

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程 進学
氏名 高山 敏充
指導教官名 正木 春彦

論文題目 *De novo* タンパク質合成系における D-アミノ酸の取り込みの研究

1. はじめに

生物学においてタンパク質は L-アミノ酸のみで構成されるのが常識である。しかし近年、D-アミノ酸を含んだタンパク質の存在を示す報告が増えている。その生成を説明するモデルとして、翻訳反応後に非酵素的あるいは酵素的に、L-アミノ酸から D-アミノ酸に異性化が起こるとされている。非酵素的異性化は、代謝回転されない歯や目などのタンパク質中の Asp 残基で多くみられ、加齢と共に D-アミノ酸の比率が高くなる傾向がある。これは Asp 側鎖が主鎖と反応して五員環を生じ、これを中間体とした異性化反応が原因だとされている。一方酵素的異性化の例としては、特定のセリン残基が特異的なイソメラーゼで D-アミノ酸に変換される、クモ毒の α -アガトキシン-TK などが知られている。

しかし可溶性タンパク質画分中の結合型 D-アミノ酸は、動物、植物、真性細菌、古細菌を含む広い生物において検出されており、アミノ酸によっては数パーセント以上になる例もある。非酵素的異性化は長い年月を要するので、世代の短い微生物には当てはまらない。また酵素的異性化で説明するには、それら全てに対応する膨大な数のイソメラーゼの存在を想定する必要がある。従って上記のモデルだけでこの現象を説明するのは困難であるので、私は全ての生物に普遍的な現象であるタンパク質合成反応の過程で、D-アミノ酸が直接取り込まれている可能性を考えた。

本研究では、大腸菌を用いて D-アミノ酸が *de novo* でタンパク質合成中に取り込まれる現象を検証した。まずタンパク質合成の最初期段階である tRNA のアミノアシル化が、D-アミノ酸を基質として起こりうるかを調べた。続いて tRNA と結合した D-アミノ酸が、リボソーム依存的にペプチドへ取り込まれるかを評価した。また翻訳終結段階として、解離因子によるペプチドの tRNA からの解離反応が、D-アミノ酸でどう影響されるかを調べた。更に D-アミノ酸添加の培養条件下で大腸菌に生産させたタンパク質を精製し、その中に D-アミノ酸が含まれるかどうかを調べた。

2. D-アミノ酸と tRNA との結合

D-Tyr, D-Trp, D-Asp は、各アミノアシル tRNA 合成酵素によって tRNA と結合することが過去に報告されている。本研究では、大腸菌から調製した tRNA 画分と精製した各合成酵素を用いて、L-アミノ酸および D-アミノ酸をアミノアシル化する反応を行った。これを酸性ゲルで電気泳動し、各 tRNA に対するプローブを用いたノザン解析で、アミノアシル化による泳動度の違いを検出した。グリシンを除く全ての L-アミノ酸および D-アミノ酸について調べたところ、新たに D-His, D-Lys でアミノアシル化反応が進行することを確認した。なお既報の D-Tyr, D-Asp のアミノアシル化反応は確認できたが、D-Trp では確認できなかった。なお、今回は全てのアミノ酸を通じて同じ反応条件で調べたが、アミノアシル化が確認されなかった他の D-アミノ酸でも今後詳細な条件検討および検出法の改善により、新たにアミノアシル化が確認される可能性は十分にある。

3. *in vitro* タンパク質合成系を用いたペプチド中への D-アミノ酸の取り込み

次いでリボソームによるペプチド転位反応に焦点を絞って D-アミノ酸の取り込みを調べた。*In vitro* で転写・精製した tRNA にあらかじめアミノ酸を酵素的に結合させたあと *in vitro* タンパク質合成中に加え、反応産物を HPLC で解析した。通常の *in vitro* 蛋白質合成系では、ラセマーゼや、D-アミノ酸-tRNA を特異的に加水分解するデアシラーゼが含まれるので、D-アミノ酸の取り込みが結果的に抑制される可能性がある。そこで翻訳に必要なすべての要素を精製して再構築した、大腸菌由来の蛋白質合成系である PURE System を用いた。

まず開始メチオニン(³⁵S 標識 L-fMet)の次に、D-アミノ酸として D-His あるいは D-Tyr がペプチド転移反応で結合するかどうかを調べた。ジペプチドをコードする RNA を鋳型として D-His-tRNA あるいは D-Tyr-tRNA を添加して反応させ、産物を酸沈殿させると沈殿画分(peptidyl-tRNA)に放射活性が得られたが、これをアルカリ処理 (tRNA との結合を切断) するとそれぞれ fMet-D-His, fMet-D-Tyr が遊離して生成された。すなわちリボソーム上で L-D のペプチド転移反応は起こるが、ジペプチジル tRNA の状態で留まっていると考えられた。上記の実験は解離因子として RF1 を用いているが、fMet-D-His は RF2 を添加しても同様に tRNA から解離しなかった。なお D-Tyr-tRNA と L-Tyr-tRNA の両方を添加すると、ほとんど fMet-L-Tyr のみが合成され、L-アミノ酸と D-アミノ酸が混在する時は L-アミノ酸が優先的に使用されることが示された。

トリペプチドをコードする RNA を鋳型とした反応では、産物を酸沈殿させると上清から fMet-D-His-L-Tyr を検出し、D-L のペプチド転移反応が進行すること、および tRNA からの解離も行われることを確認した。なお fMet-D-His-D-Tyr は本実験では確認できなかったため、D-D の反応は D-L より困難である可能性がある。また、アミノ酸の順番を変えた fMet-D-Tyr-L-His の十分な合成は現在のところ確認できていない。このことは、アミノ酸の種類とその配列によって D-

の使われ易さに違いがあることを示唆する。

以上の結果からリボソーム上でのペプチド合成において、L-アミノ酸から D-アミノ酸、および D-アミノ酸から L-アミノ酸へのペプチド転移反応はいずれも起こるが、解離因子依存の tRNA からの解離反応は、C 末端に L-アミノ酸がある時は進むが D-アミノ酸がある時は進まない、という一般化が示唆された。

更に peptidyl-tRNA hydrolase(PTH)の活性についても調べた。大腸菌は短いペプチド合成の際、一部を peptidyl-tRNA のままリボソームから drop-off することが知られている。drop-off したままだとタンパク質合成に使用する tRNA 量が減少するので、PTH はそれを回避するためにペプチドを tRNA から解離する。この欠損変異は致死となるので PTH は生育に必須の機能だと考えられる。上記の fMet-His-Tyr の合成時に、リボソーム画分から drop-off して生じたと思われる fMet-His-tRNA の性質を調べた。PTH を添加すると fMet-L-His-tRNA からペプチドは遊離されたが、fMet-D-His-tRNA からは遊離できなかった。従って PTH は release factor と同様、C 末端が D-アミノ酸の peptidyl-tRNA を基質として認識しにくいと考えられた。

4. *in vivo* のタンパク質合成における D-アミノ酸の取り込みについて

以上から、タンパク質合成装置は条件さえ揃えば D-アミノ酸を取り込みうることがわかったが、これを根拠に、自然界のいろいろな由来のタンパク質画分に、結合型の D-アミノ酸が検出される事実を説明するのは、まだ飛躍がある。少なくとも特定のタンパク質分子中に D-アミノ酸が取り込まれる例を示す必要がある。しかし D-アミノ酸を含むタンパク質分子は、含まない分子に比較していか程かタンパク質化学的な性質が変化し、機能も損なわれていると考えられるので、通常の精製過程を用いればこれらを排除してしまう可能性がある。そこで、C 末端に His タグを導入したグルタチオン-S-トランスフェラーゼ GST-His₆ をさまざまな培地で生育させた大腸菌で発現させ、これらをコバルトカラムで精製した画分のうち、グルタチオンカラムで回収される、すなわちグルタチオンに対する高い特異性を保った割合を比較した。その結果、D-アミノ酸を大量に含む合成培地で調製した標品の回収率が、L-アミノ酸からなる培地で得た標品に比べて有意な低下が見られ、前者が D-アミノ酸を分子に含む可能性が示唆された。

5. まとめ

L. M. Dedkova らは最近、大腸菌由来の *in vitro* タンパク質合成系を用い、サプレッサー tRNA に化学的に結合させた D-アミノ酸をタンパク質に導入することに成功した。彼らはリボソームを変異させることで D-アミノ酸の取り込み率を改善したが、野生型のリボソームでも有意の D-アミノ酸が導入されたデータが示されている(2003)。

本研究では、今までの科学の常識に反し、アミノアシル化からペプチド転移、翻訳終結に至るタ

ンパク質合成の全過程で、D-アミノ酸が基質として必ずしも排除されていないことを示唆した。また *in vivo* でも具体的なタンパク質分子中への D-アミノ酸の取り込みを示唆することができた。これは L-アミノ酸しか使わないとされた生物の、精密機械のようなイメージの根本的修正を求めるものである。また D-アミノ酸の含有は当然タンパク質の機能構造を損なうので、それを排除する普遍的な品質管理システムの存在も期待される。その一方で、タンパク質分子の構造と機能に関して、20 種のアミノ酸素材から 39 種の素材を使った分子デザインの可能性広げる期待がもたれる。