

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 宮本 哲也
指導教員名 正木 春彦

論文題目

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

全ての生体タンパク質はアミノ酸として、Gly 以外 L-アミノ酸のみから構成されるというホモキラリティーは古くからの常識であった。例外として、非リボソーム的に合成された細菌の細胞壁のペプチドグリカンやペプチド性抗生物質が知られていたが、近年の微量分析や光学分割技術の向上に伴い、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判ってきた。遊離型の D-アミノ酸として存在するだけでなく、いくつかの生理活性ペプチドで特定残基が翻訳後に特異的エピメラーゼで異性化される例や、ヒトの加齢や病気に関連してクリスタリンやアミロイド β で、D-Asp などが特定部位に蓄積する例が報告されている。さらに、種々の生物の組織や細胞の総可溶性高分子画分中には有意の D-アミノ酸が結合型で含まれているという報告がある。この最後の報告は、実は常識に反し、一般のタンパク質中に広く D-アミノ酸が含まれている可能性を期待させる。しかしこれを検証するためには、細胞や組織の抽出物という混合物ではなく、精製した個々のタンパク質を直接分析する必要がある。そこで本研究では、塩酸加水分解 0 時間外挿法と、重塩酸加水分解を用いた重水素ラベル法という二つの手法を用いて、精製タンパク質中に D-アミノ酸残基が含まれている可能性を検証した。

1. 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

タンパク質中の D-アミノ酸含量を求めるために、広く用いられてきた塩酸加水分解 0 時間外挿法を用いた。分析対象として大腸菌 β -galactosidase とヒト urocortin を精製し、各アミノ酸について D-アミノ酸含量を求めた。M9 最少培地で生育させた大腸菌にそれぞれのタンパク質を合成させ、His-tag により精製した。これらを 6 M 塩酸気相中 110°C で 3, 6, 16, 24 時間加水分解処理した。4-Fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F) により蛍光誘導体化した後、逆相カラムでアミノ酸を分離し、さらに各アミノ酸をキラルカラムで L 体と D 体に光学分割し定量した。各アミノ酸について加水分解時間に対する D/(D+L)比を直線回帰し、0 時間への外挿値でタンパク質中の D-アミノ酸含量を求めた。その結果、精製した二つのタンパク質から 0.5-4%の D-アミノ酸が有意に再現性よく検出された。D-アミノ酸含量はアミノ酸の種類によって異なり、タンパク質によっても異なっていた。モック実験として市販の遊離 L-アミノ酸で同様の処理を行ったところ、D-アミノ酸含量は製品の実測値とほぼ一致した。また、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、遊離アミノ酸と、タンパク質を加水分解処理したものとのほぼ一致したため、加水分解で生じたアミノ酸のラセミ化の影響は 0 時間外挿により解消されていると考えられる。ここで検出された D-アミノ酸の由来の一つの可能性として、タンパク質生合成時の D-アミノ酸の取り込みについて検証した。最少培地に D-アミノ酸を強制的に添加して、大腸菌に各タンパク質を合成させた。培地に D-アミノ酸を加えると、大腸菌細胞内の遊離 D-アミノ酸レベルは上昇したが、得られたタンパク質の D-アミノ酸含量にほとんど変化はなかった。従って、翻訳時に D-アミノ酸が取り込まれている可能性は、たとえあっても非常に低いことが示された。

2. 酸加水分解反応におけるペプチド異性化の検証

0 時間外挿法を用いて、大腸菌で発現させた各種精製タンパク質に D-アミノ酸が有意に定量されることを示した。この D-アミノ酸の由来について、ここ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。加水分解処理によってペプチド及びタンパク質から生じたアミノ酸にはラセミ化反応が起こるが、それ以前の加水分解処理中にペプチドの段階でアミノ酸残基が異性化（ペプチドのジアステレオマー化）している可能性を考えた。もし、実際に加水分解処理初期にこれが起きているのであれば、0 時間外挿法ではタンパク質中の D-アミノ酸含量を正確に求めることができない。そこで、L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala をモデルジペプチドとして用いて、ペプチドのジアステレオマー化が起きるか

どうかを検討した。各ジペプチドを 0.5~2 時間加水分解処理し、NBD 化して逆相カラムにより分離すると、ジケトピペラジンを介してそれぞれの反転配列からなるジペプチドが生じた。その一方で、わずかな量であるが、ジアステレオマー化したジペプチド (DL あるいは LD) が検出された。キラルカラムによる分析により、C 末端側のアミノ酸がよく異性化していることが明らかとなった。また、ジペプチド加水分解後の Ala と Phe の 0 時間外挿値でも、C 末端側でより大きな D-アミノ酸比が得られた。以上より、塩酸加水分解反応初期に、ジペプチドではペプチド状態で急速なアミノ酸の異性化が起きること、また特に C 末端側でジアステレオマー化しやすいことが示された。従って、タンパク質加水分解物の 0 時間外挿値は、ペプチドでの急速なジアステレオマー化のため、タンパク質中の D-アミノ酸含量を反映していないことが示唆された。

3. 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

タンパク質中の D-アミノ酸を正確に定量するためには、酸加水分解処理により生じる D-アミノ酸を排除しなければならない。遊離アミノ酸のラセミ化であろうとペプチドのジアステレオマー化であろうと、異性化の際には α 水素が一旦外れ、 H_2O 中の水素原子が再び結合する段階を経る。そこで、タンパク質を DCI/ D_2O 中で加水分解することで、ラセミ化及びジアステレオマー化したアミノ酸の α 水素を重水素に置換し、これらを分子量 1 の違いによりタンパク質中の D-アミノ酸と区別する分析系を構築した。重塩酸加水分解物を NBD 化し、ODS カラムで各アミノ酸に単離した後、キラルカラムを備えた LC-MS/MS を用いて D-アミノ酸を検出した。まず、モデルペプチドとして、化学合成 L-Ala-L-Ala-L-Ala と D-Ala-L-Ala-L-Ala を分析し、ペプチド内在性の D-Ala と加水分解中に生じた D-Ala を検出・区別できるかどうかを調べた。L-Ala-L-Ala-L-Ala からは重水素ラベルされた D-Ala のみが検出され、D-Ala-L-Ala-L-Ala からは約 35% のペプチド内在性の D-Ala が検出された。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。さらに、この方法を 2 残基の D-Phe を含む D-Phe^{2,6}-LHRH に適用して内在性の D-Phe を定量できることを確認した。そこでこの方法で β -galactosidase を分析すると、内在性の D-アミノ酸は検出されなかった。従って、0 時間外挿法により検出していた D-アミノ酸は、加水分解処理中のペプチドのジアステレオマー化によって生じていることが明らかとなった。

4. D-アミノ酸含有タンパク質の存在検証

重塩酸加水分解と LC-MS/MS を組み合わせたことにより、加水分解で生じる

D-アミノ酸の区別が可能になったため、タンパク質に含まれている D-アミノ酸を感度よく直接検出できるようになった。ここでは、この分析システムを用いて、D-アミノ酸含有タンパク質の探索、及び存在検証を行った。

(1) 真正細菌・古細菌・真核生物から抽出した総可溶性高分子画分を用いて、D-アミノ酸含有タンパク質の探索を試みた。その結果、*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* を含む真正細菌、古細菌 *Sulfolobus tokodaii* から、主に D-Ala が有意な量検出された。このうち真正細菌に関してはペプチドグリカンの前駆体や分解物に由来する可能性は否定できず、これらを正確に分画することによって、D-アミノ酸含有タンパク質の存在を確かめる必要がある。

(2) Ovalbumin は卵白の主要タンパク質であり、卵殻からの二酸化炭素放出による pH の上昇に伴って、熱安定性の上昇した S-ovalbumin に変化する。熱安定化機構については、未だ明らかとなっていないが、X 線結晶構造解析により Ser164, Ser236, Ser320 が特異的に D 体であること、そして、これらが熱安定性に関わっていることが示唆されている。In vitro で数日間、pH9.5, 37°C で処理し S-ovalbumin としたもののから、確かに D-Ser 残基が検出された。D-Ser 含量は経時的に増加していき、最終的に約 3 残基分の D-Ser 含量を示した。

(3) Ovalbumin は、D-Ser 残基を得て熱安定性が上昇したと考えられているが、その他のタンパク質でも分子内に D-アミノ酸が生じた場合、その活性や熱安定性などに影響を与えるのではないかと考えた。そこで、数種類のタンパク質を pH9.5, 37°C に置くことで、アミノ酸の異性化が起こるかどうかを調べた。その結果、carbonic anhydrase, lysozyme, α -amylase において、D-Ser や D-Ala が検出され、それらの含量の経時的な増加が確認された。従って、比較的穏やかなアルカリ条件下において、分子内に D-アミノ酸が生じることが明らかとなった。

本研究により、タンパク質中の D-アミノ酸の定量に一般的に使用されてきた 0 時間外挿法の問題を指摘し、正確な定量を可能とする分析系を構築するに至った。これにより、対象のタンパク質に D-アミノ酸が含まれていないことが判ったものの、S-ovalbumin 中に D-アミノ酸を見出すことができた。今後、この分析系による D-アミノ酸含有タンパク質の発見が期待される。

発表論文

[1] Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, Hidaka M, Homma H, Masaki H (2010) *Amino Acids* **38**, 1377-1385

[2] Miyamoto T, Sekine M, Ogawa T, Hidaka M, Homma H, Masaki H (2010) *Chem Biodivers* **7**, 1644-1650