

氏 名 (本 國 籍)	田 中 孝二郎 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 270 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	Enzymatic Studies on Bacterial Polyamine Degradation (細菌のポリアミン分解の酵素化学的研究)
審 査 委 員 会	主査 信州大学 教授 唐 澤 傳 英 副査 信州大学 教授 柴 井 博四郎 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 静岡大学 教授 岡 部 満 康 副査 信州大学 教授 寄 藤 高 光

論 文 の 内 容 の 要 旨

ポリアミンは直鎖分子の両末端にアミノ基をもつブトレッシン、両末端アミノ基の他分子内にイミノ基をもつスベルミン、スベルミジンなどの総称であり、ほぼ全生物の細胞成分として知られる重要な化合物である。細菌にはスベルミジン、ブトレッシンの他にノルスベルミジン、ジアミノプロパン (DAP) その他のポリアミンが知られている。

系統学的にプロテオバクテリアに属する *Pseudomonas* 属菌などには、スベルミジンを 4-アミノブチルアルデヒド (ABAL) と DAP へ酸化・開裂するスベルミジンデヒドロゲナーゼ (人工電子受容体依存) の存在、およびブトレッシンから α -ケトグルタル酸へのアミノ基転移により生成する ABAL を γ -アミノ酪酸へ転換する経路が知られている。

信州大学の土壌から分離された、系統学的にグラム陽性細菌のアクチノバクテリアに属する菌株 *Arthrobacter* sp. TMP-1 は上記のポリアミンに生育でき、ブトレッシン以外の 3 種のポリアミンを、ポリアミンアミノトランスフェラーゼ (アミノ基受容体はピルビン酸) で分子末端にアルデヒド基をもつアミノアルデヒドに分解する。

本研究は TMP-1 株の各ポリアミンの分解経路の第 2 段階の解明を目指し、以下の結果を得た。

1. DAP とノルスベルミジンに生育した菌体の抽出液中に存在し、3-アミノプロピオンアルデヒド (APAL) によく作用する酵素は、ニコチンアミド補酵素を電子受容体とする脱水素酵素であった。この酵素をアミノプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC class 1.2.1, APAL-DH と略) と命名した。

2. APAL-DHを1000倍に精製して、電気泳動的に均一となった標品の比活性は 290 U mg^{-1} で、分子量は205,000、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動でサブユニットは1種類だけ検出され、その分子量は52,000と測定された。この結果から本酵素がホモ4量体であると考えられた。
3. APAL-DHはAPALの他に4-アミノブチルアルデヒド (ABAL) にもよく作用した (相対活性, 43%)。しかし、4-グアニジノブチルアルデヒドに弱く作用した以外、他のアルデヒド類にはほとんど作用しなかった。NAD⁺の代わりにNADP⁺を加えた場合の相対活性は67%と高く、希な補酵素特異性を示す酵素であることが判明した。APAL/NAD⁺システムでAPALに対するKm値は $3.5 \mu\text{M}$ で、最適pHは8.5であった。p-クロロメルクリ安息香酸で強く阻害された。
4. プトレッシンとスペルミジンに生育した菌体中のAPAL-DH活性を示す酵素は、共通してAPAL-DHよりもはるかに熱に不安定であった。この酵素を電気泳動的に均一にまで精製し、比活性 4.8 U mg^{-1} (基質はABAL) の標品を得た。分子量は201,000で、分子量51,000のサブユニットのホモ4量体と考えられた。
5. プトレッシンで誘導された酵素をアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.19) と同定した。この酵素はABALの他にAPAL (相対活性, 82%)、4-グアニジノブチルアルデヒド (相対活性, 70%)、n-ブチルアルデヒド (相対活性, 30%) など多くのアルデヒドに作用し、APAL-DHとは明確に異なる広い基質特異性を示した。NAD⁺の代わりにNADP⁺を加えた場合の相対活性は45%で、やはり補酵素特異性が例外的であった。ABAL/NAD⁺システムでのABALに対するKm値は $65 \mu\text{M}$ で、最適pHは8.0であった。

審 査 結 果 の 要 旨

本学位論文の公開口頭発表 (30分) と質疑応答 (30分)、および学位論文審査会が信州大学農学部にて平成14年1月30日に行われた。

ポリアミン類は全生物のリボソームに含まれ、動物ではスペルミンとスペルミジン (SPD) が、他の生物ではSPDとプトレッシン (PUT) が主要な成分である。細菌にはノルスペルミジン (NSPD)、ジアミノプロパン (DAP) その他のポリアミンを含むものが知られている。

系統学的にプロテオバクテリアに属する *Pseudomonas* 属菌などでは、SPDの4-アミノブチルアルデヒドとDAPへの分解、PUTから4-アミノブチルアルデヒド生成 (アミノ基転移) と γ -アミノ酪酸への転換の経路が知られていた。

系統学的にDNAのG+C塩基含量の高いグラム陽性細菌グループの1菌株である *Arthrobacter* sp. TMP-1は上記のポリアミンに生育でき、PUT以外の3種のポリアミンをピルビン酸をアミノ基受容体とするポリアミンアミノトランスフェラーゼで分子末端アルデヒド基をもつアミノアルデヒド類に分解する。

本研究はTMP-1株のポリアミン分解経路の第2段階の解明を目指した。SPDとDAPの分解経路でアミノアルデヒド類はアミノプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼと名付けられた酵素によりアミノカルボン酸類に酸化され、NSPDとPUTの分解経路には、別の酵素アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼが関与してい

た。均一にまで精製された両酵素は、 NAD^+ と NADP^+ を同等に電子受容体とする点で非常に珍しい性質を共有し、基質特異性が明確に異なるのに対し、分子量、4次構造、および各種の酵素化学的性質が類似していた。アミノプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼは IUBMB Enzyme Nomenclature の基準に照らして明確に新規な酵素と考えられる。

質疑応答では、学位論文が“基礎となる学術論文”よりも充実した内容を持つべきであると指摘された。特にアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ関与の発見の経過、*Arthrobacter* sp. TMP-1株のrRNA 遺伝子配列、アミノプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼのN-末端アミノ酸配列、酵素反応液組成のさらに詳しい内容など、口頭発表された内容を学位論文に追加することが求められ、また総合序論では具体的な研究課題の設定への記述が貧弱であると指摘された。

審査会は、代謝経路の第1段階の解明に比べて中間段階の解明が各種の困難を伴うこと、上記の追記が十分可能であること、また酵素ばかりでなく代謝経路の国際的データベース（例、Swiss Institute of Bioinformatics-ExPASy、米国の Argonne National Laboratory-EMP など）がここ数年間に開設されこの種の研究が重視されている点等を考慮し、本論文を岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

[基礎となる学術論文]

- ① K. Tanaka, E. Matsuno, E. Shimizu, H. Shibai, and T. Yorifuji (2001) Purification and characterization of aminopropionaldehyde dehydrogenase from *Arthrobacter* sp. TMP-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 191-196.
- ② K. Tanaka, R. Nakai, K. Sen, E. Shimizu, D. Karasawa, and T. Yorifuji: Purification and characterization of aminobutyraldehyde dehydrogenase from *Arthrobacter* sp. TMP-1. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, in press.]