

氏名	林 将也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第5529号
学位授与の日付	平成29年 3月24日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	放線菌由来 L-メチオニン脱炭酸酵素の機能解析と臨床診断への活用
論文審査委員	教授 村田芳行 教授 稲垣賢二 教授 上村一雄 教授 田村 隆

### 学位論文内容の要旨

アミノ酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1) は微生物・動物・植物に幅広く分布しており, L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC), L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC), L-バリン脱炭酸酵素 (ValDC) などが知られる。その多くが高い基質特異性を示すため, 各種アミノ酸の特異的な定量に用いられている。

L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) (EC 4. 1. 1. 57) は, L-メチオニンの脱炭酸を触媒して, 3-メチルチオ MetDC 生産生物 (放線菌・シダ植物・海産渦鞭毛藻) において放線菌由来 MetDC は, L-メチオニンへの基質特異性が比較的高く, 腫瘍細胞に生育抑制作用を示したため, L-メチオニン定量法および抗腫瘍酵素への利用が期待できる。しかし, 酵素発現量が少なく, 酵素精製が難しいという問題点があり, 均一な精製酵素を十分量得ることができなかつた。純粋な酵素を用いた機能解析と臨床診断への活用を目的として, 本研究では, 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC を研究対象に, 純粋な酵素を用いた機能解析と医療・臨床診断への活用を目的として, 1. 遺伝子クローニング, 2. 組換え酵素の生産と均一精製, 3. 機能解析と抗腫瘍性の検討, 4. L-メチオニン酵素的定量法の開発を行った。

#### 1. L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニングおよび配列解析

水銀を用いた危険な従来の酵素活性測定法に代えて, アミノオキシダーゼと 4-アミノアンチピリン法を用いた安全で簡便な併用法を開発した。野生型酵素の N 末端配列と *Streptomyces* sp. 590 のゲノム配列から, MetDC の塩基配列とアミノ酸配列を決定・クローニングに成功した。MetDC は, HisDC, GluDC, ValDC と相同性が高く, それらに高度に保存されている 10 残基を同定した。

#### 2. L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系構築による組換え酵素の生産と均一精製

MetDC 遺伝子を用いて組換え酵素の生産および均一精製を行った。これにより, 従来の 1/110 量の培養液から等量の酵素を取得し, 酵素回収量を 5.5 倍に増加させた。野生型酵素と比べて, 精製用タグを融合した組換え MetDC は容易に均一精製された。

#### 3. L-メチオニン脱炭酸酵素の機能解析および抗腫瘍性の検討

ゲルろ過と SDS-PAGE により, 分子質量が約 110,000 Da のホモダイマーであることを確認した。基質特異性試験の結果, 生体を構成する標準アミノ酸では L-メチオニンに高い活性を示し, その他には活性をほとんど示さなかつた。ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) の有無による酵素活性の消長がみられ, MetDC が典型的な PLP 酵素であることを確認した。MetDC の生育抑制作用が, 正常細胞よりも腫瘍細胞に優先的に作用することが示された。

#### 4. L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた L-メチオニンの酵素的定量法の開発

血中 L-メチオニン量の増加は若年性血栓症や中枢神経系症と関連するといわれる。HPLC 法に代わる, 多検体から迅速, 簡便で正確に L-メチオニンを定量する方法が望まれる。既知の L-メチオニン酵素的定量法と比べ, 短時間かつ広範囲の基質濃度で測定可能であった。またほかのアミノ酸の影響を受けにくいこともわかつた。MetDC は低濃度帯では 1-500  $\mu\text{M}$ , 高濃度帯では 0.25-7.5 mM における L-メチオニンの定量が可能であった。さらに, 血しょう中濃度 (13.5-36.8  $\mu\text{M}$ ) に相当する 1-50  $\mu\text{M}$  の L-メチオニンを 10 分間という短時間で正確に定量することに成功した。

## 論文審査結果の要旨

L-メチオニンとはヒトにとって必須アミノ酸であり生命維持に欠かせない。その一方で、血中 L-メチオニン濃度の上昇は若年性血栓症や中枢神経系症に関連することが知られている。L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) はL-メチオニンを脱炭酸し、3-メチルチオプロピルアミンとCO<sub>2</sub>を生じる反応を触媒する。既知のL-メチオニン分解酵素はL-メチオニン以外の生体構成アミノ酸にも高い活性を示すため、混合物中のL-メチオニンの酵素的定量には不向きである。放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来MetDCは、シダ植物 *Dryopteris filix-mas* および海産渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* 由来のMetDCと比較してL-メチオニンに高い基質特異性を示すとともに、ヒト腫瘍細胞に対して生育抑制作用を示した。そこで申請者は、MetDCの構造と機能を遺伝子レベル、分子レベルで解析し、L-メチオニンの酵素定量や抗腫瘍性酵素への活用を本研究の目的として、放線菌由来MetDCの 1) 遺伝子クローニング、2) 組換え酵素の生産と均一精製、3) 分子機能解析と抗腫瘍性の検討、4) L-メチオニン酵素的定量法の開発を行った。

申請者は、世界ではじめてMetDCの酵素遺伝子のクローニングと解析、組換え酵素の生産に成功した。これにより、従来は困難であった酵素の大量取得と均一精製を達成し、均一精製酵素を用いて本酵素の詳細な分子機能を明らかにした。また、本酵素のヒト細胞への生育抑制作用が、正常細胞よりも腫瘍細胞に強く作用することを示した。さらに申請者は、本酵素を用いて L-メチオニンを幅広い濃度範囲で、迅速、簡便かつ正確に定量する方法を開発した。

本研究は、放線菌からMetDC酵素遺伝子の取得により、遺伝子レベル、分子レベルでの研究をはじめて行ったものである。また、MetDCの詳細な機能をはじめて均一精製酵素を用いて明らかにしたことに意義がある。これにより、微生物由来のL-アミノ酸脱炭酸酵素の研究に新たな知見を提供すると同時に、本酵素を抗腫瘍性酵素やL-メチオニン定量用酵素として実用化するための基盤の構築に大きく貢献するものであり、申請者が博士の学位（農学）に値するものであると判断した。