

# 論文内容の要旨

申請者氏名 赤澤真一

本論文は、糖尿病臨床診断の指標として用いられ、また、細胞の老化との関係が示唆されている糖化タンパク質のモデル化合物であるフルクトシルアミノ酸を酸化する酵素として微生物に新たに見い出されたフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD) についての分子生物学的、生化学的解析により、真菌におけるその存在意義の一端を明らかにしたものである。

著者は先ず FAOD 遺伝子と相同性の高い遺伝子をデータベースを対象に探索し、見出した *Schizosaccharomyces pombe* の *FAP1* 及び *FAP2* 並びに *Aspergillus oryzae* の *FAO1-FAO11* についてそれらの機能を検討した。その結果、*FAP1* 及び *FAO1* はピペコリン酸オキシダーゼ、*FAP2* はサッカロピンオキシダーゼ、*FAO2* 及び *FAO5* はサルコシンオキシダーゼをコードしておりいずれも FAOD 活性は持たないこと、一方、*FAO9* が FAOD 活性を持つタンパク質をコードしていることを明らかにした。また、これら 13 種の FAOD ホモログを 3 種の FAD 共有結合型アミノオキシダーゼとして分類するとともに *FAP2* のリジン代謝における役割について考察した。

また、*A. oryzae* に見い出した 2 つの FAOD アイソザイム (FAOD-Ao1, FAOD-Ao2) についてそれらの酵素科学的諸性質を検討し、両アイソザイムは基質特異性が異なり FAOD-Ao1 はフルクトシルリジンに作用し FAOD-Ao2 はフルクトシルリジン及びフルクトシルバリンに作用することを認めた。また、これら 2 種のアイソザイムをコードしている遺伝子が *FAO4* 及び *FAO9* であることを明らかにした。

これらの結果に基づいて、*A. oryzae* における FAOD の生理学的意義を解明するために、*FAO9* 破壊株の作製及び両アイソザイムの発現解析を行った。*FAO9* 破壊株はフルクトシルバリンを単一炭素源及び窒素源とする最少培地において生育できなかった。さらに、アンモニウム塩はアンモニアリプレッションにより硝酸レダクターゼ遺伝子の発現を抑制することが知られているが、FAOD の発現は抑制を受けずフルクトシルバリンが硝酸レダクターゼ遺伝子の発現を抑制することを見い出した。また、フルクトシルアミノ酸は *FAO9* 発現を顕著に誘導するが、*FAO4* 発現はあまり誘導しないことを認めた。

以上のことから、*FAO9* はフルクトシルバリンのようなフルクトシルアミノ酸の分解酸化に密接に関与していることが明らかとなった。また、*FAO4* 及び *FAO9* にペルオキシソーム移行シグナル配列である PTS1 の存在を認めるとともに、それらの配列に差異があり *FAO4* の発現誘導には隔壁修復に関与する Woronin body 生成と関連することを示唆した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 赤 澤 真 一

有用酵素を微生物に探索して得られた新規酵素は、対象とした基質が一般的でない場合その酵素の細胞における機能が明らかでないことがしばしばある。その生理学的意義を明らかにすることは、酵素生産の効率化に貢献するとともに基礎科学への寄与も大きい。

本論文は、糖尿病臨床診断の指標である糖化タンパク質の迅速定量法の開発を目的とした研究の結果得られたフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD) の真菌における存在意義を明らかにすることを目的として行った研究成果をとりまとめたものである。

著者は先ず FAOD 遺伝子と相同性の高い遺伝子をデータベース上で広範に検索し、*Schizosaccharomyces pombe* の *FAP1* 及び *FAP2* 並びに *Aspergillus oryzae* の *FAO1-11* を見い出した。それぞれの遺伝子について機能解析を行い、FAOD 活性、ピペコリン酸オキシダーゼ活性、サルコシンオキシダーゼ活性及びサッカロピンオキシダーゼ活性をそれぞれ持つタンパク質をコードしているものがあることを明らかにしている。また、これらの酵素の基質特異性から FAOD に相同性を示す酵素の一群は少なくとも3つの共有結合型 FAD を持つアミノオキシダーゼとして分類できることを提案している。次に、*A. oryzae* の細胞内に存在する FAOD を分離、精製し、2つの FAOD アイソザイム (FAOD-Ao1, FAOD-Ao2) について酵素科学的に検討を加えることによって、基質特異性等異なる性質を持つことを明らかにしている。さらに、これらのアイソザイムがそれぞれ *FAO4* 及び *FAO9* によってコードされていることも明らかにしている。

これらの知見に基づいて、FAOD の生理学的意義を明らかにする研究を進めた。*FAO9* 破壊株を作製することに成功し、その生育における表現型について検討を行い、本破壊株がフルクトシルバリンを単一炭素源及び窒素源とする培地で生育できないことを見出すことによって、FAOD がフルクトシルアミノ酸の資化に必須の酵素であることをすなわち FAOD が真菌にとって存在意義のある酵素であることを提示している。さらに、*A. oryzae* においてフルクトシルアミノ酸もアンモニアレプレッションと同様の現象を引き起こしたことをその関連遺伝子と *FAO4* 及び *FAO9* の発現解析から追及することによって、この成果を深めている。

以上のように、本論文は新規な有用酵素 FAOD の機能解析によりその生理的意義の一端を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。