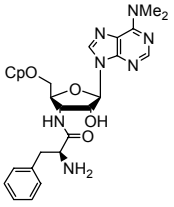
29-0060 W133-2

フッ素化ピューロマイシン誘導体を用いたリボソームのペプチド結合形成機構の解析

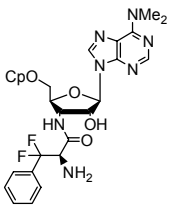
○奥田 健介[1,2], Amy C. Seila[2], Scott A. Strobel[2]（[1]岡山大薬,[2]Yale 大分子生物物理・生化学）

［目的］リボソームはペプチド結合形成（以下 PT と略す）反応を司る細胞小器官である。PT 反応の pH 依存性の結果より、pKa=7 近傍の独立した二つの脱プロトン化が本反応の進行には重要であることが示唆されている。しかしこれらの pKa 値が近接しているために、詳細な解析が困難である。そこで、我々は本 pKa の一方に関与すると考えられる A-site tRNA に着目し、F 置換により pKa の低下した基質アナログを用いて機構解析を行うことを目指した。

［方法］tRNA に替えて低分子アナログを基質として利用する 50S リボソームのフラグメント・アッセイを用いた。A-site 基質として用いた二種のヌクレオチドを右図に示す。(*S*)-2-carbomethoxy-3-phenyl-2*H*-azirine から HF-pyridine を用いた開環反応により 2 の L-β,β-diF-Phe 残基を合成した。さらに 1, 2 ともに *N*-Fmoc アミノ酸残基を puromycin aminonucleoside と縮合後、液相法により本基質を調製した。



1



2

［結果・考察］アミノ酸残基の pKa を酸塩基滴定により求めたところ、1 は 6.9 であり、2 は 5 以下であった。従って 2 のα-アミノ基は全 pH 領域(pH 5.2-9.5)にて非プロトン化された形で存在する。フラグメント・アッセイの結果、両者ともに A-site 基質として働き、1 は pKa を二つ(7.1±0.7, 7.5±0.7)持つ一方、2 はただ一つの pKa (6.8±0.1)を示した。この結果、予期した通り反応の単純化に成功し、1 の持つ高い pKa は A-site 基質に由来する一方、低い pKa はリボソームに由来することが示唆された。