

氏名	くりはらしん 栗原新
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第63号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	大腸菌の γ -グルタミル中間体を經由する新規プトレッシン代謝系に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 山本憲二 教授 小堤保則 教授 佐藤文彦

論文内容の要旨

γ -グルタミル化合物は、グルタミン酸の γ -位のカルボキシル基に他のアミノ基を持つ物質がアミド結合した構造を持つ化合物である。代表的な γ -グルタミル化合物としては、細胞内で活性酸素除去や毒物抱合に重要な役割を果たすグルタチオンが挙げられる。また、プトレッシンは、炭素数4のアルキル鎖の両端にアミノ基を有する脂肪族アミンであり、スベルミジン、スベルミンとともにポリアミンと呼ばれる化合物群に属している。ポリアミンは、細胞内でDNAやRNAといった酸性成分と結合しており、遺伝子の発現制御に関わるなど、細胞増殖において重要な役割を果たしている。プトレッシンは、他のポリアミン合成の出発物質となる重要な化合物である。大腸菌細胞内の濃度は数十mMと非常に高く、この濃度は一価カチオンを除くと、ATP、 Mg^{2+} と並んで細胞内での三大構成成分である。

本論文では、このプトレッシンを γ -グルタミル中間体を経てコハク酸の前駆体であるコハク酸セミアルデヒドに代謝する新規代謝系(以下、Ycj代謝系と呼ぶ)および、プトレッシンの新規インポーターが大腸菌に存在することを、*in vivo*、*in vitro*双方の実験により明らかにした。すなわち、Ycj代謝系を構成する酵素群および新規プトレッシンインポーターは、大腸菌のゲノム上でひとまとまりになった遺伝子群(*ycj*遺伝子群)によってコードされており、以下のようにYcj代謝系を構成することが明らかになった。

細胞外のプトレッシンが新規プトレッシンインポーター(YcjJ)によって大腸菌細胞内に取り込まれ、 γ -グルタミルプトレッシン合成酵素(YcjK)によってATP依存的に γ -グルタミル化され、 γ -グルタミルプトレッシンとなる。 γ -グルタミルプトレッシンは、 γ -グルタミルプトレッシン酸化酵素(OrdL)によって酸化的に脱アミノ化され、 γ -グルタミル- γ -アミノブチルアルデヒドとアンモニアに変化する。 γ -グルタミル- γ -アミノブチルアルデヒドは γ -グルタミル γ -アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(AldH)によって γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸に酸化され、次いで、 γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸加水分解酵素(YcjL)によってその γ -グルタミル結合が加水分解されて γ -アミノ酪酸とグルタミン酸となる。生じた γ -アミノ酪酸は、 γ -アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼによって、そのアミノ基が α -ケトグルタル酸に転移され、コハク酸セミアルデヒドとなり、すでに報告されているコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(GabD)によってコハク酸に酸化され、TCA回路に入ってC源として利用される経路が機能していることが明らかになった。すなわち、Ycj代謝系によってプトレッシンの炭素原子はコハク酸セミアルデヒドに変換され、二つのアミノ基のうちの一つはアンモニアになり、もう一つはグルタミン酸のアミノ基になる。つまりYcj代謝系は、菌体がプトレッシンをC源、N源両方に用いる代謝系である。

野生型の大腸菌はプトレッシンを単一N源として生育できるが、*ycj*遺伝子群の一部を破壊したいくつかの株は、生育できなくなった。このことは、大腸菌にとってYcj代謝系がプトレッシンを栄養源とする上で大変重要な代謝系であり、プトレッシンをC源、N源両方に用いる代謝系として機能していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

γ -グルタミル化合物は、生体内で還元剤として働き、毒物抱合作用をもつグルタチオンなど生体内に広く分布する化合物である。本論文の著者は大腸菌においてグルタチオン代謝に関わる鍵酵素である γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) について研究を行う過程でこれまでに報告のなかった全く新しい γ -グルタミル結合加水分解酵素 (YcjL) を発見した。YcjLの生理的意義は当初は不明であったが、その遺伝子 *ycjL* の周辺に存在する *ycjK* にコードされるタンパク質はグルタミンシンセターゼと相同性を持っており、グルタミンが一種の γ -グルタミル化合物であることから、YcjKはYcjLと協調して機能していると考えた。このYcjKには *Pseudomonas* sp. においてイソプロピルアミン (IPA) 代謝系に関わる IpuC というホモログが存在していた。IpuCが関与する代謝系は、IPAを γ -グルタミル中間体を経て代謝する系である。そこで本論文の著者は、この代謝系を参考にして、*ycjL* 周辺に存在する7つの遺伝子 (*ycj* 遺伝子群) によってコードされる酵素群がIPA以外のなんらかのアミンを代謝していると考え、*ycj* 遺伝子群の複数の遺伝子を破壊した株を作製し、代謝中間体の一つを蓄積・同定することに成功した。すなわち、精製した代謝中間体をNMR, MS, MS/MSで分析した結果、この物質は γ -グルタミルプトレッシンであり、*ycj* 遺伝子群によってコードされるタンパク質群が代謝するアミンはプトレッシンであることを見出した。その後の研究により、*ycj* 遺伝子群はプトレッシンを γ -グルタミル中間体を経て、コハク酸の前駆体であるコハク酸セミアルデヒドにまで分解する系であることを明らかにした。

プトレッシンは、スベルミジン、スベルミンとともにポリアミンと呼ばれる化合物の一種である。ポリアミンはその正電荷によって核酸をはじめとした酸性成分と結合し、DNAの安定化、mRNAの翻訳促進など多様な生理的役割を担っている。プトレッシンは他のポリアミンの生合成において出発物質となる重要なポリアミンであり、大腸菌内では数十mMという非常に高い濃度で存在する。ポリアミンの代謝は古くから研究されており、プトレッシン分解系も古くから知られてきた。しかし古くから知られてきたプトレッシン分解系は、代謝中間体である γ -アミノブチルアルデヒドが非酵素的に閉環反応を起こし、D¹-ピロリンになることから、生理的に不利な代謝系である。本研究によって見出された代謝系では、この閉環反応の原因となるアミノ基が γ -グルタミル化によって保護された中間体 (γ -グルタミル- γ -アミノブチルアルデヒド) を経由するため、より生理的に有利な代謝系である。以上のようにプトレッシンの代謝において新しい代謝系が見出された意義は大きい。

本研究は、機能未知の遺伝子を既存の研究結果と、ゲノムプロジェクトにより蓄積されつつあるタンパク質の機能予測とを巧みに組み合わせ、生化学的、遺伝学的手法により、全く新しい代謝系を発見した点で非常に意義深い研究である。また、この新規代謝系の発見は、全生物に共通して存在し、いくつかの重要な働きをしているポリアミンの代謝研究に非常に大きなインパクトを与えた。

よって本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成18年1月25日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。