

氏名(本籍)	なかのよしひさ 中野 長 久
学位の種類	農学博士
学位記番号	農第 135号
学位授与年月日	昭和50年 9月11日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 β -アラニンに関する研究 - その特異的
定量法の確立と微生物における代謝 -

論文審査委員 (主査)

教授 志村憲助 教授 高橋 甫

教授 松田和雄

論文内容要旨

序 論

カルボキシル基とアミノ基がメチレン基をはさんでもっとも遠く位置しているアミノ酸を ω -アミノ酸と総称している。生物界に広く分布する β -アラニンは代表的な ω -アミノ酸であり、パントテン酸の構成成分としての重要性はもとより、動物の筋肉組織に塩基性アミノ酸とジペプチドを形成して存在し、末梢神経刺激伝達物質としての作用が示唆されている。また昆虫類においては β -アラニルチロシンとして存在し、昆虫が大量に必要とするチロシンの溶解性を高める役割を担い、高等植物では完熟ホルモンであるエチレンの前駆物質として知られ、代謝生理上非常に重要なアミノ酸である。しかし、それにもかかわらず、 β -アラニンに関し詳細な研究はまったく行なわれていないのが現状であった。これは ω -アミノ酸に特異的な定量法が開発されていないことも一つの原因である。そこで本研究では、まず β -アラニンの定量法の検討から着手した。すなわち、第 I 編では ω -アミノ酸一般の特異的定量法を確立し、本方法が広い応用範囲を持ち、 ω -アミノ酸の生物界での分布の検討に止まらず、酵素化学および比較生化学的手法として用い得ることを明らかにした。ついで第 II 編では、微生物における β -アラニンの生成と分解が現在不明なことから、本定量法を応用して β -アラニンの代謝に検討を加えた。さらに関連する酵素の精製を行ない、諸性質を明らかにすることにより β -アラニンの代謝経路について総合的な研究を行なった。

I. β -アラニンの定量法の確立

1. β -アラニンの比色法

古くから遊離アンモニアが次亜塩素酸イオン存在下でフェノールと反応してインドフェノールを生成する Berthelot 反応が知られている (Fig. -1)。

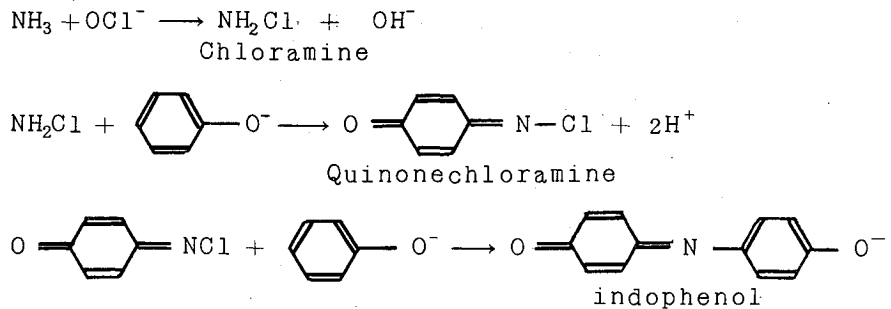


Figure 1. Berthelot's reaction

この indophenol は 630 nm に吸収極大を持つ青色を呈し、尿や血中のアンモニアの定量に用いられているが、アミノ酸はまったく陰性であると考えられていた。しかし高濃度の試薬を使用し、反応温度を高くすることにより、 β -アラニン等 ω -アミノ酸が非常によく反応し、Fig.-2 に示すように同様の発色を示すことが明らかになった。そこでフェノールと次亜塩素酸塩の有効塩素の至適濃度の決定を行ない、アンモニアの定量に用いる 0.5 - 1 % 濃度より高い 6 % フェノールと 7.5 % の有効塩素が最適であることを知った。また本反応は 0.2 N ホウ酸イオンの添加により 25 % の発色促進が認められた。

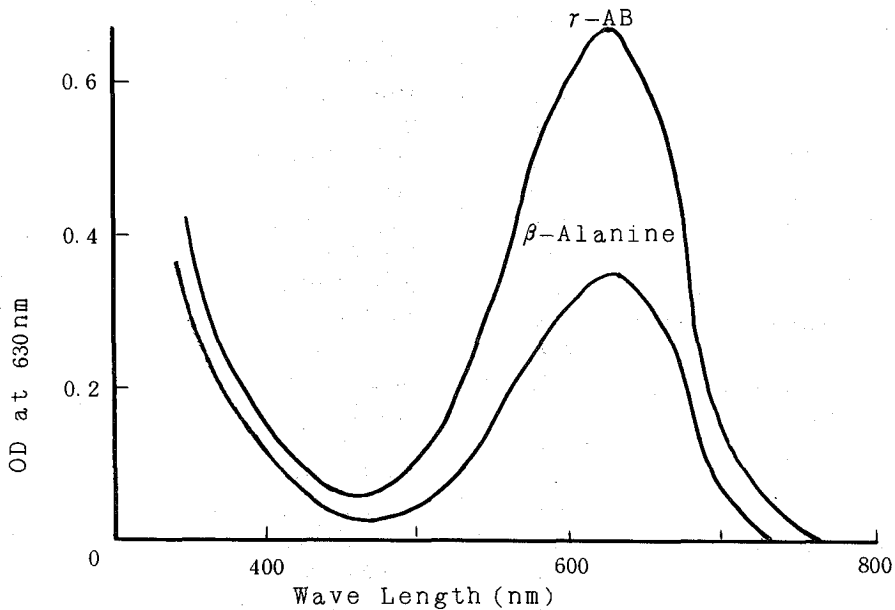


Figure 2. Spectra of reaction mixture with β -alanine and γ -aminobutyrate. Reaction mixture contained 0.5 μ mole of β -alanine and γ -aminobutyrate (0.4 ml), 6% phenol, 0.25N NaOH (0.2ml), and 7.5% NaClO (0.4ml), and were allowed to react at 100 C for 10min.

反応温度と反応時間の関係を Fig.-3 に示したが、室温より 100 °C、10 分間の反応が約 2 倍高い吸光度を与えた。この 10 分間の加熱により生成した色素は約 5 時間安定であり、またフェノール試薬は 1 カ月、次亜塩素酸塩溶液は 10 日間安定であった。本方法により β -アラニンは 1 - 100 μ g まで Beer の法則が成立し、定量が可能であることが判明した。また α -アミノ酸で ω -位にアミノ基を持つもの以外はまったく発色せず、第 2 級および第 3 級アミンも反応しなかった (Table-1)。

そこでこの比色定量法を用いて β -アラニンおよび γ -アミノ酪酸を生成する各種酵素活性の測定を試みた結果、再現性良く、また他の方法による測定値と非常によく一致した。Fig.-4 は β -ア

ラニンアミノ基転移酵素の逆反応により生成する β -アラニン定量して活性を測定した結果である。これらの事実から本方法を β -アラニンをはじめ ω -アミノ酸の代謝研究に利用しうることが明らかになった。

Table 1 Sensitivities of amino acids, amines and ammonium salts.

Molecular extinction coefficients (ϵ_{630}) were calculated from the optical densities with sample solutions (0.2 ml; total volume 1.8 ml) containing 1 to 200 μ g of the test compounds. The indicated values are mostly the means of values at 2 to 3 sample concentrations. A negative value was a value smaller than about 0.1.

Compound	$\epsilon_{630} (\times 10^{-3})$	Compound	$\epsilon_{630} (\times 10^{-3})$
<i>ω-Amino acids</i>		<i>Amines</i>	
β -Alanine	3.50	Methylamine ¹⁾	3.08
γ -Aminobutyric acid	5.38	Dimethylamine ¹⁾	neg.
δ -Aminovaleric acid	4.75	Trimethylamine ¹⁾	neg.
ϵ -Aminocaproic acid	5.62	Ethylamine	2.78
β -Aminoisobutyric acid	2.26	Ethylenediamine	3.61
α, β -Diaminopropionic acid	neg.	Ethanolamine	3.71
α, γ -Diaminobutyric acid	2.15	Palmitylamine ¹⁾	0.17
α -Hydroxy- γ -aminobutyric acid	1.53	Tyramine ¹⁾	2.35
Taurine	4.97	Tryptamine ¹⁾	0.59
2-Aminoethylphosphonic acid	4.62	Histamine ¹⁾	4.38
<i>α-Amino acids</i>		Cadaverine ¹⁾	7.72
Glycine	0.45	Aniline	4.98
α -Alanine	neg.	<i>o</i> -Phenylenediamine ²⁾	neg.
Leucine	neg.	<i>o</i> -Aminobenzoic acid ²⁾	1.21
α -Aminobutyric acid	neg.	<i>p</i> -Methylaminophenol	35.5
Phenylalanine	neg.	β -Naphthylamine	0.19
Tyrosine	neg.	<i>Ammonium salts</i>	
Aspartic acid	neg.	Ammonium chloride	5.91
Asparagine	neg.	Ammonium nitrate	5.65
Glutamic acid	neg.	Ammonium sulfate	11.69
Glutamine	neg.	Ammonium acetate	5.18
Serine	0.14	Ammonium oxalate	11.69
Cysteine	neg.	<i>Miscellaneous</i>	
Methionine	neg.	Hydroxylamine	1.97
Tryptophan	neg.	Urea	neg.
Histidine ¹⁾	0.36	Thiourea	0.17
Ornithine ¹⁾	2.83	Phenylhydrazine ^{1), 2)}	0.47
Lysine ¹⁾	3.16	Guanidine ¹⁾	neg.
Citrulline	neg.	Glucosamine ¹⁾	neg.
Arginine	neg.	Deoxystreptamine ¹⁾	neg.
α, ϵ -Diaminopimelic acid	0.91	Streptidine ^{2), 3)}	0.48
		Adenine	neg.
		Cytosine	neg.

1) Hydrochloride was used.

2) Brownish color developed.

3) Sulfate was used.

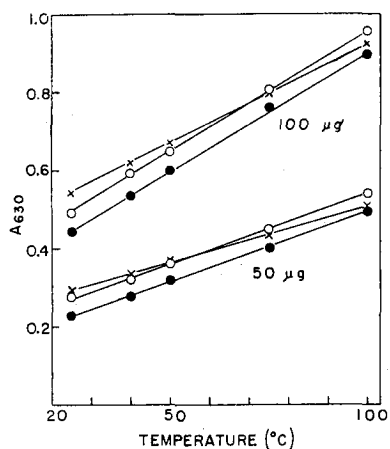


Figure 3. Effect of reaction temperature and time on color intensity.

Reaction mixtures (1.7 ml) containing 50 or 100 µg β-alanine (0.3 ml), the phenol reagent (1.0 ml) and the NaClO reagent (0.4 ml) were heated at different temperatures for different periods. Absorbances were read after adding 60% ethanol (1.0 ml).

—●— Heated for 5 min,
 —○— Heated for 10 min,
 —×— Heated for 15 min.

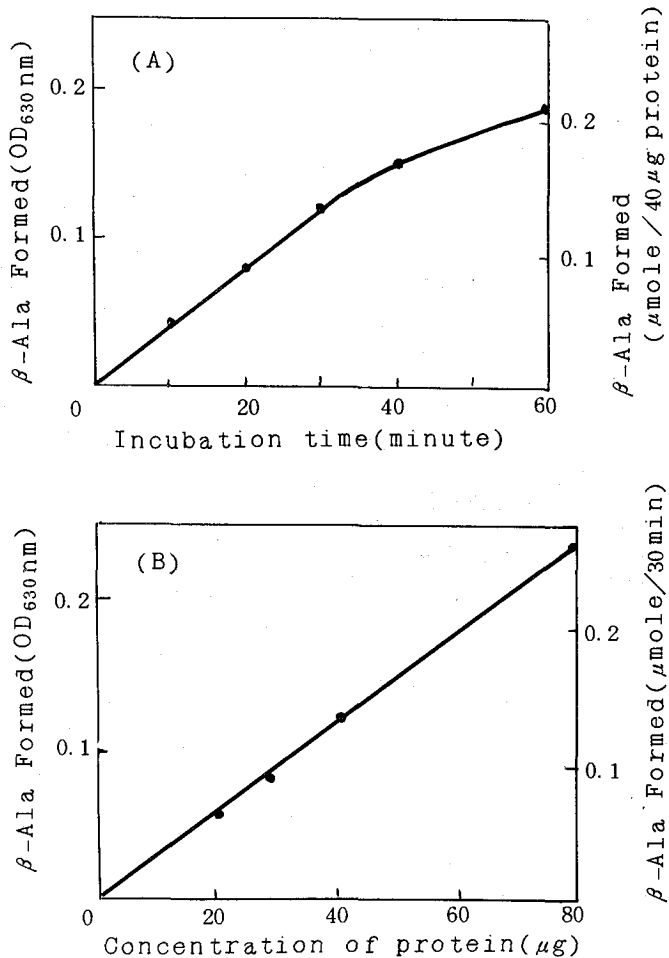
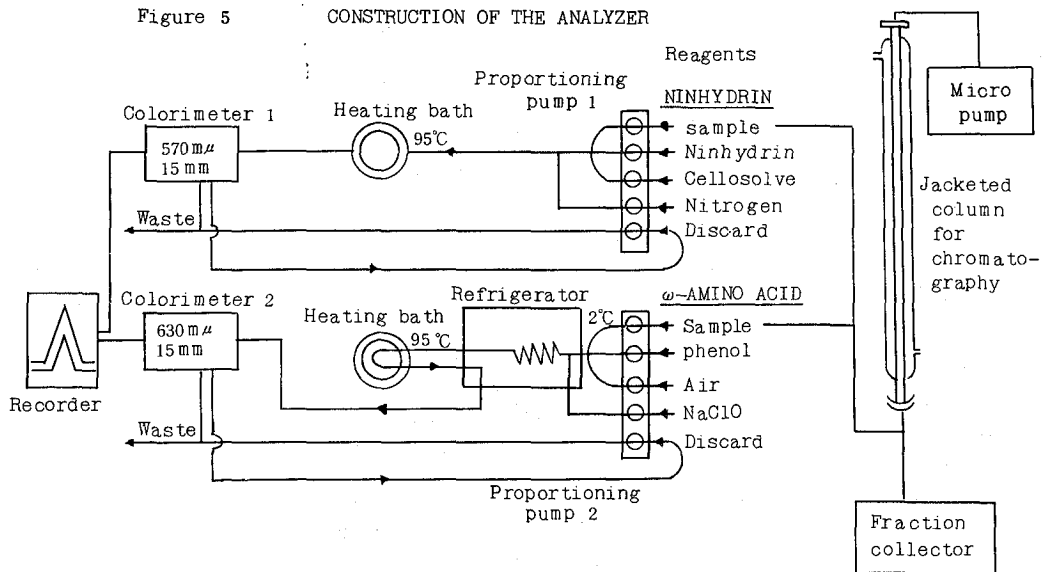


Figure 4. β-Alanine formation by β-Alanine: Pyruvate Transaminase, (A) time course, (B) effect of enzyme concentration

2 ω-アミノ酸の自動分析法の確立

β-アラニン等のω-アミノ酸を非常に高感度で定量しうることから、この比色法を利用してω-アミノ酸の自動分析を試みた。アミノ酸自動分析機を Fig. -5 のように改良してニンヒドリン発色と同時にω-アミノ酸の自動比色定量を可能にした。試薬は 0.2 M ホウ酸カリウム溶液に 10% のフェノールを溶解してフェノール試薬とし、次亜塩素酸塩の有効塩素量は 5% が最適であった。この条件により標準アミノ酸に 5 種類のω-アミノ酸を添加して分離を行ない、自動記録した。長カラム (0.9 × 58 cm) と短カラム (0.6 × 10 cm) を用いた分析結果を Fig. -6 および 7 に示した。両者の条件で ε-アミノカプロン酸以外は良く分離し、ニンヒドリン発色の 70% の発色強度が得られ、最低 5 μg で定量が可能であった。このことからω-アミノ酸の分離同定、および定量の自動化が可能となり、アスパラギン酸 α-脱炭酸酵素により生成する β-アラニンの同定を行ない良好な結果が得られた。



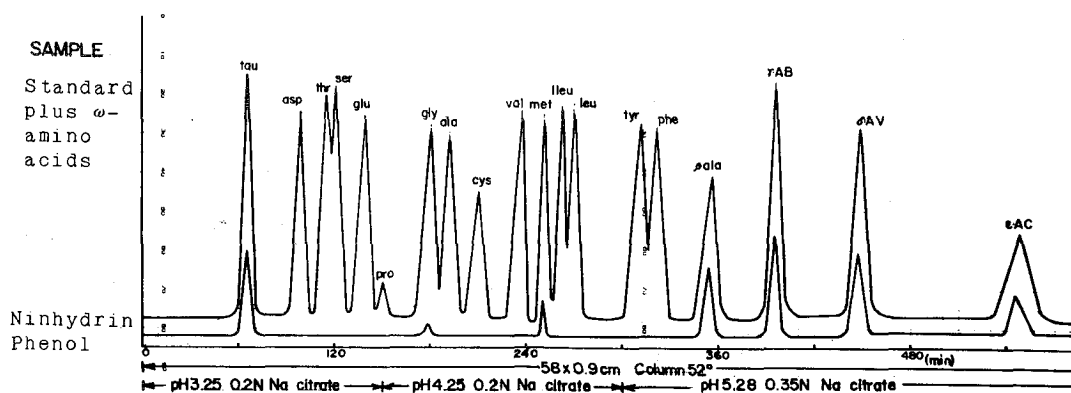


Figure 6. Chromatographic separation of neutral and acidic amino acids on a Aminex column(9×580mm)

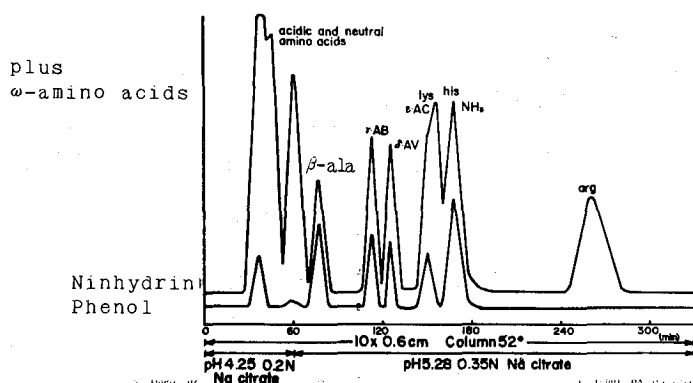


Figure 7. Chromatographic separation of basic amino acids on a Aminex column(6×100mm)

3. 薄層クロマトグラフィーによる ω-アミノ酸の検出

ω-アミノ酸の検出と同定をさらに簡便に行なう手段としてこの発色反応を薄層クロマトグラフィーに適用することを試みた。薄層はアルミナとろ紙粉末を 1:2 の割合で作製すると最適であり、発色は 5% フェノール水溶液を噴霧後、ほぼ当量の有効塩素 5% の次亜塩素酸塩溶液 (0.5% NaOH 含有) を噴霧、75℃ で 5 分間加熱して行なった。この条件により ω-アミノ酸は 1-2 μg で明瞭なスポットを与え、グリシンおよびリジン以外の α-アミノ酸はまったく発色しなかった。いくつかの ω-アミノ酸の発色例を Fig. -8 に示した。この青色の色素は室温で 24 時間放置しても約 10% 低下したのみで十分安定であった。この条件により各種 ω-アミノ酸やアミン等の発色感度を求めた結果を Table-2 に示した。またグルタミン酸脱炭酸酵素の反応生成物の同定を本方法により行ない、明らかに γ-アミノ酪酸が検出され、反応生成物の同定等に応用できることが立証された。

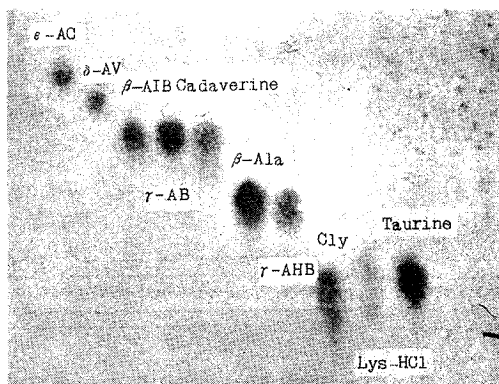


Figure 8.

A typical thin-layer chromatogram of ω -amino acids as revealed by the phenol-NaClO reagent
 Developing solvent: n-butanol-acetic acid-water (4:1:2)
 (ϵ -AC= ϵ -aminocaproic acid; δ -AV= δ -aminovaleric acid; β -AIB= β -aminoisobutyric acid; γ -AB= γ -amino butyric acid; γ -AHB= γ -amino- α -hydroxybutyric acid]

Table 2. Sensitivities of amino acids, amines and ammonium salts to phenol-NaClO reagent in thin-layer chromatography

Compounds	Sensitivities at (μ g)				Compounds	Sensitivities at (μ g)			
	0.5	1.0	5.0	100		0.5	1.0	5.0	100
<i>ω-Amino Acids</i>					Tryptophan ^{a)}	-	-	-	+
β -Alanine	+	+	+	+	Histidine HCl ^{a)}	-	-	+	+
γ -Aminobutyric	+	+	+	+	Ornithine HCl	-	+	+	+
δ -Aminovaleric	+	+	+	+	Lysine HCl	-	+	+	+
ϵ -Aminocaproic	+	+	+	+	Citrulline	-	-	-	-
β -Aminoisobutyric	-	+	+	+	Arginine ^{a)}	-	+	+	+
α , ϵ -Diaminopimelic	-	-	-	+	<i>Amines</i>				
α , β -Diaminopropionic	-	-	-	+	Methylamine HCl	-	-	+	+
α , γ -Diaminobutyric	-	+	+	+	Dimethylamine HCl	-	-	-	-
α -Hydroxy- γ -amino- butyric	-	+	+	+	Trimethylamine HCl	-	-	-	-
Taurine	+	+	+	+	Ethylamine HCl	-	-	+	+
Citiatine	+	+	+	+	Ethylenediamine 2HCl	-	-	-	+
<i>α-Amino Acids</i>					Tyramine HCl ^{a)}	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	Tryptamine HCl ^{a)}	-	+	+	+
α -Alanine	-	-	-	+	Histamine HCl	-	+	+	+
Leucine	-	-	-	-	Cadaverine 2HCl	+	+	+	+
α -Aminobutyric ^{a)}	-	-	-	+	Monobenzoyl- cadaverine HCl	-	-	+	+
Phenylalanine ^{a)}	-	-	-	+	<i>Ammonium Salts</i>				
Tyrosine ^{a)}	-	-	-	+	Ammonium sulfate	-	-	+	+
Aspartic acid ^{a)}	-	-	-	+	Ammonium oxalate	-	-	+	+
Asparagine	-	-	-	+	<i>Miscellaneous</i>				
Glutamic acid	-	-	-	-	Urea	-	-	-	+
Glutamine	-	-	-	+	Adenine ^{a)}	-	-	+	+
Serine	-	-	-	+					
Cysteine	-	-	-	-					

a) Brownish color developed.

II. β -アラニンの代謝

1. 微生物による β -アラニンの代謝

微生物に限らず個々の生物に現在認められている β -アラニンの代謝経路をまとめて Fig.-9 に示した。 β -アラニンは生体内でウラシルの分解あるいはアスパラギン酸の α -脱炭酸により生成し、

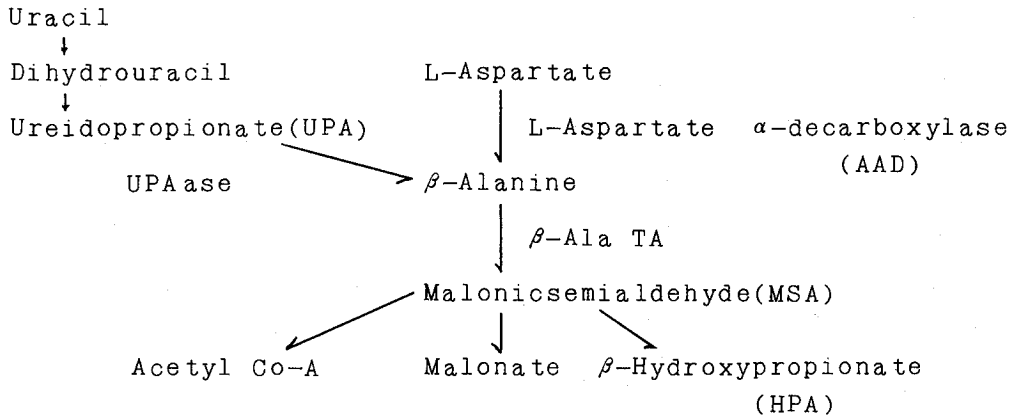


Figure 9. Metabolic pathway of β -alanine

一方分解系では β -アラニンアミノ基転移酵素 (β -Ala TA) によりマロン酸セミアルデヒド (MSA) を生成し、次に 2, 3 の経路を経て TCA 回路に導かれると考えられている。しかし β -アラニンを主体にした研究は少なく、関連する酵素の化学的性質はほとんど不明であり、同一の生物がこれらの経路を同時に持ち得るのかも不明である。そこで微生物を用い、休止細胞での β -アラニンの消長を追跡し、さらに関連する酵素を精製し、諸性質を明らかにして、代謝経路を総合的に考察した。

供試菌は β -アラニンの生成量が多く、良く発化する *E. coli* B と、土壌より分離同定した *Bacillus cereus* の 2 菌株を用いた。まず β -アラニンの生成系について検討した結果、両株共ウレイドプロピオナーゼ (UPAase) とアスパラギン酸 α -脱炭酸酵素 (AAD) を持ち、生育条件により両酵素の活性の出現に差が認められた (Table-3)。

このことは両経路が β -アラニンの供給を生育条件により分担し制御していることを示唆している。また β -Ala TA 活性も認められ、生成した β -アラニンはアミノ基転移を受けて代謝されると考えられる。一方 *B. cereus* を放射性 β -アラニンと反応させ、放射活性のアミノ酸および有機酸へのとりこみの分布を検討し、Table-4 の結果を得た。アミノ酸画分ではグリシンへのとり込みがもっとも大きく、次いでアスパラギン酸、セリン、アラニンの順序であった。またエタノールアミンへのとり込みが認められ、これは菌体抽出液と β -アラニンの反応により炭酸ガスの放出に伴いエタノ

Table 3. Change of aspartate α -decarboxylase, ureidopropionase and β -alanine transaminase activities on the various pH of culture medium in *B. cereus* K-47

pH	AAD (β -Ala. formed) (nmol/mg protein)	UPAase (NH ₃ formed)	β -Ala TA (MSA formed) (cpm/mg protein)
5	24.4	1.2	552
6	76.5	9.8	1256
7	31.2	31.5	1960
8	5.7	28.3	2284

AAD: L-Aspartate α -decarboxylase.

UPAase: Ureidopropionase.

β -Ala TA: β -Alanine transaminase.

MSA: Malonicsemialdehyde.

Table 4. Distribution of ¹⁴C among amino acids and organic acids of the acid extract of β -alanine-grown *B. cereus* K-47 incubated with β -Alanine-2-¹⁴C. Incubation mixture contained 5 μ ci β -alanine-¹⁴C, 50 μ moles K-phosphate buffer, and resting cells (15mg dry weight). Incubation was carried out at 30°C for 10minutes.

Amino acid	cpm($\times 10^4$)				
Asp	19.78	Ala	10.35	Ile	1.72
Ser	11.17	Val	1.41	EtOH(NH ₂)	1.34
Thr	6.69	Met	0.96	β -Ala	14.60
Glu	8.36	Leu	1.72	Others	2.70
Gly	27.59				
Org. acid					
Formate	1.68	Succinate	18.25	HPO	15.18
Acetate	13.34	Pyruvate	1.57	Others	5.91
Malonate	5.23	α -KG	5.86		

ールアミンの生成が認められたことから、 β -アラニンの脱炭酸生成物と考えられる。この事実から、 β -アラニンがエタノールアミンを経てグリオキシル酸を生成し、アミノ基転移によりグリシンを生成する経路の存在を推定した。さらにこの経路の存在を生成物の同定、代謝関連化合物の資化性および酸素呼吸能の検討により確かめた。有機酸画分では β -ヒドロキシプロピオン酸 (HPO)、マロン酸および酢酸に放射活性が認められることから、アミノ基転移により生成した MSA がこれら 3 経路により同時に代謝されることを示し、コハク酸へのとり込みが高いことから、HPA あるいはマ

ロン酸からコハク酸合成が活発に行なわれていることが推定された。

2 β -アラニン生成系の酵素化学的検討

前記2菌株は UPAase と AAD の両者を持つことが明らかになった。特に AAD はこれまで検討された例はまったくない。そこでこれらの精製を行ない、UPAase は40倍に、AAD は電気泳動的に単一の蛋白質として得たので、これらの標品を用い、一般的性質を明らかにした (Table-5 および Table-6)。AAD はピリドキサルリン酸を補酵素とする B_6 酵素である。本酵素はパント

テン酸と拮抗して生育を抑制する D-セリン、イソセリン、システイン酸およびヒドロキシアスパラギン酸により、顕著に拮抗阻害を受けた。このことから生育阻害は AAD の阻害に起因することが明らかになった。一方 UPAase はチミンの分解生成物である β -ウレイドイソ酪酸にも作用して β -アミノイソ酪酸を生成する。後述する β -Ala TA によりこのアミノ酸は β -アラニンと同じ速度でアミノ基転移を受けるこ

Table 5. Enzymatic properties of L-aspartate α -decarboxylase in *E. coli* B

Optimum temperature	30°C
Temperature stability	30°C
Optimum pH	5-5.5
pH stability	5-6.8
Absorption spectrum	275, 330, 408nm
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	19.4
$A_{275/250}$	1.61
K_m for Aspartate	1.15mM
M.W. by gel filtration	120,000

Table 6. Enzymatic properties of UPAase in *B. cereus* K-47

Optimum temperature	40-50°C
Temperature stability	60°C
Optimum pH	7-7.3
K_m for UPA	0.23mM
Substrate specificity	UPA 100%
	UIB 36

UPA; Ureidopropionate
UIB; Ureidoisobutyrate

とからチミンは同一の酵素系で代謝されると思われる。またこれら β -アラニン生成酵素の至適 pH の相違および pH 安定域の差からも前記 β -アラニン供給を分担していることを推定した。

3. β -アラニン分解系の酵素化学的検討

B. cereus において β -アラニンはアミノ基転移を受けるだけでなく、脱炭酸によりエタノールアミンを生成することが明らかになった。そこでこの脱炭酸酵素と β -Ala TA を精製し、性質を明らかにすると同時に β -アラニンの分解経路についてさらに検討を加えた。脱炭酸反応は菌体抽出液では Fig. -10 に示すように pH 8-8.5 で NAD^+ を添加した場合に顕著に認められた。このことか

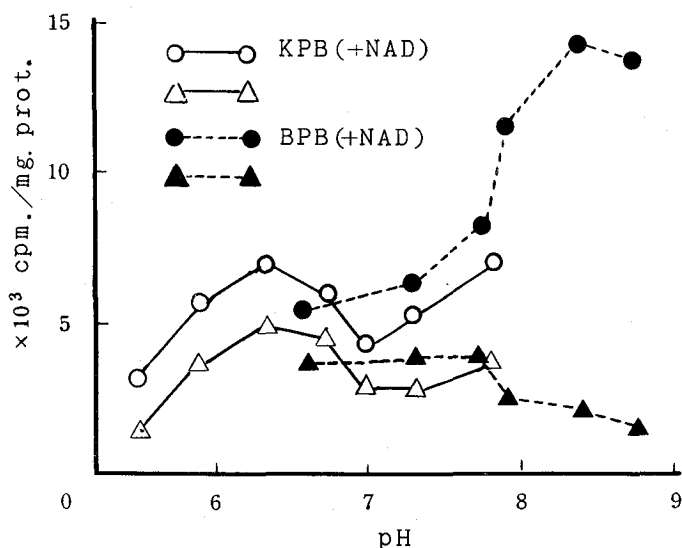
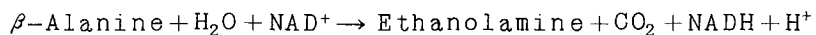


Figure 10. Optimum pH for β -alanine decarboxylase in *B. cereus*

ら反応には NAD^+ が必要であることが判明した。そこで精製を行ない、比活性約 50 倍の精製標品を得てゲル電気泳動を行ない、その活性を測定の結果一本の主バンドにのみ活性が認められ、このバンドには β -Ala TA の活性はみられなかった (Fig. -11)。このことから電気泳動的には 1 種類の酵素により触媒されることが明らかになったので本酵素の諸性質も検討し Table-7 にまとめた。また本反応はエタノールアミンから生成するグリオキシル酸により強く阻害された。このような反応を触媒する酵素についての報告はまったくないので微生物における分布を検討し、かなり広範囲に本反応系が存在することを認めた。なおこの酵素は水が関与する次式のような反応を触媒するものと結論した。



次に β -Ala TA を精製し酵素蛋白質としてはじめて単一の標品を得た。そこで酵素化学および蛋白質化学的性質の検討を行ない、結果を Table-8 に示した。本酵素は B_6 酵素であり、その基

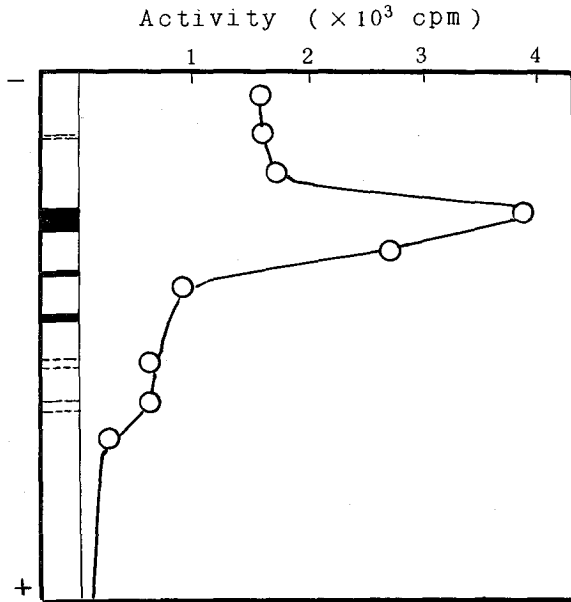


Figure-11. Enzyme activity of decarboxylation after the gel electrophoresis.

Table 7. Some properties of β -alanine decarboxylase in *B. cereus*

Optimum temperature	30°C
Optimum pH	8.0
Cofactor	NAD ⁺ specific
K _m for β -Alanine	0.58mM
for NAD ⁺	0.042mM
M.W. with gel filtration	340,000

質特異性を Table-9 および 10 に示した。アミノ基供与体は β -アミノイソ酪酸が β -アラニンとまったく同じ活性を示し、またアミンもかなり良い基質となることが判明した。アミノ基受容体はピルビン酸に特異性が高く、他にグリオキシル酸が約 50% の活性を示した。このことはエタノールアミンから生成するグリオキシル酸は本酵素により代謝を受けグリシンの生成に関与していることが明らかになった。

β -AlaTA により生成した MSA は酸化または還元を受けてアセチル CoA, マロン酸あるいは HPA を生成する。*B. cereus* はこれらすべての経路を持つことが明らかになった。そこで各酵素の部分精製を行ない、諸性質を検討し、結果を Table-11 に示した。これらの酵素活性のなかで HPA の生成反応がもっとも強く、次いでマロン酸、アセチル CoA の順序であった。この結果から

MSA は主に HPA を経てコハク酸を生成しエネルギー源として利用されると結論した。

以上の実験結果から *B.cereus* における *in vitro* 代謝に基いて β -アラニンの代謝経路を示すと Fig.-12 のようになる。

Table 8. Some properties of β -alanine transaminase in *B. cereus*

Optimum temperature	55 °C
Temperature stability	55 °C
Optimum pH	8.5-9.7
pH stability	5.0-9.7
Absorption spectrum	278, 325, 412nm
E ₁ ¹ %	20.18
A _{280/260}	1.92
Reaction mechanism	Ping-Pong
K _m for β -Alanine	1.14 mM
for Pyruvate	0.50
for Malonicsemialdehyde	1.88
for L-Alanine	2.78
S _{20,w} ⁰ value	8.84
M. W. by gel filtration	184,000
by calculation	171,000
Subunit	49,000
Diffusion constant	4.85 × 10 ⁻⁷ cm ² /sec.
I _p	4.75
N-terminal	valine
C-terminal	Alanine
Amino acid residue/Subunit	452

Table 9. Specificity of amino donors.

Substrate (10 μ moles)	Enzyme Activity (β -alanine formed) (μ mole/mg protein)	Relative rates (%)
β -Alanine	48.4	100
Taurine	3.2	7
2-Aminoethylphosphonate	0	0
4-Aminobutyrate	35.2	73
3-Aminoisobutyrate	48.7	101
4-Amino-3-hydroxybutyrate	8.9	18
5-Aminovalerate	15.4	32
6-Aminocaproate	26.7	55
5-Aminolevulinate	0	0
Ornithine	trace	
Lysine	3.5	7
1-Amino-2-propanol	1.4	3
Isopropylamine	0	0
1, 3-Propanediamine	2.8	6
3-Amino-1-propanol	7.4	15
Isopropanolamine	245.4	508
2-Amino-2-methyl-1-propanol	0.7	2
n-Propylamine	2.2	5
n-Butylamine	3.1	7
Isobutylamine	3.0	6
Monoethanolamine	2.1	4
Ethylenediamine	3.1	7
2-Mercaptoethylamine	11.3	23

Table 10. Specificity of amino acceptors

Substrate (10 μ moles)	Enzyme Act. (α -Amino acids formed) (μ moles/mg protein)	Relative Rates (%)
Glyoxylate	27.3	56
Pyruvate	48.8	100
Oxalacetate	27.0	55
2-Ketobutyrate	7.4	14
2-Ketoglutarate	0.9	2
2-Keto-n-valerate	1.8	4
2-Keto-iso-valerate	0.9	2

Table 11. Comparison of the properties of MSA-metabolizing enzymes.

Enzyme	K_m for Substrate	NAD ⁺ or NADH (mM)	CoA	Opt. pH	Opt. temp. (°C)	Specific activity (in crude ext.) (nmol/mg prot/ minute)
MSA						
MSA acetylating enzyme	0.02	0.032	0.006	7.8	35	80.4
MSA DH	0.18	0.031	—	8.5	35	183.6
3-HPA DH	1.45	0.006	—	8.8	30	362.8

DH: Dehydrogenase, 3-HPA : 3-Hydroxypropionate.

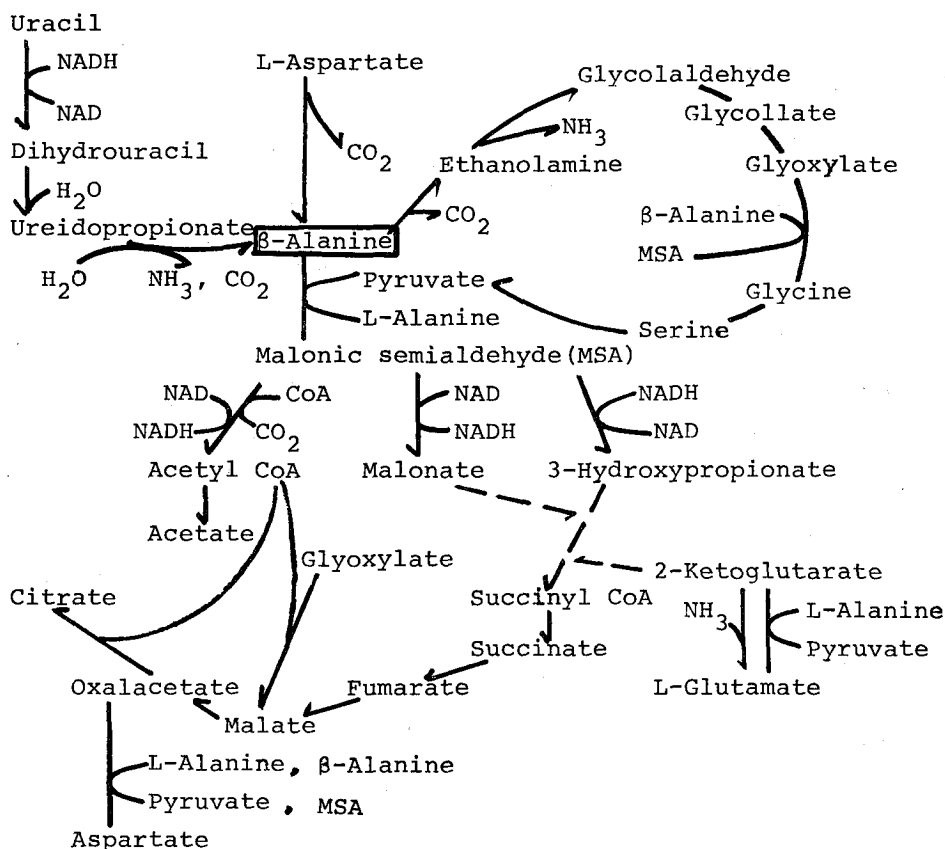


Figure 12. Metabolic Pathway of β -Alanine in *B. cereus*.

要

約

1. β -アラニンを代表とする ω -アミノ酸の新しい特異的定量法を確立した。反応は ω -位のアミノ基脱離により生成したアンモニアが Berthelot 反応により 630 nm に極大吸収を示すインドフェノールを生成することが考えられた。Borate の添加により本反応の発色は安定化した。
2. 本定量法は感度良く、安定性および再現性も高いことから、 ω -アミノ酸の分布の検討に止まらず、 ω -アミノ酸を生成する諸酵素の活性の測定に広く応用し得ることを明らかにした。
3. この定量法を用い、自動分析機および薄層クロマトグラフィーの使用により、 ω -アミノ酸の分離、同定および定量の自動化と簡易化を可能にした。
4. 微生物による β -アラニンの代謝経路について上記定量法を応用して検討を加え、 β -アラニンを脱炭酸する新しい経路が存在することを見出した。この反応は電気泳動的に単一の酵素により触媒され、 NAD^+ を補酵素とする酸化的脱炭酸によりエタノールアミンを生成することを明らかにした。
5. β -アラニン生成酵素であるアスパラギン酸 α -脱炭酸酵素をはじめて電気泳動的に単一な酵素蛋白質として精製し、従来まったく不明であった酵素化学的性質を明らかにした。さらに β -アラニン生成におけるウレイドプロピオナーゼとの役割の分担について考察を加えた。
6. β -アラニン分解系では、脱炭酸酵素以外に β -アラニンアミノ基転移酵素について精製を行ない、単一の酵素標品をはじめて得た。この標品について酵素化学的、蛋白化学的諸性質を明らかにした。
7. 以上の実験事実とアミノ基転移により生成するマロン酸セミアルデヒドの代謝経路の検討結果から、 β -アラニンの生成と分解経路を総合的に考察した。

審査結果の要旨

β -アラニンは、パントテン酸の構成成分として存在するほか、生体内では種々の生理活性物質の構成成分として重要である。しかし、 β -アラニンの生合成および分解に関しては断片的な知見が得られているのみで、多くの未解決の問題を残していた。本研究は、 β -アラニンの代謝経路について総合的な研究を行うことを目的として、先づ β -アラニンの定量法を確立し、ついで、多数の微生物の中より、 β -アラニンの代謝系の活性が高い菌株2種を選択し、酵素化学方法により代謝系の研究を行った。

β -アラニンの定量法には、Berthelot 反応の原理を応用し、6%フェノール、0.25N NaOH、7.5% NaClOと共に100°C、10分間加熱することにより、安定な発色条件を確立することができた。この条件下では α -アミノ酸は、 ω -一位にアミノ基をもつもの以外は全く発色しなかつた。さらにこの定量方法を利用して、 ω -アミノ酸の自動分析法を確立した。この方法は著者の独自の考案によるもので、広く利用されるものと考えられる。

ついで著者は、 β -アラニンの代謝活性の高い微生物として *E. coli* B および *Bacillus cereus* の2菌株を選択し、 β -アラニンの生成系について検討し、両株共ウレイドプロピオナーゼおよびアスパラギン酸 α -脱炭酸酵素の活性を認め、主要生合成系と推定した。また β -アラニントランスアミナーゼ系、 β -アラニン脱炭酸酵素系についても詳細に研究し、分解系の主要経路とした。これらの代謝系の関与する酵素をそれぞれ単離精製し、それらの性質を明らかにした。

以上、本研究は、 ω -アミノ酸の定量法、特に自動分析による定量法をはじめて確立し、この分野における研究に寄与すると共に、微生物における β -アラニンの代謝について系統的な研究を行い、その代謝系の全体像を明らかにすることができた。生化学領域の基礎として重要であるのみならず、応用分野にも役立つことが多く、農学博士の学位を授与するに十分な価値あるものと認める。