

タンパク質に含まれる D-アミノ酸残基の検出  
に関する研究

宮 本 哲 也

# 目次

## 序章

0-1. 研究背景	1
0-2. 本研究の目的	7
図表	9

## 第1章 塩酸加水分解0時間外挿法によるタンパク質中のD-アミノ酸残基の検出

### 第1節 精製タンパク質にD-アミノ酸残基が含まれている可能性の検証

1-1-1. 目的	11
1-1-2. 実験材料及び方法	13
1-1-3. 結果	21
1-1-4. 考察	23
図表	26

### 第2節 タンパク質生合成におけるD-アミノ酸取り込みの検討

1-2-1. 目的	43
1-2-2. 実験材料及び方法	44
1-2-3. 結果	46
1-2-4. 考察	48
図表	50

## 第2章 酸加水分解反応におけるペプチド異性化の検証

2-1-1. 目的	53
2-1-2. 実験材料及び方法	55
2-1-3. 結果	57

2-1-4. 考察	60
図表	63
第3章 重水素ラベルを用いたタンパク質中の D-アミノ酸残基の検出	
第1節 タンパク質中の D-アミノ酸残基の直接的検出法の構築	
3-1-1. 目的	76
3-1-2. 実験材料及び方法	78
3-1-3. 結果	80
3-1-4. 考察	82
図表	84
第2節 精製タンパク質中の D-アミノ酸残基の検出	
3-2-1. 目的	88
3-2-2. 実験材料及び方法	89
3-2-3. 結果	93
3-2-4. 考察	95
図表	98
第4章 D-アミノ酸含有タンパク質の存在検証	
第1節 総可溶性画分からの D-アミノ酸含有タンパク質の探索	
4-1-1. 目的	107
4-1-2. 実験材料及び方法	109
4-1-3. 結果	111
4-1-4. 考察	112
図表	114
第2節 ovalbumin の熱安定型遷移に伴う Ser 残基異性化の研究	
4-2-1. 目的	116

4-2-2. 実験材料及び方法	118
4-2-3. 結果	120
4-2-4. 考察	122
図表	125
第3節 アルカリ条件下におけるタンパク質異性化の研究	
4-3-1. 目的	127
4-3-2. 実験材料及び方法	128
4-3-3. 結果	130
4-3-4. 考察	131
図表	133
終章 総合討論	135
参考文献	140
謝辞	152
論文内容の要旨	



## 序章

### 0-1. 研究背景

還元的な原始地球環境を模した条件における放電実験により、水素、メタン、アンモニア、水などの単純な分子からアミノ酸を含む生体の素材となる分子が非生物的に合成されることが、Miller の実験によって示された [Miller, 1953]。この時に生成するアミノ酸は、D 体と L 体が等量存在するラセミ体である。アミノ酸の化学合成においても、不斉合成を行わない限り、ラセミ体が得られる。それにも関わらず、タンパク質を構成するアミノ酸は、不斉炭素を持たない Gly 以外 L-アミノ酸のみである（ホモキラリティー）というのが古くからの常識である。なぜタンパク質が L-アミノ酸のみを選択するようになったのかは、現在でも L-アミノ酸が結晶化の過程や地球磁場により過剰になったとする地球起源説や、L-アミノ酸が宇宙で発生して隕石が運んできたとする宇宙起源説があり、生命の起源における最大の謎とされている。この起源は不明ではあるものの、生体を構成するアミノ酸は L 体のみであると長い間言われてきた。例外的にリボソーム非依存的に合成される細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカンやペプチド性抗生物質には D-アミノ酸が含まれていることは知られていた。しかし、近年の微量分析技術や光学分割技術の発達に伴って、微生物・植物・動物に至る様々な生物種において、予想以上に多くの D-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。

植物では、古くから D-アミノ酸が存在していることが知られていた。例えば、エンドウマメ (*Pisum sativum*) の芽生えに遊離の D-Ala, D-Asp, D-Glu が、イネ (*Oryza australiensis*) にジペプチド D-Ala-D-Ala が含まれるなど、幅広い植物に

遊離型及び結合型として存在していることが判っている [Ogawa *et al.*, 1977; Manabe, 1985]。近年では、様々な野菜や果物中にも微量の遊離 D-アミノ酸が見出されている [Brückner *et al.*, 2003]。しかし、植物における D-アミノ酸の明確な生理的機能は未だ明らかとなっておらず、その解明が待たれる。水生無脊椎動物のエビ・カニ類や二枚貝には、多くの D-Ala が存在していることが知られている。淡水から海水への順応に伴って、神経組織や筋肉中の D-Ala 量が上昇することが明らかとなっており、D-Ala は Gly, L-Pro などと共に細胞内浸透圧調節物質として重要な役割を果たしている [Abe *et al.*, 2005]。また、哺乳類の脳、松果体、下垂体、精巣などには多量の D-Asp が存在しており、松果体ではメラトニン合成・分泌の抑制、下垂体前葉ではプロラクチンの分泌促進、視床下部や下垂体後葉ではオキシトシン・バソプレッシンの産生調節、精巣ではテストステロン産生の亢進に働くなど、様々な生理機能を担っている [D'Aniello, 2007; Homma, 2007]。また、哺乳類の脳、海馬、視床下部などには多量の D-Ser が存在しており、L-Glu のコアゴニストとしてイオンチャネル型受容体である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の glycine 結合部位に結合して、L-Glu による興奮を亢進することが明らかとなっている [Nishikawa, 2005; Pollegioni *et al.*, 2010]。この NMDA 受容体は興奮性神経伝達、シナプス可塑性、学習、記憶といった高次脳機能において非常に重要な働きを有しており、現在では脳内の D-Ser レベルと統合失調症との関連が指摘されており、盛んに研究が行われている。また、D-アミノ酸の一種である NMDA は、様々な動物体内に内在性物質として存在することが確認されており、その機能の詳細は未だ不明とされているが、D-Asp がその前駆体であると考えられている [D'Aniello *et al.*, 2000]。特に最近では、D-Leu, D-Met などの D-アミノ酸が *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis* において細胞壁ペプチドグリカン形成を制御していることや、*B. subtilis*,

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* においてバイオフィルムの分解に働いていることが報告された [Lam *et al.*, 2009; Kolodkin-Gal *et al.*, 2010]。いずれも、D-Ala の代わりにこれらの D-アミノ酸がペプチドグリカン中に取り込まれることによると考えられている。このように遊離型 D-アミノ酸は、様々な生物の生命活動にとって非常に重要な役割を担っている。

一方、いくつかの動物由来のペプチド及びタンパク質に D-アミノ酸残基が含まれているという報告がある。例えば、クモ毒である  $\omega$ -agatoxin は 46 番目の Ser、イモ貝類の分泌する conotoxin は 44 番目の Phe、カモノハシが生産する蹴爪毒である DLP-2 は 2 番目の Met が特異的に D 体となっている [Heck *et al.*, 1994; Buczek *et al.*, 2005; Whittington *et al.*, 2009]。これらの D-アミノ酸残基は、生理活性ペプチドとしての有効性や受容体への結合に不可欠である。また、老化組織あるいは病変組織中のタンパク質に D-アミノ酸残基が含まれていることが明らかとなっている。例えば、水晶体の主要構成成分である  $\alpha$ -crystallin,  $\beta$ -amyloid protein, myelin basic protein, elastin の特定部位に D-Asp 残基が見出されており、それぞれ白内障、アルツハイマー病、動脈硬化、皮膚硬化などの病気あるいは老化・劣化との関連が指摘されている [Fujii *et al.*, 1994; Roher *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1986; Fujii *et al.*, 2002]。

ペプチド及びタンパク質に含まれる D-アミノ酸残基の起源には、翻訳後の酵素的異性化、あるいは非酵素的異性化や、翻訳時の D-アミノ酸の取り込みが考えられる。先に述べた  $\omega$ -agatoxin、conotoxin、DLP-2 に含まれる D-アミノ酸残基は、それぞれ特異的なイソメラーゼによる酵素的異性化で生じることが報告されている。また、 $\alpha$ -crystallin や  $\beta$ -amyloid protein などに見られる D-Asp 残基は、経年的な非酵素的異性化で生成すると考察されている (Fig. 0-1) [Fujii *et al.*, 1999]。一方、タンパク質合成反応によって D-アミノ酸が取り込まれるという

例は知られておらず、この現象が起こりうるかどうかは明らかとなっていない。そこで以前、当研究室の高山により D-アミノ酸がペプチド中に取り込まれる可能性についての検証が行われた。D-アミノ酸がタンパク質生合成で取り込まれるためには、下記の三つのステップを乗り越える必要がある。ここで問題となるのは、(1)tRNA 合成酵素により tRNA が D-アミノ酸でアミノアシル化され、伸長因子によってリボソームに運ばれるか、(2)ペプチド転位反応の基質となるか、(3)解離因子により tRNA からペプチドが遊離するかである。(1)については、すでに D-Tyr, D-Asp, D-Trp が L-アミノ酸より効率は落ちるものの、それぞれの tRNA に結合できることが報告されている [Calendar *et al.*, 1967; Soutourina *et al.*, 2000]。これに加え、高山は D-His, D-Lys についても *in vitro* でそれぞれの tRNA と結合することを示した [Takayama *et al.*, 2005]。さらに、(2)について D-His, D-Tyr がペプチド転移反応の基質となるかどうかを *in vitro* で調べた [高山, 2004]。モデルとなるジペプチドをコードする RNA を鋳型として開始 fMet-tRNA、D-His-tRNA あるいは D-Tyr-tRNA を基質として *in vitro* 翻訳反応を行わせると、fMet-D-His-tRNA、fMet-D-Tyr-tRNA がそれぞれ生成されたが、ペプチドは tRNA から弱アルカリ処理で初めて遊離した。また、トリペプチドをコードする RNA を鋳型とした反応では、遊離の fMet-D-His-L-Tyr が検出された。以上の結果より、これらの D-アミノ酸はペプチド中に取り込まれ、L-アミノ酸から D-アミノ酸、及び D-アミノ酸から L-アミノ酸へのペプチド転移反応が本質的には起こりうることを示された。さらに、Goto らは *in vitro* で L-Met だけでなく、それぞれ 19 種類の D, L-アミノ酸が翻訳のイニシエーターとして許容されることを報告している [Goto *et al.*, 2008]。さらに、この報告の中で D-Ser についてはペプチド伸長反応中に取り込まれていることを示唆するデータが示されていた。

もし、タンパク質中にD-アミノ酸が取り込まれた場合、その分子はどのよう

な挙動を示すのだろうか。Dedkovaらは*in vitro*反応でluciferase、及びdihydrofolate reductase (DHFR) にサプレッサーtRNAを用いてD-アミノ酸を導入した [Dedkova *et al.*, 2006]。この研究により、活性部位あるいはその近傍以外にD-アミノ酸が導入された場合は、活性にほとんど影響を及ぼさないことを示した。従って、タンパク質分子は本質的に、少なくとも活性や立体構造に影響を与えない領域では、D-アミノ酸の取り込みに対して許容性があると考えられる。

ただし、活性や立体構造に悪影響を及ぼす部位に D-アミノ酸残基が含まれている場合、これらは排除されなければならないはずである。前述したように、タンパク質中に D-アミノ酸残基が生じたことが、病気や劣化の原因となる可能性がある。これに対する防御機構として、L-Asn 及び L-Asp 残基の非酵素的異性化によって生じる D-Asp 及び L-isoAsp 残基を修復する酵素 protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase (PIMT) が、原核生物から真核生物に幅広く存在していることが知られている。PIMT は D-Asp の遊離の $\beta$ -カルボキシル基、及び L-isoAsp の遊離の $\alpha$ -カルボキシル基を認識し、S-adenosyl-L-methionine (SAM) からのメチル基転移反応を触媒する酵素である。PIMT によりメチル化された D-Asp, L-isoAsp は速やかに環状イミド中間体へと変換され、L-Asp へと修復される [Clarke, 2003; Shimizu *et al.*, 2005]。さらに最近、D-Asp 残基を含むペプチド及びタンパク質を切断するペプチダーゼが発見された。哺乳類から単離された D-aspartyl endpeptidase (DAEP) は、肝臓、脾臓、腎臓などで比活性が高く、細胞内ではミトコンドリア内膜に存在していることが判っており、有害な D-Asp 含有タンパク質の蓄積を防いでいると期待されている [Kinouchi *et al.*, 2007]。また、菌体外酵素ではあるが *Bacillus cereus*、*Paenibacillus* sp から、それぞれ D-Phe, D-Asp 残基を含むペプチドを切断するペプチダーゼが単離されている [Asano *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2006]。これらに続いて、当研究室の濱口は *B.*

*subtilis* において D-Lys, D-Arg 残基を、*Bacillus megaterium* において D-Leu, D-Phe, D-Met, D-Val 残基を含むペプチドを切断するエンドペプチダーゼを細胞内から発見した [Hamguchi *et al.*, 2009]。この二つの酵素はその特異性と存在場所から細胞壁合成とは無関係であると考えている。このように品質管理機構に働いていると想定される酵素が様々な生物に渡って発見されていることは、D-アミノ酸含有タンパク質が普遍的に存在していることを裏付けているのかもしれない。

さらに、真正細菌・古細菌・真核生物の総可溶性高分子画分に有意の結合型 D-アミノ酸が含まれているという報告がある [Nagata *et al.*, 1998]。これによると、多くの生物種に結合型 D-アミノ酸 (D-Ser, D-Ala, D-Pro, D-Glu, D-Asp) が 1% 前後含まれていることになる (Table. 0-1)。著者らが主張しているわけではないが、この結果は、一般のタンパク質に広く有意の D-アミノ酸残基が含まれているという可能性を強く期待させる。もしこれが事実であれば、生体タンパク質は全て L-アミノ酸のみから構成されているという一般常識を大きく覆すことになる。ただし、可溶性高分子画分にはタンパク質以外の物質も含まれるため、精製タンパク質を対象とした検証が必要である。

以上のことをふまえると、タンパク質が完全に L-アミノ酸のみから構成されているという証拠はなく、タンパク質は L-アミノ酸のみから構成されているというこれまでの常識は厳密に調べられずに唱えられたものではないかと推察される。ただし、以前の分析技術では微量に D-アミノ酸残基が存在していたとしても、これを正確に捉えることはできなかったと想像される。微量分析技術や光学分割技術が発達した現在であるからこそ、タンパク質分子に D-アミノ酸残基が含まれている可能性を精査する意味があるのではないかと考えた。

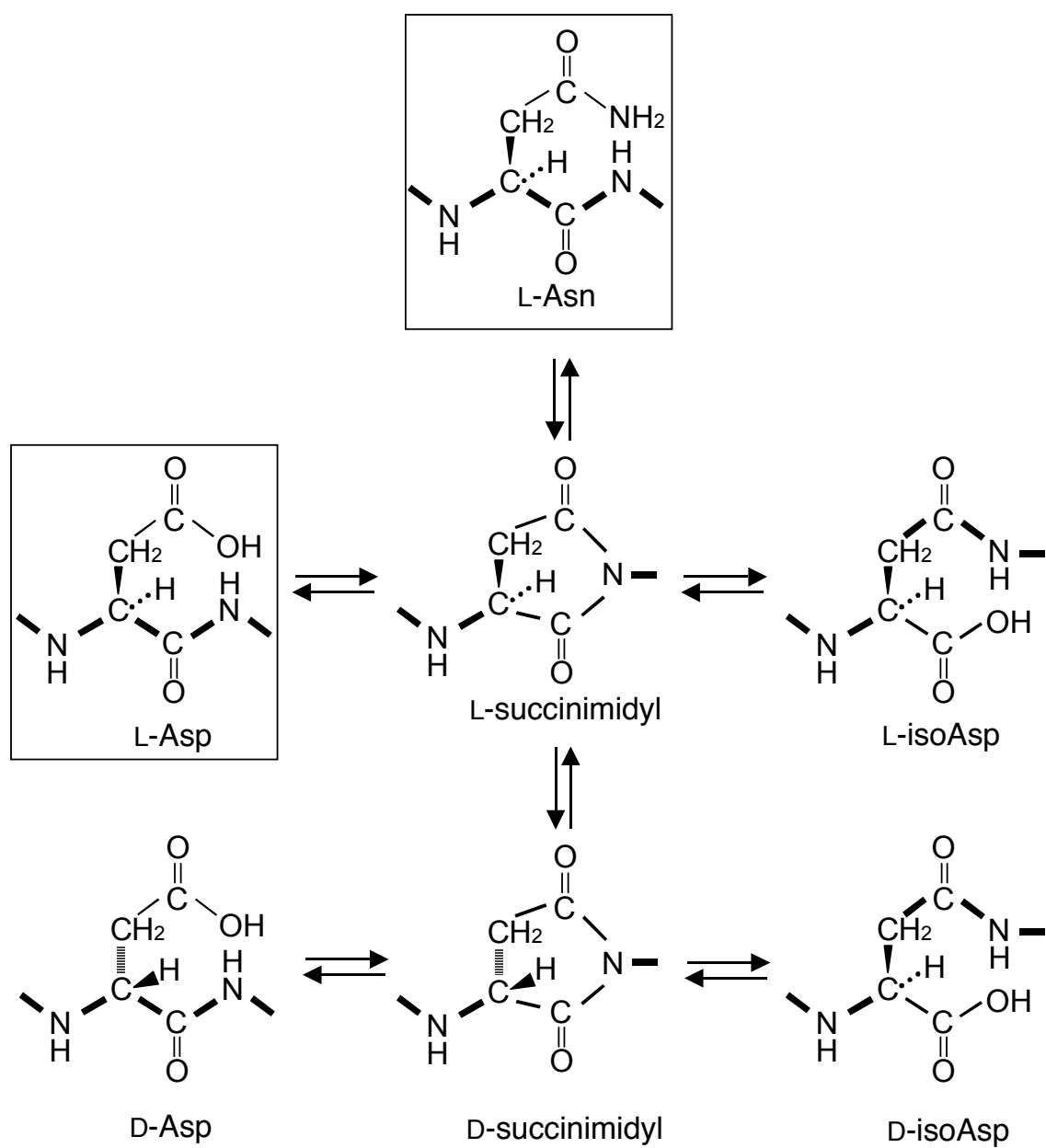
## 0-2. 本研究の目的

本研究は、*in vivo* で合成されたタンパク質に実際に D-アミノ酸残基が含まれているかどうかを検証することを目的とした。タンパク質は L-アミノ酸のみから構成されているというのが常識とされているが、現在の微量分析技術を用いて正確にこれを検証した研究はない。タンパク質に含まれている D-アミノ酸残基を検出する方法としては、タンパク質の塩酸加水分解処理に伴って生じる D-アミノ酸を経時的に定量し、これを 0 時間へ外挿することによって求める 0 時間外挿法が一般的に用いられている。このようなアミノ酸のラセミ化を利用した手法は、古生物学における年代測定、歯のエナメル質や象牙質からの身元不明死体の年齢推定、環境試料中のアミノ酸の D/L 比測定などに幅広く応用されている [Goodfriend, 1992; Ohtani, 1995; 工藤ら, 2003]。また、Nagata らによる種々の生物から抽出した総可溶性高分子画分中からの結合型 D-アミノ酸の検出もこの手法によるものである [Nagata *et al.*, 1998]。

本研究の第 1 章では、Nagata ら (1998) の用いた塩酸分解 0 時間外挿方法に準じて、*Escherichia coli* で合成した二つの精製タンパク質 ( $\beta$ -galactosidase, urocortin) についてそれぞれの D-アミノ酸含量を求めた。第 2 章では、0 時間外挿法によりタンパク質の D-アミノ酸含量を正確に定量できているかどうか、この手法自体の検証を行った。タンパク質の加水分解中に遊離したアミノ酸にはラセミ化反応が起こるが、これとは別にペプチド状態でアミノ酸が異性化している可能性を想定し、これを検証した。第 3 章では、重塩酸加水分解を利用した別法を構築し、タンパク質の D-アミノ酸含量を求めた。重塩酸加水分解中に異性化したアミノ酸を重水素でラベルし、タンパク質内在性の D-アミノ酸残基と分子質量 1 の違いにより区別することで、より正確な定量を可能とした。

第 4 章では、第 3 章で構築した重水素ラベル法を用いて、種々の生物から抽出した総可溶性画分を対象に D-アミノ酸含有タンパク質を探索した。続いて、現在 X 線結晶構造解析により D-アミノ酸残基を含むことが示唆されているタンパク質（熱安定型 S-ovalbumin）から D-アミノ酸残基の検出を試みた。さらに、数種類のタンパク質を穏やかなアルカリ条件下に晒すことで、D-アミノ酸残基が分子内に生じるかどうかを調べた。食品タンパク質では、アルカリ処理により D-アミノ酸残基が生じることが古くから知られている。以上を通じて、これまでのタンパク質内在性 D-アミノ酸残基の検出法を評価し、正確な検出法を用いて、精製タンパク質に D-アミノ酸残基が含まれる可能性、及び D-アミノ酸含有タンパク質の存在を検証した。





**Fig. 0-1** タンパク質中におけるAsn及びAsp残基の異性化機構

Asn・Asp 残基の側鎖のカルボニル炭素が、C 末端側隣接残基の窒素原子から求核攻撃を受けることで五員環イミドが形成される。この際、イミド上で反転し、D-イミド体が形成された後に開環すると D-Asp と D-isoAsp 残基が生成される。

**Table 0-1. 総可溶性高分子画分の D-アミノ酸含量**

生物種	D/(D+L) (%)				
	Ser	Ala	Pro	Glu	Asp
Eubacteria, Gram (+)					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.84	11.67	0.83	3.09	1.01
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.32	10.31	0.39	5.02	1.50
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.81	0.81	0.32	1.86	1.50
<i>Bacillus</i> sp. PS3	1.65	0.68	0.54	1.02	1.31
<i>Bacillus</i> sp. YN-1	0.33	5.21	1.11	22.32	1.19
Eubacteria, Gram (-)					
<i>Synechococcus vulcanus</i>	0.02	1.12	0.24	0.68	1.67
<i>Escherichia coli</i>	0.13	0.70	0.40	1.59	1.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.77	0.29	0.61	0.68	1.67
<i>Helicobacter pylori</i>	0.77	0.87	0.25	1.90	1.34
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1.82	1.14	0.35	1.86	1.48
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	2.16	0.01	0.98	7.96	0.84
Archaea					
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	2.91	0.67	0.65	1.24	3.95
<i>Sulforobus acidocaldarius</i>	1.05	0.40	0.16	0.34	0.17
<i>Methanosarcina barkeri</i>	0.22	0.45	0.29	0.63	0.74
<i>Halobacterium salinarium</i>	0.15	0.46	0.37	1.12	1.53
Eukaryotes					
<i>Physarum polycephalum</i>	0.44	0.57	0.96	2.22	2.21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.02	0.80	0.68	1.61	1.79
Spinach (leaf)	1.00	0.90	0.63	1.58	0.71
Rat (liver)	0.68	1.06	1.02	1.66	1.83

Nagata Y *et al.* (1998) *Biochim Biophys Acta*, **1379**, 76-82

## 第 1 章

### 塩酸加水分解 0 時間外挿法による タンパク質中の D-アミノ酸残基の検出

#### 第 1 節 精製タンパク質に D-アミノ酸残基が含まれている可能性の検証

##### 1-1-1. 目的

本章では、タンパク質の D-アミノ酸含量を求めるために、古くから一般的に使用されてきた、熱塩酸による完全加水分解物をキラル分析して得た値を加水分解時間 0 時間に外挿して求める方法（以降、0 時間外挿法と呼ぶ）を用いることにした。Nagata らも 0 時間外挿法を用いて、各生物種の総可溶性高分子画分中から結合型 D-アミノ酸を見出している [Nagata *et al.*, 1998]。この方法には、加水分解されて生じた遊離アミノ酸の経時的なラセミ化効果を取り除けば、タンパク質の真の D-アミノ酸含量が得られるというのが前提にある。まず、市販の遊離 L-アミノ酸についてモック実験を行い、得られた 0 時間外挿値（D-アミノ酸含量）が製品の実測値と比較して、信頼性のある数値を示すかどうかを確認した。

タンパク質そのものに D-アミノ酸残基が含まれている可能性を検証するためには、生物の細胞や組織の抽出物といった混合物ではなく、精製したタンパク質を直接調べる必要がある。本研究では、代表的なタンパク質として *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase を、より小さいタンパク質で、かつ *E. coli* で生合成に成功したヒト urocortin を分析対象として選んだ。 $\beta$ -galactosidase は四量体を形成しており、一つのサブユニットは 1023 残基から構成されている。urocortin は

sauvagine/corticotropin-releasing factor/urotensin I ファミリーに属する 40 残基のニューロペプチドである。化学合成した urocortin が市販されており、化学合成品では D-アミノ酸残基が含まれていない、あるいは含まれていたとしても生合成品とは異なるパターンを示すはずであると考えた。

本研究のタンパク質の精製は、アフィニティー精製に限った。タンパク質に D-アミノ酸残基が含まれている場合、その部位や数によっては、分子活性が低下することが予想される。その際、比活性を指標とした通常の精製方法では、D-アミノ酸残基を含むタンパク質分子を選択的に排除してしまい、L-アミノ酸残基のみからなる分子を濃縮してしまう可能性があると考えた。これが、今まで D-アミノ酸残基を含む分子が検出されなかった原因であると考えられる。そこで、タンパク質の機能（比活性）に影響されない His-Tag によるアフィニティー精製を用いた。

本節では、*E. coli* で合成した二つのタンパク質から有意の量の D-アミノ酸残基 (D-Ala, D-Leu, D-Phe, D-Val, D-Asp, D-Glu) が再現性よく検出できるかどうかを、これまでタンパク質の D-アミノ酸含量推定に広く用いられてきた塩酸加水分解 0 時間外挿法により解析を行った。これら 6 種類の D, L-アミノ酸は、今回用いたキラル分析システムで感度良く検出できた。なお、酸加水分解処理により、Asn 及び Gln はそれぞれ Asp、Glu として検出される。さらに、ヒト由来のタンパク質として市販の serum albumin の分析を同様にを行い、*E. coli* で合成したタンパク質の分析結果と比較した。

なお、本章の主な研究成果は、文献 [Miyamoto *et al.*, 2010a] として発表した。

## 1-1-2. 実験材料及び方法

### 1-1-2-1. *Escherichia coli*

$\beta$ -galactosidaseの生産宿主として、*E. coli* K-12 MG1655株 (F,  $\lambda$ ) (今泉明博士 (味の素株式会社) より恵与) を用いた。urocortinの生産宿主には、*E. coli* BL21 (DE3) 株 (F, *dcm*, *ompT*, *hsdS* ( $r_B^- m_B^-$ ), *gal*) を用いた。プラスミド作製の宿主には、*E. coli* DH5 $\alpha$ 株 (F,  $\lambda$ , *deoR*, *supE44*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*, *hsdR17* ( $r_k^- m_k^-$ ),  $\Delta(lacZYA-argF)U169$ ,  $\phi80lacZ \Delta M15$ ) を用いた。*lacI*遺伝子をPCRで得る際の鋳型には、*E. coli* W3110株 (F,  $\lambda$ ) のゲノムを用いた。*lacI*発現プラスミドを作製する際の宿主には、*E. coli* RR1株 (*supE44*, *hsdS20*, *ara-14*, *proA2*, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *mcrB*) を用いた。

### 1-1-2-2. L-アミノ酸

L-Ala, L-Ser, L-Leu, L-Phe, L-Val, L-Asp, L-Glu は、ペプチド研究所 (大阪) 製品を使用した。各 L-アミノ酸の公称 D-アミノ酸含量は、L-Ala: <0.01%, L-Ser: 0.47%, L-Leu: 0.01%, L-Phe: 0.02%, L-Val: <0.01%, L-Asp: <0.01%, L-Glu: 0.04%である。

### 1-1-2-3. 培地組成

L-broth 培地の組成は、1% Bacto Tryptone (Difco), 0.5% Bacto Yeast Extract (Difco), 0.5% NaCl (国産化学) である。寒天培地として使用する際は、最終濃度 1.5%となるように寒天粉末 (国産化学) を加えた。

M9 最少培地の組成は、0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 0.05% NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4% glucose あるいは 0.4% galactose である。薬剤耐性に応じて、ampicillin sodium (和光純薬工業) を最終濃度 100  $\mu$ g/ml、

chloramphenicol (和光純薬工業) を最終濃度 30  $\mu\text{g/ml}$  となるように加えた。

#### 1-1-2-4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

$\beta$ -galactosidase の SDS-PAGE は、分離ゲル (10% acrylamide, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS)、濃縮ゲル (4.5% acrylamide, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS)、Running buffer (2.5 mM Tris, 19.2 mM glycine, 0.01% SDS), Loading buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue)、染色液 (SimplyBlue SafeStain; Invitrogen) で行った。

urocortin の SDS-PAGE は、分離ゲル (15% acrylamide, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS)、Running buffer (100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0.1% SDS) で行った。その他の組成は、 $\beta$ -galactosidase と同様である。

#### 1-1-2-5. $\beta$ -galactosidase 発現プラスミドの構築

pMC1871 の *SmaI*-*SalI* 断片 (*lacZ* 遺伝子全長をコード) を pTV118N の *SmaI*-*SalI* サイトの間に導入した pTV118N-*lacZ* を基にして、*lacZ* 遺伝子の N 末端に His-Tag 遺伝子を導入した [Casadaban *et al.*, 1983]。構築図を Fig. 1-1 に示した。His-Tag 遺伝子を含む合成 DNA (FW : 5'-CATGGGCCATCATCATCATCATCCCC-3', RV : 5'-GGGATGATGATGATGATGATGGCC-3') を 95°C で 5 分間加熱処理を行い、アニーリングさせた。得られた二本鎖 DNA を *NcoI*, *SmaI* で処理した pTV118N-*lacZ* とライゲーション (T4 DNA ligase; TaKaRa) させ、pTV118N-His-*lacZ* を作製した。

#### 1-1-2-6. *lacI* 発現プラスミドの構築

$\beta$ -galactosidase の非誘導時のリーク発現を抑えるためのプラスミドを作製す

るために、pACYC184 に *lacI* 遺伝子を導入した。*lacI* 遺伝子は、*E. coli* W3110 株のゲノムを鋳型として、5'末端に *Cla*I サイト (下線)、3'末端に *Hind*III サイト (下線) を導入するように設計したプライマー (FW : 5'-CCCATCGATTTACG TTGACACCATCGAATGG-3', RV : 5'-CCCAAAGCTTACTGCCCCGCTTTCCAGTCG GGA-3') を用いて、PCR により増幅した。得られた PCR 断片を pACYC184 の *Cla*I サイトと *Hind*III サイトの間に挿入し、pACYC184-*lacI* を作製した。これにより、pACYC184 の *tet* プロモーターの活性はなくなり、挿入断片の 5'末端は *lacI* プロモーターの-35 領域以降を完全に含むため、挿入断片には本来のプロモーターが含まれている。このプラスミドを導入された *E. coli* は、リプレッサー-LacI を恒常的に発現する。

#### 1-1-2-7. $\beta$ -galactosidase の生産

pTV118N-His-*lacZ* と pACYC184-*lacI* を導入した *E. coli* MG1655 株を ampicillin (100  $\mu$ g/ml) と chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml) を含む 10ml の L-broth 培地で 37°C、約 12 時間振盪培養した後、集菌した。M9 最少培地 (0.4% glucose) で 2 回洗浄した後、100 ml の M9 最少培地 (0.4% glucose) に  $OD_{660} \doteq 0.1$  となるように植菌した。37°C で  $OD_{660}=0.6\sim 0.8$  まで振盪培養した後、集菌した。これを 400 ml の M9 最少培地 (0.4% galactose) に  $OD_{660}=0.1\sim 0.2$  となるように植菌した。37°C で振盪培養し、 $OD_{660} \doteq 0.5$  で isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度 1 mM となるように加えることで発現誘導を行った。誘導後、さらに 12 時間振盪培養し、集菌した。

#### 1-1-2-8. $\beta$ -galactosidase の精製

$\beta$ -galactosidase の精製には、His SpinTrap (GE Healthcare) を使用した。菌体を

binding buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.4) に懸濁後、超音波破碎を行った。菌体破碎後の上清画分に 1 M imidazole (pH 7.0) を最終濃度 100 mM となるように添加した後、His SpinTrap にアプライした。wash buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 7.4) で数回洗浄し、elution buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) で溶出した。

溶出画分は、VIVASPIN 500 MWCO 30,000 (Vivascience AG) を用いて、脱塩と濃縮を行った。タンパク質溶液体積を 25  $\mu$ l になるまで濃縮し、475  $\mu$ l の 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) を加え、再度濃縮を行った。これをさらに 2 回繰り返した。精製後の $\beta$ -galactosidase の SDS-PAGE を Fig. 1-2 に示した。

#### 1-1-2-9. urocortin 発現プラスミドの構築

urocortin 遺伝子は、アミノ酸配列 (DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERA EQNRIIFDSV; 40 残基) から *E. coli* の最適コドンに基づいて合成した。また、これらの合成 DNA (FW : 5'-GACAACCCGTCTCTGTCTATCGACCTGACCTTCC ACCTGCTGCGTACCCTGCTGGAACTGGCGCGTAC-3', RV : 5'-AACAGAGTCG AAGATGATACGGTTCTGTTCCGCACGTTACGCTGAGACTGGGTACGCGCCA GTTCC-3') を、下線で示した 15 bp が相補的となるように設計した。これを Klenow Fragment (TaKaRa) を用いて 37°C で 1 時間処理し、それぞれの末端まで DNA を伸長させ、二本鎖とした。その断片のクローニング用に SD 配列と開始コドンを含む *Nde*I サイト (下線) を付加した FW プライマー (5'-GGGAATTCATCCATATGGACAACCCGTCTCTGTCTATC-3')、His-Tag コード領域と終始コドン、*Xho*I サイト (下線) を付加した RV プライマー (5'-AATCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGAACAGAGTCGAAGATGATACG-



3') を用いて、PCR を行った。得られた断片を *Nde*I と *Xho*I で切り出して、pET43a の *Nde*I サイトと *Xho*I サイトの間に挿入し、pET43a-urocortin-His を作製した。

#### 1-1-2-10. urocortin の生産

pET43a-urocortin-His を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 株を ampicillin (100 µg/ml) を含む L-broth 培地で 37°C、約 12 時間振盪培養した後、集菌した。M9 最少培地 (0.4% glucose) で 2 回洗浄した後、100 ml の M9 培地 (0.4% glucose) に OD<sub>660</sub> ≒ 0.1 となるよう植菌した。37°C で OD<sub>660</sub> ≒ 0.5 まで振盪培養した後、集菌した。これを 400 ml の M9 最少培地 (0.4% glucose) に OD<sub>660</sub> = 0.1~0.2 となるように植菌した。37°C で振盪培養し、OD<sub>660</sub> = 0.6~0.8 で IPTG を最終濃度で 0.4 mM となるように加え、発現誘導を行った。誘導後、さらに 6 時間振盪培養し、集菌した。

#### 1-1-2-11. urocortin の精製

urocortin の精製には、His SpinTrap を使用した。urocortin は不溶性画分に回収されたため、6 M urea 存在下でカラム精製を行った。buffer の組成は、wash buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole, 6 M urea, pH 7.4)、elution buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 300 mM imidazole, 6 M urea, pH 7.4) である。

脱塩・濃縮には、Sep-Pak C18 Cartridges (Waters) を使用した。溶出したタンパク質溶液に、最終濃度 0.05% となるように trifluoroacetic acid (TFA) を加え、Sep-Pak C18 Cartridges にアプライした。0.05% TFA 水溶液 500 µl で洗浄し、0.05% TFA を含む 80% acetonitrile 500 µl で 2 回溶出した。溶出画分は、凍結乾燥を行った。乾燥した試料は、Milli-Q 水に溶解した。精製後の urocortin の SDS-PAGE

を Fig. 1-3 に示した。

#### 1-1-2-12. 塩酸加水分解

タンパク質の加水分解には、PICO TAG™ ワークステーション (Waters) (以下、PICO TAG と記す) を使用した。この装置には、試料を乾燥し、真空状態にするための真空バルブと窒素バルブの他に、同時に 4 本の反応バイアルを収納できるオーブンが内蔵されている。試料の加水分解は塩酸気相中で行われるため、塩酸溶液による汚染を最小限に抑えることができる。以下に操作概要を記した。

サンプルチューブは、あらかじめ 6 M 塩酸で一晩浸すことにより洗浄した。洗浄したサンプルチューブに試料溶液を入れた後、専用の反応バイアルに移し、PICO TAG に装着して試料を乾燥させた。乾燥後、反応バイアルの底に 6 M 塩酸を 200  $\mu$ l を入れ、窒素で反応バイアル内を置換しながら、反応バイアル内を真空状態にした。その後、ただちにオーブンに入れ、110°C で加水分解処理を行った。加水分解後は、再度 PICO TAG を用いて試料を乾燥させた。

市販の L-アミノ酸を使ったモック実験では、各アミノ酸は Milli-Q 水に溶解した。ただし、Asp と Glu は 1 M 塩酸に溶解後、Milli-Q 水で調製した。各 10 mM に調製した L-アミノ酸を、110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理した。タンパク質の加水分解実験では、 $\beta$ -galactosidase は 10  $\mu$ g、urocortin は 5  $\mu$ g、ヒト serum albumin (Sigma) は 10  $\mu$ g をそれぞれ 110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理した。また、市販の  $\beta$ -galactosidase (TOYOBO) は、Milli-Q 水で 1 mg/ml とし、同様に 10  $\mu$ g を加水分解処理した。

#### 1-1-2-13. アミノ酸の誘導体化

アミノ酸の誘導体化には、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用

いた (Fig. 1-4) [Imai *et al.*, 1981]。NBD 化による発蛍光体は、励起波長 470 nm、蛍光波長 530 nm を有する。NBD 化したアミノ酸には不斉中心がないため、誘導体はアミノ酸に由来する不斉性により、Pirkle 型キラル固定相を用いて良好に分離可能である [Fukushima *et al.*, 1995]。

加水分解と同等の処理を施した L-アミノ酸は、Milli-Q 水 100  $\mu$ l に溶解した。この溶液を 50 mM borate buffer (pH 9.5) 中に、カラムスイッチング HPLC (high performance liquid chromatography) システムにより Asp 及び Glu の分析を行う場合は最終濃度 10  $\mu$ M、その他のアミノ酸の分析を行う場合は最終濃度 500  $\mu$ M となるように調製した。このうち 20  $\mu$ l を 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu$ l と混ぜ、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 970  $\mu$ l を加え、反応を止めた。0.45  $\mu$ m フィルター (Millex-LH; Millipore) で濾過し、このうち 10  $\mu$ l を HPLC に導入した。

タンパク質加水分解産物は、50 mM borate buffer (pH 9.5) 50  $\mu$ l に溶解した。アミノ酸画分を分取する際は、このうち 20  $\mu$ l を NBD 化し、1% TFA 水溶液 270  $\mu$ l を用いて反応を止めた。カラムスイッチング HPLC システムで分析を行う際は、試料を 5 倍希釈し、このうち 20  $\mu$ l を NBD 化し、1% TFA 水溶液 470  $\mu$ l を用いて反応を止めた。それぞれ 10  $\mu$ l を HPLC に導入した。

#### 1-1-2-14. D, L-アミノ酸の検出と D-アミノ酸含量の算出

D, L-Asp 及び D, L-Glu の分析には、カラムスイッチング HPLC システムを使用した [Long *et al.*, 2001]。それぞれのフローダイアグラムを Fig. 1-5 と Fig. 1-6 に示した。試料は、まず C8 カラム Mightysil RP-8 GP (150 $\times$ 4.6 mm i.d.; 関東化学, 35°C) において夾雑物と D, L-Asp、または D, L-Glu に分画される。この時、D, L-Asp の溶出には 50 mM sodium acetate (pH 5.1)/methanol 95 : 5 を、D, L-Glu の

溶出には 10 mM sodium phosphate (pH 7.0)/methanol 95 : 5 を 1.0 ml/min で送液して行った。D, L-Asp 及び D, L-Glu の画分は、カラムスイッチングにより、C18 トラップカラム Mightysil RP-18 GP (50×4.6 mm i.d.; 関東化学) に導入される。この画分は、再びカラムスイッチングすることにより、キラルカラムに導入され、それぞれ D 体と L 体のエナンチオマーに光学分割される。キラルカラムは、D, L-Asp の分割に SUMICHIRAL OA-3200 (250×4.6 mm i.d.; 住化分析センター, 35°C) を、D, L-Glu の分割に SUMICHIRAL OA-3100 (250×4.6 mm i.d.; 住化分析センター, 35°C) を使用した。この際の移動相は、10 mM citric acid を含む methanol/acetonitrile 85 : 15、3 mM citric acid を含む methanol をそれぞれ用いた。

その他のアミノ酸の分析には、まず TSK-gel ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d.; Tosoh, 33°C) を用いて各アミノ酸に分離した [Hamase *et al.*, 1997]。移動相 A は 1% tetrahydrofuran (THF), 0.02% TFA を含む 10% acetonitrile 水溶液、移動相 B は 1% THF, 0.02% TFA を含む acetonitrile を用いた。溶出は 18 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0% から 25% に、83 分から 90 分にかけて 25% から 75% になるようにリニアグラジエントをかけた。その後、SUMICHIRAL OA-3100 (250×4.6 mm i.d., 35°C) により光学分割を行った。移動相は 3 mM citric acid を含む methanol を用い、1.0 ml/min で送液した。それぞれのフローダイアグラムを Fig. 1-7 と Fig. 1-8 に示した。また、ODS カラムによる 13 種類の NBD-D, L-アミノ酸のクロマトグラムを Fig. 1-9 に示した。分取した画分は、遠心エバポレーターを用いて一晩かけて乾固させた。乾固した試料を 1% TFA 水溶液に溶解し、このうち 10 µl をキラルカラムに導入した。

D, L-アミノ酸の定量には、クロマトグラムから得られたピークの高さを用いた。各加水分解時間に対する D/(D+L) 比を直線回帰して、0 時間への外挿値をタンパク質に本来含まれている D-アミノ酸含量として求めた。

### 1-1-3. 結果

#### 1-1-3-1. 遊離 L-アミノ酸の 0 時間外挿値

市販の L-Ala, L-Ser, L-Leu, L-Phe, L-Val, L-Asp, L-Glu について、タンパク質に対して行うのと同様に 110°C、6 M 塩酸気相中でインキュベーションし、各インキュベーション時間における D-アミノ酸比から 0 時間外挿値を求めた。この条件において、各遊離 L-アミノ酸のラセミ化反応が時間依存的に進行しており、このラセミ化反応速度 (回帰直線の傾き) は各アミノ酸で異なっていた (Fig. 1-10)。0 時間外挿値は、Ala: 0.03%, Ser: 0.61%, Leu: 0.01%, Phe: 0.04%, Val: 0.11%, Asp: 0.12%, Glu: 0.65%であった (Table 1-1)。また、市販の遊離 L-アミノ酸の 0 時間外挿値は、製品を塩酸処理せずに実測した D-アミノ酸含量とよく一致した (Table 1-1)。つまり、市販の L-アミノ酸にはそれぞれごく微量の D-アミノ酸が含まれており、0 時間外挿値は、確かに遊離 L-アミノ酸の D-アミノ酸含量を正確に反映していることが示された。

#### 1-1-3-2. *E. coli* で合成した $\beta$ -galactosidase の分析

pTV118N-His-lacZ と pACYC184-lacI を共導入した *E. coli* MG1655 株を M9 最少培地 (0.4% galactose) で培養し、N 末端に His-Tag を付加した  $\beta$ -galactosidase を発現させ、Ni カラムにより精製を行った (Fig. 1-2)。精製  $\beta$ -galactosidase の D-アミノ酸含量は、D-Ala: 1.77%, D-Leu: 1.63%, D-Phe: 4.19%, D-Val: 0.56%, D-Asp: 1.74%, D-Glu: 2.08%であり、D-Ser を除いた各アミノ酸で有意の D-アミノ酸が再現性よく検出された (Fig. 1-11a, Table 1-2)。Ser については、正確に D-Ser のピークを特定することができなかった。また、対照として分析した市販の精製  $\beta$ -galactosidase から同様に D-Ala: 1.34%, D-Leu: 1.47%, D-Phe: 3.18%, D-Val: 0.57%,

D-Asp: 1.73%, D-Glu: 1.96%と有意の D-アミノ酸が検出された (Fig. 1-11b, Table 1-2)。

#### 1-1-3-3. ヒト urocortin の分析

その他のタンパク質でも D-アミノ酸が検出されるかを調べるために、*E. coli* で合成した urocortin と、その対照として化学合成した urocortin を分析した。pET43a-urocortin-His を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 株を M9 最少培地 (0.4% glucose) で培養し、C 末端に His-Tag を付加した urocortin を発現させた。発現した urocortin は不溶性画分に回収されたため、6 M urea 存在下で Ni カラムにより精製した (Fig. 1-3)。精製 urocortin の D-アミノ酸含量は、D-Ala: 0.98%, D-Leu: 0.99%, D-Phe: 1.42%, D-Val: 0.58%, D-Asp: 1.53%, D-Glu: 1.17%であり、各アミノ酸で有意に D-アミノ酸が再現性よく検出された (Fig. 1-12a, Table 1-3)。化学合成 urocortin では、D-Ala: 0.49%, D-Leu: 1.36%, D-Phe: 1.45%, D-Val: 0.36%, D-Asp: 1.59%, D-Glu: 1.46%と同程度の D-アミノ酸が有意に検出された (Fig. 1-12b, Table 1-3)。また、この D-アミノ酸含量は $\beta$ -galactosidase のものとは異なっていた。

#### 1-1-3-4. ヒト serum albumin の分析

*E. coli* 以外の生物で合成されたタンパク質の D-アミノ酸含量を調べるために、市販のヒト serum albumin の分析を行った。分析の結果、D-Ala: 0.54%, D-Leu: 0.70%, D-Phe: 0.74%, D-Val: 0.60%, D-Asp: 1.21%, D-Glu: 1.41%と、各アミノ酸で有意の D-アミノ酸が再現性よく検出された (Fig. 1-13, Table 1-4)。 $\beta$ -galactosidase や urocortin とは、各アミノ酸の D-アミノ酸含量が異なっていた。

#### 1-1-4. 考察

*E. coli* で合成したタンパク質に D-アミノ酸残基が含まれている可能性を *E. coli*  $\beta$ -galactosidase とヒト urocortin を分析することにより検証した。対照として市販の遊離 L-アミノ酸についてモック実験を行った結果、D-アミノ酸含量はほぼ 0%、あるいは製品の実測値と一致したため、0 時間外挿法がタンパク質の D-アミノ酸含量を推定するのに信頼性のある分析系であることを確認した (Table 1-1)。実際に精製した  $\beta$ -galactosidase と urocortin の分析を行うと、二つのタンパク質から分析した 7 種類のアミノ酸のうち Ala, Val, Leu, Phe, Asp, Glu の 6 種類のアミノ酸で有意の D-アミノ酸が再現性よく検出された (Table 1-2, 1-3)。Ser については、正確に D-Ser のピークを同定することができなかったが、これは塩酸加水分解中におけるラセミ化反応速度が非常に遅かったためである。加水分解処理中のアミノ酸のラセミ化反応速度を反映する回帰直線の傾きは、遊離 L-アミノ酸の傾きとタンパク質加水分解時の傾きとではほぼ一致したため、ペプチドから遊離した L-アミノ酸のラセミ化効果は 0 時間外挿することにより解消されていると考えられる (Fig. 1-10, 1-11, 1-12)。つまり、0 時間外挿値は、加水分解処理中の遊離 L-アミノ酸のラセミ化によって生じた D-アミノ酸を含まない。例外的に、*E. coli* で合成した urocortin の Ala と遊離 L-Ala の回帰直線の傾きが異なっていたが、その原因は明らかではない。化学合成品とは異なり、生合成した urocortin は不溶性画分から尿素変性状態で精製しているので、立体構造に違いはあるものの、遊離アミノ酸になった後に違いはないはずである。

His-Tag 精製した  $\beta$ -galactosidase と精製度の高い市販の  $\beta$ -galactosidase から同程度の D-アミノ酸が検出された (Table 1-2)。数種類のアミノ酸で若干の差があるものの、精製法の違いは D-アミノ酸含量には、ほとんど反映されないといえる。

さらに、 $\beta$ -galactosidase と urocortin の D-アミノ酸含量を比較すると、Ala, Leu, Phe でそれぞれ異なっていた。Phe については、urocortin で約 1.5%であるが、 $\beta$ -galactosidase では約 4%とその差は顕著であった (Table 1-2, 1-3)。これは個々のタンパク質の違い、すなわち、アミノ酸配列や立体構造の違いなどが影響を及ぼすことを示唆していると考えられる。

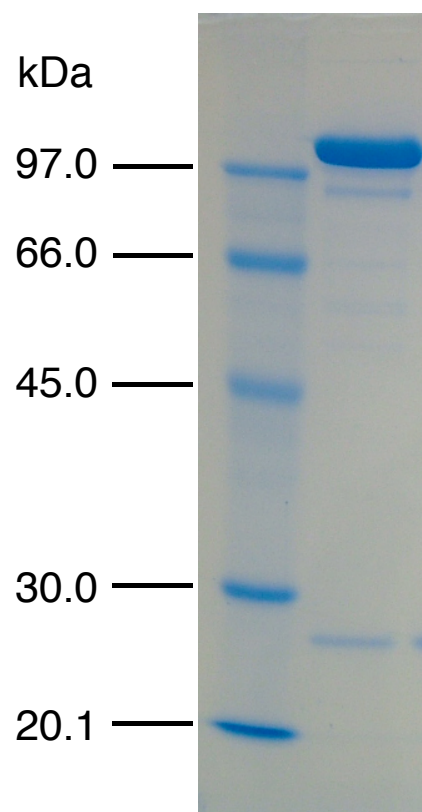
さらに、*E. coli* 以外の生物が生産したタンパク質としてヒト serum albumin の分析を行った結果からも同様に有意の D-アミノ酸が検出され、その D-アミノ酸含量のパターンは二つのタンパク質とも異なっていた (Table 1-4)。このことは、生物に関係なく一般的にタンパク質から D-アミノ酸が検出されることを示唆している。

これらのタンパク質から検出された D-アミノ酸の由来には、(1)翻訳後の酵素的異性化、あるいは非酵素的異性化、(2)タンパク質生合成時の取り込み、(3)分析過程におけるアミノ酸の異性化の可能性が考えられる。(1)について、一般のタンパク質全てで酵素的異性化が起こっていると仮定すると、限りある遺伝子の中で膨大な数の特異的なイソメラーゼを、あるいは生命活動する上で大変不都合である幅広い基質と反応するイソメラーゼを想定する必要があるため、この可能性はまず否定できる。非酵素的異性化については、Asn・Asp 残基が非酵素的に異性化することが知られており、その異性化反応機構が明らかとなっている (Fig. 0-1) [Geiger *et al.*, 1987]。しかし、その他のアミノ酸残基では、このような報告はない。未知の異性化反応機構が存在している可能性も考えられるが、非酵素的異性化には通常長い年月を必要とするため、30 分以内のライフサイクルを持つような微生物のタンパク質については反応機構として成り立たないであろう。(2)については、当研究室の過去の研究より、*in vitro* で D-アミノ酸が取り込まれる余地があることを示している [高山, 2004]。現段階では、(3)

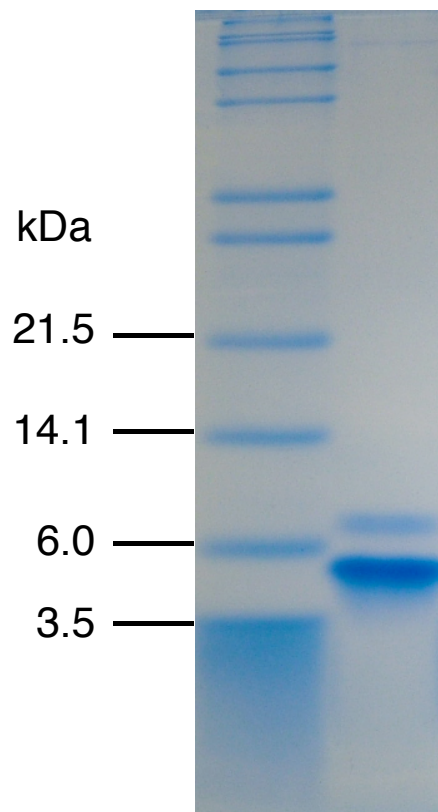


の可能性を完全に否定することはできないが、次節においては可能性の高いと考えられた(2)タンパク質生合成時に D-アミノ酸が取り込まれる可能性について検討した。

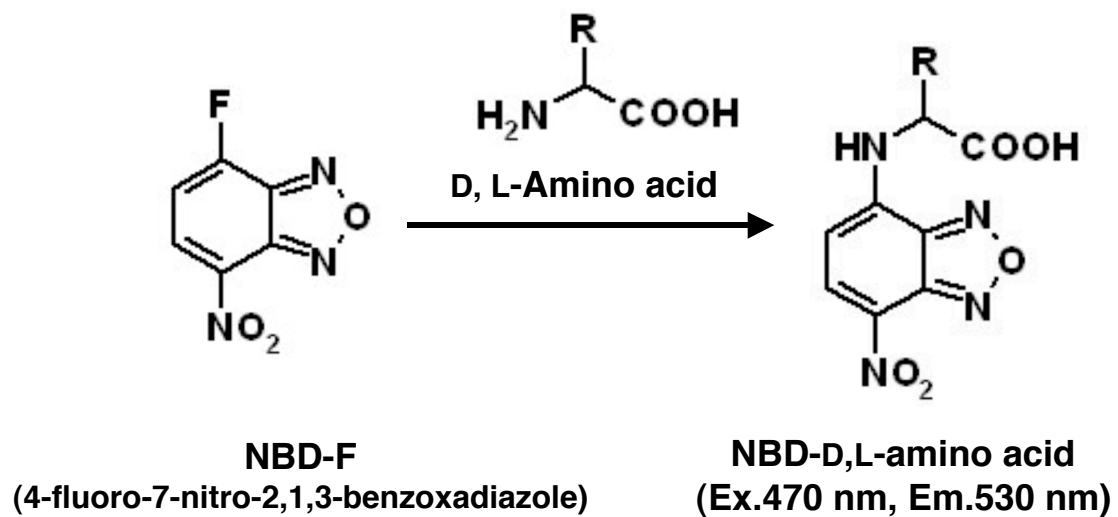




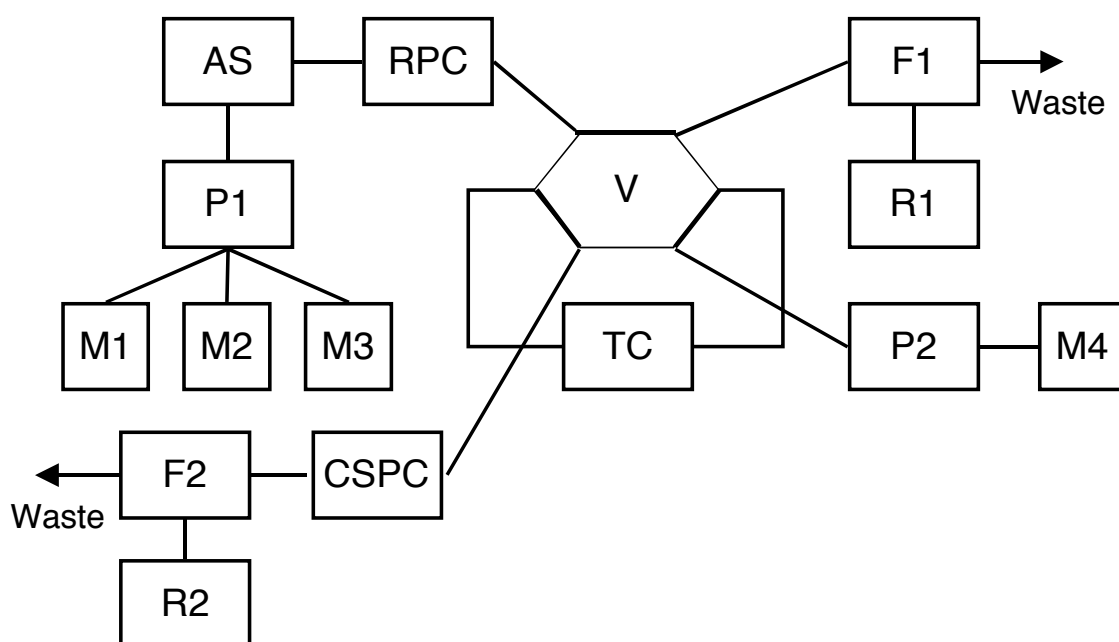
**Fig. 1-2 His-tag 精製した *E. coli* 生産 $\beta$ -galactosidase の SDS-PAGE**



**Fig. 1-3 His-tag 精製した *E. coli* 生産 urocortin の SDS-PAGE**



**Fig. 1-4** NBD-F によるアミノ酸の誘導体化反応



AS : Auto sampler; JASCO 851-AS

R1, R2 : Integrater; JASCO 807-IT

F1, F2 : Fluorescent detector, Ex. 470 nm Em. 530 nm

V : Switch valve; JASCO column selection unit HV-1592-01

P1, P2 : Pump; JASCO 880-PU Flow rate : 1.0 ml/min

RPC : Mightysil RP-8 GP 150×4.6 mm i.d., Temperature : 35°C

TC : Mightysil RP-18 GP 50×4.6 mm i.d., room temperature

CSPC : Sumichiral OA-3200, 250×4.6 mm i.d. Temperature : 35°C

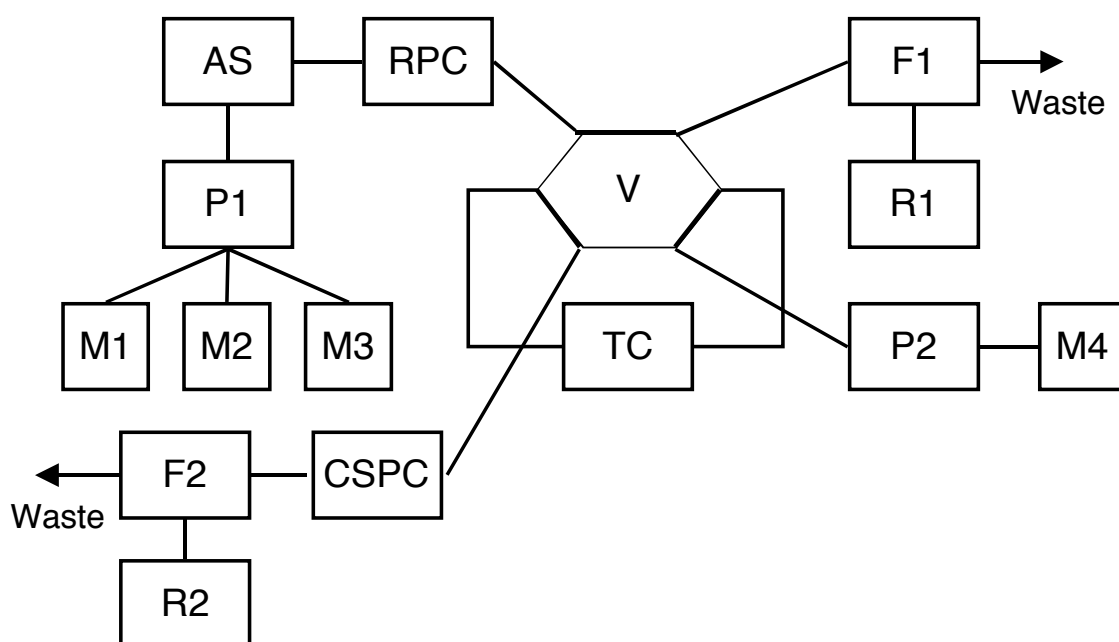
M1 : 50 mM sodium acetate (pH 5.1) : methanol = 95 : 5

M2 : 70% acetonitrile

M3 : methanol

M4 : 10 mM citric acid in methanol : acetonitrile = 85 : 15

**Fig. 1-5 D, L-Asp 定量用カラムスイッチング HPLC システム**



AS : Auto sampler; JASCO 851-AS

R1, R2 : Integrater; JASCO 807-IT

F1, F2 : Fluorescent detector, Ex. 470 nm Em. 530 nm

V : Switch valve; JASCO column selection unit HV-1592-01

P1, P2 : Pump; JASCO 880-PU Flow rate : 1.0 ml/min

RPC : TSK-gel Octyl 80Ts 150×4.6, mm i.d. Temperature : 35°C

TC : Mightysil RP-18 GP 50×4.6 mm i.d., room temperature

CSPC : Sumichiral OA-3100, 250×4.6 mm i.d. Temperature : 35°C

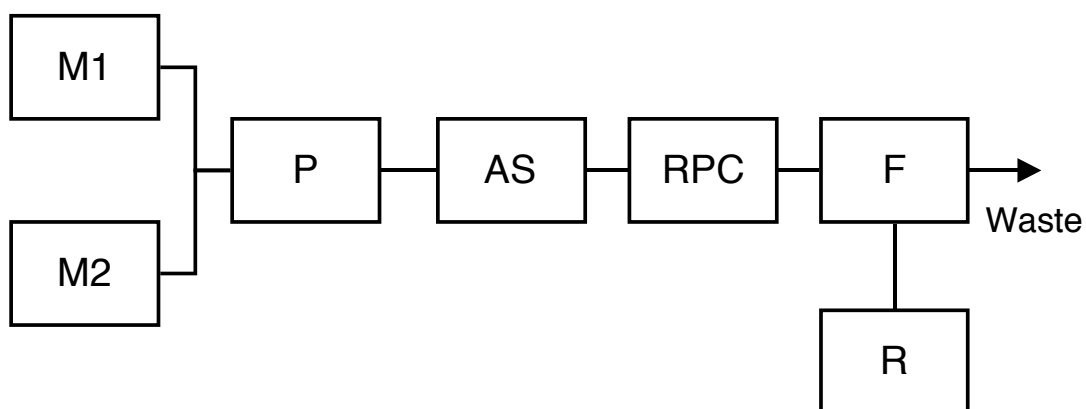
M1 : 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) : methanol = 95 : 5

M2 : 70% acetonitrile

M3 : methanol

M4 : 3 mM citric acid in methanol

**Fig. 1-6 D,L-Glu 定量用カラムスイッチング HPLC システム**



P : TOSOH; CCPM pump Flow rate : 1.0 ml/min

AS : Auto sampler; TOSOH, AS-8000

RPC : TSKgel ODS-80Ts, 250×4.6 mm i.d. Temperature : 33°C

F : Fluorescence detector; JASCO FP-1520S, Ex. 470 nm, Em. 530 nm

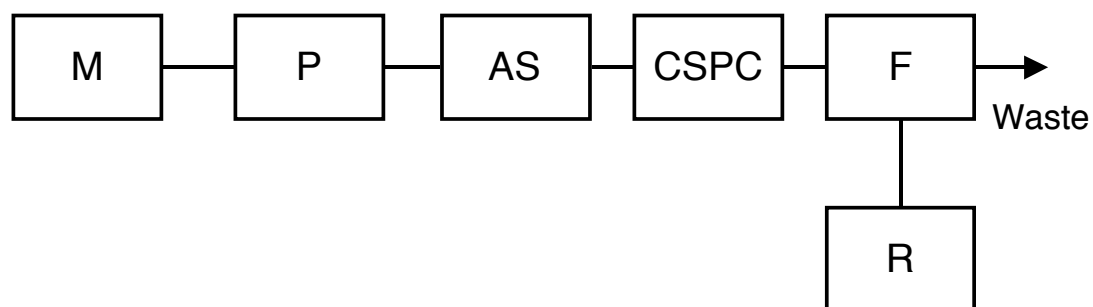
R : Integrator; JASCO, 807-IT Integrator

M1 : Mobile phase A; 1% THF, 0.02% TFA in 10% acetonitrile

M2 : Mobile phase B; 1% THF, 0.02% TFA in acetonitrile

**Fig. 1-7 ODS カラムを備えた HPLC システム**





P : TOSOH; CCPM pump Flow rate : 1.0 ml/min

AS : Auto sampler; TOSOH, AS-8000

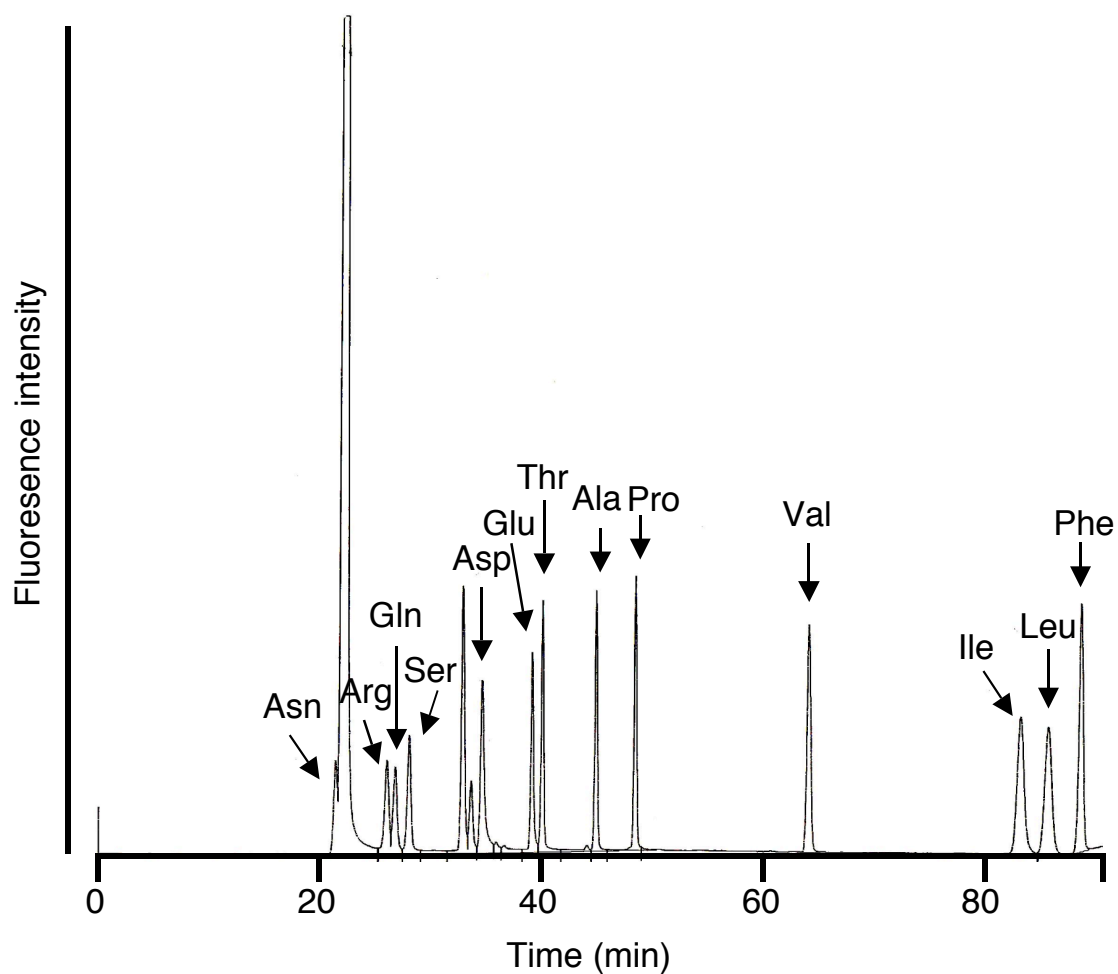
CSPC : Sumichiral OA-3100, 250×4.6 mm i.d. Temperature : 35°C

F : Fluorescence detector; JASCO FP-920S, Ex. 470 nm, Em. 530 nm

R : Integrator; JASCO, 807-IT Integrator

M : Mobile phase; 3 mM citric acid in methanol

**Fig. 1-8** キラルカラムを備えたHPLCシステム



**Fig. 1-9 ODSカラムによるNBD-アミノ酸の分離**

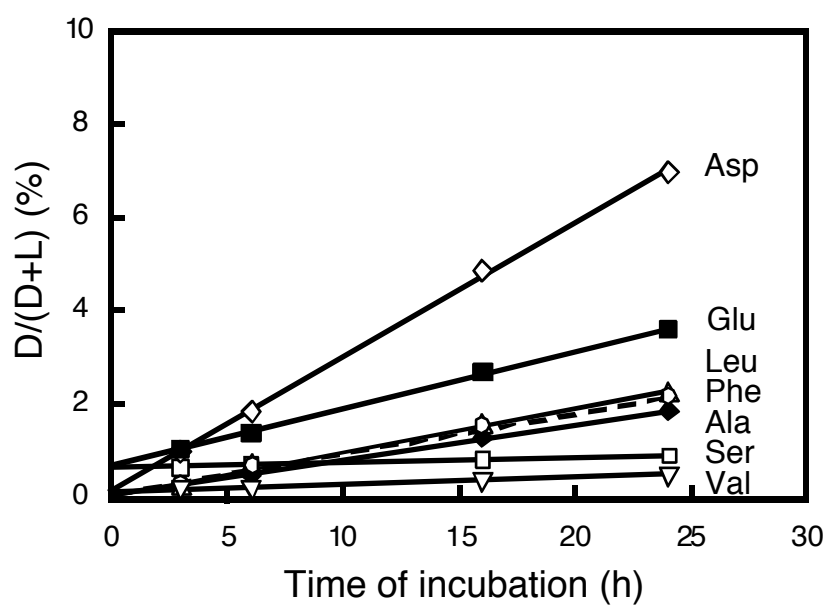
各NBD-D,L-アミノ酸を1 pmol導入した。

カラム : ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d., 33°C)

移動相 : A; 1% THF, 0.02% TFA in 10% acetonitrile

B; 1% THF, 0.02% TFA in acetonitrile

流速 : 1 ml/min



**Fig. 1-10** 遊離L-アミノ酸の塩酸処理中の経時的ラセミ化

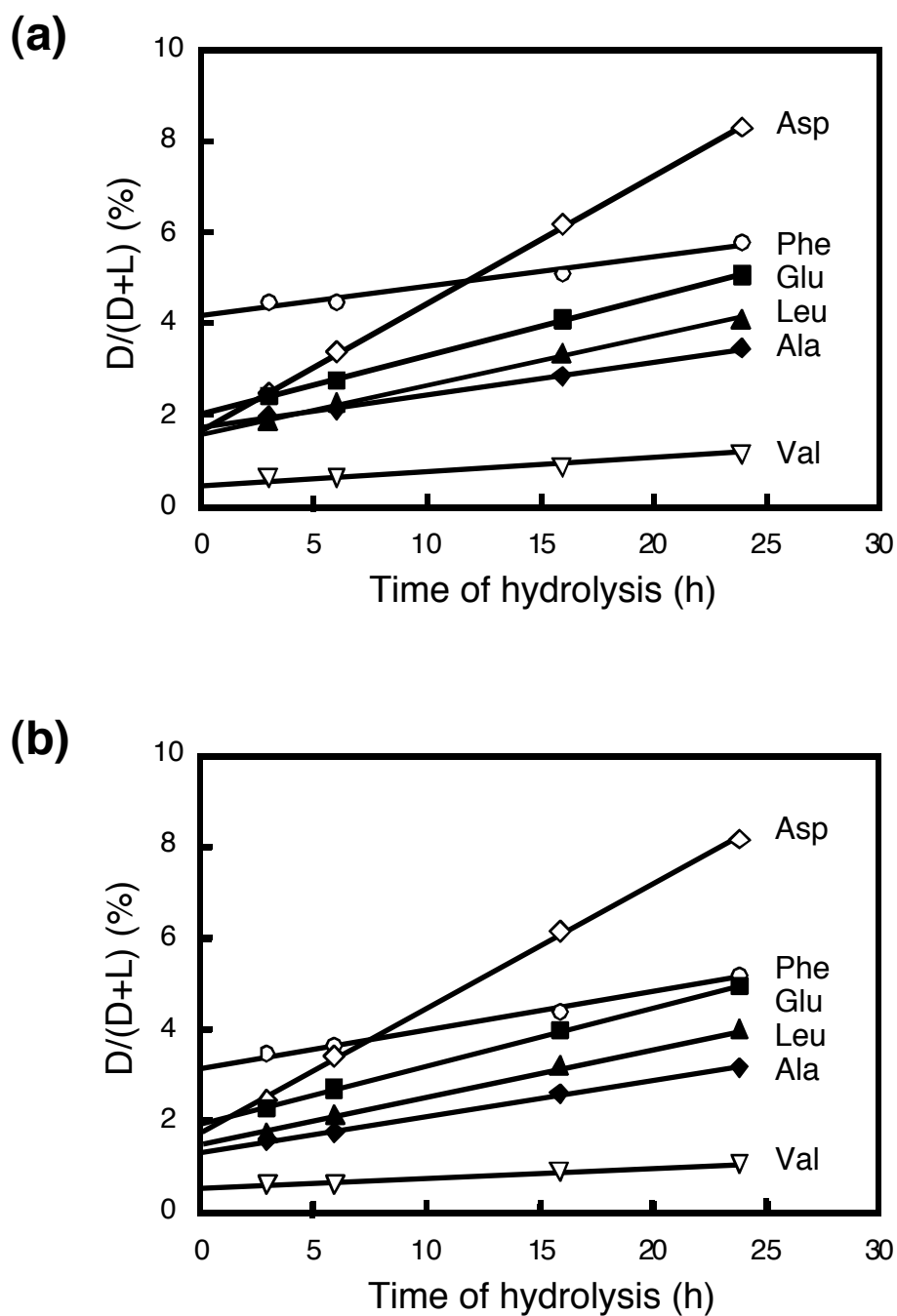
Ala (◆), Ser (□), Leu (▲), Phe (○, 点線), Val (▽), Asp (◇), Glu (■)は、2回の実験の平均値として示した。

**Table 1-1. 遊離 L-アミノ酸の D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

	D/(D+L) (%)						
	Ala	Ser	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
モック <sup>a</sup>	0.03	0.61	0.01	0.04	0.11	0.12	0.65
実測値 <sup>b</sup>	0.01	0.56	0	0.02	0.02	0	0.63

<sup>a</sup> D-アミノ酸含量は、2 回の実験の平均値として表した。

<sup>b</sup> D-アミノ酸含量は、4 回の実験の平均値として表した。



**Fig.1-11 (a)His-tag精製 $\beta$ -galactosidaseと(b)市販の精製 $\beta$ -galactosidaseの加水分解中におけるD-アミノ酸比**

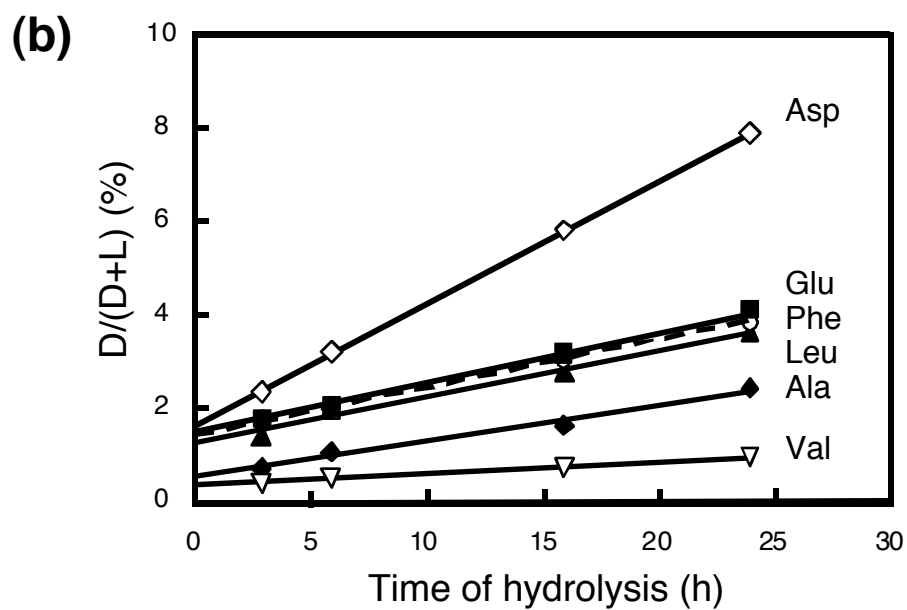
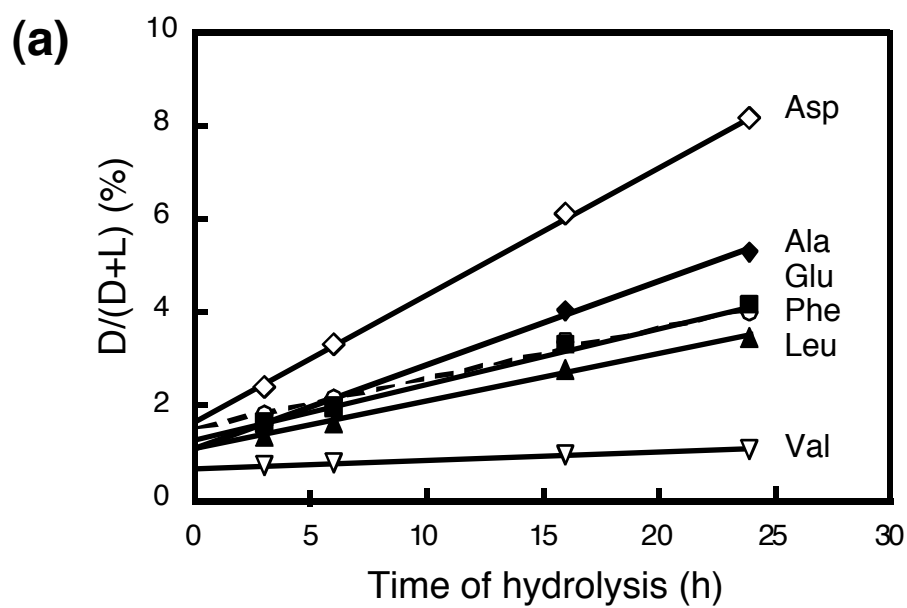
Ala (◆), Leu (▲), Phe (○), Val (▽), Asp (◇), Glu (■)は、(a)2回(b)4回の実験の平均値として示した。

**Table 1-2.  $\beta$ -galactosidaseの D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

	D/(D+L) (%)					
	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
His-tag精製 <sup>a</sup>	1.77	1.63	4.19	0.56	1.74	2.08
市販品 <sup>b</sup>	1.34±0.06	1.47±0.02	3.18±0.15	0.57±0.04	1.73±0.02	1.96±0.10

<sup>a</sup>D-アミノ酸含量は、2回の実験の平均値として表した。

<sup>b</sup>D-アミノ酸含量は、4回の実験の平均値±標準偏差として表した。



**Fig. 1-12** (a)*E. coli*合成urocortinと(b)化学合成urocortinの加水分解中におけるD-アミノ酸比

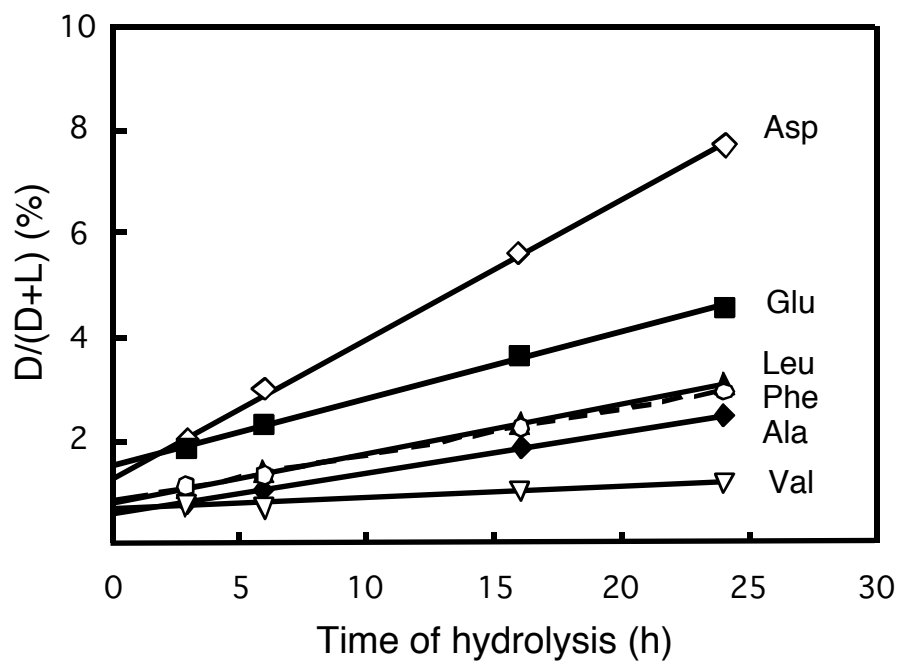
Ala (◆), Leu (▲), Phe (○, 点線), Val (▽), Asp (◇), Glu (■)は、6回の実験の平均値として示した。

**Table 1-3. urocortinの D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

	D/(D+L) (%)					
	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
<i>E. coli</i> 合成	0.98±0.18	0.99±0.11	1.42±0.14	0.58±0.09	1.53±0.16	1.17±0.13
化学合成	0.49±0.21	1.36±0.32	1.45±0.25	0.36±0.06	1.59±0.31	1.46±0.31

D-アミノ酸含量は、6 回の実験の平均値±標準偏差として表した。





**Fig. 1-13** ヒト serum albumin の加水分解中における D-アミノ酸比

Ala (◆), Leu (▲), Phe (○, 点線), Val (▽), Asp (◇), Glu (■) は、3 回の実験の平均値として示した。

**Table 1-4. ヒト serum albuminの D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

	D/(D+L) (%)					
	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
serum albumin	0.54±0.05	0.70±0.02	0.74±0.13	0.60±0.28	1.21±0.05	1.41±0.07

D-アミノ酸含量は、3 回の実験の平均値±標準偏差として表した。

## 第2節 タンパク質生合成における D-アミノ酸取り込みの検討

### 1-2-1. 目的

第 1 節において、*E. coli* で合成し、精製した $\beta$ -galactosidase と urocortin から有意の D-アミノ酸が再現性よく検出された。これらの D-アミノ酸の由来として、本節では、タンパク質生合成時に D-アミノ酸が取り込まれる可能性を検討した。この検討にあたり、まず最少培地で生育させた *E. coli* 細胞内にそもそも遊離 D-アミノ酸が存在しているのか、さらに *E. coli* ゲノムにおけるコドン使用頻度に基づいて作製した D, L-アミノ酸溶液を培地に添加することで、細胞内のタンパク質生合成の場にアミノ酸が供給されるのかどうかを調べた。もし、タンパク質生合成時に D-アミノ酸が取り込まれているのであれば、少なくとも細胞内に利用可能な遊離 D-アミノ酸が存在しているはずである。そして、細胞内に十分な遊離 D-アミノ酸が存在しているのであれば、tRNA と結合した後、ペプチド転移反応の基質となる可能性があると考えた。そこで、各 D-アミノ酸を添加した合成培地で生育させた *E. coli* にタンパク質を合成させ、それぞれの D-アミノ酸含量を調べた。

*E. coli* BL21 (DE3) 株細胞内の遊離 D-アミノ酸量を測定した。本章第 1 節の urocortin 合成時と同じ条件で培養を行い、IPTG 添加前 ( $OD_{660} \doteq 0.6$ ) と添加後の細胞について分析を行った。また、D-アミノ酸を強制的に添加した合成培地で生育させた *E. coli* に $\beta$ -galactosidase と urocortin を合成させ、0 時間外挿法を用いてそれぞれの D-アミノ酸含量を求めた。

## 1-2-2. 実験材料及び方法

### 1-2-2-1. アミノ酸溶液の調製

L-Asp と Gly は和光純薬工業製品、D-Gln は Sigma 製品を使用した。その他の D,L-アミノ酸はペプチド研究所製品を使用した。

アミノ酸溶液の組成は、20 種類のアミノ酸を *E. coli* コドン使用頻度に則して混合し、20 種類全体の濃度で 1% 溶液となるように調製し、0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (Millipore) を用いて濾過滅菌した (Table.1-5)。この溶液をアミノ酸としての最終濃度で 0.5%となるように M9 最少培地に添加した。目的に応じて、19 種 L-アミノ酸+Gly (以下、L20 と記す), D-Asp, D-Asn, D-Glu, D-Gln (以下、D(D, N, E, Q) と記す), D-Asp, D-Asn, D-Glu, D-Gln+15 種 L-アミノ酸+Gly (以下、D(D, N, E, Q)+L16 と記す), D-Ala, D-Ser, D-Val, D-Leu, D-Phe (以下、D(A, S, V, L, F) と記す), D-Ala, D-Ser, D-Val, D-Leu, D-Phe+14 種 L-アミノ酸+Gly (以下、D(A, S, V, L, F)+L15 と記す)の 5 種類の溶液を作製した。

### 1-2-2-2. *E. coli* 細胞内の遊離アミノ酸画分の調製

pET43a-urocortin-His を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 株の培養は、1-1-2-10 と同様に行った。D,L-アミノ酸を添加した M9 培地で  $\text{OD}_{660}=0.6$  まで振盪培養した後、半分の培養液を回収し、残り半分の培養液に対して IPTG を最終濃度 0.4 mM となるように加えた。IPTG 添加後、さらに 3~12 時間振盪培養し、集菌した。

培養液 50 ml 分の菌体を PBS で 2 回洗浄し、IPTG 添加前の菌体は 750  $\mu\text{l}$ 、添加後の菌体は 1500  $\mu\text{l}$  の PBS を加え、超音波破碎を行った。破碎後、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、上清を回収した。タンパク質除去のために、上清 200  $\mu\text{l}$  に methanol 800  $\mu\text{l}$  を加えた後、-20°C で一晩静置した。15,000 rpm, 4°C で 10 分

間遠心し、この上清を細胞内遊離アミノ酸画分として回収した。

#### 1-2-2-3. 遊離 D-アミノ酸の定量

1-2-2-2 で調製した細胞内遊離アミノ酸画分のうち 200  $\mu$ l を遠心乾固し、50 mM borate buffer (pH 9.5) 40  $\mu$ l に溶解した。15 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 30  $\mu$ l を加え、60°C で 5 分間反応させ、1% TFA 水溶液 230  $\mu$ l で反応を止めた。D-アミノ酸の定量法は、1-1-2-14 の通りに行った。

#### 1-2-2-4. 各培地で合成したタンパク質の D-アミノ酸含量の算出

各 D, L-アミノ酸溶液を添加した合成培地を用いた  $\beta$ -galactosidase と urocortin の生産は、1-1-2-7 と 1-1-2-10 の通りに行った。IPTG 添加後は、3~6 時間振盪培養し、集菌した。各タンパク質の精製は、1-1-2-8 と 1-1-2-11 の通りに行った。加水分解、NBD-F による誘導体化、D-アミノ酸含量の算出は、それぞれ 1-1-2-12, 1-1-2-13, 1-1-2-14 の通りに行った。

### 1-2-3. 結果

#### 1-2-3-1. *E. coli* BL21 (DE3) 株細胞内の遊離 D-アミノ酸

M9 最少培地、及びこれに 4 種類のアミノ酸溶液を加えた合成培地でそれぞれ *E. coli* BL21 (DE3) 株を生育させ、細胞内の遊離 D-アミノ酸レベルを調べた。なお、D(D, N, E, Q) 溶液を添加した培地では、*E. coli* BL21 (DE3) 株は生育しなかった。M9 最少培地で培養した *E. coli* BL21 (DE3) 株細胞内には、細胞壁のペプチドグリカン合成に使用される D-Ala、D-Glu がそれぞれ 44%, 20%含まれていたが、D-Ser, D-Leu, D-Phe, D-Val, D-Asp はほとんど含まれていなかった (Table. 1-6, 1-7)。各アミノ酸溶液を添加した合成培地で培養した場合、D-Leu, D-Phe, D-Val が 3~15%細胞内に含まれていた。D-Ala の量は変わらず、50%程度であり、D-Ser についても変化はなかった。D-Asp は 3%と微量に増加し、D-Glu に至っては 80%とそのほとんどが D 体として存在していた。また、D-Leu, D-Val については、IPTG 添加後に細胞内 D-アミノ酸レベルが上昇していた (Table 1-7)。従って、M9 最少培地で培養した *E. coli* の細胞内には D-Ala, D-Glu 以外の D-アミノ酸は含まれていないこと、細胞外の環境によって細胞内の D-アミノ酸レベルは大きく変化することが明らかとなった。

#### 1-2-3-2. タンパク質中への D-アミノ酸取り込みの検討

M9 最少培地に D-アミノ酸を加えることで、*E. coli* 細胞内の D-アミノ酸レベルが上昇することが明らかとなった。そこで、この条件下で生育させた *E. coli* MG1655 株及び BL21 (DE3) 株にタンパク質を合成させ、このタンパク質の D-アミノ酸含量が増加するかどうかを調べることで、タンパク質生合成過程において D-アミノ酸が取り込まれる可能性を検討した。*E. coli* コドン使用頻度に則

して作製した D,L-アミノ酸溶液を M9 最少培に加え、*E. coli* に $\beta$ -galactosidase と urocortin をそれぞれ合成させた。Gly を含む 19 種類の L-アミノ酸を添加した合成培地で生育させた*E. coli*により合成された二つのタンパク質からは、やはり M9 最少培地で合成したタンパク質と同様の D-アミノ酸含量が得られた。D-アミノ酸を添加した合成培地、及び D-アミノ酸と L-アミノ酸を混合して添加した合成培地で合成された二つのタンパク質においても、これらの D-アミノ酸含量は M9 最少培地の結果と比較して大きな変化はなかった (Table 1-8, 1-9)。従って、タンパク質生合成によって D-アミノ酸が取り込まれている可能性は低いことが明らかとなった。

#### 1-2-4. 考察

タンパク質生合成過程において D-アミノ酸が取り込まれているのであれば、タンパク質中の D-アミノ酸残基は細胞内に存在する遊離 D-アミノ酸に由来するはずである。M9 最少培地で培養した *E. coli* 細胞内には、細胞壁のペプチドグリカン合成に使用される D-Ala (44%) と D-Glu (20%) が非常に多く含まれていた (Table 1-6, 1-7)。D-Ala と D-Glu は、*E. coli* 細胞内でそれぞれ alanine racemase、glutamate racemase によって生成される [Wild *et al.*, 1985; Doublet *et al.*, 1992]。一方で、その他の D-アミノ酸 (D-Ser, D-Leu, D-Phe, D-Val, D-Asp) は、ほとんど含まれていなかった (Table 1-6, 1-7)。この結果は、Nagata らが以前報告した *E. coli* 細胞内の D-アミノ酸レベルと同様の傾向を示していた [Nagata *et al.*, 2001]。従って、これらの D-アミノ酸は細胞内では合成されず、細胞内に存在するためには細胞外から取り込むほかないと考えられた。

実際に、培地に D-アミノ酸を添加すると、Leu, Phe, Val において細胞内の D-アミノ酸レベルが上昇した (Table 1-6, 1-7)。すなわち、細胞内に培地中の D-アミノ酸が取り込まれていることが確認された。また、この 3 種類の D-アミノ酸は、IPTG 添加前と添加後で D-アミノ酸レベルが異なっていた。これは IPTG 添加後の培養の間に D-アミノ酸がさらに取り込まれ、細胞内に蓄積したためであると考えられる。D-Ser を培地に加えても、細胞内の D-Ser 含量は変わらなかった。これには D-Ser がそもそも細胞内に取り込まれない可能性と、細胞内に取り込まれた D-Ser が D-serine deaminase によって代謝されている可能性が考えられる [Bloom *et al.*, 1975]。

以上の結果から、*E. coli* 細胞内のアミノ酸環境は、外部環境によって大きく変化することが明らかとなった。そこで、D-アミノ酸を添加した培地で生育さ



せた *E. coli* に $\beta$ -galactosidase と urocortin を合成させ、0 時間外挿法によりそれぞれの D-アミノ酸含量を調べた。先述した通り、いくつかの D-アミノ酸 (D-Tyr, D-Asp, D-Trp, D-His, D-Lys) は、それぞれの tRNA に結合することが判っており、また、この結合を切断する酵素 (D-tyrosyl-tRNA deacylase) の存在も明らかとなっている。[Calendar *et al.*, 1967; Soutourina *et al.*, 2000; Takayama *et al.*, 2005]。このことは、D-アミノ酸-tRNA がペプチド転移反応の基質となりうることを示唆している可能性があり、実際 *in vitro* で基質となりうることを示唆されている [高山, 2004]。そのため、D-アミノ酸が豊富に存在する環境下では、タンパク質生合成時において取り込まれることが期待された。しかし、どちらのタンパク質においても D-アミノ酸含量にほとんど変化はなく、*E. coli* の生育環境はタンパク質生合成には影響を与えなかった (Table 1-8, 1-9)。従って、タンパク質生合成において D-アミノ酸が取り込まれる可能性は、非常に低いことが示された。D-アミノ酸の結合した tRNA は、もし生じたとしても生体内においてはそれ以降のタンパク質合成に至るまでのステップで排除されているのかもしれない。

**Table 1-5. 培地に添加した D,L-アミノ酸**

アミノ酸	最終濃度 (mM)
Ala	5.32
Arg	1.31
Cys	0.33
His	0.54
Lys	1.20
Met	0.93
Pro	1.92
Ser	2.76
Thr	2.26
Asp	1.92
Glu	1.94
Asn	1.31
Gln	1.51
Ile	2.28
Leu	4.05
Phe	1.18
Trp	0.37
Tyr	0.70
Val	3.02
Gly	4.88

**Table 1-6. *E. coli* BL21 (DE3) 株細胞内 (OD≒0.6; IPTG誘導前) の遊離 D-アミノ酸量**

培地	D/(D+L) (%)						
	Ala	Ser	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
M9	44	0.6	0.3	0	0	0.2	25
L20	52	1.3	0	0	0.3	0.2	38
D(ASLFV)	50	1.1	3.3	10	6.4	0.6	31
D(ASLFV)+L15	51	0.9	5.8	12	15	0.2	26
D(DNEQ)+L16	-	-	-	-	-	3.0	83

**Table 1-7. *E. coli* BL21 (DE3) 株細胞内 (IPTG誘導後) の遊離 D-アミノ酸量**

培地	D/(D+L) (%)						
	Ala	Ser	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
M9	45	0.9	0.2	0	0.3	0.1	20
L20	51	1.2	0	0	0.2	0.5	13
D(ASLFV)	50	1.3	20	14	28	0.2	70
D(ASLFV)+L15	52	1.0	13	15	23	0.1	32
D(DNEQ)+L16	-	-	-	-	-	3.1	97

**Table 1-8. 各培地で合成した $\beta$ -galactosidaseの D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

培地	D/(D+L) (%)					
	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
L20	1.80	1.64	3.82	0.55	1.41	2.00
D(ASLFV)	1.57	1.58	4.05	0.58	-	-
D(ASLFV)+L15	1.85	1.75	4.17	0.70	-	-
D(DNEQ)	-	-	-	-	1.88	2.21
D(DNEQ)+L16	-	-	-	-	1.53	2.03

D-アミノ酸含量は、2 回の実験の平均値として表した。

**Table 1-9. 各培地で合成した urocortinの D-アミノ酸含量 (0時間外挿値)**

培地	D/(D+L) (%)					
	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Glu
L20	1.00	0.36	0.94	1.27	0.83	1.24
D(ASLFV)	1.21	0.44	1.02	1.58	0.81	-
D(ASLFV)+L15	0.54	0.41	0.87	0.97	0.47	-
D(DNEQ)	-	-	-	-	-	1.31
D(DNEQ)+L16	-	-	-	-	-	1.28

D-アミノ酸含量は、2 回の実験の平均値として表した。

## 第 2 章

### 酸加水分解反応におけるペプチド異性化の検証

#### 2-1. 目的

第 1 章において、0 時間外挿法を用いた解析により、任意に選んだ三つのタンパク質 ( $\beta$ -galactosidase, ヒト urocortin, ヒト serum albumin) の精製標品から有意の D-アミノ酸が再現性よく検出された。また、検出された D-アミノ酸の由来の可能性の一つとして、タンパク質生合成反応における取り込みについて検討したところ、この可能性は低いものであると考えられた。そこで、本章では分析過程におけるアミノ酸の異性化について検証した。分析過程において最も異性化が起きやすいと考えられるのは、塩酸加水分解処理のステップである。塩酸加水分解処理中にペプチド及びタンパク質から遊離したアミノ酸にはラセミ化反応が起こるが、このラセミ化によって生成した D-アミノ酸は 0 時間外挿することによって解消することができるのは、第 1 章で示した。加水分解処理に伴う異性化を遊離アミノ酸のラセミ化のみと考えるならば、遊離アミノ酸の出現は 0 時間より遅れるため、ラセミ化効果の総和は回帰直線が原点を通るのではなく、マイナス値となるはずである (Fig. 2-1)。しかし、実際には 0 時間外挿値はプラスの値となるため、この分の内在性 D-アミノ酸残基が多く含まれるか、あるいは加水分解初期に速い異性化が起きていることが考えられる。ここで起こる異性化としては、ペプチドの状態でアミノ酸が異性化 (ペプチドのジアステレオマー化) している可能性が疑われる。もし、実際に加水分解処理中にペプチドのジアステレオマー化が起きている場合、0 時間外挿法ではタンパク質の D-アミノ酸含量を正確に求めることができないということになる。

これを検証するために、ペプチドの最も単純なモデルであるジペプチドを選び、L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala を用いて、一過的にエナンチオマーであるジペプチドが生じるかどうかを調べた。アミノ酸が遊離する前のペプチドを捉えるために、加水分解処理時間は 0.5, 1, 2 時間とした。塩酸加水分解後、NBD-F により蛍光誘導体化し、HPLC を用いて ODS カラムで各ジアステレオマーに分離し、続いてキラルカラムで各エナンチオマーに分離した。また、それぞれのジペプチドから加水分解により得られたアミノ酸について 0 時間外挿法により外挿値を求め、0 時間外挿法が人工的に生じた D-アミノ酸を含むとするならば、その由来が何であるかについて検討した。

## 2-2. 実験材料及び方法

### 2-2-1. ジペプチド

L-Ala-L-Phe, L-Ala-D-Phe, D-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Phe, D-Phe-L-Ala は、Bachem 製品を使用した。L-Phe-L-Ala は、Sigma 製品を使用した。L-Phe-D-Ala と D-Phe-D-Ala は、バイオロジカ (名古屋) に合成依頼した。

### 2-2-2. 加水分解

20  $\mu\text{g}$  の L-Ala-L-Phe、あるいは L-Phe-L-Ala を PICO TAG (Waters) を用いて、6 M 塩酸気相中、110°C で 0.5, 1, 2 時間加水分解処理した。

### 2-2-3. ジペプチドのジアステレオマー分離

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 45  $\mu\text{l}$  に溶解した。ジペプチドの定量を行う場合、このうち 1  $\mu\text{l}$  に 50 mM borate buffer (pH9.5) 19  $\mu\text{l}$  と 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu\text{l}$  を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 470  $\mu\text{l}$  を加え、反応を停止した。ジペプチドのエナンチオマー分析のための分取を行う場合、加水分解産物 20  $\mu\text{l}$  を使用し、同様に NBD-F と反応させた後、1% TFA 水溶液 270  $\mu\text{l}$  を加え、反応を停止した。0.45  $\mu\text{m}$  フィルター (Millex-LH; Millipore) で濾過し、このうち 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に導入し、逆相カラム TSK-gel ODS-80Ts (250 $\times$ 4.6 mm i.d.; Tosoh, 33°C) で各アミノ酸に分離した [Hamase *et al.*, 1997]。移動相 A は 1% THF, 0.02% TFA を含む 5% acetonitrile 水溶液、移動相 B は 1% THF, 0.02% TFA を含む acetonitrile を用いた。溶出は 15 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0% から 22% に、65 分までに 22% から 27% になるようにリニアグラジエントをかけた。続いて、

110 分まで移動相 B を 27%で送液した。

#### 2-2-4. ジペプチドのエナンチオマー分離

2-2-3 で分離した各ジペプチド画分を分取・乾固した後、1% TFA 水溶液に溶解し、SUMICHIRAL OA-3200 (250×4.6 mm i.d.; 住化分析センター, 10°C) を用いて各エナンチオマーに分離した。移動相には、0.15 mM citric acid を含む methanol/acetonitrile 98 : 2 を用い、0.5 ml/min で送液した。2-2-1 に記したジペプチドを標準物質として使用した。

#### 2-2-5. 0 時間外挿法

10 µg の L-Ala-L-Phe、あるいは L-Phe-L-Ala を 6 M 塩酸気相中、110°C で 3, 6, 16, 24 時間の加水分解処理を行った後、NBD-F を用いて蛍光誘導体化した。逆相カラム TSK-gel ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d., 33°C) により各アミノ酸に分離し、SUMICHIRAL OA-3100 (250×4.6 mm i.d.; 住化分析センター, 33°C) を用いて各エナンチオマーに分離した。移動相には、1 mM citric acid を含む methanol/acetonitrile 95 : 5 を用い、1.0 ml/min で送液した。D, L-アミノ酸の定量には、クロマトグラムから得られたピークの高さを用いた。各加水分解時間に対する D/(D+L)比を 0 時間へ外挿して、それぞれのジペプチドにおける Ala と Phe の 0 時間外挿値を求めた。



## 2-3. 結果

### 2-3-1. 各ジペプチド加水分解産物のジアステレオマー分離

まず、各ジペプチド標品を用いて、各ジアステレオマーに分離できる分析条件を決定した (Fig. 2-2)。L-Ala-L-Phe, L-Phe-L-Ala を塩酸気相中、110°C で 0.5, 1, 2 時間加水分解処理した。NBD-F による蛍光誘導体後、ODS カラムにより各遊離アミノ酸、及び各ジペプチドジアステレオマーを分離した。1 時間の加水分解処理を施した各ジペプチドのクロマトグラムを Fig. 2-3 と Fig. 2-4 に示した。

L-Ala-L-Phe 加水分解産物を ODS カラムにより分析すると、遊離した Ala と Phe、未分解の L-Ala-L-Phe、これらに加えて配列が反転した L-Phe-L-Ala が検出された (Fig. 2-3)。同様に、L-Phe-L-Ala 加水分解産物の分析からも、配列が反転した L-Ala-L-Phe が検出された (Fig. 2-4)。ジペプチドを塩酸加水分解処理すると、diketopiperazine という環状構造を介して配列が反転することが知られている (Fig. 2-5) [Steinberg *et al.*, 1981]。時間依存的に未分解のジペプチドは Ala と Phe に分解され減少していくが、配列の反転したジペプチドは各加水分解時間においてほぼ一定量存在しており、この割合は加水分解が進行するにつれて上昇し、L-Ala-L-Phe 加水分解処理 2 時間で反転して生じた L-Phe-L-Ala は約 50% に、同様に L-Phe-L-Ala 加水分解処理により反転して生じた L-Ala-L-Phe は約 35% に達した (Fig. 2-6)。また、それぞれのジペプチドの加水分解産物から微量ではあるが、異性化したジアステレオマーと溶出時間の一致するピーク (Fig. 2-3 における D-Ala-L-Phe あるいは L-Ala-D-Phe (0.2~0.6%)、及び Fig. 2-4 における D-Phe-L-Ala あるいは L-Phe-D-Ala (0.3~0.9%)) が検出された。さらに、それぞれの配列反転ジペプチドにおいても、異性化したジアステレオマーと考えられるピークが極めて微量に検出された (Fig. 2-3, 2-4)。

### 2-3-2. 各ジペプチド加水分解産物のエナンチオマー分離

生じたジアステレオマーの確認と、各ジペプチドにおいてどちら側のアミノ酸に異性化が起きているのかを調べるために、ODS カラムを用いて分離した異性化ジアステレオマーと考えられる画分を分取し、キラルカラムを用いて各エナンチオマーに分離した。まず、各ジペプチドにおいて 4 種類のエナンチオマーを分離できる条件を決定した。Fig. 2-7a, b にそれぞれ、D, L-Ala-D, L-Phe 標品 (D-Ala-D-Phe, D-Ala-L-Phe, L-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Phe)、及び D, L-Phe-D, L-Ala 標品のクロマトグラムを示した。

L-Ala-L-Phe に由来する異性化ジアステレオマーと考えられた ODS カラムの画分をキラルカラムで分離すると、主ピーク (この画分に含まれるエナンチオマーのうち 80~90%) が L-Ala-D-Phe と一致し、また、小ピークが D-Ala-L-Phe と一致し、予想された 2 種類のジアステレオマーペプチドであることが確認された (Fig. 2-8a)。また、この画分中の D-Ala-L-Phe の存在割合は加水分解処理時間とともに増加した (Table 2-1)。一方、反転して生じた配列 L-Phe-L-Ala が異性化したジアステレオマー画分中には、加水分解処理時間によらず L-Phe-D-Ala と D-Phe-L-Ala が等量含まれていた (Fig. 2-8b, Table 2-1)。

また、L-Phe-L-Ala を加水分解処理して得た異性化ジアステレオマー画分には、主に L-Phe-D-Ala (この画分に含まれるエナンチオマーのうち 80~90%) が検出され、わずかに D-Phe-L-Ala が含まれていた (Fig. 2-9a, Table 2-2)。同様にこの画分中の D-Phe-L-Ala の存在割合は経時的に増加していた。一方、反転して生じた配列 L-Ala-L-Phe が異性化したジアステレオマー画分には、L-Ala-D-Phe より D-Ala-L-Phe の方が各加水分解処理時間において多く含まれていた (Fig. 2-9b, Table 2-2)。

以上の結果を総合的にみると、塩酸加水分解処理中にどちらのジペプチドに

においても主に C 末端側で異性化が起きていることが明らかとなった。

### 2-3-3. 0 時間外挿法による外挿値の評価

以上の結果から、塩酸加水分解処理中にペプチドのジアステレオマー化が起きていることが明らかとなった。もし、ジペプチドの加水分解 0 時間外挿値が、この影響を受けているのであれば、C 末端側のアミノ酸でより大きな値を示すはずである。そこで、これを確認するために L-Ala-L-Phe, L-Phe-L-Ala を 3, 6, 16, 24 時間塩酸加水分解処理し、Ala と Phe について各加水分解時間における D/(D+L) 比を用いて、0 時間外挿値を求めた。L-Ala-L-Phe の Ala と Phe の 0 時間外挿値はそれぞれ 0.07%、0.44%であり、L-Phe-L-Ala の Ala と Phe の 0 時間外挿値はそれぞれ 0.54%、0.36%であった (Fig. 2-10, Table 2-3)。L-アミノ酸のみから構成されているジペプチドにも関わらず、0 時間外挿法で求めた外挿値は 0%を示さず、どちらのジペプチドにおいても C 末端側にあるアミノ酸の 0 時間外挿値の方が大きい D-アミノ酸比を示した。これは各ジペプチドのエナンチオマー分析の結果と一致しており、0 時間外挿値は加水分解処理によるペプチドジアステレオマー化の影響を反映していることが示された。

## 2-4. 考察

本章では、塩酸加水分解処理中に遊離する前のペプチド状態でアミノ酸が異性化（ペプチドのジアステレオマー化）しているかどうかを調べた。0 時間外挿法によって、ペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化反応による D-アミノ酸の生成については解消できるが、もし処理中のペプチドにおいて急速なジアステレオマー化が起こっているならば、タンパク質における真の D-アミノ酸含量を求めることはできず、手法として致命的な問題となる。本研究では、最も単純なモデルであるジペプチドの L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala を用いて、0.5~2 時間までの短い加水分解時間で処理した後、各ジペプチドのジアステレオマー及びエナンチオマーの解析を行った。

ODS カラムを用いたジアステレオマーの分離により、各ジペプチド (LL ペプチド) 加水分解産物において微量の異性化したジペプチド (DL または LD ペプチド) が検出された (Fig. 2-3, 2-4)。また、ジケトピペラジンを介して、配列が反転したジペプチドが生じ、さらにこの反転配列においても極微量の異性化したジペプチドが検出された (Fig. 2-3, 2-4)。

それぞれ得られた異性化ジアステレオマー画分をキラルカラムにより、各エナンチオマーに分離した。L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala の異性化ジアステレオマー画分からは、それぞれ C 末端が異性化した L-Ala-D-Phe と L-Phe-D-Ala が主に検出された (Fig. 2-8a, 2-9a)。しかし、L-Phe-L-Ala から直接ジアステレオマー化した場合と異なり、L-Ala-L-Phe の加水分解に伴って配列が反転した L-Phe-L-Ala から生じた異性化ジアステレオマー画分からは、L-Phe-D-Ala と D-Phe-L-Ala がほぼ等量検出された (Fig. 2-8b)。また、L-Phe-L-Ala の加水分解により配列が反転した L-Ala-L-Phe から生じた異性化ジアステレオマー画分では、L-Ala-D-Phe

よりも D-Ala-L-Phe の方が多くを占めていた (Fig. 2-9b)。反転配列においてはどちらの場合も、N 末端が異性化したペプチドが等量以上生じているが、これは C 末端が異性化したジペプチド (L-Ala-D-Phe 及び L-Phe-D-Ala) が反転して生成したか、あるいはジケトピペラジン上において異性化が生じて生成した可能性が考えられる [Steinberg *et al.*, 1981]。これとは別に、2 時間加水分解処理した L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala のそれぞれの反転配列 (L-Phe-L-Ala, L-Ala-L-Phe) 画分をキラルカラムで分離すると、両残基が D 体と推定される極めて小さいピークが検出された。このピークの正確な同定はできなかったが、仮にこれを DD ペプチドと考えると、2 時間の加水分解処理で生じたエナンチオマーのうち約 0.1% 生じていることとなる。以上より、加水分解処理で生じたこれらジアステレオマー化したペプチドを総合すると、どちらのジペプチドにおいても C 末端で異性化が起こりやすいことが明らかとなった。

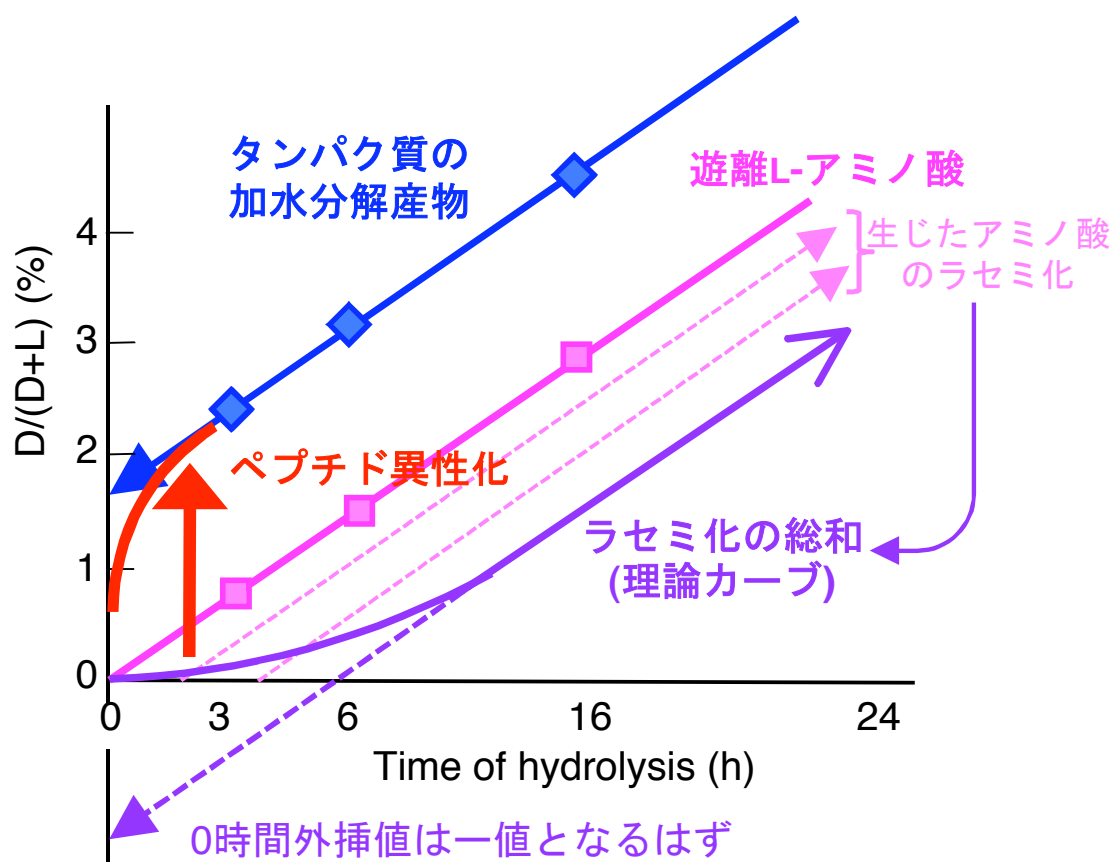
また、ペプチドのジアステレオマー化が 0 時間外挿値に及ぼす影響をみるために、それぞれのジペプチド由来のアミノ酸の異性化の様子を 0 時間外挿法により解析した。0 時間外挿値は 0% を示さず、特に C 末端側のアミノ酸で大きな値を示した (Fig. 2-10, Table 2-3)。このことは、ジペプチド状態でジアステレオマーとなる異性化が C 末端側で起こりやすいという結果と一致しており、0 時間外挿値が、ペプチド状態でのジアステレオマー化の影響を受けていることを示す。

塩酸加水分解において、なぜ C 末端で異性化が起きやすいのかを加水分解反応機構より推察した (Fig. 2-11)。加水分解反応は、まずカルボニル酸素にプロトンが付加することで開始する。この中間体 A は窒素の電子供与性により、中間体 B と共鳴安定化にある。従って、より不安定な中間体 C になることはほとんどないと考えられている。しかし、もし中間体 C を経由することがあれば、

N 末端側の $\alpha$ 炭素に異性化が起こりえる。本研究の結果から、N 末端ではなく、C 末端で異性化が起こりやすいことから、中間体 C ではなく、中間体 D を経由しているのではないかと推測している。中間体 D は、中間体 C よりも共鳴部位が長くなるため、こちらに反応が進みやすいのではないかと考えられる。

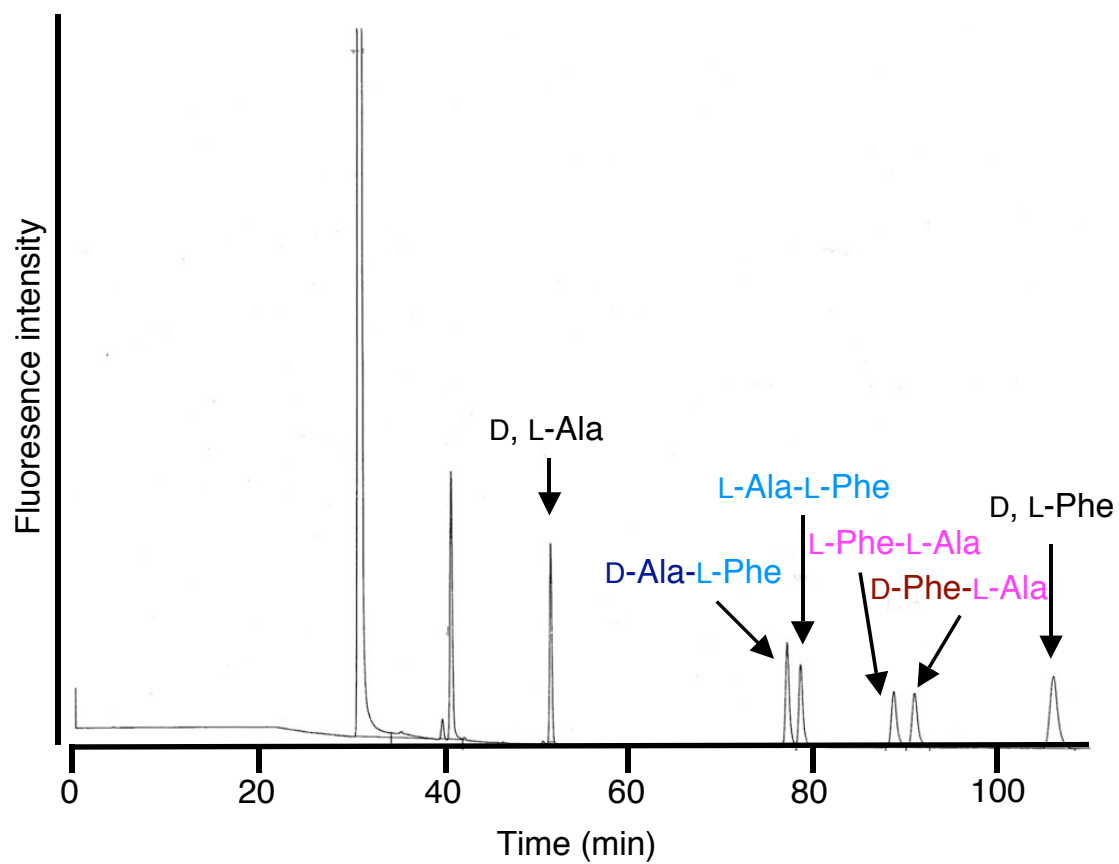
本章より、モデルジペプチドの加水分解処理中にペプチドのジアステレオマー化が起きていることが示された。従って、タンパク質の加水分解産物において、0 時間外挿値がプラスの値を示すには、ここで示した加水分解処理初期での急速なペプチドの異性化により D-アミノ酸が生じる場合と、内在性の D-アミノ酸残基が存在する場合であることが判った (Fig. 2-1)。ペプチドの異性化効果のみを考えると、ペプチドの異性化速度と遊離アミノ酸のラセミ化速度が等しい時に原点を通ると考えられる。従って、0 時間外挿法では、ペプチドの異性化効果を排除できないため、タンパク質の D-アミノ酸含量を正確に求めることができない。この結果はタンパク質加水分解の状況全体を再現できてはいないものの、タンパク質加水分解においても同様の現象が起きていることを示唆している。しかし、タンパク質の場合、ポリペプチドの C 末端で異性化が起こるのか、加水分解しようとするペプチド結合全てにおいてその C 末端側で異性化が起こるのか、現時点では明らかではない。

本章で、0 時間外挿値には加水分解処理により生じる人工的な D-アミノ酸が含まれていることが明らかとなった。そこで次章では、塩酸加水分解 0 時間外挿法に代わる、別の方法を構築し、タンパク質中の D-アミノ酸残基の正確な検出を試みた。



**Fig. 2-1 0 時間外挿法におけるペプチド異性化の影響**

タンパク質加水分解において、D-アミノ酸の出現が遊離後のアミノ酸のラセミ化だけであると考え、遊離アミノ酸が生じるのにある程度時間がかかるため、生じたアミノ酸分子ごとに遅れてラセミ化が起こる (紫線)。そのため、0 時間外挿値はマイナス値となるはずである。しかし、加水分解処理初期において、ペプチド異性化 (赤点線) により急速に D-アミノ酸が生成されることで、実際のタンパク質加水分解産物 (青線) の 0 時間外挿値がプラス値となると考えられる。



**Fig. 2-2 ODSカラムによる各ジペプチド標品の分離**

NBD化したAla, Phe及び各ジペプチドをそれぞれ1 pmol導入した。

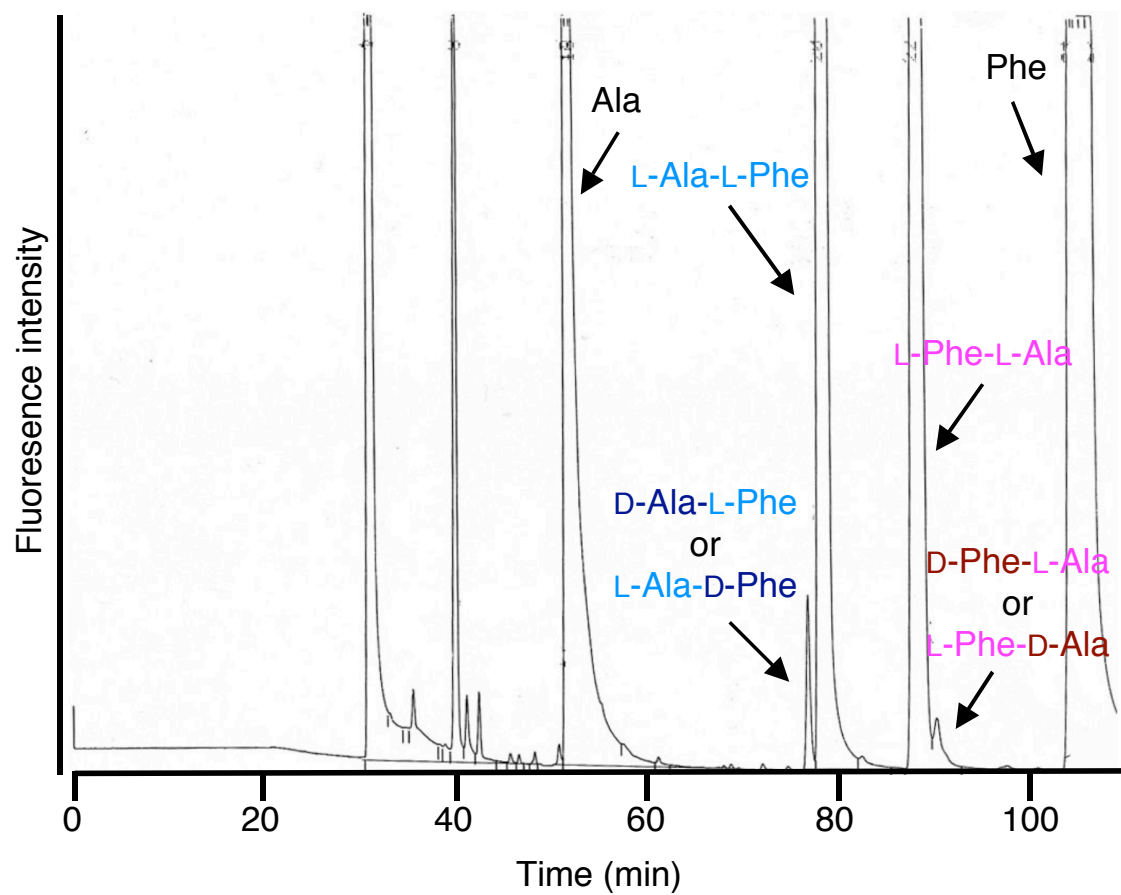
カラム : ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d., 33°C)

移動相 : A; 1% THF, 0.02% TFA in 5% acetonitrile

B; 1% THF, 0.02% TFA in acetonitrile

流速 : 1 ml/min





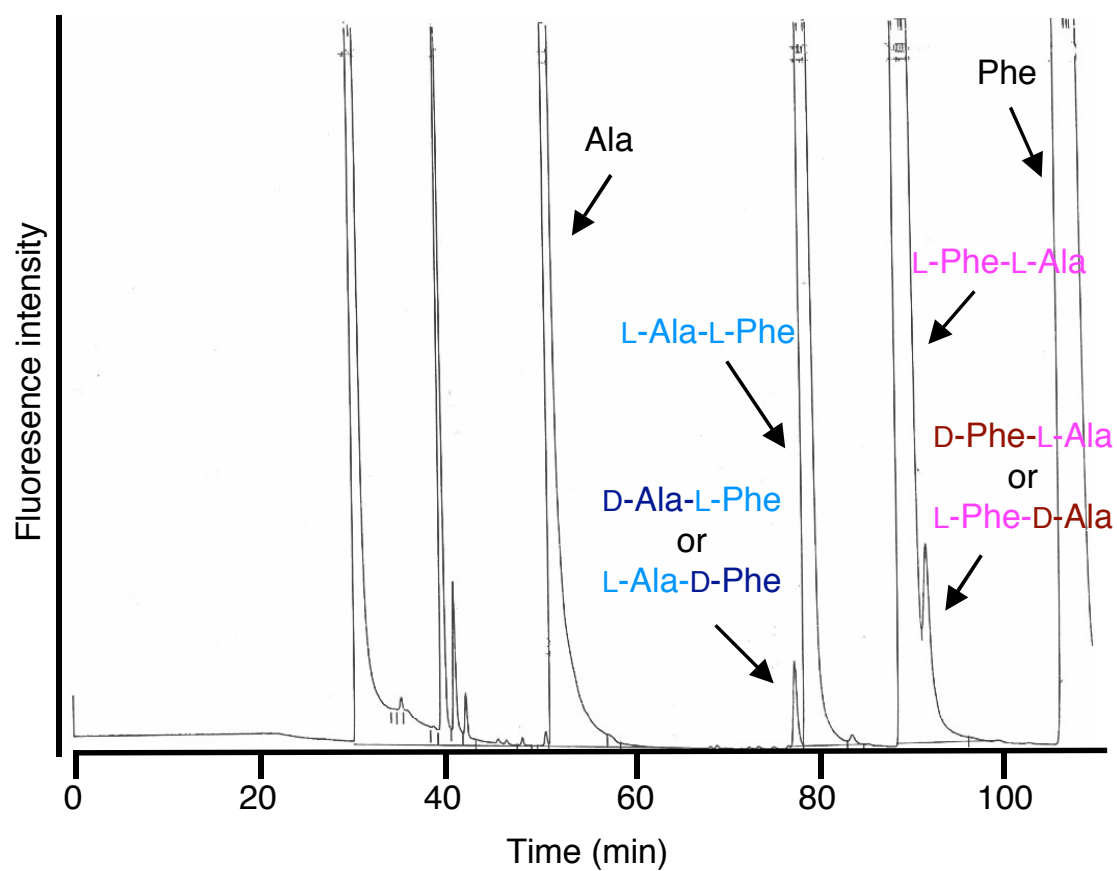
**Fig. 2-3 ODSカラムによるL-Ala-L-Phe 1時間加水分解産物の分離**

カラム : ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d., 33°C)

移動相 : A; 1% THF, 0.02% TFA in 5% acetonitrile

B; 1% THF, 0.02% TFA in acetonitrile

流速 : 1 ml/min



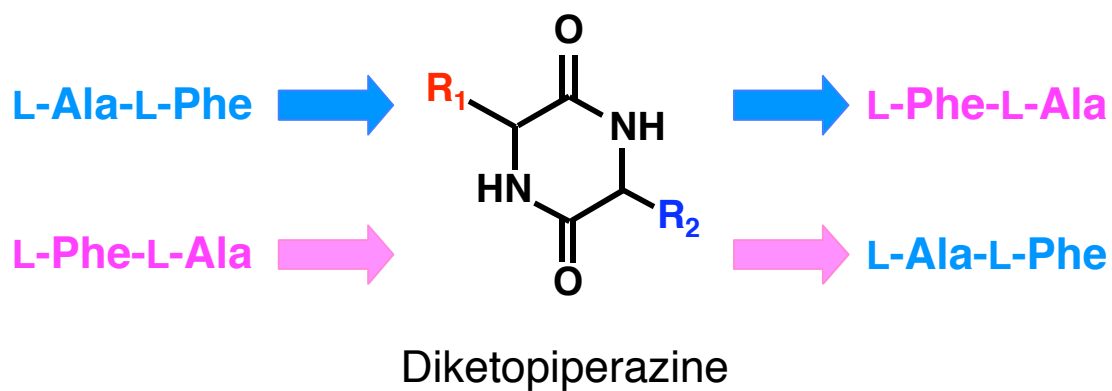
**Fig. 2-4 ODSカラムによるL-Phe-L-Ala 1時間加水分解産物の分離**

カラム : ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d., 33°C)

移動相 : A; 1% THF, 0.02% TFA in 5% acetonitrile

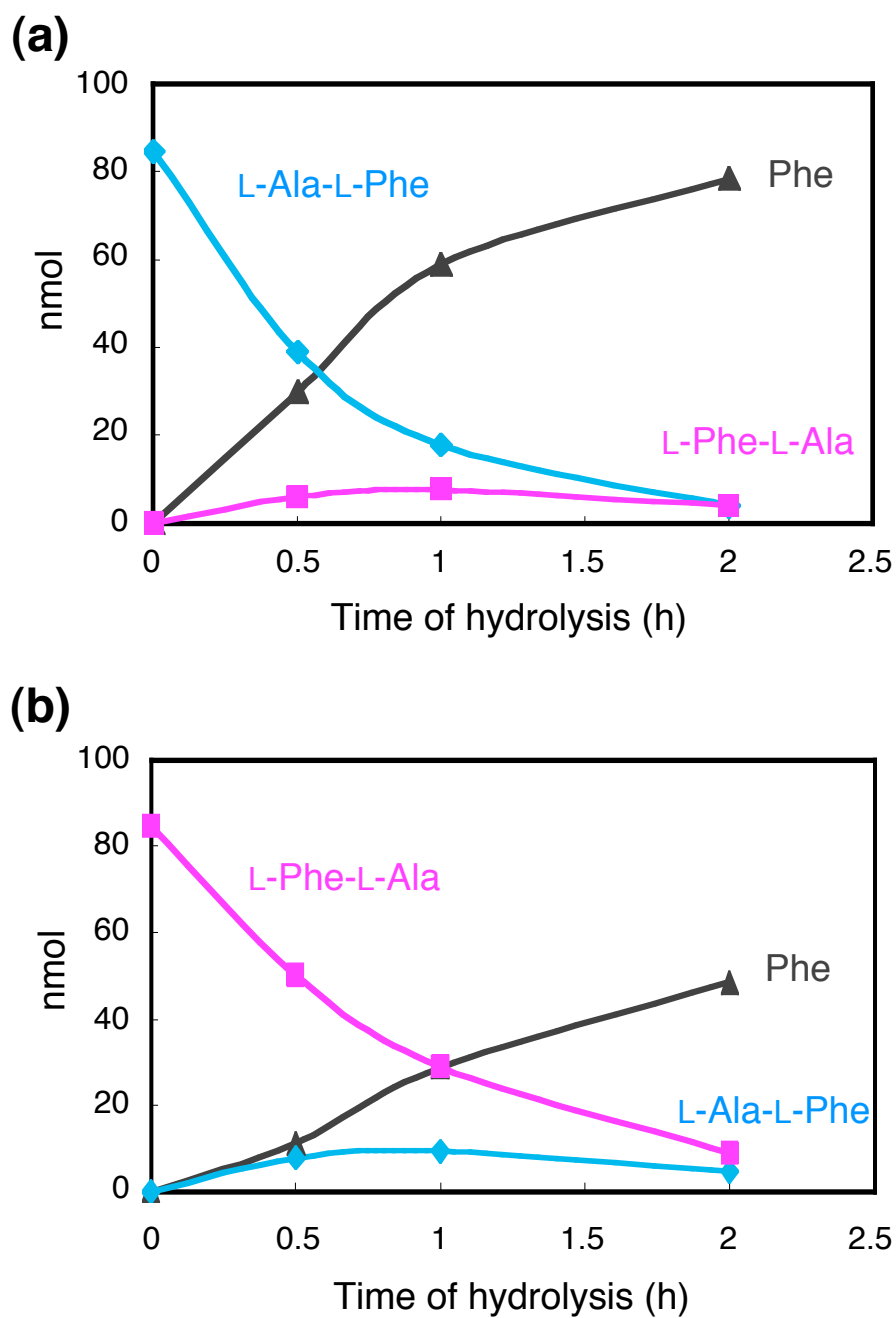
B; 1% THF, 0.02% TFA in acetonitrile

流速 : 1 ml/min



**Fig. 2-5 Diketopiperazine**を介したジペプチドの配列反転

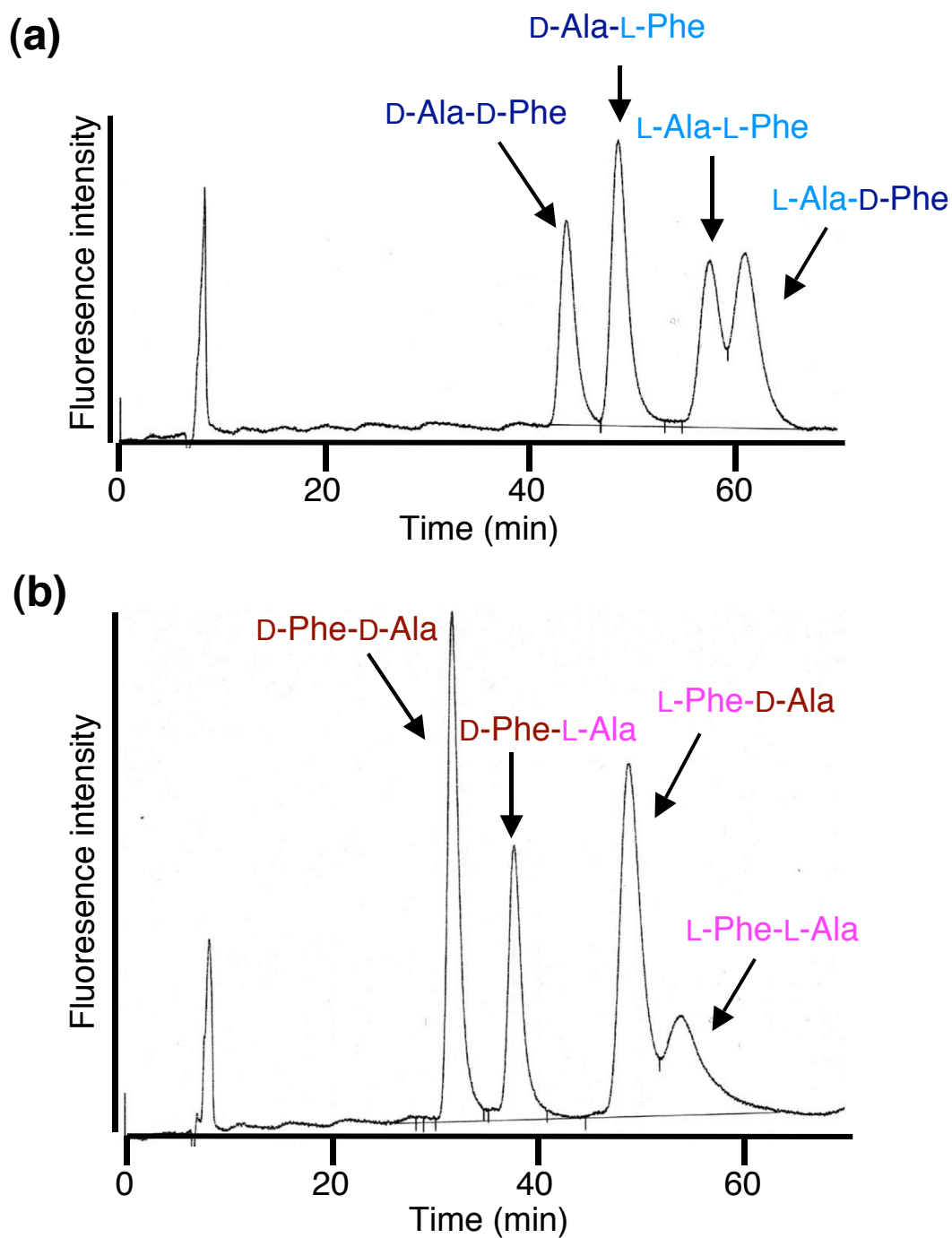
L-Ala-L-Phe から diketopiperazine が形成されると、その開裂時に、元の L-Ala-L-Phe と配列が反転した L-Phe-L-Ala が生じる。同様に、L-Phe-L-Ala では、元の L-Phe-L-Ala と配列が反転した L-Ala-L-Phe が生じる。



**Fig. 2-6** 加水分解処理時間による各ジペプチドと遊離Pheの量変化

(a) L-Ala-L-Phe加水分解 (b) L-Phe-L-Ala加水分解

L-Ala-L-Phe (◆), L-Phe-L-Ala (■), Phe (▲) は、2回の実験の平均値を示した。



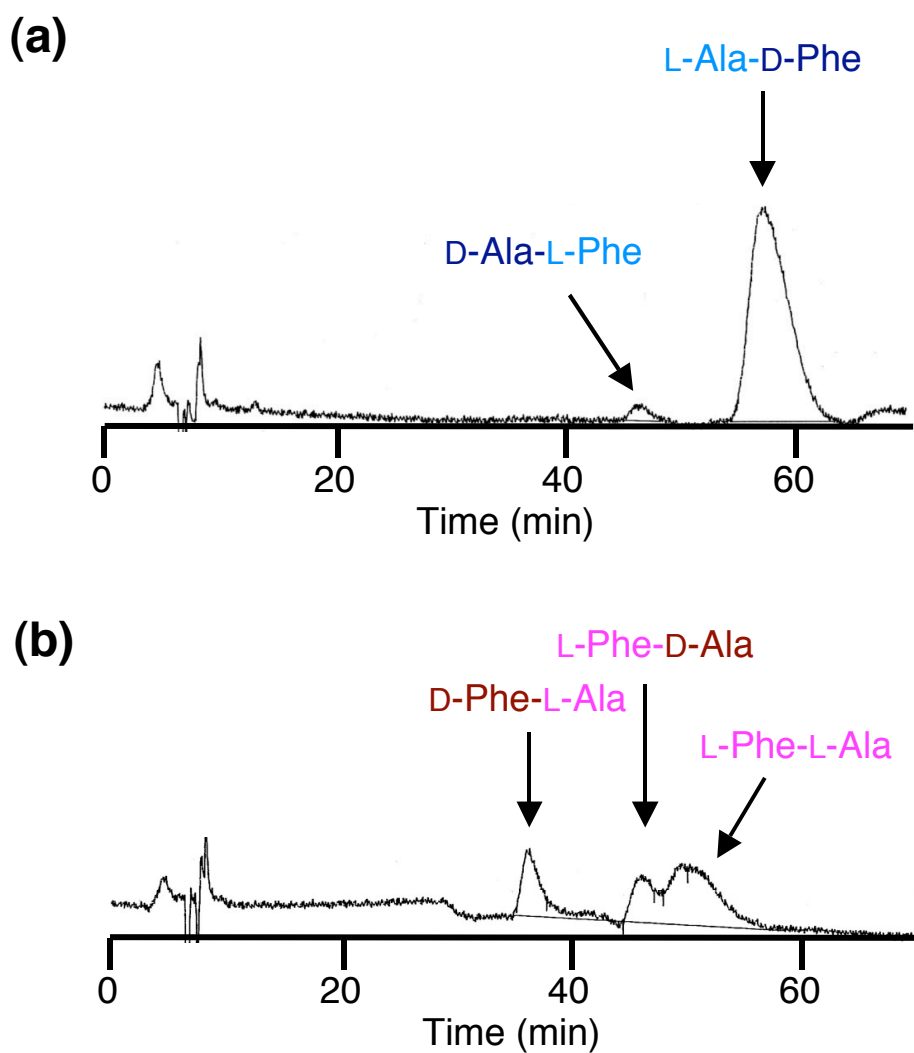
**Fig. 2-7** キラルカラムによる(a)D, L-Ala-D, L-Phe標品と(b)D, L-Phe-D, L-Ala標品のエナンチオマー分離

各NBD-ジペプチド標品は、それぞれ1 pmol導入した。

カラム : SUMICHIRAL OA-3200 (250×4.6 mm i.d., 10°C)

移動相 : 0.15 mM citric acid in methanol/acetonitrile 98 : 2

流速 : 0.5 ml/min



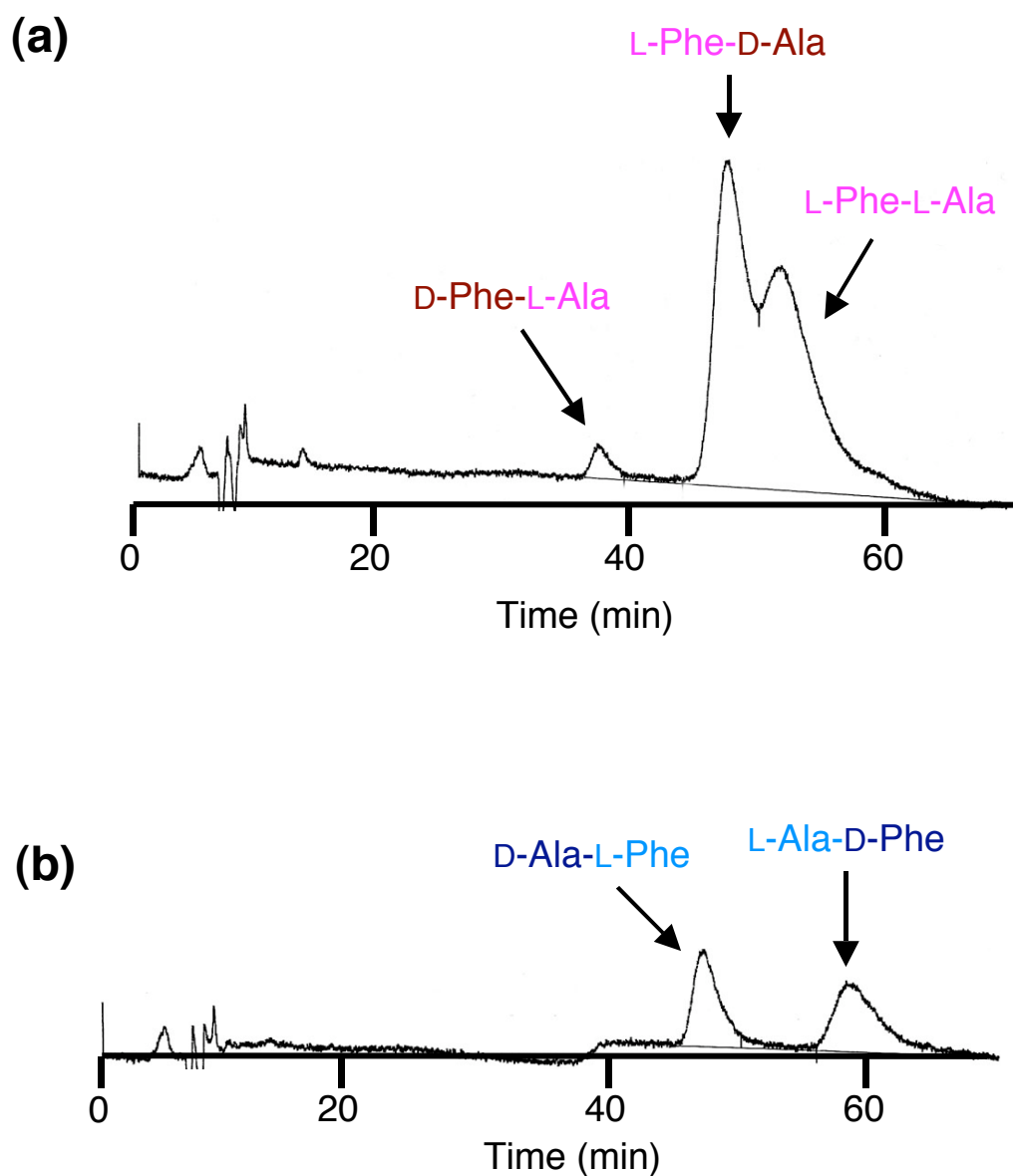
**Fig. 2-8 L-Ala-L-Phe 1時間加水分解処理により生じた異性化画分のエナンチオマー分離**

(a) L-Ala-L-Phe異性化画分 (b) 反転したL-Phe-L-Ala異性化画分

カラム : SUMICHIRAL OA-3200 (250×4.6 mm i.d., 10°C)

移動相 : 0.15 mM citric acid in methanol/acetonitrile 98 : 2

流速 : 0.5 ml/min



**Fig. 2-9 L-Phe-L-Ala 1時間加水分解処理により生じた異性化画分のエナンチオマー分離**

(a) L-Phe-L-Ala異性化画分 (b) 反転したL-Ala-L-Phe異性化画分

カラム : SUMICHIRAL OA-3200 (250×4.6 mm i.d., 10°C)

移動相 : 0.15 mM citric acid in methanol/acetonitrile 98 : 2

流速 : 0.5 ml/min

**Table 2-1. L-Ala-L-Phe加水分解処理で生じた各エナンチオマーのジペプチド中における割合 (%)**

Time (h)	DADF	LALF	DALF	LADF	DFdA	LFLA	DFLA	LFdA
0.5	86.34		0.15		13.45		0.06	
	0	86.34	0.01	0.14	0	13.45	0.03	0.03
1	69.40		0.31		30.12		0.18	
	0	69.40	0.02	0.29	0	30.12	0.09	0.09
2	49.24		0.58		49.60		0.58	
	0	49.24	0.13	0.45	0	49.60	0.29	0.29

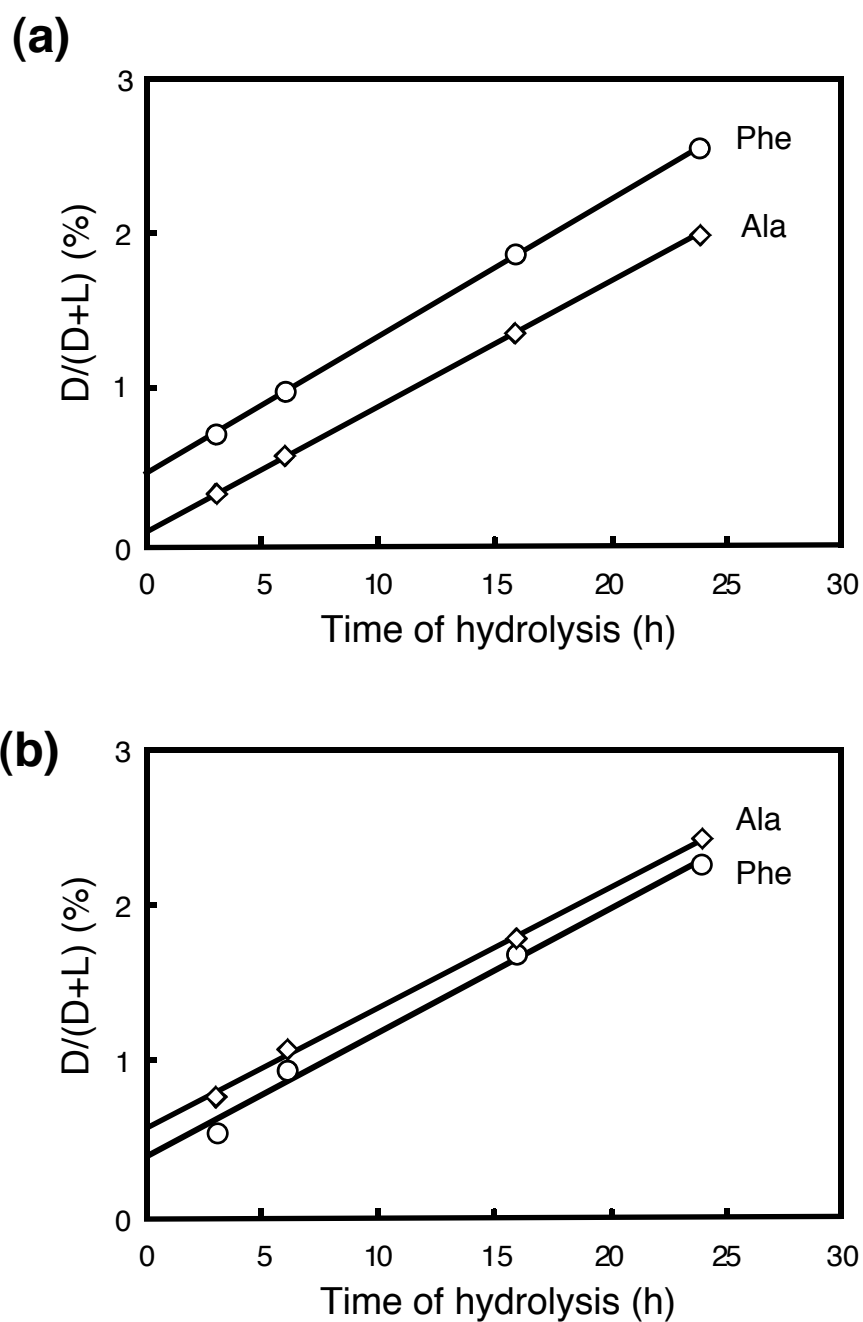
各加水分解処理時間における全未分解ジペプチドに対する各ジアステレオマー (上段)、または各エナンチオマー (下段) の割合は、2 回の実験の平均値を示した。なお、Ala, Pheは 1 文字表記とした。LALF の加水分解により、DALF と LADF、及び反転した配列の LFLA, DFLA, LFdA を生じる。

**Table 2-2. L-Phe-L-Ala加水分解処理で生じた各エナンチオマーのジペプチド中における割合 (%)**

Time (h)	DADF	LALF	DALF	LADF	DFdA	LFLA	DFLA	LFdA
0.5	13.50		0.03		86.18		0.30	
	0	13.5	0.02	0.01	0	86.18	0.03	0.27
1	24.62		0.10		74.81		0.47	
	0	24.62	0.06	0.04	0	74.81	0.05	0.42
2	33.31		0.38		65.37		0.94	
	0	33.31	0.25	0.13	0	65.37	0.14	0.80

各加水分解処理時間における全未分解ジペプチドに対する各ジアステレオマー (上段)、または各エナンチオマー (下段) の割合は、2 回の実験の平均値を示した。なお、Ala, Pheは 1 文字表記とした。LFLA の加水分解により、DFLA と LFdA、及び反転した配列の LALF, DALF, LADF を生じる。





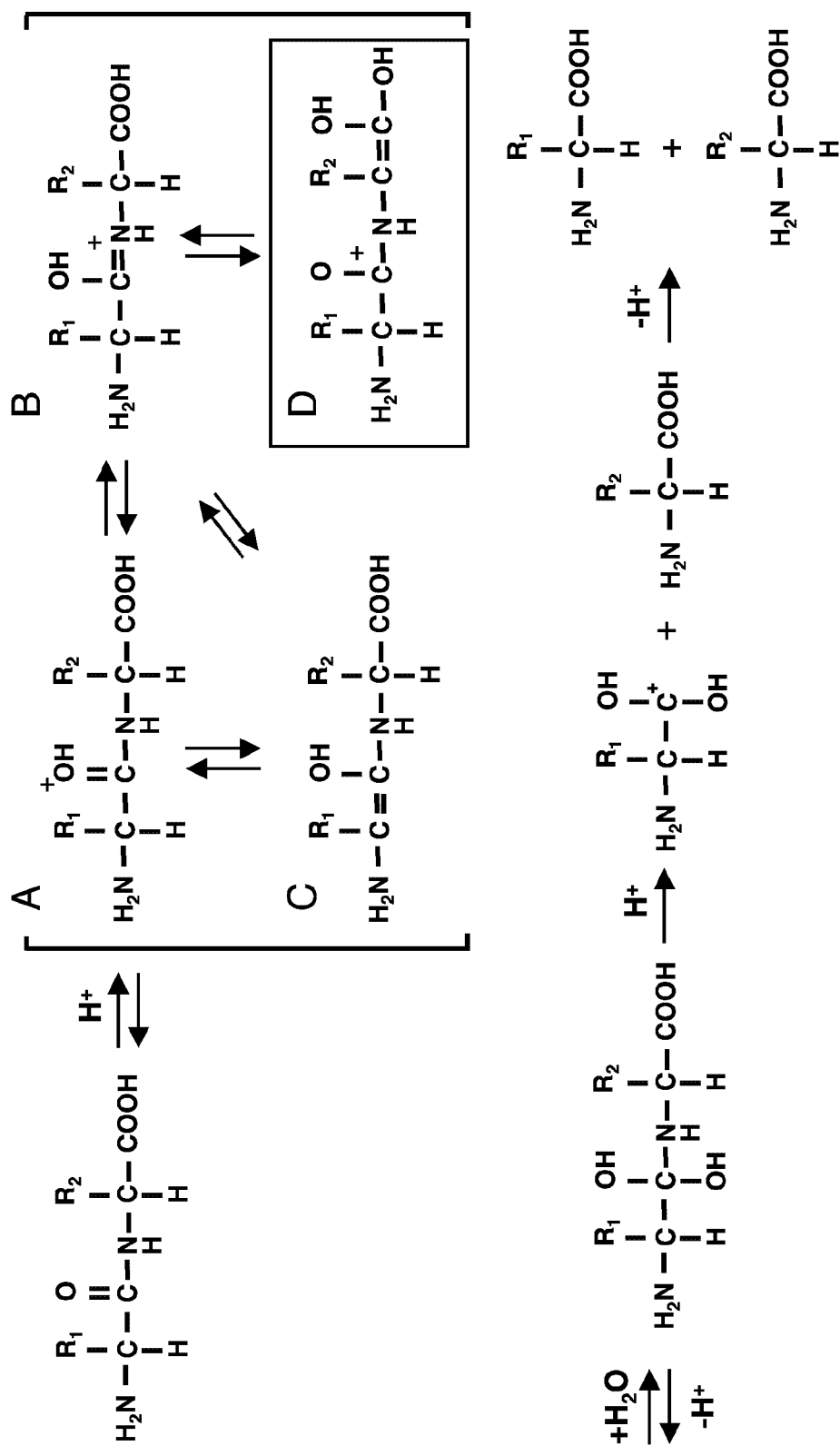
**Fig. 2-10** (a)L-Ala-L-Pheと(b)L-Phe-L-Alaの加水分解中におけるD-アミノ酸比

Ala (◇), Phe (○)は、3回の実験の平均値を示した。

**Table 2-3. 塩酸加水分解した L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala における D/(D+L) 比の 0 時間外挿値**

	D/(D+L) (%)	
	Ala	Phe
L-Ala-L-Phe	0.07±0.04	0.44±0.10
L-Phe-L-Ala	0.54±0.06	0.36±0.08

0 時間外挿値は、3 回の実験の平均値±標準偏差を示した。



**Fig. 2-11** ジペプチドの酸加水分解反応機構

プロトンがカルボニル酸素に付加し、中間体Aとなる。これに水分子が付加し、酸素上のプロトンが窒素に移動し、アミンが脱離する。

## 第 3 章

### 重水素ラベルを用いたタンパク質中の D-アミノ酸残基の検出

#### 第 1 節 タンパク質中の D-アミノ酸残基の直接的検出法の構築

##### 3-1-1. 目的

第 2 章において、タンパク質の塩酸加水分解反応中にペプチド状態でアミノ酸の異性化 (ペプチドのジアステレオマー化) が起きていることを示した。そのため、0 時間外挿法ではこの時に異性化した人工的な D-アミノ酸が 0 時間外挿値に含まれてしまい、タンパク質の D-アミノ酸含量を正確に求めることができないことが示された。タンパク質に含まれる D-アミノ酸残基を正確に定量するためには、塩酸加水分解処理によって生じた全ての D-アミノ酸を排除しなければならない。遊離アミノ酸であれ、ペプチド中のアミノ酸残基であれ、アミノ酸がラセミ化、あるいは異性化する際には、 $\alpha$ 水素が一旦外れ、 $\text{H}_2\text{O}$  中の水素が再び結合するという過程を経る。そこで、古くには Manning が加水分解に  $^3\text{HCl}$  を用い、Frank らや Liardon らは  $\text{DCl}$  中で加水分解を行うことで、処理中にラセミ化したアミノ酸をトリチウムや重水素で標識した [Manning, 1970; Frank *et al.*, 1979; Liardon *et al.*, 1981]。本研究では、タンパク質の加水分解を  $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$  気相中で行うことで、ラセミ化及びペプチド中で異性化したアミノ酸の  $\alpha$ 水素を重水素に置換し、これらを分子質量 1 の違いにより、タンパク質に含まれる D-アミノ酸残基と区別することが可能な分析システムを構築することを目指した (Fig. 3-1)。

本節では、重塩酸加水分解法と、検出系としてキラルカラムを備えた

LC/ESI-MS/MS (liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectroscopy) を組み合わせた分析システムを構築した。モデルペプチドとして、二つの化学合成ペプチド L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala を分析し、ペプチド内在性 D-Ala と加水分解により生じた D-Ala を検出・区別できるかどうかを調べた。さらに、この分析システムを 10 残基中 2 残基の D-Phe を含む黄体形成ホルモン放出ホルモンアンタゴニスト (D-Phe<sup>2,6</sup>-LHRH) にも適用し、ペプチド内在性 D-Phe の検出を試みた。

なお、本節の研究成果は、文献[Miyamoto *et al.*, 2010b]として発表した。

### 3-1-2. 実験材料及び方法

#### 3-1-2-1. 試薬

L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala は、Sigma 製品を使用した。Pyr-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-Gly (D-Phe<sup>2,6</sup>-LHRH) は、Bachem 製品を使用した。D<sub>2</sub>O (99.9%) と DCI (99.9%) は、和光純薬工業製品を使用した。

#### 3-1-2-2. 加水分解

1 µg の L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala、あるいは 2 µg の D-Phe<sup>2,6</sup>-LHRH を PICO TAG (Waters) を用いて、6 M DCI/D<sub>2</sub>O 気相中、110°C で 16 及び 24 時間加水分解処理した。

#### 3-1-2-3. LC/ESI-MS/MS 分析用試料の調製

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 50 µl に溶解した。このうち 20 µl に 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10 µl を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 270 µl を加え、反応を停止した。0.45 µm フィルター (Millex-LH) で濾過し、このうち 10 µl を HPLC に導入し、逆相カラム TSK-gel ODS-80Ts (250 × 4.6 mm i.d.; Tosoh, 33°C) で各アミノ酸に分離した [Hamase *et al.*, 1997]。移動相 A は 1% THF, 0.02% TFA を含む 5% acetonitrile 水溶液、移動相 B は 1% THF, 0.02% TFA を含む acetonitrile を用いた。NBD-Ala の溶出は、15 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0% から 30% にリニアグラジエントをかけることで行った。NBD-Phe の溶出は、15 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0% から 22% に、65 分までに 22% から 32% になるようにリニアグラジエントをかけ、90 分まで移動相 B を 32% で

送液して行った。各アミノ酸を分取・乾固し、0.01% TFA 水溶液に溶解し、この一部を LC/ESI-MS/MS で分析した。

#### 3-1-2-4. LC/ESI-MS/MS による D,L-アミノ酸の検出

使用した LC/ESI-MS/MS は、Agilent 1100 separation module (Agilent Technologies) とエレクトロスプレーイオン源を備えた四重極タンデム質量分析計 (API-3000; Applied Biosystems) から構成されている。キラルカラムは、CHIROBIOTIC TAG (150×2.1 mm i.d.; Astec) を使用した。NBD-Ala の溶出には methanol/H<sub>2</sub>O/TFA 85 : 15 : 0.01、NBD-Phe の溶出には methanol/H<sub>2</sub>O/TFA 82 : 18 : 0.01 を 0.2 ml/min で送液して行った。MS/MS 分析はポジティブイオンモードで目的のフラグメンテーションを行った。質量検出器の作動条件は 10 pmol/μl の NBD-アミノ酸を ESI-MS/MS に 10 μl/min で送液して、最適化した。N<sub>2</sub> は衝突ガスとして用いた。ES キャピラリーは 5.0 kV、温度は 400°C とした。その他のパラメーターは、スペクトロメーターソフトウェア (Applied Biosystems) で最適化した。ESI-MS/MS による前駆イオンと生成イオンの検出には、マルチプルリアクションモニタリングモード (MRM) を用いた。

NBD-アミノ酸の D, L-エナンチオマーの定量には、クロマトグラムのピーク面積を用いた。ペプチドの D-Ala 含量は、D-Ala ( $m/z$  253/236)/(D-Ala ( $m/z$  253/236+254/237+255/238)+L-Ala ( $m/z$  253/236+254/237+255/238)) から算出した。加水分解処理中に生じた D-Ala 比は、D-Ala ( $m/z$  254/237+255/238)/(D-Ala ( $m/z$  254/237+255/238)+L-Ala ( $m/z$  253/236+254/237+255/238)) から算出した。

### 3-1-3. 結果

#### 3-1-3-1. NBD-D, L-アミノ酸の光学分割と検出

Song らにより、キャピラリーLC-MS/MS を用いた NBD-アミノ酸のキラル分析が報告されている [Song *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007]。本研究では、NBD-D, L-アミノ酸の定量にセミマイクロキラルカラムを備えた ESI-MS/MS 分析システム (API-3000) を使用した。まず、ODS カラムにより各 NBD-アミノ酸に分離し、分取・乾固した試料を LC/ESI-MS/MS により分析した。

ポジティブイオンモードにおいて、NBD-Ala, NBD-Ser, NBD-Leu, NBD-Phe, NBD-Val の前駆イオンはそれぞれ、 $m/z$  253,  $m/z$  269,  $m/z$  295,  $m/z$  329,  $m/z$  281 であり、生成イオンはそれぞれ、 $m/z$  236,  $m/z$  252,  $m/z$  249,  $m/z$  283,  $m/z$  235 であった。化学合成ペプチドの NBD-Ala の定量には  $m/z$  253/236, 254/237, 255/238 をそれぞれモニターした。これらの NBD- D, L-アミノ酸はキラルカラム (CHIROBIOTIC TAG) によって良好に分離でき、全てにおいて NBD-L-アミノ酸が最初に溶出された。

#### 3-1-3-2. 化学合成ペプチド中の D-アミノ酸残基の検出

L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala は、6 M DCI/D<sub>2</sub>O 気相中、110°C で 16 及び 24 時間加水分解処理した。ODS カラムで NBD-Ala の画分を分取し、LC/ESI-MS/MS に導入した。L-Ala-L-Ala-L-Ala の D-アミノ酸含量は、加水分解処理時間によらず 0%であった (Fig. 3-2a, Table 3-1)。一方、NBD-Ala の分子質量+1 ( $m/z$  254/237) に 1%以上の D-Ala が検出された (Fig. 3-2b, Table 3-2)。これは加水分解処理中に生じた D-Ala を示しており、16 時間から 24 時間にかけて時間依存的に D-Ala 比が上昇していた。また、NBD-L-Ala が分子質量+1 ( $m/z$



254/237) に検出されたが、これは主に天然の  $^{13}\text{C}$  による同位体効果を示していると考えられる。D-Ala-L-Ala-L-Ala の D-アミノ酸含量は、約 35%であり、これは理論上の D-アミノ酸含量 (約 33%) とよく一致していた (Fig. 3-2c, Table 3-1)。

さらに、他のアミノ酸にも適用するため、D-Phe<sup>2,6</sup>-LHRH の分析を行った。予想通り、ペプチド中の D-Phe を基準の分子質量 ( $m/z$  329/283) で確認することができた (Fig. 3-3)。また、加水分解処理中に生じた NBD-L-Phe が分子質量+1 ( $m/z$  330/284) に検出された。

以上の結果より、重塩酸加水分解と LC/ESI-MS/MS を組み合わせた分析システムを用いることで、ペプチド内在性の D-アミノ酸残基と、加水分解処理による遊離アミノ酸のラセミ化、及びペプチド中の異性化により生成した人工的な D-アミノ酸とを区別することが可能となった。

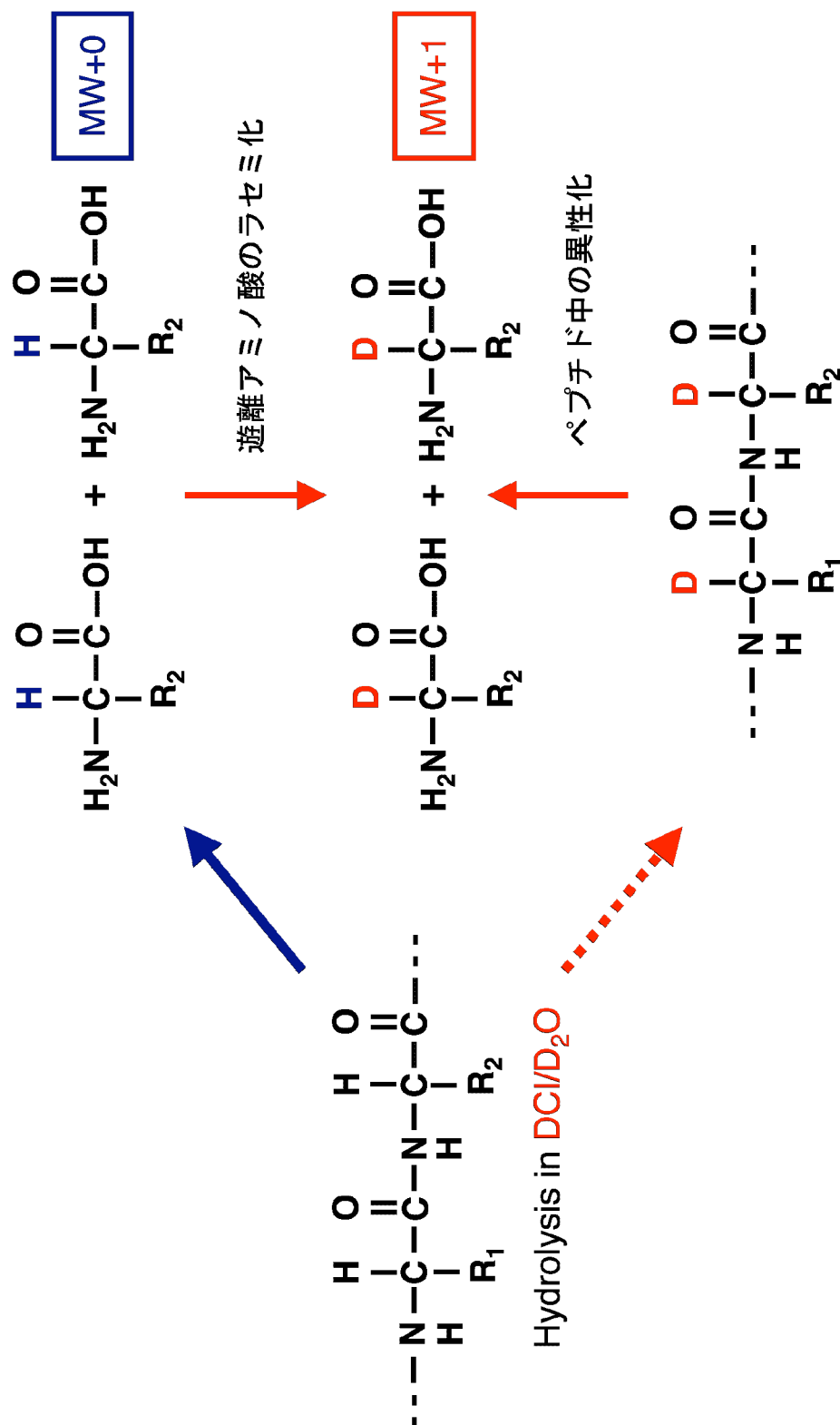
#### 3-1-4. 考察

本節において、ペプチド内在性の D-アミノ酸残基と加水分解処理によってラセミ化及びペプチド中での異性化により生じた人工的な D-アミノ酸とを区別できる分析システムを構築した。重塩酸加水分解とキラルカラムを備えた LC/ESI-MS/MS を組み合わせたこの分析システムは、D-アミノ酸を簡便に、そして感度よく検出することができた。過去の Frank らや Liardon らの研究では検出系に GC-MS を、Goodlett らは LC-MS を使用している [Frank *et al.*, 1979; Liardon *et al.*, 1981; Goodlett *et al.*, 1995]。本研究ではこれらに代わり、LC/ESI-MS/MS を検出系に用いたことによって、より感度良く、また固有のフラグメントイオンの検出により確実に微量物質である D-アミノ酸を捉えることが可能となった。

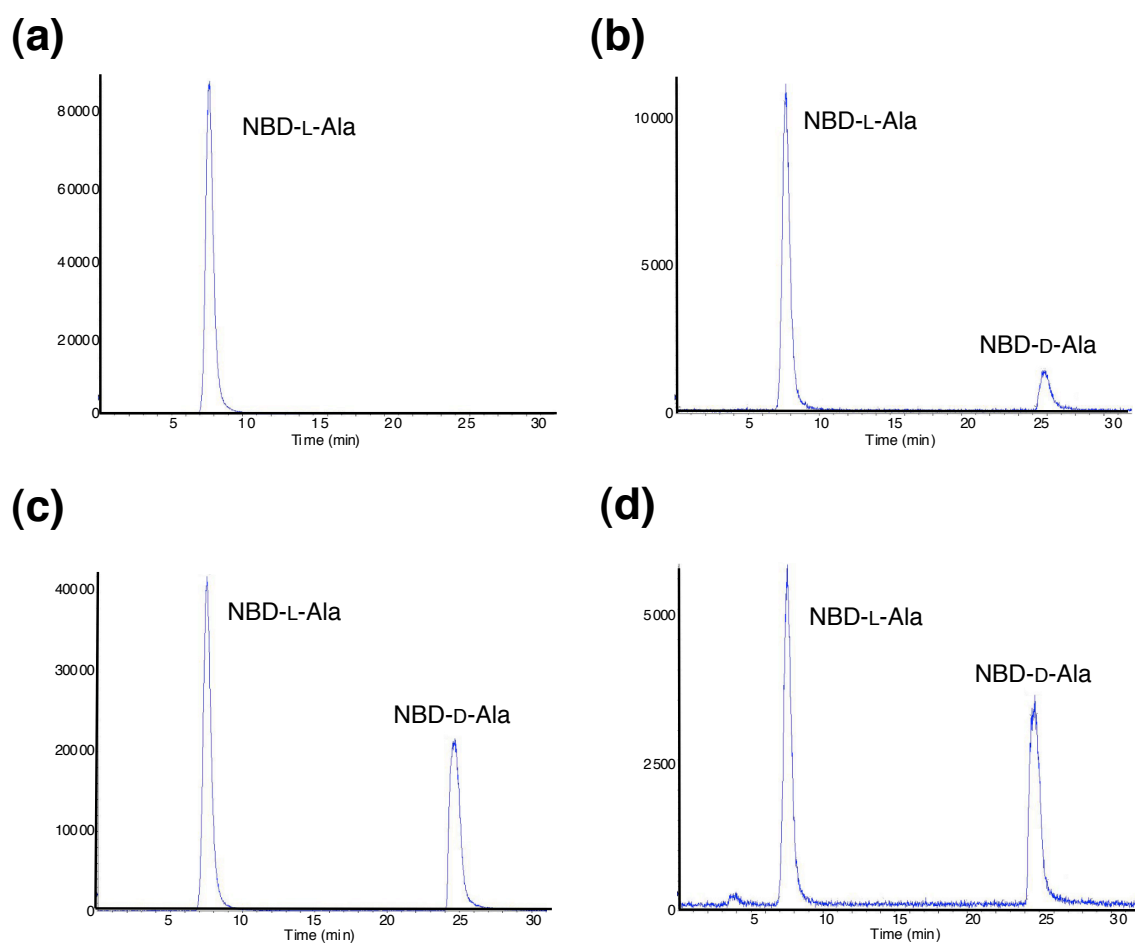
L-Ala-L-Ala-L-Ala の分析からは、期待していた通りに NBD-D-Ala ( $m/z$  253/236) は検出されず、重水素が付加した NBD-D-Ala ( $m/z$  254/237) のみが検出された (Fig. 3-2a, b)。従って、加水分解処理中に生じた D-Ala を、重水素置換により分子質量+1 として区別することができた。また、ペプチド化学合成過程において D-Ala の混入がないこと、さらには NBD 誘導体化 (60°C, 5 分間) によって人工的な D-Ala が生成されていないことを確認できた。一方、D-Ala-L-Ala-L-Ala の分析から理論値 (33%) とほぼ一致する D-Ala (35%) を検出できたことは、ペプチド及びタンパク質中の D-アミノ酸残基を正確に検出することにおいて、信頼性のある分析システムであることを示している (Fig. 3-2c, Table 3-1)。

また、10 残基の化学合成ペプチド D-Phe<sup>26</sup>-LHRH の分析において、ペプチド中の D-Phe を検出できたことと、加水分解処理によって生じた NBD-L-Phe を検出できたことから、より大きなペプチドやタンパク質にも適用することができ

ると考えられる (Fig. 3-3)。また当然のことながら、本分析法では L 体から D 体だけでなく、D 体から L 体変換にも同様に適用できることを示した。さらに、LC の分析条件を決定することにより、Ala や Phe 以外のアミノ酸の検出にも容易に適用することが可能である。次節では、ここで構築した分析システムを実際にタンパク質に適用し、内在性の D-アミノ酸残基の検出を試みた。



**Fig. 3-1** 重塩酸加水分解によるアミノ酸の重水素ラベル化  
 アミノ酸の重水素ラベル化には、ペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化による場合とペプチド中でのアミノ酸残基の異性化による場合がある。



**Fig. 3-2 重塩酸加水分解したトリペプチド由来NBD-D,L-AlaのLC/ESI-MS/MS MRMクロマトグラム**

- (a) 24時間加水分解した(L-Ala)<sub>3</sub>から単離したNBD-L-Ala ( $m/z$  253/236)
- (b) 24時間加水分解した(L-Ala)<sub>3</sub>から単離したNBD-D, L-Ala ( $m/z$  254/237)
- (c) 24時間加水分解したD-Ala-(L-Ala)<sub>2</sub>から単離したNBD-D, L-Ala ( $m/z$  253/236)
- (d) 24時間加水分解したD-Ala-(L-Ala)<sub>2</sub>から単離したNBD-D, L-Ala ( $m/z$  254/237)

**Table 3-1. L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala の D-Ala 含量**

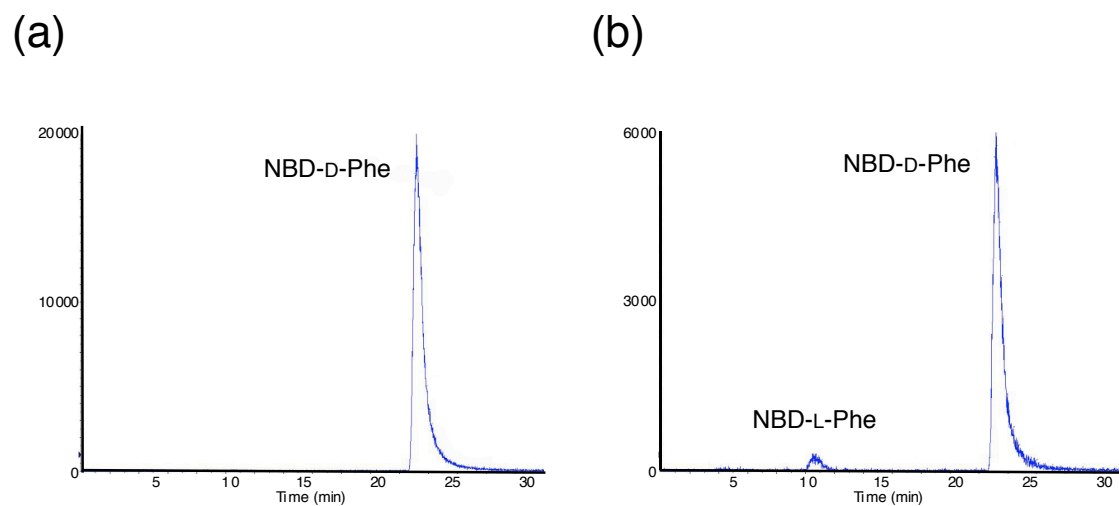
Time of hydrolysis (h)	L-Ala-L-Ala-L-Ala (%)	D-Ala-L-Ala-L-Ala (%)
16	0	35.0 ± 0.32
24	0	35.3 ± 0.28

D-Ala 含量は、4 回の実験の平均値±標準偏差を示した。

**Table 3-2. L-Ala-L-Ala-L-Ala の加水分解処理中に生じた D-Ala 比**

Time of hydrolysis (h)	L-Ala-L-Ala-L-Ala (%)
16	1.24 ± 0.29
24	1.96 ± 0.16

D-Ala 比は、4 回の実験の平均値±標準偏差として示した。



**Fig. 3-3 重塩酸加水分解したモデルペプチド由来NBD-D,L-PheのLC/ESI-MS/MS MRMクロマトグラム**

(a) 24時間加水分解したD-Phe<sup>2,6</sup>-LHRHから単離したNBD-D-Phe ( $m/z$  329/283)

(b) 24時間加水分解したD-Phe<sup>2,6</sup>-LHRHから単離したNBD-D, L-Phe ( $m/z$  330/284)

## 第 2 節 精製タンパク質中の D-アミノ酸残基の検出

### 3-2-1. 目的

本節では、前節で構築した重水素ラベルを用いた分析システムにより、*E. coli* で合成した $\beta$ -galactosidase に内在性 D-アミノ酸残基 (D-Ala, D-Leu, D-Phe, D-Val) が含まれているかどうかを調べた。これらの D-アミノ酸は、このシステムにより最適化でき、感度良く検出された。さらに、生物種の違いによる D-アミノ酸含量を調べるために、*E. coli* 以外の発現宿主として *Saccharomyces cerevisiae* で合成した $\beta$ -galactosidase についての分析を行った。真核生物の *S. cerevisiae* は、*E. coli* と比較すると細胞内環境や翻訳システムが異なっており、またタンパク質発現系を構築することが容易であり、十分に目的タンパク質を確保できるため、本目的に適していると考えた。さらに、ウシ serum albumin とヒト serum albumin についても同様に解析した。

また、第 1 章の 0 時間外挿法では、アミノ酸のラセミ化効果を差し引いた後も、加水分解処理におけるペプチド中でのアミノ酸残基の異性化効果を含むので、内在性の D-アミノ酸残基を正確に求めることができないことを第 2 章で示したが、本分析システムとの対応関係を知るために、本章でも 0 時間外挿法を用いた。0 時間外挿法は、キラルカラムからの溶出ピークを蛍光モニターで定量したのに対し、本章の 0 時間外挿法では、ESI-MS/MS で定量している点が異なり、さらに重塩酸加水分解と組み合わせると、内在性の D-アミノ酸残基と処理中に生じた D-アミノ酸を区別して定量することが可能となる。本章の結果と 0 時間外挿法により得られた D-アミノ酸含量を比較して、その由来を議論した。



### 3-2-2. 実験材料及び方法

#### 3-2-2-1. 酵母

$\beta$ -galactosidase の発現宿主には、*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株 (*MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*) を用いた。

#### 3-2-2-2. 培地組成

*E. coli* の培養は、1-1-2-3 と同様の培地で行った。*S. cerevisiae* BY4742 株の培養には、YPD 培地 (1% Bacto Yeast Extract (Difco), 2% Bacto Peptone (Difco), 2% glucose (国産化学)), SD 培地 (0.67% Bacto Nitrogen Base without Amino Acids (Difco), 2% glucose (国産化学)), SG 培地 (0.67% Bacto Nitrogen Base without Amino Acids (Difco), 2% galactose (和光純薬工業)) を使用した。寒天培地として使用する場合は、最終濃度 2% となるように Bacto Agar (Difco) を加えた。

#### 3-2-2-3. $\beta$ -galactosidase 酵母発現プラスミドの構築

pTV118N-His-*lacZ* (1-1-2-5 参照) を *Xba*I と *Sal*I で処理し、His-*lacZ* を含む断片を得た。この断片を *E. coli*-*S. cerevisiae* シャトルベクター pGML20 の *Xba*I と *Sal*I サイト間に挿入し、pGML20-His-*lacZ* を作製した [Iha *et al.*, 1998]。GAL1 プロモーターにより、 $\beta$ -galactosidase の発現が誘導される。

#### 3-2-2-4. 酵母の形質転換

形質転換は酢酸リチウム法を改良した以下の方法で行った [Gietz *et al.* 1995]。*S. cerevisiae* BY4742 株を YPD 培地で一晚培養した後、これを新しい YPD 培地に 10% 加え、6 時間程度培養した。6,000 rpm で 5 分間遠心し、集菌した後、TE

溶液に懸濁した。再度同様に集菌し、0.1 M lithium acetate を含む TE 溶液 1 ml に懸濁し、30°C で 30 分間振盪した。6,000 rpm の遠心で集菌し、0.1 M lithium acetate と 15% glycerol を含む TE 溶液 300  $\mu$ l に懸濁し、1~10  $\mu$ g の DNA を加え、30°C で 30 分間振盪した。その後、700  $\mu$ l の 50% PEG#4000 を加え、30°C で 30 分間振盪した。6,000 rpm の遠心で集菌し、滅菌水に懸濁後、uracil (20  $\mu$ g/ml)、L-His (20  $\mu$ g/ml)、L-Lys (30  $\mu$ g/ml) を含む SD 培地に塗布した。ここで pGML20-His-lacZ が導入された *S. cerevisiae* BY4742 株は、L-Leu 生合成が可能となり、生育できる。

#### 3-2-2-5. 酵母による $\beta$ -galactosidase の生産及び精製

pGML20-His-lacZ を導入した *S. cerevisiae* BY4742 株を uracil (20  $\mu$ g/ml)、L-His (20  $\mu$ g/ml)、L-Lys (30  $\mu$ g/ml) を含む 10 ml の SD 培地で 30°C、約 24 時間振盪培養した。これを 400 ml の SD 培地に 1%加えた。30°C で OD<sub>660</sub>=0.5 まで振盪培養した後、集菌した。SG 培地で洗浄し、400 ml の SG 培地に交換することで発現誘導した。さらに、30°C で 24 時間振盪培養した後、集菌した。

$\beta$ -galactosidase の精製には、His SpinTrap (GE Healthcare) を使用した。菌体を binding buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.4) に懸濁後、ガラスビーズ (glass beads, acid washed; Sigma) と Tissue Lyser (QIAGEN) を用いて破碎した。菌体破碎後の上清画分に 1 M imidazole (pH 7.0) を最終濃度 100 mM となるように添加した後、His SpinTrap にアプライした。wash buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 7.4) で数回洗浄し、elution buffer (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) で溶出した。

溶出画分は、VIVASPIN 500 MWCO 30,000 (Vivascience AG) を用いて、脱塩

と濃縮を行った。タンパク質溶液体積を 25  $\mu$ l になるまで濃縮し、475  $\mu$ l の 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) を加え、再度濃縮を行った。これをさらに 2 回繰り返した。精製後の $\beta$ -galactosidase の SDS-PAGE を Fig. 3-4 に示した。

#### 3-2-2-6. 加水分解

*E. coli* 生産 $\beta$ -galactosidase 20  $\mu$ g、*S. cerevisiae* 生産 $\beta$ -galactosidase 10  $\mu$ g、ウシ serum albumin (Sigma) 20  $\mu$ g、ヒト serum albumin (Sigma) 20  $\mu$ g を PICO TAG を用いて、6 M DCl/D<sub>2</sub>O 気相中及び 6 M HCl/H<sub>2</sub>O、110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理した。

#### 3-2-2-7. LC/ESI-MS/MS 分析用試料の調製

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 25  $\mu$ l に溶解した。このうち 20  $\mu$ l に 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu$ l を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 270  $\mu$ l を加え、反応を停止した。0.45  $\mu$ m フィルター (Millex-LH) で濾過し、このうち 10  $\mu$ l を HPLC に導入し、TSK-gel ODS-80Ts カラム (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 33°C) で各アミノ酸に分離した [Hamase *et al.*, 1997]。移動相 A は 1% THF, 0.02% TFA を含む 5% acetonitrile 水溶液、移動相 B は 1% THF, 0.02% TFA を含む acetonitrile を用いた。溶出は 15 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0%から 22% に、65 分までに 22%から 32%になるようにリニアグラジエントをかけた。続いて、95 分まで移動相 B を 32%で送液した。各アミノ酸を分取・乾固し、0.01% TFA 水溶液に溶解し、この一部を LC/ESI-MS/MS で分析した。

#### 3-2-2-8. LC/ESI-MS/MS による D,L-アミノ酸の検出

使用した LC/ESI-MS/MS、キラルカラムは 3-1-2-4 の通りである。NBD-Ala と NBD-Phe の溶出は 3-1-2-4 の通りである。NBD-Leu と NBD-Val は、methanol/H<sub>2</sub>O/TFA 73:27:0.01、methanol/H<sub>2</sub>O/TFA 70:30:0.01 でそれぞれ溶出した。

NBD-アミノ酸の D, L-エナンチオマーの定量には、クロマトグラムのピーク面積を用いた。塩酸加水分解処理試料に含まれる D-アミノ酸比の算出式は、Table 3-3 に示した。タンパク質に含まれる D-アミノ酸比の算出式は、Table 3-4 に示した。重塩酸加水分解処理中に生じた D-アミノ酸比の算出式は、Table 3-5 に示した。

### 3-2-3. 結果

#### 3-2-3-1. 塩酸加水分解を用いた *E. coli* 生産 $\beta$ -galactosidase の分析

通常通りの塩酸気相中で加水分解を行うと、タンパク質中に存在するかもしれない D-アミノ酸残基と加水分解処理によって新たに生じた人工的な D-アミノ酸は、共に基準の分子質量に検出される。*E. coli* で生産した $\beta$ -galactosidase は 6 M 塩酸気相中、110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理した。各加水分解時間において、基準の分子質量の D-アミノ酸 (D-Ala, D-Leu, D-Phe) が検出された (Fig. 3-5)。また分子質量+1 にも NBD-L-アミノ酸が検出されたが、これらは本章第 1 節で述べた通り、天然の同位体効果によるものである。

$\beta$ -galactosidase 中の Ala, Leu, Phe の D-アミノ酸含量を 0 時間外挿法により、推定した (Fig. 3-6, Table 3-6)。Val については、加水分解処理中のラセミ化反応速度が遅いため、NBD-D-Val のピークは検出されなかった。各アミノ酸の 0 時間外挿値は有意な値を示し、D-Phe の値が高いなど、第 1 章の結果と傾向が似ていた (Table 3-6)。この分析システムを用いても、0 時間外挿法によると $\beta$ -galactosidase から有意な D-アミノ酸が検出された。

#### 3-2-3-2. 重塩酸加水分解を用いた *E. coli* 生産 $\beta$ -galactosidase の分析

重塩酸気相中で加水分解を行うと、大部分のアミノ酸残基は $\alpha$ 水素が置換されないまま加水分解されるので分子質量に変化はないが、一部の残基は加水分解後の遊離アミノ酸の段階あるいはペプチド中で $\alpha$ 水素が置換されるので、分子質量が+1 大きくなる。一方で、タンパク質に含まれていた D-アミノ酸残基の多くは、基準の分子質量の D-アミノ酸として、また重水素ラベルされた D-アミノ酸の約 1/2 は基準分子質量+1 の D-アミノ酸、約 1/2 は同じく L-アミノ酸と

して検出される。*E. coli* で生産した $\beta$ -galactosidase を 6 M 重塩酸気相中、110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理し、D-アミノ酸 (D-Ala, D-Leu, D-Phe, D-Val) 含量を求めた。その結果、各アミノ酸について分子質量+1 でのみ D-アミノ酸が検出され、基準の分子質量には検出されなかった (Fig. 3-7, Table 3-7)。従って、 $\beta$ -galactosidase に内在性の D-アミノ酸残基は含まれておらず、加水分解処理の過程で生じたものであることが示された。

また、各 NBD-アミノ酸の分子質量+1 における D/(D+L)比を直線回帰して求めた 0 時間外挿値は、有意なプラスの値を示した (Fig. 3-8, Table 3-7)。これは第 2 章で述べたように、タンパク質においても同様に加水分解反応初期において、アミノ酸として遊離する前のペプチド状態でアミノ酸が異性化している可能性を示している。従って、タンパク質加水分解においても 0 時間外挿法によって決定した D-アミノ酸含量には、加水分解処理中のペプチドジアステレオマー化によって生じる D-アミノ酸を含んでいることが明らかとなった。

### 3-2-3-3. *S. cerevisiae* 生産 $\beta$ -galactosidase 及び serum albumin の解析

*E. coli* 以外の生物として、真核生物である *S. cerevisiae* を宿主に $\beta$ -galactosidase を合成させた。pGML20-His-lacZ を導入した *S. cerevisiae* BY4742 株を SG 培地で培養し、N 末端に His-Tag を付加した $\beta$ -galactosidase を発現させ、Ni カラムにより精製を行った (Fig. 3-4)。重塩酸気相中で 24 時間加水分解処理し、D-Ala, D-Leu, D-Val, D-Phe の各含量を求めた。その結果、*E. coli* 生産 $\beta$ -galactosidase と同様に、*S. cerevisiae* で合成した $\beta$ -galactosidase にこれらの D-アミノ酸は含まれていないことが示された (Table 3-8)。また、より高等生物であるウシ及びヒト由来の serum albumin においても同様に D-アミノ酸は検出されなかった (Table 3-8)。

#### 3-2-4. 考察

本節において、*E. coli* または *S. cerevisiae* により合成した $\beta$ -galactosidase に D-アミノ酸残基 (D-Ala, D-Leu, D-Phe, D-Val) が含まれているかどうかを重水素ラベル法を用いて調べた。重水素ラベル法は感度良く、タンパク質中の D-アミノ酸残基と加水分解処理中に生じた D-アミノ酸を検出・区別することができた。まず通常通り、塩酸気相中で $\beta$ -galactosidase を加水分解処理し、キラルカラムを備えた LC/ESI-MS/MS を用いて、基準の分子質量において各 D-アミノ酸が検出されることを確認した (Fig. 3-5)。

次に、ラセミ化あるいはペプチド中で異性化したアミノ酸を重水素ラベルするために重塩酸気相中で $\beta$ -galactosidase を加水分解し、同様の検出システムを用いて分析した。その結果、D-Ala, D-Leu, D-Phe, D-Val の NBD 誘導体は、基準の分子質量に検出されず、いずれも分子質量+1 にのみ検出された (Fig. 3-7, Table 3-7)。つまり、 $\beta$ -galactosidase に少なくともこれらの D-アミノ酸残基は含まれていないことが明らかとなった。

一方、第 1 章において各加水分解時間における D/(D+L)比をプロットし、これを 0 時間へ直線回帰した 0 時間外挿値より、 $\beta$ -galactosidase から各 D-アミノ酸が検出されている (Table 3-6)。さらに、LC/ESI-MS/MS を用いた検出系においても、同様に有意の 0 時間外挿値が得られた (Table 3-6)。これら二つの 0 時間外挿値の傾向は似ているが、値そのものは一致しなかった。これは主に検出系の違いを反映していると考えられ、特に溶出ピークの蛍光モニターによる定量と、ESI-MS/MS による定量性の違いによるものではないかと考えている。これまで 0 時間外挿値を D-アミノ酸含量として定義してきたが、本章の結果より、0 時間外挿値はタンパク質の真の D-アミノ酸含量を反映していないことが示さ

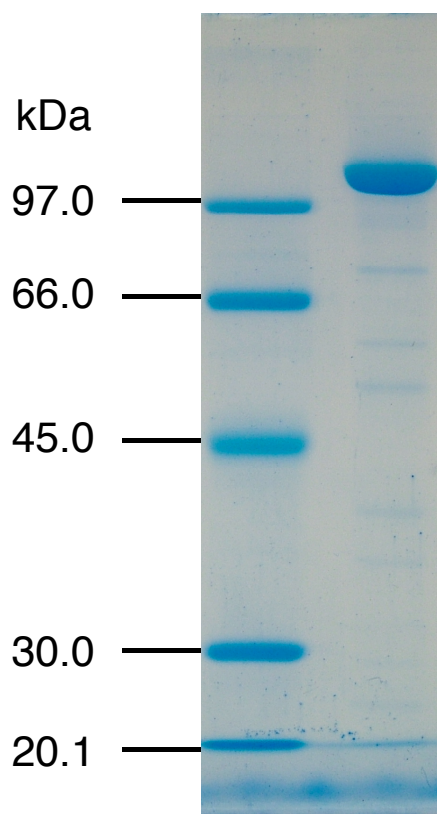
れた。また、加水分解処理中に生じた D-アミノ酸を反映する分子質量+1 における D/(D+L)比に関して、同様に 0 時間外挿値を求めると、有意にプラスの値を示した (Fig. 3-8, Table 3-7)。各加水分解時間における D/(D+L)比が、加水分解処理中にペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化効果だけを含むのであれば、この 0 時間外挿値はマイナス値を示すはずである (Fig. 2-1)。ペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化効果が 0 時間外挿により解消されているのは、第 1 章で述べた通りである。以上のことから、第 2 章でモデルジペプチドにおいて、加水分解反応初期にペプチド状態でアミノ酸の異性化 (ペプチドのジアステレオマー化) が実際に起きていたように、タンパク質においても同様の現象が起きていることが示唆された。さらに、塩酸加水分解処理した試料 (内在性の D-アミノ酸残基と加水分解処理に伴って生じた D-アミノ酸の両方を含む) における本来の分子質量から求めた 0 時間外挿値と、重塩酸加水分解処理した試料 (加水分解処理に伴って生じた D-アミノ酸のみを含む) における分子質量+1 から求めた 0 時間外挿値は、ほぼ同じ値を示した (Table 3-6, 3-7)。このことは重塩酸中での加水分解が塩酸中での加水分解をよく反映していることを示しており、従って、0 時間外挿値は加水分解処理中にペプチド状態での異性化により生成した D-アミノ酸を反映していることが明らかとなった。0 時間外挿法は古くからタンパク質の D-アミノ酸含量を求めるのに用いられてきたが、この方法を用いて真の D-アミノ酸含量を求めることはできないことが示された。

本章で構築した重塩酸加水分解とキラル LC/ESI-MS/MS を組み合わせた分析システムは、タンパク質の D-アミノ酸含量を正確に検出することにおいて非常に有用である。この方法を用いると、ペプチドから遊離後にラセミ化した D-アミノ酸とペプチド中で異性化した D-アミノ酸は全て $\alpha$ 水素が重水素に置換されるため、タンパク質に含まれている D-アミノ酸残基と完全に区別することが可



能である。本節において、*E. coli* と *S. cerevisiae* により合成された $\beta$ -galactosidase、ウシ及びヒト serum albumin には、D-アミノ酸残基が含まれていないことが明らかとなった (Table 3-7, 3-8)。従って、天然のタンパク質に広く D-アミノ酸残基が含まれている可能性はほぼ否定できる。ただし、本節で示したのは Ala, Leu, Phe, Val の 4 種類のアミノ酸についての証拠である。自然状態のタンパク質において異性化速度が最も速いのは Asp 残基であり、第 1 章でも 0 時間外挿法による結果からタンパク質中の Asp 及び Glu において有意の D-アミノ酸が検出されていた。今回、この二つのアミノ酸に関して、本分析で使用したキラルカラム (CHIROBIOTIC TAG) により光学分割できる条件を決定するまでに至らなかったため、Asp と Glu については検証することができなかった。また、Ser については、第 1 章において $\beta$ -galactosidase 加水分解産物から D-Ser が極微量にしか検出できなかったため、本解析では Ser を対象外とした。

序章で述べたように、いくつかの生理活性ペプチド及び老化関連タンパク質には D-アミノ酸残基が含まれていることが明らかとなっており、未だ見出されていない D-アミノ酸含有タンパク質が存在していることが期待される。このような研究において、本章で構築した分析システムは非常に有効であり、D-アミノ酸含有タンパク質の発見の一助になると考えている。そこで、次章ではこの分析システムを用いて、実際に D-アミノ酸含有タンパク質を見出すことを目指した。



**Fig. 3-4 His-tag 精製した *S. cerevisiae* 生産 $\beta$ -galactosidase の SDS-PAGE**

**Table 3-3. 塩酸加水分解処理試料に含まれる D-アミノ酸比の算出式**

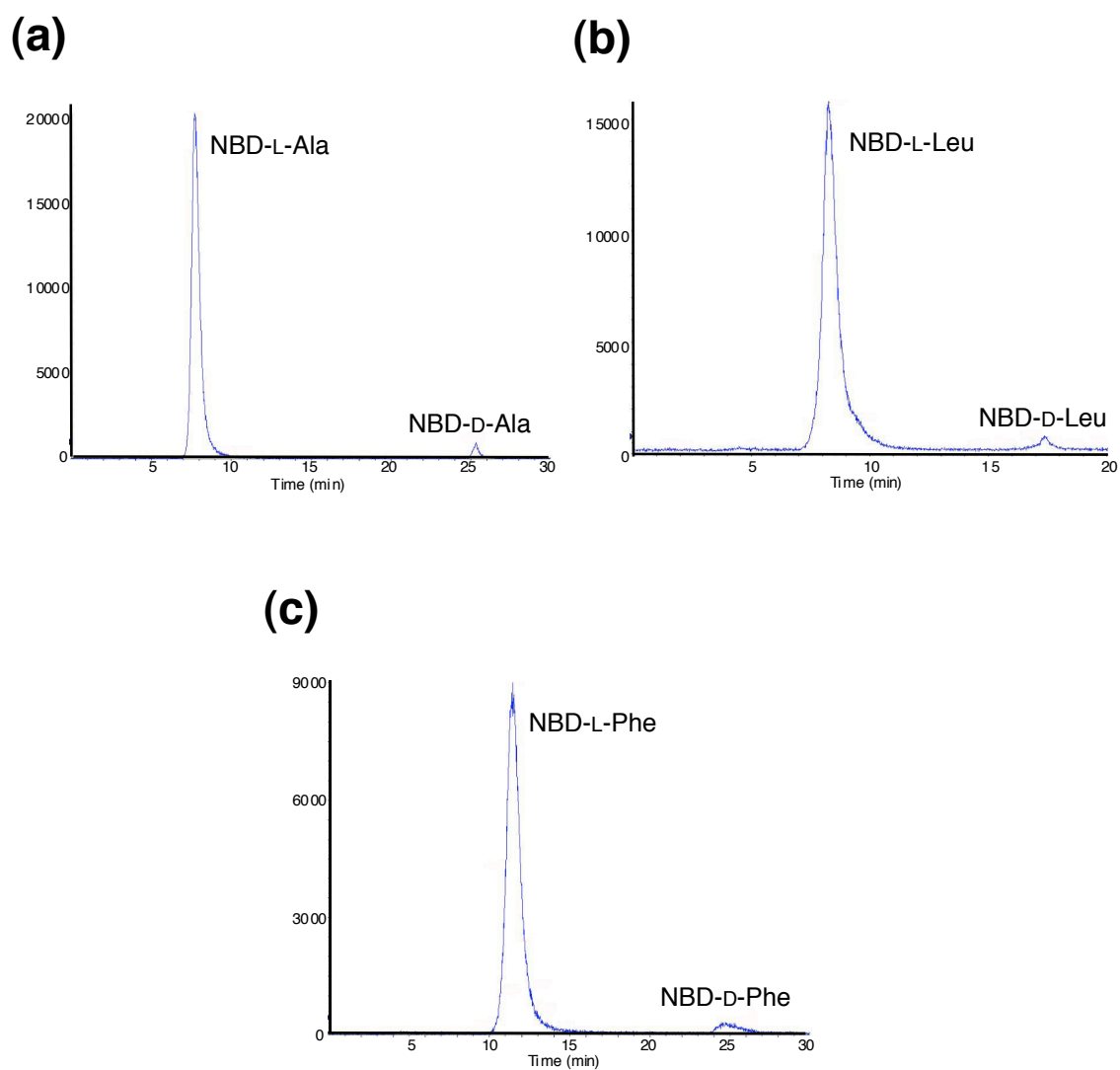
	<i>m/z</i>	D-アミノ酸比の算出式
NBD-Ala	253/236	$D(253/236)/(D(253/236+254/237)+L(253/236+254/237))$
NBD-Leu	295/249	$D(295/249)/(D(295/249+296/250)+L(295/249+296/250))$
NBD-Phe	329/283	$D(329/283)/(D(329/283+330/284)+L(329/283+330/284))$

**Table 3-4. タンパク質に含まれる D-アミノ酸比の算出式**

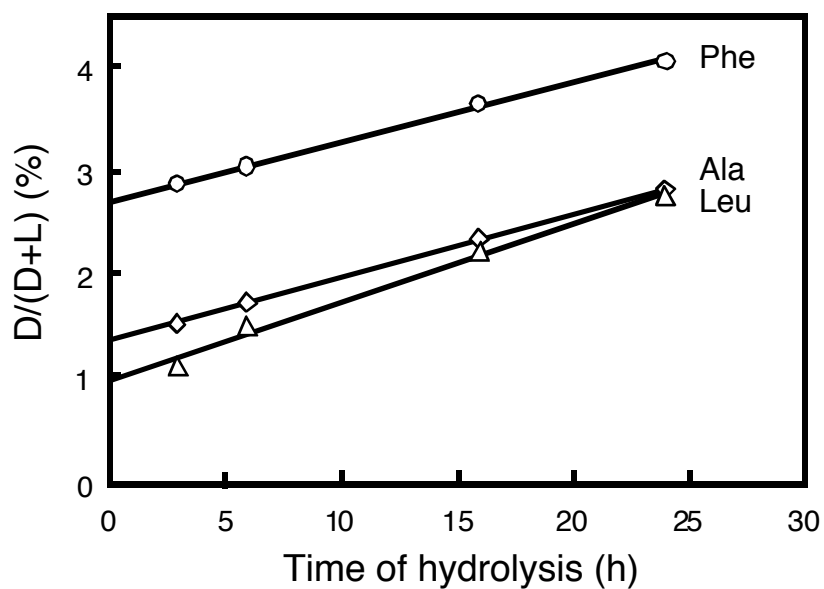
	<i>m/z</i>	D-アミノ酸比の算出式
NBD-Ala	253/236	$D(253/236)/(D(253/236+254/237)+L(253/236+254/237))$
NBD-Leu	295/249	$D(295/249)/(D(295/249+296/250)+L(295/249+296/250))$
NBD-Phe	329/283	$D(329/283)/(D(329/283+330/284)+L(329/283+330/284))$
NBD-Val	281/235	$D(281/235)/(D(281/235+282/236)+L(281/235+282/236))$

**Table 3-5. 重塩酸加水分解処理中に生じた D-アミノ酸比の算出式**

	<i>m/z</i>	D-アミノ酸比の算出式
NBD-Ala	254/237	$D(254/237)/(D(253/236+254/237)+L(253/236+254/237))$
NBD-Leu	296/250	$D(296/250)/(D(295/249+296/250)+L(295/249+296/250))$
NBD-Phe	330/284	$D(330/284)/(D(329/283+330/284)+L(329/283+330/284))$



**Fig. 3-5** 24時間塩酸加水分解した*E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseから単離したNBD-D, L-アミノ酸のLC/ESI-MS/MS MRMクロマトグラム  
 (a) NBD-D, L-Ala ( $m/z$  253/236) (b) NBD-D, L-Leu ( $m/z$  295/249) (c) NBD-D, L-Phe ( $m/z$  329/283)



**Fig. 3-6** *E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseの塩酸加水分解中におけるD-アミノ酸比

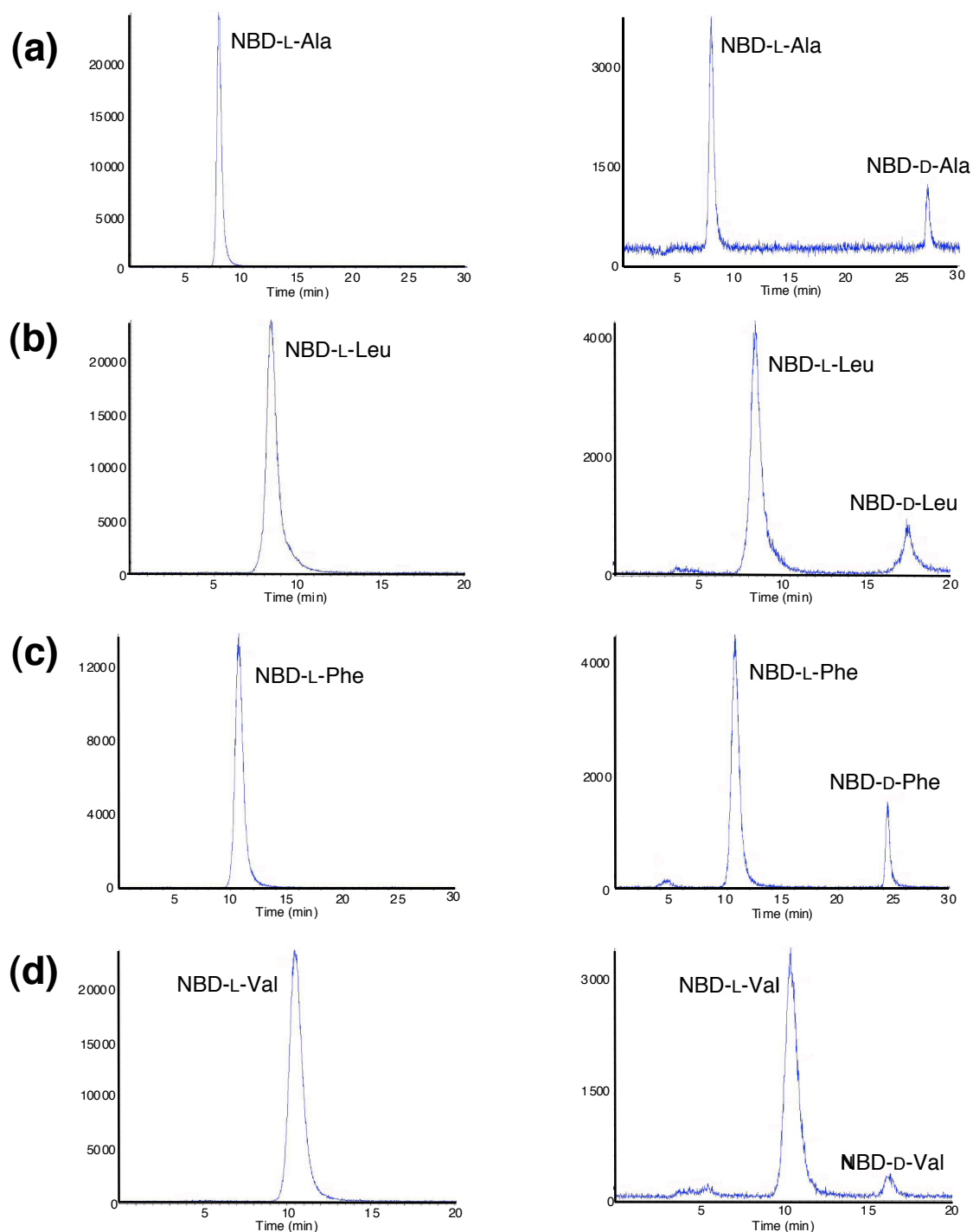
Ala ( $m/z$  253/236; ◇), Leu ( $m/z$  295/249; △), Phe ( $m/z$  329/283; ○)は、3回の実験の平均値を示した。

**Table 3-6.** 塩酸加水分解した *E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseにおける D/(D+L)比の 0 時間外挿値

	D/(D+L) (%)			
	Ala	Leu	Phe	Val
第一章 <sup>a</sup>	1.77	1.63	4.19	0.56
本章 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.04	2.68 $\pm$ 0.13	-

<sup>a</sup>0 時間外挿値は、2 回の実験の平均値として表した (Table 1-2参照)。

<sup>b</sup>0 時間外挿値は、3 回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。



**Fig. 3-7** 24時間重塩酸加水分解した*E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseから単離したNBD-D,L-アミノ酸のLC/ESI-MS/MS MRMクロマトグラム

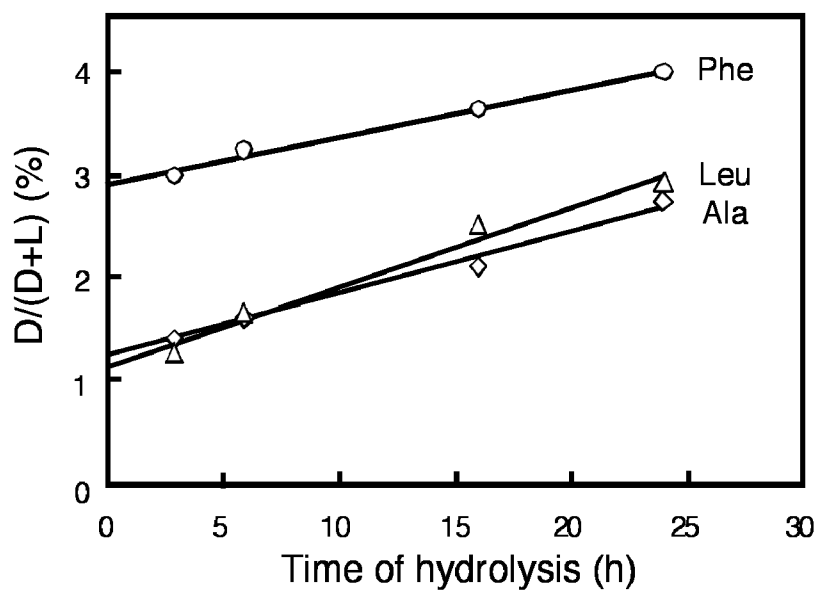
(a) NBD-D, L-Ala (左:  $m/z$  253/236, 右:  $m/z$  254/237) (b) NBD-D, L-Leu (左:  $m/z$  295/249, 右:  $m/z$  296/250) (c) NBD-D, L-Phe (左:  $m/z$  329/283, 右:  $m/z$  330/284) (d) NBD-D, L-Val (左:  $m/z$  281/235, 右:  $m/z$  282/236)

**Table 3-7. *E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseの内在性 D-アミノ酸含量と重塩酸加水分解処理中に生じた D-アミノ酸比 (0時間外挿値)**

	D/(D+L) (%)			
	Ala	Leu	Phe	Val
タンパク質内在 D-アミノ酸	0	0	0	0
加水分解中に生じた D-アミノ酸	1.22 $\pm$ 0.15	1.10 $\pm$ 0.03	2.88 $\pm$ 0.18	-

D-アミノ酸含量は、3 回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。





**Fig. 3-8** *E. coli*生産 $\beta$ -galactosidaseの重塩酸加水分解中におけるD-アミノ酸比

Ala ( $m/z$  254/237;  $\diamond$ ), Leu ( $m/z$  296/250;  $\triangle$ ), Phe ( $m/z$  330/284;  $\circ$ )は、3回の実験の平均値を示した。

**Table 3-8. *S. cerevisiae*生産 $\beta$ -galactosidase, ウシ及びヒト serum albumin の内在性 D-アミノ酸含量**

	D/(D+L) (%)			
	Ala	Leu	Phe	Val
$\beta$ -galactosidase	0	0	0	0
ウシ serum albumin	0	0	0	0
ヒト serum albumin	0	0	0	0

## 第 4 章

### D-アミノ酸含有タンパク質の存在検証

#### 第 1 節 総可溶性画分からの D-アミノ酸含有タンパク質の探索

##### 4-1-1. 目的

第 3 章において、タンパク質中の D-アミノ酸残基を感度良く、正確に検出できる分析システムを構築した。タンパク質を重塩酸中で加水分解することにより、ラセミ化、あるいはペプチド中で異性化して生成した人工的な D-アミノ酸を排除することが可能となった。この分析システムを用いた解析により、D-アミノ酸残基が普遍的にタンパク質に含まれている可能性を、少なくとも Ala, Leu, Phe, Val に関して否定した。

ここで再度、Nagata らの論文 (1998) について考察すると、著者らは種々の生物の総可溶性高分子画分から塩酸加水分解 0 時間外挿法により結合型 D-アミノ酸を見出したが、本論文の第 1 章から第 3 章までの結果により、普遍的に存在しているように見えた結合型 D-アミノ酸は、全て塩酸加水分解処理におけるペプチドのジアステレオマー化に帰結する可能性があるとも考えられる。しかし、ここで重水素ラベル法を用いて解析を行えば、少なくとも塩酸加水分解処理に伴って生じる D-アミノ酸は完全に排除することができるため、真のタンパク質内在性 D-アミノ酸残基を検出することが可能である。そこで、本節では重水素ラベルを用いた分析システムを利用して、種々の生物の総可溶性画分から D-アミノ酸残基を含む特定のタンパク質を探索することを目的とした。現在まで、ペプチドレベルでの発見例は多いものの、より高分子のタンパク質レベル

での発見例は数が少ない。もし、新規 D-アミノ酸含有タンパク質を発見することができれば、その分子中の D-アミノ酸残基が立体構造や活性に与える影響など、非常に興味深い知見を得ることができるであろう。

本節では、任意に選んだ真正細菌・古細菌・真核生物から抽出した総可溶性画分に含まれる各 D-アミノ酸 (D-Ala, D-Ser, D-Leu, D-Phe, D-Val) を追跡することで、D-アミノ酸含有タンパク質の存在を検証した。

#### 4-1-2. 実験材料及び方法

##### 4-1-2-1. 使用した生物

*Thermus thermophilus* HB27 株, *Aeropyrum pernix* K1 株は、小山芳典博士（独立行政法人産業技術総合研究所）より恵与された。*Sulfolobus tokodaii* は、若木高善教授（東京大学農学生命科学研究科）より恵与された。*Caenorhabditis elegans* N2 株及び *E. coli* OP50 株 (uracil 要求性株) の総可溶性画分は、本間浩教授（北里大学薬学研究科）より恵与された。

##### 4-1-2-2. 総可溶性画分の調製

各生物の培養方法は、Table 4-1 に示した。各生物をそれぞれの培養条件で培養した後、超音波、あるいはガラスビーズ (Sigma) と Tissue Lyser (QIAGEN) により細胞を破碎した。これを 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、上清を回収した。4 倍量の ethanol を加え、-80°C で 1~2 時間静置した後、15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、沈殿物を回収し、風乾させた。*C. elegans* 及び *E. coli* OP50 株については、trichloroacetic acid (TCA) 沈殿物として供給され、これを ethanol により数回洗浄後、風乾させた。*E. coli* OP50 株は *C. elegans* の餌として与えられたため、コントロールとして調製した。これらを 20 mM potassium phosphate (pH7.4) に溶解し、各生物の総可溶性画分とした。

##### 4-1-2-3. 加水分解

各生物の総可溶性画分は PICO TAG (Waters) を用いて、6 M DCl/D<sub>2</sub>O 気相中、110°C で 24 時間加水分解処理を行った。

#### 4-1-2-4. LC/ESI-MS/MS 分析用試料の調製

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 50  $\mu$ l に溶解した。このうち 20  $\mu$ l に 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu$ l を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 270  $\mu$ l を加え、反応を停止した。0.45  $\mu$ m フィルター (Millex-LH; Millipore) で濾過し、このうち 10  $\mu$ l を HPLC に導入し、TSK-gel ODS-80Ts (250  $\times$  4.6 mm i.d.; Tosoh, 33°C) で各アミノ酸に分離した [Hamase *et al.*, 1997]。移動相 A は 1% THF, 0.02% TFA を含む 5% acetonitrile 水溶液、移動相 B は 1% THF, 0.02% TFA を含む acetonitrile を用いた。溶出は 15 分まで移動相 A を 1.0 ml/min で送液し、50 分までに移動相 B を 0% から 22% に、65 分までに 22% から 32% になるようにリニアグラジエントをかけた。続いて、95 分まで移動相 B を 32% で送液した。各アミノ酸を分取・乾固し、0.01% TFA 水溶液に溶解し、この一部を LC/ESI-MS/MS で分析した。

#### 4-1-2-5. LC/ESI-MS/MS による D, L-アミノ酸の検出

Agilent 1100 separation module (Agilent Technologies) と四重極タンデム質量分析計 (API-3000; Applied Biosystems) から構成されている LC/ESI-MS/MS を使用した。キラルカラムは CHIROBIOTIC TAG (150  $\times$  2.1 mm i.d.; Astec) を使用した。NBD-Ala, NBD-Leu, NBD-Phe, NBD-Val の溶出は、3-1-2-4 と 3-2-2-8 の通りである。NBD-Ser は、methanol/H<sub>2</sub>O/TFA 80:20:0.01 で溶出した。

NBD-アミノ酸の D, L-エナンチオマーの定量には、クロマトグラムのピーク面積を用いた。総可溶性画分の D-アミノ酸含量は、Table 3-4 と D-Ser については  $D\text{-Ser } (m/z \ 269/252) / (D\text{-Ser } (m/z \ 269/252) + L\text{-Ser } (m/z \ 269/252 + 270/253))$  から算出した。

#### 4-1-3. 結果

任意に選んだ真正細菌（グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌）、古細菌、真核生物の各生物を栄養豊富な培地で十分に生育させた後、ethanol 沈殿、及び TCA 沈殿 (*C. elegans*, *E. coli* OP50 株) により得られた沈殿物を総可溶性画分として回収した。各試料を 6 M 重塩酸気相中、110°C で加水分解処理し、ODS カラムにより各アミノ酸を単離後、分取した試料を LC/ESI-MS/MS で分析した。

総可溶性画分に含まれる D-アミノ酸が検出された生物は、グラム陽性細菌の *B. subtilis*、*B. megaterium*、*S. aureus*、グラム陰性細菌の *E. coli* MG1655 株及び OP50 株、*P. aeruginosa*、*T. thermophilus*、*T. aquaticus*、古細菌の *S. tokodaii* であり、それぞれ D-Ala が検出された (Table 4-2)。また、*E. coli* MG1655 株に限っては、微量ながら D-Ser も検出された (Table 4-2)。真核生物においては、全ての生物で D-アミノ酸は検出されなかった。また、検出された D-アミノ酸は主に D-Ala であり、D-Val, D-Leu, D-Phe についてはどの生物においても検出されなかった。

#### 4-1-4. 考察

幅広い生物に対して D-アミノ酸含有タンパク質の有無を調べるために、真正細菌（グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌）、古細菌、真核生物を含む生物から抽出した総可溶性画分を分析した。分析対象とした全てのグラム陽性細菌、及びグラム陰性細菌の総可溶性画分中から D-Ala が検出された。これらの生物の総可溶性画分中には 1~4%の D-Ala が含まれていたが、*S. aureus* については 26%もの D-Ala が含まれていた (Table 4-2)。しかし、真正細菌は D-Ala を構成成分とする細胞壁ペプチドグリカンを持しているため、この中に含まれている D-Ala を検出している可能性を否定することはできない。また、古細菌である *S. tokodaii* において D-Ala が検出された (Table 4-2)。古細菌の細胞壁はタンパク質性の S 層であり、ペプチドグリカンが存在しないため、実際にペプチド及びタンパク質中の D-Ala 残基を反映している可能性が期待できる。一般に高温条件下においては、タンパク質の異性化が促進されるため、至適生育温度が 70℃以上の高度好熱菌 *Thermus* 属、超好熱菌 *S. tokodaii* と *A. pernix* は、細胞内においてタンパク質の異性化が起きていることを想定していた。今回の分析から検出されたのは *Thermus* 属と *S. tokodaii* 中の D-Ala であったが、これらは高温環境による異性化で生じた産物であるとも考えられる。さらに、*E. coli* MG1655 株については、D-Ser が微量ではあるが検出されており、非常に興味深い (Table 4-2)。*E. coli* MG1655 株の培養条件 (37℃, 12h 以上) では、タンパク質の異性化を促進する要因はなく、D-Ser 残基を含むタンパク質が存在している可能性が期待される。

真核生物については、全ての生物、及び分析した全てのアミノ酸において D-アミノ酸は検出されなかった。もし D-アミノ酸含有タンパク質が存在していた



としても、そのタンパク質が機能していないのであれば、品質管理機構により排除されている可能性も生物種に問わず考えられる。また、 $\alpha$ -crystallin や  $\beta$ -amyloid protein のように D-アミノ酸を含むタンパク質は凝集する場合もあるため、不溶性画分に存在している可能性も十分に考えられる [Kaji *et al.*, 2007; Tomiyama *et al.*, 1994]。仮に微量に存在しているタンパク質に D-アミノ酸残基が含まれていたとしても、今回対象とした総可溶性画分という混合物においては、全ての平均においてその検出限界以上の内在性 D-アミノ酸が含まれていなければ検出できず、それらを捉えることはできないと考えられる。

本研究で総可溶性画分中から D-アミノ酸が検出された生物について、今後、総可溶性画分に対してカラムを用いて正確に分画し、その画分ごとに D-アミノ酸の有無を解析することで、D-アミノ酸含有タンパク質の存在を確認し、ひいてはタンパク質そのものを同定することができると考えている。

**Table 4-1. 分析に使用した生物**

生物種	培養方法
Eubacteria, Gram (+)	
<i>Bacillus subtilis</i> 168	L-broth, 37°C, 12h以上
<i>Bacillus megaterium</i>	L-broth, 37°C, 12h以上
<i>Staphylococcus aureus</i>	L-broth, 37°C, 12h以上
Eubacteria, Gram (-)	
<i>Escherichia coli</i> MG1655	L-broth, 37°C, 12h以上
<i>Escherichia coli</i> OP50	L-broth, 37°C, 12h以上
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	L-broth, 37°C, 12h以上
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	0.8% polypepton, 0.4% Yeast Extract, 0.2% NaCl, 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 4 mM CaCl <sub>2</sub> , 70°C, 22h
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	
Archaea	
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	恵与された菌体を使用
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	恵与された菌体を使用
Eukaryote	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742	YPD, 30°C, 12h以上
<i>Kluyveromyces lactis</i> IFO1267	YPD, 30°C, 12h以上
<i>Caenorhabditis elegans</i> (egg)	NGM (0.3% NaCl, 0.25% pepton, 0.25% Bacto Agar, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 5 mg/l cholesterol, 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH6)), 20°C
<i>Caenorhabditis elegans</i> (adult)	
Human (Hela cell)	D-MEM, 5% CO <sub>2</sub> , 37°C, 24h

**Table 4-2. 総可溶性画分の D-アミノ酸含量**

生物種	D/(D+L) (%)				
	Ser	Ala	Val	Leu	Phe
Eubacteria, Gram (+)					
<i>B. subtilis</i>	0	4.3	0	0	0
<i>B. megaterium</i>	0	2.4	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	26.5	0	0	0
Eubacteria, Gram (-)					
<i>E. coli</i> MG1655	0.2	4.3	0	0	0
<i>E. coli</i> OP50	0	0.2	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	1.3	0	0	0
<i>T. thermophilus</i>	0	3.4	0	0	0
<i>T. aquaticus</i>	0	3.0	0	0	0
Archaea					
<i>S. tokodaii</i>	0	0.4	0	0	0
<i>A. pernix</i>	0	0	0	0	0
Eukaryote					
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	0	0
<i>K. lactis</i>	0	0	0	0	0
<i>C. elegans</i> (egg)	0	0	0	0	0
<i>C. elegans</i> (adult)	0	0	0	0	0
Human (Hela cell)	0	0	0	0	0

## 第2節 ovalbumin の熱安定型遷移に伴う Ser 残基異性化の研究

### 4-2-1. 目的

ニワトリの ovalbumin (~45 kDa) は、卵白タンパク質の 54%を占める主要なタンパク質である。未受精卵の保存中及び受精卵の発達中に野生型 ovalbumin (N-ovalbumin) は、中間体 (I-ovalbumin) を介して熱安定型 S-ovalbumin になることが知られている [Smith *et al.*, 1962; Smith *et al.*, 1965; Hatta *et al.*, 2001]。また古くから、S-ovalbumin を含む卵白は、加熱によりゲル化してしまうことが知られていた [Shitamori *et al.*, 1984]。示差走査熱量計 (DSC) を用いた N-, I-, S-ovalbumin の熱変性温度は、それぞれ 78, 82, 86°C である [Donovan *et al.*, 1975; Donovan *et al.*, 1976]。熱安定型 S-ovalbumin への遷移の原因は、卵殻からの二酸化炭素の放出によって、pH が上昇することにあると言われており、精製 ovalbumin のアルカリ処理によっても *in vitro* で S-ovalbumin が形成される [Hatta *et al.*, 2001]。これまでに ovalbumin の熱安定化機構の説明として、タンパク質表面の電荷、あるいは疎水性の変化、二次構造の遷移といったモデルが提唱されてきたが、未だにその決定的な原因は明らかとなっていない [Nakamura *et al.*, 1981a; Nakamura *et al.*, 1981b; Kint *et al.*, 1979; Huntington *et al.*, 1995]。最近、熱安定型 S-ovalbumin の X 線結晶構造解析により、N-ovalbumin とは異なる点が見出された [Yamasaki *et al.*, 2003]。それはタンパク質表面に露出している Ser164, Ser236, Ser320 が特異的にそれぞれ D 体として存在している可能性があるということである。また、ovalbumin 変異体 (S164V, S236G, S320V, S164V/S320V) の解析により、Ser164, Ser320 の熱安定性への寄与が示唆されている [Ishimaru *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010]。

本節では、重水素ラベルによる分析システムを用いて天然の ovalbumin、及び組換え体 ovalbumin を解析して、実際に S-ovalbumin に D-Ser 残基が含まれているかどうかを検証した。さらに、各 ovalbumin 変異体 (S164V, S236G, S320V, S164V/S320V) を解析することにより、D-Ser 残基部位の推定を試みた。

#### 4-2-2. 実験材料及び方法

##### 4-2-2-1. ovalbumin の調製

albumin from chicken egg white S-ovalbumin free は、Sigma製品を使用した。組換え体ovalbumin (野生型 (WT)、変異体S164V, S236G, S320V, 二重変異体S164V/S320V) は、高橋延行博士 (京都大学農学研究科) より恵与された。

##### 4-2-2-2. インキュベーション方法及び試料調製

市販の albumin (S-ovalbumin free) は、100 mM glycine/NaOH (pH9.5) 中に 1 mg/ml となるように調製し、このうち 100  $\mu$ l を 37°C で 1, 3, 5, 7, 10 日間それぞれインキュベーションした。また、10 mM potassium phosphate (pH7.4) 中に 1 mg/ml となるように調製し、同様に 37°C で 10 日間インキュベーションした。コントロールは、同様の試料を 0°C で 10 日間静置した試料とした。10 mM sodium phosphate (pH6.0) に溶解した形で供給された組換え体 ovalbumin (WT, S164V, S236G, S320V, S164V/S320V) は、0.1 M glycine/NaOH (pH9.5) 中に 1 mg/ml となるように調製した。このうち 100  $\mu$ l を 37°C で 3, 6, 9, 12 日間それぞれインキュベーションした。また、50 mM potassium phosphate (pH7.4) 中に 1 mg/ml となるように調製し、同様に 37°C で 20 日間インキュベーションした。コントロールは、0°C で 12 日間、あるいは 20 日間静置した試料とした。

それぞれの試料は、VIVASPIN 500 MWCO 5,000 (Sartorius) を用いて、脱塩と濃縮を行った。タンパク質溶液体積を 25  $\mu$ l になるまで濃縮し、475  $\mu$ l の 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) を加え、再度濃縮を行った。これをさらにもう一度繰り返した。

#### 4-2-2-3. 加水分解

各種の ovalbumin 約 10  $\mu\text{g}$  を PICO TAG (Waters) を用いて、6 M DCl/D<sub>2</sub>O 気相中、110°C で 24 時間加水分解処理した。

#### 4-2-2-4. LC/ESI-MS/MS 分析用の試料調製

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 40  $\mu\text{l}$  に溶解した。このうち 20  $\mu\text{l}$  に 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu\text{l}$  を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液 270  $\mu\text{l}$  を加え、反応を停止した。0.45  $\mu\text{m}$  フィルター (Millex-LH) で濾過し、このうち 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に導入した。カラム、移動相の条件は 4-1-2-4 の通りである。各アミノ酸を分取・乾固し、0.01% TFA 水溶液に溶解し、この一部を LC/ESI-MS/MS で分析した。

#### 4-2-2-5. LC/ESI-MS/MS による D,L-アミノ酸の検出

使用した LC/ESI-MS/MS システムと、これに用いたキラルカラムは 4-1-2-5 の通りである。NBD-Ala, NBD-Ser, NBD-Leu, NBD-Phe, NBD-Val の溶出は、3-1-2-4, 3-2-2-8, 4-1-2-5 の通りに行った。

NBD-アミノ酸の D, L-エナンチオマーの定量には、クロマトグラムのピーク面積を用いた。ovalbumin の D-アミノ酸含量は、D-アミノ酸 (Ser:  $m/z$  269/252, Val:  $m/z$  281/235)/(D-アミノ酸 (Ser:  $m/z$  269/252+270/253, Val:  $m/z$  281/235+282/236)+L-アミノ酸 (Ser:  $m/z$  269/252+270/253, Val:  $m/z$  281/235+282/236)) から算出した。

#### 4-2-3. 結果

##### 4-2-3-1. 天然 ovalbumin 中の D-Ser 残基の検出

天然の ovalbumin (以下、S-ovalbumin free; Sigma のことを指す) をアルカリ条件下におくことで、S-ovalbumin への遷移を促し、D-Ser 残基が検出されるかどうかを調べた。市販の ovalbumin を 100 mM glycine/NaOH (pH9.5) に溶解し、37°C で 1, 3, 5, 7, 10 日間それぞれインキュベーションした。各試料を重塩酸加水分解した後、LC/ESI-MS/MS により解析した結果、コントロール (0°C, 10 日間) において 4% の D-Ser (1.5 残基) が検出され、7 日目まで経時的に D-Ser 含量が増加し、10 日目には飽和していた (Table 4-3)。7 日目、10 日目の D-Ser 含量は約 8% であり、これは X 線結晶構造解析から示唆された 3 残基分の D-Ser 含量 (7.89%) と一致した。

さらに、中性付近での変化を調べるために、10 mM potassium phosphate (pH7.4) に溶解し、37°C で 10 日間インキュベーションした。pH7.4 においても、1.7% の D-Ser が検出されたが、pH9.5 における結果と比較すると D-Ser 含量が非常に小さかった (Table 4-3)。

##### 4-2-3-2. ovalbumin 変異体解析による D-Ser 残基部位の推定

S-ovalbumin 中の D-Ser 残基部位を推定するため、*E. coli* BL21 (DE3) 株で生産した組換え体 ovalbumin の野生型と変異体 S164V, S236G, S320V, S164V/S320V をそれぞれアルカリ条件下でインキュベーションし、D-Ser 含量の変化を調べた。変異体は S-ovalbumin において D-Ser に転換する可能性のある Ser 残基をそれぞれ Val、あるいは Gly に置換しているため、D-Ser 含量が野生型より一残基分 (2.6%)、二重変異体では 2 残基分 (5.2%) 小さくなることが予想される。



それぞれの試料を 100 mM glycine/NaOH (pH9.5) 中、37°C で 3, 6, 9, 12 日間それぞれインキュベーションした。野生型において、天然のものと同様に経時的に D-Ser 含量が増加し、9 日目で 3 残基 (7.8%) となった (Table 4-4)。しかし、9 日目では飽和せず、12 日目で 8.4%と 3 残基分以上の値を示した。コントロール (0°C, 12 日間) では、0.7%と微量の D-Ser が検出されたが、これは天然の ovalbumin から得られた値よりも非常に低かった。

変異体 S164V, S236G, S320V, S164V/S320V の各 D-Ser 含量も野生型と同様にそれぞれ経時的に増加した (Table 4-4)。しかし、野生型と比較すると D-Ser 含量は小さいものの、1 残基分 (2.6%) の違いを示さなかった。二重変異体 S164V/S320V では、さらに D-Ser 含量は小さかったが、やはり 2 残基分の違いを得られなかった。従って、間接的に D-Ser 残基部位を推定することはできなかった。さらに、Val の分析も同様に行ったが、野生型及び全ての変異体において D-Val 残基は検出されなかった。

さらに、野生型と変異体 S164V, S236G, S320V について、中性付近での D-Ser 含量の変化を調べた。各試料を 50 mM potassium phosphate (pH7.4) 中、37°C で 20 日間インキュベーションし、解析を行った。コントロール (0°C, 20 日間) では、D-Ser は検出されなかったが、20 日目では各変異体で約 0.4%と非常に微量の D-Ser が検出された (Table 4-5)。

#### 4-2-4. 考察

熱安定型 S-ovalbumin の X 線結晶構造解析により、三つの Ser 残基 (Ser164, Ser236, Ser320) が D 体となっていることが示唆されており、このうち Ser164 と Ser320 は熱安定性に関与していることが示唆されている [Yamasaki *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010]。本研究では、実際に S-ovalbumin 中に D-Ser 残基が存在しているかどうかを重水素ラベルを利用した分析システムにより検証した。

市販の ovalbumin (S-ovalbumin free; Sigma) と *E. coli* で生産した組換え体 ovalbumin を、それぞれアルカリ処理 (pH9.5, 37°C) することで S-ovalbumin へと遷移させた。これらを分析すると、確かに D-Ser 残基を検出することができ、処理時間に応じて経時的に D-Ser 含量が増加した (Table 4-3, 4-4)。天然の ovalbumin では 7 日間、組換え体 ovalbumin では 9 日間のインキュベーションで X 線結晶構造解析と一致する 3 残基分の D-Ser 含量が得られた。未受精卵白身の 37°C における pH は、10 日までの間ほぼ経時的に pH9.0 から pH9.5 へと遷移する [Hatta *et al.*, 2001]。また、pH9.5, 37°C の条件で 10 日間インキュベーションすると、経時的に S-ovalbumin の割合が増え、10 日間で約 90% が S-ovalbumin となるという DSC の結果と本解析の結果より、S-ovalbumin の存在割合と D-Ser 含量は相関しているといえる [Hatta *et al.*, 2001]。組換え体 ovalbumin においては D-Ser 含量が 9 日間で飽和せず、12 日目においてさらに増加していたことより、組換え体においては天然の ovalbumin と立体構造や修飾残基などの状況が異なることが考えられるため、想定された 3 残基以外にも異性化した Ser 残基が存在する可能性が考えられる。

また、天然の ovalbumin は 10 日間、組換え体 ovalbumin は 20 日間、中性 (pH7.4)

でインキュベーションを行った。どちらもわずかに Ser 残基の異性化が起っていたが、pH9.5 と比べると異性化速度が非常に遅かった。従って、pH が高い方が Ser 残基の異性化が促進されることが判る (Table 4-3, 4-5)。

D-Ser 残基部位を推定するために、変異体 S164V, S236G, S320V, S164V/S320V をそれぞれアルカリ条件下 (pH9.5, 37°C) におき、D-Ser 含量を経時的に追跡した。変異体 S164V, S236G, S320V は 9 日間のインキュベーションによって、2 残基分の D-Ser 含量を超える 6~7%を示し、さらに 12 日間では 7~8%を示した (Table 4-4)。二重変異体 S164V/S320V においても、9 日目で 3.5%と 1 残基分の Ser 含量より大きな値を示した (Table 4-4)。各変異体の D-Ser 含量は、野生型より小さいものの、D-Ser 1 残基分及び 2 残基分の数値を示さなかった。従って、この変異体解析から D-Ser 残基部位を正確に推定するには至らなかった。アミノ酸置換による各変異体の D-Ser 含量は想定していた値より総じて大きかったため、推定 3 残基以外に D 体化した Ser 残基があると考えられる。やはり、*E. coli* で合成した変異体では、野生型の立体構造を完全に再現しているとは限らないため、予想通りの結果を得られなかったのではないかと考えている。

以上の結果と合わせて、三つの Ser 残基の異性化順序に関する知見を得るために、野生型と変異体 S164V, S236G, S320V について中性付近 (pH7.4) での変化を調べた。pH9.5 における S164V, S236G, S320V の D-Ser 含量は、ほぼ同様の経時変化を示しており、また、中性においては異性化速度が極めて遅かったため、異性化順序を推定するには至らなかった。

今後は、S-ovalbumin のペプチドマッピングにより、各推定 D-Ser 残基をそれぞれ含むペプチドを単離し、これを解析することで D-Ser 残基部位を特定する。ただし、アミノ酸配列上 Ser164 と Ser165 が連続しているため、推定 D-Ser 残基を一つ含むペプチドに分離するのは困難であるかもしれない。

また、以上の ovalbumin の解析を通じて、第 3 章で構築した重水素ラベルを用いた分析システムが、モデルペプチドのみならず、実際にタンパク質中の D-アミノ酸残基を検出でき、正確に定量できることを示した。確実な検出が実現したことで、ovalbumin が天然のタンパク質において、D-アミノ酸残基を含むという非常に数少ない発見例であることを実証することができた。従って、本分析システムがタンパク質の D-アミノ酸含量を定量するのに、0 時間外挿法に取って代わる方法として非常に有効であることが示された。

**Table 4-3. 天然 ovalbumin の D-Se r 含量の経時変化**

Day	D/(D+L) (%)	
	pH9.5	pH7.4
0 <sup>a</sup>	4.0	1.4
1	4.4	-
3	5.7	-
5	7.2	-
7	7.9	-
10	7.8	1.7

<sup>a</sup> 0°C, 10日間静置

**Table 4-4. pH9.5における組換え体 ovalbuminの D-Ser含量の経時変化**

Day	D/(D+L) (%)				
	WT	S164V	S236G	S320V	S164V/S320V
0 <sup>a</sup>	0.7	0.8	0.2	0.5	0.6
3	3.3	2.8	2.3	2.8	2.0
6	5.6	4.2	4.4	4.8	2.9
9	7.8	5.8	7.0	6.5	3.5
12	8.4	6.9	7.9	7.2	4.5

<sup>a</sup> 0°C, 12日間静置**Table 4-5. pH7.4における組換え体 ovalbuminの D-Ser含量の経時変化**

Day	D/(D+L) (%)			
	WT	S164V	S236G	S320V
0 <sup>a</sup>	0	0	0	0
20	0.4	0.4	0.2	0.4

<sup>a</sup> 0°C, 20日間静置

### 第3節 アルカリ条件下におけるタンパク質異性化の研究

#### 4-3-1. 目的

前節において、アルカリ処理により野生型 ovalbumin から熱安定型に遷移した S-ovalbumin に D-Ser 残基が実際に含まれていることを示した。Takahashi による変異体解析の結果と合わせると、ovalbumin は D-Ser 残基の保有により熱安定性が上昇したと考えられ、非常に興味深い現象である [Takahashi *et al.*, 2010]。タンパク質分子内に D-アミノ酸残基が含まれている場合、活性の低下や分解・凝集などの欠陥が生じる場合がある。しかし、ovalbumin の例のように分子内に D-アミノ酸残基が生じることで、その活性や熱安定性などを上昇させるような影響を与える場合があるのではないかと考えた。本節では、まず任意に選んだ数種類のタンパク質を比較的穏やかなアルカリ条件下 (pH9.5) に晒しておくことで、アミノ酸残基の異性化が起こるかどうかを調べた。古くから極端なアルカリ条件下においては、タンパク質の異性化が起こることが知られている [Masters *et al.*, 1979; Liardon *et al.*, 1983]。

今回は、carbonic anhydrase, lysozyme,  $\alpha$ -amylase, ウシ serum albumin, ヒト serum albumin を対象に分析を行った。 $\alpha$ -amylase については、*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, ブタ膵臓といった様々な生物由来のものについて解析した。

#### 4-3-2. 実験材料及び方法

##### 4-3-2-1. 試薬

$\alpha$ -amylase from *B. subtilis* は、和光純薬工業製品を使用した。 $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis*,  $\alpha$ -amylase from *A. oryzae*,  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas, carbonic anhydrase from bovine erythrocytes は、Sigma 製品を使用した。Lysozyme from egg white は、生化学工業製品を使用した。ウシ serum albumin, ヒト serum albumin は、Sigma 製品を使用した。

##### 4-3-2-2. インキュベーション方法及び試料調製

carbonic anhydrase, lysozyme, ウシ serum albumin, ヒト serum albumin は、100 mM glycine/NaOH (pH9.5) 中に 1 mg/ml となるように調製し、このうち 100  $\mu$ l を 37°C で 5~12 日間インキュベーションした。各種 $\alpha$ -amylase は、1 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む 100 mM glycine/NaOH (pH9.5) 中に約 1 mg/ml となるように調製し、このうち 100  $\mu$ l を、あるいは 100  $\mu$ g となるように溶液体積を調製し、37°C で 3, 6 日間それぞれインキュベーションした。*B. subtilis* と *B. licheniformis* 由来の $\alpha$ -amylase は、100 mM glycine/NaOH (pH9.5) に完全に溶解できなかったため、遠心した上清（可溶性画分）を用いた。コントロールは、それぞれ同様の試料を 0°C で同期間静置した試料とした。

それぞれの試料は、VIVASPIN 500 MWCO 5,000 (Sartorius) を用いて、脱塩と濃縮を行った。タンパク質溶液体積を 25  $\mu$ l になるまで濃縮し、475  $\mu$ l の 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) を加え、再度濃縮を行った。これをさらにもう一度繰り返した。



#### 4-3-2-3. 加水分解

各タンパク質約 10  $\mu\text{g}$  を PICO TAG を用いて、6 M DCl/D<sub>2</sub>O 気相中、110°C で 24 時間加水分解処理した。

#### 4-3-2-4. LC/ESI-MS/MS 分析用試料の調製

加水分解産物は 50 mM borate buffer (pH9.5) 40  $\mu\text{l}$  に溶解した。このうち 20  $\mu\text{l}$  に 50 mM NBD-F/acetonitrile 溶液 10  $\mu\text{l}$  を加え、60°C で 5 分間反応させた後、1% TFA 水溶液を加え、反応を停止した。0.45  $\mu\text{m}$  フィルター (Millex-LH) で濾過し、このうち 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に導入した。カラム、移動相の条件は 4-1-2-4 の通りである。各アミノ酸を分取・乾固し、0.01% TFA 水溶液に溶解し、この一部を LC/ESI-MS/MS で分析した。

#### 4-3-2-5. LC/ESI-MS/MS による D,L-アミノ酸の検出

使用した LC/ESI-MS/MS システムと、これに用いたキラルカラムは 4-1-2-5 の通りである。NBD-Ala, NBD-Ser, NBD-Leu, NBD-Phe, NBD-Val の溶出は、3-1-2-4, 3-2-2-8, 4-1-2-5 の通りに行った。

NBD-アミノ酸の D, L-エナンチオマーの定量には、クロマトグラムのピーク面積を用いた。各タンパク質の D-アミノ酸含量は、Table 3-4 と D-Ser については  $\text{D-Ser } (m/z \ 269/252)/(\text{D-Ser } (m/z \ 269/252 + 270/253) + \text{L-Ser } (m/z \ 269/252 + 270/253))$  から算出した。

#### 4-3-3. 結果

各タンパク質を pH9.5, 37°C で数日間アルカリ処理を行うことで、異性化により分子中に D-アミノ酸残基が生じるかどうかを調べた。5 日間アルカリ処理したウシ serum albumin、及び 10 日間アルカリ処理したヒト serum albumin からは、D-アミノ酸 (D-Ala, D-Ser, D-Leu, D-Phe, D-Val) は検出されなかった。5 日間アルカリ処理した carbonic anhydrase からは D-Ala と D-Ser、lysozyme からは D-Ser が検出され、共に D-Leu, D-Phe, D-Val は検出されなかった (Table 4-6)。carbonic anhydrase は 12 日間のアルカリ処理により、4.8%まで D-Ser 含量が増加していたが、同時にタンパク質の分解が進行していた。一方、lysozyme は、12 日目においても分解しておらず、D-Ser 含量は 0.6%で飽和していた。

$\alpha$ -amylase は Ca 要求性のため、インキュベーション時に 1 mM  $\text{CaCl}_2$  を加えた。*B. subtilis* と *B. licheniformis* 由来の  $\alpha$ -amylase からは、D-Ala と D-Ser がそれぞれ検出された (Table 4-7)。コントロール (0°C, 6 日間) においても、共に微量の D-Ala と D-Ser が含まれており、*B. subtilis* 由来の  $\alpha$ -amylase の D-Ala 含量以外は 3 日から 6 日にかけて経時的に増加した。*A. oryzae* とブタ膵臓由来の  $\alpha$ -amylase からは、6 日目においてそれぞれ D-Ser とブタ膵臓由来からは D-Ala も検出された (Table 4-7)。また、*B. subtilis* 由来の  $\alpha$ -amylase を用いて、インキュベーション時の Ca の有無による D-Ser 含量の変化を調べたが、変化はなかった (Table 4-8)。

以上より、タンパク質を pH9.5, 37°C でアルカリ処理すると、異性化により D-アミノ酸残基 (D-Ala, D-Ser) が生じることが示された。

#### 4-3-4. 考察

5 種類のタンパク質を対象に、アルカリ処理による D-アミノ酸含量の変化をそれぞれ調べた。3 種類のタンパク質 (carbonic anhydrase, lysozyme,  $\alpha$ -amylase) をアルカリ条件下 (pH9.5, 37°C) で数日間インキュベーションすると、分子内に D-アミノ酸残基 (D-Ala, D-Ser) を生じることが明らかとなった。

carbonic anhydrase を 5 日間アルカリ処理すると、D-Ser が 0.8%とわずかに生じており、その他の D-アミノ酸は検出されなかった。一方、12 日間アルカリ処理を行うと、D-Ser 含量が約 5%まで上昇し、極僅かな D-Ala (0.2%) が検出された (Table 4-6)。これらの試料を SDS-PAGE により確認すると、12 日間処理した試料においては分解が進行していた。従って、長期間のアルカリ処理により、変性あるいは分解した分子も多く存在し、その中で分解されずに生き残った分子中に D-アミノ酸残基が蓄積されていると考えられる。

アルカリ処理した lysozyme からは、D-Ser (0.6%) のみが検出された。D-Ser 含量は、5 日間のアルカリ処理ですでに飽和していた。lysozyme は、ovalbumin と同様に卵白の構成成分であるため、アルカリ条件に晒されており、生理的に Ser 残基の僅かな異性化が生じている可能性が考えられる。

$\alpha$ -amylase については、異なる 4 種類の生物由来 (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *A. oryzae*, ブタ膵臓) の酵素を分析し、その全てにおいて D-Ala 及び D-Ser が検出された (Table 4-7)。*B. subtilis*, *B. licheniformis* 由来の  $\alpha$ -amylase は、コントロール (0°C, 6 日間) において、極僅かな D-Ala と D-Ser が含まれており、その後僅かながら経時的に D-アミノ酸含量が増加した。*A. oryzae* 及びブタ膵臓由来の  $\alpha$ -amylase では、3 日間のアルカリ処理では D-アミノ酸残基は検出されず、6 日間の処理で D-アミノ酸残基が生じていた。このようにアルカリ条件においては、

生産生物種によらず、 $\alpha$ -amylase の分子内に D-アミノ酸残基が生じることが示された。また、 $\alpha$ -amylase は Ca 要求性であり、Ca 非存在下では不安定化する [Machius *et al.*, 1998]。そこで、不安定化した $\alpha$ -amylase では D-アミノ酸残基が蓄積するのではないかと考え、インキュベーション時の Ca の有無による D-Ser 含量の変化を調べた。6 日間処理した試料において、共に 1%と同じ量の D-Ser が検出されたため、Ca の有無は $\alpha$ -amylase の異性化に影響しなかった (Table 4-8)。また、同試料においても、Ca の有無に関わらずタンパク質の分解が確認された。アルカリ処理によるタンパク質の変性・分解には、分子内のアミノ酸異性化が原因となって引き起こされる場合があるのかもしれない。

以上を通じて、アルカリ処理 (pH9.5, 37°C) においてタンパク質中の Ser 残基が特に異性化しやすく、続いて Ala 残基も異性化することを示した。タンパク質ごとに D-アミノ酸含量や異性化するアミノ酸残基が異なっているため、アミノ酸異性化にはアミノ酸配列や立体構造などが影響していると考えられる。Ser 残基の異性化は、カルボアニオン中間体を介して起こると考えられる [Bada, 1985]。Ser は高い電子求引性を持ち、ラセミ化速度が速いため、今回様々なタンパク質で Ser 残基の異性化が起きたのではないかと考えられる。今後、アルカリ処理により一残基以上の D-アミノ酸残基を分子内に生じるタンパク質を見出すことができれば、その分子の活性や物性などの変化を追い、さらに異性化残基部位を特定することでタンパク質科学において新たな知見が得られるものと考えている。

**Table 4-6. pH9.5における carbonic anhydraseと lysozymeの D-アミノ酸含量の経時変化**

Day	D/(D+L) (%)			
	Carbonic anhydrase		Lysozyme	
	Ala	Ser	Ala	Ser
0 <sup>a</sup>	0	0	0	0
5	0	0.8	0	0.6
12	0.2	4.8	0	0.6

<sup>a</sup> 0°C, 12日間静置

**Table 4-7. pH9.5における $\alpha$ -amylaseの D-アミノ酸含量の経時変化**

Day	D/(D+L) (%)							
	<i>B. subtilis</i>		<i>B. licheniformis</i>		<i>A. oryzae</i>		ブタ膵臓	
	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser
0 <sup>a</sup>	0.6	0.2	0.1	0.1	0	0	0	0
3	0.6	0.4	0.2	0.3	0	0	0	0
6	0.6	0.7	0.4	0.5	0	0.6	0.5	1.6

<sup>a</sup> 0°C, 6 日間静置**Table 4-8. Caの有無による $\alpha$ -amylase (*B. subtilis*) の D-Ser含量**

Day	D/(D+L) (%)	
	Ca (-)	Ca (+)
0 <sup>a</sup>	0.1	0.1
6	1.0	1.0

<sup>a</sup> 0°C, 6 日間静置

## 終章

### 総合討論

本研究において、タンパク質は L-アミノ酸のみから構成されているという長年の常識に対して、現在の微量分析技術、及び光学分割技術を用いて精製タンパク質に D-アミノ酸残基が含まれているかどうかを正確に検証した。序章で述べた通り、分析技術の発達に伴って微量物質である D-アミノ酸を確実に捉えることが可能となり、D-アミノ酸が生体内に普遍的に存在していることが明らかとなってきた。

第 1 章では、塩酸加水分解 0 時間外挿法という古典的かつ一般的な方法を用いて、*E. coli* で合成した  $\beta$ -galactosidase と urocortin に D-アミノ酸残基が含まれているかどうかを調べた。その結果、二つのタンパク質から有意な D-アミノ酸が再現性よく検出された。また、これらの D-アミノ酸含量 (0 時間外挿値) は、タンパク質の種類やアミノ酸の種類によって異なっていた (Table 1-2, 1-3)。ここで検出された D-アミノ酸の由来については、(1)翻訳後の酵素的異性化、あるいは非酵素的異性化、(2)タンパク質生合成時の取り込み、(3)分析過程におけるアミノ酸の異性化の可能性が考えられた。まず、(1)翻訳後の酵素的異性化・非酵素的異性化の可能性については、論理的に否定できた。そこで、当研究室の以前の研究より可能性があると考えられた(2)タンパク質生合成時の取り込みについて検証を行った [高山, 2004]。*E. coli* 生育培地に D-アミノ酸を強制的に添加し、*E. coli* 細胞内の D-アミノ酸レベルが高い環境下において、タンパク質を合成させることで D-アミノ酸含量が増加するかどうかを調べたが、D-アミノ酸含量に大きな変化はなかった (Table 1-8, 1-9)。従って、タンパク質生合成時に取り込まれる可能性は低いものと考えられた。

第 2 章では、(3)分析過程におけるアミノ酸の異性化について検証した。タンパク質塩酸加水分解処理においてペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化反応とは別に、ペプチド状態でアミノ酸が異性化（ペプチドのジアステレオマー化）している可能性があると考えられた。モデルジペプチド L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala を短時間で加水分解処理すると、それぞれ特に C 末端側が異性化したジペプチドが検出された (Table 2-1, 2-2)。また、各ジペプチドの 0 時間外挿法による解析からも、0 時間外挿値が C 末端側のアミノ酸で大きかったことから、0 時間外挿値はこのペプチドジアステレオマー化の影響を反映していることが示された (Table 2-3)。従って、0 時間外挿法を用いて、タンパク質の D-アミノ酸含量を正確に推定できないことが明らかとなった。

そこで、第 3 章ではこれに代わる別の手法として、重水素ラベル法による分析システムを構築し、再度タンパク質中の D-アミノ酸残基の検出を試みた。この分析系は、タンパク質を重塩酸中で加水分解処理し、ペプチドから遊離したアミノ酸のラセミ化、及びペプチド中での異性化に伴って $\alpha$ 水素が重水素に置換した D-アミノ酸 (分子質量+1) を LC/ESI-MS/MS を用いて排除することを可能とした。実際に *E. coli* 及び *S. cerevisiae* で合成した $\beta$ -galactosidase を分析すると、どちらからも内在性の D-アミノ酸残基は検出されなかった (Table 3-7, 3-8)。従って、第 1 章において 0 時間外挿法により得られていた D-アミノ酸含量は、タンパク質の真の D-アミノ酸含量を示していたわけではなく、第 2 章の結果と合わせると、タンパク質加水分解産物における 0 時間外挿値にも、やはり加水分解処理によるペプチド中でのアミノ酸の異性化によって生じた人工的な D-アミノ酸の影響を受けていることが明らかとなった。今回構築した分析システムは、タンパク質に含まれている D-アミノ酸残基を感度良く、正確に検出できたため、D-アミノ酸含有タンパク質の発見やタンパク質の光学純度測定などに有



効に利用できるものと考えている。現在、NBD-Ala, Ser, Leu, Phe, Val に加えて NBD-Arg の分析が行えることを確認しているが、その他の NBD-アミノ酸についても ESI によるイオン化とキラルカラムによる光学分割条件を最適化できれば、本分析システムに簡単に適用することが可能である。特に Asn 及び Asp 残基はタンパク質中において異性化が起こりやすく、多くのタンパク質から見出されていることから、この検出条件を決定することは必須であるといえる。

第 4 章では、本分析システムを用いて、実際に D-アミノ酸含有タンパク質の存在検証を行った。真正細菌・古細菌・真核生物から抽出した総可溶性画分を分析すると、対象とした全ての真正細菌（グラム陽性及びグラム陰性細菌）と古細菌 *S. tokodaii* から D-Ala、*E. coli* MG1655 株から D-Ser が検出された (Table 4-2)。しかし、真正細菌については細胞壁ペプチドグリカン中に含まれている D-Ala を検出している可能性があるため、今後、カラムを用いて正確に分画することで、D-Ala 含有タンパク質の存在の真偽に迫る必要がある。ペプチドグリカンを持たない *S. tokodaii* や多量の D-Ala が検出された *S. aureus*、*E. coli* MG1655 株には D-アミノ酸含有タンパク質の存在が期待される。さらに、より多くの生物を対象に分析を行い、その中から D-アミノ酸含有タンパク質を同定することで、タンパク質中に D-アミノ酸残基が存在する意義についての知見を得ることができると考えている。

続いて、X 線結晶構造解析より D-Ser 残基が含まれているという報告のあった熱安定型 S-ovalbumin の分析を行った。天然及び組換え体の ovalbumin を数日間アルカリ処理 (pH9.5, 37°C) した後、これを分析すると、確かに D-Ser 残基が検出された (Table 4-3, 4-4)。異性化 Ser 残基部位の正確な同定には至らなかったが、D-Ser 含量は報告のあった 3 残基分と一致したため、これら 3 つの Ser 残基が異性化している可能性は高いと考えている。今後は、D-Ser 残基の特定

と熱安定性との関係について詳細を明らかにする必要があると考えている。

最後に、数日間アルカリ処理 (pH9.5, 37°C) した各種タンパク質の分子内に D-アミノ酸残基が生じるかどうかを調べた。その結果、carbonic anhydrase, lysozyme, 各種生物由来の $\alpha$ -amylase において、分子内に僅かに D-Ala と D-Ser が生じていた (Table 4-6, 4-7)。D-Ser は分析した多くのタンパク質から検出されており、アルカリ処理によって異性化が起こりやすいことが判った。一方、長い間アルカリ処理を行うと、タンパク質の分解が進行するものもあった。その中で生き残り、D-アミノ酸残基が生じた分子について、その挙動 (活性や物性など) がどのように変化するのかは、非常に興味深いものである。今後は、アルカリ処理により、少なくとも一残基以上の D-アミノ酸残基を生じるタンパク質を見出した上で、各種パラメーターの測定をすることが望ましいと考えている。

以上の研究を通じて、タンパク質中の D-アミノ酸残基の定量にこれまで一般的に使用されてきた塩酸加水分解 0 時間外挿法の問題点を指摘し、正確な定量を可能とする重水素ラベルを用いた分析系を構築するに至った。この方法を用いた分析によって、タンパク質には普遍的に D-アミノ酸残基が含まれているわけではなく、これまでの常識は大部分のタンパク質に当てはまるであろうことが示された。しかし、これまでの報告により D-アミノ酸残基を含むペプチド及びタンパク質が存在することは事実であり、またタンパク質の晒される環境 (高温やアルカリなど) によってはアミノ酸残基の異性化が生じるため、分子中に D-アミノ酸残基が定着する場合もあるだろうと考えている。今後、さらに多くの D-アミノ酸含有タンパク質が発見されることを期待している。そのためのツールとして、D-アミノ酸残基の正確な検出と定量を実現した重水素ラベルによる本分析システムは、その一端を十分に担うことができると考えている。特定

の D-アミノ酸残基を含むようなタンパク質は、L-アミノ酸のみから構成されているタンパク質よりも、機能あるいは性質の面で優位となる場合もあることが想定される。実際に D-Ser 残基を有する S-ovalbumin は熱安定性が向上している。従って、D-アミノ酸含有タンパク質の発見、そしてそれに続くタンパク質の解析により、学術的知見としてだけでなく、バイオテクノロジーや医学・薬学など様々な分野において有用な知見が得られるのではないかと考えている。

## 参考文献

- Abe H, Yoshikawa N, Sarower MG, Okada S (2005) Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals. *Biol Pharm Bull*, **28**, 1571-1577
- Asano Y, Ito H, Dairi T, Kato Y (1996) An alkaline D-stereospecific endopeptidase with beta-lactamase activity from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem*, **271**, 30256-30262
- Bada JL (1985) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids. (Barrett GC, ed), Chapman and Hall, New York, pp. 399-414
- Bloom FR, McFall E, Young MC, Carothers AM (1975) Positive control in the D-serine deaminase system of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **121**, 1092-1101
- Brückner H, Westhauser T (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*, **24**, 43-55
- Buczek O, Yoshikami D, Bulaj G, Jimenez EC, Olivera BM (2005) Post-translational amino acid isomerization: a functionally important D-amino acid in an excitatory peptide. *J Biol Chem*, **280**, 4247-4253
- Calendar R, Berg P (1967) D-Tyrosyl RNA: formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis. *J Mol Biol*, **26**, 39-54

Casadaban MJ, Martinez-Arias A, Shapira SK, Chou J (1983) Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol*, **100**, 293-308

Clarke S (2003) Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing res rev*, **2**, 263-285

D'Aniello A (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev*, **53**, 215-234

D'Aniello A, Di Fiore MM, Fisher GH, Milone A, Seleni A, D'Aniello S, Perna AF, Ingrosso D (2000) Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB J*, **14**, 699-714

Dedkova LM, Fahmi NE, Golovine SY, Hecht SM (2006) Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins. *Biochemistry*, **45**, 15541-15551

Donovan JW, Mapes CJ (1976) A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to S-ovalbumin in eggs. *J Sci Food Agric*, **27**, 197-204

Donovan JW, Mapes CJ, Davis JG, Garibaldi JA (1975) A differential scanning

calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J Sci Food Agric*, **26**, 78-83

Doublet P, van Heijenoort J, Mengin-Lecreulx D (1992) Identification of the *Escherichia coli murI* gene, which is required for the biosynthesis of D-glutamic acid, a specific component of bacterial peptidoglycan. *J Bacteriol*, **174**, 5772-5779s

Fisher GH, Garcia NM, Payan IL, Cadilla-Perezrios R, Sheremata WA, Man EH (1986) D-Aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 683-687

Frank H, Woiwode W, Nicholson GJ, Bayer E (1979) Stable isotopes. (Klein ER, Klein PD, eds), Academic Press, New York, pp. 165-172

Fujii N, Satoh K, Harada K, Ishibashi Y (1994) Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from human lens. *J Biochem*, **116**, 663-669

Fujii N, Tajima S, Tanaka N, Fujimoto N, Takata T, Shimo-Oka T (2002) The presence of D-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 1047-1051

Fujii N, Takemoto LJ, Momose Y, Matsumoto S, Hiroki K, Akaboshi M (1999)

Formation of four isomers at the asp-151 residue of aged human alpha A-crystallin by natural aging. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 746-751

Fukushima T, Kato M, Santa T, Imai K (1995) Enantiomeric separation and sensitive determination of D,L-amino acids derivatized with fluorogenic benzofurazan reagents on Pirkle type stationary phases. *Biomed Chromatogr*, **9**, 10-17

Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem*, **262**, 785-94

Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360

Goodfriend GA (1992) Rapid racemization of aspartic acid in mollusc shells and potential for dating over recent centuries. *Nature*, **357**, 399-401

Goodlett DR, Abuaf PA, Savage PA, Kowalski KA, Mukherjee TK, Tolan JW, Corkum N, Goldstein G, Crowther JB (1995) Peptide chiral purity determination: hydrolysis in deuterated acid, derivatization with Marfey's reagent and analysis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **707**, 233-244

Goto Y, Murakami H, Suga H (2008) Initiating translation with D-amino acids. *RNA*, **14**,

1390-1398

Hamaguchi M, Ogawa T, Hidaka M, Nishino N, Masaki H (2009) Intracellular D-stereospecific endopeptidases of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*. The 1st international conference of D-amino acid research abstracts, p. 72

Hamase K, Homma H, Takigawa Y, Fukushima T, Santa T, Imai K (1997) Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain. *Biochim Biophys Acta*, **1334**, 214-222

Hatta H, Nomura M, Takahashi N, Hirose M (2001) Thermostabilization of ovalbumin in a developing egg by an alkalinity-regulated, two-step process. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 2021–2027

Heck SD, Siok CJ, Krapcho KJ, Kelbaugh PR, Thadeio PF, Welch MJ, Williams RD, Ganong AH, Kelly ME, Lanzetti AJ, *et al* (1994) Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin. *Science*, **266**, 1065-1068

Homma H (2007) Biochemistry of D-aspartate in mammalian cells. *Amino Acids*, **32**, 3-11

Huntington JA, Patston PA, Gettins PG (1995) S-ovalbumin, an ovalbumin conformer with properties analogous to those of loop-inserted serpins. *Protein Sci*, **4**, 613-621



Iha H, Turugi K (1998) Shuttle-vector system for *Saccharomyces cerevisiae* designed to produce C-terminal-Myc-tagged fusion proteins. *Biotechniques*, **25**, 936-938

Imai K, Watanabe Y (1981) Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Chim Acta*, **130**, 377-383

Ishimaru T, Ito K, Tanaka M, Matsudomi N (2010) Thermostabilization of ovalbumin by alkaline treatment: Examination of the possible roles of D-serine residues. *Protein Sci*, **19**, 1205-1212

Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Takata T, Fujii N (2007) Localization of D-beta-aspartic acid-containing proteins in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 3923-3927

Kinouchi T, Nishio H, Nishiuchi Y, Tsunemi M, Takada K, Hamamoto T, Kagawa Y, Fujii N (2007) Isolation and characterization of mammalian D-aspartyl endopeptidase. *Amino Acids*, **32**, 79-85

Kint S, Tomimatsu Y (1979) A Raman difference spectroscopic investigation of ovalbumin and S-ovalbumin. *Biopolymers*, **18**, 1073-1079

Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R (2010) D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, **328**, 627-629

工藤潤也, 高野淑識, 金子竹男, 小林憲正 (2003) 土壌試料中のアミノ酸濃度及びその D/L 比測定のための抽出/加水分解法の最適化 分析化学, **52**, 35-40

Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA, Waldor MK (2009) D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, **325**, 1552-1555

Liardon R, Hurrell RF (1983) Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *J Agric Food Chem*, **31**, 432-437

Liardon R, Ledermann S, Ott U (1981) Determination of D-amino acids by deuterium labelling and selected ion monitoring. *J Chromatogr*, **203**, 385-395

Long Z, Nimura N, Adachi M, Sekine M, Hanai T, Kubo H, Homma H (2001) Determination of D- and L-aspartate in cell culturing medium, within cells of MPT1 cell line and in rat blood by a column-switching high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **761**, 99-106

Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G (1998) Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder-->order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, **6**, 281-292

Manabe H (1985) Occurrence of D-alanyl-D-alanine in *Oryza australiensis*. *Agric Biol Chem*, **49**, 1203-1204

Manning JM (1970) Determination of D- and L-amino acid residues in peptides. Use of tritiated hydrochloric acid to correct for racemization during acid hydrolysis. *J Am Chem Soc*, **92**, 7449-7454

Masters PM, Friedman M (1979) Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. *J Agric Food Chem*, **27**, 507-511

Miller SL (1953) A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, **117**, 528-529

Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, Hidak M, Homma H, Masaki H (2010a) Detection of D-amino acids in purified proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, **38**, 1377-1385

Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, Hidak M, Homma H, Masaki H (2010b) Generation of enantiomeric amino acids during acid hydrolysis of peptides detected by the liquid chromatography/tandem mass spectroscopy. *Chem Biodivers*, **7**, 1644-1650

Nagata Y, Fujiwara T, Kawaguchi-Nagata K, Fukumori Y, Yamanaka T (1998) Occurrence of peptidyl D-amino acids in soluble fractions of several eubacteria, archaea and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, **1379**, 76-82

Nagata Y, Fukuda A, Sakai M, Iida T, Kawaguchi-Nagata K (2001) D-Amino acid contents of mitochondria and some purple bacteria. *J Mol Catal B : Enzymatic*, **12**, 109-

Nakamura R, Ishimaru M (1981a) Changes in the shape and surface hydrophobicity of ovalbumin during its transformation to S-ovalbumin. *Agric Biol Chem*, **45**, 2775–2780

Nakamura R, Takemori Y, Shitamori S (1981b) Liberation of carboxyl groups on conversion of ovalbumin to S-ovalbumin. *Agric Biol Chem*, **45**, 1653–1659

Nishikawa T (2005) Metabolism and functional roles of endogenous D-serine in mammalian brains. *Biol Pharm Bull*, **28**, 1561-1565

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1977) Identification of D-aspartic acid and D-glutamic acid in pea seedling. *Agric Biol Chem*, **41**, 1811-1812

Ohtani S (1995) Estimation of age from the teeth of unidentified corpses using the amino acid racemization method with reference to actual cases. *Am J Foren Med Path*, **16**, 238-242

Pollegioni L, Sacchi S (2010) Metabolism of the neuromodulator D-serine. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 2387-2404

Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely HA, Heinrichson RL, Ball MJ, Greenberg BD (1993) Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its

deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **268**, 3072-3083

Shimizu T, Matsuoka Y, Shirasawa T (2005) Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol Pharm Bull*, **28**, 1590-1596

Sitamori S, Kojima E, Nakamura R (1984) Changes in the heat-induced gelling properties of ovalbumin during its conversion to S-ovalbumin. *Agric Biol Chem*, **48**, 1539-1544

Smith MB, Back JF (1962) Modification of ovalbumin in stored eggs detected by heat denaturation. *Nature*, **193**, 878 – 879

Smith MB, Back JF (1965) Studies on ovalbumin. II. the formation and properties of S-ovalbumin, a more stable form of ovalbumin. *Aust J Biol Sci*, **18**, 365–377

Song Y, Feng Y, LeBlanc MH, Zhao S, Liu YM (2006) Assay of trace D-amino acids in neural tissue samples by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, **78**, 8121-8128

Song Y, Liang F, Liu YM (2007) Quantification of D-amino acids in the central nervous system of *Aplysia californica* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **21**, 73-77

Song Y, Shenwu M, Zhao S, Hou D, Liu YM (2005) Enantiomeric separation of amino

acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole by capillary liqchromatography/  
tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1091**, 102-109

Soutourina J, Plateau P, Blanquet S (2000) Metabolism of D-aminoacyl-tRNAs in  
*Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biol Chem*, **275**, 32535-32542

Steinberg S, Bada JL (1981) Diketopiperazine formation during investigations of amino  
acid racemization in dipeptides. *Science*, **213**, 544-545

Takahashi N, Maeda M, Yamasaki M, Mikami B (2010) Protein-engineering study of  
contribution of conceivable D-serine residues to the thermostabilization of ovalbumin  
under alkaline conditions. *Chem Biodivers*, **7**, 1634-1643

Takahashi S, Ogasawara H, Hiwatashi K, Hori K, Hata K, Tachibana T, Itoh Y,  
Sugiyama T (2006) Paenidase, a novel D-aspartyl endopeptidase from *Paenibacillus* sp.  
B38: purification and substrate specificity. *J Biochem*, **139**, 197-202

高山敏充 (2004) *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 博士論文

Takayama T, Ogawa T, Hidaka M, Shimizu Y, Ueda T, Masaki H (2005) Esterification  
of *Escherichia coli* tRNAs with D-histidine and D-lysine by aminoacyl-tRNA  
synthetases. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 1040-1041

Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N, Mori H (1994) Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues. *J Biol Chem*, **269**, 10205-10208

Whittington CM, Koh JM, Warren WC, Papenfuss AT, Torres AM, Kuchel PW, Belov K (2009) Understanding and utilising mammalian venom via a platypus venom transcriptome. *J Proteomics*, **72**, 155-164

Wild J, Hennig J, Lobočka M, Walczak W, Kłopotowski T (1985) Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, **198**, 315-322

Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M (2003) Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *J Biol Chem*, **278**, 35524-35530

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室教授正木春彦先生に深く感謝申し上げます。有意義な御助言、御激励を賜りました同研究室准教授日高真誠先生に心より感謝申し上げます。日頃より御配慮、御協力して頂いた同研究室助教小川哲弘先生に深く感謝致します。同研究室の先輩方からは、様々な場面でご指導頂いたことを深く感謝します。同期や後輩の皆様には、日々の生活で大変お世話になったことを深く感謝致します。

北里大学薬学研究科生体分子解析学教室教授本間浩先生には、多大なる御指導と御協力を賜り、深く感謝するとともに心より御礼を申し上げます。同研究室の関根正恵先生には、親切的な御指導、御協力して頂いたことを心より感謝申し上げます。また、同研究室の先生方、学生の皆様には大変お世話になったことを深く御礼申し上げます。

有意義な御助言、御協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科教  
授渡邊秀典先生に深く感謝致します。

京都大学農学研究科助教高橋延行先生には、試料のご提供や御協力を頂き深く御礼申し上げます。

最後に、本当に長きにわたって私を常に暖かく見守り、そして様々な場面で支え続けてくれた両親に心から感謝致します。

2011 年 3 月