



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Bacterial Metabolism of 1, 4-Diguanidinobutane and Agmatine

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Syed Mohammed Shoeb メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2414

氏名(国籍)	Syed Mohammed Shoeb (バングラデシュ人民共和国)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	農博甲第73号		
学位授与年月日	平成8年3月14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	Bacterial Metabolism of 1,4-Diguanidinobutane and Agmatine		
審査委員	主査	信州大学教授	寄藤高光
	副査	岐阜大学教授	河合啓一
	副査	静岡大学教授	田原康孝
	副査	信州大学教授	黒沢辰一
	副査	信州大学教授	入江鏡三

論文の内容の要旨

1. 本論文の概要

本論文に記された研究は、生体アミンの1種アグマチンと、アグマチン誘導体で動植物のある種のものに含まれる1,4-ジグアニジノブタン(DGB)の分解代謝経路を主として酵素化学的方法で検討したものである。

*Pseudomonas*属菌や腸内細菌についてはDGBまたはアグマチンの分解について知見が得られている。本論文はこれらとは系統的に遠隔な、高GC含量のグラム陽性菌(放線菌類縁細菌)を対象にスクリーニングして見出した、DGBを窒素源として資化できる*Rhodococcus* sp. C-x株のDGB分解代謝経路を検討し、新しい経路を発見した。

ついで *P. putida*のDGB分解酵素ジグアニジノブタナーゼ(DGBH, EC 3.5.3.20)を初めて均一なタンパク質にまで精製し、その物理化学的および酵素化学的性質を詳細に解明した。

さらに、研究の過程で市販のアグマチン標品が多量のDGBとプトレッシンを不純物として含んでいることを見出し、このような標品中の各成分を特異的に分別定量でき、食品中のアグマチンを特異的に定量できる*Rhodococcus*のアグマチン分解酵素を用いる酵素分析法を確立した。また *P. putida*のDGBHを用いてDGBからアグマチンを安価に生産する方法を開発した。

2. *Rhodococcus*属菌におけるDGBの分解経路¹⁾

DGBに生育させた*Rhodococcus*の細胞抽出液は各1種類のグアニジノ基をウレイド基に転換するデイミナーゼ型の酵素とウレイド基をアミノ基に転換するアミダーゼ型酵素を含んでいた。これらをそれぞれ高度に精製して基質特異性を検討し、アグマチンデイミナーゼ (ADI, EC 3.5.3.12) およびカルバモイルプトレッシンアミダーゼ (CPA, EC 3.5.1.53) と同定した。ADIはDGBおよびアグマチンによく作用し、CPAはカルバモイルアグマチンとカルバモイルプトレッシンによく作用した。DGBとアグマチンはこれらの酵素を効果的に誘導した。酵素的に調製した中間体の¹Hおよび¹³C-NMR分析から、カルバモイルアグマチン、アグマチン、カルバモイルプトレッシン、プトレッシンがこの経路で生成することが確認された。これらの結果から、本菌はDGBをカルバモイルアグマチン、アグマチン、カルバモイルプトレッシン経由でプトレッシンへと代謝し、ADIが第1, 第3段階、CPAが第2, 第4段階を触媒すると結論した。

3. *Pseudomonas*属菌のジグアニジノブタナーゼ (DGBH) の精製と性質²⁾

P. putida ATCC 12633 (type strain) が生産するDGBHを精製し、均一なタンパク質とした。本酵素は分子量170,000, サブユニット分子量38,000で、262 nmに強い極大吸収を持つ特異なスペクトルを示した。1分子のサブユニットは2分子のMn²⁺イオンを含んでいた。本酵素は α, ω -ジグアニジノ化合物 (メチレン基数3~8) およびアグマチンホモログ (メチレン基数5~7) に作用した。DGBに対する K_m 値は0.65 mM, アグマチンに対して相対活性0.6%, K_m 値は3.0 mMと測定された。本論文はこの他各種化合物による阻害などの性質も記載している。

4. *Rhodococcus*のADIの利用³⁾

Rhodococcus sp. C-x株が生産するADIはDGBの2つのグアニジノ基の一方のみ、およびアグマチンのグアニジノ基を分解した。DGBから生成するカルバモイルアグマチンのグアニジノ基には作用しなかった。

ADIをDGBとアグマチンの混合試料に作用させると、生成したウレイド基の濃度は試料中のDGBとアグマチンの濃度の和に等しく、分解されないグアニジノ基の濃度は最初のDGBの濃度に等しくなることを実際に確認した。ついでこれらの化合物を酵素的に分別定量する具体的な条件を明らかにし、試料中の各化合物の濃度と測定値の間の直線性を明らかにした。この方法の感度はイカなどの海産食品の鮮度を十分鋭敏に判別できるものであった。

またプトレッシン分析に用いられている*Micrococcus*のプトレッシンオキシダーゼがアグマチンのアミノ基には作用しないことを確認し、市販のアグマチン標品中に含まれるプトレッシンを特異的に定量する条件を見出した。市販のいくつかのアグマチン硫酸塩標品がDGB硫酸塩を13~17% (w/w), プトレッシン硫酸塩を17~18% (w/w) 含むことを明らかにした。

5. *Pseudomonas*のDGBHの利用²⁾

アグマチン(1-アミノ-4-グアニジノブタン)はプトレッシン(1,4-ジアミノブタン)の片側のアミノ基を有機化学的にグアニジノ基に転換して製造される。このときDGB

(1,4-ジグアニジノブタン)が副生するので、収率、純度の点で困難があるため、高価でまたプトレッシンとDGBを含む不純な標品が多い。他方DGBはプトレッシンから非常に容易に調製できる。

本論文は有機合成したDGBのグアニジノ基の片側のみを*Pseudomonas*のDGBHで分解することによって、高純度のアグマチンを安価・容易に調製できることを示した。またこの方法で市販アグマチンから不純物を除去できることを示した。

[文献]

- 1) S. M. Shoeb *et al.* Biosci. Biotech. Biochem., **58**, 859-863 (1994).
- 2) S. M. Shoeb *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol., **44**, 94-99 (1995).
- 3) S. M. Shoeb *et al.* Biosci. Biotech. Biochem., **60**, 69-72 (1996).

審 査 結 果 の 要 旨

申請者の提出した学位論文の内容は、細菌による1,4-ジグアニジノブタン(DGB)とアグマチンの分解に関するものであり、研究結果は第2～4章の三部に分けて記述されている。DGBはある種の動植物の成分として見いだされ、分子の両端に各1個のグアニジノ基をもつ化合物である。アグマチンはアルギニンが各種の生物に存在する脱炭酸酵素によって分解されるとき生ずる化合物である。細菌におけるアルギニンの分解経路は7つのグループにまとめられるような多様な経路で分解され、その分布は細菌界の系統学的構造とよく対応している。本研究は、グラム陽性で放線菌に類縁の細菌である*Rhodococcus* sp. C-x およびグラム陰性細菌である*Pseudomonas putida*を用い、細菌においてDGBおよびアグマチンの分解経路もまた多様化していることを明らかにした。

本論文の第2章は、*Rhodococcus*属菌C-x株に新規なDGB分解経路が存在することを明らかにした。すなわちこの株はDGBをN-カルバモイルアグマチン、アグマチン、N-カルバモイルプトレッシンを経てプトレッシンに分解した。この経路を触媒する2種の酵素を高度に精製し、誘導剤と基質特異性を検討し、第1および第3段階はアグマチンデイミナーゼが触媒し、第2および第4段階はカルバモイルプトレッシンアミダーゼが触媒することを明

らかにした。また経路の中間体は、合成 D G B または市販アグマチンから酵素的に調製した試料を用い、 ^{13}C -NMR 分析によって同定した。

本論文の第 3 章は *Pseudomonas putida* のグアニジノプタナーゼの精製と性質を記述している。この酵素は *P. putida* で D G B の分解の第 1 段階を触媒する酵素で、これまで均一なタンパク質にまで精製されていなかった。本研究では、初めて均一にまで精製した酵素を調製し、分子量、サブユニットサイズ、および 262 nm に極大をもつ特異な吸収スペクトルを示すことを明らかにし、また有機合成した数多くの基質アナログを用いて得た基質特異性、ミカエリス定数、阻害剤などに関するデータを示している。

第 4 章は、上記の 2 つの章で得られた結果の応用に関するものである。すなわち、まず安価に有機合成できる D G B の 2 つのグアニジノ基の片方のみを *P. putida* のグアニジノプタナーゼで加水分解することによって、高価なアグマチンを容易に調製できること、および大量調製の条件を示した。更に *Rhodococcus* sp. C-x のアグマチンデイミナーゼおよび *Micrococcus* のブトレッシンオキシダーゼを用いて市販のアグマチン硫酸塩標品（しばしば多量の D G B とブトレッシンを含む）の 3 つの成分をそれぞれ特異的に分別定量する方法を開発した。

上記の内容は、いずれも十分な新規性をもつと考えられ、また主な結果が *Biosci. Biotech. Biochem.* 誌（2 報）、及び *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 誌（1 報）に論文として掲載されていることも考え合わせ、博士の学位に相当するものと認めた。