

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Isam Ali Mohamed Ahmed Ali
審査委員	主査 森 信寛 (印) 副査 一柳 剛 (印) 副査 澤 嘉弘 (印) 副査 松下 一信 (印) 副査 有馬 二朗 (印)
題目	STUDIES ON THE MICROBIAL DEGRADATION OF HOMOCHOLINE (微生物によるホモコリンの分解に関する研究)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>コリンは生体膜の脂質成分の一種であるホスファチジルコリンや神経伝達物質であるアセチルコリンとして存在する。ベタインは大腸菌や高等植物において浸透圧調整物質として働き耐塩性や様々なストレス耐性に関与している。さらに、カルニチンは脂質代謝において長鎖脂肪酸がミトコンドリア内膜を通過するための担体としての役割を担っている。このような物質はその化学構造が類似しており、第4級アンモニウム化合物と総称されている。第4級アンモニウム化合物の中でも分子内に偶数個のメチレン基を有しているコリン、カルニチン及び4-トリメチルアミノブタノールの分解経路や分解酵素はおおよそ解明されている。しかし、分子内に奇数個のメチレン基を持ったホモコリン(3-N-trimethylaminopropanol)の微生物分解に関する研究はほとんど行われていない。</p> <p>本研究では、まずホモコリン分解微生物の単離と同定を行った。ホモコリンを炭素源、窒素源として生育できる微生物を142菌株、土壌から分離し、生育が良好であった30菌株を選抜した。さらに、ホモコリン分解速度が速い菌株として4菌株を選抜した。形態学的観察、生化学的性質の検討及び分子生物学的分析により、これら4菌株は <i>Arthrobacter</i> 属、<i>Rhodococcus</i> 属、<i>Pseudomonas</i> 属に属する細菌であることが明らかとなった。今までに報告されている第4級アンモニウム化合物を分解できる菌のほとんどは <i>Arthrobacter</i> 属あるいは <i>Pseudomonas</i> 属の細菌であり、本研究でも同様の結果であった。一方、これまで第4級アンモニウム化合物を分解できる <i>Rhodococcus</i> 属細菌は報告されておらず、本研究での分離が初めての例である。</p> <p>次に、<i>Arthrobacter</i> sp. strain E5, <i>Rhodococcus</i> sp. strain A2, <i>Pseudomonas</i> sp. strain A9 によるホモコリン分解の代謝産物の同定を試みた。選抜した3菌株のホモコリン培養液や休止菌体反応液中の代謝産物をキャピラリー電気泳動、GC-MS, FAB-MS により検出・同定を行った。培</p>	

養基質であるホモコリンの減少に伴い、トリメチルアミノプロピオンアルデヒド、 $\beta$ -アラニンベタイン、トリメチルアミンと同定された代謝産物が増加した。このような結果から、これらの細菌のホモコリンの分解経路として、ホモコリン分子中のアルコール基がアルデヒド基、カルボキシル基へと酸化され、さらに、 $\beta$ -アラニンベタイン中の炭素-窒素間の結合が切断され、トリメチルアミンとアルキル鎖 (C3 部分) を生じるような経路が存在することを明らかにした。

さらに、ホモコリン分解経路に関与する酵素について検討した。ホモコリン分解菌として分離した 30 菌株中のホモコリン酸化活性をレプリカ法と分光光度法でスクリーニングし、ほとんどの菌株には NAD 依存性の脱水素酵素が存在することが明らかとなった。さらに、*Pseudomonas* sp. strain A9 の風乾菌体を用いて酵素活性を検討したところ、ホモコリンの酸化には NAD 依存性のアルコール脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素が関与していることが明らかとなった。また、A9 株の無細胞抽出液中に NAD 依存性のホモコリン脱水素酵素活性を見出し、本酵素は誘導酵素であることを証明した。粗酵素液を用いて基質特異性を検討したところ広い特異性を示した。酵素精製に先立ち NAD 依存性ホモコリン脱水素酵素活性の安定化を検討したが、格段に安定化させる条件を見出すことはできなかった。また、NAD 依存性 3-ヒドロキシプロピオン酸脱水素酵素活性を *Pseudomonas* sp. strain A9 の無細胞抽出液中に見出し、誘導的に生成することを明らかにした。このことは、3-ヒドロキシプロピオン酸が本菌のホモコリン分解の代謝中間体であることを示唆している。以上の結果から以下のような分解経路・分解酵素を推定した。*Pseudomonas* sp. strain A9 では、ホモコリンはトリメチルアミノプロピオンアルデヒドを経由して $\beta$ -アラニンベタインに酸化される。これらの反応を触媒する酵素は NAD 依存性ホモコリン脱水素酵素と NAD 依存性アルデヒド脱水素酵素である。次に、 $\beta$ -アラニンベタインはその C-N 結合が開裂を受け、トリメチルアミンと 3-ヒドロキシプロピオン酸が生成する。さらに、3-ヒドロキシプロピオン酸は NAD 依存性 3-ヒドロキシプロピオン酸脱水素酵素により酸化され、マロン酸セミアルデヒドとなる。

以上のように、本研究は、微生物による第 4 級アンモニウム化合物分解に関する研究、特にホモコリン分解に関して新たな知見を加えた。よって、本論文を学位論文として十分な価値を有するものと判定した。