

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮本 哲也

生物の生体タンパク質を構成するアミノ酸が L-アミノ酸のみであることは常識であるが、タンパク質中のアミノ酸残基の光学活性を正確に知る技術は長い間なかったため、直接証拠なしに常識は定着したと考えられる。近年、分析技術の発達により、今まで非天然物質とされてきた D-アミノ酸が様々な生物からみつかり、遊離アミノ酸としてだけでなく、いくつかの生理活性ペプチド中や、老化に伴ってタンパク質中に結合型 D-アミノ酸が増える例も知られている。また、様々な生物の組織や細胞の可溶性高分子量画分中に有意の結合型 D-アミノ酸が含まれるという報告もあり、一般のタンパク質にはじつは有意の D-アミノ酸残基が含まれているという可能性を期待させる。しかし、最新の分析技術を用いてこの問題を検証した報告はない。そこで申請者は、生合成させ精製したタンパク質中に 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、それに伴う重要な新知見を得た。

本論文は4章からなる。第1章では、タンパク質の D-アミノ酸含量決定法として、広く応用されている塩酸加水分解0時間外挿法を用いた。大腸菌 β ・galactosidase・とヒトurocortinを精製し、Ala, Asp, Glu, Ile, Leu, Phe の D-アミノ酸含量を求めたところ、0.5-4%の D-アミノ酸が再現性よく検出された。この D-アミノ酸の由来として、翻訳過程で D-アミノ酸が取り込まれる可能性を検証した。培地に D-アミノ酸を添加すると、大腸菌細胞内の遊離 D-アミノ酸量は大きく上昇するが、生合成されるタンパク質の D-アミノ酸検出量にはほとんど影響しなかった。従って、翻訳時に細胞内の D-アミノ酸が直接取り込まれている可能性は低いと考えられた。

第2章では、分析過程でアミノ酸が異性化する可能性を検証した。加水分解で遊離したアミノ酸のラセミ化による D-アミノ酸は0時間外挿法で消去できるが、ペプチドのままアミノ酸残基が異性化していればその効果は消去できない。そこで、L-Ala-L-Phe と L-Phe-L-Ala (LL 体)をモデルとして、ペプチドのままジアステレオマー化が起きるかどうかが検討した。その結果、ジアステレオマー化したジペプチド(DL 体または LD 体)が検出され、このうち C 末端側のアミノ酸に異性化傾向の強いことを明らかにした。即ち β ・galactosidase・等で検出される D-アミノ酸は、分析過程の異性化で生じたものであり、通常の0時間外挿法では、タンパク質内在の D-アミノ酸含量を正確に求めることができないことを示した。

第3章では、タンパク質中の D-アミノ酸残基を正確に定量するための分析系を確立した。タンパク質を重塩酸加水分解し、その処理中に異性化したアミノ酸の α 水素を重水素に置換し、分子質量の違いにより、タンパク質に内在した D-アミノ酸と区別する分析系である。まず、モデルペプチドを用いて、ペプチド内在性の D-アミノ酸を正確に検出・定量できる

ことを確認した。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ず、最終的に β -galactosidase には調べた限り D-アミノ酸は含まれていないことを示した。

第 4 章では、上記で構築した分析系を用い、D-アミノ酸を含むと示唆されていた ovalbumin の分析を行った。その結果、可溶性画分から真の内在性 D-Ala と D-Ser を検出でき、生理的な弱アルカリ処理を施した ovalbumin からは、推定されていた通りの D-Ser 含量を測定した。このように、タンパク質中の真の D-アミノ酸を検出・定量する手法を確立し、新規 D-アミノ酸含有タンパク質の発見に応用できることを示した。

以上、本研究により申請者は、信頼されてきたタンパク質中の D-アミノ酸の分析法の問題点を指摘し、問題点の原因を明らかにするとともに、これに代わる内在性 D-アミノ酸の検出・定量法を確立した。そして、この手法により身近なタンパク質中にも D-アミノ酸が内在していることを示したことは、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。