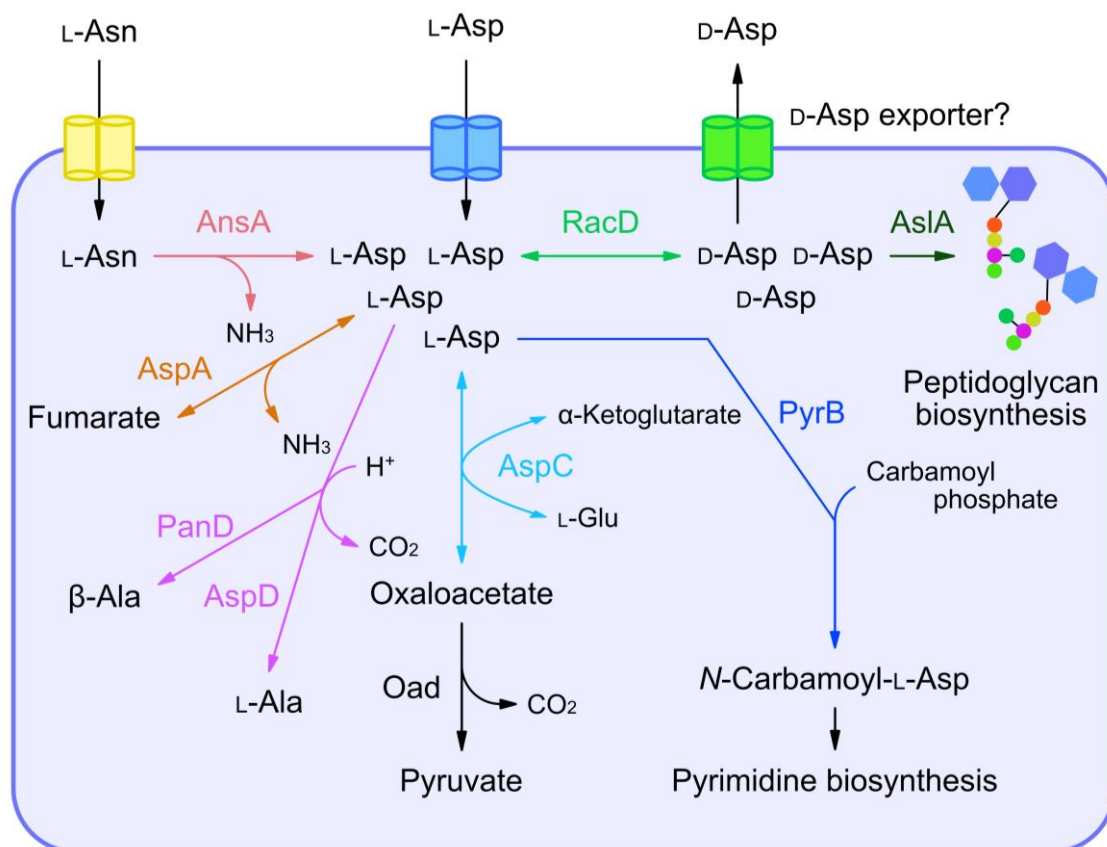


Fig. 9. 乳酸菌における L-Asp の代謝

細胞内に取り込まれた L-Asn はアスパラギナーゼ (AnsA) によって L-Asp へ代謝される。L-Asp はアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) によって変換される、もしくは、アスパルターゼ (AspA) によってフマル酸とアンモニアに、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC) によってオキサロ酢酸と L-Glu に、アスパラギン酸-1-または-4-デカルボキシラーゼ (それぞれ PanD と AspD) によって、それぞれ  $\beta$ -Ala と L-Ala に、または、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ (PyrB) によって N-カルバモイル-L-アスパラギン酸に代謝され、ピリミジン合成に使用される。AspC により L-Asp から変換されたオキサロ酢酸はさらに、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (Oad) によってピルビン酸に代謝される。図は[133-135]を基に作成。

## 16. 研究目的

D-Aspはヒトを含む哺乳動物において、神経伝達物質として機能することや、ホルモンの生産と分泌の調整に関与することが明らかとなってきた。また、精子運動性能を向上させることや、コラーゲン繊維束の形成を促進することが明らかとなってきた。さらに、合成ペニシリン剤である Aspoxicillinの原料としても使用されている。そのため、広範な医薬品や食品などへの応用が期待されており、その生産技術の開発が重要となっている。ある種の乳酸菌は細胞質でアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) によりL-AspからD-Aspを生産し、D-Aspを細胞壁構成成分として使用している。実際に、乳酸菌 *Levilactobacillus brevis* JCM1170株の培養液上清中に約317  $\mu$ MのD-Aspが確認されている。したがって、多量のD-Aspを生産する乳酸菌は、D-Aspの工業的発酵生産に有用であると考えられる。しかしながら、現在までにどのような乳酸菌がどの程度のD-Aspを生産するかは明らかにされていない。

D-Aspを含むD-アミノ酸の測定はHPLCを用いて行われるが、測定のために蛍光誘導体化などの前処理が必須であること、1回に1試料しか測定できないことから、多数の乳酸菌培養液のD-Aspを測定することが困難である。一方、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) を使用した酵素学的な測定法では、前処理を必要とせず、1度の測定で多数の試料を測定できるため、多数の乳酸菌培養液のD-Asp定量に有用と考えられる。DDOは酸性D-アミノ酸を基質とするためD-Gluにも作用してしまうが、当研究室では、D-Aspに対してのみ高い特異性を有する、酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1由来のDDO (ChDDO) の単離に成功しており、ChDDOを使用することによってD-Asp特異的な測定法の開発が可能であると考えられる。そこで本研究では、ChDDOを用いたD-Asp高生産乳酸菌の酵素学的スクリーニング法を開発を行い、スクリーニングによって得られたD-Asp高生産乳酸菌の高いD-Asp生産能にかかわる因子の解明を目的とした。

## 第一章 酵素を用いた D-Asp 高生産乳酸菌スクリーニング法の開発

## 1. 緒言

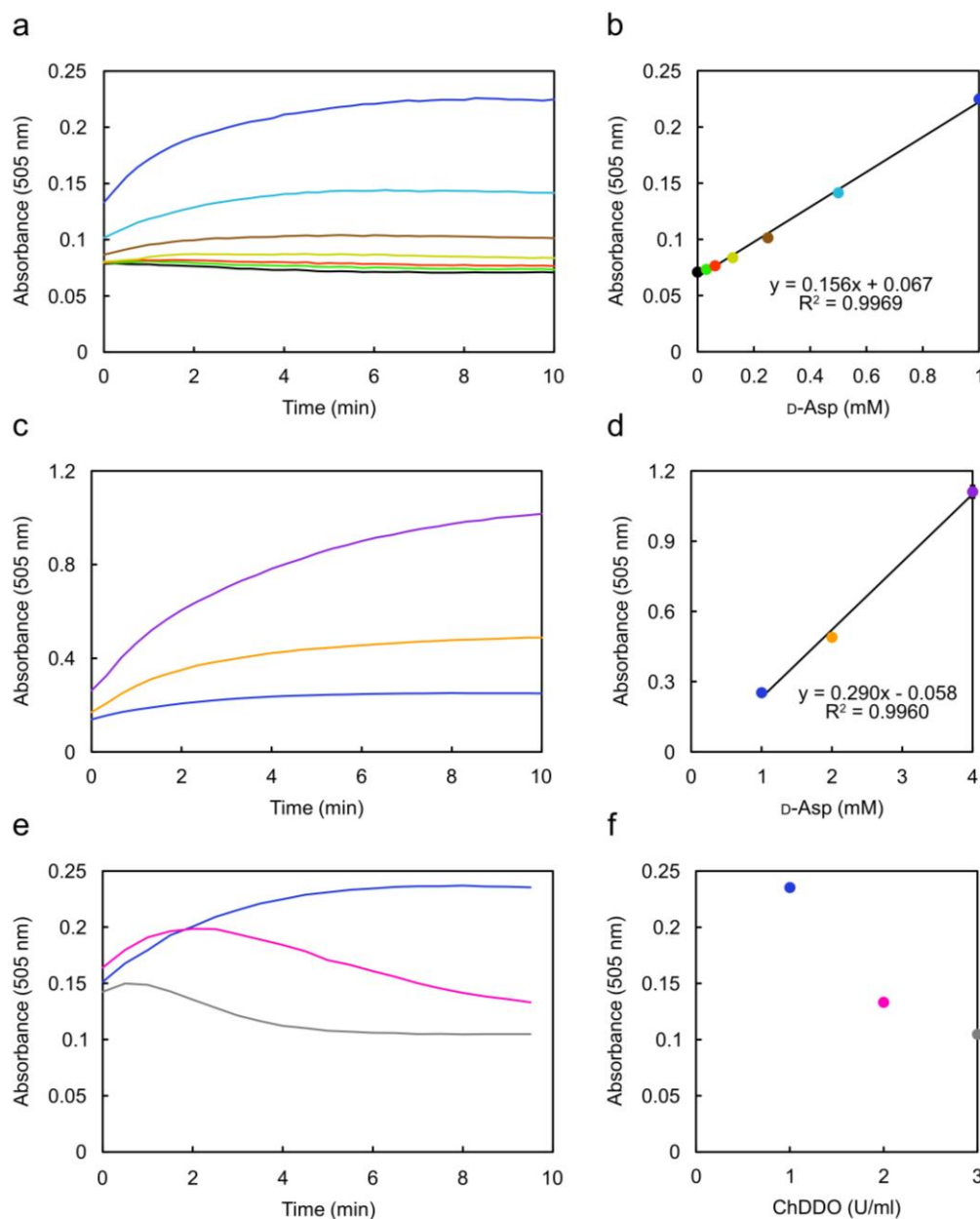
近年、D-Asp は細菌から動物に至る幅広い生物種において見出されており、その役割が明らかになりつつある[10]。また、D-Asp の生理効果を利用した食品も開発されており、生体における D-Asp の重要性が認知されつつある。*Lactobacillus* 属に分類されていた乳酸菌や *Enterococcus* 属に属する乳酸菌は細胞壁構成成分として D-Asp を使用している。実際に、*Levilactobacillus brevis* JCM 1170 株の培養液には 317  $\mu$ M の濃度の D-Asp が見出されている[42]。このことから、D-Asp を多量に生産する乳酸菌が取得できれば、D-Asp の工業的な発酵生産に有用と考えられる。また、乳酸菌の D-Asp 生産能が属レベルまたは種レベルに特有な特性かどうか明らかになると期待される。

D-Asp を多量に生産する乳酸菌を取得するには、多数の乳酸菌培養液に含まれる D-Asp を定量する必要がある。現在、D-Asp を含む D-アミノ酸は主に HPLC を用いて測定されている。しかし、HPLC による D-Asp の測定は蛍光誘導体化などの前処理が必須であり、1 度の測定で 1 試料しか測定できないため、多数の乳酸菌培養液の D-Asp を測定することは困難である。一方、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) を用いた酵素学的な D-Asp の測定法は、HPLC を用いた方法に感度の点で劣るが、前処理を必要とせず、1 度の測定で多数の試料を測定できるため、多数の乳酸菌培養液の D-Asp 定量に有用と考えられる。しかし、現在までに見いだされているほとんどの DDO は D-Asp だけでなく、D-Glu にも作用する点が問題として挙げられる[99]。D-Glu は細菌細胞壁の構成成分であるため、DDO を用いて乳酸菌培養液中の D-Asp を測定すると D-Glu が干渉すると考えられる[3]。これまでに当研究室では、土壌から DDO を多量に生産する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 を単離し、本酵母から D-Asp に対し高い活性かつ高い特異性を示す DDO (ChDDO) の取得に成功している[117]。したがって、ChDDO を用いることによって、D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニング系を開発できると考えた。第一章では、ChDDO を用いた乳酸菌培養液中の D-Asp 検出・定量法を開発し、新潟県内の食品試料から単離した乳酸菌から既知の D-Asp 高分泌生産乳酸菌よりも多量の D-Asp を生産する乳酸菌の単離を試みた。また、乳酸菌の D-Asp 分泌生産能が属や種レベルで固有な性質か解析した。

## 2. 結果

### 2.1. 大腸菌粗抽出液 ChDDO を用いた D-Asp 検出

D-Asp 検出に用いる ChDDO の精製には時間と手間を要することから、初めに、*ChDDO* 遺伝子を発現させた大腸菌粗抽出液を用いて D-Asp が検出できるか検討した。現在、最も高い D-Asp 生産能を有することが報告されている乳酸菌は *Lv. brevis* JCM 1170 株であり、当乳酸菌の培養液上清には 317  $\mu\text{M}$  の D-Asp が検出されている[42]。そこで、JCM 1170 株よりも高い D-Asp 分泌生産能を有する乳酸菌を取得することを目的とし、0–1 mM の濃度の D-Asp の検出を試みた。発色基質としてフェノールと 4-アミノアンチピリン (phenol/4AAP) を用い、蒸留水に溶解した 0–1 mM D-Asp を反応液 1 U/ml の抽出液 ChDDO を用いて反応させたところ、反応に伴う発色は測定開始時から時間の経過とともに上昇し、10 分間の反応の間に試験した全ての D-Asp 濃度において平衡に達した (Fig. 1-1a)。測定終了時の吸光度と D-Asp 濃度は高い相関関係を示したことから (Fig. 1-1b)、発色基質 phenol/4AAP と 1 U/ml 粗抽出液 ChDDO を用いて、D-Asp を濃度依存的に検出できることが分かった。さらに、より高濃度の 1–4 mM 濃度の D-Asp を同様に測定したところ、4 mM において吸光度が平衡に達しなかった (Fig. 1-1c, d)。したがって、4 mM 程度の濃度の D-Asp の検出においては、10 分間程度の反応時間は短いこと、反応系に添加する ChDDO の量が少ないことが分かった。そこで、反応系に添加する粗抽出液量（それに伴う ChDDO 活性値の量）を増加させて 1 mM D-Asp を測定したところ、添加する粗抽出液量が多くなるにつれて、吸光度の低下が観察された (Fig. 1-1e, f)、このことから、粗抽出液中の夾雑物が反応系に影響を与えることが分かった。



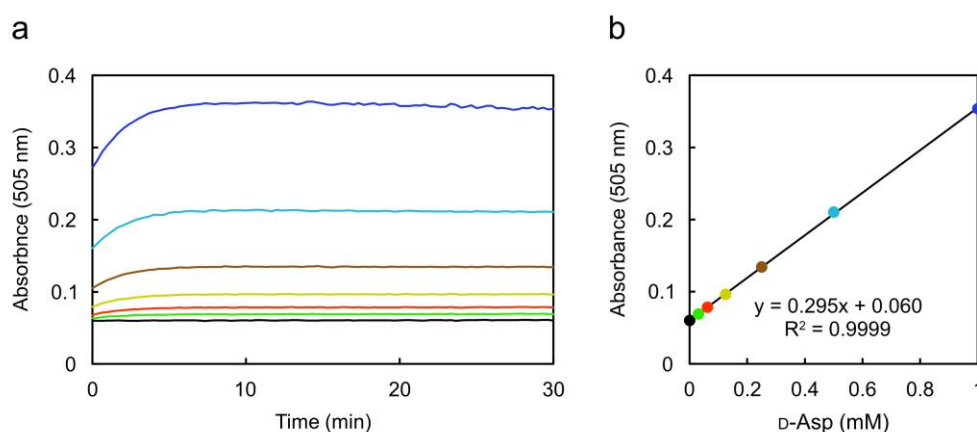
**Fig. 1-1. ChDDO 発現大腸菌粗抽出液を用いた D-Asp 検出**

蒸留水に溶解した 0–1 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (a) と測定開始から 10 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (b)。蒸留水に溶解した 1–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (c) と測定開始から 10 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (d)。1–3 U/ml 大腸菌粗抽出液 ChDDO の 1 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (e) と測定終了時の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (f)。(a)–(d) 反応系 1 U/ml の大腸菌粗抽出液を用いて測定。(b), (d), (f) 各プロットは試験終了時における吸光度を 3 回測定した値の平均値。全て発色基質 phenol/4AAP を用いて 37°C で測定。紫：4 mM, オレンジ：2 mM, 青：1 mM, 水色：0.5 mM, 茶：0.25 mM, 黄：0.125 mM, 赤：0.062 mM, 緑：0.031 mM, 黒：0 mM。桃：1 mM D-Asp / 2 U/ml ChDDO, 灰：1 mM D-Asp / 3 U/ml ChDDO。



## 2.2. 精製 ChDDO を用いた D-Asp 検出

ChDDO を発現させた大腸菌粗抽出液を用いて D-Asp を検出すると大腸菌粗抽出液による測定への影響が明らかとなったため、次に精製した ChDDO を用いて、同様に蒸留水に溶解した D-Asp の検出を試みた。粗抽出液の場合と同様に、0 – 1 mM D-Asp を反応系 1 U/ml の精製 ChDDO を用いて反応させたところ、吸光度は時間とともに上昇し、反応開始 20 分以降に全ての濃度において平衡に達した (Fig. 1-2a)。反応開始 30 分後の吸光度は粗抽出液を用いた場合よりも約 1.5 倍高く、D-Asp 濃度と吸光度はより高い相関関係を示した (Fig. 1-2b)。大腸菌粗抽出液に含まれる夾雑物の測定系への影響がなくなり、感度が上昇したと考えられた。これらのことから、以降の実験では精製 ChDDO を測定に用いることにした。

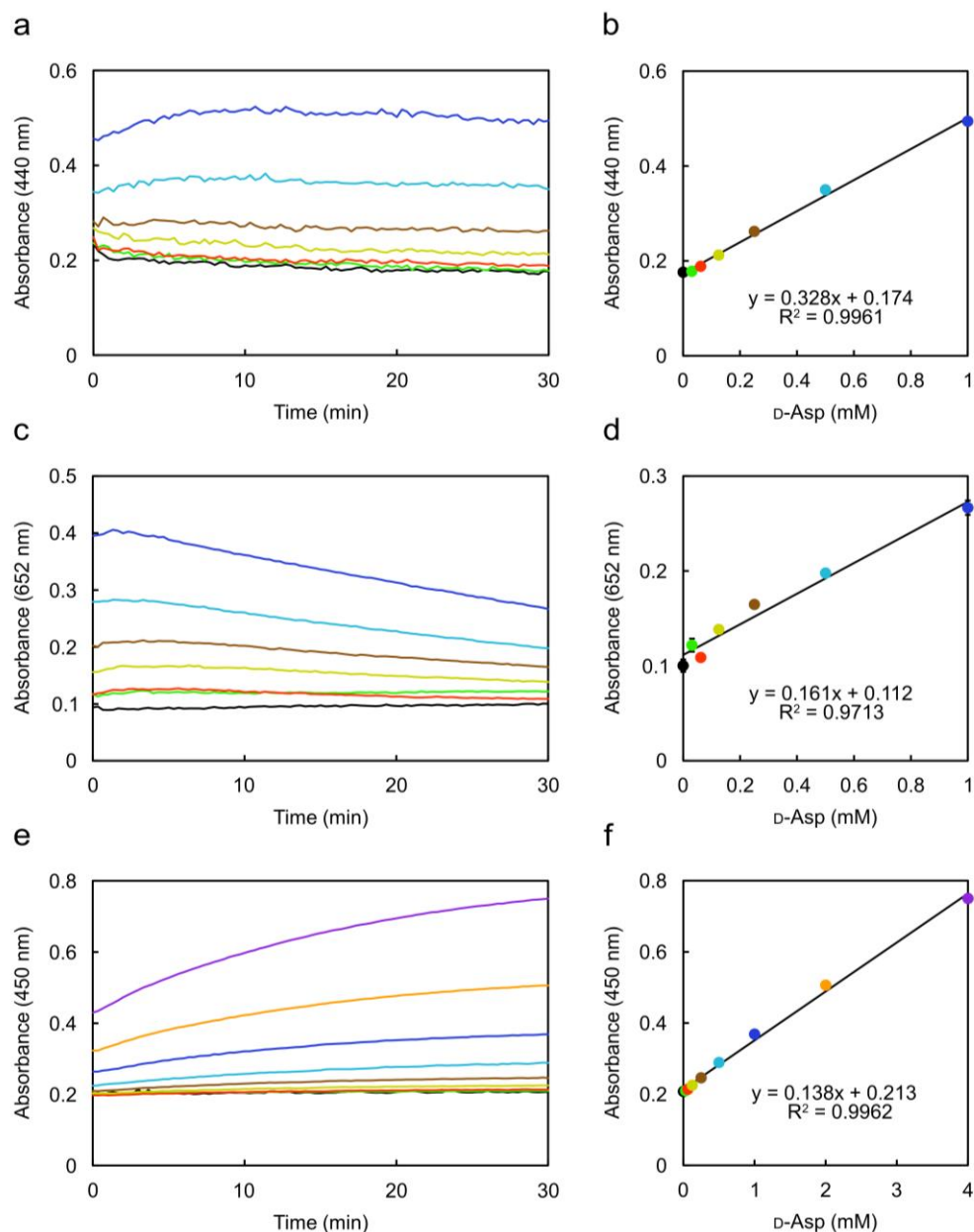


**Fig. 1-2. 精製 ChDDO を用いた D-Asp 検出**

蒸留水に溶解した 0 – 1 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (a) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (b)。反応系 1 U/ml の精製 ChDDO と発色基質 phenol/4AAP を用いて 37°C で測定。 (b) 各プロットは試験終了時における吸光度を 3 回測定した値の平均値。青：1 mM, 水色：0.5 mM, 茶：0.25 mM, 黄：0.125 mM, 赤：0.062 mM, 緑：0.031 mM, 黒：0 mM。

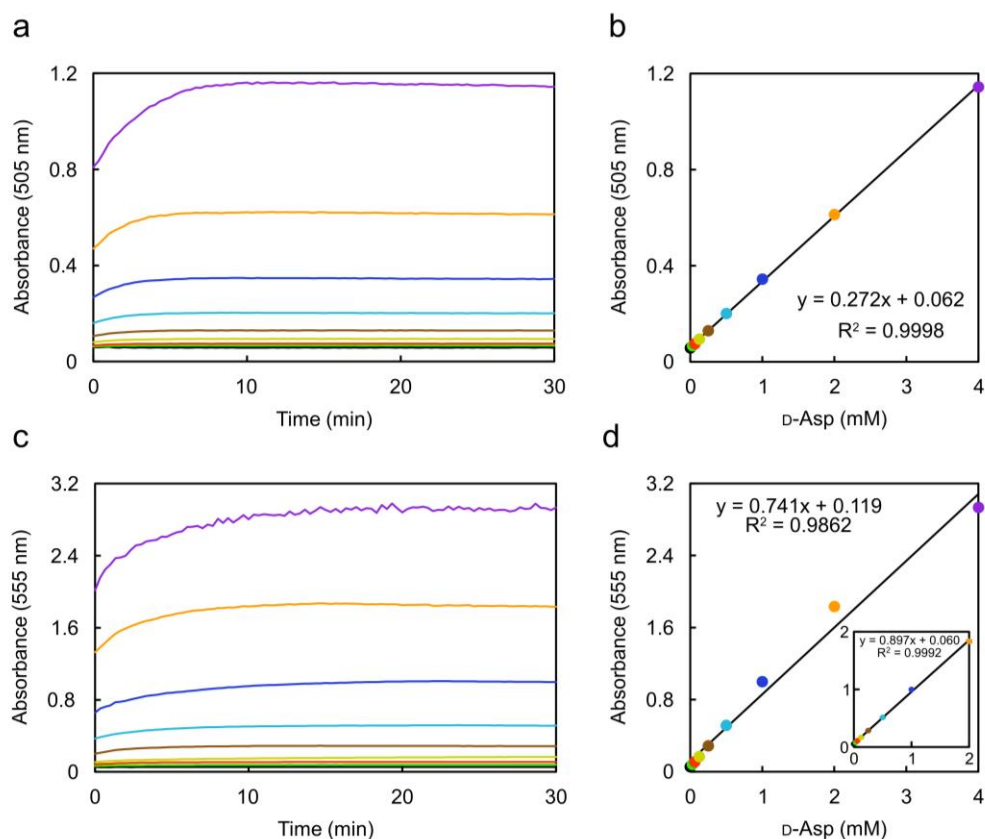
### 2.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出試薬の検討

D-Asp と ChDDO の反応で生成する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の検出に最適な西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 発色基質を決定するため、HRP 発色基質として多用されている *o*-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) と *o*-phenylenediamine (OPD) およびトリンダー試薬である phenol/4AAP および TOOS/4AAP を用いて、蒸留水に溶解した 0–1 mM および 0–4 mM D-Asp を反応系 1 U/ml の精製 ChDDO を用いて検出した[129-132]. *o*-Dianisidine, TMB と OPD を用いて得られた測定開始 30 分後の吸光度の回帰直線は高い直線性を有していた (Fig. 1-2b, d, f). しかしながら、*o*-dianisidine を用いた反応系では、低濃度の D-Asp (0–125  $\mu$ M) で吸光度の増加が観察されず、時間とともに吸光度が緩やかに低下した (Fig. 1-3a). また、回帰直線の低濃度側ではプロットが直線から外れていた (Fig. 1-3b). TMB を用いた反応系では、測定開始時において既に各 D-Asp 濃度に対する吸光度が最大となり、反応時間の経過とともに低下した (Fig. 1-3c). また、回帰直線の 0–125  $\mu$ M におけるプロットのばらつきが大きかった (Fig. 1-3d). OPD を用いた反応系では、測定開始時から時間とともに吸光度が増加したが、その増加は緩やかで、全ての D-Asp 濃度において反応開始 30 分後に吸光度が平衡に達しなかった (Fig. 1-3e). 一方、測定終了時における D-Asp 濃度と吸光度は高い相関性を示したことから、OPD を用いて 0–4 mM の濃度範囲の D-Asp を定量できる可能性が示唆された (Fig. 1-3f). トリンダー試薬である phenol/4AAP と TOOS/4AAP を用いた反応系では、全ての D-Asp 濃度において反応開始 30 分以内に吸光度が平衡に達した (Fig. 1-4a, c). また、反応終了時における D-Asp 濃度と吸光度は非常に高い相関性を示し、回帰直線の傾き (感度) は OPD の場合よりも高かった (Fig. 1-4b). 特に、TOOS/4AAP の感度は高く、phenol/4AAP の約 2.7 倍だった (Fig. 1-4d). しかし、TOOS/4AAP を用いた 4 mM D-Asp 検出時の吸光度は測定装置の測定限界に近いいため、実際の吸光度よりも幾分低い吸光度と考えられた. そこで、0–2 mM D-Asp の濃度範囲で相関を解析したところ、0–4 mM D-Asp で得られた値 (傾き: 0.741, 相関性:  $R^2=0.9862$ ) よりも、高い感度と相関性が得られた (傾き, 0.897; 相関性,  $R^2=0.9992$ ; Fig. 1-4d 挿入図). したがって、本研究で試験した 5 種の発色基質のうち、トリンダー試薬である phenol/4AAP と TOOS/4AAP は、測定時間内で吸光度が平衡に達し、かつ D-Asp 濃度と吸光度が高い感度と相関性 (特に TOOS/4AAP) を示したことから、以降の D-Asp の検出実験では発色基質として phenol/4AAP と TOOS/4AAP を使用することにした.



**Fig. 1-3. *o*-Dianisidine, TMB と OPD を発色基質として用いた D-Asp 検出**

1.0 mM *o*-dianisidine を用いた 0–1 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (a) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (b). 1.0 mM TMB を用いた 0–1 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (c) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (d). 3.0 mM OPD を用いた 0–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (e) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (f). 全てにおいて反応系 1 U/ml の精製 ChDDO. (b), (d), (f) 各プロットは試験終了時における吸光度を 3 回測定した値の平均値. すべての条件において, 測定は 37°C で行った. 紫: 4 mM, オレンジ: 2 mM, 青: 1 mM, 水色: 0.5 mM, 茶: 0.25 mM, 黄: 0.125 mM, 赤: 0.062 mM, 緑: 0.031 mM, 黒: 0 mM.

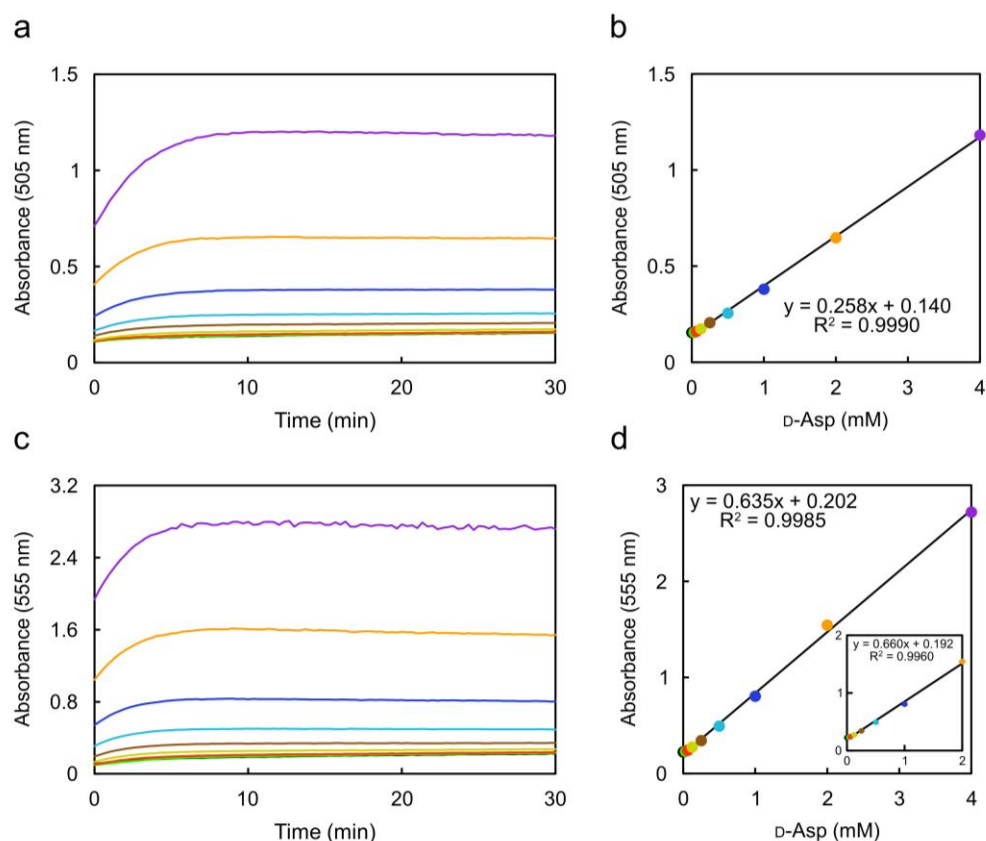


**Fig. 1-4. トリンダー試薬を発色基質として用いた D-Asp 検出**

発色基質 phenol/4AAP による 0–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (a) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (b). 発色基質 TOOS/4AAP による 0–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (c) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (d). (d) を 0–2 mM の範囲で引いた回帰直線 (挿入図). (b), (d), (挿入図) 各プロットは試験終了時における吸光度を 3 回測定した値の平均値. すべての条件において, 測定は 37°C で行った. 紫: 4 mM, オレンジ: 2 mM, 青: 1 mM, 水色: 0.5 mM, 茶: 0.25 mM, 黄: 0.125 mM, 赤: 0.062 mM, 緑: 0.031 mM, 黒: 0 mM.

## 2.4. MRS 培地成分の D-Asp 検出に及ぼす影響

D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングでは、乳酸菌生育培地である MRS 培地で乳酸菌を培養し、その培養液上清中の D-Asp を測定する。そこで、MRS 培地成分による測定系への影響を明らかにするため、0–4 mM D-Asp 溶液を MRS 培地で調製し、発色基質としてトリンダー試薬である phenol/4AAP もしくは TOOS/4AAP を用いて D-Asp を検出した。解析の結果、phenol/4AAP と TOOS/4AAP を用いた反応系のどちらとも、D-Asp を蒸留水に溶解した場合と同様に、反応時間の経過とともに吸光度が増加し、平衡に達する時間も同等であった (Fig. 1-5a, c)。測定終了時における吸光度は、TOOS/4AAP では D-Asp を蒸留水に溶かした場合よりもわずかに低く、phenol/4AAP では同等だった。どちらの試薬を用いた場合でも、D-Asp を蒸留水に溶解した場合と異なり、低濃度 (0–0.063 mM) において吸光度が反応時間の経過とともに穏やかに増加したが (Fig. 1-5a, c)、D-Asp 濃度と吸光度の相関は非常に高く、蒸留水の場合と同様に感度は TOOS/4AAP のほうが高かった (Fig. 1-5b, d)。また、0–2 mM D-Asp の濃度範囲で検量線を引くと、0–4 mM の場合よりも、わずかに高い傾きが得られた (Fig. 1-5d 挿入図)。以上の結果から、トリンダー試薬を用いた D-Asp 測定系への MRS 培地成分の影響はほとんどないことが分かった。それぞれの回帰直線 (phenol/4AAP : 0–4 mM, TOOS/4AAP : 0–2 mM) から、検出限界 (DL) および定量限界 (QL) を算出したところ、phenol/4AAP を用いた場合は、それぞれ 48  $\mu$ M および 144  $\mu$ M であった。また、TOOS/4AAP を用いた場合はそれぞれ 13  $\mu$ M および 40  $\mu$ M であった。これら QL は、本研究の測定で目標とした D-Asp 濃度 (300  $\mu$ M 以上) よりも低いことから、どちらの発色基質も D-Asp 高生産菌のスクリーニングに適用できることが分かった。TOOS/4AAP は phenol/4AAP と比較して D-Asp 濃度と吸光度が高い感度と相関性を示したことから、以降の実験では発色基質として TOOS/4AAP を使用することにした。

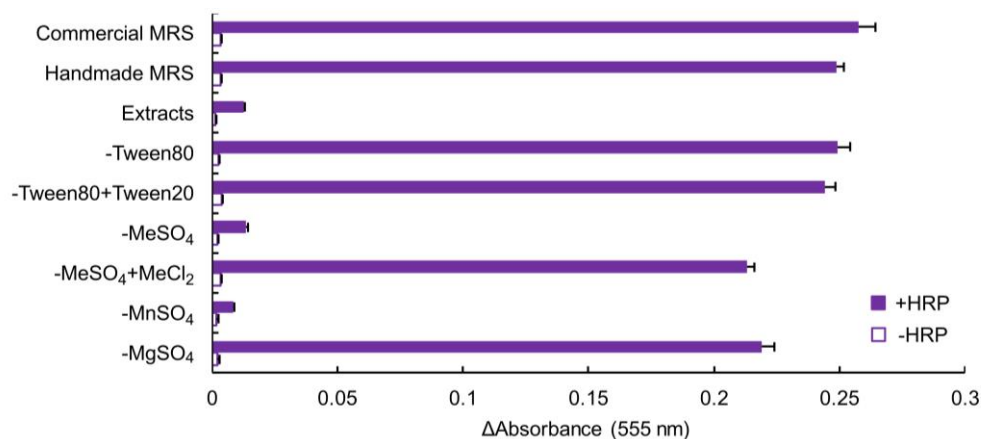


**Fig. 1-5. MRS 培地成分のトリンダー試薬を用いた D-Asp 検出への影響**

発色基質 phenol/4AAP による 0–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (a) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (b). 発色基質 TOOS/4AAP による 0–4 mM D-Asp に対する吸光度の経時変化 (c) と測定開始から 30 分後の吸光度と D-Asp 濃度の関係 (d). (d) の 0–2 mM の部分の拡大図 (挿入図). (b), (d), (挿入図) 各プロットは試験終了時における吸光度を 3 回測定した値の平均値. すべての条件において, 測定は 37°C で行った. 紫: 4 mM, オレンジ: 2 mM, 青: 1 mM, 水色: 0.5 mM, 茶: 0.25 mM, 黄: 0.125 mM, 赤: 0.062 mM, 緑: 0.031 mM, 黒: 0 mM.

トリンダー試薬を用いた D-Asp 検出の MRS 培地成分による阻害は観察されなかったが、低濃度の D-Asp (0–0.063 mM) において吸光度の経時的な緩やかな上昇が観察された (Fig. 1-5). 特に, D-Asp 0 mM においても吸光度の上昇が観察されたため, ChDDO ではなく HRP と他の物質が反応し, 定量に影響を与える可能性が考えられた. そこで, 低濃度の D-Asp 測定時における経時的な吸光度増加の原因を探るために, MRS 培地から各成分を抜いた培地を作成し, 吸光度増加に起因する因子の特定を試みた (Fig. 1-6).

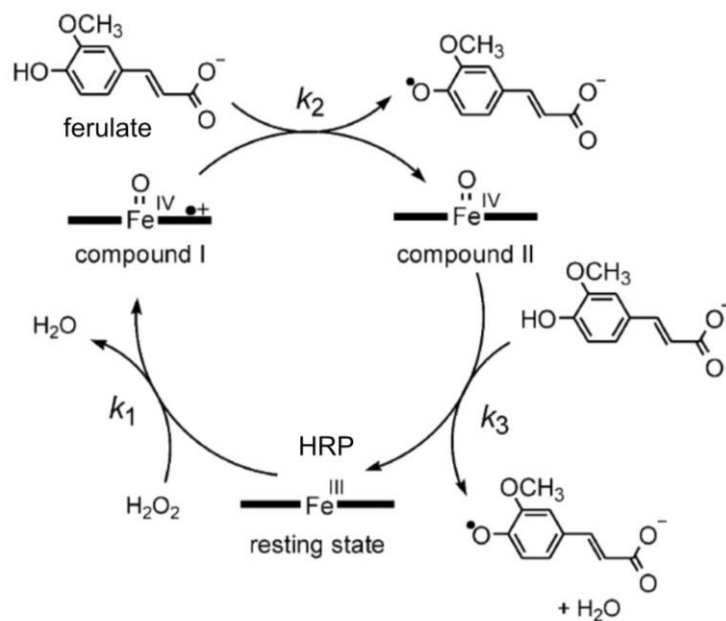
初めに, MRS 培地に含まれるエキス類のみを混合した培地 (Extracts) を反応系に供したところ, 吸光度の増加がほとんど観察されなかった (Fig. 1-6). 一方, MRS 培地のすべての成分を混合して調製した MRS 培地 (Handmade MRS) では市販の MRS 培地 (Commercial MRS) と同様の吸光度上昇が観察された. このことから, MRS 培地のエキス類以外の成分が吸光度の増加の原因と考えられた. HRP は主な基質である  $\text{H}_2\text{O}_2$  の他に様々な過酸化物にも反応することが報告されている [138]. 乳酸菌の生育促進因子として MRS 培地に添加されている Tween 80 はオレイン酸のエステル体であり, 不飽和脂肪酸であるオレイン酸は (18:1 ( $\Delta 9$ )) は過酸化脂肪酸になりやすいことが知られている [139]. Tween 80 は不飽和脂肪鎖を有するが, Tween 20 は飽和脂肪鎖を有するため, Tween 80 を Tween 20 に置換することによって, Tween 80 の影響を評価した. Tween 80 を抜いた MRS 培地 (-Tween 80) および Tween 80 を抜いて Tween 20 を添加した MRS 培地 (-Tween 80+Tween 20) を反応に供したところ, どちらの培地とも同程度の吸光度の増加が観察された (Fig. 1-6). したがって, Tween 80 は吸光度増加の原因でないことが分かった. HRP が含有しており反応に参与するヘム鉄は反応触媒時に 3 段階の状態をとることが報告されている (Fig. 1-7) [140, 141]. HRP の基底状態の Fe (III) は  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応することで酸素原子が結合した Compound I (Fe (IV) カチオンラジカル種) の状態へ変化する. そのため, 硫酸イオンが HRP への酸素供給源として作用した可能性が考えられた. そこで, 硫酸金属塩を塩化金属塩に置換することによって, 硫酸イオンの影響を評価した. 硫酸金属塩 ( $\text{MnSO}_4$  と  $\text{MgSO}_4$ ) を抜いた MRS 培地 (- $\text{MeSO}_4$ ) および硫酸金属塩を抜いて塩化金属塩 ( $\text{MnCl}_2$  と  $\text{MgCl}_2$ ) を添加した培地 (- $\text{MeSO}_4$ + $\text{MeCl}_2$ ) を反応に供したところ, 硫酸金属塩を抜いた培地で吸光度の増加が観察されず, 硫酸金属塩を抜いて塩化金属塩を添加した培地では吸光度の増加が観察された (Fig. 1-6). このことから, 吸光度の増加は金属イオンに起因することが分かった. 最後に金属イオンの影響を検討するため,  $\text{MnSO}_4$  のみを抜いた MRS 培地 (- $\text{MnSO}_4$ ) と  $\text{MgSO}_4$  のみを抜いた MRS 培地 (- $\text{MgSO}_4$ ) を反応に供したところ,  $\text{MnSO}_4$  のみを抜いた MRS 培地において吸光度の増加が観察されなかった. 以上の結果より,  $\text{Mn}^{2+}$  と HRP の存在が顕著な吸光度の増加を引き起こすことが明らかとなった.



**Fig. 1-6. MRS 培地成分によるバックグラウンド吸光度の上昇要因の解析**

Commercial MRS と Handmade MRS はそれぞれ、市販品の MRS 培地（Difco）と市販品の MRS 培地の成分を基に調製した MRS 培地を示す。Extracts は peptone, yeast extract と Ehlrich extract を混合したものである。MeSO<sub>4</sub> は MgSO<sub>4</sub> と MnSO<sub>4</sub> の両方を示し、MeCl<sub>2</sub> は MgCl<sub>2</sub> と MnCl<sub>2</sub> の両方を示す。プラス (+) とマイナス (-) は、それぞれ Handmade MRS から該当する成分を加えたまたは抜いたことを表す。紫色バーは反応液に HRP を添加し、白色バーは HRP を加える代わりに 100 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.5）加えたことを示す。吸光度は反応液と HRP を 37°C で 30 分間反応させた間に増加した吸光度を示す。測定は 3 回行い、バーは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。





**Fig. 1-7. HRP による過酸化水素の触媒機構**

[140]の Fig.4 より引用し、一部改変した。HRP は休止状態 (resting state) の HRP は  $\text{H}_2\text{O}_2$  により酸化され、Fe (IV) カチオンラジカル種の compound I になる。Compound I は還元基質であるフェラル酸により還元され compound II になる。Compound II は再びフェラル酸により還元を受け、休止状態へと戻る。

## 2.5. 乳酸菌培養液の D-Asp 検出

これまでに検討した ChDDO を用いた D-Asp 検出法により、乳酸菌培養液中の D-Asp が実際に定量できるか明らかにするため、D-Asp を生産することが知られている乳酸菌 2 株 (*Lv. brevis* JCM 1170 株と *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 株) を MRS 培地で培養し、その培養液上清の D-Asp の測定を検討した。また、陰性対照として D-Asp を生産しない細菌 2 株 (*Staphylococcus epidermidis* JCM 2414 株と *Escherichia coli* K-12 株) も同様に培養し、その培養液上清の D-Asp も測定した。さらに、同じ培養液上清の D-Asp を HPLC により定量し、ChDDO を用いた酵素法により得られた値と比較した (Table 1-1)。

D-Asp 生産乳酸菌である *Lv. brevis* JCM 1170 株と *Lb. gasseri* JCM 1131 株の培養液上清の D-Asp を酵素法により測定したところ、それぞれ  $230 \pm 14$  と  $162 \pm 15 \mu\text{M}$  であった。一方、HPLC による測定では、それぞれ  $602 \pm 24$  と  $479 \pm 28 \mu\text{M}$  であり、酵素法と HPLC 法による測定で大きな差が生じた。陰性対照株である *S. epidermidis* JCM 2414 株と *E. coli* K-12 株の培養液上清の D-Asp 濃度は、酵素法ではそれぞれ  $13 \pm 20$  と  $31 \pm 15 \mu\text{M}$  であり、HPLC による測定ではそれぞれ  $27 \pm 4$  と  $39 \pm 3 \mu\text{M}$  と同等であった。また、菌を培養していない MRS 培地を HPLC 法に供したところ、 $64 \pm 3 \mu\text{M}$  の D-Asp が観察されたことから、陰性対照株の培養液に観察された D-Asp は、MRS 培地由来と考えられた。酵素法による D-Asp 定量値と HPLC 法による D-Asp 定量値の関係を求めたところ、相関関係が見られたため、近似式から得られた補正式による濃度補正が可能と考えられた (Fig. 1-8)。酵素法によって得られた D-Asp 定量値を補正式により補正したところ、*Lv. brevis* JCM 1170 株と *Lb. gasseri* JCM 1131 株培養液上清の D-Asp 濃度はそれぞれ、 $619 \pm 34$  と  $462 \pm 46 \mu\text{M}$  と補正され、HPLC 法による値に近づいたことが示された。したがって、酵素法による定量値を補正することによって、正確な濃度が推定できることが明らかとなった。

Table 1-1. 酵素法と HPLC 法による D-Asp 定量

Strains	D-Asp (μM)		
	Enzymatic	Corrected enzymatic <sup>a</sup>	HPLC
MRS medium	-	-	64 ± 3
<i>Lv. brevis</i> JCM 1170	230 ± 14	602 ± 24	619 ± 34
<i>Lb. gasseri</i> JCM 1131	162 ± 15	479 ± 28	462 ± 46
<i>S. epidermidis</i> JCM 2414	13 ± 20	-	27 ± 4
<i>E. coli</i> K-12	31 ± 15	-	39 ± 3

酵素法は TOOS/4AAP を発色基質とし, 2 U/ml になるよう ChDDO を反応液に添加して吸光度上昇をモニタリングして算出した.

<sup>a</sup>Fig. 1-8 の近似式より算出.

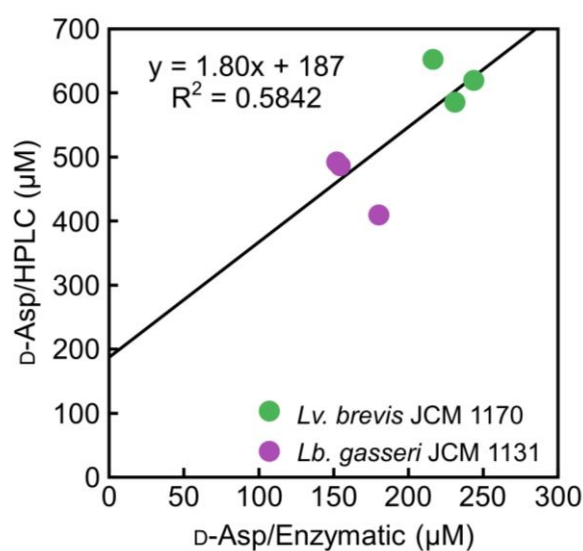
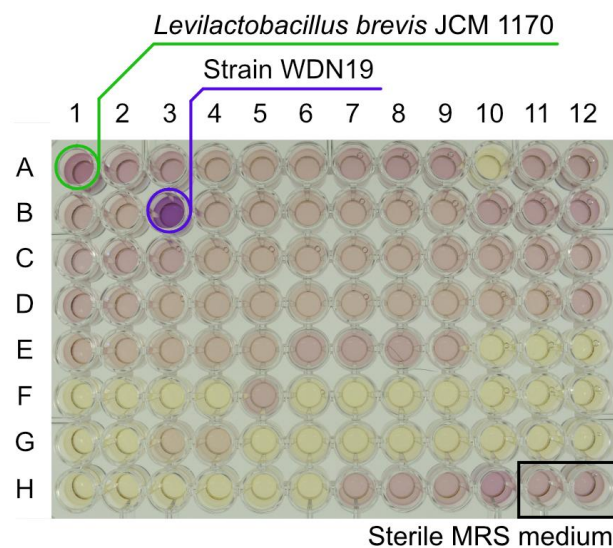


Fig. 1-8. 酵素法と HPLC 法による乳酸菌培養液上清 D-Asp 濃度定量値の関係

D-Asp 生産乳酸菌である *Lv. brevis* JCM 1170 株 (●) と *Lb. gasseri* JCM 1131 株 (●) の培養液上清中の D-Asp を HPLC 法と酵素法で測定したときの対応関係を表す. 各プロットは各乳酸菌培養液に対して 3 回行ったときの各々の値を表す. プロットの値は Table 1-1 に示す D-Asp 濃度定量値である.

## 2.6. 食品からの乳酸菌単離と D-Asp 高生産乳酸菌スクリーニング

乳酸菌は自然界の至る所に存在するが、本研究では将来的に単離した乳酸菌の応用的利用を考えた。そのため、安全性の観点から、D-Asp 高生産乳酸菌を食品から単離することにした。初めに、新潟県内の地場でのみ販売されている発酵食品や野菜・果実から乳酸菌候補株を多数単離した。食品試料を生理食塩水に懸濁し、MRS 培地、MRSCS 培地と LBS 培地の3種類の乳酸菌選択培地に塗布して、一般的な乳酸菌のコロニーの色である白または薄い黄色のコロニーの株を選抜し、約 950 株のコロニーを取得した。次に、取得した菌株から乳酸菌を選抜するために、乳酸菌に共通する特徴であるカタラーゼ陰性と乳酸生産を確認するため、単離された候補株に対して 0.5%  $\text{CaCO}_3$  を添加した MRS 培地によるハロー形成試験と、菌体に過酸化水素を添加するカタラーゼ試験を行った。その結果、ハロー形成陽性とカタラーゼ陰性の乳酸菌候補株を 628 株取得することができた。これら単離した全ての株の MRS 培養液上清の D-Asp を開発した酵素法で測定したところ、現在までに最も高い D-Asp 生産能が報告されている *Lv. brevis* JCM 1170 株の培養液上清よりも強い呈色を示す培養上清が 1 株確認された (Fig. 1-9)。また、各菌株で呈色の違いが見られ、*Lv. brevis* JCM 1170 株よりは呈色が弱いものの、コントロールより呈色が濃い菌株や呈色が見られない菌株が確認された (Fig. 1-9)。非常に強い呈色が得られた培養液の菌株を WDN19 株と名づけ、D-Asp 生産能 (D-Asp 濃度/ $\text{OD}_{600}$ ) を算出したところ、 $2,110 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  であった。一方、*Lv. brevis* JCM 1170 株の D-Asp 生産能は  $803 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  であり、WDN19 株の方が 2.6 倍高い D-Asp 生産能を有していることが分かった。以上の結果より、本研究で開発した ChDDO を用いた D-Asp 生産菌の酵素スクリーニング法により、D-Asp 高生産株 WDN19 株の取得に成功した。



**Fig. 1-9. D-Asp 高生産乳酸菌の酵素スクリーニング**

ChDDO を用いた酵素法により D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングを行った一例を示す。乳酸菌は 300  $\mu$ l MRS 培地で 30°C で 24 時間培養した。培養液上清中の D-Asp は TOOS/4AAP を発色基質として、反応液に 2 U/ml になるよう ChDDO を添加することにより検出した。紫色が濃いほど D-Asp 濃度が高いことを示す。ウェル A1 と B3 はそれぞれ、*Lv. brevis* JCM 1170 株と WDN19 株の培養液上清の呈色を示す。ウェル H11 と H12 はコントロールとして用いた滅菌 MRS 培地の呈色を示す。

## 2.7. D-Asp 分泌生産および非分泌生産乳酸菌の分子系統解析

スクリーニングにより得られた D-Asp 高生産乳酸菌 WDN19 株を同定するため、16S rRNA 遺伝子配列を解析した。加えて、乳酸菌における D-Asp 生産能の属や種による違いを解析するため、得られた WDN19 株を含む D-Asp 分泌生産乳酸菌 13 株と非分泌生産乳酸菌 12 株の計 25 株について BLAST 検索と分子系統解析を行った (Table 1-2)。

BLAST 検索の結果、スクリーニングで単離された D-Asp 高分泌生産乳酸菌である WDN19 株は乳酸菌 *Latilactobacillus curvatus* DSM 20019 株に最も近縁であることが分かった (Table 1-2)。また、解析した乳酸菌候補株はすべて乳酸菌であり、4 属 10 種の乳酸菌に分類された (Table 1-2)。D-Asp 高分泌生産および分泌生産乳酸菌は *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactococcus* もしくは *Enterococcus* 属に分類された。一方、D-Asp 非分泌生産乳酸菌は *Leuconostoc* 属と *Lactiplantibacillus plantarum* に近縁だった。*Leuconostoc* 属乳酸菌は D-Asp 高分泌生産および分泌生産乳酸菌 3 属と系統的に大きく離れていた (Fig. 1-10)。興味深いことに、D-Asp の分泌生産が確認できなかった 15S9 株と 15S15 株も WDN19 株と同じ *L. curvatus* に最も近縁だった (Table 1-2, Fig. 1-10)。単離した *L. curvatus* に近縁の 5 つの乳酸菌は、*L. sakei* に近縁の 15S2 株、15S7 株および 15S8 株とともに、*L. sakei* および *L. graminis* とクラスターを形成していたことから、*Latilactobacillus* 属に近縁と考えられた (Fig. 1-10)。

Table 1-2. 単離した D-Asp 分泌生産および非分泌生産乳酸菌の近縁種

Sources	Strains	D-Asp production <sup>a</sup>	Species	Identity <sup>b</sup> (%)	S_ab <sup>c</sup>
Chinese cabbage pickle	14L6	n.d. <sup>d</sup>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> DSM 20193	99.85	0.990
	14S11	n.d.	<i>Leu. citreum</i> DSM 5577	99.85	0.990
	14S12	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> DSM 20450	99.85	0.993
Chinese cabbage pickle	15L1	+	<i>Enterococcus casseliflavus</i> DSM 20680	99.93	0.995
	15L2	+	<i>Ent. casseliflavus</i> DSM 20680	99.28	0.995
	15S2	+	<i>Latilactobacillus sakei</i> DSM 20017	100.00	0.995
	15S7	+	<i>Lt. sakei</i> DSM 20017	99.93	0.992
	15S8	+	<i>Lt. sakei</i> DSM 20017	100.00	0.995
	15S9	n.d.	<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019	99.89	0.986
	15S13	n.d.	<i>Leu. mesenteroides</i> DSM 20343	100.00	1.000
	WDN19	+++	<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019	99.86	0.986
	15S15	n.d.	<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019	99.79	0.984
Cucumber rice-bran pickle	16L1	n.d.	<i>Leu. citreum</i> DSM 5577	99.85	0.990
	16S1	+	<i>Ent. gallinarum</i> DSM 24841	99.86	0.989
			<i>Ent. casseliflavus</i> DSM 20680	99.85	0.992
	16S2	+	<i>Ent. casseliflavus</i> DSM 20680	99.86	0.992
Cucumber pickle	17S9	n.d.	<i>Leu. mesenteroides</i> DSM 20343	100.00	1.000
	17S20	+	<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019	99.86	0.986
Salwort	20L1	n.d.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSM 20174	99.93	0.995
	20L14	++	<i>Levilactobacillus brevis</i> DSM 20054	100.00	0.997
Cucumber mustard pickle	25L1	n.d.	<i>Leu. mesenteroides</i> DSM 20343	99.93	0.998
Vegetable miso pickle	26M1	+	<i>Ent. faecium</i> DSM 20477	99.93	0.996
Daikon radish soy sauce pickle			<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i> JCM 31787	100.00	-
	33L1	n.d.	<i>Leu. mesenteroides</i> DSM 20343	99.93	0.995
Spring mix	35S5	n.d.	<i>Leu. lactis</i> DSM 20202	99.93	0.995
Nalta jute	38L1	n.d.	<i>Lp. plantarum</i> DSM 20174	100.00	0.993
Cucumber rice-bran pickle	51L10	++	<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019	99.86	0.986

<sup>a</sup>記号はそれぞれ、D-Asp 生産量が *Lv brevis* JCM 1170 よりも高い (+++), 同じ (++) , 低い (+) と非検出 (-) であることを示す.

<sup>b</sup>E-value はすべての株において 0.0 である.

<sup>c</sup>S\_ab score は Ribosomal Database Project (<http://rdp.cmc.msu.edu/>) による解析で得られた.

<sup>d</sup>n.d. は not detected を表す.

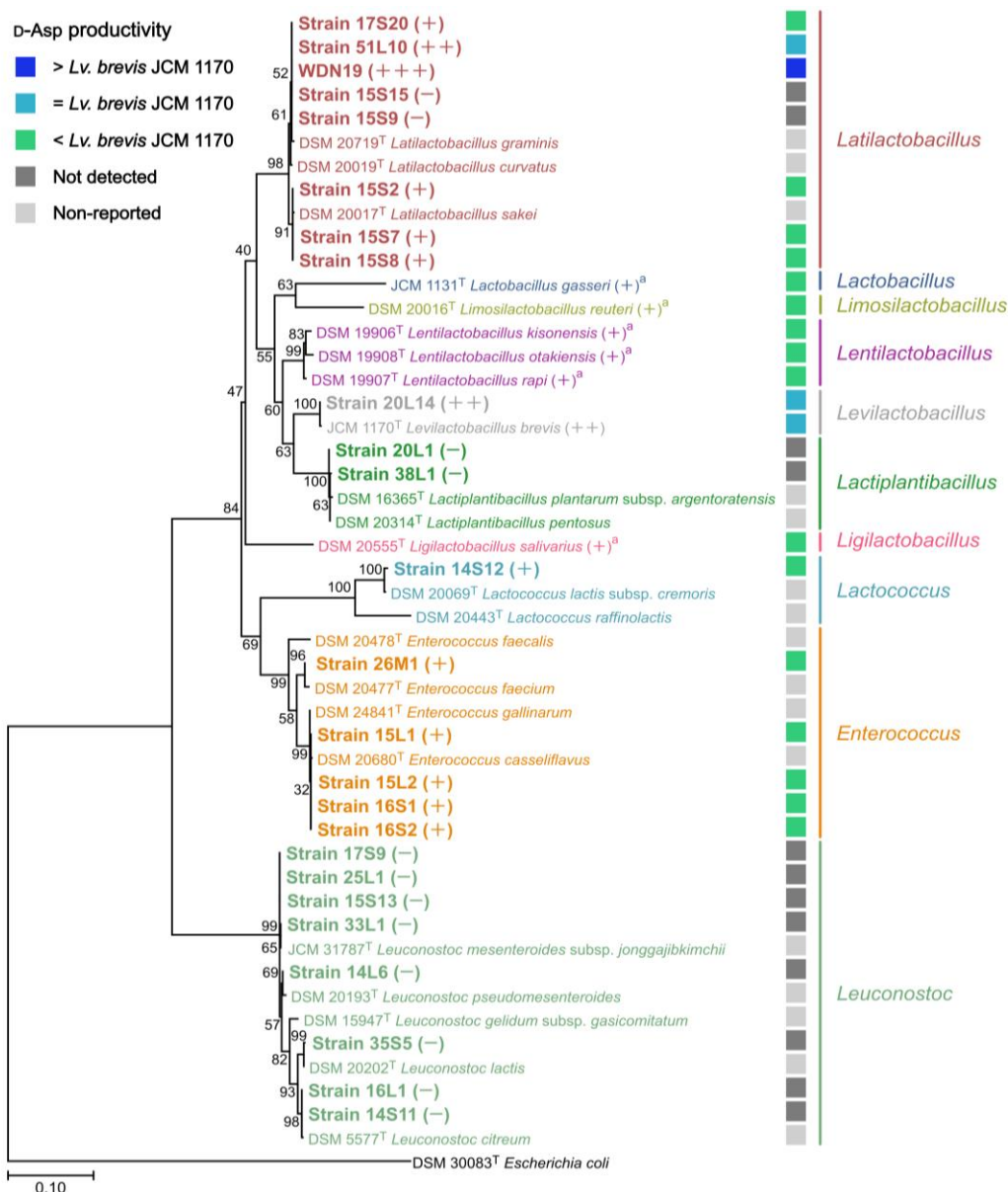


Fig. 1-10. D-Asp 分泌生産および非分泌生産乳酸菌の分子系統解析

最尤法により作成. 節の数字はブーストラップ値 (1000) の%表記. 16S rRNA 配列の accession no.: *Lt. graminis* DSM 20719 (NR\_042438.1), *Lt. curvatus* DSM 20019 (NR\_042437.1), *Lt. sakei* DSM 20017 (NR\_042443.1), *Lb. gasseri* JCM 1131 (NR\_075051.2), *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 (NR\_025911.1), *Lentilactobacillus kisonensis* DSM 19906 (NR\_041658.1), *Lent. otakiensis* DSM 19908 (NR\_041657.1), *Lent. rapi* DSM 19907 (NR\_041659.1), *Lv. brevis* JCM 1170 (NR\_044704.2), *Lp. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365 (NR\_042254.1), *Lp. pentosus* DSM 20314 (NR\_029133.1), *Ligilactobacillus salivarius* DSM 20555 (NR\_028725.2), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069 (NR\_040954.1), *Lc. raffinolactis* DSM 20443 (NR\_044359.1), *Ent. faecalis* DSM 20478 (NR\_040789.1), *Ent. faecium* DSM 20477 (NR\_042054.1), *Ent. gallinarum* DSM 24841 (NR\_113924.1), *Ent. casseliflavus* DSM 20680 (NR\_10456.1), *Leu. mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* JCM 31787 (NR\_157602.1), *Leu. pseudomesenteroides* DSM 20193 (NR\_040814.1), *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JCM 12535 (NR\_074997.2), *Leu. lactis* DSM 20202 (NR\_040823.1), *Leu. citreum* DSM 5577 (NR\_041727), *E. coli* DSM 30083 (NR\_024570.1). 上付き T は type strain を示す. Strain の横の記号は Table 1-2 に対応.



### 3. 考察

#### 3.1. 酵素法と HPLC 法による D-Asp 検出の比較

本研究で開発した酵素を用いた D-Asp 分泌生産乳酸菌のスクリーニング法は、D-アミノ酸生産微生物スクリーニングの初めての報告である。これまでに D-アミノ酸生産微生物のスクリーニングが行われてこなかった理由として、現在までに D-Asp を含む D-アミノ酸の検出・定量には主に HPLC 法が使用されており、HPLC 法では一回の測定に一つのサンプルしか測定できないことや測定に時間を有することが挙げられる[102-104]。また、特定の D-アミノ酸に特異的に作用しかつ簡便に検出できる酵素がほとんどないことが挙げられる。DDO は酸性 D-アミノ酸に作用するが、ChDDO を除く DDO は D-Glu に対しても高い活性を示す。D-Glu はほとんどの細菌の細胞壁構成成分として生産されるため、ChDDO 以外の DDO を用いた場合は D-Asp 検出に干渉する可能性が非常に高い[3]。D-Asp 特異的に作用する酵素には、ChDDO の他に、RacD、D-アスパラギン酸リガーゼ (AslA) やアスパラギンシンターゼ (AsnH) があるが、RacD を用いる場合には、D-Asp を L-Asp に変換した後に L-Asp を他の酵素で検出する必要がある[4, 128, 142]。また、AslA と AsnH はそれぞれ、PG に D-Asp を結合させる酵素とその D-Asp をアミド化させる酵素であることから検出・定量に用いるのは困難と考えられる。本研究では、D-Asp に対し高い特異性を有する ChDDO を用いることによって、D-Glu 干渉の課題を克服することができた。開発した酵素法の D-Asp に対する DL と QL はそれぞれ 14 と 42  $\mu\text{M}$  であり、HPLC 法の DL と QL は nM レベルであることから、酵素法の検出感度は HPLC 法に劣ることが分かった[104, 143, 144]。しかし、発色試薬を AmplexRed などの蛍光検出試薬に変更することで検出感度を数十倍上げることは可能である。また、D-Asp 高分泌生産乳酸菌のスクリーニングでは  $\mu\text{M}$  レベルの検出感度で十分であり、培養液をそのまま使用できかつ反応時間 30 分で最大 96 サンプル測定できることから、開発した酵素法は D-アミノ酸分泌生産菌のスクリーニングにおける HPLC 法の欠点を克服できたといえる。

### 3.2. ChDDO 発現大腸菌粗抽出液を用いた D-Asp 検出

本研究では、初めに測定に用いる ChDDO の調製の手間を省くため、ChDDO を発現させた大腸菌粗抽出液を用いて D-Asp の検出を検討したが、添加する粗抽出液量の増加に伴い、反応液の吸光度が低下した (Fig. 1-1e, f). 反応過程において、吸光度が一度上昇していることから、反応によって生成したキノイミン色素が分解されたと考えられた。現在のところ、この原因は不明であるが、キノイミン色素は酸化縮合によって生じることから、大腸菌粗抽出液中に含まれる何らかの酵素によって還元された可能性が考えられる。さらに、添加する粗抽出液量を増やすにつれて、吸光度が低下し始める時間も早かった。また、粗抽出液 ChDDO と精製 ChDDO による測定結果の比較から、精製 ChDDO のほうが吸光度の上昇が大きく、回帰直線の傾きも大きかった (Fig. 2). 反応系に 1 U/ml の ChDDO を含む粗抽出液を用いた反応系では定量が可能と考えられたが、大腸菌粗抽出液に含まれる ChDDO の活性値は調製毎に変化することから、粗抽出液を用いた測定では安定した D-Asp 定量ができない可能性が考えられた。したがって、精製した ChDDO を定量に用いることが重要であることが分かった。

### 3.3. 発色試薬の検討

現在報告されている最も高い D-Asp 生産能を有する乳酸菌である *Lv. brevis* JCM 1170 株が生産する D-Asp 濃度は 317  $\mu\text{M}$  である[42]. 本研究では、317  $\mu\text{M}$  以上の D-Asp 生産能を有する乳酸菌の取得を目標としているため、317  $\mu\text{M}$  以上の D-Asp を定量できる感度が必要である。本研究で使用する HRP の基質となる発色試薬のうち、*o*-dianisidine、TMB と OPD は単体で HRP の基質となりえるため、TOOS のような 2 成分からなる発色基質よりも培地成分の影響を軽減できると考えて選択した[129-131]. *o*-Dianisidine は DDO の活性測定で使用されているため、アッセイ系に影響しないことが考えられたが、低濃度の D-Asp (0–125  $\mu\text{M}$ ) で吸光度の増加が見られず、時間とともに吸光度が緩やかに低下した (Fig. 1-3a). また、低濃度側のプロットのばらつきが大きかったことから、バックグラウンドが大きいことが示唆された (Fig. 1-3b). これは、*o*-dianisidine の不溶性の酸化物が沈殿したことが原因と考えられた。しかしながら、 $R^2$  値は 0.9961 であり、反応が測定時間内に平衡に達していること、高濃度側ではばらつきが見られないことから高濃度の D-Asp の検出・定量には使用できると考えられた (Fig. 1-3a, b). TMB は測定開始時から測定終了時にかけて吸光度が低下した (Fig. 1-3c). TMB は反応後の荷電状態により吸収波長が異なり ( $A_{370}$  または  $A_{652}$ ), 反応後の反応液に硫酸や塩酸などを添加して反応液を酸性にすることにより 450 nm の最大吸収波長を有する安定した色素体に変換できることが知られている[130]. そのため、TMB を用いた反応系で観察された吸光度の低下は酸の添加により改善できる可能性がある。 $R^2$  値は 0.9713 と高かったものの (Fig. 1-3d), 本研究では簡便な酵素スクリーニング法の開発を目的としているため、追加の操作を必要としない発色試薬が好ましいと考えられる。OPD の D-Asp 濃度に

対する吸光度の応答性は良好だったが、測定時間内に吸光度が平衡に達しなかった (Fig. 1-3e). 反応速度は酵素量の増加で解決できると考えられるが、回帰直線の傾き (感度) が 5 種類の発色試薬の中で最も低かった (Fig. 1-3f). 本研究ではより感度が高く、反応速度も速い発色基質が見いだされていることから、本研究での適用は難しいと考えられた. 本研究で使用した発色基質のうち、phenol/4AAP と TOOS/4AAP はそれぞれ 2 種類の試薬を共存させて使用する [129, 132]. *o*-Dianisidine と同様に、phenol/4AAP は DDO の活性測定で使用されているため、アッセイ系に影響しないことが考えられた [129]. 実際、Phenol/4AAP では高い直線性を有する回帰直線が得られ、 $R^2$  値は 0.9998 と 5 種類の発色試薬の中で最も高かった (Fig. 1-4b). また、反応も測定時間内に平衡に達していることから (Fig. 1-4a), 利用可能と考えられた. TOOS/4AAP は phenol/4-AAP よりも感度が高いことが報告され、その感度は phenol/4AAP の感度よりも 3.1 倍高いことが報告されている [129]. TOOS/4-AAP では、2 – 4 mM の範囲で測定装置の測定限界に近づいたため、2 mM を超えるような濃度の D-Asp の定量には phenol/4AAP の使用が好ましいと考えられる. しかしながら、回帰直線の  $R^2$  値は 0.9992 と phenol/4AAP と同程度であり (Fig 1-4d, 挿入図), 反応も測定時間内に平衡に達していた (Fig. 1-4c). 特に、0 – 2 mM の範囲の回帰直線の傾き (感度) は、phenol/4AAP より 3.3 倍高くより感度が優れていたことから (Fig. 1-4b, d, 挿入図), 実サンプルで使用する乳酸菌の培養液中の夾雑物の影響を小さくできる可能性がある. したがって、TOOS/4AAP も本研究において利用可能と考えられた.

### 3.4. MRS 培地成分の D-Asp 検出への影響

MRS 培地は多様な成分を含むため、酵素法による D-Asp 検出に干渉する可能性が考えられた. 実際、酵素法により測定した MRS 培養液の D-Asp 定量値は HPLC 法による定量値よりも低く算出された (Table 1-1). MRS 培地に含まれる成分と HRP を反応させたところ、MRS 培地中の  $Mn^{2+}$  が HRP と反応し、バックグラウンドを大きく上昇させることが示された (Fig. 1-6). TOOS と同じアニリン系の試薬である *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethylaniline sodium salt (MAOS) と 4-AAP が  $Cu^{2+}$  存在下で反応することが報告されている [145]. 4-AAP と TOOS での報告はないものの、4-AAP と MAOS は  $Mn^{2+}$  存下でもわずかに反応することから、 $Mn^{2+}$  が 4-AAP と TOOS の反応に関与した可能性がある [145]. また、シッフ塩基を有する 4-AAP 縮合体が金属イオンと結合し呈色を生じることが報告されている. 例えば、4-AAP と pyrrole-2-carboxaldehyde との縮合体は  $Cu^{2+}$  存在下で紫色を呈し、4-AAP と 2-hydroxy 1, 2-di(phenyl)ethenone(benzidine)との縮合体は  $Fe^{3+}$  存在下で紫色を呈することが報告されている [145]. 4-AAP と TOOS の縮合により生じるキノイミン色素もシッフ塩基を有していることから、 $Mn^{2+}$  とシッフ塩基が結合し呈色が生じた可能性がある. また、多くの乳酸菌において、 $Mn^{2+}$  を細胞内に取り込むことによって、活性酸素に対する防御に利用することが報告されている [146]. したがって、*S. epidermidis* や *E. coli* よりも

多くの  $Mn^{2+}$  を乳酸菌が細胞内に取り込むことで、乳酸菌における吸光度上昇が低くなり、HPLC 法と比較して D-Asp 濃度が低く算出された可能性が考えられる。

### 3.5. 乳酸菌の単離

本研究では乳酸菌 13 株において D-Asp 分泌生産が確認でき、その多くは漬物から単離された。漬物などの発酵食品では、野菜に食塩の添加や重石による加圧などの処理を施していることから、野菜からアミノ酸などの栄養を漏出させているため、乳酸菌が豊富に存在しやすいとされている。加えて、発酵中は嫌気状態であるため、乳酸菌の生育に適しているとされている[147]。

本研究で単離した約 950 株の乳酸菌候補株のうち、628 株がハロー形成試験とカタラーゼ試験で乳酸菌と推定された。乳酸菌を単離するための選択培地には MRS 培地にシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを添加した MRSCS 培地と LBS 培地を使用した。MRS 培地は乳酸菌の汎用的な培地であるが、大腸菌などの乳酸菌以外の細菌も生育でき、乳酸菌の選択性が低いことが報告されている[148]。MRSCS 培地は、MRS 培地にシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを選択剤として添加し選択性を持たせた培地である。シクロヘキシミドはカビや酵母などの真核生物に作用し、転写を阻害する、一方、アジ化ナトリウムはグラム陰性菌の生育を阻害することから、MRS 培地にこれら化学物質を添加することでグラム陽性菌である乳酸菌の選択性を上げることができる[149,150]。LBS 培地は、MRS 培地に比べ、2019 年以前に *Lactobacillus* 属と分類されていた乳酸菌に対する選択性が非常に高いことが知られている[148]。これは、LBS 培地の pH は 5.5 と MRS 培地の pH 6.5 に比べ酸性であり、以前に *Lactobacillus* 属と分類されていた乳酸菌は酸耐性を有する株が多いためと考えられている[148]。本研究で単離した乳酸菌候補株の約 2/3 が乳酸菌の性質を有していたことから、これら培地を使用したことで乳酸菌単離の選択性が上がったと考えられる。

### 3.6. D-Asp 分泌生産乳酸菌

本研究で D-Asp 分泌生産乳酸菌として単離された乳酸菌は、*Latilactobacillus* 属、*Levilactobacillus* 属、*Lactococcus* 属と *Enterococcus* 属に近縁であった (Table 1-2, Fig. 1-10)。乳酸菌において、D-Asp の生産に必要な RacD は *Enterococcus faecalis*, *Latilactobacillus sakei* と *Streptococcus thermophilus* で酵素自身の存在が見いだされており、*E. faecium*, *E. lactis*, *Lv. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Lactocaseibacillus casei* で RacD 活性が見いだされ、*Lactococcus lactis*, *Lb. rhamnosus* と *Lactiplantibacillus plantarum* で *racD* 遺伝子が見出されている[2, 4, 151-154]。さらに、2019 年まで *Lactobacillus* 属に分類されていた乳酸菌 (*Latilactobacillus* 属、*Levilactobacillus* 属や *Lactococcus* 属など) や *Enterococcus* 属の乳酸菌は細胞壁に D-Asp と D-Asp が AnsH によってアミド化された D-Asn を細胞壁に有するため、RacD を有していると考えられて

いる[4,142,155]. 一方, *Lp.plantarum* は *racD* 遺伝子を有しているが, 本研究で単離された近縁株からは D-Asp が検出されなかった. *Lp. Plantarum* は *racD* 遺伝子を有しているが, 細胞壁に D-Asp を有していないことが明らかにされており, RacD が主に D-Asp を L-Asp に変換して生育に利用する役割を担っている可能性が考えられている[4, 93]. このような RacD の D-Asp の生育への利用は細菌 *Vibrio fisheri* でも報告されている[93]. したがって, 本研究で開発した酵素スクリーニング法は D-Asp 分泌生産乳酸菌の取得において機能していると考えられる.

本研究で単離された D-Asp 高分泌生産乳酸菌 WDN19 株は, 16S rRNA 遺伝子配列解析から *Lt. curvatus*, *Lt. sakei* や *Lt. graminis* に近縁であったが, 同様に近縁とされた乳酸菌株の D-Asp 分泌生産能は大きく異なっていた (Fig. 1-10). 現在のところ, *Lt. curvatus*, *Lt. sakei* や *Lt. graminis* の D-Asp 分泌生産量は不明であるため, 第二章において WDN19 株の詳細な同定を行い, その基準株と D-Asp 生産能, 遺伝情報, 酵素活性や転写量を比較することによって, WDN19 株の D-Asp 高分泌生産能に関与する因子について解析することにした.

## 4. 材料と方法

### 試薬

D-Asp は田辺三菱製薬 (Osaka, Japan) から寄贈されたものを用いた。西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP), phenol と *o*-dianisidine は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。 *o*-Phenylenediamine (OPD) と *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline sodium salt (TOOS) はそれぞれ東京化成工業 (Tokyo, Japan) と同仁堂 (Kumamoto, Japan) から購入した。試薬は特記しない場合, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 富士フィルム和光純薬 (Osaka, Japan), ナカライテスク (Kyoto, Japan) または Bio-Rad (Hercules, CA, USA) から購入した。De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) と *Lactobacillus* Selection Agar (LBS) は Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入した。オリゴヌクレオチドは Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) から購入した。

### 使用菌株と培地

*ChDDO* 遺伝子の大腸菌における発現には、過去に当研究室で作成された *ChDDO* 遺伝子発現ベクター pET25b *ChDDO* を保有する *E. coli* NiCo21 (DE3) を使用した[156]。乳酸菌培養中の D-Asp 分析には、*Lv. brevis* JCM 1170 株と *Lb. gasseri* JCM 1131 株の培養液上清を使用した。また、陰性対照として D-Asp を生産しない *S. epidermidis* JCM 2414 株と *E. coli* K-12 株の培養液上清を使用した。これら菌株は理研バイオリソース研究センター (Ibaraki, Japan) から購入した。*E. coli* NiCo21 (DE3) の培養には、Lysogeny Broth (LB) 培地 (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, pH 7.0) もしくは Terrific Broth (TB) 培地 (12 g/l tryptone, 24 g/l yeast extract, 4 ml/l glycerol, 12.54 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.31 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) を使用した。その他の菌株は MRS 培地 (10 g/l proteose peptone No. 3, 10 g/l beef extract, 5 g/l yeast extract, 20 g/l dextrose, 1 g/l polysorbate 80, 2 g/l ammonium citrate, 5 g/l sodium acetate, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l MnSO<sub>4</sub>, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5) で培養した。食品から単離した菌株は MRS 培地, 10 mg/l シクロヘキシミドと 10 mg/l アジ化ナトリウムを含む MRS (MRSCS) 培地と LBS 培地 (10 g/l pancreatic digest of casein, 5 g/l yeast extract, 20 g/l dextrose, 1 g/l polysorbate 80, 2 g/l ammonium citrate, 25 g/l sodium acetate hydrate, 0.575 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.12 g/l MnSO<sub>4</sub>, 0.034 g/l FeSO<sub>4</sub>, and 6 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5) で培養した。培地はオートクレーブ (120°C, 15 min) により滅菌処理した。LB, MRS, MRSCS と LBS 寒天培地には精製寒天粉末を 15 g/l となるように添加した。抗生物質を添加する場合、終濃度が 100 µg/ml となるようにアンピシリン添加し、培地名に "A" を付記した。

### 大腸菌における *ChDDO* 遺伝子発現

*ChDDO* 遺伝子を有する大腸菌を 100 µg/ml アンピシリンを含む 10 ml の LB 培地において 30°C で 16 h, 169 rpm で震盪培養した。0.5 ml の前培養液を 100 µg/ml アンピシリンを含む 100 ml の TB 培地に接種し 37°C で OD<sub>600</sub> が 0.4 に達するまで 200 rpm で震盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.4 に達した時, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるよう添加し, 20°C で 18 h さらに培養した。培養後, 遠心分離 (5,000 × g, 10 min, 4°C) で大腸菌を回収し, 氷冷洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, 10% (v/v) グリセロール, pH 7.0) に懸濁した。細胞懸濁液を超音波破碎装置 UD-201 sonicator (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) を用いて output 3, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) し, 上清を孔径 0.45 µm の PVDF フィルター (Whatman 25 mm GD/X syringe filter, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) でろ過し, *ChDDO* を含む粗抽出液を調製した。

### *ChDDO* の精製

*ChDDO* 遺伝子を有する大腸菌を 100 µg/ml アンピシリンを含む 10 ml の LB 培地において 30°C で 14 h, 169 rpm で震盪培養した。前培養液全量を 100 µg/ml アンピシリンを含む 3 l の TB 培地に接種し 37°C で OD<sub>600</sub> が 0.4 に達するまで 200 rpm で震盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.4 に達した時, IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し, 20°C で 28 h さらに培養した。培養後, 遠心分離 (5,000 × g, 10 min, 4°C) で大腸菌を回収し, 氷冷洗浄バッファーに懸濁した。細胞懸濁液を超音波破碎装置 UD-201 sonicator を用いて output 10, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) し, 上清を孔径 0.45 µm の PVDF フィルターでろ過し, *ChDDO* を含む粗抽出液を調製した。粗抽出液を 400 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーでイミダゾール濃度が 40 mM となるよう調整した後, 40 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで平衡化した HisTALON superflow cartridge (Clontech, Mountain View, CA, USA) に供し, 40 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで洗浄後, 150 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーによりタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を Amicon Ultra-15 (10,000 MW cut-off) (Millipore, Bedford, MA, USA) により濃縮し, 5% (v/v) グリセロールを含む 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) に対して一晚透析した。遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) 後, 上清を回収し, D-Asp 検出に使用するまで -80°C で保存した。

## DDO 活性測定

DDO 活性は、phenol と 4-AAP を発色基質とした HRP とのカップリング法により行った[129]。具体的には、ChDDO 精製酵素液を BSA 溶液（50 mM リン酸カリウムバッファー、5% (v/v) グリセロール、25 µg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、pH 7.5）により適宜希釈したのち、50 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.5）に溶解した終濃度 20 mM D-Asp、1.5 mM 4-AAP、2 mM phenol、25 U/ml HRP と 20 µM FAD を含む反応液に添加し 37°C で反応させた。ChDDO 活性は、反応によって得られるキノイミン色素を波長 505 nm で吸光度を分光光度計（UV-2500 PC, Shimadzu）経時的に測定し、活性を算出した。コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。

## タンパク質濃度測定

タンパク質濃度測定は Bradford 法により行い、Bio-Rad protein assay reagent concentrate（Bio-Rad, Hercules, CA, America）付属のプロトコルに従った。標準タンパク質として BSA を使用した。

## 大腸菌粗抽出液 ChDDO および精製 ChDDO を用いた D-Asp 検出

検出に用いる 0 – 4 mM D-Asp 標準液は蒸留水に D-Asp を溶解して pH を 7.5 に調製した。終濃度 100 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.5）、20 µM FAD、2.5 U/ml HRP と各種発色基質（2 mM phenol/1.5 mM 4-AAP、1.5 mM TOOS/1.5 mM 4-AAP、1 mM *o*-dianisidine、1 mM TMB と 3 mM OPD）を含む反応液に D-Asp 標準液を添加し、37°C で 5 min、600 rpm で震盪しながら保温した[129, 131, 132]。保温後、反応液の吸光度（phenol/4-AAP :  $A_{505}$ 、TOOS/4-AAP :  $A_{555}$ 、*o*-dianisidine :  $A_{450}$ 、TMB :  $A_{652}$ 、OPD :  $A_{450}$ ）をマイクロプレートリーダー（SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, San Jose, CA, USA）で測定したのち、大腸菌粗抽出液 ChDDO もしくは BSA 溶液で希釈した ChDDO 精製酵素溶液を反応系にそれぞれ 1 – 3 U/ml と 1 U/ml になるよう添加し、すみやかに各発色試薬に対応する波長の吸光度で 30 min 経時的に 37°C で測定した。

## MRS 培地及び MRS 培地成分の影響検討

D-Asp 検出における MRS 培地の影響は、MRS 培地で調製した 0 – 4 mM D-Asp 標準溶液を用い、上述した方法で、精製 ChDDO と発色基質 phenol/4AAP もしくは TOOS/4AAP を用いて検討した。検出限界（DL）および定量限界（QL）はブランクの分散値を  $\sigma_b$ 、検量線の傾きを  $a$  としてそれぞれ、 $DL = 3.3 \times \sigma_b / a$ 、 $QL = 10 \times \sigma_b / a$  の式により算出した。

MRS 培地成分の影響は、肉エキスをカッオ肉エキス（富士フイルム和光純薬, Osaka, Japan）を用いて調製した MRS 培地から、各々の培地成分を除いた MRS 培地を作成して、HRP と反応させた。コントロールは HRP の代わりに、100 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.5）を反応液に添加して反応させた。



### 乳酸菌培養液上清の D-Asp 定量

D-Asp 分泌生産が報告されている乳酸菌 *Lv. brevis* JCM 1131 株と *Lb. gasseri* JCM 1170 株を使用した。また、陰性対照として D-Asp 非生産菌である *S. epidermidis* JCM 2414 株と *E. coli* K-12 株を使用した。各菌株を 5 ml MRS 培地で 30°C もしくは 37°C で定常期初期までブチルゴム栓をした試験管で静置培養した後、培養液 50  $\mu$ l を 5 ml MRS 培地に接種し、同様の条件で培養した。培養液を遠心分離 (10,000  $\times$  g, 4°C, 10 min) し、培養液上清を回収した。培養液上清は分析に使用するまで -30°C で冷凍保存した。培養液上清中の D-Asp は発色試薬 TOOS/4-AAP と 2 U/ml の精製 ChDDO を含む反応系で上述した方法で定量した。

HPLC による D-Asp の定量は、培養液上清 200  $\mu$ l を 800  $\mu$ l メタノールへ添加して攪拌したのち遠心分離 (13,000  $\times$  g, 4°C, 10 min) して上清を回収した。沈殿画分を 500  $\mu$ l メタノールで洗浄したのち、遠心分離 (13,000  $\times$  g, 4°C, 10 min) して上清を回収し、先に回収した上清と合わせた。回収した上清を 40°C で濃縮乾固し、500  $\mu$ l の 100  $\mu$ M L-システイン酸溶液に溶解した。調製した測定試料は、測定前に 100  $\mu$ M L-システイン酸溶液で 10 倍に希釈した。アスパラギン酸の誘導体化は Aswad の方法に従って行った[33]。具体的には、4 mg *o*-フタルアルデヒドを 300  $\mu$ l メタノールに溶解したのち、250  $\mu$ l の 0.4 M ホウ酸ナトリウムバッファー (pH 9.4), 60  $\mu$ l の 1 M *N*-acetyl-L-cysteine と 390  $\mu$ l 蒸留水を加えて誘導体化試薬を調製した。アスパラギン酸の誘導体化は 5  $\mu$ l の誘導体化試薬と 20  $\mu$ l の L-システイン酸に溶解した測定試料をボルテックスで混合したのち、室温で 2 分間反応させた。475  $\mu$ l の酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.55) を加えることで反応を停止させたのちボルテックスで攪拌し、10  $\mu$ l を測定に供した。HPLC の測定には J'sphere ODS-M80 (TMC, Kyoto, Japan) カラムを使用し、移動相にはメタノール:酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.55) を 3.8:96.2 で混合したものを使用した。測定は流速 1 ml/min のイソクラティックな条件で行った。

### 乳酸菌の単離

新潟県内の農産物直売所などから、乳酸菌単離源として 45 種類の発酵食品、野菜と果実を入手した。単離源を 1% (w/v または v/v) になるよう 4.5 ml 滅菌 0.85% (w/v) 食塩水に混合したのち段階希釈し、MRS 寒天培地、LBS 寒天培地および MRSCS 寒天培地に塗布した。塗布した寒天培地はアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学, Tokyo, Japan) を用いた嫌氣的条件下において 30°C で 3 日間保温した。生育したコロニーから乳酸菌に共通する色 (クリーム色または黄色) や大きさ (直径 1–3 mm) をもとに選抜したのち、0.5% (w/v) の炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地を用いてハロー形成を確認した。さらに、ハロー形成が確認された菌株を 1 ml MRS 液体培地で静置培養したのち、培養液を遠心分離 (5,000  $\times$  g, 室温, 10 min) して菌体を回収し、菌体を 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液に懸濁した時に気泡 (O<sub>2</sub>) の発生が観察されない株を選抜した (カタラーゼ試験)。最終的に取得した菌株はグリセロールストックとして -80°C で保存した。

### D-Asp 高分泌生産乳酸菌のスクリーニング

単離した乳酸菌を 300  $\mu$ l MRS 液体培地を分注した培養用 96 well マイクロプレート (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) に接種し, 30°C で 24 h 静置培養した. 培養液 3  $\mu$ l を新しい 300  $\mu$ l の MRS 液体培地を含む培養用 96 well マイクロプレートに接種し, 同一条件で培養した. 培養液における菌株の生育 ( $OD_{600}$ ) は, 培養液 20  $\mu$ l を 80  $\mu$ l MRS で希釈し, マイクロプレートリーダーで測定した. また, 培養液の D-Asp は精製 ChDDO と発色基質 TOOS/4-AAP を用いて上述した方法で検出した. 具体的には, 培養液を遠心分離 (1,000  $\times$  g, 室温, 10 min) して得られた上清 20  $\mu$ l を 160  $\mu$ l 定量反応液に添加し, 37°C で 5 min, 600 rpm で震盪しながら加温した. 加温後, 反応系 2 U/ml 精製 ChDDO を添加した後, 吸光度  $A_{555}$  を 30 min 経時的に 37°C で測定した. 培養液上清を添加したセルの 30 min 反応後の吸光度 ( $A_{555, \text{sup}}$ ) から, 滅菌 MRS を添加したセルの 30 min 反応後の吸光度 ( $A_{555, \text{blank}}$ ) を減算し,  $OD_{600}$  で除した値を D-Asp 生産能  $[(A_{555, \text{sup}} - A_{555, \text{blank}}) / OD_{600}]$  と定義した.

### 乳酸菌の同定

単離菌株を 1 ml MRS 液体培地で 30°C で一晩静置培養し, Geno Plus Genomic DNA Extraction Miniprep System (Viogene, New Taipei city, Taiwan) を用いて添付のプロトコルに従ってゲノム DNA を調製した. 調製したゲノム DNA を鋳型とし, プライマー 27FC (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1490RC (5'-GTTACCTTGTTACGACTTC-3') および Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio, Japan) を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅 (94°C で 60 s 保温後, 98°C 10 s, 55°C 15 s, 68°C 90 s を 30 サイクル) した. PCR 反応液を Illusta ExoPlusStar (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) または ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて精製したのち, プライマー 27FC と 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') を用いて塩基配列を解析した. なお, 塩基配列解析は Eurofins Genomics に委託した. 得られた塩基配列を Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) と Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) により解析するとともに, MEGAX 付属の Muscle を用いて, 他の乳酸菌および大腸菌の 16S rRNA 配列とマルチプルアライメントを作成し, maximum likelihood 法により系統樹を作成した.

第二章 *Latilactobacillus* sp. WDN19 株における D-Asp 高生産機構の解析

## 1. 緒言

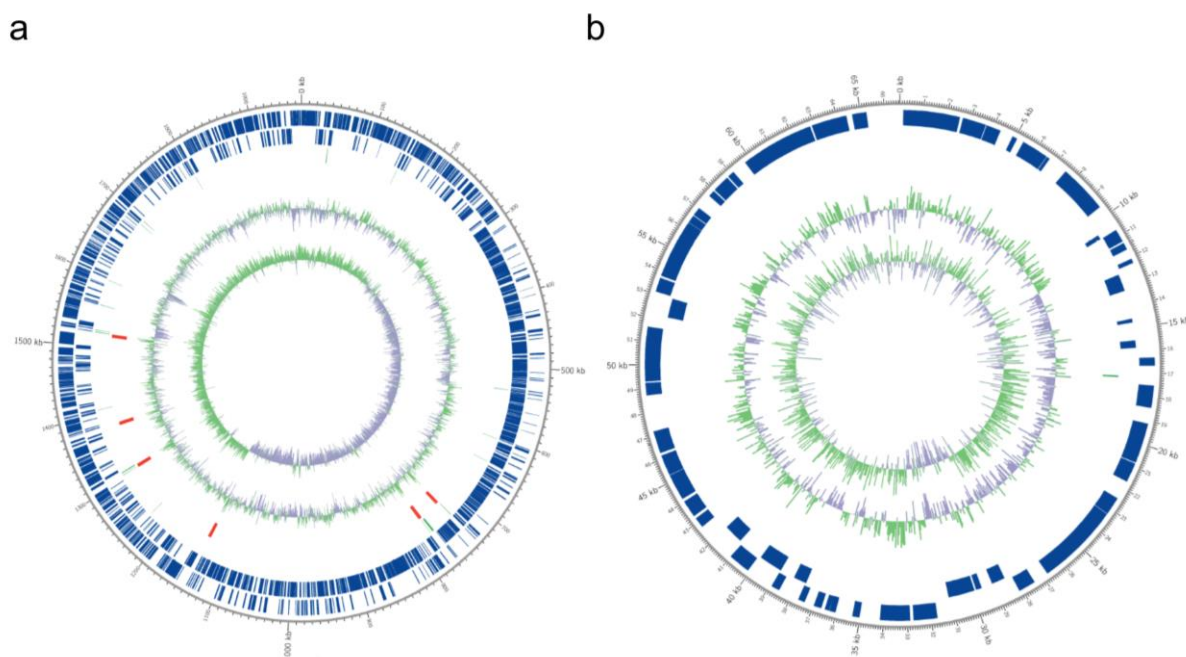
本研究ではこれまでに、D-Asp に高い特異性を有する DDO (ChDDO)を用いた D-Asp 生産乳酸菌のスクリーニング法を開発し、既知の D-Asp 高生産乳酸菌である *Levilactobacillus brevis* JCM 1170 株よりも 2.6 倍高い D-Asp 生産能を有する乳酸菌 WDN19 株を白菜の塩漬けから単離することに成功した。16S rRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析から、WDN19 株は *Latilactobacillus curvatus* DSM 20019 株, *Lt. graminis* DSM 20719 株, *Lt. sakei* DSM 20017 株に近縁であり、なかでも *Lt. curvatus* DSM 20019 に最も近縁であった。

これまでに、乳酸菌の D-Asp 高生産機構に関する知見は乏しく、D-Asp 生産能に影響を与える因子は不明であった。さらに、WDN19 株に近縁な乳酸菌 3 種のうち *Lt. sakei* のみ培養液中の D-Asp 濃度が測定されているが、最も近縁な *Lt. curvatus* の D-Asp 生産能は不明であった。そこで第二章では、WDN19 株のより詳細な同定を行い、WDN19 株で観察された高い D-Asp 生産能が近縁種に共通する性質か調べるとともに、WDN19 株の D-Asp 生産能に影響を与える因子について解析した。

## 2. 結果

### 2.1. WDN19 株の全ゲノム配列解析

WDN19 株の菌種および D-Asp 高生産機構を明らかにするため、WDN19 株の全ゲノム配列を解析した (Table 2-1)。配列解析により、121,749 個の subreads が得られ、その平均長と  $N_{50}$  値はそれぞれ 9,972 bp と 13,416 bp であり、計 1.21 Gbp であった (coverage : 597 $\times$ )。全ゲノム配列の解析の結果、WDN19 株は 1,967,462 bp からなる環状染色体 DNA と 66,648 bp からなる環状プラスミド DNA をそれぞれ 1 つ有することが明らかとなった (Fig. 2-1, Table 2-1)。染色体 DNA は 2,055 個の protein-coding sequences (CDSs) を含み、G+C 含量は 41.88% であった。一方、プラスミド DNA は 70 個の CDSs を含み、G+C 含量は 35.08% であった (Table 2-1)。WDN19 株の染色体 DNA 配列には、D-Asp 生産に関わるアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) をコードする遺伝子 (LTWDN19\_09520) と、その下流に D-アスパラギン酸リガーゼ (AsIA) をコードする遺伝子 (LTWDN19\_RS09510) が 1 つ見出された (Fig. 2-2)。また、その下流にはアスパラギン酸/アラニンアンチポーター (AspT) をコードする遺伝子 (LTWDN19\_09470) とトランスポサアーゼ遺伝子の挿入によって破壊されたと推定されるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC) をコードする遺伝子 (LTWDN19\_09500 と LTWDN19\_09480) が見出された (Fig. 2-2)。



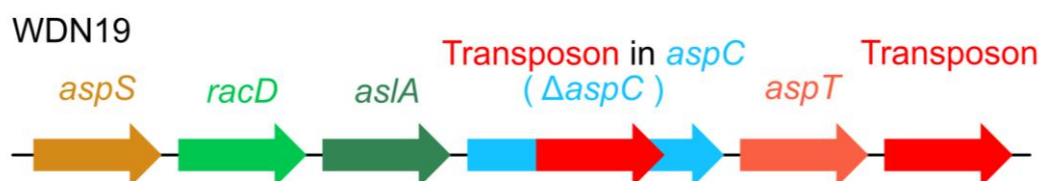
**Fig. 2-1. WDN19 株のゲノム DNA とプラスミド DNA の環状マップ**

WDN19 株のゲノム DNA (a) とプラスミド DNA (b) のアノテーション結果により作成された環状マップ。マークは外側から : forward strand の遺伝子, reverse strand の遺伝子, tRNA, rRNA, G+C%, GC skew.

Table 2-1. WDN19 株のゲノム配列とプラスミド配列の概要

	Chromosome	Plasmid
Form	Circular	Circular
Subreads	121,749	
$N_{50}$	13,416	
Length (bp)	1,967,462	66,468
CDSs	2,055	70
G+C%	41.88	35.08

$N_{50}$  は subread の配列長を長い方から足していき、全 subread の配列長の 50%に達したときの subread の配列長を表す。

Fig. 2-2. WDN19 株ゲノムにおける *racD* 遺伝子周辺の Asp 代謝に関わる遺伝子

D-Asp 生産に必要なアスパラギン酸ラセマーゼをコードする遺伝子 (*racD*) と周辺の Asp 代謝に関わる遺伝子の位置を示す。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (*aspC*) の配列中にはトランスポサラーゼをコードする遺伝子が挿入されている。*aspS*, *aslA* と *aspT* はそれぞれアスパラギン酸-tRNA リガーゼ、D-アスパラギン酸リガーゼとアスパラギン酸:アラニンアンチポーターをコードする遺伝子を示す。

## 2.2. WDN19 株の同定

WDN19 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、基準株である *Lt. curvatus* DSM 20019 株, *Lt. graminis* DSM 20719 株, *Lt. sakei* DSM 20017 株と *Lt. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831 株の 16S rRNA 遺伝子配列に対して、それぞれ 99.86%, 99.72%, 99.29%と 99.15%といずれも高い同一性を示したことから、16S rRNA 遺伝子配列を用いて WDN19 株の菌種を一つに推定できなかった (Table 2-2). *Latilactobacillus* 属の乳酸菌を含む、最近まで *Lactobacillus* 属と分類されていた乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子配列による種の分類は困難なことが知られており、代わりに DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニット (*rpoA*) やフェニルアラニン-tRNA リガーゼ  $\alpha$  サブユニット (*pheS*) 遺伝子の塩基配列が種分類の遺伝子マーカーとして提案されている[157]. そこで、*rpoA* と *pheS* 遺伝子配列および全ゲノム配列の相同性と生化学的解析から WDN19 株の同定をより詳細に検討した (Table 2-2, Fig. 2-3).

WDN19 株の *rpoA* と *pheS* 遺伝子配列を用いて相同性を解析したところ、*Lt. curvatus* DSM 20019 株の配列に対してのみいずれも 99%以上の同一性を示した. さらに、WDN19 株の全ゲノム配列を用いた average nucleotide identity (ANI) 解析により、WDN19 株の全ゲノム配列は *Lt. curvatus* DSM 20019 株の全ゲノム配列に対して最も高い 98.50%の ANI 値を示した. ANI 値が 95%以上であれば同種と判定されることから、WDN19 株は *Lt. curvatus* と考えられた[158].

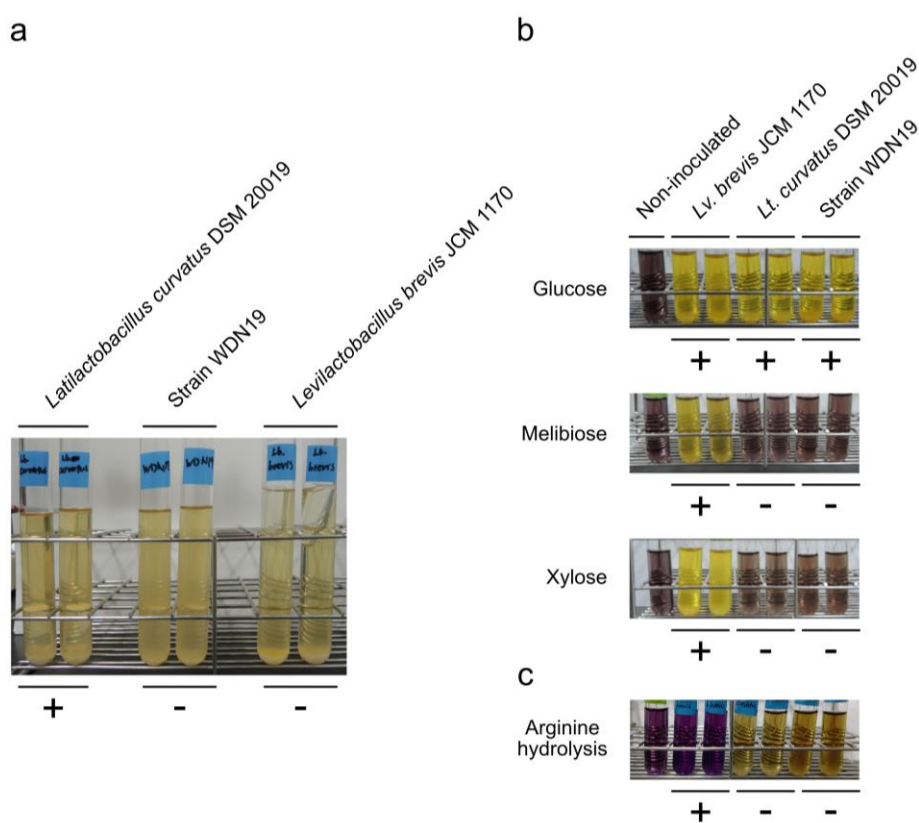
Table 2-2. WDN19 株の *rpoA* と *pheS* 遺伝子配列および全ゲノム配列の相同性解析

Strains <sup>a</sup>	Sequence identity (%)			ANI (%) <sup>b</sup>
	16S rRNA	<i>rpoA</i>	<i>pheS</i>	
<i>Lt. curvatus</i> DSM 20019 <sup>T</sup>	99.86	99.79	99.90	98.50
<i>Lt. graminis</i> DSM 20719 <sup>T</sup>	99.72	98.13	88.84	83.76
<i>Lt. sakei</i> DSM 20017 <sup>T</sup>	99.29	96.70	85.85	79.30
<i>Lt. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> DSM 15831 <sup>T</sup>	99.15	96.22	86.46	79.35

a WDN19 の 16S rRNA 遺伝子配列に対する配列同一性が 99%以上であった基準株を示す.

b Average nucleotide identity (ANI) は JSpeciesWS ANIb (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) により計算した. 解析に使用したゲノム配列の accession number を示す: WDN19 株, AP024685; *Lt. curvatus* DSM 20019<sup>T</sup> 株, GCA\_001435495.1; *Lt. graminis* DSM 20719<sup>T</sup> 株, GCA\_001436415.1; *Lt. sakei* DSM 20017<sup>T</sup> 株, GCA\_001434065.1; *Lt. sakei* subsp. *carneus* DSM 15831<sup>T</sup> 株, GCA\_001434065.1.

次に、WDN19 株の生化学的解析を検討した (Fig. 2-3). 16S rRNA 遺伝子配列に対する配列同一性が 99%以上であった *Lt. curvatus*, *Lt. graminis*, *Lt. sakei* はいずれもガス生産陰性を示し、メリビオース代謝、キシロース代謝とアルギニン加水分解において、互いに異なる表現型を示すことが報告されている[159-162]. つまり、*Lt. sakei* はアルギニン加水分解は陽性を示し、メリビオース代謝は株により陰性または陽性を示し、キシロース代謝は陰性を示す。*Lt. graminis* はキシロース代謝は陽性を示すが、アルギニン加水分解とメリビオース代謝は陰性を示す。*Lt. curvatus* はこれら代謝の全てが陰性である。WDN19 株のこれら代謝の表現型を解析したところ、*Lt. curvatus* DSM 20019 と同様に、すべて陰性を示した (Fig. 2-3). 以上の塩基配列解析と生化学的解析の結果から、WDN19 株は *Lt. curvatus* と同種と考えられた。したがって、以降の実験において、*Lt. curvatus* の基準株である DSM 20019 株を WDN19 株の対照株として用いた。



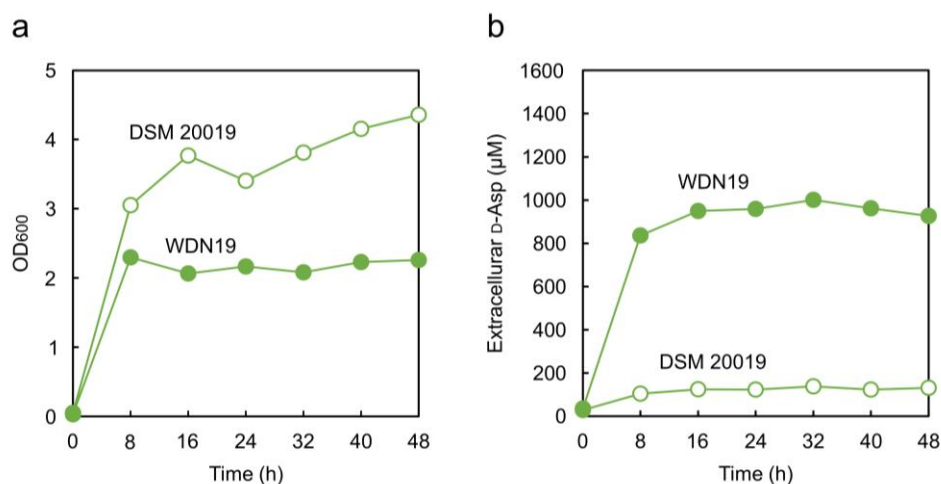
**Fig. 2-3. WDN19 株の生化学的性質**

乳酸菌のガス生産試験 (a), 糖代謝試験 (b), アルギニン加水分解試験 (c). 糖代謝とアルギニン加水分解試験に使用した培地には、pH 指示薬として 40 mg/l ブロモクレゾールパープルを添加した。Lv. brevis JCM 1170 株は陽性対照として使用した。+ (プラス) と- (マイナス) はそれぞれ陽性と陰性を示す。

### 2.3. WDN19 株と DSM 20019 株の D-Asp 生産量の比較

WDN19 株は *Lt. curvatus* と同種と考えられたが, *Lt. curvatus* における D-Asp 生産に関する知見はない. そのため, WDN19 株の高い D-Asp 生産能が *Lt. curvatus* に特有な性質かどうかは不明であった. そこで, *Lt. curvatus* 基準株である DSM20019 株と WDN19 株の MRS 培地における D-Asp 生産能を比較した (Fig. 2-4).

WDN19 株と DSM 20019 株の MRS 培地における生育は, それぞれ培養開始 8 時間と 16 時間以降に定常期に到達したが, DSM 20019 株の生育は WDN19 株の約 2 倍であった (Fig. 2-4a). しかし, 培養 48 時間後の培養液上清の D-Asp 濃度は, WDN19 株が 927  $\mu\text{M}$  であったのに対して, DSM 20019 株では 131  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 2-4b). よって, DSM 20019 株と WDN19 株の細胞あたりの D-Asp 生産能はそれぞれ 30 と 411  $\mu\text{M OD}_{600}^{-1}$  と算出され, WDN19 株は DSM 20019 株の 13.7 倍の D-Asp 細胞外生産能を有していることが分かった. したがって, 高い D-Asp 生産能は *Lt. curvatus* に共通する性質ではなく, WDN19 株に特有の性質であることが分かった.



**Fig. 2-4. MRS 培地における WDN19 株と DSM 20019 株の生育と細胞外 D-Asp 生産**

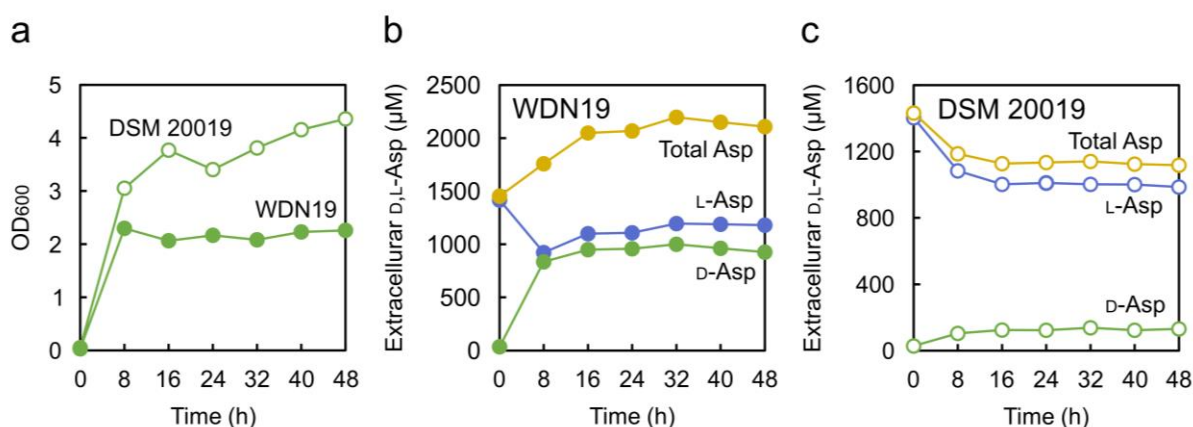
MRS 培地中で 30°C で静置培養したときの WDN19 株 (●) と DSM 20019 株 (○) の生育 (a) と培養液上清の D-Asp 濃度 (b) を示す. 各プロットは 3 回の測定の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す.



## 2.4. WDN19 株と DSM 20019 株における D,L-Asp 生産

乳酸菌において、D-Asp は RacD による L-Asp のラセミ化により生産されることが知られている [4]. MRS 培地には約 1.5 mM の L-Asp が含まれることが確認されたことから、MRS 培地における D-Asp 生産の一部は培地成分の L-Asp から RacD により生産された可能性が考えられた。そこで、MRS 培地における WDN19 株と DSM 20019 株の培養液上清の L-Asp と D-Asp 濃度を経時的に測定した (Fig. 2-5).

両株において、培養液中の L-Asp は D-Asp の増加とともに減少した (Fig. 2-5b, c). このことから、両株により生産された D-Asp は主に MRS 培地成分に含まれる L-Asp から RacD の働きにより生産されたと考えられた。WDN19 株における L-Asp の低下速度と D-Asp の増加速度は、DSM 20019 株のものよりも著しく速かったことから、WDN19 株の高い D-Asp 生産能は高い RacD 活性に起因する可能性が示唆された。また、WDN19 株では、培養 8 時間以降も D,L-Asp の両方が緩やかに増加することで、全 Asp 濃度が増加したことから、L-Asp が新規に生合成された可能性が示唆された (Fig. 2-5b). 一方、DSM 20019 株では、培養 8 時間以降に D,L-Asp は増加せず、逆に全 Asp 濃度は低下した (Fig. 2-5c). D-Asp の濃度増加に対して L-Asp の濃度低下がかなり大きいことから、DSM 20019 株における L-Asp の分解代謝が示唆された。



**Fig. 2-5. MRS 培地における WDN19 株と DSM 20019 株の生育と細胞外 D,L-Asp 濃度**

MRS 培地中で 30°C で培養したときの WDN19 株 (●) と DSM 20019 株 (○) の生育 (a), WDN19 (b) と DSM 20019 株 (c) の細胞外における D-Asp (●), L-Asp (●) と全 Asp 濃度 (●). 各プロットは 3 回測定した平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

## 2.5. WDN19 株と DSM 20019 株の RacD 活性

### 2.5.1. 乳酸菌粗抽出液における RacD 活性

WDN19 株における RacD 活性は DSM 20019 株よりも高いことが示唆されたため (Fig. 2-5), 両株の細胞粗抽出液中の RacD 活性を測定した (Table 2-3).

WDN19 株と DSM 20019 株を MRS 培地で培養し, 対数増殖期初期, 対数増殖期中期および定常期初期の菌体から粗抽出液を調製し, RacD 活性を測定したところ, 両株とも対数増殖期中期にかけて RacD 活性が上昇し, その後, 定常期初期にかけて RacD 比活性が低下した. すべての時点において, WDN19 株の RacD 活性は DSM 20019 株よりも高かったが, 特に対数増殖期初期では, WDN19 株の RacD 活性は DSM 20019 株よりも 12.9 倍も高かった. 一方, 両株の培養液上清からは RacD 活性は観察されなかった (Data not shown). このことから, WDN19 株細胞内の高い RacD 活性が WDN19 株の高 D-Asp 生産能の一因であることが分かった.

**Table 2-3. WDN19 株と DSM 20019 株の細胞粗抽出液における RacD 活性**

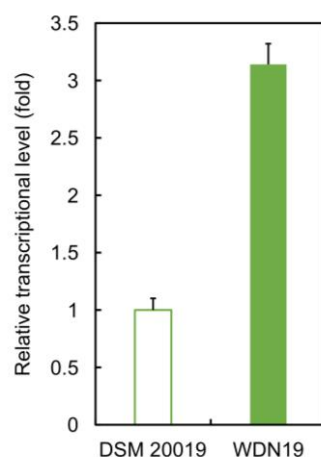
Growth phase	RacD activity (U/mg)	
	WDN19	DSM 20019
Early exponential phase	0.180 ± 0.003	0.014 ± 0.003
Middle exponential phase	0.353 ± 0.022	0.272 ± 0.036
Early stationary phase	0.115 ± 0.001	0.101 ± 0.002

乳酸菌は MRS 培地で 30°C で培養し, 対数増殖期初期 (WDN19 株,  $OD_{600} = \sim 0.7$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} = \sim 0.9$ ), 対数増殖期中期 (WDN19 株,  $OD_{600} = \sim 2.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} = \sim 2.5$ ) および定常期初期 (WDN19 株,  $OD_{600} = \sim 3.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} = \sim 4.0$ ) で回収した細胞から粗抽出液を調製した. RacD 活性は HPLC 法により測定した. 測定は 3 回行い, 各データは平均値と標準偏差を表す.

### 2.5.2 WDN19 株と DSM 20019 株における *racD* 遺伝子の転写量

対数増殖期初期の WDN19 株の粗抽出液中の RacD 活性は DSM 20019 株よりも 12.9 倍高く、*racD* 遺伝子の転写量が高いことが示唆されたことから (Table 2-3), 両株の対数増殖期初期における *racD* 遺伝子の転写量を比較した (Fig. 2-6).

WDN19 株の対数増殖期初期における *racD* 遺伝子の転写量は, DSM 20019 株と比較して 3.14 倍高かった (Fig. 2-6). しかし, 対数増殖期初期の RacD 活性で見られた 12.9 倍には届かないことから, WDN19 株では RacD 自体の活性も高い可能性が示唆された.



**Fig. 2-6. WDN19 株と DSM 20019 株の対数増殖期初期の *racD* 遺伝子転写量**

WDN19 株と DSM 20019 株の粗抽出液の対数増殖期初期における *racD* 遺伝子の転写量. MRS 培地で対数増殖期初期まで 30°C で培養した細胞を用いて, qRT-PCR を行った. 各バーは 3 回測定した平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す. 16S rRNA 遺伝子を対照遺伝子として使用した.

### 2.5.3. WDN19 株と DSM 20019 株の組換え RacD の分子活性

WDN19 株と DSM 20019 株の細胞粗抽出液における RacD 活性と、対数増殖期初期での *racD* 遺伝子の転写量から、WDN19 株の RacD 自身の分子活性が高い可能性が示唆された (Table 2-3, Fig. 2-6). WDN19 株と DSM 20019 株の RacD は 86.64% のアミノ酸配列同一性を有し、32 個のアミノ酸残基が異なる (Fig. 2-7). そこで、両者の RacD の分子活性を比較するため、WDN19 株と DSM 20019 株の *racD* 遺伝子を pET25b に導入した RacD 発現ベクターをそれぞれ作成し、*E. coli* NiCo21 (DE3) に導入して C 末端 His-tag 融合タンパク質として発現させ精製した (Fig. 2-8).

WDN_RacD	MEDMFTILGGMGTHATETFVHMIDELTPAEKDQDYLNYYVFNHATIPDRTAYILGNSTEN	60
DSM_RacD	MEEMFTILGGMGTAATETFVHLIDELTPAKKDQDYLNYYVFNHAEIPDRTAYILDNSQEN	60
WDN_RacD	PLLTMLKDVQQMNL LAPKFMIMTCNTAHYFYDELQAAADFDDIHMPPRETVMKMKKNIPGL	120
DSM_RacD	PLPVMLKDIRQMNL LAPKFMIMTCNTAHYFYDELQAAADFDDIHMPPRETVMKMQQTIPGL	120
WDN_RacD	KKIGVLSTTGTRQAGIYQKATENFGLESVVPNQETQDATMSLIYDDIKATGKFSHEKYKH	180
DSM_RacD	KKIGVLSTTGTRQAGIYQKATAAFGLESVVPDQTLQDATMSLIYDDIKATGTFSHDKYQK	180
WDN_RacD	IVDTMLNDYDCDAVILGCTELSVAQEEYPLYTEKVIDPMKVVSQNIVDGLYN-	232
DSM_RacD	IVDTMLNDYDCDAVILGCTELSVAQSEFPLYPDKVIDPMTVVGQNIVDGLYNK	233

Fig. 2-7. WDN19 株と DSM 20019 株の RacD のアミノ酸配列のアライメント

WDN19 株 (WDN\_RacD) と DSM 20019 株 (DSM\_RacD) のアライメントは T-COFFEE server (<http://tcoffee.crg.cat/>) により作成した。

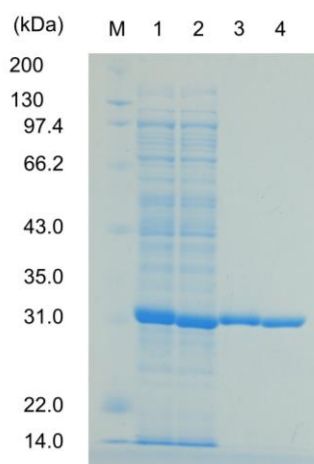
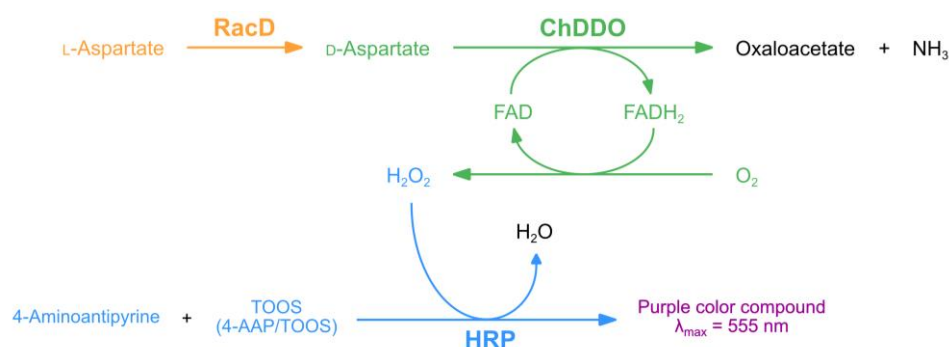


Fig. 2-8. 大腸菌で発現させた WDN19 株と DSM 20019 株 RacD の精製

タンパク質を 12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動し、Coomassie Brilliant Blue G-250 により染色した。細胞粗抽出液と精製タンパク質はタンパク量がそれぞれ 10  $\mu$ g と 2  $\mu$ g となるようにアプライした。Lane 1, マーカータンパク質; Lane 2, WDN19 株の RacD を発現させた大腸菌粗抽出液; Lane 3, DSM 20019 株の RacD を発現させた大腸菌粗抽出液; Lane 4, WDN19 株の精製 RacD; Lane 5, DSM 20019 株精製 RacD.

ラセマーゼの活性測定は HPLC を用いた方法が主に用いられている[154, 163, 164]. しかし, HPLC 法による活性測定は測定に要する時間が長く, 1 回に複数の試料を測定できない. また, 経時的に反応を追うことが難しいため, 測定中の反応速度が一定になっていることを確認することは困難である. 一方, 呈色反応による酵素法による活性測定は, 測定中の反応速度を分光光度計で確認できるため, 測定中の反応速度が一定になっていることが容易に確認でき, 一度に複数の測定が可能である. 当研究室では, D-Asp 特異的に作用する ChDDO が利用可能であるため, トリンダー呈色試薬を用いた HRP とのカップリング反応による RacD 活性測定法について検討した (Fig. 2-9).



**Fig. 2-9. ChDDO と HRP を使用した RacD 活性測定**

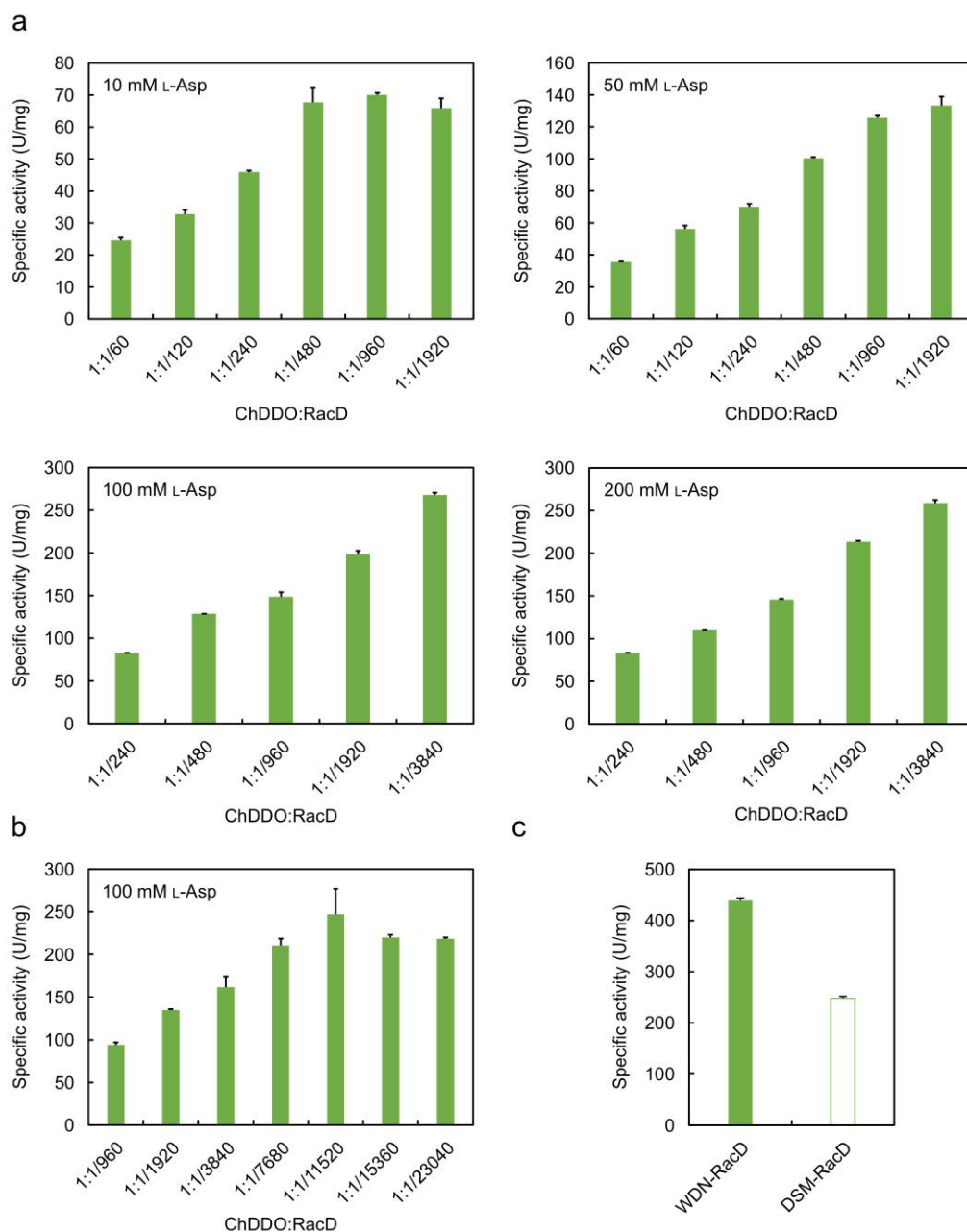
RacD の基質である L-Asp は RacD により D-Asp に変換される. 変換された D-Asp は, ChDDO により触媒される酸化的脱アミノ反応により, オキサロ酢酸, アンモニアと過酸化水素に分解される. HRP は過酸化水素を基質として 4-aminoantipyrine と TOOS の脱水縮合反応を触媒し, 結果として濃度依存的な紫の呈色が生ずる.

初めに, ChDDO が反応の律速とならないか検証するため, ChDDO と 10 – 200 mM D-Asp を反応させた. まず, RacD を含まない反応液において, 10 – 200 mM D-Asp を含む反応液に 5 U/ml-反応液になるように ChDDO を, 10 U/ml-反応液になるように HRP を添加したところ, 瞬時に吸光度 1 を超える呈色が観察された (Data not shown). このことから, 5 U/ml-反応液の ChDDO は 200 mM までの濃度の D-Asp を瞬時に代謝でき, 基質濃度が 10 – 200 mM L-Asp において, ChDDO は反応系の律速とならないと考えられた. 次に, 5 U/ml-反応液の ChDDO, 10 U/ml-反応液の HRP と 10 – 200 mM の L-Asp を含む反応液に様々な量の RacD を添加して反応させたところ, RacD の比活性は基質濃度が 10 mM から 100 mM に増加するにつれて上昇したが, 基質濃度が 100 mM と 200 mM ではほぼ同等の活性値が得られた (Fig. 2-10a). したがって, RacD の活性測定に用いる基質濃度を 100 mM とした.

100 mM L-Asp を基質として用いて, 反応系に添加する RacD の量を低下させると, RacD の比活性が増加した (Fig. 2-10b). そこで, さらに反応系に添加する RacD の量を低下させたところ, 反

応系に添加した ChDDO の質量に対する RacD の質量比 (ChDDO:RacD) が 1:1/960 から 1:1/3,840 までは RacD の比活性値が増加した。一方, ChDDO:RacD 質量比が 1:1/7,840 から 1:1/23,040 の間では約 210 U/mg と一定となった (Fig. 2-10b)。以上の結果から, 酵素法による RacD の酵素活性測定では基質濃度を 100 mM とし, ChDDO に対する RacD の質量比が 1:1/7,840 – 1:1/23,040 倍になるように添加することにした。

開発した RacD の酵素活性測定法を用いて, 精製した両株の RacD の酵素活性を測定したところ (Fig. 2-10c), WDN19 株と DSM 20019 株の RacD の比活性はそれぞれ  $439 \pm 5$  と  $247 \pm 5$  U/mg であり, WDN19 株 RacD の比活性は DSM 20019 株よりも 1.8 倍高かった。したがって, WDN19 株は DSM 20019 株に比べ, *racD* 遺伝子の転写量と RacD 自体の活性の両方が高いことで, 細胞内の RacD 活性が高いことが分かった。



**Fig. 2-10. 酵素法による RacD 酵素活性測定法の開発と WDN19 株と DSM 20019 株 RacD の分子活性**

10–200 mM L-Asp に対する RacD 添加量の影響解析 (a), 100 mM L-Asp における RacD 添加量の影響解析 (b) と WDN19 株と DSM 20019 株精製 RacD の分子活性 (c). (a, b) 横軸は反応液に含まれる 1.1 mg/ml または 1.7 mg/ml ChDDO に対する RacD 質量比を示す. RacD 活性は 5 U/ml ChDDO と 10 U/ml HRP を加えたカップリング法により測定した. 発色基質に TOOS と 4-AAP を使用し, 555 nm の吸光度を 30°C で 20 分間経時的に測定した. (c) 反応液における ChDDO に対する RacD の質量比が 1/7,840–1/23,040 倍となるように RacD を添加し, 酵素法で測定した. 各データは 3 回の測定の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す.

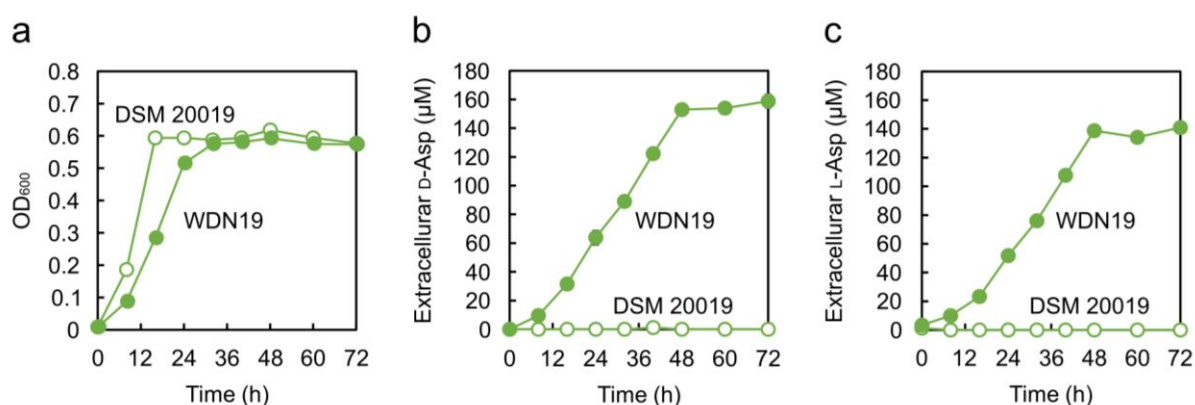


## 2.6. WDN19 株と DSM 20019 株における L-Asp 生産

### 2.6.1. 化学合成培地での L-Asp 生産

WDN19 株の MRS 培地における培養において D-Asp に加えて L-Asp も増加したことから, L-Asp の生合成が示唆された (Fig. 2-5b). WDN19 株が L-Asp を生産することを明らかにするため, L-Asp を含まない化学合成培地 (CDM) における, 培養液上清の D, L-Asp 生産を測定した.

CDM を用いた培養では, WDN19 株の生育速度は DSM 20019 株よりも遅かったが, 最終的な生育は同程度であった (Fig. 2-11a). 一方, 有意な D-Asp 生産は WDN19 株においてのみ観察され, 培養 72 時間後の培養液上清の D-Asp は  $195\ \mu\text{M}$  であった (Fig. 2-11b). また, L-Asp も WDN19 株でのみ観察され, 72 時間後の培養液上清の L-Asp は D-Asp と同等の  $187\ \mu\text{M}$  であった (Fig. 2-11c). 以上の結果より, WDN19 株は DSM 20019 株よりも高い L-Asp 生合成能を有していること, WDN19 株の MRS 培地培養液に観察された D-Asp の一部は生合成された L-Asp から生産されたことが分かった.



**Fig. 2-11. 化学合成培地における WDN19 株と DSM 20019 株の生育と細胞外 D,L-Asp 生産**

CDM 培地中で  $30^{\circ}\text{C}$  で培養したときの WDN19 (●) と DSM 20019 株 (○) の生育 (a), 培養液上清の D-Asp 濃度 (b) と L-Asp 濃度 (c). 各プロットは 3 回の測定の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す.



### 2.6.2. L-Asp 生合成

WDN19 株と DSM 20019 株の CDM における D,L-Asp 生産量の違いから、WDN19 株の L-Asp 生産能は DSM 20019 株よりも高いことが示唆された (Fig. 2-11). 乳酸菌において L-Asp は、アスパルターゼ (AspA) によりフマル酸とアンモニアから、L-アスパラギナーゼ (AnsA) により L-Asn から、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC) によりオキサロ酢酸と L-Glu から生合成される (Fig. 2-12). これら遺伝子のうち、両株に *aspA* 遺伝子は見出されなかったことから、WDN19 株と DSM 20019 株では AnsA と AspC により L-Asp が生合成されることが考えられた. しかし、WDN19 株では *aspC* 遺伝子がトランスポゾン挿入により破壊されていることから (Fig. 2-2), WDN19 株では AnsA により L-Asp が生合成されることが考えられた. そこで、L-Glu もしくは L-Asn を CDM に添加して、両株の D,L-Asp 生産に与える影響を解析した (Table 2-4).

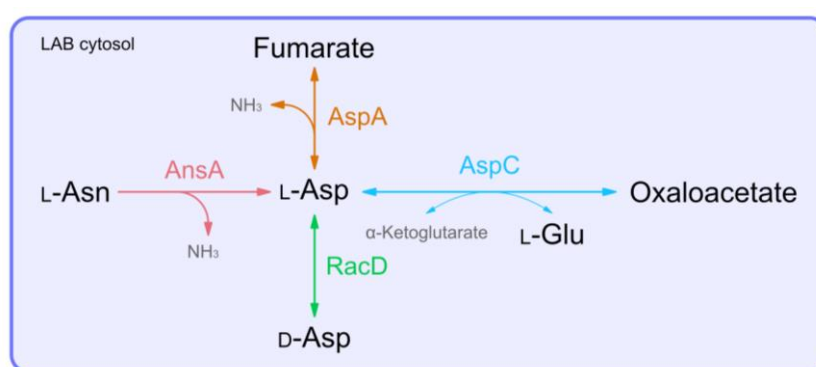


Fig. 2-12. 乳酸菌における L-Asp 生合成経路

乳酸菌における L-Asp の生産経路を示す. L-Asp は L-アスパラギナーゼ (AnsA) により L-Asn から、アスパルターゼ (AspA) によりフマル酸から、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC) によってオキサロ酢酸と L-Glu から生産される.

初めに、342  $\mu$ M の L-Glu を含む CDM に 1 mM と 10 mM の L-Glu をさらに添加し、両株の D,L-Asp 生産に与える影響を観察したところ、DSM 20019 株の培養液には、未添加の場合と同様、D, L-Asp とともに検出されなかった. 一方、WDN19 株の培養液には D, L-Asp とともに検出されたが、その濃度は未添加の場合よりも減少し、添加した L-Glu の濃度に応じて減少量が増加した. この減少の理由として、L-Glu 添加による生育の低下に加えて、L-Asp 生産能の低下が原因と考えられた. 次に、378  $\mu$ M の L-Asn を含む CDM に 1 mM と 10 mM の L-Asn をさらに添加し、両株の D,L-Asp 生産に与える影響を観察したところ、DSM 20019 株において、10 mM L-Asn の添加によって D, L-Asp の両方が検出され、L 体が D 体の約 2 倍の濃度で検出された. 一方、WDN19 株では、L-Asn の添加により生育は大きく低下するものの、1 mM と 10 mM L-Asn の添加によって、D, L-Asp

は、未添加の場合の、それぞれ約 2 倍と 4 倍に増加した。結果として、10 mM L-Asn の添加によって D, L-Asp の生産能はともに約 4 倍に増加した。以上の結果より、WDN19 株と DSM 20019 株において L-Asp は主に L-Asn から生産されることが明らかとなった。また、WDN19 株の L-Asn から L-Asp への変換能は DSM 20019 株よりも非常に高いと考えられた。

**Table 2-4. L-Asp 生合成前駆体の培養液添加が WDN19 株と DSM 20019 株の D,L-Asp 生産に与える影響**

		Asp productivity <sup>a</sup>			D/(D+L)%
	OD <sub>600</sub>	(μM OD <sub>600</sub> <sup>-1</sup> )			
		D-Asp	L-Asp	Total Asp	
DSM 20019					
No addition	0.542 ± 0.013	— <sup>b</sup>	—	—	—
1 mM L-Asn	0.841 ± 0.016	—	7 ± 3	7 ± 3	0
10 mM L-Asn	0.895 ± 0.003	12 ± 0	20 ± 3	31 ± 3	37 ± 3
1 mM L-Glu	0.606 ± 0.009	—	—	—	—
10 mM L-Glu	0.717 ± 0.003	—	—	—	—
WDN19					
No addition	0.348 ± 0.005	416 ± 2	516 ± 11	931 ± 13	45 ± 0
1 mM L-Asn	0.323 ± 0.006	733 ± 2	910 ± 5	1,643 ± 6	45 ± 0
10 mM L-Asn	0.200 ± 0.006	1,680 ± 10	2,100 ± 32	3,770 ± 26	44 ± 1
1 mM L-Glu	0.271 ± 0.001	239 ± 2	287 ± 4	526 ± 6	46 ± 0
10 mM L-Glu	0.280 ± 0.002	173 ± 5	210 ± 11	383 ± 15	45 ± 1

1 mM または 10 mM の各アミノ酸を添加した CDM で 30°C で 48 時間培養した。No addition の CDM には L-Glu と L-Asn がそれぞれ 342 μM と 378 μM（ともに 50 mg/l）含まれている。3 回測定した平均値と標準偏差を示す。

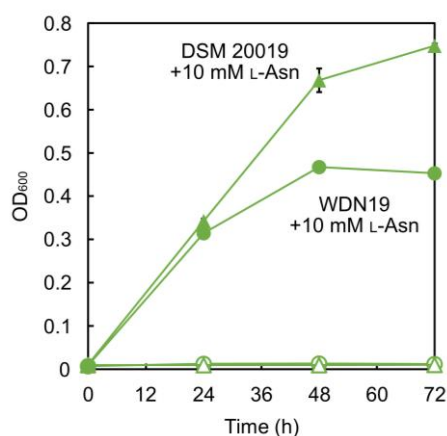
<sup>a</sup> Asp 生産能は Asp 濃度を OD<sub>600</sub> で除して算出した。

<sup>b</sup> not detected または算出不能を表す。

### 2.6.3. L-Asn 生合成と取り込み能

WDN19 株と DSM 20019 株において、L-Asn が L-Asp 生合成前駆体となることが明らかになったことから (Table 2-4), 次に, L-Asn の生合成の有無 (栄養要求性) について調査した (Fig. 2-13).

両株を L-Asn を含まない CDM で培養したところ, 生育することができなかった. 一方, CDM に 10 mM L-Asn を添加すると両株は良好に生育した. このことから, 両株は L-Asn を生合成できず, 培地に含まれる L-Asn を細胞内に取り込んで, 細胞質で AnsA により L-Asp に変換して生育に利用していると考えられた.

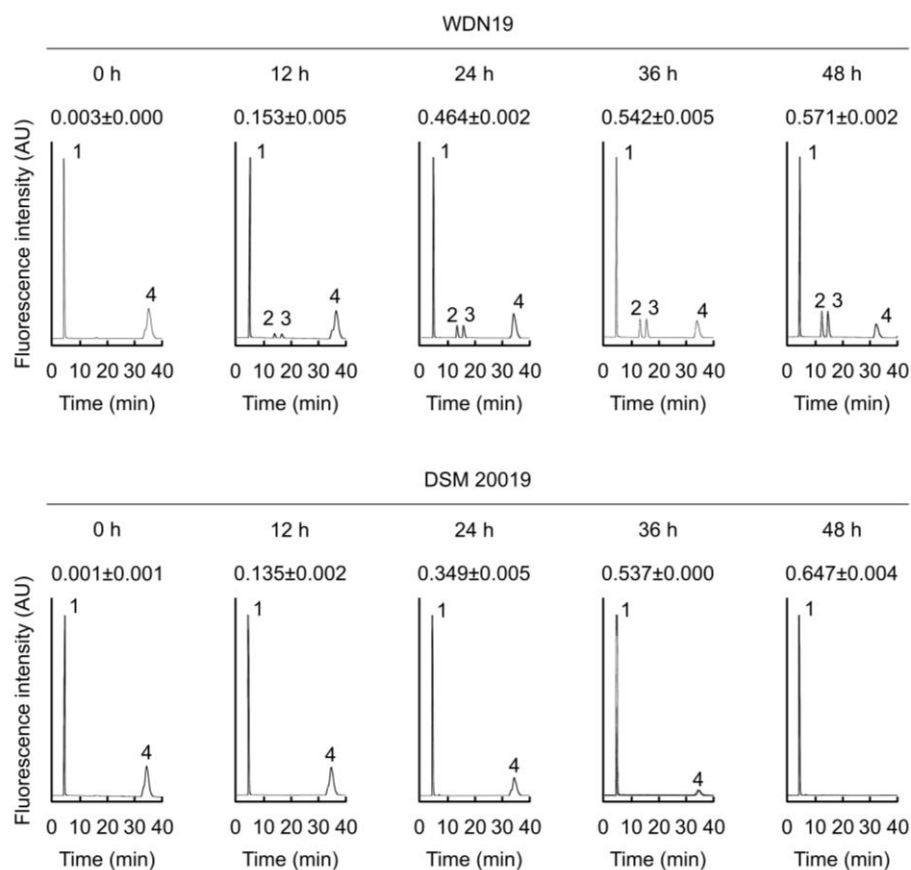


**Fig. 2-13. WDN19 株と DSM 20019 株の L-Asn 栄養要求性**

WDN19 株 (●) と DSM 20019 株 (▲) を 10 mM L-Asn を含む (●, ▲), または含まない CDM (○, △) で 30°C で培養したときの生育を示す. 各 CDM には窒素源として 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加した. 各プロットは 3 回測定した平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す. 丸と三角はそれぞれ WDN19 株と DSM 20019 株を表す.

WDN19 株と DSM 20019 株において, 培地中の L-Asn が AnsA による L-Asp 生合成の前駆体になることが分かったため (Table 2-4), L-Asn の細胞内への取り込みが両株の L-Asp 生産能に影響を与える可能性が考えられた. そこで, 両株による L-Asn の細胞内取り込み能を解析した (Fig. 2-14).

両株を 1 mM L-Asn を添加した CDM 培地で 48 時間培養し, 細胞液上清の L-Asn 濃度を解析したところ, DSM 20019 株では培養開始時に見られた L-Asn のピークが消失した. 一方, WDN19 株では L-Asn のピークがわずかに見られたがほとんど消失し, D-Asp と L-Asp のピークが新たに出現した. このことから, WDN19 株と DSM 20019 株の L-Asn の取り込み能に大きな違いはなく, WDN19 株の高い L-Asp 生産能は, WDN19 株の L-Asn 取り込み能が高いことに起因しないことが明らかとなった.



**Fig. 2-14. WDN19 株と DSM 20019 株の培養液の L-Asn 取り込み能**

1 mM L-Asn を添加した CDM で 30℃ で 0–48 時間培養した培養液上清のクロマトグラム. 各図の上部の数値は OD<sub>600</sub> 値を表し, 3 回測定した平均値と標準偏差を表す. Peak 1, L-システイン酸; peak 2, D-Asp; peak 3, L-Asp; peak 4, L-Asn+L-Ser.

#### 2.6.4. AnsA 活性

培地への多量の L-Asn 添加により, L-Asp の大幅な生産増加が WDN19 株のみで観察されたが, ①両株において培地の L-Asn が細胞内に取り込まれて主に AnsA により L-Asp が生産されること (Table 2-4), ②両株において L-Asn が生合成されないこと (Fig. 2-13), ③両株の L-Asn の取り込み能に大きな違いがないことが示された (Fig. 2-14). したがって, WDN19 株における AnsA 活性が WDN19 株よりも高い可能性が考えられた. そこで, 両株の細胞粗抽出液における AnsA 活性を測定した (Table 2-5).

WDN19 株と DSM 20019 株の細胞粗抽出液における AnsA 活性は生育に伴って増加した. 対数増殖期初期では, 両株の AnsA 活性に差は見られなかったが, 対数増殖期中期と定常期初期では, WDN19 株の AnsA 活性は DSM 20019 株よりもそれぞれ 2.1 と 3.2 倍高く, WDN19 株の AnsA 活性が高いことが示された.

**Table 2-5. WDN19 株と DSM 20019 株の細胞粗抽出液における AnsA 活性**

Growth phase	AnsA activity (mU/mg)	
	WDN19	DSM 20019
Early exponential phase	0.154 ± 0.001	0.150 ± 0.001
Middle exponential phase	0.389 ± 0.046	0.183 ± 0.005
Early stationary phase	0.616 ± 0.106	0.192 ± 0.006

乳酸菌は MRS 培地で 30°C で培養し, 対数増殖期初期 (WDN19 株, OD<sub>600</sub> = ~0.7; DSM 20019 株, OD<sub>600</sub> = ~0.9), 対数増殖期中期 (WDN19 株, OD<sub>600</sub> = ~2.0; DSM 20019 株, OD<sub>600</sub> = ~2.5) および定常期初期 (WDN19 株, OD<sub>600</sub> = ~3.0; DSM 20019 株, OD<sub>600</sub> = ~4.0) で回収した細胞から粗抽出液を調製した. AnsA 活性は Asparaginase Activity Assay Kit により測定した. 各データは 3 回測定した平均値と標準偏差を表す.

## 2.7. 細胞内 Asp 濃度

DSM 20019 株の MRS 培地における培養において L-Asp の分解が示唆された (Fig. 2-5c). また, WDN19 株では, L-Asp の L-Glu とオキサロ酢酸への変換を担う *acpC* 遺伝子がトランスポゾン挿入により破壊されていた (Fig. 2-2). これらの観察結果から, WDN19 株の高い D-Asp 生産能の一因として, WDN19 株における RacD への L-Asp の高い供給量が考えられた. そこで, 両株の細胞内の D, L-Asp 含有量を測定した.

測定の結果, WDN19 株の細胞内 D-Asp と L-Asp 濃度はそれぞれ 28.7 と 36.8 nmol/mg-protein であった. 一方, DSM 20019 株では, それぞれ 4.1 と 9.4 nmol/mg protein であった. したがって, DSM 20019 株では, L-Asp の D-Asp 以外への化合物への代謝が WDN19 株よりも高いと考えられ (主に AspC による L-Asp のオキサロ酢酸への代謝), WDN19 株の高い D-Asp 生産能の一因として, WDN19 株における RacD への L-Asp の高い供給量が示唆された.

### 3. 考察

これまでに、乳酸菌の D-Asp 高生産機構に関する知見は乏しく、D-Asp 生産能に影響を与える因子は不明である。さらに、WDN19 株に近縁な 3 種のうち *Lt. sakei* のみ培地中の D-Asp 濃度が測定されているが、他の 2 乳酸菌種の D-Asp 生産能が不明であった。そこで、WDN19 株の詳細な同定を行い、WDN19 株で観察された D-Asp 高生産能が近縁種に共通する性質か調べるとともに、D-Asp 高生産能に寄与する因子について解析した。

#### 3.1. WDN19 株と DSM 20019 株の D-Asp 生産量

WDN19 株は分子系統学的解析と生化学的解析から *Lt. curvatus* と考えられたが、*Lt. curvatus* の基準株である DSM 20019 株の D-Asp 生産能は WDN19 株よりも非常に低かったことから、WDN19 株の高い D-Asp 生産能は *Lt. curvatus* に共通した特性ではなく、WDN19 株の固有の特性であると考えられた。*Lt. curvatus* と同属である *Lt. sakei* DSM 20017 株の、MRS 培地における D-Asp の最大濃度は 270  $\mu$ M であり、DSM 20019 株の定常期での値よりは大きいものの、WDN19 株よりはかなり低かった (Table 2-6)。また、DSM 20019 株が生産した 130  $\mu$ M 程度の D-Asp は、*Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 株、*Lentilactobacillus kisonensis* DSM 19906 株や *Lent. otakinensis* DSM 19908 株の定常期初期における値と同等であった (Table 2-6)。このことから、*Lt. curvatus* を含む多くの乳酸菌の MRS 培地における D-Asp 細胞外生産濃度は 130  $\mu$ M 程度であることが分かった。

**Table 2-6. D-Asp 生産乳酸菌の MRS 培地培養液における D-Asp 生産量**

Strains	D-Asp production ( $\mu$ M)	Reference
WDN19	927	This work
<i>Latilactobacillus curvatus</i> DSM 20019	131	This work
<i>Lt. sakei</i> DSM 20017	270	[79]
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	225	[42]
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016	150	[42]
<i>Lentilactobacillus kisonensis</i> DSM 19906	120	[42]
<i>Lent. otakinensis</i> DSM 19908	129	[42]
<i>Lent. rapi</i> DSM 19907	110	[42]
<i>Levilactobacillus brevis</i> JCM 1170	317	[42]
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> DSM 20555	118	[42]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20481	75	[42]

すべて MRS 培地で培養された。引用文献[79]は最大濃度を示し、引用文献[42]は定常期初期の濃度を示す。

### 3.2. WDN19 株と DSM 20019 株 RacD の構造比較

WDN19 株と DSM 20019 株の RacD (それぞれ WDN\_RacD と DSM\_RacD) の分子活性は、WDN\_RacD の方が 1.8 倍高かったが、現在のところ、RacD の活性に影響を及ぼす構造的知見は全くない。結晶構造が明らかとなっている古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 株のアスパラギン酸ラセマーゼ (Ph\_AspR) と両株の RacD のアミノ酸配列を比較したところ、Ph\_AspR の触媒残基と基質結合に関わるアミノ酸残基は両株の RacD で保存されていた (Fig. 2-15a)。WDN\_RacD と DSM\_RacD の三次元構造モデルを作成し、触媒残基の位置を観察したところ (Fig. 2-15b)、Ph\_AspR の活性部位に存在する Lys164 とこれに対応する WDN\_RacD と DSM\_RacD の Lys168 の側鎖の向きが多少異なっていたが、活性部位を構成するアミノ酸残基の位置に大きな違いは観察されなかった。このことから、活性部位におけるアミノ酸残基の相違が WDN\_RacD の高活性の直接的な原因でないことが分かった。

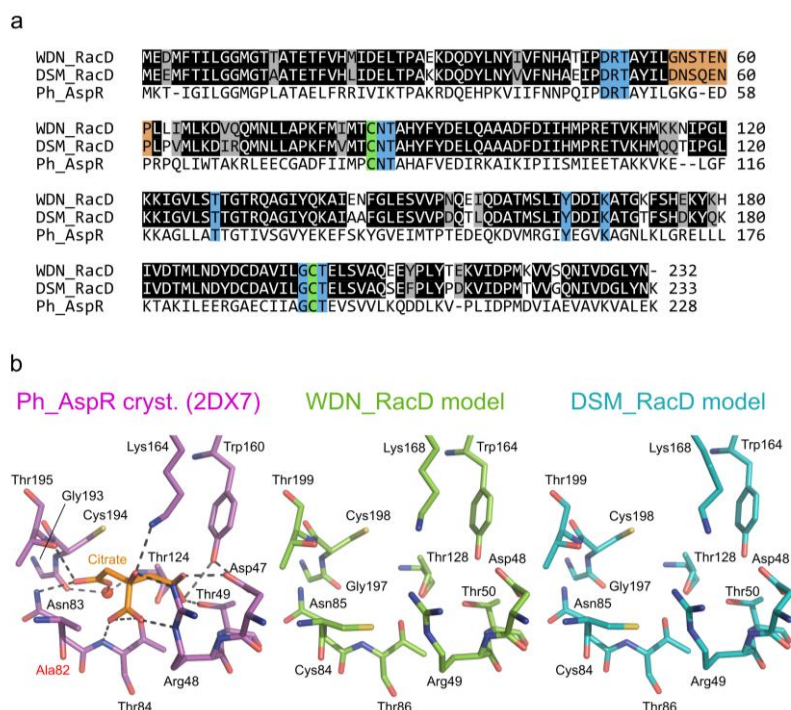
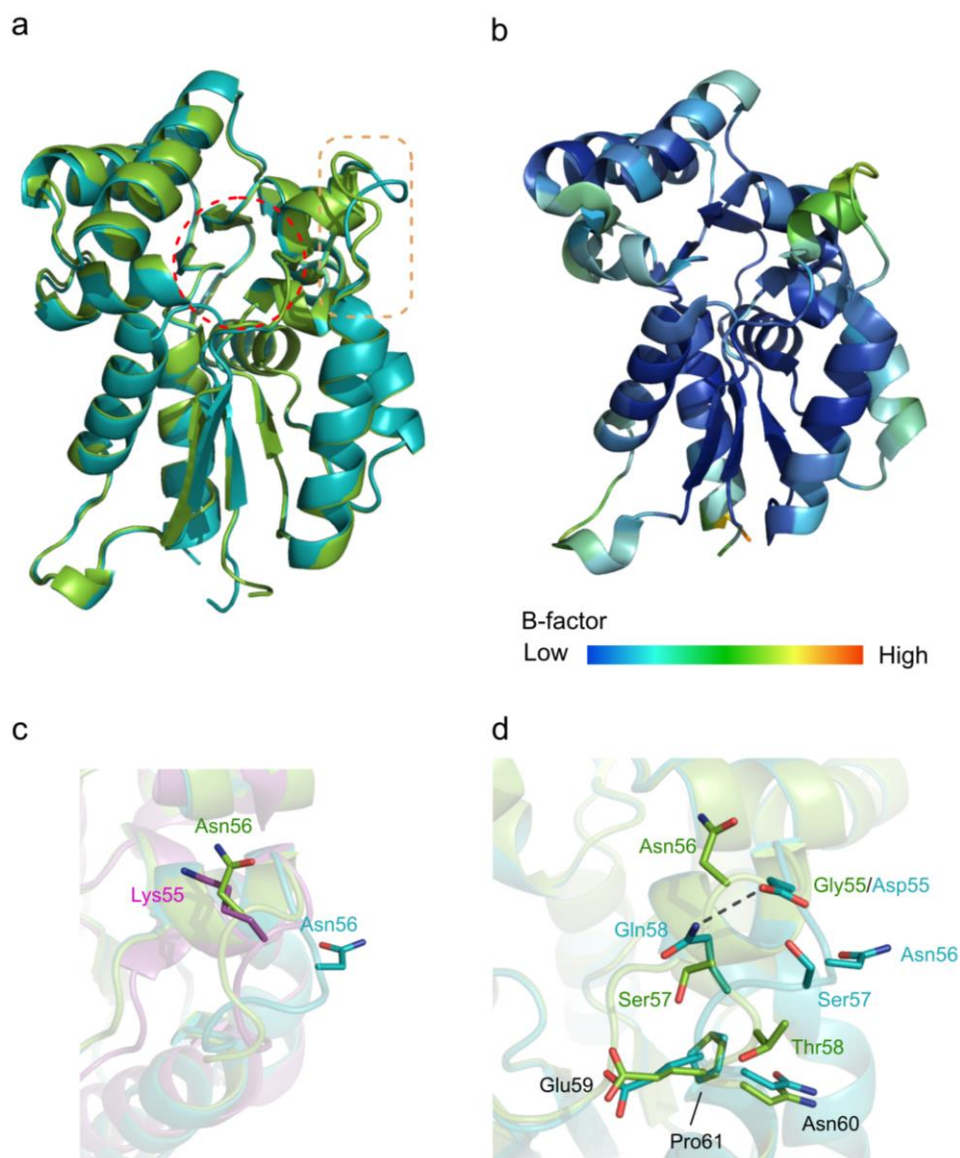


Fig. 2-15. Ph\_AspR, WDN\_RacD と DSM\_RacD の活性部位構造の比較

Ph\_AspR, WDN\_RacD と DSM\_RacD のアミノ酸配列アライメント (a) と、WDN19 株と DSM 20019 株 RacD の三次元構造モデルと Ph\_AspR 結晶構造 (PDB entry, 1JFL) の活性部位構造 (b)。(a) アライメントは T-COFFEE server (<http://tcoffee.crg.cat/>) により作成した。アミノ酸残基の色: 緑, 触媒残基である 2 つの Cys 残基; 青, 基質結合に関わる残基; オレンジ, モデル構造が大きく異なるループ領域。Accession number: WDN\_RacD, WP\_221276754; DSM\_RacD, WP\_039098320; Ph\_AspR, WP\_010884762。(b) Ph\_AspR は、82 番目の Cys 残基を Ala 残基に置換しクエン酸を結合させてある。WDN19 株と DSM2 0019 株の RacD のモデル構造は AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) により構築した。配色: 緑, WDN\_RacD; シアン, DSM\_RacD; マゼンタ, Ph\_AspR。スティックの配色: 青, 窒素原子; 赤, 酸素原子; 黄色, 硫黄原子。



次に、WDN\_RacD と DSM\_RacD のモデル構造全体を重ね合わせたところ、そのほとんどで一致したが、55–61 番目のアミノ酸残基により構成されるループ構造が大きく異なっていた (Fig. 2-16a). Ph\_AspR の結晶構造におけるこのループの B-factor は他の部分よりも高く、動きやすいと考えられる (Fig. 2-16b). また、このループは活性部位上部に位置することから、このループ構造の違いが活性に影響を与えている可能性が考えられた. WDN\_RacD と DSM\_RacD において、これらループを形成する 6 個のアミノ酸残基のうち 2 個のアミノ酸残基が異なっていた (Fig. 2-15a). すなわち、55 番目のアミノ酸残基が、WDN\_RacD と DSM\_RacD ではそれぞれ Gly55 と Asp55 であり、58 番目のアミノ酸残基が、WDN\_RacD と DSM\_RacD ではそれぞれ Thr58 と Gln58 であった. この違いにより、WDN\_RacD の Asn56 は、Ph\_AspR の Lys55 と同様、活性部位側に配向するが、DSM\_RacD の Asn56 は活性部位の外側に配向すると考えられた (Fig. 2-16c). また、DSM\_RacD では Asp55 側鎖と Gln58 側鎖が静電的に相互作用することでループが活性部位の反対側に配向するが、WDN\_RacD では一次構造上においてそれぞれ対応する位置に Gly55 と Thr58 が存在することで Ser57 が Glu59 と相互作用し、ループが活性部位側に配向すると考えられた (Fig. 2-16d). したがって、両 RacD における 55 番目と 58 番目のアミノ酸残基の相違がループ構造の違いを生み、これにより WDN\_RacD と DSM\_RacD の活性に違いが生じたと考えられた. 今後、部位特異的変異導入実験などでこのループ構造が RacD 活性に与える影響を解析していく必要がある.



**Fig. 2-16. Ph\_AspR, WDN\_RacD と DSM\_RacD の活性部位構造の比較**

WDN\_RacD と DSM\_RacD の三次元構造モデルの重ね合わせ (a), Ph\_AspR の B-factor (b), WDN\_RacD と DSM\_RacD の三次元構造モデルと Ph\_AspR の結晶構造 (PDB entry, 1JFL) の活性部位近傍のループ構造の比較 (c) と WDN\_RacD と DSM\_RacD の三次元構造モデルにおけるループ形成アミノ酸残基の比較 (d). (a) 赤点線領域は活性部位をオレンジ点線領域は構造が異なるループを示す. (b) 青から赤になるにつれて B-factor が高くなることを表す. WDN19\_RacD と DSM\_RacD のモデル構造は AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) により作成した. 構造の重ね合わせと B-factor の配色は PyMOL ver 2.4 (<https://pymol.org>) を使用した. リボン配色: 緑, WDN\_RacD; シアン, DSM\_RacD; マゼンタ, Ph\_AspR. スティックの配色: 青, 窒素原子; 赤, 酸素原子.

### 3.3. WDN19 株と DSM 20019 株における RacD と AnsA 活性の相違

WDN19 株では DSM 20019 株よりも RacD 分子活性に加え, *racD* 遺伝子の転写量も高かった. 両株のゲノム配列における *racD* 遺伝子周辺の遺伝子配置は同じであり, 上流にはアスパラギン酸-tRNA リガーゼ遺伝子 (*aspS*) が下流には D-アスパラギン酸リガーゼ遺伝子 (*aslA*) が存在した (Fig. 2-2). 両株の *aspS* と *racD* 遺伝子の間の領域の塩基配列は, 遺伝子どうしの塩基配列と比較して相同性が低く (Fig. 2-17), DSM 20019 株のこの領域の GC が WDN19 株では AT に置換されている割合が高かった. この置換により, WDN19 株の *racD* 遺伝子上流に -10 と -35 配列の存在が予測プログラムの解析から推定された (Fig. 2-17). したがって, WDN19 株では, *aspS* 遺伝子上流のプロモーターに加えて, *racD* 遺伝子上流に新たなプロモーター領域が出現したことによって, *racD* 遺伝子の転写量が DSM 20019 株よりも高い可能性が考えられた. グラム陽性細菌における *racD* 遺伝子の発現制御についての報告は全くないが, グラム陰性細菌の *Vibrio fischeri* では, C4-ジカルボン酸トランスポーター遺伝子と *racD* 遺伝子から構成される推定のオペロン領域上流に, LysR-type transcriptional regulator (LTTR) 結合部位が見出されており, LTTR である DarR が外部の D-Asp の存在に応答して *racD* 遺伝子の転写を活性化させることが報告されている[93]. また, グラム陰性 Proteobacteria では, DarR ホモログが Asp 代謝に関連する遺伝子の近傍に存在していることが報告されている[93]. WDN19 株と DSM 20019 株のゲノム配列において, DarR ホモログは見出されず, LTTR 結合部位も *aspS* と *racD* 遺伝子上流に見出されなかったことから, グラム陰性細菌とグラム陽性細菌では *racD* 遺伝子の発現制御に違いが存在する可能性が考えられる. 今後, WDN19 株の *racD* 遺伝子の発現制御機構を解析することで, 新たな知見が得られると期待される.

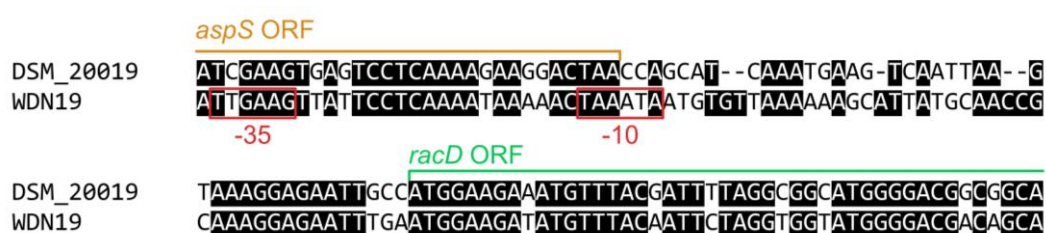
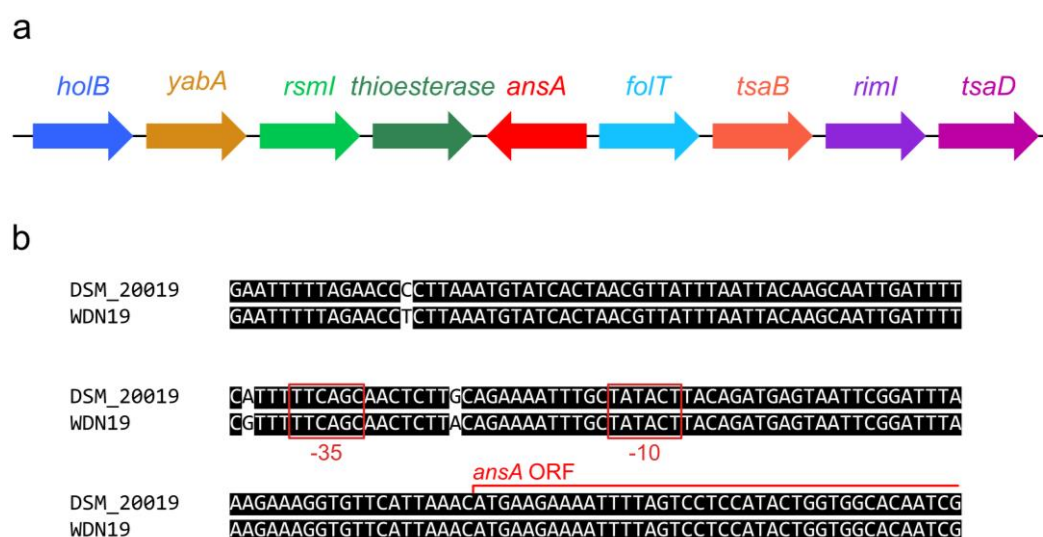


Fig. 2-17. WDN19 株と DSM 20019 株における *racD* 遺伝子上流の塩基配列

BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) によって予測された -10 と -35 配列は赤で囲った. アライメントは T-COFFEE server (<http://tcoffee.crg.cat/>) により作成した. 遺伝子名: *aspS*, アスパラギン酸-tRNA リガーゼ; *racD*, アスパラギン酸ラセマーゼ.

対数増殖期初期において、WDN19 株の *AsnA* 活性は DSM 20019 株と同程度であったが、生育とともに DSM 20019 株よりも高くなっていった。しかし、両株の *AnsA* のアミノ酸配列や *ansA* 遺伝子近傍の遺伝子配置は同じであり、*ansA* 遺伝子上流の塩基配列も高度に保存され、同位置に推定の -10 と -35 配列が存在していた (Fig. 2-18)。したがって、*AnsA* 活性に違いを生む要因についてはさらなる研究が必要である。



**Fig. 2-18. WDN19 株と DSM 20019 株における *ansA* 遺伝子周辺の遺伝子配置と上流配列**

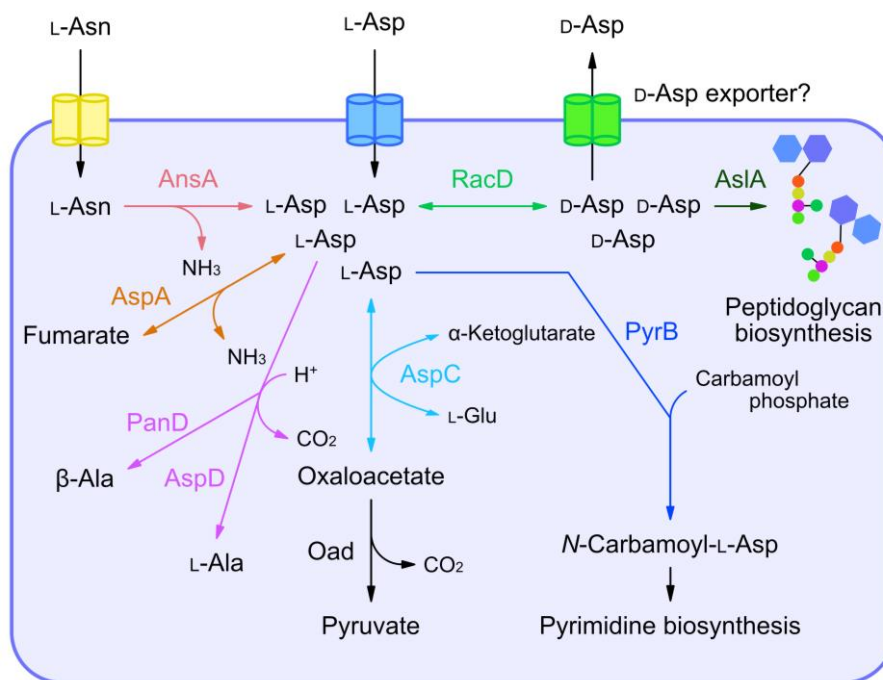
WDN19 株と DSM 20019 株における、*ansA* 遺伝子近傍の遺伝子座 (a) と *ansA* 遺伝子上流の塩基配列 (b)。 (b) BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) によって予測された推定の -10 と -35 配列は赤で囲った。 アライメントは T-COFFEE server (<http://tcoffee.crg.cat/>) により作成した。 遺伝子名: *holB*, DNA ポリメラーゼ III サブユニット  $\delta$ ; *yabA*, 複製開始調整タンパク質; *rsmI*, リボソーム RNA スモールサブユニットメチルトランスフェラーゼ; *ansA*, アスパラギナーゼ; *folT*, 葉酸トランスポーター; *tsaB*, tRNA スレオニルカルバモイルアデノシン生合成タンパク質; *rimI*, *gmu* オペロンレプレッサー (リボソームタンパク質 S18) -アラニン *N*-アセチルトランスフェラーゼ; *tsaD*, *N*<sup>6</sup>-アデノシンスレオニルカルバモイルトランスフェラーゼ。

### 3.4. WDN19 株と DSM 20019 株における L-Asp 生産能の相違

D-Asp は RacD によって L-Asp から生産されるため、L-Asp 生産能も D-Asp 生産能に大きく影響すると考えられる。乳酸菌において L-Asp を代謝する酵素には AspA, AspC, アスパラギン酸-1-デカルボキシラーゼまたはアスパラギン酸-4-デカルボキシラーゼ（それぞれ PanD と AspD）とアスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ（PyrB）がある（Fig. 2-19）[133]。これらのうち、WDN19 株と DSM 20019 株には、*aspC* と *pyrB* 遺伝子が存在した。しかし、WDN19 株の *aspC* 遺伝子はトランスポサナーゼ遺伝子の挿入により破壊されていたことから（Fig. 2-2）、WDN19 株における L-Asp 代謝能は DSM 20019 株よりも低いと考えられた。

WDN19 株において L-Glu の添加は L-Asp の生産能を低下させたが、D/(D+L)%に影響を与えなかったことから、L-Glu の添加は RacD 活性には影響を与えず、L-Asn の取り込みまたは AnsA 活性に影響を及ぼした可能性が考えられた。グラム陽性菌において、L-Asn は L-Glu または L-Gln の取り込みに必須の GlnPQ トランスポーターによって輸送されることが報告されている[165, 166]。また、*Bacillus* sp.において、L-Glu は細胞内の AnsA 活性に影響を与えないことが報告されている[167, 168]。これらの知見から、多量の L-Glu の添加は L-Asn の細胞内輸送を競合的に阻害し、WDN19 株の D, L-Asp 生産能を低下させたと考えられた。

培養液への L-Asn と L-Glu の添加は DSM 20019 株の生育を増加させたが、WDN19 株の生育は逆に抑制した。これらのアミノ酸は細胞壁構成要素である D-Glu や D-Asp の供給源となり、さらに DSM 20019 株では AspC が存在するため、生体にとって重要なオキサロ酢酸、ピルビン酸や  $\alpha$ -ケトグルタル酸などの供給源にもなりうる。したがって、L-Asn と L-Glu の添加により生育に有用な物質が供給されたことで、DSM 20019 株の生育が増加したと考えられる。一方、L-Asn と L-Glu の添加は WDN19 株の生育にも有用な効果を及ぼすと考えられるが、逆に阻害する結果となった。この原因として *acpC* 遺伝子の破壊が関与する可能性が考えられるが、現在のところその詳細は不明であり、今後の解析が必用と考えられる。



**Fig. 2-19. 乳酸菌における L-Asp 代謝**

細胞内に取り込まれた L-Asn はアスパラギナーゼ (AnsA) によって L-Asp へ代謝される。L-Asp はアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) によって変換される、もしくは、アスパルターゼ (AspA) によってフマル酸とアンモニアに、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspC) によってオキサロ酢酸と L-Glu に、アスパラギン酸-1-または-4-デカルボキシラーゼ (それぞれ PanD と AspD) によって、それぞれ β-Ala と L-Ala に、または、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ (PyrB) によって N-カルバモイル-L-アスパラギン酸に代謝され、ピリミジン合成に使用される。AspC により L-Asp から変換されたオキサロ酢酸はさらに、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (Oad) によってピルビン酸に代謝される。図は[133-135]を基に作成した。

### 3.5. WDN19 株における D-Asp 高生産の生理的意義

WDN19 株の D-Asp 生産量は、DSM 20019 株だけでなく、他の D-Asp 生産乳酸菌の生産量を大きく上回っていたことから (Table 2-6)、乳酸菌の生育に必要な量以上の D-Asp を生産していると考えられる。高濃度の D-Asp は細菌のタンパク質合成を阻害することが報告されていることから、WDN19 株は生育環境で生存競争に打ち勝つために D-Asp を多量に生産している可能性が考えられる[19, 20, 169].

*Lc. lactis* において、L-Asp は D-Asp に変換されて細胞壁 PG 合成に利用されるだけでなく、ピリミジン生合成やタンパク質生合成にも使用される[170]。したがって、ピリミジン生合成やタンパク質生合成の代謝が増加すると PG への D-Asp 供給量が減少し、PG の厚さと固さが低下する[170]。対数増殖期では、ピリミジン生合成やタンパク質生合成が活発であることから細胞壁が柔らかくなり、細胞増殖や分裂が行いやすくなる。一方、定常期ではこれら生合成が低下することから、細胞壁が厚く固くなる。*Lc. lactis* では、細胞壁合成に関わる遺伝子発現を制御するのではなく、このような L-Asp の可用性によるシンプルな方法により細胞壁の可塑性を制御していると考えられている[170]。*Lt. curvatus* の *racD* 遺伝子の近傍には、推定のヌクレオシドパーミターゼ(*nupG*)、アスパラギン酸-tRNA リガーゼ (*aspS*)、*aspC* や D-アスパラギン酸リガーゼ (*aslA*) が存在しており (Fig. 2-19)、なおかつ *pyrB* 遺伝子も存在することから、*Lc. lactis* において示唆された L-Asp の可用性による細胞壁可塑性の制御機構が存在している可能性がある。WDN19 株は、他の乳酸菌よりも L-Asp や D-Asp の供給量が高いと考えられるため、他の乳酸菌と競合する環境では、優位に増殖できるかもしれない。

## 4. 材料と方法

### 試薬

D-Asp は田辺三菱製薬 (Osaka, Japan) から寄贈されたものを用いた. 西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. *N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリンナトリウム塩 (TOOS) は同仁堂 (Kumamoto, Japan) から購入した. 試薬は特記しない場合, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan), ナカライテスク (Kyoto, Japan), または Bio-Rad (Hercules, CA, USA) から購入した. De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) は Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入した. オリゴヌクレオチドは Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) または Integrated DNA Technology (Coralville, AI, USA) から購入した.

### 使用菌株と培地

WDN19 株は D-Asp 高生産乳酸菌として第一章で単離した株を用いた. *Lactobacillus curvatus* DSM 20019 株は独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) から入手した. WDN19 株と DSM 20019 株の培養には de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 培地 (10 g/l プロテオースペプトン No. 3, 10 g/l 肉エキス, 5 g/l 酵母エキス, 20 g/l デキストロース, 1 g/l ポリソルベート 80, 2 g/l クエン酸アンモニウム, 5 g/l 酢酸ナトリウム, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l MnSO<sub>4</sub>, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5) または L-Asp を含まない化学合成培地 (CDM) (Table 2-7) を使用し, 30°C で培養した. *ChDDO* 遺伝子の大腸菌における発現は過去に当研究室で作成された *ChDDO* 遺伝子発現ベクター pET25b *ChDDO* を保有する *E. coli* NiCo21 (DE3) を使用した[156]. DNA 組換えと遺伝子発現のための大腸菌はそれぞれ *E. coli* DH5α と *E. coli* NiCo21 (DE3) を使用した. 大腸菌の培養には lysogeny broth (LB) 培地 (10 g/l トリプトン, 5 g/l 酵母エキス, 5 g/l NaCl, pH 7.0) または Terrific broth (TB) 培地 (12 g/l トリプトン, 24 g/l 酵母エキス, 4 ml/l グリセロール, 12.54 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.31 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) を使用した. MRS と LB 寒天培地には精製寒天粉末を 15 g/l となるように添加した. 抗生物質を添加する場合, 終濃度が 100 µg/ml となるようにアンピシリンを添加した.



Table 2-7. 化学合成培地 (CDM) の基本組成

Reagents	Concentration (mg/l)
Sodium acetate · 3H <sub>2</sub> O	3317.8
Tween 80	1000.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	4414.9
KCl	750.0
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	12.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	409.5
Glucose	5000.0
L-Ala	50.0
L-Cys	50.0
L-Phe	50.0
Gly	50.0
L-His · HCl · H <sub>2</sub> O	67.6
L-Ile	50.0
L-Lys · HCl	62.5
L-Leu	50.0
L-Met	50.0
L-Asn · H <sub>2</sub> O	56.8
L-Pro	50.0
L-Gln	50.0
L-Arg	50.0
L-Ser	50.0
L-Thr	50.0
L-Val	50.0
L-Trp	50.0
L-Tyr	50.0
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.4
Pridoxal · HCl	0.6
Nicotinic acid	1.0
Folic acid	0.2
Calcium panthotenate	1.0
Riboflavine	1.0
Thiamine · HCl	1.3
Adenine	5.0
Guanine	10.0
Uracil	10.0

pH は 6.5 となるように 5 N NaOH で調整した.

L-Asn 栄養要求性試験では, L-Asn を除いて調製した.

### ゲノム DNA

DSM 20019 株と WDN19 株を 5 ml MRS 培地で 30°C で 14 時間静置して前培養したのち、140 µl 培養液を 14 ml MRS 培地に接種し、30°C で 8 時間静置して培養した。遠心分離 (5,000×g, 10 min, 4°C) により菌体を回収したのち、QIAGEN Genomic-tip 100/G (QIAGEN, Hilden, German) 付属のプロトコルに従いゲノム DNA を抽出した。

### ゲノム配列解析

WDN19 株のゲノム配列は PacBio RS II sequencer を用いて行った。ゲノムアセンブリは PacBio SMRT Analysis ver. 2.3.0 プラットフォームの Hierarchiral Genome Assembly Process 3 (HGAP3) を用いて行った。アノテーションは DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST) ver. 1.2.13 (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) により行った。ゲノム配列解析とゲノムアセンブリは Macrogen Japan (Tokyo, Japan) により行われた。

### Average nucleotide identity (ANI)解析

WDN19 株のゲノム配列 (AP024685) の average nucleotide identity (ANI) 解析は JSpeiesWS ANIb (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) を用いて解析した[171]。

### 遺伝子相同性解析

WDN19 株の 16S rRNA 遺伝子、DNA 誘導 RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニット (*rpoA*) 遺伝子とフェニルアラニン-tRNA リガーゼ  $\alpha$  サブユニット (*pheS*) 遺伝子の相同性解析は、NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の BLAST を用いて解析した。

### 表現型解析

グルコースからのガス生産は、バイアル瓶を転倒させて挿入した MRS 培地中で、乳酸菌を 30°C で 3 日間静置培養して試験した。糖代謝は基底培地 (10 g/l ペプトン, 5 g/l 酵母エキス, 1 g/l ポリソルベート 80, 5 g/l 酢酸ナトリウム, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l MnSO<sub>4</sub>, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04 g/l ブロモクレゾールパープル, pH 6.5) に 20 g/l グルコース, 20 g/l キシロースまたは 20 g/l メリビオースを添加して乳酸菌を 30°C で 3 日間静置培養して試験した。アルギニン加水分解試験は、基底培地に 1 g/l グルコース, 2 g/l 酢酸ナトリウムと 3 g/l L-Arg を添加して乳酸菌を 30°C で 6 日間静置培養して試験した。Levilactobacillus brevis JCM 1171 株を陽性対照として使用した。

***racD* 遺伝子大腸菌発現ベクターの作成**

WDN19 株 ( *WDN\_racD* ) および DSM20019 株 ( *DSM\_racD* ) の停止コドンを含まない *racD* 遺伝子を、各ゲノム DNA と各 INF\_WDNracDH\_F/INF\_WDNracDH\_R と INF\_DSMracDH\_F/INF\_DSMracDH\_R プライマーペアを用いて、Tks Gflex DNA ポリメラーゼにより PCR 増幅した (Table 2-8)。PCR は、94°C で 60 s、98°C で 10 s、60°C で 30 s、72°C で 60 s のサイクルを 30 回繰り返す条件で行った。各 *racD* 遺伝子は、In-Fusion HD cloning Kit (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、pET25b の *NdeI* と *XhoI* サイトに導入し、T7 promoter と T7 terminator のプライマーを使用したシーケンスシグリングにより、変異がないことを確認した。WDN\_RacD と DSM\_RacD の発現プラスミドは、それぞれ pET25b\_WDNracD と pET25b\_DSMracD と名付けた。

**Table 2-8 プライマーセット**

Name	5' → 3'
INF_WDNracDH_F	CCCGTTTGATCTCGAAGTTGTACAACCCATCAACG
INF_WDNracDH_R	AAGGAGATATACATATGGAAGATATGTTTACAATTCTAGG
INF_DSMracDH_F	CCCGTTTGATCTCGAACTTGTTGTATAGCCCGTCG
INF_DSMracDH_R	AAGGAGATATACATATGGAAGAAATGTTTACGATTTTAGG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG

**RacD の精製**

pET25b\_WDNracD と pET25b\_DSMracD を有する大腸菌を 20 ml の LBA 培地において 30°C で 14 h、169 rpm で震盪培養した。培養液全量を 3 l の TBA 培地に接種し、37°C で OD<sub>600</sub> が 0.4 に達するまで 200 rpm、空気量 1.0 ml/min でジャーファーマンターを用いて培養した。OD<sub>600</sub> が 0.4 に達した時、IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し、20°C で 28 時間さらに培養した。培養後、遠心分離 (5,000 × g, 10 min, 4°C) で大腸菌を回収し、標準バッファー (50 mM NaPi, 0.3 M NaCl, pH 6.5) に懸濁した。細胞懸濁液を超音波破碎装置 UD-201 sonicator (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) を用いて output 10, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) し、上清を孔径 0.45 μm の PVDF フィルター (Whatman 25 mm GD/X syringe filter, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) でろ過し、RacD を含む粗抽出液を調製した。粗抽出液にイミダゾールを終濃度 10 mM となるように添加したのち、10 mM イミダゾールを含む標準バッファーで平衡化した HisTALON superflow cartridge (Clontech, Mountain View, CA, USA) に供し、10 mM イミダゾールを含む標準バッファーで洗浄後、150 mM イミダゾールを含む標準バッファーによりカラムに結合したタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を Amicon Ultra-15 (10,000 MW cut-off) (Millipore, Bedford, MA, USA) により濃縮し、10%グリセロールを含む 50 mM NaPi バッファー (pH 6.5) に対して一晚透析した。遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) 後、上清を回収し、活性測定を行うまで -80°C で保存した。

### ChDDO の精製

ChDDO 遺伝子を有する大腸菌を 10 ml の LBA 培地において 30°C で 14 h, 169 rpm で震盪培養した。培養液全量を 3 l の TBA 培地に接種し 37°C で OD<sub>600</sub> が 0.4 に達するまで 200 rpm で攪拌培養した。OD<sub>600</sub> が 0.4 に達した時、IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し、20°C で 28 h さらに培養した。培養後、遠心分離 (5,000 × g, 10 min, 4°C) で大腸菌を回収し、氷冷洗浄バッファーに懸濁した。細胞懸濁液を超音波破碎装置 UD-201 sonicator を用いて output 10, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) し、上清を孔径 0.45 μm の PVDF フィルターでろ過し、ChDDO を含む細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に 400 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーをイミダゾール濃度が終濃度 40 mM となるよう添加した後、40 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで平衡化した HisTALON superflow cartridge に供し、40 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで洗浄後、150 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーによりカラムに結合したタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を Amicon Ultra-15 (10,000 MW cut-off) により濃縮し、5%グリセロールを含む 50 mM リン酸カリウム (KPi) バッファー (pH 7.5) に対して一晩透析した。遠心分離 (20,000 × g, 30 min, 4°C) 後、上清を回収し、活性測定を行うまで -80°C で保存した。

### ChDDO の活性測定

ChDDO 活性は、フェノールと 4-アミノアンチピリン (4AAP) を発色基質とした HRP とのカップリング法により測定した[156]。具体的には、ChDDO 精製酵素液を KBSA 溶液 [50 mM リン酸カリウムバッファー, 5% (v/v) グリセロール, 25 μg/ml ウシ血清アルブミン (BSA), pH 7.5] により適宜希釈したのち、50 mM KPi バッファー (pH 7.5) に溶解した 20 mM D-Asp, 1.5 mM 4AAP, 2 mM phenol, 25 U/ml HRP と 20 μM FAD を含む反応液に添加し 37°C で反応させた。ChDDO 活性は、反応によって得られるキノイミン色素を波長 505 nm で吸光度を分光光度計 (UV-2500 PC, Shimadzu) 経時的に測定し、活性を算出した。コントロールとして、基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。

### 乳酸菌粗抽出液における RacD 活性測定

乳酸菌を 5 ml MRS 培地において 30°C で 14 h 静置したのち、4 ml の培養液を 400 ml MRS 培地に接種し、対数増殖期初期（WDN19 株,  $OD_{600} \sim 0.7$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 0.9$ ）、対数増殖期中期（WDN19 株,  $OD_{600} \sim 2.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 2.5$ ）および定常期初期（WDN19 株,  $OD_{600} \sim 3.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 4.0$ ）までさらに培養した。菌体を遠心分離（ $5,000 \times g$ , 4°C, 10 min）により回収し、標準バッファー [50 mM NaPi, 1 mM ジチオスレイトール (DTT), 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), pH 7.2] により 3 回洗浄した。菌体を湿菌体重量の 10 倍量 (w/v) の標準バッファーに懸濁した後、超音波破碎装置 UD-201 sonicator を用いて、output 3, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離（ $20,000 \times g$ , 30 min, 4°C）し、上清を孔径 0.45  $\mu m$  の PVDF フィルターでろ過し、RacD を含む細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液（WDN19 株は 40  $\mu g$ , DSM 20019 株は 200  $\mu g$  のタンパク質を含む）を 10 mM L-Asp, 1 mM DTT および 50 mM NaPi (pH 6.5) を含む反応液に添加して総液量 200  $\mu l$  とし、30°C で反応させた。反応液に含まれるアミノ酸は液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。1 U は 1 min あたりに生成される 1  $\mu mol$  のエナンチオマーの量と定義した ( $\mu mol/min$ )。

### アミノ酸の HPLC 測定

200  $\mu l$  の試料を 800  $\mu l$  メタノールと混合したのち遠心分離（ $13,000 \times g$ , 4°C, 10 min）して上清を回収した。沈殿画分を 500  $\mu l$  メタノールで洗浄したのち、遠心分離（ $13,000 \times g$ , 4°C, 10 min）して上清を回収し、先に回収した上清と合わせた。回収した上清を 40°C で遠心エバポレーターを用いて濃縮乾固したのち、500  $\mu l$  の 100  $\mu M$  L-システイン酸に溶解した。溶液は、測定前に適宜 100  $\mu M$  L-システイン酸でさらに希釈した。アミノ酸の誘導体化は Aswad の方法に従った[101]。具体的には、5  $\mu l$  の誘導体化試薬（4 mg *o*-フタルアルデヒドを 300  $\mu l$  メタノールに溶解したのち、250  $\mu l$  の 0.4 M ホウ酸ナトリウムバッファー (pH 9.4), 60  $\mu l$  の 1 M *N*-アセチル-L-システインと 390  $\mu l$  蒸留水を加えて調製）と 20  $\mu l$  の調製試料をボルテックスで混合したのち 2 min 反応させ、475  $\mu l$  の酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.55) を添加後ボルテックスで攪拌して反応を停止させた 10  $\mu l$  の試料を HPLC に導入した。HPLC 測定には、J'sphere ODS-M80 (TMC, Kyoto, Japan) カラムを使用し、移動相にはメタノール:酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.55) を 3.8:96.2 で混合したものを使用した。測定は流速 1 ml/min のイソクラティックな条件で行い、励起波長と蛍光波長はそれぞれ 320 nm と 440 nm に設定した。

### 精製 RacD の活性測定

精製した RacD の活性は、TOOS と 4AAP を発色基質とした ChDDO と HRP のカップリング反応を改良して測定した。具体的には、精製 RacD 溶液を NaBSA 溶液 [50 mM リン酸ナトリウムバッファー, 5% (v/v) グリセロール, 25  $\mu g/ml$  ウシ血清アルブミン (BSA), pH 6.5] により適宜希釈したのち、25  $\mu l$  RacD を 10 – 200 mM L-Asp, 1.5 mM 4-AAP, 1.5 mM TOOS, 20  $\mu M$  FAD, 10 U/ml HRP, 5.0 U/ml ChDDO と 100 mM NaPi (pH 6.5) を含む反応液 475  $\mu l$  に添加して、30°C で反応させた。反応開始後、波長 555 nm の吸光度を 5 – 20 min 経時的に測定し、直線の傾きから RacD 活性を算出した。

### 乳酸菌粗抽出液における AnsA 活性測定

乳酸菌を 5 ml MRS 培地において 30°C で 14 h 静置して培養した。4 ml の培養液を 400 ml MRS 培地に接種し、対数増殖期初期 (WDN19 株,  $OD_{600} \sim 0.7$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 0.9$ ), 対数増殖期中期 (WDN19 株,  $OD_{600} \sim 2.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 2.5$ ) および定常期初期 (WDN19 株,  $OD_{600} \sim 3.0$ ; DSM 20019 株,  $OD_{600} \sim 4.0$ ) になるまでさらに培養した。菌体を遠心分離 ( $5,000 \times g$ , 4°C, 10 min) により回収し, 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5) により 3 回洗浄した。菌体を湿菌体重量の 4 倍量 (w/v) の Asparaginase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich) 付属の asparaginase assay buffer に懸濁したのち, 同体積量の  $\phi$  0.35-0.5 mm のガラスビーズ (BZ-04; AS ONE, Osaka, Japan) を加え, 2 min のボルテックスを 3 回繰り返した。粗抽出液を遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 30 min, 4°C) して上清を回収し, 細胞粗抽出液とした。細胞粗抽出液の AnsA 活性は Asparaginase Activity Assay Kit のプロトコルに従って測定した。1 U は 1 min あたりに生成される 1  $\mu$ mol の L-Asp の量と定義した ( $\mu$ mol/min)。

### タンパク質解析

タンパク質濃度測定は Bradford 法により行い, Bio-Rad protein assay reagent concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, America) 付属のプロトコルに従って行った[172]。標準タンパク質として牛血清アルブミン (BSA) を使用した。SDS-PAGE には 12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを使用した。

### 全 RNA の調製

乳酸菌を 5 ml MRS 培地において 30°C で 14 h 静置して培養したのち, 1 ml の培養液を 100 ml MRS 培地に接種し,  $OD_{600}$  が 0.6 – 0.8 なるまで, 30°C でさらに培養した。菌体を遠心分離 ( $6,000 \times g$ , 4°C, 10 min) により回収し, 1 ml DECP 水で 2 回洗浄し, 1 ml DECP 水に懸濁した。菌体懸濁液を 0.1 g の  $\phi$ 0.45-0.5 mm ジルコニアビーズ (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) を含む微量遠心チューブに移し, 遠心分離 ( $6,000 \times g$ , 4°C, 10 min) により菌体を回収した。湿菌体を凍結乾燥器 (DRC-1100 and FDU-2100; EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥し, 使用するまで -80°C で保存した。全 RNA は Direct-zol RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) 付属のプロトコルに従って, 抽出・精製した。

### *racD* 遺伝子の RT-qPCR

*racD* 遺伝子の定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) は, 全 RNA, DSMracD\_F/DSMracD\_R (DSM 20019 株) と WDNracD\_F/WDNracD\_R (WDN19 株) プライマーペアと RNA direct SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて, StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で行った。ノーマライズ遺伝子として 16S rRNA 遺伝子の転写も 16S\_F/16S\_R のプライマーペアを用いて同様に定量した。

### D, L-Asp 生産の解析

乳酸菌を 5 ml MRS 培地において 30°C で 14 h または CDM において 30°C で 24 h 静置して培養したのち、50  $\mu$ l の培養液を 5 ml MRS 培地または CDM へ接種し、30°C でさらに培養した。L-Asp 生合成前駆体の検討においては、乳酸菌を 5 ml CDM において 30°C で 24 h 静置して培養したのち、50  $\mu$ l の培養液を 10 mM の L-Asn または L-Glu を含む 5 ml CDM に接種し、30°C でさらに培養した。培養液上清の D, L-Asp 濃度は HPLC により測定した。

### L-Asn 栄養要求性

乳酸菌を 5 ml CDM において 30°C で 24 h 静置して培養したのち、50  $\mu$ l の培養液を 5 ml の L-Asn を全く含まず 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を窒素源として含む CDM 培地と 5 ml の 10 mM L-Asn を含む 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を窒素源として含む CDM 培地に接種したのち、30°C でさらに培養し、生育を OD<sub>600</sub> で経時的に測定した。

### 細胞内 Asp 濃度測定

乳酸菌を 5 ml MRS 培地において 30°C で 14 h 静置して培養したのち、4 ml の培養液を 400 ml MRS 培地に接種し、30°C で 8 h さらに培養した。菌体を遠心分離 (5,000 $\times$ g, 4°C, 10 min) により回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、PBS に懸濁した。菌体懸濁液を超音波破碎装置 UD-201 sonicator を用いて、output 3, duty 50, 30 s の超音波処理を 20 回繰り返した。細胞破碎液を遠心分離 (20,000 $\times$ g, 30 min, 4°C) して得た上清を孔径 0.45  $\mu$ m の PVDF フィルターでろ過し細胞粗抽出液とし、D, L-Asp を HPLC により測定した。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導していただきました長岡技術科学大学大学院 環境生物化学研究室 高橋祥司教授に御礼申し上げます。高橋祥司教授には基礎的な実験操作や論文作成に至るまで、多くのことをご教授していただきました。深く感謝いたします。

さらに、乳酸菌の培養方法や単離方法について多くのご助言を賜りました小山高等工業専門学校 物質工学科 高屋朋彰准教授、そして多くの試料の HPLC 分析を引き受けていただいた福島工業高等専門学校 化学・バイオ工学科 柴田公彦准教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究を遂行するにあたり多くのご助言を賜りました七五三掛湧也様に深く感謝いたします。そして私と同じく博士後期課程へ進学し、共に過ごしてきた今西大生君、古市剛大君、修士課程で過ごしてきた川口誠之君、今野聖矢君、篠原輝君、鈴木秀之君、渡部裕介君に感謝致します。さらに、実験の手伝いを引き受けていただいた石川拓実君、小林智弘君、安里光波留さんに感謝致します。

最後に、何不自由なく私をここまで育てていただき、常に見守り続けてくれた父、母、そして妹に深く感謝致します。



## 引用文献

- [1] F. Cava, H. Lam, M.A. de Pedro, M.K. Waldor, Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria, *Cell Mol Life Sci* **68** (2011) 817-831.
- [2] S. Takahashi, K. Abe, K. Shibata, Y. Kera, Functions and metabolism of D-amino acids in microorganisms, in: J.P.F. D'Mello (Ed.), *The Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids*, CABI.org, (2017), pp. 315-331.
- [3] D.-J. Scheffers, G. Pinho Mariana, Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies, *Microbiol Mol Biol Rev* **69** (2005) 585-607.
- [4] M.P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas, Cell wall structure and function in lactic acid bacteria, *Microb Cell Fact* **13** Suppl 1 (2014) S9.
- [5] P. Schumann, 5 - Peptidoglycan structure, in: F. Rainey, A. Oren (Eds.), *Methods in Microbiology*, Academic Press, (2011), pp. 101-129.
- [6] K.H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol Rev* **36** (1972) 407-477.
- [7] E.J. Prenner, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes, *Biochim Biophys Acta (BBA)* **1462** (1999) 201-221.
- [8] B.M. Burkhart, R.M. Gassman, D.A. Langs, W.A. Pangborn, W.L. Duax, V. Pletnev, Gramicidin D conformation, dynamics and membrane ion transport, *Biopolymers* **51** (1999) 129-44.
- [9] F. Fdhila, V. Vázquez, J.L. Sánchez, R. Riguera, DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*, *J Nat Prod* **66** (2003) 1299-1301.
- [10] A. Aliashkevich, L. Alvarez, F. Cava, New insights into the mechanisms and biological roles of D-amino acids in complex eco-systems, *Front microbiol* **9** (2018) 683.
- [11] C. Rumbo, J.A. Vallejo, M.P. Cabral, M. Martínez-Gutián, A. Pérez, A. Beceiro, G. Bou, Assessment of antivirulence activity of several D-amino acids against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* **71** (2016) 3473-3481.
- [12] A.I. Hochbaum, I. Kolodkin-Gal, L. Foulston, R. Kolter, J. Aizenberg, R. Losick, Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development, *J Bacteriol* **193** (2011) 5616-5622.
- [13] H. Lam, D.-C. Oh, F. Cava, N. Takacs Constantin, J. Clardy, A. de Pedro Miguel, K. Waldor Matthew, D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria, *Science* **325** (2009) 1552-1555.
- [14] L. Alvarez, A. Aliashkevich, M.A. de Pedro, F. Cava, Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity, *ISME J* **12** (2018) 438-450.
- [15] E.V. Pikuta, R.J. Menes, A.M. Bruce, Z. Lyu, N.B. Patel, Y. Liu, R.B. Hoover, H.-J. Busse, P.A. Lawson, W.B. Whitman, *Raineyella antarctica* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, D-amino-acid-utilizing anaerobe isolated from two geographic locations of the Southern Hemisphere, *Int J Syst Evol Microbiol* **66** (2016) 5529-5536.

- [16] Y. Yu, J. Yang, L.-Y. Zheng, Q. Sheng, C.-Y. Li, M. Wang, X.-Y. Zhang, A. McMinn, Y.-Z. Zhang, X.-Y. Song, X.-L. Chen, Diversity of D-amino acid utilizing bacteria from Kongsfjorden, arctic and the metabolic pathways for seven D-amino acids, *Front Microbiol* **10** (2020).
- [17] G.M. Hills, Chemical factors in the germination of spore-bearing aerobes; the effects of amino acids on the germination of *Bacillus anthracis*, with some observations on the relation of optical form to biological activity, *Biochem J* **45** (1949) 363-370.
- [18] N. Chesnokova Olga, A. McPherson Sylvia, T. Steichen Christopher, L. Turnbough Charles, The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development, *J Bacteriol* **191** (2009) 1303-1310.
- [19] J.M. Eisenstadt, L. Grossman, H.P. Klein, Inhibition of protein synthesis by D-aspartate and a possible site of its action, *Biochim Biophys Acta* **36** (1959) 292-294.
- [20] J.M. Eisenstadt, H.P. Klein, Effects of aspartate on growth and on the synthesis of  $\alpha$ -amylase in *Pseudomonas saccharophila*, *J Bacteriol* **87** (1964) 1355.
- [21] M. Broccardo, V. Erspamer, G. Falconieri Erspamer, G. Improta, G. Linari, P. Melchiorri, P.C. Montecucchi, Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin, *Br J Pharmacol* **73** (1981) 625-631.
- [22] E.C. Jimenez, B.M. Olivera, W.R. Gray, L.J. Cruz, Contryphan is a D-tryptophan-containing Conus peptide\*, *J Biol Chem* **271** (1996) 28002-28005.
- [23] R.B. Jacobsen, E.C. Jimenez, R.G. De la Cruz, W.R. Gray, L.J. Cruz, B.M. Olivera, A novel D-leucine-containing Conus peptide: Diverse conformational dynamics in the contryphan family, *J Pept Res* **54** (1999) 93-9.
- [24] A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi, Endogenous D-serine in rat brain: *N*-Methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging, *J Neurochem* **60** (1993) 783-6.
- [25] J.P. Mothet, A.T. Parent, H. Wolosker, R.O. Brady, Jr., D.J. Linden, C.D. Ferris, M.A. Rogawski, S.H. Snyder, 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** (2000) 4926-4931.
- [26] P.M. Kim, H. Aizawa, P.S. Kim, A.S. Huang, S.R. Wickramasinghe, A.H. Kashani, R.K. Barrow, R.L. Huganir, A. Ghosh, S.H. Snyder, Serine racemase: Activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 2105-10.
- [27] Y. Yang, W. Ge, Y. Chen, Z. Zhang, W. Shen, C. Wu, M. Poo, S. Duan, Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003) 15194-15199.
- [28] V. Labrie, S. Duffy, W. Wang, S.W. Barger, G.B. Baker, J.C. Roder, Genetic inactivation of D-amino acid oxidase enhances extinction and reversal learning in mice, *Learn Mem* **16** (2008) 28-37.
- [29] A.C. Basu, G.E. Tsai, C.L. Ma, J.T. Ehmsen, A.K. Mustafa, L. Han, Z.I. Jiang, M.A. Benneyworth, M.P. Froimowitz, N. Lange, S.H. Snyder, R. Bergeron, J.T. Coyle, Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior, *Mol Psychiatry* **14** (2009) 719-727.

- [30] F. Errico, J.-P. Mothet, A. Usiello, D-Aspartate: An endogenous NMDA receptor agonist enriched in the developing brain with potential involvement in schizophrenia, *J Pharm Biomed Anal* **116** (2015) 7-17.
- [31] S. Sacchi, V.D. Novellis, G. Paolone, T. Nuzzo, M. Iannotta, C. Belardo, M. Squillace, P. Bolognesi, E. Rosini, Z. Motta, M. Frassinetti, A. Bertolino, L. Pollegioni, M. Morari, S. Maione, F. Errico, A. Usiello, Olanzapine, but not clozapine, increases glutamate release in the prefrontal cortex of freely moving mice by inhibiting D-aspartate oxidase activity, *Sci Rep* **7** (2017) 46288.
- [32] Y. Nagata, R. Masui, T. Akino, The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma, *Experientia* **48** (1992) 986-8.
- [33] A. Hesaka, S. Sakai, K. Hamase, T. Ikeda, R. Matsui, M. Mita, M. Horio, Y. Isaka, T. Kimura, D-Serine reflects kidney function and diseases, *Sci Rep* **9** (2019) 5104.
- [34] D.W. Armstrong, M. Gasper, S.H. Lee, J. Zukowski, N. Ercal, D-Amino acid levels in human physiological fluids, *Chirality* **5** (1993) 375-8.
- [35] Y. Nagata, M. Higashi, Y. Ishii, H. Sano, M. Tanigawa, K. Nagata, K. Noguchi, M. Urade, The presence of high concentrations of free D-amino acids in human saliva, *Life Sci* **78** (2006) 1677-81.
- [36] G.L. Marcone, E. Rosini, E. Crespi, L. Pollegioni, D-Amino acids in foods, *Appl Microbiol Biotechnol* **104** (2020) 555-574.
- [37] Y. Mutaguchi, T. Ohmori, T. Ohshima, 乳酸発酵と D-アミノ酸生産, *化学と生物* **53** (2015) 18-26.
- [38] H. Brückner, T. Westhauser, Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants, *Amino acids* **24** (2003) 43-55.
- [39] T. Ogawa, Y. Kawasaki, K. Sasaoka, De novo synthesis of D-alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings, *Phytochemistry* **17** (1978) 1275-1276.
- [40] T. Ogawa, M. Fukuda, K. Sasaoka, Occurrence of D-amino acid aminotransferase in pea seedlings, *Biochem Biophys Res Commun* **52** (1973) 998-1002.
- [41] R.W. aldag, J.L. Young, M. Yamamoto, An enzymatic chromatographic procedure for the determination of D-amino acids in plant and soil extracts, *Phytochemistry* **10** (1971) 267-274.
- [42] Y. Mutaguchi, T. Ohmori, H. Akano, K. Doi, T. Ohshima, Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids, *Springerplus* **2** (2013) 691.
- [43] S. Kato, T. Ishihara, H. Hemmi, H. Kobayashi, T. Yoshimura, Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines, *J Biosci Bioeng* **111** (2011) 104-108.
- [44] L. Pollegioni, E. Rosini, G. Molla, Advances in enzymatic synthesis of D-amino acids, *Int J Mol Sci* **21** (2020).
- [45] M. Senuma, O. Otsuki, N. Sakata, M. Furui, T. Tosa, Industrial production of D-aspartic acid and L-alanine from DL-aspartic acid using a pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells, *J Ferment Bioeng* **67** (1989) 233-237.
- [46] T. Nagasawa, H. Yamada, Enzymatic transformations of 3-chloroalanine into useful amino acids,

*Appl Biochem Biotechnol* **13** (1986) 147-65.

[47] D.M. Veine, H. Yao, D.R. Stafford, K.S. Fay, D.L. Livant, A D-amino acid containing peptide as a potent, noncovalent inhibitor of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in human prostate cancer invasion and lung colonization, *Clin Exp Metastasis* **31** (2014) 379-93.

[48] S. Chattopadhyay, U. Raychaudhuri, R. Chakraborty, Artificial sweeteners – a review, *J Food Sci Technol* **51** (2014) 611-621.

[49] Y. Mutaguchi, 乳酸菌の D-アミノ酸生産と新規アミノ酸異性化酵素の同定, *D-アミノ酸学会誌* **3** (2015) 7-12.

[50] X. Gao, Q. Ma, H. Zhu, Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids, *Appl Microbiol Biotechnol* **99** (2015) 3341-3349.

[51] D. Zhang, X. Jing, W. Zhang, Y. Nie, Y. Xu, Highly selective synthesis of D-amino acids from readily available L-amino acids by a one-pot biocatalytic stereoinversion cascade, *RSC adv* **9** (2019) 29927-29935.

[52] A. Fan, J. Li, Y. Yu, D. Zhang, Y. Nie, Y. Xu, Enzymatic cascade systems for D-amino acid synthesis: progress and perspectives, *SMAB* **1** (2021) 397-410.

[53] H. Akita, J. Hayashi, H. Sakuraba, T. Ohshima, Artificial thermostable D-amino acid dehydrogenase: Creation and application, *Front Microbiol* **9** (2018) 1760.

[54] G. Ndrepepa, Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review, *J Lab Precis Med* **6** (2021) 8725.

[55] N. Nakajima, K. Tanizawa, H. Tanaka, K. Soda, Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system, *J Biotechnol* **8** (1988) 243-248.

[56] K. Vedha-Peters, M. Gunawardana, J.D. Rozzell, S.J. Novick, Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids, *J Am Chem Soc* **128** (2006) 10923-10929.

[57] S. Nakano, Y. Minamino, F. Hasebe, S. Ito, Deracemization and stereoinversion to aromatic D-amino acid derivatives with ancestral L-amino acid oxidase, *ACS Catal* **9** (2019) 10152-10158.

[58] F. Parmeggiani, S.L. Lovelock, N.J. Weise, S.T. Ahmed, N.J. Turner, Synthesis of D- and L-phenylalanine derivatives by phenylalanine ammonia lyases: A multienzymatic cascade process, *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger* **127** (2015) 4691-4694.

[59] W.H. Holzapfel, B.J. Wood, Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy, John Wiley & Sons 2014.

[60] J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C.M.A.P. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, P.W. O'Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G.E. Felis, M.G. Gänzle, S. Lebeer, A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae, *Int J Syst Evol Microbiol* **70** (2020) 2782-2858.

[61] S.W. Cho, J. Yim, S.W. Seo, Engineering Tools for the development of recombinant lactic acid bacteria, *Biotechnol J* **15** (2020) 1900344.

[62] S. Salminen, A. Von Wright, Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, CRC Press 2004.

- [63] M.E. Stiles, Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* **70** (1996) 331-345.
- [64] S.J. Sathe, N.N. Nawani, P.K. Dhakephalkar, B.P. Kapadnis, Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *J Appl Microbiol* **103** (2007) 2622-2628.
- [65] T. Yoshimura, M. Goto, D-Amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases, *FEBS J* **275** (2008) 3527-3537.
- [66] R. Martín, S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M.L. Marín, J. Xaus, L. Fernández, J.M. Rodríguez, Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut, *J Pediatr* **143** (2003) 754-758.
- [67] X.-H. Guo, J.-M. Kim, H.-M. Nam, S.-Y. Park, J.-M. Kim, Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties, *Anaerobe* **16** (2010) 321-326.
- [68] C.J. González, J.P. Encinas, M.L. Garcí'a-López, A. Otero, Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes, *Food Microbiology* **17** (2000) 383-391.
- [69] R.J. Jones, H.M. Hussein, M. Zagorec, G. Brightwell, J.R. Tagg, Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, *Food Microbiology* **25** (2008) 228-234.
- [70] Y.-S. Chen, F. Yanagida, T. Shinohara, Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure, *Lett Appl Microbiol* **40** (2005) 195-200.
- [71] C. Bulut, H. Gunes, B. Okuklu, S. Harsa, S. Kilic, H. Sevgi Coban, A. Fazil Yenidunya, Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region, *J Dairy Res* **72** (2005) 19-24.
- [72] M. Masuda, M. Ide, H. Utsumi, T. Niuro, Y. Shimamura, M. Murata, Production potency of folate, vitamin B12, and thiamine by lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles, *Biosci Biotechnol Biochem* **76** (2012) 2061-2067.
- [73] L.J. Harris, M.A. Daeschel, M.E. Stiles, T.R. Klaenhammer, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *J Food Prot* **52** (1989) 384-387.
- [74] G. Perdigón, C. Maldonado Galdeano, J.C. Valdez, M. Medici, Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system, *Eur J Clin Nutr* **56** (2002) S21-S26.
- [75] T.D.T. Nguyen, J.H. Kang, M.S. Lee, Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *Int J Food Microbiol* **113** (2007) 358-361.
- [76] C.C. Almeida, S.L.S. Lorena, C.R. Pavan, H.M.I. Akasaka, M.A. Mesquita, Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients, *Nutr Clin Pract* **27** (2012) 247-251.
- [77] I. Kepert, J. Fonseca, C. Müller, K. Milger, K. Hochwind, M. Kostric, M. Fedoseeva, C. Ohnmacht, S. Dehmel, P. Nathan, S. Bartel, O. Eickelberg, M. Schlöter, A. Hartmann, P. Schmitt-Kopplin, S. Krauss-Etschmann, D-Tryptophan from probiotic bacteria influences the gut microbiome and allergic airway disease, *J Allergy Clin Immunol* **139** (2017) 1525-1535.
- [78] P. van Baarlen, J.M. Wells, M. Kleerebezem, Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli, *Trends Immunol* **34** (2013) 208-215.

- [79] Y. Gogami, K. OKADA, M. Moriyama, H. Mizoguchi, T. Oikawa, Quantitative analysis of D-amino acids in sake brewing processes of Kimoto, Kimoto adding starter lactic acid bacteria, and Sokujomoto, *Trace Nutrients Res* **29** (2012) 1-6.
- [80] I. Lucquin, M. Zagorec, M. Champomier-Vergès, S. Chaillou, Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes, *Food Microbiol* **29** (2012) 187-196.
- [81] S. Kask, K. Adamberg, A. Orłowski, F.K. Vogensen, P.L. Møller, Y. Ardö, T. Paalme, Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese, *Food Res Int* **36** (2003) 1037-1046.
- [82] S.-G. Jo, E.-J. Noh, J.-Y. Lee, G. Kim, J.-H. Choi, M.-E. Lee, J.-H. Song, J.-Y. Chang, J.-H. Park, *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice, *J Microbiol* **54** (2016) 503-509.
- [83] Y. Hong, H.-S. Yang, J. Li, S.-K. Han, H.-C. Chang, H.-Y. Kim, Identification of lactic acid bacteria in salted Chinese cabbage by SDS-PAGE and PCR-DGGE, *J Sci Food Agric* **94** (2014) 296-300.
- [84] E. Michel, C. Monfort, M. Deffrasnes, S. Guezennec, E. Lhomme, M. Barret, D. Sicard, X. Dousset, B. Onno, Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods, *Int J Food Microbiol* **239** (2016) 35-43.
- [85] B.Y. Bulgasem, M.N. Lani, Z. Hassan, W.M.W. Yusoff, S.G. Fnaish, Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic candida species, *Mycobiology* **44** (2016) 302-309.
- [86] F. Dal Bello, J. Walter, W. Hammes, C. Hertel, Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition, *Microb Ecol* **45** (2003) 455-463.
- [87] M. Zommiti, N. Connil, J.B. Hamida, M. Ferchichi, Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a strain isolated from chicken ceca, *Probiotics Antimicrob Proteins* **9** (2017) 415-424.
- [88] Y. Chen, L. Yu, N. Qiao, Y. Xiao, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen, Q. Zhai, *Latilactobacillus curvatus*: A candidate probiotic with excellent fermentation properties and health benefits, *Foods* **9** (2020) 1366.
- [89] J.A. Gerlt, G.L. Kenyon, J.W. Kozarich, D.J. Neidhart, G.A. Petsko, V.M. Powers, Mandelate racemase and class-related enzymes, *Curr Opin Struct Biol* **2** (1992) 736-742.
- [90] S.B. Hernández, F. Cava, Environmental roles of microbial amino acid racemases, *Environ microbiol* **18** (2016) 1673-1685.
- [91] L. Liu, K. Iwata, A. Kita, Y. Kawarabayasi, M. Yohda, K. Miki, Crystal structure of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its implications for molecular mechanism of PLP-independent racemization, *J Mol Biol* **319** (2002) 479-489.
- [92] A. Ohtaki, Y. Nakano, R. Iizuka, T. Arakawa, K. Yamada, M. Odaka, M. Yohda, Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the

reaction mechanism, *Proteins* **70** (2008) 1167-1174.

[93] R.M. Jones, D.L. Popham, A.L. Schmidt, E.L. Neidle, E.V. Stabb, *Vibrio fischeri* DarR directs responses to D-aspartate and represents a group of similar LysR-type transcriptional regulators, *J Bacteriol* **200**( (2018) e00773-17.

[94] Y. Miyoshi, T. Oyama, Y. Itoh, K. Hamase, Enantioselective two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of amino acids; Analysis and physiological significance of D-amino acids in mammals, *Chromatography* **35** (2014) 49-57.

[95] H. Brückner, A. Schieber, Determination of free D-amino acids in mammalia by chiral gas chromatography–mass spectrometry, *J High Res Chromatogr* **23** (2000) 576-582.

[96] S. Zhao, Y. Song, Y.-M. Liu, A novel capillary electrophoresis method for the determination of D-serine in neural samples, *Talanta* **67** (2005) 212-216.

[97] S. Kato, T. Ikuta, H. Hemmi, S. Takahashi, Y. Kera, T. Yoshimura, Enzymatic assay for D-aspartic acid using D-aspartate oxidase and oxaloacetate decarboxylase, *Biosci Biotechnol Biochem* **76** (2012) 2150-2.

[98] T. Ito, K. Takahashi, T. Naka, H. Hemmi, T. Yoshimura, Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal Biochem* **371** (2007) 167-172.

[99] S. Takahashi, D-Aspartate oxidase: Distribution, functions, properties, and biotechnological applications, *Appl Microbiol Biotechnol* **104** (2020) 2883-2895.

[100] V. Guillén-Casla, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, Direct chiral determination of free amino acid enantiomers by two-dimensional liquid chromatography: application to control transformations in E-beam irradiated foodstuffs, *Anal Bioanal Chem* **397** (2010) 63-75.

[101] D.W. Aswad, Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of *o*-phthaldialdehyde, *Anal Biochem* **137** (1984) 405-9.

[102] T. Watanabe, K. Shibata, Y. Kera, R.-H. Yamada, Occurrence of freed-aspartate and aspartate racemase in the blood shell *Scapharca broughtonii*, *Amino Acids* **14** (1998) 353-360.

[103] A. Morikawa, K. Hamase, T. Inoue, R. Konno, A. Niwa, K. Zaitzu, Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase activity, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **757** (2001) 119-125.

[104] Y. Gogami, K. Okada, T. Oikawa, High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake, *J Chromatogr B* **879** (2011) 3259-3267.

[105] E. Rosini, G. Molla, C. Rossetti, M.S. Pilone, L. Pollegioni, S. Sacchi, A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase, *J Biotechnol* **135** (2008) 377-384.

[106] J.L. Still, M.V. Buell, et al., Studies on the cyclophorase system; D-Aspartic oxidase, *J Biol Chem* **179** (1949) 831-7.

[107] A. D'Aniello, A. Giuditta, Identification of D-aspartic acid in the brain of octopus *Vulgaris lam*, *J Neurochem* **29** (1977) 1053-1057.

[108] G. Sarower, Distribution and substrate specificity of D-amino acid and D-aspartate oxidases in

marine invertebrates, *ScienceAsia* **30** (2004) 335-40.

[109] M.G. Sarower, T. Matsui, H. Abe, Distribution and characteristics of D-amino acid and D-aspartate oxidases in fish tissues, *J Exp Zoo A Comp Exp Biol* **295** (2003) 151-159.

[110] Y. Kera, H. Aoyama, N. Watanabe, R.H. Yamada, Distribution of D-aspartate oxidase and free D-glutamate and D-aspartate in chicken and pigeon tissues, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **115** (1996) 121-6.

[111] A. Neidle, D.S. Dunlop, Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat, *Life Sci* **46** (1990) 1517-22.

[112] K. Zaar, A. Völkl, H.D. Fahimi, D-aspartate oxidase in rat, bovine and sheep kidney cortex is localized in peroxisomes, *Biochem J* **261** (1989) 233-238.

[113] M. Katane, Y. Seida, M. Sekine, T. Furuchi, H. Homma, *Caenorhabditis elegans* has two genes encoding functional D-aspartate oxidases, *FEBS J* **274** (2007) 137-149.

[114] R.-h. Yamada, Y. Kera, H. Toi, T. Hayashi, K. Arimoto, M. Takahashi, I. Iwazaki, S. Yamashita, Microbial oxidases of acidic D-amino acids, *J Mol Cat B: Enzymatic* **12** (2001) 93-104.

[115] S. Takahashi, K. Osugi, Y. Shimekake, A. Shinbo, K. Abe, Y. Kera, Characterization and improvement of substrate-binding affinity of D-aspartate oxidase of the thermophilic fungus *Thermomyces dupontii*, *Appl Microbiol Biotechnol* **103** (2019) 4053-4064.

[116] S. Takahashi, T. Kakuichi, K. Fujii, Y. Kera, R.-h. Yamada, Physiological role of D-aspartate oxidase in the assimilation and detoxification of D-aspartate in the yeast *Cryptococcus humicola*, *Yeast* **22** (2005) 1203-1212.

[117] R.-h. Yamada, H. Ujiie, Y. Kera, T. Nakase, K. Kitagawa, T. Imasaka, K. Arimoto, M. Takahashi, Y. Matsumura, Purification and properties of D-aspartate oxidase from *Cryptococcus humicolus* UJ1, *Biochim Biophys Acta* **1294** (1996) 153-158.

[118] S. Takahashi, T. Takahashi, Y. Kera, R. Matsunaga, H. Shibuya, R.H. Yamada, Cloning and expression in *Escherichia coli* of the D-aspartate oxidase gene from the yeast *Cryptococcus humicola* and characterization of the recombinant enzyme, *J Biochem* **135** (2004) 533-40.

[119] S. Fukunaga, S. Yuno, M. Takahashi, S. Taguchi, Y. Kera, S. Odani, R.-H. Yamada, Purification and properties of D-glutamate oxidase from *Candida boidinii* 2201, *J Ferment Bioeng* **85** (1998) 579-583.

[120] M. Wakayama, S. Nakashima, K. Sakai, M. Moriguchi, Isolation, enzyme production and characterization of D-aspartate oxidase from *Fusarium sacchari* var. *elongatum* Y-105, *J Ferment Bioeng* **78** (1994) 377-379.

[121] A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike, D-aspartate oxidase localisation in pituitary and pineal glands of the female pig, *J Neuroendocrinol* **22** (2010) 1165-72.

[122] M. Katane, Y. Saitoh, Y. Seida, M. Sekine, T. Furuchi, H. Homma, Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*, *Chem Biodivers* **7** (2010) 1424-34.

[123] A. Negri, G. Tedeschi, F. Ceciliani, S. Ronchi, Purification of beef kidney D-aspartate oxidase



overexpressed in *Escherichia coli* and characterization of its redox potentials and oxidative activity towards agonists and antagonists of excitatory amino acid receptors, *Biochim Biophys Acta* **1431** (1999) 212-22.

[124] M. Katane, T. Kawata, K. Nakayama, Y. Saitoh, Y. Kaneko, S. Matsuda, Y. Saitoh, T. Miyamoto, M. Sekine, H. Homma, Characterization of the enzymatic and structural properties of human D-aspartate oxidase and comparison with those of the rat and mouse enzymes, *Biol Pharm Bull* **38** (2015) 298-305.

[125] G. Tedeschi, A. Negri, F. Ceciliani, S. Ronchi, A. Vetere, G. D'Aniello, A. D'Aniello, Properties of the flavoenzyme D-aspartate oxidase from *Octopus vulgaris*, *Biochim Biophys Acta* **1207** (1994) 217-22.

[126] C. Setoyama, R. Miura, Structural and functional characterization of the human brain D-aspartate oxidase, *J Biochem* **121** (1997) 798-803.

[127] M. Wakayama, K. Takashima, Y. Tau, S. Nakashima, K. Sakai, M. Moriguchi, Spectrophotometric assay of D-aspartate and D-glutamate using D-aspartate oxidase with malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, *Anal Biochem* **250** (1997) 252-253.

[128] Y. Mutaguchi, T. Ohmori, H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Doi, T. Ohshima, Visible wavelength spectrophotometric assays of L-aspartate and D-aspartate using hyperthermophilic enzyme systems, *Anal Biochem* **409** (2011) 1-6.

[129] G. Molla, L. Piubelli, F. Volonte, M.S. Pilone, Enzymatic detection of D-amino acids, *Methods Mol Biol* **794** (2012) 273-89.

[130] P.D. Josephy, T. Eling, R.P. Mason, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates, *J Biol Chem* **257** (1982) 3669-75.

[131] S. Fornera, P. Walde, Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with *o*-phenylenediamine, *Anal Biochem* **407** (2010) 293-295.

[132] K. Tamaoku, Y. Murao, K. Akiura, Y. Ohkura, New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic spectrophotometric determination of hydrogen peroxide, *Anal Chim Acta* **136** (1982) 121-127.

[133] M. Fernández, M. Zúñiga, Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria, *Crit Rev Microbiol* **32** (2006) 155-183.

[134] J.E. Christensen, E.G. Dudley, J.A. Pederson, J.L. Steele, Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* **76** (1999) 217-46.

[135] A. Solopova, C. Formosa-Dague, P. Courtin, S. Furlan, P. Veiga, C. Péchoux, J. Armalyte, M. Sadauskas, J. Kok, P. Hols, Y.F. Dufrêne, O.P. Kuipers, M.-P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas, Regulation of cell wall plasticity by nucleotide metabolism in *Lactococcus lactis*\*, *J Biol Chem* **291** (2016) 11323-11336.

[136] M.N. Cahyanto, H. Kawasaki, M. Nagashio, K. Fujiyama, T. Seki, Regulation of aspartokinase, aspartate semialdehyde dehydrogenase, dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase in *Lactobacillus plantarum*, *Microbiology* **152** (2006) 105-112.

[137] C. Wu, J. Zhang, G. Du, J. Chen, Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress, *Appl*

*Microbiol Biotechnol* **97** (2013) 4083-4093.

[138] C.-L. Wang, A. Mulchandani, Ferrocene-conjugated polyaniline-modified enzyme electrodes for determination of peroxides in organic media, *Anal Chem* **67** (1995) 1109-1114.

[139] E. Choe, D.B. Min, Mechanisms and factors for edible oil oxidation, comprehensive reviews in *Food Sci Food Safe* **5** (2006) 169-186.

[140] N.C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry* **65** (2004) 249-259.

[141] G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu, The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature* **417** (2002) 463.

[142] S. Bellais, M. Arthur, L. Dubost, J.-E. Hugonnet, L. Gutmann, J. Van Heijenoort, R. Legrand, J.-P. Brouard, L. Rice, J.-L. Mainardi, Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*, *J Biol Chem* **281** (2006) 11586-11594.

[143] M. Kato, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, K. Imai, Determination of D-amino acids, derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F), in wine samples by high-performance liquid chromatography, *Biomed Chromatogr* **9** (1995) 193-194.

[144] I. Azua, I. Goiriena, Z. Bana, J. Iriberry, M. Unanue, Release and consumption of D-amino acids during growth of marine prokaryotes, *Microb Ecol* **67** (2014) 1-12.

[145] J.-J. Xiong, P.-C. Huang, C.-Y. Zhang, F.-Y. Wu, Colorimetric detection of Cu<sup>2+</sup> in aqueous solution and on the test kit by 4-aminoantipyrine derivatives, *Sens Actuators B Chem* **226** (2016) 30-36.

[146] F.S. Archibald, I. Fridovich, Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria, *J Bacteriol* **146** (1981) 928.

[147] S. Okada, 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性, *日本乳酸菌学会誌* **13** (2002) 23-36.

[148] H. Kinoshita, S. Imoto, Y. Suda, M. Ishida, Comparison of selectivity of MRS agar and modified LBS agar for isolation of lactobacilli, *Milk Sci* **60** (2011) 171-176.

[149] T.G. Obrig, W.J. Culp, W.L. McKeenan, B. Hardesty, The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes, *J Biol Chem* **246** (1971) 174-81.

[150] R.A. Packer, The use of sodium azide (NaN<sub>3</sub>) and crystal violet in a selective medium for Streptococci and *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *J Bacteriol* **46** (1943) 343-349.

[151] H.C. Lamont, W.L. Staudenbauer, J.L. Strominger, Partial purification and characterization of an aspartate racemase from *Streptococcus faecalis*, *J Biol Chem* **247** (1972) 5103-5106.

[152] T. Fujii, T. Yamauchi, M. Ishiyama, Y. Gogami, T. Oikawa, Y. Hata, Crystallographic studies of aspartate racemase from *Lactobacillus sakei* NBRC 15893, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **71** (2015) 1012-1016.

[153] P. Veiga, S. Piquet, A. Maisons, S. Furlan, P. Courtin, M.-P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas, Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan crossbridge, *Mol Microbiol* **62** (2006) 1713-1724.

- [154] H. Okada, M. Yohda, Y. Giga-Hama, Y. Ueno, S. Ohdo, H. Kumagai, Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria, *Biochim Biophys Acta* **1078** (1991) 377-382.
- [155] W. Staudenbauer, J.L. Strominger, Activation of D-aspartic acid for incorporation into peptidoglycan, *J Biol Chem* **247** (1972) 5095-5102.
- [156] S. Takahashi, K. Shimada, S. Nozawa, M. Goto, K. Abe, Y. Kera, Possible role of a histidine residue in the substrate specificity of yeast D-aspartate oxidase, *J Biochem* **159** (2016) 371-8.
- [157] S.M. Naser, P. Dawyndt, B. Hoste, D. Gevers, K. Vandemeulebroecke, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, J. Swings, Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses, *Int J Syst Evol Microbiol* **57** (2007) 2777-2789.
- [158] J. Goris, K.T. Konstantinidis, J.A. Klappenbach, T. Coenye, P. Vandamme, J.M. Tiedje, DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities, *Int J Syst Evol Microbiol* **57** (2007) 81-91.
- [159] F. Berthier, S.D. Ehrlich, Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA, *Int J Syst Evol Microbiol* **49** (1999) 997-1007.
- [160] C. Belfiore, R.R. Raya, G.M. Vignolo, Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*), *SpringerPlus* **2** (2013) 257.
- [161] R. Coppola, M. Succi, E. Sorrentino, M. Iorizzo, L. Grazia, Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise, *Le Lait* **83** (2003) 211-222.
- [162] E.M. Santos, I. Jaime, J. Rovira, U. Lyhs, H. Korkeala, J. Björkroth, Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”, *Int J Food Microbiol* **97** (2005) 285-296.
- [163] T. Yamashita, M. Ashiuchi, K. Ohnishi, S.i. Kato, S. Nagata, H. Misono, Molecular identification of monomeric aspartate racemase from *Bifidobacterium bifidum*, *Eur J Biochem* **271** (2004) 4798-4803.
- [164] K. Abe, S. Takahashi, Y. Muroki, Y. Kera, R.-h. Yamada, Cloning and expression of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent aspartate racemase gene from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii* and characterization of the recombinant enzyme, *J Biochem* **139** (2006) 235-244.
- [165] F. Fulyani, G.K. Schuurman-Wolters, D.-J. Slotboom, B. Poolman, Relative rates of amino acid import via the ABC transporter GlnPQ determine the growth performance of *Lactococcus lactis*, *J Bacteriol* **198** (2015) 477-485.
- [166] G. Gouridis, G.K. Schuurman-Wolters, E. Ploetz, F. Husada, R. Vietrov, M. de Boer, T. Cordes, B. Poolman, Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ, *Nature Struct Mol Biol* **22** (2015) 57-64.
- [167] M.R. Atkinson, S.H. Fisher, Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol* **173** (1991) 23-27.
- [168] K.J. Golden, R.W. Bernlohr, Nitrogen catabolite repression of the L-asparaginase of *Bacillus licheniformis*, *J Bacteriol* **164** (1985) 938-940.
- [169] T. Henríquez, J.C. Salazar, M. Marvasi, A. Shah, G. Corsini, C.S. Toro, SRL pathogenicity island

contributes to the metabolism of D-aspartate via an aspartate racemase in *Shigella flexneri* YSH6000, *PLOS ONE* **15** (2020) e0228178.

[170] B. Martínez, A. Rodríguez, S. Kulakauskas, M.-P. Chapot-Chartier, Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences, *FEMS Microbiol Rev* **44** (2020) 538-564.

[171] M. Richter, R. Rosselló-Móra, F. Oliver Glöckner, J. Peplies, JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison, *Bioinformatics* **32** (2016) 929-931.

[172] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72** (1976) 248-254.