

[ 別紙 2 ]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 高 山 敏 充

生体を構成するアミノ酸はL型のみであるという考えは長い間の常識であった。しかし近年、生体素材に D-アミノ酸の存在を示す報告が相次いでおり、アミノ酸のキラリティーに関する考え方も変化しつつある。遊離型だけでなく結合型の D-アミノ酸も広く発見されているが、一般には、L 型-アミノ酸のみでタンパク質が合成され、その一部の残基が例外的に翻訳後修飾で D 型に変換されると考えられている。しかし、これだけでは結合型 D-アミノ酸の普遍性を説明するには不十分であるとして、本論文では、翻訳過程で D-アミノ酸がタンパク質に直接取り込まれるという仮説を立て、それを検証しようとしている。

序章ではまず、生体中に見いだされる遊離型、結合型両方の D-アミノ酸の例を紹介し、生命現象と D-アミノ酸との関わりを述べている。続いて細菌や古細菌から動物、植物に至る幅広い生物素材で、D-アミノ酸が結合型として可溶性画分に相当量存在するという報告を取り上げ、タンパク質合成における D-アミノ酸の取り込みの可能性を検討する意義を述べている。

第一章ではタンパク質合成の初期段階である tRNA のアミノアシル化反応について、D-アミノ酸がアミノアシル tRNA 合成酵素の基質となりうるかどうかを調べている。グリシンを除く 19 種類の D-アミノ酸について検討し、すでに報告のある D-Asp と D-Tyr に加え、新たに少なくとも D-His と D-Lys でアミノアシル化反応が進行することを示した。これは D-アミノ酸がアミノアシル化過程では完全には排除されていないことを意味する。

第二章では前章の結果をふまえ、試験管内転写産物 tRNA を D-アミノ酸によりアミノアシル化し、それを *in vitro* のタンパク質合成系の基質としてリボソーム依存的に D-アミノ酸がペプチドに取り込まれるかどうかを調べている。アルカリ処理後に formyl-L-Met-D-His と formyl-L-Met-D-Tyr が得られたことから、L 型から D 型へのペプチド転移反応が進行することを示している。これらの反応速度は、L 型から L 型への反応と比較して、formyl-L-Met-D-His では 1/2、formyl-L-Met-D-Tyr では 1/5-1/10 程度であった。続いて formyl-L-Met-D-His-L-Tyr の合成の確認して、D 型から L 型へのペプチド転移反応が進行することを示している。しかし同一条件で formyl-L-Met-D-His-D-Tyr は確認出来なかったことから、D 型から D 型への反応は D 型から L 型への反応より効率が低いことが示唆され、また、formyl-L-Met-D-Tyr-L-His の合成も確認できなかったことから、D-アミノ酸の取り込み効率はペプチド配列に依存することが示唆された。続いて解離因子によるペプチド解離反応について調べている。formyl-L-Met-D-His と formyl-L-Met-D-Tyr というジペプチドは tRNA からの解離効率が極めて低かったが、formyl-L-Met-D-His-L-Tyr というトリペプチドでは十分な解離

が確認された。さらに、リボソームから drop-off したペプチジル-tRNA をペプチドと tRNA に解離させる、peptidyl-tRNA hydrolase (PTH) の活性について調べ、formyl-L-Met-L-His-tRNA ではペプチドが解離されたが formyl-L-Met-D-His-tRNA では解離されなかった。以上から、解離因子および PTH による tRNA からのペプチドの解離は、C 末端が L-アミノ酸の時に進行するが D-アミノ酸の時は進まないことが示されている。

第三章では、生細胞中でのタンパク質合成でも D-アミノ酸が取り込まれるかどうかを検討している。D-アミノ酸混合物あるいは L-アミノ酸混合物を添加した最少培地で大腸菌を生育させ、そこから精製した glutathione S-transferase (GST) の特性を比較している。D-アミノ酸培地由来の GST は、L-アミノ酸培地由来の GST と比べてグルタチオン結合活性が劣っていることを示し、これを D-アミノ酸が GST に取り込まれた結果であると解釈している。

第四章では、D-アミノ酸がタンパク質中に取り込まれる一般的可能性、および D-アミノ酸が取り込まれた場合の生命現象について総合的に議論している。

以上本論文は、タンパク質合成に使われるのは L-アミノ酸だけであるという長い間の生物学の常識に果敢に挑戦して、その反証を挙げた研究であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。