

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Maizom Binti Hassan
審査委員	主査 森 信寛 (印) 副査 澤 嘉弘 (印) 副査 一柳 剛 (印) 副査 松下 一信 (印) 副査 渡辺 文雄 (印)
題目	Enzymatic Studies on the Degradation of 4-N-Trimethylamino-1-butanol by <i>Pseudomonas</i> sp. 13CM
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <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、コリン類縁体である 4-trimethylaminobutanol (TMA-Butanol) の微生物分解を酵素科学的な観点から追求した研究であり、その内容は以下のように要約される。</p> <p>TMA-Butanol 分解菌を土壌から多数分離し、NAD 依存性 TMA-Butanol 脱水素酵素 (TMA-Butanol 脱水素酵素) を生産する菌株の探索を行い、<i>Pseudomonas</i> 属と同定された 13CM 株を選抜した。また、TMA-Butanol 脱水素酵素生産性を高めるため、培地、培養条件を最適化した。さらに、本菌体中に TMA-Butanol 脱水素酵素に加え、Trimethylaminobutyraldehyde (TMABaldehyde) 脱水素酵素、L-カルニチン脱水素酵素活性を見出した。</p> <p>次に、本菌の抽出液より、種々のクロマトグラフィーを行い TMA-Butanol 脱水素酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素の分子質量は約 45 kDa でモノマー酵素であった。至適温度は 50℃、酸化および還元反応の至適 pH はそれぞれ 9.5 と 6.0 であった。本酵素反応は重金属、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、<i>o</i>-Phenanthroline に強く阻害された。本酵素は TMA-Butanol 以外に TMAButanol よりメチル基が一つ少ない dimethylaminobutanol (TMA-Butanol) も酸化した。さらに炭素鎖が長い TMA-Pentanol, DMA-Pentanol, TMA-Hexanol, DMA-Hexanol にも作用した。理化学的性質、酵素学的性質から</p>	

本酵素は新規なアルコール脱水素酵素であると結論づけた。続いて、TMABaldehyde 脱水素酵素の精製を行った。本酵素は分子質量 55 kDa のトリマーであった。等電点は 5.5、至適温度と至適 pH はそれぞれ 40°C と 10.0 であった。次に本酵素の基質特異性や反応速度論の検討、さらに N-末端アミノ酸配列決定を行った。TMABaldehyde, dimethylaminobutyraldehyde および NAD<sup>+</sup> に対する K<sub>m</sub> 値はそれぞれ 7.4 μM, 51 μM, 0.125 mM であった。N 末端から 13 残基アミノ酸配列を決定した。本酵素は既に動物由来の酵素が報告されているが、基質特異性を異にしており、微生物では初めての酵素である。

さらに、ショットガンクローニング法により TMABaldehyde 脱水素酵素遺伝子をクローニングし、組換え体から TMABaldehyde 脱水素酵素を精製し、その性質を検討した。組換え体酵素は 13CM より精製した TMABaldehyde 脱水素酵素とは異なることが明らかとなり、*Pseudomonas* sp. 13CM には性質が異なる 2 種類の TMABaldehyde 脱水素酵素 (I および II) が存在することを証明するとともに、TMABaldehyde 脱水素酵素 II 遺伝子の全塩基配列を決定した。

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代謝に関する研究に新たな知見を加えた。さらに、新規酵素を単離し、その特性を明らかにすることにより酵素科学分野においても新たな知見を得た。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。