

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Md. Rezaul Bari
審査委員	主査 森 信寛 (印)
	副査 澤 嘉弘 (印)
	副査 阿座上 弘行 (印)
	副査 有馬 二郎 (印)
	副査 藪田 行哲 (印)
題目	Molecular studies on trimethylaminobutanol dehydrogenase and trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase produced by <i>Pseudomonas</i> sp. 13CM ( <i>Pseudomonas</i> sp. 13CMのトリメチルアミノブタノール脱水素酵素及びトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素の分子的研究)
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。本研究は、コリン類縁体4-トリメチルアミノブタノールの分解に関与している酵素、トリメチルアミノブタノール脱水素酵素およびトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素の分子に関する研究であり、その内容は以下のように要約される。</p> <p>酵素活性を指標としたショットガンクローニング法で見出されたトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素の全塩基配列を決定した。さらに、pET24b(+)を用いた大量発現系を構築し、酵素を精製し、その諸性質を検討した。本酵素の分子質量はゲル濾過法で150kDaと算出された。SDS-PAGE法から、本酵素はサブユニットの分子質量52kDaの三量体であった。また、MALDI-TOF MS法では分子質量は51kDaであった。本酵素の等電点は4.5であった。至適pH及び至適温度はそれぞれ9.5と40℃であった。トリメチルアミノブチルアルデヒド、ジメチルアミノブチルアルデヒド及びNADに対するKm値はそれぞれ0.31 mM, 0.62 mM, 1.16 mMであった。本酵素はすでに報告されているトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素(トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素I)とは分子質量や基質に対するKm値などで違いが見られた。今回、新たに見出されたアルデヒド脱水素酵素をトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素IIと命名した。</p>	

さらに、*Pseudomonas* sp. 13CM が生産するトリメチルアミノブタノール脱水素酵素とトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素 I の両遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。トリメチルアミノブタノール脱水素酵素とトリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素 I の N-末端アミノ酸配列とデータベース上の様々なアルコール脱水素酵素及びアルデヒド脱水素酵素に保存されているアミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを設計し、PCR 法により、DNA 断片を増幅した。次に、インバース PCR 法を行い、最終的に両脱水素酵素遺伝子の全長塩基配列を決定した。両酵素のアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、*Pseudomonas putida* GB-1 の推定上のアルデヒド脱水素酵素及び鉄含有アルコール脱水素酵素とそれぞれ 94%、87% のホモロジーであった。さらに、両酵素の大量発現系を構築し、組換え型トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素 I の性質を検討した。アルデヒド脱水素酵素 I の分子質量はゲル濾過法で 160kDa と算出され、SDS-PAGE 法から、本酵素はサブユニットの分子質量 50kDa の三量体であった。至適 pH および至適温度は pH 9.5、50°C であった。トリメチルアミノブチルアルデヒド、ジメチルアミノブチルアルデヒド及び NAD に対する  $K_m$  値はそれぞれ 0.12 mM、0.07 mM、0.15 mM であった。組換え型トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素 I の性質は *Pseudomonas* sp. 13CM から精製した酵素と同じ性質を示した。

最後に、トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素 I 及び II の基質結合ポケット付近に存在する重要なアミノ酸残基について検討した。ホモロジーモデリングとアミノ酸配列の比較により、基質通路の入口付近のアミノ酸配列に違い（アルデヒド脱水素酵素 I では Asp457, Glu458, Leu459, アルデヒド脱水素酵素 II では Gln437, Ala438, Val439）が見られた。部位特異的変異法により、両酵素の 3 個のアミノ酸残基のペプチドを互いに入れ替えた変異酵素を作成した。種々の基質に対する性質を検討したところ、ほとんど全ての変異酵素はその活性が低下していた。さらに、アルデヒド脱水素酵素 I 由来の変異酵素は基質、補酵素に対する  $K_m$  値が増加していた。一方、アルデヒド脱水素酵素 II の 2 個の変異酵素（A438E, V439L）は基質に対する親和性が増大した。アルデヒド脱水素酵素 II の Q437D の変異酵素の活性が非常に低下したことから、アルデヒド脱水素酵素 II の Q437 残基とアルデヒド脱水素酵素 I の D457 残基は基質の結合と生成物の生成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上のように、本研究により、第 4 級アンモニウム化合物分解酵素系遺伝子に関する分子生物学的な新しい知見が得られた。さらに、アルデヒド脱水素酵素の構造と機能の相関に係る重要な情報が得られた。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。