

微生物における第4級アンモニウム化合物
分解酵素および分解経路に関する研究

**(Studies on microbial degradation enzymes and pathway
of quaternary ammonium compounds)**

藤光洋志

2016

もくじ

序論	……	1
第1章 TMA-ブタノール分解菌スクリーニングと 分解経路の解明	……	8
第2章 <i>Fusarium</i> 由来TMA-ブタノール脱水素酵素の 精製と諸性質	……	19
第3章 γ -ブチロベタインニル CoA 合成酵素の スクリーニングと酵素生産条件の検討	……	34
第4章 <i>Agrobacterium</i> 由来 γ -ブチロベタインニ CoA 合成酵素の精製と遺伝子のクローニング	……	49
結論	……	74
謝辞	……	78
引用	……	80
要旨	……	89
Abstract	……	91
本論文に関連する投稿論文	……	93

序論

第4級アンモニウムは一般式 R_4N^+ で表され、窒素原子が周りの pH に依存せず常に正に帯電しているという特徴を有している。応用例としては、電気泳動の一法である CTAB 法で用いられる臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムや手指殺菌用アルコール製剤に添加されている塩化ベンザルコニウムがある。またタンパク質の分離精製に用いる強陰イオン交換樹脂のイオン交換基も第4級アンモニウム化合物から成る (Fig. 1)。

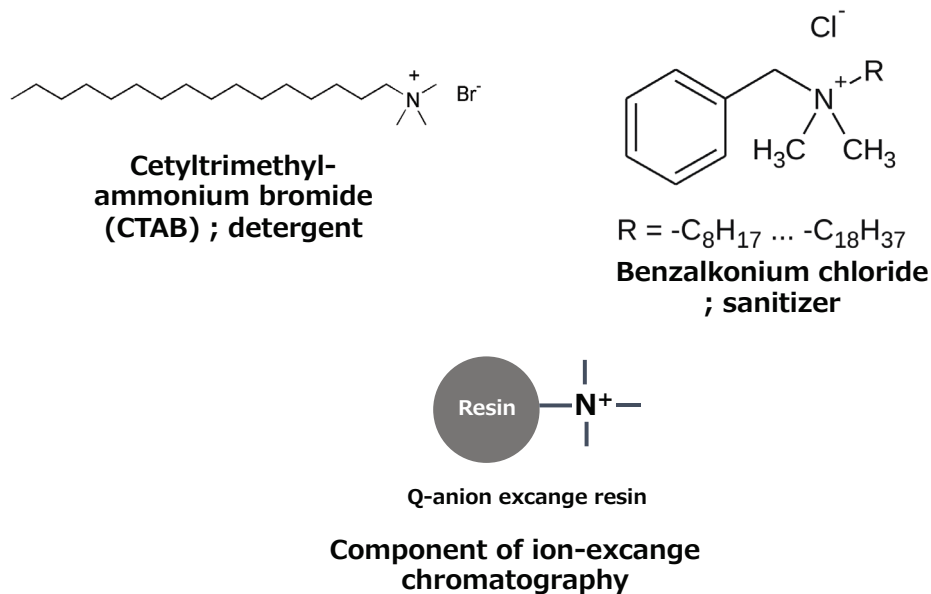


Figure 1. Application of quaternary ammonium compounds.

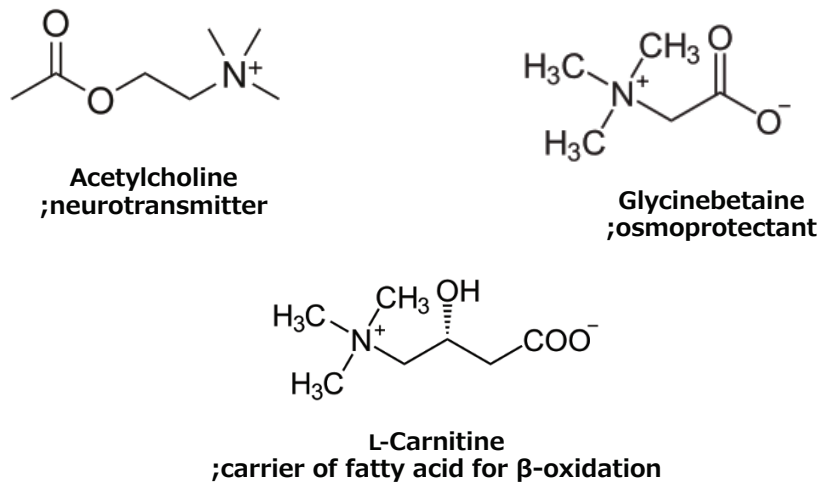


Figure 2. Physiological function of quaternary ammonium compounds.

生体内の第4級アンモニウム化合物として、コリン、グリシンベタイン、L-カルニチンが知られている (Fig. 2)。コリンは神経伝達物質であるアセチルコリンやリン脂質の1種であるホスファチジルコリンの構成成分である。グリシンベタインはある種の植物や微生物の浸透圧調節のための適合溶質である。さらにL-カルニチンは、脂肪酸がミトコンドリア内で β 酸化される際に、ミトコンドリア内膜で脂肪酸の輸送担体として働いている (Fig. 3, Vaz FM and Wanders RJA, 2002 より引用)。

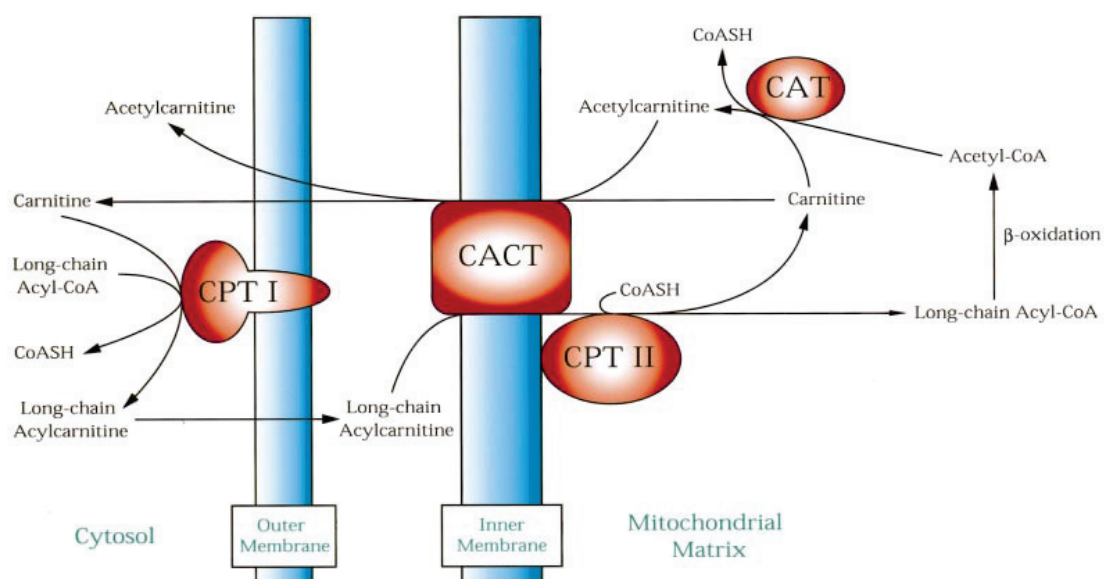


Figure 3. Function of carnitine in the transport of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation

上述のように第4級アンモニウム化合物は生体内で重要な役割を果たしており、その生合成経路について比較的よく研究がされている。例えば、コリンはO-ホスホコリンやCDP-コリンといった誘導体を経て、生合成されるがコリンの中心骨格は、基本的にはFig. 4に示すようにアミノ酸のL-セリンの脱炭酸 (L-セリン→エタノールアミン) およびN-トリメチル化 (エタノールアミン→コリン) によって生合成される (Jakob AS, 1958; Rontein D et al., 2001; Denis R et al., 2003; Gabriella P et al., 2004)。またL-カルニチンの生合成は、ほ乳類の場合ペプチド中のL-リジンが、カビ等の真核微生物の場合遊離のL-リジンが出発物質となる違いがあるもののFig. 5に示すような一連の代謝経路を経て、合成される

(Richard AK and Harry PB, 1977; Frederic MV and Ronald JAW, 2002; Karin S et al., 2010)。グリシンベタインの生合成は、コリンの酸化反応によってなされると報告されている (Jakob AS, 1958) が、近年、好塩性細菌からグリシンの *N*-トリメチル化によって合成される経路も報告されている (Antti N et al., 2000)。

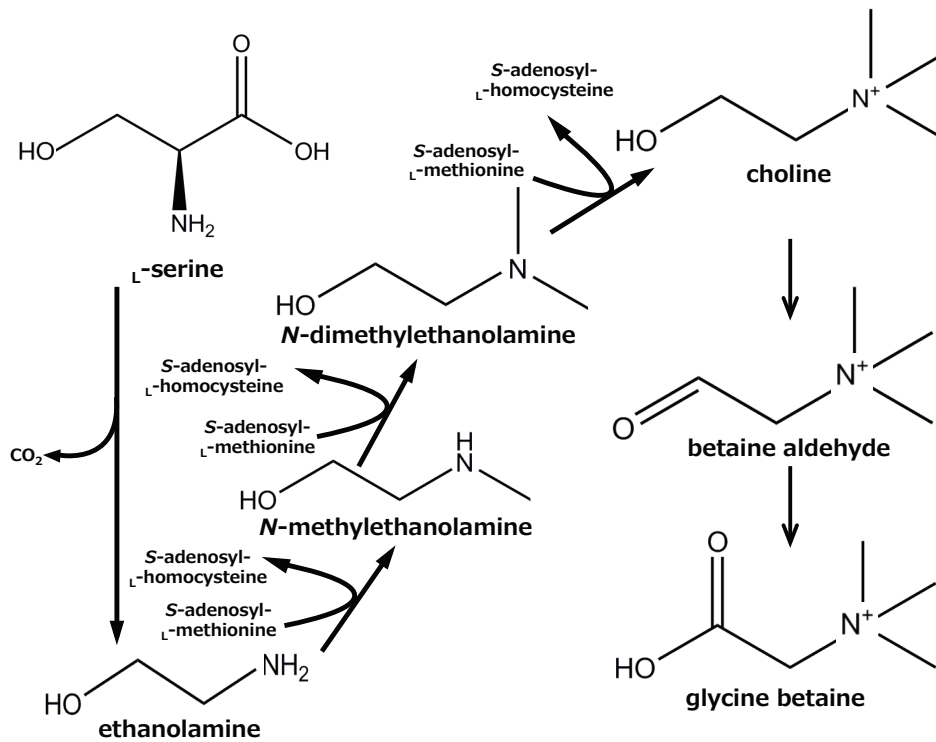


Figure 4. Biosynthetic pathway of choline and glycinebetaine.

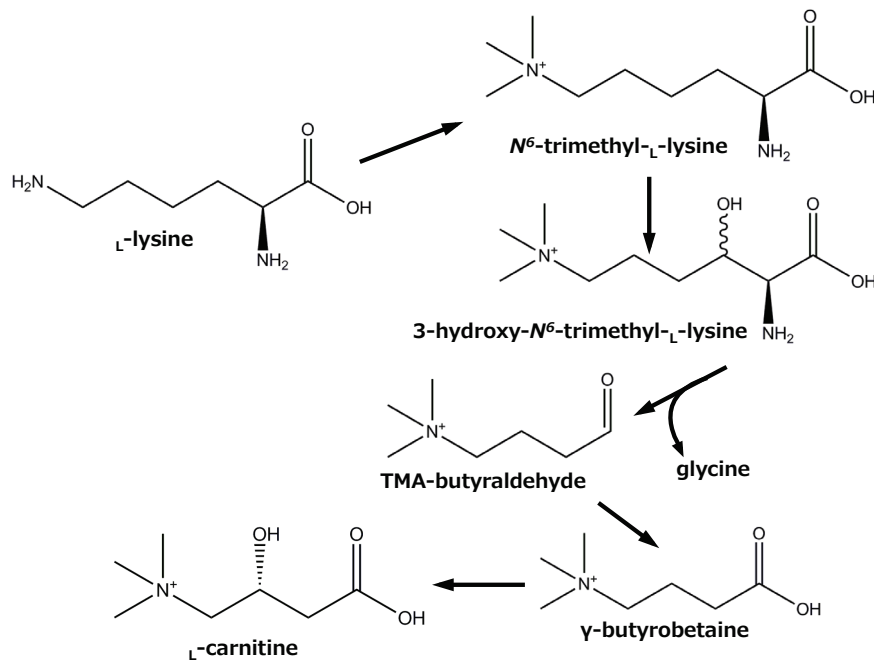


Figure 5. Biosynthetic pathway of L-carnitine.

また第4級アンモニウム化合物の分解経路について、種々の微生物を用いて研究されてきた。Fig. 6 に示すように、コリンはグリシンベタインへ代謝された後、グリシンへ分解されると報告されている (長沢ら, 1980)。また L-カルニチンの場合、トリメチルアミンが遊離する反応等も報告されている (Seim H et al., 1982) が 3-デヒドロカルニチンに代謝される分解経路がよく研究されている (Hans-Peter K, 1997; Clemens U et al., 2005; Jamie AM and Matthew JW, 2015)。3-デヒドロカルニチン以降の分解経路は不明であるが、放射性同位体を用いた代謝産物の研究から、グリシンベタインへと代謝され、その後はコリン分解系と同様の経路を経ると考えられている (Lindstedt G et al., 1967)。

この分解経路の研究において、コリンの分解酵素については微生物により酵素の種類が異なる事が明らかとなっている。すなわち、原核生物の *Pseudomonas* 属細菌などでは呼吸鎖に連結したコリン脱水素酵素を利用している事が報告されている (Nagasawa T et al., 1976) が、*Arthrobacter* 属細菌はコリン酸化酵素を利用している事が報告されている (Ikuta S et al., 1977; Fan F et al., 2004)。また真核微生物では糸状菌はコリン酸化酵素を (Yamada H et al., 1979; Enokibara S, 2012)、酵母では水酸化酵素を利用している事 (Mori N et al., 1988) が明らかとなっている。

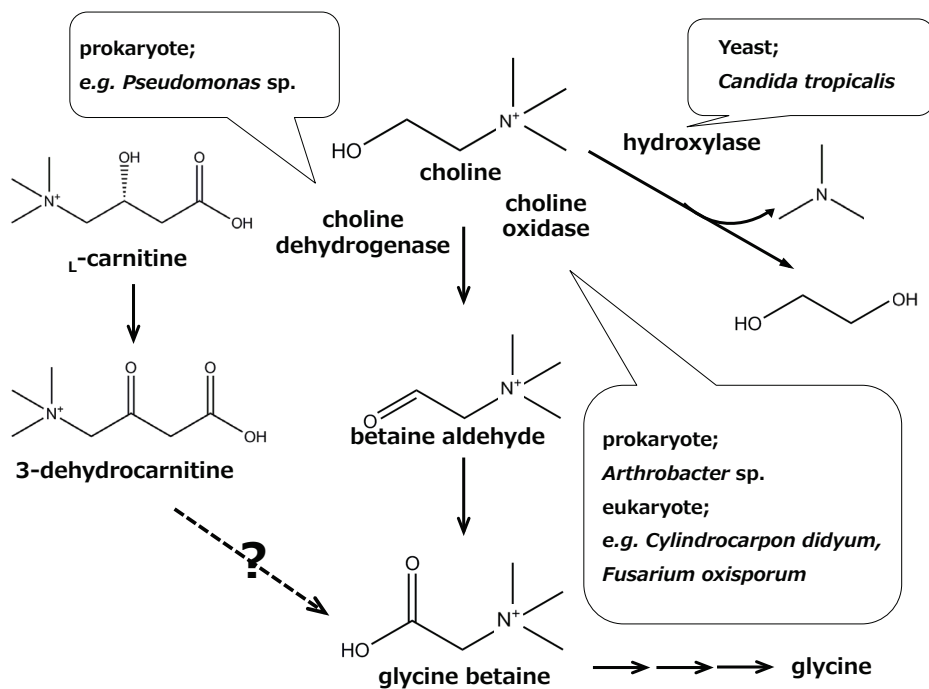


Figure 6. Microbial degradation pathway of choline and L-carnitine.

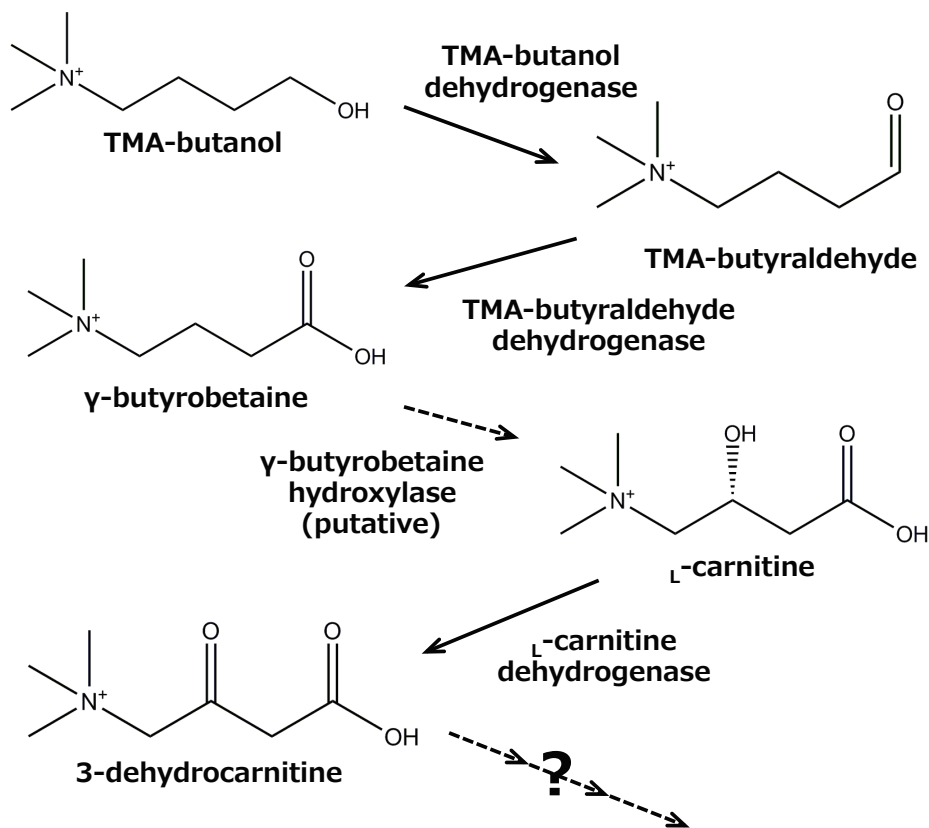


Figure 7. Microbial degradation pathway of 4-*N*-trimethylamino-1-butanol.

このように微生物の種類によってコリンの代謝経路は様々である。さらにコリン類縁体である 4-トリメチル-1-アミノブタノール (TMA-ブタノール) の分解経路、分解酵素についての研究が行われた (Hassan M et al, 2007&2008a)。

TMA-ブタノールを炭素及び窒素源として利用できる土壌分離菌 *Pseudomonas* sp. 13CM は初発酵素として NAD^+ 依存性 TMA-ブタノール脱水素酵素を生成すること、さらに、TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素および L -カルニチン脱水素酵素を生成することが明らかになり、これまでの研究と同様の L -カルニチン代謝経路を有していると推定された (Hassan, 2008b)。しかし本菌においても 3-デヒドロカルニチン以降の分解経路については未解明のままであった (Fig. 7)。

本論文の著者は修士論文研究において市販の様々な食用キノコの L -カルニチン含量の分析と L -カルニチンの生合成酵素のひとつである TMA-ブチルアルデ

ヒド脱水素酵素の分布およびエノキタケから本酵素を精製し、諸性質の検討を行った (藤光, 2009)。その結果、食用キノコ中に 0.28-5.2 mg/100g wet weight の L-カルニチンが存在することを明らかにした。さらに、TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素は、その活性値に高低はあるものの、調べたほとんどの食用キノコ中に活性を見出した。さらに、活性の高かったエノキタケより本酵素を高度に精製し、本酵素が TMA-ブチルアルデヒドおよびメチル基がひとつ少ないジメチルアミノブチルアルデヒド (DMA-ブチルアルデヒド) を特異的に認識することを明らかにした。

以上のような背景から、本研究では、種によって異なる第 4 級アンモニウム化合物の代謝経路を明らかにすると共に、そこで関わる種々の酵素について諸性質を明らかにし、これまでの報告との比較等を行う事を目的とした。具体的には、修士研究で取り扱った TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素の上流 (酵素反応の結果、反応生成物として TMA-ブチルアルデヒド産生すると考えられる酵素 : TMA-ブタノール分解酵素) および下流の酵素 (TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素の反応生成物である γ -ブチロベタインを分解する酵素) を対象に研究を行う事にした。

より詳細に述べると、原核生物由来 TMA-ブタノール脱水素酵素との比較などを目的に真核微生物を対象に TMA-ブタノール分解酵素を探索した (第 1 章)。その結果存在が明らかとなった *Fusarium* 属糸状菌由来 TMA-ブタノール脱水素酵素の諸性質を明らかにした (第 2 章)。また L-カルニチン前駆体である γ -ブチロベタイン分解酵素を探索した (第 3 章)。その結果存在が明らかとなった、*Agrobacterium* 属細菌由来 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素について諸性質を明らかにすると共に、これまで明らかとなっていなかった L-カルニチン分解経路について考察を行った。

第 1 章

TMA-ブタノール分解菌のスクリーニングと分解経路の解明

(1.1) 緒言

過去の研究でコリンの類縁体である TMA-ブタノール (4-トリメチル-1-アミノブタノール) の分解経路が調べられた (Hassan M et al., 2007; Hassan M, 2008b)。その研究で、*Pseudomonas* sp. 13CM は脱水素酵素により TMA-ブタノールを資化していると考えられた。原核生物におけるコリンの分解については、*Pseudomonas* 属細菌では、コリンは呼吸鎖関与のコリン脱水素酵素によって、コリンは分解されると考えられている (Nagasawa T et al., 1975&1976)。一方、*Pseudomonas* 属細菌由来の TMA-ブタノール脱水素酵素は NAD^+ 依存性のため、コリン分解酵素とはまったく異なる酵素であると考えられる (Hassan M et al., 2007)。事実、*Pseudomonas* 属由来 TMA-ブタノール脱水素酵素はコリンを基質として認識せず、本菌においてコリンは別の代謝経路で分解されていると考えられる (Hassan M et al., 2007; Hassan M, 2008b)。

一方、真核生物においてはコリン酸化酵素が存在する事が報告されている (Yamada H et al., 1979; Enokibara S, 2012)。本項では、真核微生物において TMA-ブタノールの分解酵素が存在するのか探索した研究について述べる。

(1.2) 材料と方法

(1.2.1) 試薬

4-ジメチルアミノ-1-ブタノールは東京化成工業株式会社より購入した。またヨウ化 TMA-ブタノール、ヨウ化 TMA-ブチルアルデヒドは Hassan らの方法 (Hassan M et al., 2007) によって合成した。その他の試薬は、市販の特級ないし 1 級試薬を用いた。

(1.2.2) 供試菌

鳥取大学農学部微生物工学研究室保存の第 4 級アンモニウム資化性を有した酵母、糸状菌を用いた。*Fusarium* 属糸状菌 50 株を鳥取大学大学院連合農学研究科植物病理学研究室 児玉基一郎教授より分譲頂いた。また NBRC 番号のつ

いている *Fusarium* 糸状菌 10 株については、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) から分譲頂いた株を用いた。

(1.2.3) 微生物の培養条件

種々の菌株の培養にはヨウ化 TMA-ブタノールを単一の炭素・窒素源とする TMA-ブタノール培地 (ヨウ化 TMA-ブタノール 5 g L^{-1} 、 KH_2PO_4 3 g L^{-1} 、 K_2HPO_4 3 g L^{-1} 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g L^{-1} 、酵母エキス 0.5 g L^{-1} 、pH 7.5) を用いた。種培養の後、目視で濁度から生育度を判断し、生育の良い株を本培養に供した。種培養、本培養とも 30°C で好氣的に行った。培養日数は種培養、本培養とも約 48 時間とした。

集菌は本培養の後、ブフナー漏斗、ろ紙 (ADVANTEC 東洋, No.2)、アスピレーターによる吸引ろ過法で集菌した。集菌後の菌体は粗酵素液調製まで -20°C で保管した。また集菌時に培養液の濁度 (T_{660}) を Novaspec II (アマシヤムファルマシア) により測定した。

(1.2.4) 粗酵素液の調製と酵素活性測定条件

生育が良好であった 9 菌株について、菌体破碎し無細胞抽出液を調製した。菌体破碎は Bead-Beater (Biospec Products Inc., USA) を用い、ビーズ破碎 (使用 buffer : 100mM リン酸カリウム buffer [pH 7.0]、約 0°C ; ドライアイスで氷冷、破碎時間 1 分) の後、遠心 ($8,000 \times g$ 、20 分、 4°C) した上清を無細胞抽出液とした。

NAD^+ 依存性 TMA-ブタノール脱水素酵素活性は以下の反応液組成を調製し、吸光度 340 nm の増加を 30°C で経時的に測定した (反応液組成: 150 mM グリシン-NaOH buffer [pH 9.5]、 15 mM ヨウ化 TMA-ブタノール、 1 mM NAD^+ 、2-7% [v/v] 無細胞抽出液、全量: 1.5 mL)。また TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素および L-カルニチン脱水素酵素活性測定の際は、上記反応液のヨウ化 TMA-ブタノールの代わりに 10mM ヨウ化 TMA-ブチルアルデヒドあるいは 15mM L-カルニチンを用いた。

PMS 依存性 TMA-ブタノール脱水素酵素活性は以下の反応液組成を調製し、吸光度 600 nm の減少を 30°C で経時的に測定した (反応液組成: 170 mM リン

酸カリウム buffer [pH 8.0]、10 mM ヨウ化 TMA ブタノール、0.67 mM KCN、17 mM 1-Methoxy PMS、0.067 mM DCIP、2-7 % [v/v]、無細胞抽出液、全量: 1.5mL)。

TMA-ブタノール酸化酵素活性は以下の反応液組成を調製し、吸光度 500 nm の増加を 30°C で経時的に測定した (反応液組成: 166 mM リン酸カリウム buffer [pH 8.0]、100 mM ヨウ化 TMA-ブタノール、20 mM フェノール、15 mM 4-アミノアンチピリン、30 U/mL ペルオキシダーゼ、7-13 % [v/v]、無細胞抽出液、全量: 1.5mL)。

(1.3) 結果

(1.3.1) 種培養および本培養に供した菌の生育評価

先行研究 (高木, 2005) から研究室保存の酵母や糸状菌は TMA-ブタノール培地での生育が良くないという示唆がされていたが、本研究で改めて培養を行ったところ、多く株で生育は良くなかった (目視で評価)。特に酵母 (コリンなどの第 4 級アンモニウム化合物資化性菌) は非常に生育が悪かった。

一方、糸状菌については、Table. 1 に示すように一部の菌株で生育の良い菌があった。

Table 1. Screening of TMA-butanol degrading eukaryotic microbe.

Strain		T ₆₆₀
<i>Fusarium merismoides</i> var. <i>acetilereum</i>	(NBRC30040)	1.12
<i>Fusarium anguioides</i>	(AKU3703)	0.90
<i>Cylindrocarpon didyum</i> M-1	(AKU3891)	0.89
<i>Fusarium merismoides</i> TG-1	(AKU3709)	0.86
<i>Aspergillus awamori</i>	(AKU3306)	0.56

(1.3.2) *Fusarium* 属糸状菌の本培養における生育評価

Table. 1 の結果から、*Fusarium* 属糸状菌は比較的、生育が良いと判断した。そこで *Fusarium* 属糸状菌についてより網羅的な評価を行うため、分譲菌 60 株を TMA-ブタノール培地で培養した。その結果を Table. 2 に示す。

Table 2. Screening of TMA-butanol dehydrogenase from *Fusarium* species.

Species	Turbidity (T ₆₆₀)	Wet cell weight (g)	TMA-butanol dehydrogenase Activity (U/ml)	Species	Turbidity (T ₆₆₀)	Wet cell weight (g)	TMA-butanol dehydrogenase Activity (U/ml)
<i>F. merismoides</i> var. <i>acetilereum</i> (NBRC30041)	4.35	11	3.8	<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 1	0.35		
<i>F. merismoides</i> var. <i>acetilereum</i> (NBRC30040)	3.26	10	4.3	<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 4	0.34		
<i>F. caucasicum</i> Letov (NBRC5979)	1.55	4	0.1	<i>F. oxysporum</i> f. <i>gladioli</i>	0.33		
<i>F. anguioides</i> Sherbakoff (NBRC4467)	1.54	2	0.0	<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 9	0.32		
<i>F. avenaceum</i> Saccardo f. <i>fabae</i> (NBRC7158)	1.49	3	0.1	<i>F. oxysporum</i> f. <i>melonis</i> , No. 2	0.32		
<i>F. avenaceum</i> Saccardo (NBRC33236)	1.41	2	0.0	<i>F. roseum</i> No. 2 Syn. <i>F. avenaceum</i> v. <i>fabae</i> (from <i>Vicia faba</i>)	0.32		
<i>F. chlamydosporum</i> var. <i>chlamydos</i> (NBRC31096)	1.35	3	0.0	<i>F. oxysporum</i> f. <i>cepae</i>	0.31		
<i>F. crookwellense</i> Burgess (NBRC32584)	1.13	5	0.1	<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 7	0.31		
<i>F. equiseti</i> Saccardo (NBRC30198)	1.03	2	0.0	<i>F. oxysporum</i> f. <i>majus</i> , No. 1	0.31		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>cucumerinum</i> , No. 2	0.71			<i>F. solani</i> , No. 3 (from <i>Colocasia esculenta</i> Schott cv. 'Eguimo')	0.31		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>niveum</i> , No. 2	0.64			<i>F. oxysporum</i> , No. 6 (from planting stock <i>Larix kaempferi</i>)	0.30		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , A-158	0.62			<i>F. oxysporum</i> f. <i>nelumbicolum</i> , No. 2	0.24		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>cucumerinum</i> , No. 1	0.61			<i>F. oxysporum</i> f. <i>melogenae</i> , No. 2	0.23		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>batatas</i> , No. 4	0.57			<i>F. oxysporum</i> f. <i>melonis</i> , No. 1	0.23		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>lini</i> , No. 2	0.53			<i>F. roseum</i> No. 15 (from Trunk of <i>Quercus acutissima</i>)	0.20		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>majus</i> , No. 10	0.53			<i>F. roseum</i> No. 11 Syn. <i>F. anguioides</i>	0.19		
<i>F. lateritium</i> , No. 3	0.52			<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 8	0.18		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>luffae</i>	0.50			<i>F. oxysporum</i> f. <i>niveum</i> , No. 3	0.17		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>majus</i> , No. 8	0.47			<i>F. oxysporum</i> f. <i>tulipae</i>	0.17		
<i>F. oxysporum</i> , No. 1 (from <i>Allium chinense</i>)	0.47			<i>F. oxysporum</i> , No. 5 (from planting stock <i>Pinus thunbergii</i>)	0.16		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>niveum</i> , No. 6	0.43			<i>F. oxysporum</i> , No. 6 (from planting stock <i>Pinus thunbergii</i>)	0.16		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>conglutinans</i> , No. 2	0.41			<i>F. episphaeria</i> No. 1	0.14		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 6	0.41			<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , R 5-6	0.14		
<i>F. oxysporum</i> , No. 4 (from planting stock <i>Larix kaempferi</i>)	0.41			<i>F. merismoides</i> (NBRC9984)	0.12	-	-
<i>F. oxysporum</i> f. <i>conglutinans</i> , No. 1	0.39			<i>F. episphaeria</i> No. 2	0.11		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>niveum</i> , No. 7	0.38			<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> , No. 10	0.09		
<i>F. lateritium</i> , No. 2	0.37			<i>F. oxysporum</i> f. <i>nicotianae</i>	0.07		
<i>F. oxysporum</i> , No. 1 (from damping-off <i>Glycine max</i>)	0.37			<i>F. solani</i> f. <i>martii</i>	0.05		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>nelumbicolum</i> , No. 1	0.36			<i>F. lateritium</i> , No. 1	0.02		
<i>F. oxysporum</i> f. <i>niveum</i>	0.36			<i>F. nivale</i> Syn. <i>F. aspidioti</i>	0.02		

(1.3.3) *F. merismoides* var. *acetilereum* の TMA-ブタノール分解酵素の同定

特に生育の良かった *F. merismoides* var. *acetilereum* 2株について、NAD⁺依存性脱水素酵素活性、PMS 依存性脱水素酵素活性、酸化酵素活性を調べた結果 NAD⁺依存性脱水素酵素活性を検出した (Table. 3)。そこで、比較的生育の良かった他の *Fusarium* 属糸状菌 7株についても NAD⁺依存性脱水素酵素活性を測定したが、どの株も NAD⁺依存性脱水素酵素活性が著しく低い、あるいは活性が検出できなかった (Table. 2)。

Table 3. TMA-butanol degradation enzyme activity of *F. merismoides* var. *acetilereum*.

Enzyme	Enzyme activity (mU/mL broth)	Specific activity (U/mg)
NAD ⁺ dependent dehydrogenase	194	0.35
PMS dependent dehydrogenase	-	-
oxidase	-	-

-; not detect.

(1.3.4) TMA-ブタノール脱水素酵素生成条件の検討

(1.3.3) の結果より TMA-ブタノール脱水素酵素活性が最も高かった *F. merismoides* var. *acetilereum* (NBRC 30040) を TMA-ブタノール分解菌として選抜し、本菌を培養する培地組成を検討した結果を Fig. 8 に示す。

Fig. 8 の結果より、最適な培地組成を次のように決定した (ヨウ化 TMA-ブタノール 5 g L⁻¹、KH₂PO₄ 3 g L⁻¹、K₂HPO₄ 3 g L⁻¹、MgSO₄•7H₂O 0.5 g L⁻¹、酵母エキス 1.0g L⁻¹、ペプトン 3.0 g L⁻¹、微量金属塩混合物 [3130 mg/L FeCl₃•6H₂O、940 mg/L ZnCl₂、375 mg/L H₃BO₃、250 mg/L MnCl₂•4H₂O、250 mg/L CuSO₄•5H₂O、190 mg/L CoSO₄•7H₂O、125 mg/L (NH₄) Mo₇O₂₄•4H₂O] 0.8 mL L⁻¹、pH 7.0)。

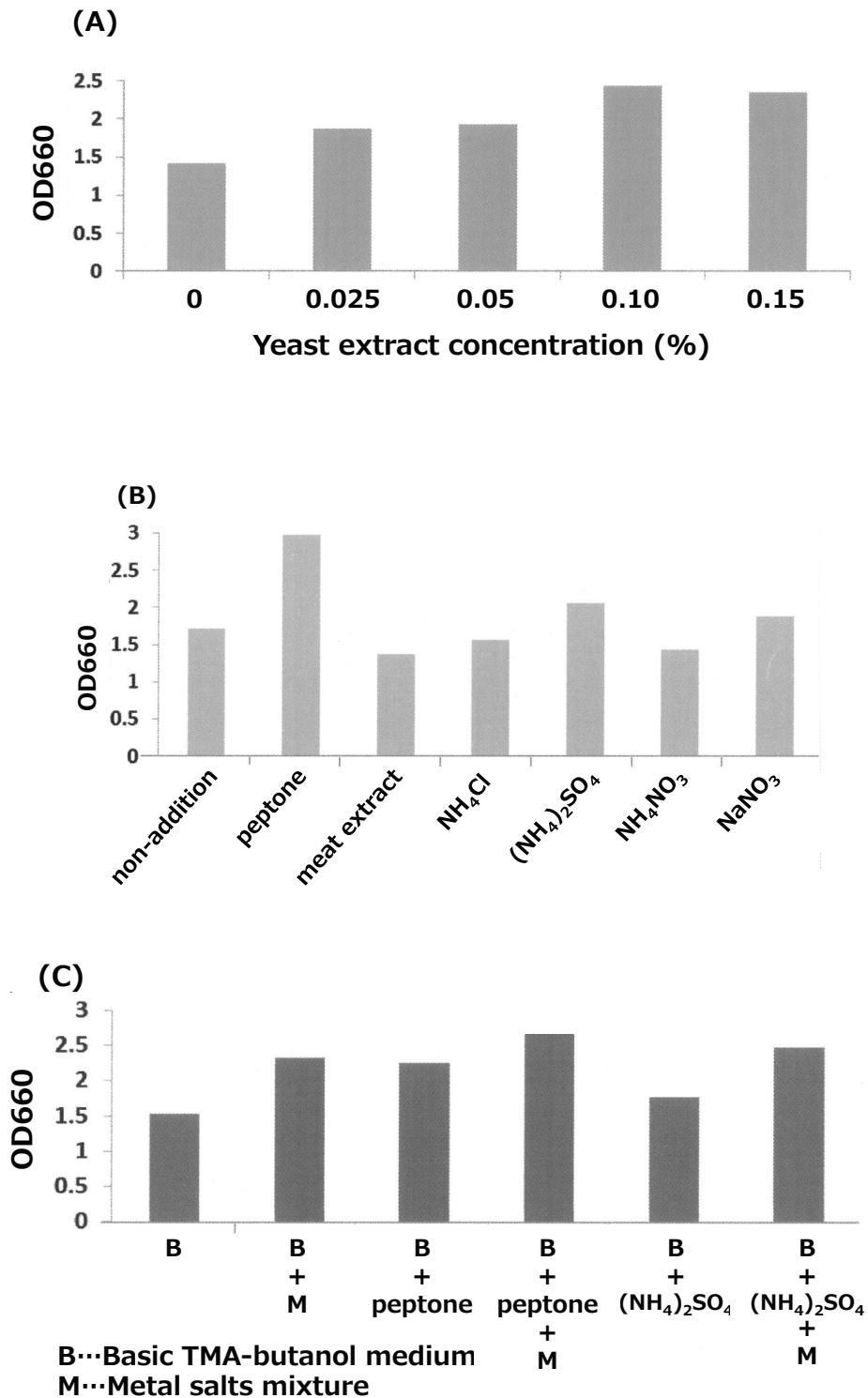


Figure 8. Effect of several nutrients for *F. merismoides* var. *acetilereum* growth: (A) addition of yeast extract, (B) addition of several nitrogen sources, and (C) addition of metal salts mixture to TMA-butanol medium.

(1.3.5) TMA-ブタノール脱水素酵素下流の酵素活性

Hassan らは *Pseudomonas* sp. 13CM に本酵素以外に TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素および L-カルニチン脱水素酵素活性を検出している (Hassan M et al., 2008a, b)。そこで (1.3.4) で決定した培地条件で本菌を培養し、無細胞抽出液中の各種酵素活性を測定したところ、TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素活性および L-カルニチン脱水素酵素活性を検出した (Table 4)。

Table 4. Several dehydrogenase activities from *F. merismoides* var. *acetilereum*.

Dehydrogenase	Enzyme activity (mU/mL broth)	Specific activity (U/mg)
TMA-butanol	130	0.23
TMA-butyraldehyde	5.9	0.011
L-carnitine	12	0.022

(1.4) 考察

過去の研究 (高木, 2004) で推測されていたように、真核微生物では TMA-ブタノールを炭素および窒素源として資化できる菌は少なかった。第 4 級アンモニウム化合物の資化性を有している土壤分離糸状菌および酵母をそれぞれ約 100 株および約 50 株、さらに分譲株を含めた *Fusarium* 属糸状菌 60 株を培養したが、その多くは生育が悪かった (目視での濁度評価)。

特に酵母の生育が悪かった点について、コリン分解菌の研究では酵母はコリンを窒素源として利用しており、別に炭素源を要求した (Mori N et al., 1988)。TMA-ブタノール分解菌についても、窒素源としてしか利用できないのではないかと推測している。

試験に供した種々の菌株の中でも *F. merismoides* var. *acetilereum* は特に生育がよく、本研究で設定した培養条件、培地条件で TMA-ブタノールを十分に資化できることが分かる。その際、TMA-ブタノール分解酵素として脱水素酵素を利用していると考えられる。

研究当初、真核微生物の TMA-ブタノール分解酵素は、存在するとしたら酸化酵素だろうと考えていた。これは TMA-ブタノールがコリンと非常に良く似た構造であり、真核微生物におけるコリンの分解酵素が酸化酵素であると報告

されていたからである。その予想に反して、*F. merismoides* var. *acetilereum* の TMA-ブタノール分解酵素は脱水素酵素であり、原核生物の TMA-ブタノール脱水素酵素と同じ NAD⁺依存性酵素であった。

また他の *Fusarium* 属糸状菌からは設定した活性検出条件では TMA-ブタノール脱水素酵素活性を検出できなかった。生育した他の菌は、おそらく他の TMA-ブタノール分解酵素を利用して生育しているものと考えられるが、生育が悪い菌は培地に微量栄養源として添加している酵母エキスを資化して生育していると考えられる。

また *F. merismoides* var. *acetilereum* 株のみ TMA-ブタノール脱水素酵素を有している事は非常に興味深い。TMA-ブタノールはコリンのアナログとして人工的に合成された化合物であり、天然中には存在しないと考えられる。そのため、どうして本株が TMA-ブタノール脱水素酵素を有しているのか、その生理学的意義については関心が持たれるところではあるが、本研究ではそれを明らかにする事はできなかった。

Fusarium 属糸状菌は特に植物病原菌として知られており、特定の宿主 (植物) と特定の菌株が密接な関係にあることが知られている (駒田ら, 2010)。*F. merismoides* が早春季におけるコムギの地下部に存在する付着種子から特異的に分離されたという報告 (駒田ら, p.149, 2010) があるが、試験で選抜した株 (*F. merismoides* var. *acetilereum*) が特にどのような条件で分離されやすいのか報告が無く、どのような植物と相互作用があるのか不明である。同様に本研究に供した種々の *Fusarium* 属糸状菌の中で *F. merismoides* var. *acetilereum* が特異的に TMA-ブタノール脱水素酵素を有している事からも、本酵素が特定の植物との特異的な相互作用に関わっている可能性もあるが詳細は不明である。

日本産 *Fusarium* 属糸状菌の分子系統樹によると *F. merismoides* は clade 1 に属し、*Fusarium* 属の中では非常に原始的な株といえる事が報告されている (Fig. 9, 駒田ら, p.33 および別添図-2 より引用, 2010)。*Fusarium* 属の分類法は諸説あり、試験で選抜した株が clade 1 に分類されるかは不明だが、原始的な株では TMA-ブタノール脱水素酵素を有しているのに、進化が進むと酵素活性を失っていると考えると非常に興味深い現象だと考えられる。この点については第 2 章の考察で言及する。

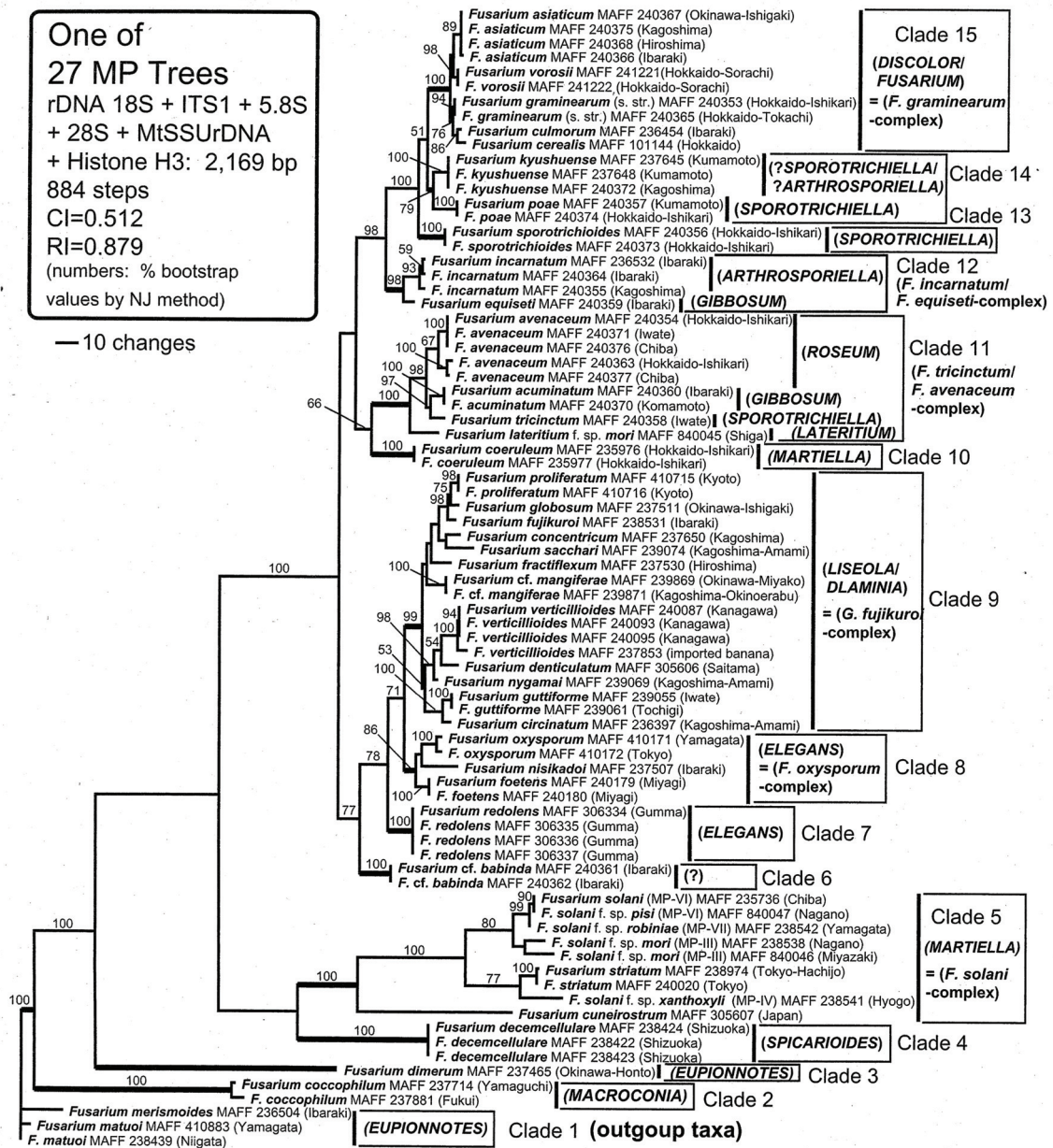


Figure 9. Phylogenetic relationship of *Fusarium* species isolated from Japan, based on several molecular biological information.

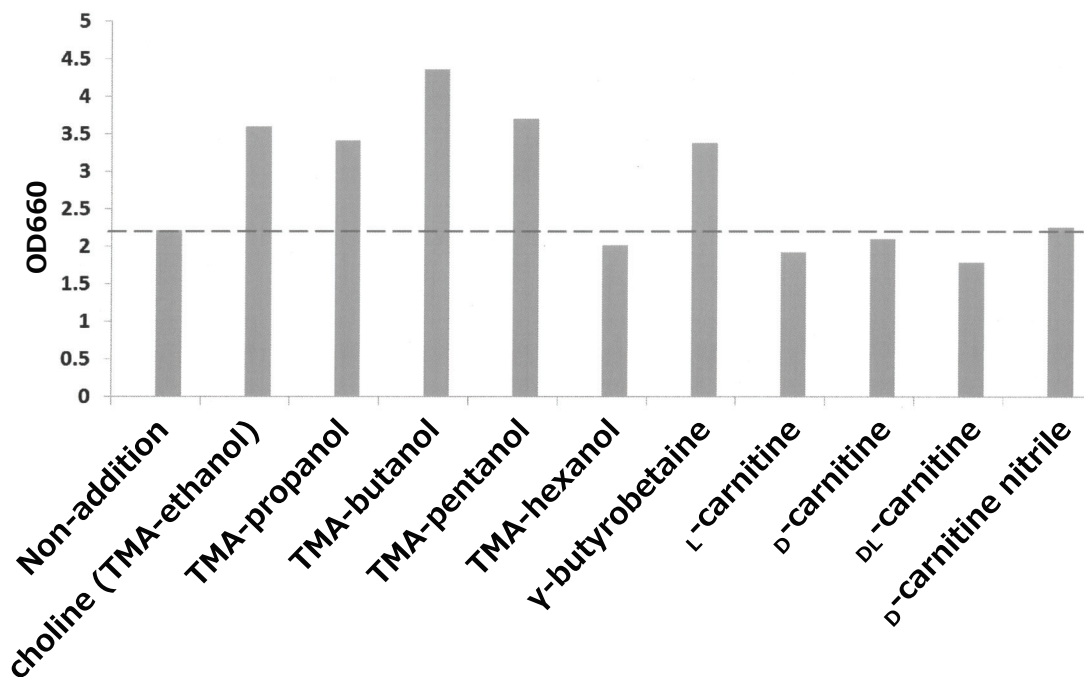


Figure 10. Utilization of TMA-butanol analogue in *F. merismoides* var. *acetilereum*.

また Fig. 10 に示すように *F. merismoides* var. *acetilereum* の TMA-ブタノール類縁化合物に対する資化性は化合物によって大きく異なる。試験に供した第 4 級アンモニウム化合物の中では TMA-ブタノールが最も生育 (濁度) の良い化合物であった。ペプトンなどを加え、最適化された TMA-ブタノール培地で培養した *F. merismoides* var. *acetilereum* の無細胞抽出液からは TMA-ブタノール脱水素酵素加えて TMA-ブチルアルデヒド脱水素酵素活性および L-カルニチン脱水素酵素活性が検出された。この結果から本菌の TMA-ブタノール分解経路は以下のような経路を経ると考えられた。

TMA-ブタノール→TMA-ブチルアルデヒド→γ-ブチロベタイン→L-カルニチン→3-デヒドロカルニチン

これまでの研究で *Pseudomonas* 属細菌において L-カルニチン分解系が 3-デヒドロカルニチンを介し、グリシンベタインへと代謝されると報告されている (Lindstedt G et al., 1967) が、関与する酵素活性は検出されていない。この点に

については第3章および第4章で言及する。

一方、各種第4級アンモニウム化合物の資化性の結果からは、本菌はL-カルニチンを資化できないと考えられる (Fig. 10)。本菌がL-カルニチン分解酵素であるL-カルニチン脱水素酵素活性を有しているという結果からすると、L-カルニチンを資化できないという結果は興味深い。その理由について明らかにできる実験を行っていないので、詳細は不明だが、L-カルニチンが細胞壁または細胞膜を透過できないのではないかと推測している。

またL-カルニチン脱水素酵素については、*Agrobacterium* 属細菌 (Mori N et al., 1994; Hanschmann H et al., 1996)や *Xanthomonas* 属細菌 (Mori N et al., 1988)、*Pseudomonas* 属細菌 (Wargo MJ, Hogan DA, 2009) など原核生物にのみ活性検出や精製の報告があるが、真核生物で本酵素の活性を検出したという報告は無い。真核生物はミトコンドリア内での β 酸化で脂質を代謝している。その際、L-カルニチンが脂肪酸の担体 (輸送キャリアー) として機能していることから、真核生物にとってL-カルニチンは非常に重要な物質と言える。この重要な物質を分解する必要性は少ないため分解系を有していないと推測できる。本研究では真核微生物である *F. merismoides* var. *acetilereum* からL-カルニチン脱水素酵素活性が検出できた。上述のような理由から、このことは非常に興味深く、本株由来L-カルニチン脱水素酵素の諸性質を研究したかったのだが、酵素の安定性が悪かったことから、L-カルニチン脱水素酵素の研究は断念せざるを得なかった。

第 2 章

F. merismoides var. *acetilereum* 由来 TMA-ブタノール脱水素酵素の精製と諸性質

(2.1) 緒言

TMA-ブタノールを炭素及び窒素源として利用できる真核微生物をスクリーニングした結果、*F. merismoides* var. *acetilereum* を見い出した。さらに本菌株の無細胞抽出液中に NAD^+ 依存性 TMA-ブタノール脱水素酵素活性が検出された。そこで本項では、本酵素を精製し諸性質を検討した結果について述べる。また原核生物の *Pseudomonas* 属細菌からも同じ NAD^+ 依存性 TMA-ブタノール脱水素酵素が報告されている (Hassan M et al., 2007) ので、それぞれの類似点や相違点について比較した。

(2.2) 材料と方法

(2.2.1) 試薬

3-ジメチルアミノ-1-プロパノール (DMA-プロパノール)、4-ジメチルアミノ-1-ブタノール (DMA-ブタノール)、5-クロロ-1-ペンタノール、6-ジメチルアミノ-1-ヘキサノール (DMA-ヘキサノール)、4-アミノブチルアルデヒド ジメチルアセタールは東京化成工業株式会社から購入した。ヨウ化 TMA-プロパノール、ヨウ化 TMA-ブタノール、ヨウ化 TMA-ペンタノール、ヨウ化 TMA-ヘキサノール、ヨウ化 TMA-オクタノール、ヨウ化 4-トリメチルアミノブチルアルデヒド (TMA-ブチルアルデヒド) は Hassan らの方法 (Hassan M et al., 2007) によって合成した。その他の試薬は、市販の特級ないし 1 級試薬を用いた。

(2.2.2) 酵素活性測定

TMA-ブタノール脱水素酵素活性 (酸化反応) は以下の反応液組成を調製し、吸光度 340 nm の増加を 30°C で経時的に測定した [反応液組成: 150 mM グリシン-NaOH buffer (pH 9.5)、15 mM ヨウ化 TMA-ブタノール、1 mM NAD^+ 、2-7% (v/v) TMA-ブタノール脱水素酵素溶液、全量: 1.5 mL]。また還元反応は以下の反応液組成を調製し、吸光度 340 nm の減少を 30°C で経時的に測定した [反応

液組成: 150 mM リン酸カリウム buffer (pH 6.0)、1 mM ヨウ化 TMA-ブチルアルデヒド、0.34 mM NADH、 2-7 % (v/v) TMA-ブタノール脱水素酵素溶液、全量: 1.5 mL]。

酵素活性の値は NADH の 340 nm における分子吸光係数 ($6,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から算出した。また酵素活性単位 (ユニット: U) は 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の NADH を増加または減少させる酵素量を 1 U とした。

(2.2.3) *F. merismoides* var. *acetilereum* の培養

NBRC より分譲された *F. merismoides* var. *acetilereum* (NBRC 30040) を (1.3.4) で決定した TMA-ブタノール培地で培養した。培養は 30°C で行い、2 日間の種培養 (5 mL TMA-ブタノール培地/16 mm 試験管) の後、3 日間本培養 (500 mL/2 L 坂口フラスコ) した菌体を用いた。また (1.2.3) に書かれた方法で集菌した。

(2.2.4) TMA-ブタノール脱水素酵素の精製

全ての操作は特に記述がない限り、 5°C で行い、1mM ジチオスレイトール (DTT) を含んだ 50 mM トリエタノールアミン-NaOH (TEA-NaOH) buffer (pH 7.0) を用いた。

菌体破砕は Bead-Beater (Biospec Products Inc., USA) を用い、ビーズ破砕 (ビーズサイズ; 0.4 mm, ドライアイスで冷却、破砕時間 30 秒、本培養培地 250 mL 相当量の菌体を使用) の後、遠心 ($8,600 \times g$, 20 分、 4°C) した上清を無細胞抽出液とした。

その後、無細胞抽出液を硫安分画に供し、30-50% 硫安分画を回収した。同分画を TEA-NaOH buffer で溶解させた。その後 2.0 M 硫安を含む TEA-NaOH buffer を等量加え、硫安の終濃度を 1.0 M とした。

遠心 ($12,000 \times g$, 20 分、 4°C) の後、その上清を 1.0 M 硫安を含む buffer で平衡化した Phenyl-Toyopearl 650M カラム ($1.6 \times 25 \text{ cm}$) を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーに供した。硫安濃度を 1.0 M から 0 M にリニアグラジエントで低下させ本酵素を溶出させた。

疎水性相互作用クロマトグラフィーの高活性分画を透析し、DEAE-Sepharose カラム ($1.6 \times 13.5 \text{ cm}$) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。

KCl 濃度を 0 M から 1.0 M にリニアグラジエントで増加させ本酵素を溶出させた。

陰イオン交換クロマトグラフィーの高活性画分を遠心濃縮フィルター (Millipore Ultra free 4、MW : 10,000、Nihon Millipore Ltd.) で濃縮した後、0.1 M KCl を含む buffer で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (1.6 × 90 cm) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供した。平衡化 buffer と同じ buffer で本酵素を溶出させた。

ゲルろ過クロマトグラフィーの高活性画分を遠心濃縮フィルター (同上) で濃縮した後、1mM DTT を含んだ 20 mM TEA-NaOH buffer (pH 7.0) で平衡化した Mono-Q 5/50 GL カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。KCl 濃度を 0 M から 1.0 M にリニアグラジエントで増加させ本酵素を溶出させた。

陰イオン交換クロマトグラフィーの高活性画分は、-20℃で保存し諸性質検討に供した。

またタンパク質濃度は、吸光度 280 nm を測定する方法および牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法 (Lowry OH et al., 1951) で測定した。

(2.2.5) TMA-ブタノール脱水素酵素の電気泳動および N 末端アミノ酸配列解析

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) は 7.5 %濃度のゲルを使用し、Williams と Reisfeld の方法 (Williams DE and Reisfeld RA, 1964) によって行った。タンパク質は 0.1% Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 によって検出した。また TMA-ブタノール脱水素酵素活性の検出は以下の反応溶液にゲルを浸す事により行った [活性染色反応液 : 150 mM グリシン-NaOH buffer (pH 9.5)、1.98 mM NAD⁺、1.13 mM ヨウ化 TMA-ブタノール、0.24 mM ニトロブルーテトラゾリウム、64 μM 1-メトキシフェナジンメトサルフェート]。

SDS-PAGE は 12.5 %濃度のゲルを使用し、Laemmli の方法 (Laemmli UK, 1970) によって行った。

N 末端アミノ酸配列は SDS-PAGE の後、PVDF 膜にブロッキング (使用機

器: AE-6677P/S/N ATTO Bioscience) し、タンパク質のバンド部分を切り出し、エドマン分解法による自動アミノ酸配列分析機 (PPSQ-31A; 島津製作所、Kyoto, Japan) で分析した。

(2.3)結果

(2.3.1) TMA-ブタノール脱水素酵素の精製、純度検定および分子質量

精製の総括を Table. 5 に示す。また純度検定のために行った Native-PAGE および SDS-PAGE の結果を Fig. 11 に示す。電気泳動の結果、Native-PAGE、SDS-PAGE とも CBB 染色によるタンパク質のバンドは 1 本であった。また Native-PAGE ゲルの活性染色バンドの位置と CBB 染色のバンドの位置は一致した (Fig. 11A)。

ゲルろ過法 [使用カラム : TSK-gel G3000SW、使用 buffer : 50 mM TEA-NaOH buffer (pH 7.0、1 mM DTT、0.1 mM KCl)] によると本酵素の分子質量は 160 kDa であった。また SDS-PAGE による分子質量は 40 KDa であった (Fig. 11B)。

Table 5. Purification of TMA-butanol dehydrogenase from *F. merismoides* var. *acetilereum*.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free extract (1.5 L broth)	315	1998	0.2	1	100
Ammonium sulfate precipitation (30–50%)	281	1780	0.2	1	89
Phenyl-Toyopearl	207	188	1.1	7	66
DEAE-Sepharose	160	51	3.1	20	51
Sephacryl S-200	95.9	14	7.1	45	30
Mono-Q	17.4	0.75	23.2	147	6

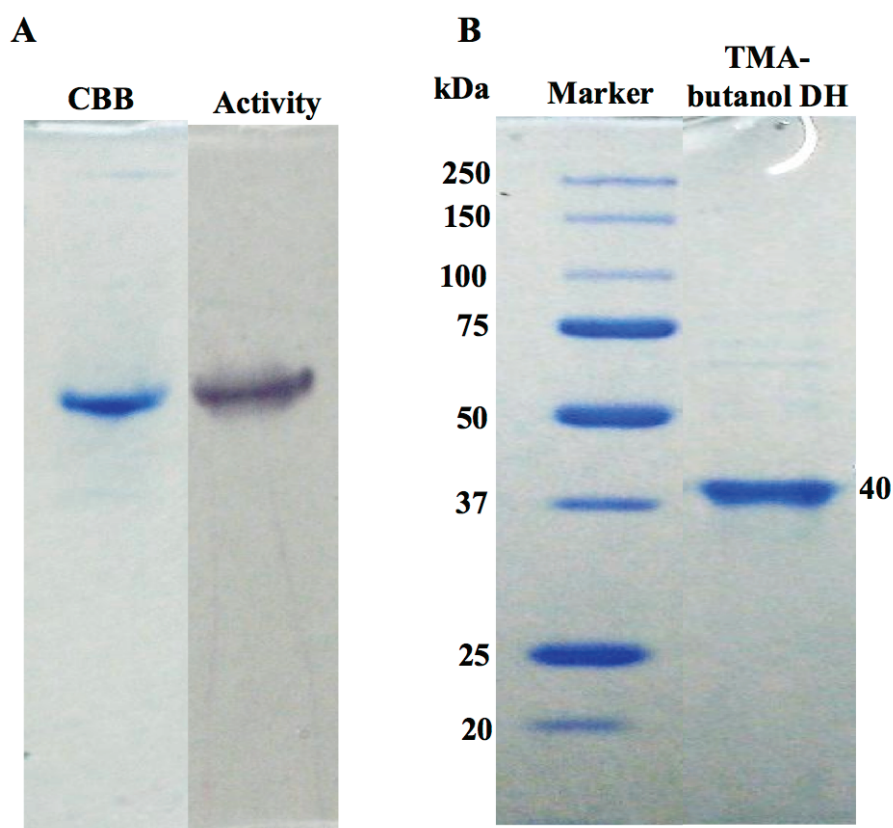


Figure 11. Assessment of homogeneity (A and B) of TMA-butanol dehydrogenase. Enzyme purity was checked using Native-PAGE (A) and SDS-PAGE (B).

(2.3.2) TMA-ブタノール脱水素酵素の pH、温度、阻害剤に対する反応性

pH、温度に対する反応性を Fig. 12 に示した。酸化反応 (TMA-ブタノール + $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{TMA-ブチルアルデヒド} + \text{NADH} + \text{H}^+$) は pH 9.5 が最適であった (Fig. 12A)。還元反応 (TMA-ブチルアルデヒド + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{TMA-ブタノール} + \text{NAD}^+$) は pH 7.5 が最適であった (Fig. 12B)。

pH 安定性は Fig. 12C のようになった。本酵素は pH 8.0 において最も安定であった。一方、酸化反応の至適 pH 9.5 においては活性が半減するという結果が得られた。

また温度に対する反応性については、反応最適温度 (酸化反応) は 45°C であった。温度安定性について、本酵素は 30°C までは安定であったが、それ以上の温度になると酵素活性は減少し、 $40\text{-}45^\circ\text{C}$ で活性は半減した (Fig. 12D)。

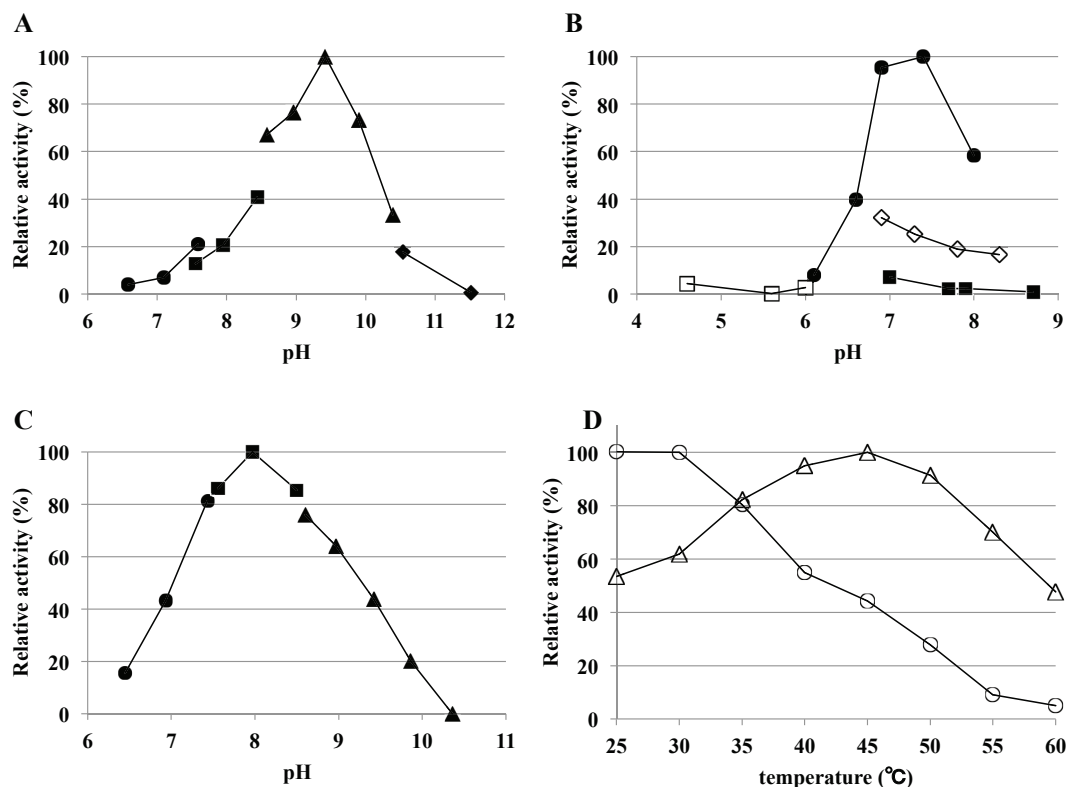


Figure 12. Effects of pH and temperature on the catalytic activity and stability of TMA-butanol DH. Optimum pH for catalytic activity for oxidation (A) and reduction (B) reactions, and pH stability (C) of the purified enzyme. Temperature profile of TMA-butanol DH (D).

Experimental conditions were the following: The optimum pH of the enzyme was ascertained by measuring TMA-butanol DH activity at 30 °C with pH of 6.5–11.0. The buffers were citrate buffer (open square, □), potassium phosphate buffer (closed circle, ●), TEA-NaOH buffer (open diamond, ◇), Tris-HCl buffer (closed square, ■), glycine-NaOH buffer (closed triangle, ▲), and carbonate buffer (closed diamond, ◆). All buffer concentrations were 50 mM. The pH stability of the enzyme was ascertained by measuring the remaining activity after incubation of the enzyme at 30 °C for 30 min in different buffers at pH of 6.5–11.0. Buffers used here were identical to those used to ascertain optimum pH.

The optimum temperature (open triangle, Δ) was measured by preincubating the reaction mixture at specified temperatures of 25–60 °C for 3 min. Then the enzyme solution and NAD⁺ were added. The reaction was monitored at 340 nm at the same temperature. Stability (open circle, ○) was tested by incubating the enzyme for 30 min in 50 mM TEA-NaOH buffer (pH 7.0) containing 1 mM DTT at different temperatures (25–60 °C). The remaining activity, measured at 30 °C, was expressed as a percentage of the control.

各種阻害剤に対する反応性の結果を、Table. 6 に示す。過硫酸アンモニウム、過酸化水素、*N*-エチルマレイミド、4-(クロロ水銀)安息香酸、1,10-フェナンスロリンに対して特に敏感で、その活性は10%以下に激減した。

Table 6. TMA-butanol dehydrogenase from *Fusarium merismoides* var. *acetilereum* and *Pseudomonas* sp. 13CM.

Property	<i>Fusarium merismoides</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. 13CM
Molecular mass (kDa)		
Gel filtration	160	45
SDS-PAGE	40	45
Subunit structure	Tetramer	Monomer
Inhibition (relative activity %)		
Semicarbazide	106	78
Aminoguanidine	101	nt
Hydroxylamine	99	nt
Phenylhydrazine	41	nt
Iodoacetic acid	124	2
4-(Chloromercuri) benzoic acid	4.9	nt
<i>N</i> -Ethylmaleimide	2.9	nt
2-Mercaptoethanol	108	nt
DTT	83	nt
H ₂ O ₂	0.3	nt
Ammonium persulfate	0.0	nt
<i>N, N</i> -Diethylthiocarbamate	107	nt
NaN ₃	105	100
KCN	102	100
2, 2'-Bipyridyl	97	52
EDTA	94	77
8-Hydroxyquinoline	61	nt
1, 10-Phenanthroline	8.0	0 (0.1 mM)
Phenylmethylsulfonyl fluoride	56	100

The reaction mixture (containing the enzyme) was pre-incubated with different inhibitors for 5 min at 30 °C before the addition of NAD⁺. The residual activity was

expressed as the percentage of activity measured in the absence of inhibitors. Each reagent was added at the final concentration of 1 mM unless otherwise described.

nt, not tested

(2.3.3) TMA-ブタノール脱水素酵素の基質特異性












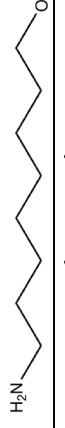
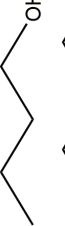
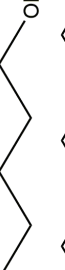

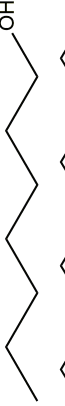
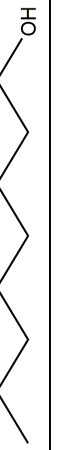
TMA-アルコール、DMA-アルコール、アミノアルコールおよびアルキルアルコールに対する基質特異性を調べた (Table. 7)。本酵素は多くのアルコールを基質として認識することが明らかとなった。一方、コリン (TMA-エタノール)、ホモコリン (TMA-プロパノール)、DMA-プロパノール、メタノール、1-ノナノール、1-デカノールは基質として認識されなかった。

炭素鎖が C₄ から C₈ の TMA-アルコールについては、全て基質として認識され、TMA-ブタノール (K_m : 2.2 mM) に比べ、TMA-ペンタノール (K_m : 0.13 mM)、TMA-オクタノール (K_m : 0.60 mM) が高い親和性を示した。

また炭素鎖が C₄ から C₈ の DMA-アルコールも、全て基質として認識され、DMA-ブタノール (K_m : 2.9 mM) に比べ、DMA-ペンタノール (K_m : 0.36 mM)、DMA-ヘキサノール (K_m : 0.18 mM)、DMA-オクタノール (K_m : 0.25 mM) は高い親和性を示した。

一方、アルキルアルコール類は基質として認識されたアルキルアルコール内では炭素鎖が長い方が親和性も高い傾向にあった。総合すると、8-アミノ-1-オクタノールが最も高い親和性 (K_m : 0.061 mM)、最も高い触媒効率 (K_{cat}/K_m : 2140) を示した。

Table 7. Kinetic parameters between of *Fusarium* enzyme and *Pseudomonas* enzyme.

Substrate	<i>Fusarium merismoides</i>				<i>Pseudomonas</i> sp. 13CM*			
	K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m	K_m (mM)	V_{max} (μ mol/min)	V_{max}/K_m		
4-Trimethylamino-1-butanol 	2.2	55.5	25.6	0.54	6.67	12		
5-Trimethylamino-1-pentanol 	0.13	41.2	317	1.2	3.45	2.9		
6-Trimethylamino-1-hexanol 	1.5	67.9	44.1	1.3	1.92	1.5		
8-Trimethylamino-1-octanol 	0.60	101	168	nt	nt	nt		
4-Dimethylamino-1-butanol 	2.9	68.3	23.4	0.83	3.24	3.9		
5-Dimethylamino-1-pentanol 	0.36	139	385	0.10	3.13	34		
6-Dimethylamino-1-hexanol 	0.18	82.5	453	0.59	2.63	4.5		
8-Dimethylamino-1-octanol 	0.25	86.6	347	nt	nt	nt		
4-Amino-1-butanol 	1.9	44.5	22.9	-	-	-		
5-Amino-1-pentanol 	0.48	114	237	nt	nt	nt		
6-Amino-1-hexanol 	0.10	124	1250	nt	nt	nt		
8-Amino-1-octanol 	0.061	131	2140	nt	nt	nt		
1-Butanol 	67	119	1.77	nt	nt	nt		
1-Pentanol 	12	104	8.85	nt	nt	nt		
1-Hexanol 	7.9	211	26.8	nt	nt	nt		
1-Heptanol 	4.2	211	50.2	nt	nt	nt		
1-Octanol 	0.73	106	145	nt	nt	nt		

nt, not tested:

-, not oxidized

*) Hassan M et al., 2007

All substrate concentrations were 3 mM.

(2.3.4) TMA-ブタノール脱水素酵素の N 末端アミノ酸配列

エドマン分解による N 末端アミノ酸配列決定を試みたが、N 末端アミノ酸は遊離せず、検出できなかった。

(2.4) 考察

F. merismoides var. *acetilereum* 由来 TMA-ブタノール脱水素酵素 (*Fusarium* 酵素) 精製標品の Native-PAGE および SDS-PAGE の結果 (Fig. 11 A, B) から、*Fusarium* 酵素は単一に精製できたと判断した。また分子質量はゲルろ過法で 160 kDa、SDS-PAGE で 40 kDa であり、ホモ 4 量体構造を有していると判断した (Table. 6)。

本酵素の N 末端アミノ酸配列の決定を試みたが、残念ながら決定する事ができなかった。N 末端アミノ酸に何らかの修飾が入っており、エドマン分解では遊離しない、と推定した。また臭化シアン (CNBr) による内部アミノ酸配列取得も試みたが、タンパク質量が十分ではなく、内部アミノ酸配列を決定する事ができなかった。

そこで立体構造の保持や活性に関わるアミノ酸残基を推定するため、また *Pseudomonas* sp. 13CM 由来 TMA-ブタノール脱水素酵素 (*Pseudomonas* 酵素) との比較のため、種々の阻害剤に対する反応性を評価した (Table. 6)。その中で *Fusarium* 酵素は *Pseudomonas* 酵素と比べて、いくつかの阻害剤で反応性の異なるものがあつた。

例えば SH 基修飾試薬であるヨード酢酸について、*Pseudomonas* 酵素は強く阻害されるのに対し、*Fusarium* 酵素はむしろ活性が賦活される結果が得られた。一方、同じ SH 基修飾試薬である *N*-エチルマレイミドに対する反応性について、*Pseudomonas* 酵素はデータが無いため反応性は不明だが、*Fusarium* 酵素は著しく阻害される事が明らかとなった。

また *Fusarium* 酵素は過硫酸アンモニウム、過酸化水素で著しく阻害される事から、酸化に弱い事が推測できる。この事から活性中心や立体構造の保持に酸化されやすいアミノ酸残基が関わっている事が推定できる。酸化されやすいアミノ酸としてはメチオニンやシステインがあるが (戸田, 2011)、このような残基が活性中心付近にあるのかもしれない。

セリンプロテアーゼ阻害剤として知られるフッ化フェニルメチルスルホニルについて、*Pseudomonas* 酵素は影響を受けないが、*Fusarium* 酵素は中程度阻害を受ける結果が得られた。これも同様に *Fusarium* 酵素には、活性や立体構造に関与するセリン残基の存在が示唆される。

また *Fusarium* 酵素について、阻害剤全体で見ると、疎水性 (芳香族性) が強い試薬に、より阻害される傾向が見られる。カルボニル修飾試薬 (セミカルバジド、アミノグアニジン、ヒドロキシアミン、フェニルヒドラジン) ではフェニルヒドラジンが中程度阻害し、SH 基修飾試薬 (ヨード酢酸、4-クロロ水銀安息香酸、エチルマレイミド) では4-クロロ水銀安息香酸、エチルマレイミドが強く阻害する。キレート試薬 (*N,N*-ジチエチルチオカルバミン酸、アジ化ナトリウム、シアン化カリウム、2,2'-ビピリジル、EDTA、8-ヒドロキシキノリン、1,10-フェナンスロリン) の場合、酵素とキレート試薬が直接関与する阻害様式か判断が難しいが、8-ヒドロキシキノリンが中程度、1,10-フェナンスロリンが強く阻害する。これら阻害剤の阻害様式が様々であると思われるが、*Fusarium* 酵素中の疎水的な部分と阻害剤が何かしらの関係があり、また *Fusarium* 酵素において疎水的な部分が活性に強く関与しているのではないかと考えている (Hashimoto Y et al., 2005)。

また前述のキレート試薬では2,2'-ビピリジルについて、*Pseudomonas* 酵素は強く阻害されるのに対し、*Fusarium* 酵素に対する影響は少ないという結果が得られた。その一方で、両酵素ともキレート試薬である1,10-フェナンスロリンには極めて強く阻害される。特に1,10-フェナンスロリンは Fe^{2+} イオンの定量に用いられる (Kolthoff IM et al., 1950) 事が知られており、両酵素とも Fe^{2+} イオンの関与が示唆される。

NAD(P)⁺依存性アルコール脱水素酵素は3つのグループに大別される。すなわちグループ I: 亜鉛依存型酵素、グループ II: 亜鉛非依存型酵素、グループ III: 鉄含有/鉄依存型酵素、の3つのグループに分けられる (Reid MF and Fewson CA, 1994; Elleuche S et al., 2014)。グループ III のアルコール脱水素酵素はサブユニットを構成するアミノ酸残基数が約385個である事が報告されている (Reid MF and Fewson CA, 1994; Elleuche S and Antranikian G, 2013)。ペプチド鎖中のアミノ酸1残基の平均分子量を110と仮定し、この値とグループ III のアミノ酸

酸残基数の積 (42 kDa) は、両酵素サブユニットの分子質量 (40-45 kDa) に相当する残基数である。一方、グループ I は 350、グループ II は 250 程度のアミノ酸残基数と報告されており、グループ III よりやや小さい分子質量を有している事が推測できる (前述の概算から算出するとグループ I の場合、39 kDa。グループ II の場合、28 kDa 相当になる)。以上の 2 点 (1,10-フェナンスロリンで強く阻害される事、分子質量の大きさ) から両酵素はグループ III の NAD(P)⁺ 依存性アルコール脱水素酵素に分類されると考えられる。

Fusarium 酵素の基質特異性について、その酵素反応速度パラメーターを Table. 7 に示した。*Fusarium* 酵素は、疎水性の高いアルキルアルコール、比較的親水性が高いアミノアルコール、立体障害の大きい TMA-アルコールなど様々なアルコールを認識する。しかし炭素鎖長の短い、コリン (TMA-エタノール) やホモコリン (TMA-プロパノール)、DMA-プロノール、メタノールは基質とはならなかった。またアミノプロパノール、エタノール、プロパノールはわずかに認識された (TMA-ブタノールに対する相対活性 : 5.8 %、31 %、33 %)。一方、炭素鎖長が長い 1-ノナノール、1-デカノールは基質として認識されなかった。このことから *Fusarium* 酵素は基質特性が非常に広いものの、概ね中程度の鎖長 (C₄-C₈) のアルコールを酸化することができるようである。

一般にアルコール脱水素酵素は基質特異性が広いと言われている (Reid MF and Fewson CA, 1994) が、第 4 級アンモニウム化合物を酸化する酵素は基質特性が非常に狭い。例えば、コリン脱水素酵素はコリンアナログである DMA-エタノールやモノエタノールアミン、tert-ブタノールなどを酸化できない (Nagasawa T et al., 1976)。またコリン酸化酵素はベタインアルデヒドも酸化する (コリンとの相対活性で約 50%) が、DMA-エタノール、2-メチルアミノエタノール、TMA-プロパノールおよび TMA-ブタノールに対する酸化活性は著しく低下する (コリンとの相対活性は 15%以下) (Enokibara S, 2012)。*Pseudomonas* 属の TMA-ブタノール脱水素酵素は TMA-ブタノールおよびそのアナログしか酸化しない (Hassan M et al., 2007)。

Gadda らはコリン酸化酵素が、基質であるコリンを認識するためにはコリン分子のトリメチルアミノ基が極めて重要であると述べている (Gadda G et al., 2004)。またタラ (魚類) 由来ベタインアルデヒド脱水素酵素の結晶構造解析に

より、ベタインアルデヒドのトリメチルアミノ基と酵素分子中のトリプトファン残基との間の相互作用が示唆された (Johansson K, 1998)。同様にアセチルコリンエステラーゼのトリプトファン残基とアセチルコリンの間でも相互作用が報告されている (Sussman JL et al., 1991&1993; Gilson MK et al., 1994; Silman I et al., 1994)。すなわち、第4級アンモニウム化合物の正電荷とトリプトファン残基の芳香環由来負電荷がカチオン- π 相互作用しているという現象である。またこのような相互作用を介して触媒反応が進むが故に、第4級アンモニウム化合物を触媒する酵素は基質特異性が狭いと考えられている。

Hassan らは *Pseudomonas* 由来の TMA-ブタノール脱水素酵素も、上述のような基質認識機構を推測している (Hassan M et al, 2007)。すなわち、酵素分子中にはトリメチルアミノ基部分を認識する anionic site と炭素鎖尾部のアルコール部分を認識する catalytic site が存在すると推定している (Hassan M et al, 2007; Hassan M, 2008b)。

一方、*Fusarium* 由来の TMA-ブタノール脱水素酵素は第4級アンモニウム化合物に特異的な酵素とは言えない。触媒効率 (K_{cat}/K_m) や酵素と基質の親和性 (K_m) から考えると、本酵素は 8-アミノ-1-オクタノール、6-アミノ-1-ヘキサノールなどを基質として最もよく認識している。また酵素-基質複合体の安定性 (K_{cat} の小ささ) から考えると TMA-ペンタノール、4-アミノ-ブタノールなどとの複合体が安定であると言える。それ故、本酵素はむしろアミノアルコールを基質として認識する傾向があるようである。

一方、炭素鎖長の長いアルコールについては、*Fusarium* 由来の TMA-ブタノール脱水素酵素は 1-ノナノールや 1-デカノールを酸化しない。この点は非常に興味深く、本酵素は 1-ノナノールを認識しないが、1-ノナノールの 9 位のメチル基がアミノ基に置き換わった 8-アミノ-1-オクタノールは最も高い触媒効率 (K_{cat}/K_m) を示している。このことから、アミノ基部分も少なからず認識していることが推測できる。

つまり第4級アンモニウム化合物を基質とするコリン酸化酵素やベタインアルデヒド脱水素酵素および *Pseudomonas* 属由来の TMA-ブタノール脱水素酵素で説明されている基質認識モデルだけでは、本酵素の基質認識を説明する事は困難である。一方、これまでに報告されてきたアルコール脱水素酵素が第4級

アンモニウム化合物を基質として認識するか否かを検討した報告はほとんどなく、本酵素の性質が他のアルコール脱水素酵素と比べて著しく特異的な性質か、判断するのは難しい。少なくとも、第4級アンモニウム化合物を認識するアルコール脱水素酵素の中で、広い基質特性を有している酵素は、知る限り本酵素だけだと考えている。

第1章の考察で述べたように、本酵素の生産株および近縁株は *Fusarium* 属の中でもかなり原始的な菌株と考えられる。*Fusarium* 属糸状菌は現在でも分類的に再編が行われており、他の糸状菌や原核生物まで含めた際に、本当に本菌株が原始的な株なのか、言及し難い部分があるが、仮に本菌株が原始的な菌株と考えて以下に推測を述べる。本酵素の基質特性の広さや本菌株が真核生物として L-カルニチン脱水素酵素活性を有している事は、進化を通じた多様性から考えると整合性を持って説明できる。

すなわち、始原的な生物は少ない種類の酵素で多くの反応を触媒する必要があり、生命発生初期において酵素は極めて広い触媒能を有していたと言われている。一方、進化が進むにつれ、酵素も多様化し、基質特異性が狭まる傾向にあったという説である (亀谷将史, 2014)。

また原核生物でしか報告されていない、L-カルニチン脱水素酵素を本菌株が有している事もこの説を支える。原核生物の脂肪酸代謝は細胞質内で行うことができるが、本株も含め真核生物では、脂肪酸代謝を L-カルニチンを介したミトコンドリア内での β 酸化に依存している。それにも関わらず、本菌株が真核生物において重要な L-カルニチン分解系 (L-カルニチン脱水素酵素) を有している事は、本菌株が系統的に原核生物と真核生物をつなぐ部分に存在すると考える事もできる。

この推測を証明できる実験が行う事ができていないため、これ以上の言及は避けるが、本菌株、本酵素がこれまでの報告と比べ、興味深い性質を有している事は明らかだと考えられる。

第 3 章

γ -ブチロベタインル CoA 合成酵素のスクリーニングと 酵素生産条件の検討

(3.1) 緒言

第 1-2 章の研究を通じ、第 4 級アンモニウム化合物分解酵素について研究を行ってきたが、Lindstedt らが述べている 3-デヒドロカルニチン以降の代謝経路を明らかにする事はできなかった (Lindstedt G et al., 1967)。Pseudomonas 属細菌においては、L-カルニチン分解系が補酵素 A (CoA) 関与の経路を経てグリシンベタインへ合流する事が示唆されている (Lindstedt G et al., 1967)。しかし第 1 章で言及したように、他の菌を含め CoA 関与の酵素活性検出報告はもちろん、精製や諸性質を検討したという報告はこれまでに無い。

工業的には、L-カルニチンは主に微生物変換法で生産されている。すなわち *Agrobacterium* 属細菌 (ないし *Rhizobium* 属細菌) の L-カルニチン脱水素酵素破壊株を用い、 γ -ブチロベタインを L-カルニチンに変換させる方法である (Lonza, 1998)。この特許によると、 γ -ブチロベタインから L-カルニチンの反応は *Pseudomonas* 属細菌で報告されている水酸化反応ではなく、 γ -ブチロベタインル CoA 合成酵素を初発の酵素とする脂肪酸の β 酸化類似反応であることが示唆されている (Fig. 13) が関与する酵素について詳細は述べられていない。第 3 章では CoA が関与する第 4 級アンモニウム化合物分解酵素について、活性検出を試みた結果について述べる。また活性陽性株において、酵素生産条件の検討を行った結果について述べる。

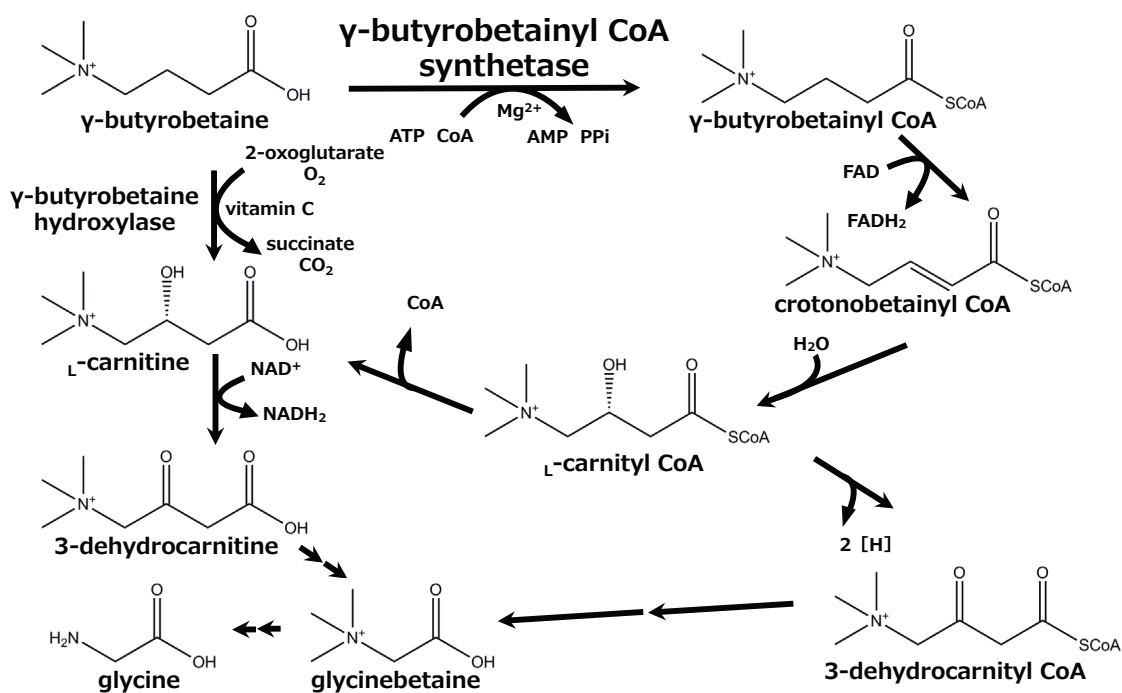


Figure 13. β -Oxidation-like pathway of γ -butyrobetaine degradation

(3.2) 材料と方法

(3.2.1) 試薬

γ -ブチロベタイン塩酸塩はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) から購入した。D-カルニチン塩酸塩は味の素 (Tokyo, Japan) から分譲頂いた。補酵素 A リチウム塩 (CoA-Li₃)、アデノシン-3-リン酸ナトリウム塩 (ATP-Na₂) はオリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan) から購入した。ポリペプトンは和光純薬工業 (Osaka, Japan)、カツオエキスは極東製薬工業 (Tokyo, Japan) から購入した。その他の試薬は市販の特級ないし 1 級試薬を用いた。

(3.2.2) γ -ブチロベタイン分解菌の培養方法と無細胞抽出液調製方法

使用菌株は鳥取大学農学部微生物工学研究室保存の第 4 級アンモニウム資化性を有した土壌分離微生物を用いた。

種培養用培地として、肉汁培地を調製した。組成を以下に示す (肉汁培地: ポリペプトン 5 g L⁻¹、カツオエキス 10 g L⁻¹、グルコース 5 g L⁻¹、NaCl 1 g L⁻¹、pH 7.0)。また本培養用培地として、以下に示す γ -ブチロベタインを単一の炭素及び窒素源とした γ -ブチロベタイン培地を調製した (γ -ブチロベタイン培

地： γ -ブチロベタイン塩酸塩 5 g L^{-1} 、 KH_2PO_4 1 g L^{-1} 、 K_2HPO_4 1 g L^{-1} 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g L^{-1} 、酵母エキス 0.5 g L^{-1} 、pH 7.0)。

各種保存菌 (15% グリセロールストック菌、 -80°C 保存) 約 100 株を一白金耳相当量、種培養 (5 mL 肉汁培地/16 mm 試験管) に供した。培養は約 1 日、 25°C で振とう培養を行った。種培養の後、目視で濁度を評価、生育の良い菌のみ本培養に供した。

種培養で生育の良かった菌を一白金耳、本培養 (20mL γ -ブチロベタイン培地/50mL 容三角フラスコ) に供した。本培養は 25°C 、2-3 日間振とう培養を行った。生育した菌体は濁度 (T_{660}) を測定の後、遠心 ($8,000 \times g$ 、20 分、 4°C) し菌体を回収した。集菌体は、菌体破碎までは -20°C で冷凍保存した。

菌体破碎はビーズ破碎 [使用 buffer : 600 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、使用機器:シェイクマスターネオ Ver 1.0 (バイオメディカルサイエンス, Tokyo, Japan)、使用ビーズ:タングステンビーズ 6 mm およびジルコニアシリカビーズ 0.6 mm、 $4-10^\circ\text{C}$ 、破碎時間:5 分 \times 2 回] により行った。菌体破碎の後、遠心 ($12,000 \times g$ 、20 分、 4°C) し、上清を無細胞抽出液とした。タンパク質濃度は Lowry らの方法 (Lowry OH et al., 1951) によって定量した。

(3.2.3) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素活性の検出方法

酵素活性の検出は 3 つの方法を併用した。

1 つめの方法は γ -ブチロベタイン依存的な ATP の減少を、NADH の減少で検出する酵素カップリング法を用いた (Fig. 14)。反応液組成を以下に示す。[反応液組成: 300 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、4 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、3mM CoA- Li_3 、3 mM ATP- Na_2 、3 mM MgCl_2 、2 mM ホスホエノールピルビン酸、0.25 mM NADH、4 mM DTT、0.83 U/mL ミオキナーゼ、0.83 U/mL、ピルビン酸キナーゼ、0.83U/mL 乳酸脱水素酵素、無細胞抽出液 0.8-1.2 mg/mL、液量 1.2 mL]。無細胞抽出液以外を混合の後、 30°C で 3 分インキュベートした。その後、無細胞抽出液を添加し、340 nm の吸光度の減少を測定した。ブランクには γ -ブチロベタインを添加しない条件を用いた。

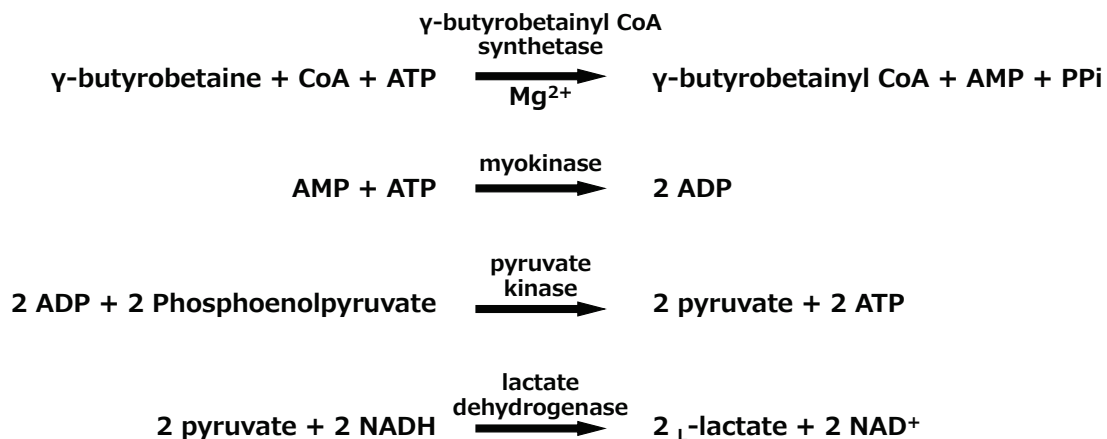


Figure 14. The scheme of enzyme coupling method.

2つめの方法は酵素反応の結果、増減すると考えられる ATP、CoA および AMP を HPLC により分析する方法を用いた。以下に示す反応液を調製し、30°C で 60 分間酵素反応に供した後、反応液をフィルター (Microcon 10K, Merck Millipore, Germany) にかき、HPLC に供した [反応液組成: 210 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、3.8 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、2.9 mM CoA-Li₃、2.9 mM ATP-Na₂、2.9 mM MgCl₂、4 mM DTT、125 mM 硫酸アンモニウム、0.1-3.0 mg/mL 無細胞抽出液、全量 100 μ L]。ブランクに γ -ブチロベタイン、CoA、ATP、無細胞抽出液を添加しない条件の反応液をそれぞれ調製した。これらのサンプルはそのまま分析に供すると検出範囲を超えてしまうため、フィルターろ液 50 μ L と超純水 94 μ L を混合し、HPLC 用分析サンプルとした。HPLC の分離条件は以下を示す [A buffer: 5 mM 酢酸 buffer (pH 5.0)、B buffer: 同酢酸 buffer + アセトニトリル (70 /30)、溶出条件: 0-9 分、100 % A buffer、9-29 分: リニアグラジエント、29-40 分: 100 % B buffer]。また ATP 関連化合物および CoA 標準溶液をサンプルとしたときのクロマトグラムを Fig. 15 に示す。

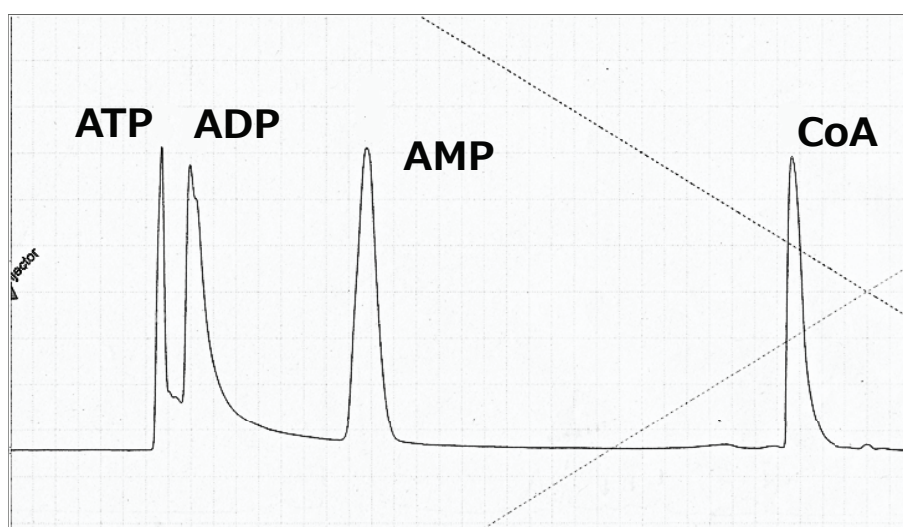


Figure 15. The chromatogram of ATP derivatives and CoA.

3つめの方法は酵素反応の結果生成する γ -ブチロベタイン CoA をヒドロキسام酸-鉄錯体として検出するヒドロキسام酸法を用いた (Fig. 16)。反応液組成を以下のように調製し、30°Cで 30-60 分インキュベートした。反応終了液に同量 (0.6 mL)の塩化鉄試薬 (30% [w/v] 塩化鉄 (III)、10% [w/v] トリクロロ酢酸/2 M HCl) を添加し酵素反応の停止及び γ ブチロベタイン ヒドロキسام酸-鉄錯体を形成させた [反応液組成: 反応液組成: 180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、4.8 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、1.4 mM CoA-Li₃、3.6 mM ATP-Na₂、3.6 mM MgCl₂、3.0 mM DTT、500 mM ヒドロキシアミン塩酸塩 (4 M NaOH で pH 7.3 程度に調整。用事調製)、10-30 % (v/v) 無細胞抽出液、全量 0.6 mL]。その後遠心 (12,000 × g、15 分、室温) し、上清の 540 nm における吸収を測定した。

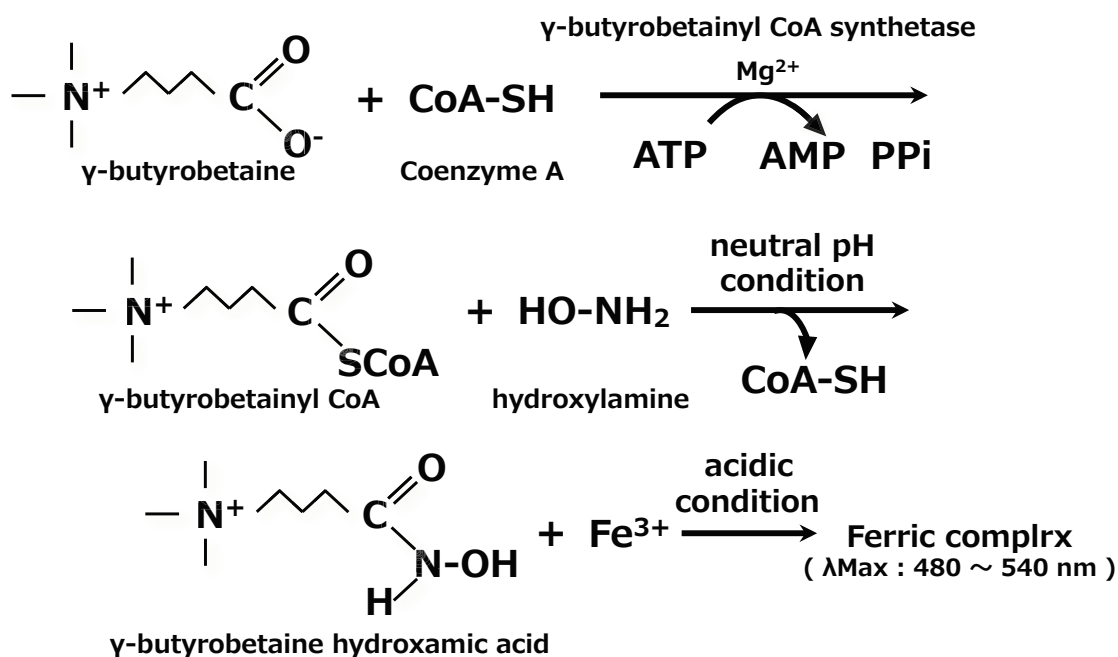


Figure 16. The scheme of hydroxamic method.

(3.2.4) ヒドロキサム酸法による γ -ブチロベタインヒドロキサム酸-鉄錯体の分子吸光係数の推定

γ -ブチロベタインヒドロキサム酸-鉄錯体の分子吸光係数が不明なため、*S*-ブチリルチオコリンおよび *S*-アセチルチオコリンを標品として、分子吸光係数の推定を行った。ヒドロキサム酸法の分析条件から無細胞抽出液、 γ -ブチロベタイン、CoA を添加していない反応溶液に *S*-ブチリルチオコリンあるいは *S*-アセチルチオコリンを添加した。その後はヒドロキサム酸法と同じように分析し、*S*-ブチリルチオコリンおよび *S*-アセチルチオコリン濃度と吸光度から検量線を作成した。なお、*S*-ブチリルチオコリンを用いた場合は酪酸ヒドロキサム酸が、*S*-アセチルチオコリンを用いた場合は酢酸ヒドロキサム酸が形成される。

(3.2.5) *Agrobacterium* sp. 525a 由来 γ -ブチロベタインニル CoA 合成酵素の局在

本酵素の局在性を調べるために、無細胞抽出液（遠心上清）を超遠心（100,000 × *g*、60 分、4°C）に供した。超遠心後、沈殿は 600 mM Tris-HCl buffer

(pH7.5) に懸濁させ、超遠心上清と共にヒドロキサム酸法による酵素活性測定に供した。

(3.2.6) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の生産条件の検討

Agrobacterium sp. 525a を以下に示す 3 種の培地で培養した

[1] γ -ブチロベタイン培地： γ -ブチロベタイン塩酸塩 5 g L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g L⁻¹、K₂HPO₄ 1 g L⁻¹、MgSO₄•7H₂O 0.5 g L⁻¹、酵母エキス 0.5 g L⁻¹、pH 7.0

[2] マンニトール・ペプトン培地：マンニトール 10 g L⁻¹、ペプトン 10 g L⁻¹、KH₂PO₄ 0.5 g L⁻¹、K₂HPO₄ 8 g L⁻¹、MgSO₄•7H₂O 0.5 g L⁻¹、酵母エキス 1.0 g L⁻¹、微量元素塩混合物 [3130 mg/L FeCl₃•6H₂O、940 mg/L ZnCl₂、375 mg/L H₃BO₃、250 mg/L MnCl₂•4H₂O、250 mg/L CuSO₄•5H₂O、190 mg/L CoSO₄•7H₂O、125 mg/L (NH₄) Mo₇O₂₄•4H₂O] 0.5 mL L⁻¹、pH 7.5

[3] D-カルニチン培地：D-カルニチン塩酸塩 5 g L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g L⁻¹、K₂HPO₄ 1 g L⁻¹、MgSO₄•7H₂O 0.5 g L⁻¹、酵母エキス 0.5 g L⁻¹、pH 7.0)。

また酵素誘導用培地として、 γ -ブチロベタイン濃度を 0.1-5 g L⁻¹ の範囲で増減させた γ -ブチロベタイン培地を用いた。また酵母エキスの代わりに微量栄養源として、ビタミン混合物 (4-アミノ安息香酸 763 mg mL⁻¹、ニコチン酸 598 mg mL⁻¹、チアミン塩酸塩 530 mg mL⁻¹、パントテン酸カルシウム塩 137 mg mL⁻¹、リボフラビン 117 mg mL⁻¹、ピリドキシン塩酸塩 43 mg mL⁻¹、ビオチン 3.3 mg mL⁻¹、シアノコバラミン 0.1 mg mL⁻¹、0.45 μ m フィルター滅菌済) を 1.0 mL L⁻¹ の濃度で添加した。

種培養は上述の 3 種の培地 (5 mL 各培地/16 mm 試験管) を用い、約 1 日、30°C で振とう培養を行った。本培養は上述の 3 種の培地 (350-1,000 mL 各培地 /500-2,000 mL 容坂口フラスコ) を用い、2-3 日、25-30°C で振とう培養を行った。

本培養終了後、遠心 (1,500 \times g、10 分、25°C) して沈澱を誘導培養に供した。沈澱は滅菌済み 0.85% KCl で懸濁 (クリーンベンチ内で行った) させ、同条件で遠心することを 2 回繰り返して、菌体を洗浄した。誘導培養条件を以下に示す。

[25°C、誘導時間 6-36 h、培地： γ -ブチロベタイン培地 (γ -ブチロベタイン 0.1-5 g L⁻¹) 200-400 mL / 500-1,000 mL 容坂口フラスコ]。

菌体破碎は超音波破碎 [使用 buffer：3mM DTT を含む 50 mM Tris-HCl buffer

(pH 7.5)、使用機器：UD-200 (トミー精工、Tokyo、Japan)、2-10 °C、破碎時間：2分] により行った。破碎後、遠心 (8,000 × g、20 分、4°C) し、上清をヒドロキサム酸法による酵素活性測定に供した。

(3.3) 結果

(3.3.1) γ -ブチロベタイン分解菌の探索

研究室保存の土壌分離微生物約 100 株を用い、酵素カップリング法および HPLC 法で γ -ブチロベタイン依存的な ATP の減少などを評価した。多くはブランク (γ -ブチロベタイン無添加) との差が小さく、再現性にも乏しかった。そのなかで、比較的有望と思われた *Agrobacterium* sp. 525a をヒドロキサム酸法に供した。その結果を Table. 8 に示す。 γ -ブチロベタイン、CoA、ATP、MgCl₂ に依存した吸光度の上昇が見られた。また反応時間とも比例して吸光度が上昇していることから、 γ -ブチロベタインニル CoA 合成酵素活性陽性株として、*Agrobacterium* sp. 525a を選抜した。

Table 8. Detection of γ -butyrobetainyl CoA synthetase activity from *Agrobacterium* sp. 525a grown on γ -butyrobetaine.

Enzyme reaction time (min)	Absorbance at 540 nm				
	Complete	Omission			
		γ -butyrobetaine	ATP	MgCl ₂	CoA
0	0.131	0.131			
20	0.170	0.139			
40	0.228	0.151			
60	0.225	0.151	0.123	0.136	0.121

Notes: Complete condition contains γ -butyrobetaine, ATP, MgCl₂, and CoA at enzyme assay. Other conditions are omitted for these compounds.

(3.3.2) ヒドロキサム酸法による γ -ブチロベタインヒドロキサム酸-鉄錯体の分子吸光係数の推定

S-ブチリルチオコリンを標品として用いたヒドロキサム酸法による検量線を Fig. 17 に示す。ここには示していないが *S*-アセチルチオコリンを標品として用いた検量線もほぼ同じ値を示した。*S*-ブチリルチオコリン、*S*-アセチルチオコリンを用いた両検量線とも直線性がよく、傾きも両者で大きな差はなかった。両条件ではそれぞれ、酪酸ヒドロキサム酸-鉄錯体および酢酸ヒドロキサム酸-鉄錯体が形成されるが、両者の差が少ない事から γ -ブチロベタインヒドロキサム酸-鉄錯体にも近似が可能と判断した。より構造に近い *S*-ブチリルチオコリンを用いた条件から分子吸光係数を算出した (分子吸光係数: $426 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

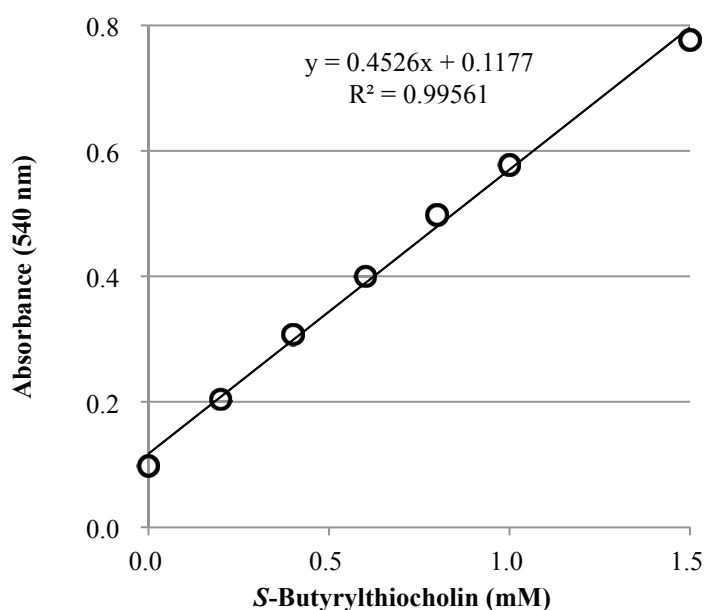


Figure 17. The calibration curve for hydroxamic method using *S*-butrylthiocholine.

(3.3.3) *Agrobacterium* sp. 525a 由来 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の局在

菌体破碎後の *Agrobacterium* sp. 525a 懸濁液を熱処理 (60°C、10 分)、遠心 (11,600 \times g、20 分、4°C)、超遠心 (100,000 \times g、60 分、4°C) に供した酵素溶液を用い、ヒドロキサム酸法による活性測定を行った。その結果を Fig. 18 に示す。

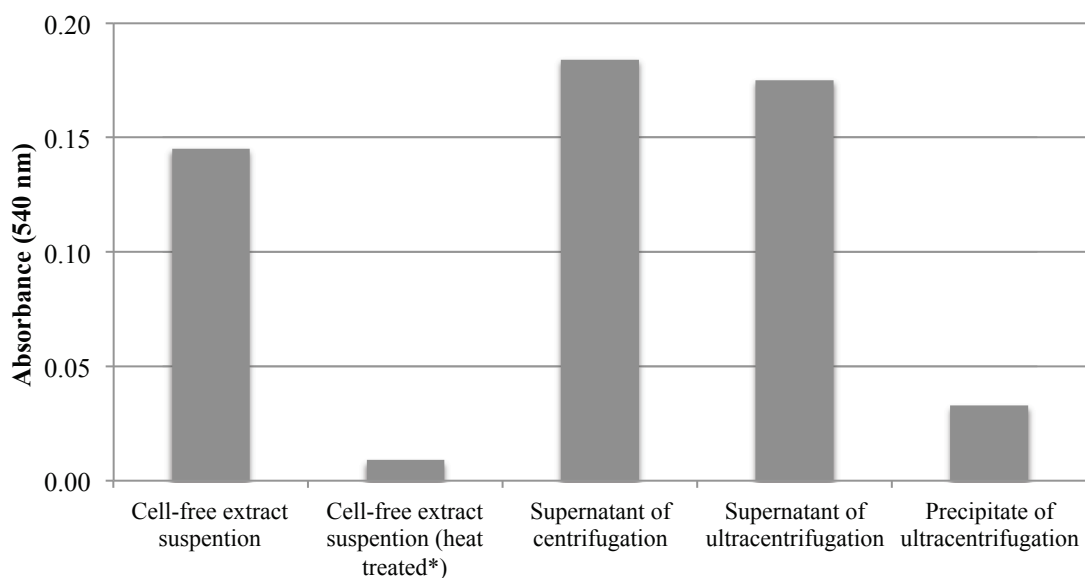


Figure 18. Localization of the enzyme activity

*Heat treated condition was forrowed; 60°C, 10min.

(3.3.4) γ -ブチロベタインル CoA 合成酵素の生産条件

培養にあたって γ -ブチロベタインの使用量を抑えるために、種々の培養法を試みた。 γ -ブチロベタイン培地のみでの培養では、培地にペプトンを 5 g L^{-1} 添加し、25°C、48 時間の培養が最も生産性 (γ -ブチロベタインル CoA 合成酵素量/ γ -ブチロベタイン使用量) が良かった (Table. 9)。更なる生産性向上を目的にマンニトール・ペプトン培地での種培養、本培養の後、誘導用 γ -ブチロベタイン培地に置換培養した。この方法の場合、1,500 mL のマンニトール・ペプトン培地で培養した菌体を γ -ブチロベタイン濃度が 0.1 g L^{-1} の誘導用培地 400 mL で約 30 時間培養すると生産性が向上した (Table. 9)。

しかしこの方法では、無細胞抽出液の比活性が低く、酵素の精製で問題が出る事が予想された。そこでさらに培地条件の検討を行った。その結果、D-カルニチン培地で種培養、本培養の後、誘導用 γ -ブチロベタイン培地で置換培養する方法が生産性、比活性の両面で良い結果が得られた。この方法の場合、3 L の D-カルニチン培地で培養して得られた菌体を γ -ブチロベタイン濃度が 0.1 g L^{-1} の誘導用培地 400 mL で培養した時、生産性が最大となった (Table. 9)。なお培養時間 6-36 時間の間で酵素活性をそれぞれ評価したが、大きな差が無かつ

たことから誘導時間は 6-12 時間程度にした。また誘導時間が短い事、誘導培地に移す菌体量が多い事から、操作に伴う煩雑さ、菌体への影響を考慮し、本培養までは無菌的に操作したが、本培養後の菌体洗浄操作以降の行程は無菌的には操作しなかった。

Table 9. Productivity and specific activity of γ -butyrobetainyl CoA synthetase in cell-free extract of *Agrobacterium* sp. 525a.

	Productivity (mU/g γ -butyrobetaine)	Enzyme activity (mU/mL broth)	Specific activity (mU/mg protein)
Batch cultivation (γ -butyrobetaine medium)	54	0.27	1.0
Batch cultivation (γ -butyrobetaine + peptone medium)	290	1.5	3.3
Replace cultivation (mannitol + peptone medium)	14,000	1.4	0.34
Replace cultivation (D-carnitine medium)	81,000	8.0	5.1

(3.4) 考察

研究当初、第 4 級アンモニウム化合物の資化性を有した研究室保存の土壤分離微生物約 100 株について、 γ -ブチロベタイン資化性のスクリーニングを行ったが生育の良い菌株でも本酵素活性陽性株を見つける事は困難であった。このことについて、おそらくスクリーニング時の検定条件の設定に問題があったと考えられる。

本研究では3つの活性検出法を用いたが、当初使用していたのは主に酵素カップリング法と HPLC 法であった。これらの方法については以下のような特徴を有している。

酵素カップリング法：ATP の分解反応を NADH の減少として検出する。反応速度で評価するため、比較的短時間に多サンプル測定可能である。一方で微弱な酵素活性の検出のためには長い酵素反応時間を設定する必要がある。

HPLC 法：ATP 関連化合物 (ATP、ADP、AMP) および CoA 関連化合物 (CoA、 γ -ブチロベタイル CoA など) の増減を網羅的に定量が可能である。エンドポイント法の測定になるため、微弱な酵素活性でも酵素反応時間を長くする事で検出可能である。分析用カラムの洗浄も含めると1アッセイ 90分程度必要であり、多サンプルのアッセイには不向きである。

上述のように互いに補完し合う特徴を有しているため、有効だと考えていたが誤算だった事は予想していたよりも本酵素活性が微弱である事だった。最適化された培養条件であっても、NAD⁺依存性酸化還元酵素と比べると無細胞抽出液中の本酵素活性は1/100倍程度の低い活性であった。また両活性検出法で擬陽性 (γ -ブチロベタイン、CoA 非依存的な ATP の分解) が多くのサンプルで検出された。このことがより解析を困難にした。おそらく無細胞抽出液中の本酵素活性に比較して、ATPase などの酵素活性が強く、それが活性検出を困難にしたと考えられた。

そこで一連のスクリーニングがきちんと機能していることを確かめることにした。つまり、両活性検出系 (酵素カップリング法および HPLC 法) で陰性と評価されたサンプルが、他の検出系でも陰性と評価できるか、3番目の方法としてヒドロキサム酸法を用い、評価することにした。この時、最も陽性の可能性の高いと評価していた *Agrobacterium* sp. 525a をサンプルとして用いた。ポジティブコントロールとして市販のアシル CoA 合成酵素 (Amanoenzyme, Aichi,

Japan) を用いた。その結果、ポジティブコントロールでは陽性、*Agrobacterium* sp. 525a でも極めて微弱であるが陽性傾向の結果が得られた。そこで反応時間や酵素添加量などを再検討した結果、Table. 8 および Fig. 18 のような結果を得る事ができた。すなわち、本酵素活性は酵素反応時間 (Table. 8) と酵素添加量 (データは未掲載) に比例しており、さらに熱処理でその活性が激減していた (Fig. 18)。また再現性の確認を行い、本酵素活性の検出に成功したと判断した。

ヒドロキサム酸法は次のような特徴を有している。本法は 1960 年代頃に開発された比較的古典的な検出方法であり、強酸を使用するだけでなく、塩基のトランジション (例: A → G、C → T) を引き起こす (変異源性を有している) とされるヒドロキシアミンを高濃度で使用する。またヒドロキシアミンは塩酸塩、ないし水溶液として流通しているが酵素反応に供す際は中和させる必要があり、また用事調製が必要である。

このような危険性や煩雑さから積極的に採用したい方法ではなかったため、当初は使用していなかったが、本研究においては本法が最も適当な方法であったため採用した。主な利点は前述のように ATPase など共雑酵素の影響を受けにくく、本研究で設定した条件ではチオエステルに特異的に反応する事が挙げられる。ここで述べるチオエステルは本研究の場合 γ -ブチロベタイン CoA のことであり、第 4 章で詳しく述べるが酵素カップリング法のように反応副生成物である ADP などを検出する方法に比べ、より鋭敏な活性検出が可能であると考えられる。また本法は化合物の増加を定量する方法である。そのためより検出感度は良いと考えられる (「0 mM → 1 mM」を定量するのと「100 mM → 99 mM」を定量するのでは前者の方が検出しやすいと考えられる)。

一方で、*S*-ブチリルチオコリンを用いた検量線からは、ヒドロキサム酸鉄錯体の分子吸光係数 (540 nm) が $426 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ であることが分かった (Fig. 17)。この値は他で汎用される比色定量法の分子吸光係数と比べると決して高い値ではない (例えば、脱水素酵素に用いられる NADH: $6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 程度、酸化酵素に用いられる H_2O_2 検出のためのキノン色素: $14,000\text{-}30,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 程度、ペプチダーゼに用いられる *p*-ニトロアニリン: $6,000\text{-}9,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 程度)。そのため、より多くの酵素量を添加する事や反応時間を長くする事が必要だと考えられる。

次に酵素の局在性に関してだが、特許等の情報 (Kulla HG, 1991; Lonza, 1998; Meyer HP and Robins KT, 2005) によると本酵素は β 酸化類似代謝経路で働く酵素と考えられる。大腸菌の脂肪酸 β 酸化系酵素は細胞膜上に存在する (コーンスタンプ, 1998) という報告もあったため、本酵素も膜状に存在する可能性を考慮し、超遠心に供した。その結果、本酵素は主に超遠心上清に活性が局在していた (Fig. 18)。このことから、本酵素は *Agrobacterium* sp. 525a 菌体内に存在する可溶性酵素であると判断した。

本酵素を精製し、諸性質を検討するにあたって、培養基質が課題となった。すなわち本酵素の誘導に用いる γ -ブチロベタインがかなり高価 (約 3,800 円/g) であり、小スケールの培養はともかく、以後のスケールアップが困難であると考えられた。そこで γ -ブチロベタインの有機合成も試みたが、良好な結果が得られなかったため、最終的に置換培養により菌体を調製する事とした。

置換培養は、栄養の豊富な培地で十分量の菌体を調製した後、集菌して菌体を酵素誘導用の培地に移し、酵素誘導を促す培養方法である。一般に酵素誘導用の培地は、栄養条件が厳しく、菌体の増殖には不向きな傾向があるが、培養の手間等の問題から、誘導培地で酵素の誘導と菌体の増殖を兼ねて培養を行う事が多い。しかし前述の 2 つの理由 (活性が微弱、培地が高価) から本研究では置換培養を試みた。

菌体培養用培地はグルコース効果により酵素の誘導が阻害される可能性を考慮し、マンニトールを炭素源、ペプトンを窒素源とした培地を使用した。微量栄養源として、酵母エキスおよび金属塩混合物を添加した。

本培地で培養した菌体の増殖は盛んであった。誘導条件を最適化した後の生産性 (無細胞抽出液の全酵素活性/使用 γ -ブチロベタイン量) は γ -ブチロベタイン+ペプトン培地で培養したときの約 50 倍向上したが、無細胞抽出液の比活性 (全酵素活性/全タンパク質量) は約 1/10 と低下してしまった (Table. 9)。

この条件では培養はクリアーできて精製が困難になるだろうと考え、より良い条件を探索した。その中で D-カルニチンを炭素窒素源にした培地が非常に良い結果を示した。D-カルニチン培地での培養を最適化した条件では γ -ブチロベタイン+ペプトン培地の最適化条件に比べ、生産性が約 280 倍、比活性が約 1.5 倍向上した (Table. 9)。本菌は D-カルニチン培地で培養した場合、D-カルニ

チン脱水素酵素を発現する事が報告されており (Setyahadi S et al., 1997)、それ故旺盛な生育を示すと考えられた。また本培養で用いた D-カルニチン塩酸塩は DL-カルニチンの光学分割の副産物であり、研究室に多量に保管されていたため、多量の D-カルニチン培地を調製しやすかった事も大きな利点であった。また本菌は D-カルニチン培地だけでなく、L-カルニチンや DL-カルニチンを単一の炭素窒素源とした培地でも生育する事が報告されている (Setyahadi S, 1998)。このことから仮に D-カルニチンの入手が困難であったとしても、DL-ないし L-カルニチンで培養することも可能である。

第 4 章

Agrobacterium sp. 525a 由来 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の精製と遺伝子のクローニング

(4.1) 緒言

第 3 章に述べた研究で、 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の諸性質を検討するにあたり、酵素活性検出条件、菌体培養条件を決定する事ができた。本章では *Agrobacterium* sp. 525a 由来 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の諸性質を検討した。またクローニングの過程で明らかになった、オペロンと思われる本酵素遺伝子を含む遺伝子群 (L-カルニチンに至る β 酸化系類似経路に関与する酵素群をコードしていると考えられる) について言及すると共に、L-カルニチンの分解系で長らく不明であった、L-カルニチンからグリシンベタインへ至る分解経路について考察を行った。

(4.2) 材料と方法

(4.2.1) 試薬

ヨウ化 β -アラニンベタインは Ahmed らの方法 (Ahmed IAM et al., 2010) により合成した。またその他の試薬は (3.2.1) に記述した方法で入手した。

(4.2.2) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の活性測定法

酵素活性測定には 2 つの方法を併用した。第一の方法は (3.2.3) で述べたヒドロキサム酸法である。反応液組成を以下のように調製し、30°C で 60-120 分インキュベートした。反応が終わった反応液に同量の塩化鉄試薬 (30% [w/v] 塩化鉄 (III)、10% [w/v] トリクロロ酢酸/2 M HCl) を添加し酵素反応を停止するとともに、 γ ブチロベタイン ヒドロキサム酸-鉄錯体を形成させた [反応液組成：反応液組成：180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、4.8 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、0.96 mM CoA-Li₃、3.6 mM ATP-Na₂、3.6 mM MgCl₂、3.0 mM DTT、500 mM ヒドロキシアミン塩酸塩 (4 M NaOH で pH 7.3 程度に調整。用事調製)、10-30 % (v/v) 無細胞抽出液、全量 0.6 mL]。その後、遠心 (12,000 \times g、15 分、室温) し、上清の 540 nm における吸光度を測定した。酵素活性の値は (3.3.2) で求めた酪

酸ヒドロキサム酸-鉄錯体の分子吸光係数 ($426 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から算出した。また酵素活性単位 (ユニット:U) は1分間に $1\mu\text{mol}$ の基質の変化を触媒する酵素量を1Uとした。

また酵素精製におけるカラムクロマトグラフィーの各フラクションの酵素活性は96穴プレートで測定した。反応液は前述の基質濃度で全量が $150\mu\text{L}$ になるように調製し、同量の塩化鉄試薬を添加し、遠心 ($4,000 \times g$, 20分、室温) した上清の吸光度を測定した。マイクロプレートでの測定の際は、光路長が異なるため、(3.2.4) に記述したように *S*-ブチリルチオコリンを標品として、検量線を作成し用いた。

第二の方法は、(3.2.3) で述べた酵素カップリング法である。反応液組成は以下のように調製した [反応液組成: 180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、 4 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、 0.96 mM CoA- Li_3 、 3.6 mM ATP- Na_2 、 3.6 mM MgCl_2 、 2.0 mM ホスホエノールピルビン酸、 0.15 mM NADH、 3.0 mM DTT、 10 U/mL ピルビン酸キナーゼ、 10 U/mL 乳酸脱水素酵素、無細胞抽出液、全量 1.2 mL]。無細胞抽出液以外を混合し、 30°C で2分インキュベートした。次に無細胞抽出液を添加し、 340 nm における吸光度の減少を測定した。酵素活性の値はNADHの分子吸光係数 ($6,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から算出した。また酵素活性単位 (ユニット:U) は1分間に $1\mu\text{mol}$ のNADHを減少させる酵素量を1Uとした。酵素カップリング法は酵素反応速度パラメーターの算出の際に利用した。

(4.2.3) *Agrobacterium* sp. 525a の培養

Agrobacterium sp. 525a を (3.3.4) で決定した D -カルニチン培地で培養した。培養は 30°C で行い、1日間の種培養 (5 mL D -カルニチン培地/ 16 mm 試験管) の後、3日間本培養 (1 L D -カルニチン培地 / 2 L 坂口フラスコ) した菌体を用いた。培養後の菌体を遠心 ($4,000 \times g$, 20分、室温) し、集菌した。

集菌体は 0.85% KCl で洗浄し、再び遠心し菌体を回収した。これを合計2回行った。本培養液 3 L 相当量の菌体を (3.3.4) で決定した誘導用 γ -ブチロベタイン培養 (γ -ブチロベタイン濃度 0.1 g L^{-1} 、 400 mL γ -ブチロベタイン培地/ 1 L 容坂口フラスコ) に移し、 25°C で6-12時間振とう培養を行い、遠心 ($8,600 \times g$, 20分、 4°C) し集菌した。集菌後の菌体は粗酵素液調製まで -20°C で保管した。

(4.2.4) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の精製

全ての操作は特に記述がない限り、5°Cで行い、1 mM DTT を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用いた。

菌体の破砕は超音波破砕 [使用菌体量：9 L 本培養相当量 (1,200 mL 誘導培養相当量)、使用 buffer: 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5、3 mM DTT、100 mM NaCl)、使用機器：UD-200 (トミー精工、Tokyo、Japan)、2-10°C、破砕時間：90 分] により行った。

菌体破砕後、遠心 (14,000 \times g、30 分、4°C) し、上清をヒドロキサム酸法による酵素活性測定に供した。

その後、無細胞抽出液を 100 mM NaCl を含む Tris-HCl buffer で平衡化した Poros HQ-50 樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (ϕ 3.6 \times 23 cm) に供した。100 mM NaCl を含む Tris-HCl buffer で洗浄の後、NaCl 濃度を 100 mM から 150 mM にステップワイズで増加させ、本酵素を溶出させた。

高活性画分を硫酸画分 (乳鉢で細かく磨砕した硫酸粉末を用いた。硫酸添加は、最初は多めに加え、ある程度溶解したのを確認したら、順次漸減させながら加え、なるべく手早く、部分的に高濃度になるのを避けるよう注意しながら添加した。完全溶解確認した後、氷水中で 15 分スターラーにかけ、インキュベートした) に供し、0-60% 硫酸画分を遠心 (21,600 \times g、30 分、4°C) により沈澱として回収した。

同画分を十分量 (150 mL 程度) の 1.5 M リン酸カリウム buffer (pH 7.0、1 mM DTT) で溶解させた。その後、不溶性夾雑物の除去を目的に遠心 (21,600 \times g、30 分、4°C) し、上清を回収した。

この上清を、1.5 M リン酸カリウム buffer (pH 7.0、1 mM DTT) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650M カラム (ϕ 1.6 \times 6.0 cm) に供した。リン酸カリウム buffer の濃度を 1.5 M から 0.1 M にリニアグラジエントにより減少させ本酵素を溶出させた。

疎水性相互作用クロマトグラフィーの高活性画分を Tris-HCl buffer で透析の後、遠心濃縮フィルター (Millipore Ultra free 4、MW: 10,000、Nihon Millipore Ltd.) で濃縮した。この濃縮画分を Tris-HCl buffer で平衡化した Mono-Q 5/50 GL カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。100mM NaCl を含む

buffer で洗浄の後、NaCl 濃度を 100 mM から 125 mM にリニアグラジエントで増加させ、本酵素を溶出させた。

陰イオン交換クロマトグラフィーの高活性画分は、それぞれ-20°Cで保存し諸性質検討に供した。

またタンパク質濃度は、吸光度 280 nm を測定する方法および牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法 (Lowry OH et al., 1951) で測定した。

(4.2.5) 電気泳動と N 末端アミノ酸配列解析

精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) に供した。5.0 %濃度のゲルを使用し、Williams と Reisfeld の方法 (Williams DE and Reisfeld RA, 1964) によって行った。タンパク質は 0.1% CBB R-250 によって検出した。またどのタンパクバンドが酵素活性を示すか検討するために、ゲルを 5 mm ずつ切断し、それぞれを 1.5 mL 容エッペンドルフチューブ内で細かく砕いた。その後、ヒドロキサム酸法の反応溶液を調製し、エッペンドルフチューブに加え、酵素反応を行った。

N 末端アミノ酸配列は Native-PAGE の後、PVDF 膜にブロッティング (使用機器 : AE-6677P/S/N ATTO Bioscience) し、タンパク質のバンド部分を切り出し、エドマン分解法による自動アミノ酸配列分析機 (PPSQ-31A; 島津製作所、Kyoto, Japan) で分析した。取得した推定アミノ酸配列を NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により、ホモロジー解析を行った。

(4.2.6) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素遺伝子のクローニング

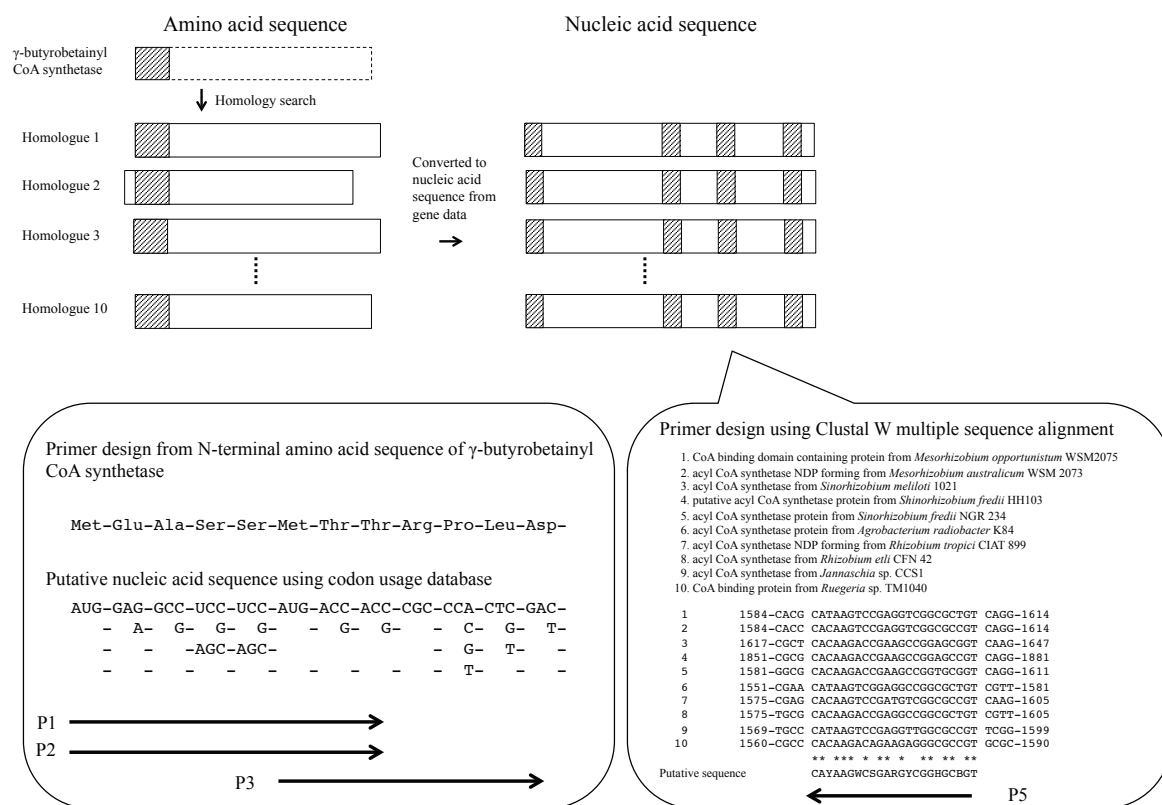
γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の N 末端アミノ酸配列および、*Agrobacterium/Rhizobium* 属細菌のコドン使用頻度 (Codon Usage Database <http://www.kazusa.or.jp/codon>) から 5'末端塩基配列を推定した。

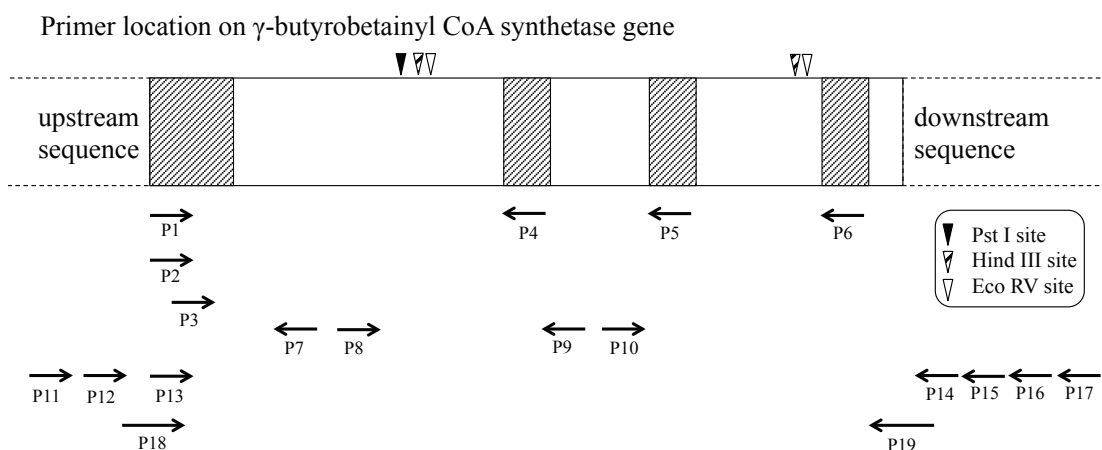
また N 末端アミノ酸配列情報から、相同性の高い ORF を列挙した。それらの配列を Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) により多重比較し、保存性の高い内部配列領域を推定した。推定 5'末端塩基配列と内部配列のそれぞれにプライマーを作成し、*Agrobacterium* sp. 525a のゲノム DNA を鋳

型として PCR を行った。予想増幅断片長に一致する PCR 産物をシーケンス
 につけ、内部配列を決定した。

決定した内部配列情報を元にインバース PCR を行い、内部配列両端の配列情
 報を取得した。また、決定した内部配列を改めて NCBI-BLAST につけ、列挙さ
 れた遺伝子を改めて Clustal W で多重比較し、本酵素遺伝子前後の ORF の推定
 保存配列を取得した。その情報を元にプライマーを作成し γ -ブチロバチニル
 CoA 合成酵素遺伝子全長の塩基配列を決定した。

なお、Fig. 19 は用いたプライマー配列情報とそれぞれのプライマーの推定ア
 ニーリング位置である。





Primer list using for γ -butyrobetainyl CoA synthetase gene cloning

Primer name	Sequence (5'-3')	Remarks
P1	ATGGARGCSTCSTCSATGACSAC	Constructed from N-terminal amino acid sequence
P2	ATGGARGCSAGCAGCATGACSAC	Constructed from N-terminal amino acid sequence
P3	ATGACSACSCGCCNCTBGA	Constructed from N-terminal amino acid sequence
P4	CCAGAYGAANGTGTGRTARTC	Constructed from conserved sequence
P5	ACVGCDCCGRCYTCSGWCTTRTG	Constructed from conserved sequence
P6	ADHGGRTTRAKVTCBAGTTC	Constructed from conserved sequence
P7	CATCGGAAAGTTCGTTCCACC	Used for Inverse PCR
P8	CTCACCCAATCCTCGAACAT	Used for Inverse PCR
P9	GAAGGTGTGGTAGTCGAGCG	Used for Inverse PCR
P10	ATTGGGTACCACCTGTGAT	Used for Inverse PCR
P11	GTTCCGGCMAGCCRATCGGC	Constructed from upstream sequence
P12	TCTGGGACGGCACATCGGAAATC	Constructed from upstream sequence
P13	ATGGAGGCATCCTCGATGACCACC	
P14	ATSGCRTTSGCYTTVGGSC	Constructed from downstream sequence
P15	CCARCCVSGCARAAGAAAYTTBTC	Constructed from downstream sequence
P16	CCRTARTCGCCRTCACMGCATC	Constructed from downstream sequence
P17	ATSAYCGGYTTGTTSAKVKCGC	Constructed from downstream sequence
P18	CGAACAAATGCAAC <u>CATATG</u> GAGGCATCC	NdeI site is underlined
P19	<u>GACGGATCCTGAT</u> TGGTCCTGTCATGC	BamHI site is underlined

Figure 19. Primer design for PCR and inverse PCR to obtain γ -butyrobetainyl CoA synthetase nucleotide sequence. PstI, HindIII, EcoRV, and SalI were used for inverse PCR. The homologue gene (*bcoA/B*) [Lonza, 1998] reportedly contains SalI, BamHI, PvuII, SacI, PvuI, SphI, and the XhoI site. γ -Butyrobetainyl CoA synthetase gene does not contain these sites.

(4.2.7) リコンビナント酵素の調製

Fig. 19 に示すプライマー P18 と P19 を用い、増幅した PCR 断片を pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen Corp.) に挿入させた。シーケンス解析により正しい挿入断片が入っている事を確認した。このプラスミドから pET-22b (Novagen Inc.) にサブクローニングした。

Escherichia coli Rosetta (DE3) 株に、このプラスミド (γ -ブチロベタインイル CoA 遺伝子挿入 pET-22b) 形質転換させた後、この大腸菌を LB 培地 (100 μ M カルベニシリン含) で以下に示す条件で培養した (37°C、1 h)。その後、IPTG を 0.1 mM になるよう添加し、酵素を誘導させた。誘導後、集菌 (遠心 : 8,000 $\times g$ 、20 分、4°C) し、菌体は使用時まで -20°C で保管した。

凍結した菌体 (75 mL 培養相当量) は 2 mL の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5、1 mM DTT 含) に懸濁させた後、超音波破碎 (使用機種 : Q125; Qsonica LLC, USA、破碎時間 : 5 分、4-10°C) によって破碎した。その後、遠心 (15,000 $\times g$ 、20 分、4°C) し上清をリコンビナント酵素溶液として分析に供した。

(4.2.8) 酵素反応生成物の同定

酵素反応の結果、ADP が生成するか AMP が生成するか確認するために HPLC により分析を行った。ヒドロキサム酸法による酵素活性測定の後、鉄試薬を加えない酵素反応溶液を以下に示す 2 つの方法で分析した。

1. 酵素カップリング法

反応液組成を以下に示す [180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、4.8 mM γ -ブチロベタイン塩酸塩、3.6 mM ATP- Na_2 、3.6 mM MgCl_2 、3.0 mM DTT、0.96 mM CoA- Li_3 、2.0 mM ホスホエノールピルビン酸、0.15 mM NADH、10 U mL^{-1} ミオキナーゼ (AMP 検出の際はミオキナーゼを添加したが、ADP 検出の際は除いた)、10 U mL^{-1} ピルビン酸キナーゼ、10 U mL^{-1} 乳酸脱水素酵素、酵素反応溶液 (150 μ L)、全量 1.2 mL]。酵素反応溶液を添加の後、340 nm における吸光度の減少を 30°C で経時的に分析した。

2. HPLC 法

上述の酵素反応液を遠心フィルター (Microcon 10K, Merck Millipore, Germany) にかけて、そのろ液を HPLC に供した。分析条件を以下に示す [使

用カラム : Jupiter C18 カラム ; 5 μm , 300 \AA , 250 \times 4.60 mm; Phenomenex Inc., USA、移動層 A : 5 mM 酢酸 buffer (pH 5.0)、移動層 B : 5 mM 酢酸 buffer (pH 5.0) + アセトニトリル (70/30)、泳動 0-14 分 : 100 % A buffer、14-34 分 : A \rightarrow B buffer、34-39 分 : 100 % B buffer、検出 : 260 nm]。

(4.3)結果

(4.3.1) γ -ブチロベタインル CoA 合成酵素の精製

精製の総括表を Table. 10 に示す。また精製酵素標品を Native-PAGE に供した結果を Fig. 20 に示す。このように精製の結果、単一には精製できていない事が明らかとなった (Fig. 20A)。 (4.2.5) に示したように、どのバンドが本酵素バンドに相当するか調べるために、切断したゲル片を用いてヒドロキサム酸法による酵素活性測定を行った。その結果、セクション No. 8 のゲルが最も高い吸光度を示した (Fig. 20B)。

Table 10. Purification of γ -butyrobetainyl CoA synthetase from *Agrobacterium* sp. 525a.

Purification step	Total activity (mU)	Total protein (mg)	Specific activity (mU \cdot mg $^{-1}$)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	9636	1901.0	5.1	100	1.0
Poros HQ-50	3268	87.0	38	34	7.5
Ammonium sulfate (0-60%)	1919	29.0	66	20	13
Butyl toyopearl	717	2.0	364	7.4	72
Mono-Q HR 5/50	110	0.1	976	1.1	193

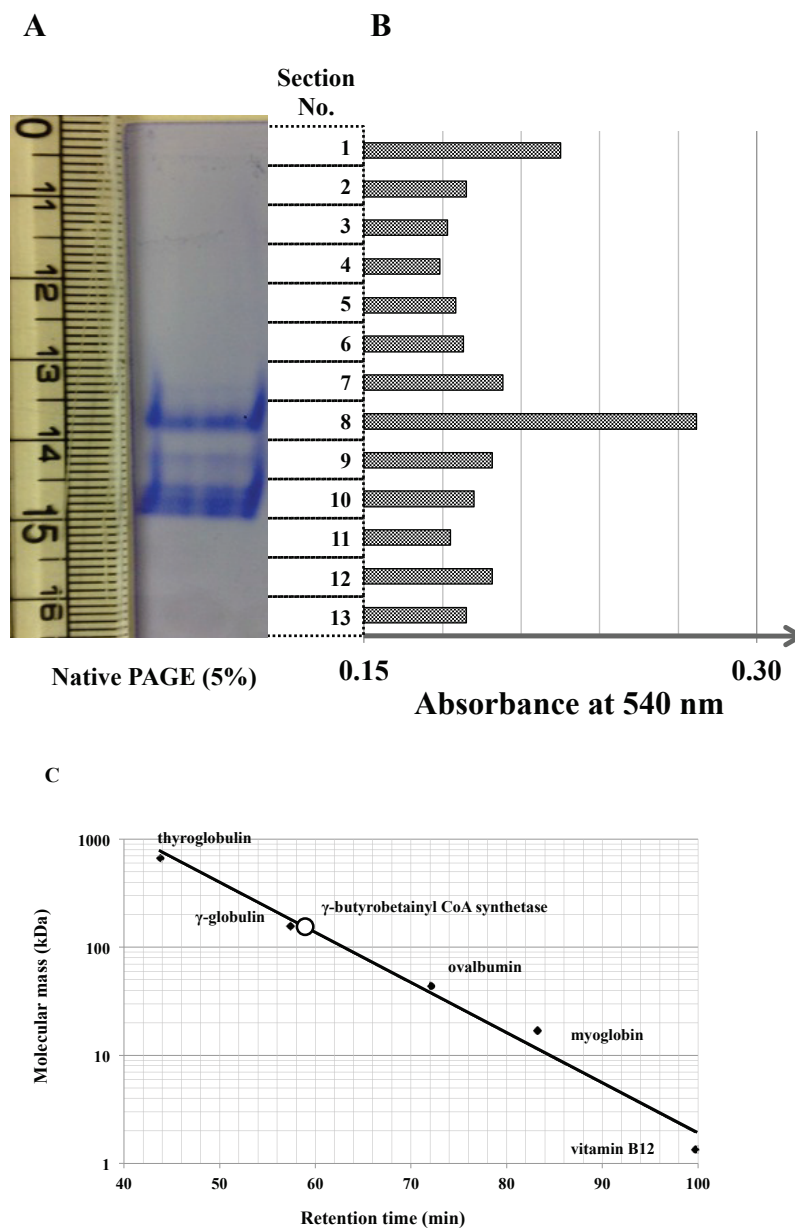


Figure 20. Analysis of purified γ -butyrobetainyl CoA synthetase by (A) Native-PAGE, (B) activity assay of the enzyme after Native-PAGE, and (C) estimation of the native molecular mass of purified enzyme using size exclusion chromatography on a Superdex 200 increase 10/300 GL column. Standard proteins used were thyroglobulin (670 kDa), γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (45 kDa), myoglobin (17 kDa), and vitamin B₁₂ (1.35 kDa).

このゲル部分のバンドを N 末端アミノ酸配列解析に供した結果、23 残基のアミノ酸配列が明らかとなった。その配列は MEASSMTTRPLDRLIRPKSIAVF であった。この配列をホモロジー解析した結果を Table.11 に示す。それぞれのタンパク質の親株はリゾビウム科に分類される種が多かった。

ゲルろ過法 [使用カラム : Superdex 200 increase カラム、使用 buffer : 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5、1 mM DTT、0.1 mM KCl)] によると本酵素の分子質量は 130 ± 15 kDa であった (Fig. 20C)。また、詳細は (4.3.2) で述べるが本酵素の全アミノ酸配列から推定される分子質量は 72.9 kDa であった。

Table 11. Comparison of N-terminal sequence of γ -butyrobetainyl CoA synthetase with other CoA synthetase.

Annotated function	Accession No.	Origin	N-terminal amino acid sequence	E value	Identity
γ -butyrobetainyl CoA synthetase		<i>Agrobacterium</i> sp. 525a	MEASSMTT--RPLDRLIRPKSIAVF		100%
acyl-CoA synthetase	WP_056322240.1	<i>Rhizobium</i>	MTT--RPLDRLIRPKSIAVF	4.00E-09	100%
acyl-CoA synthetase	WP_034510384.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	MTP--RPLDRLIRPKTIAVF	1.00E-06	89%
acyl-CoA synthetase	WP_053248333.1	<i>Ensifer adhaerens</i>	MTI--RSLDRLIRPKSIAVF	2.00E-06	88%
acyl-CoA synthetase	WP_012708684.1	<i>Sinorhizobium fredii</i>	MGRGLFQRRRSMTPPRSLDRLIRPRPSIAVF	5.00E-06	81%
acyl-CoA synthetase	WP_047640634.1	<i>Rhizobium tropici</i>	MT--PRPLDRLIRPRRTIAVF	9.00E-06	83%
acyl-CoA synthetase	WP_037387082.1	<i>Sinorhizobium americanum</i>	MSTPRRPLDRLIRPRPSIAVF	1.00E-05	80%
CoA-binding domain-containing protein, partial	WP_003536658.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	WQRSEGDAMTTPARSLDRLIRPRPSIAVF	2.00E-05	71%
acyl-CoA synthetase	WP_037209640.1	<i>Rhizobium</i> sp. YR295	MT--RSLDRLIRPKSIAVF	2.00E-05	89%
acyl-CoA synthetase	WP_028749984.1	<i>Rhizobium leucaenae</i>	MTQ--RPLDRLIRPQTIAVF	3.00E-05	83%
acyl-CoA synthetase	WP_010969805.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MTTPRSLDRLIRPRPSIAVF	3.00E-05	80%

Note: Amino acids are abbreviated to one-letter symbols; identical amino acid residues are presented in bold.

(4.3.2) リコンビナント酵素の調製とアミノ酸配列解析

リコンビナント酵素のN末端アミノ酸配列は野生株由来のN末端アミノ酸配列と完全に一致し、クローニングに成功したと判断した。693 残基からなる全アミノ酸配列をホモロジー解析した結果、相同性が最も高いタンパク質は *Rhizobium* 由来アシル CoA 合成酵素であり、その相同性は 95 %であった (Table. 12)。

全アミノ酸配列のドメイン解析を行った結果、CoA 結合ドメイン、コハク酸 CoA リガーゼ様フラボドキシンドメイン、ATP 結合ドメインという 3 つの特徴的なドメインが見つかった (Fig. 21)。

Table 12. Comparison of amino acid sequence of γ -butyrobetainyl CoA synthetase with other CoA synthetase.

Annotated function	Accession No.	Origin	Amino acid sequence identity
acyl-CoA synthetase	WP_056322240.1	<i>Rhizobium</i>	95%
acyl-CoA synthetase	WP_037209640.1	<i>Rhizobium</i> sp. YR295	82%
acyl-CoA synthetase	WP_037160247.1	<i>Rhizobium</i> sp. CF258	82%
acyl-CoA synthetase	KQS97819.1	<i>Rhizobium</i> sp. Leaf386	82%
acyl-CoA synthetase	WP_037096441.1	<i>Rhizobium</i> sp. OK665	82%
CoA-binding domain-containing protein	WP_023513347.1	<i>Shinella</i> sp. DD12	82%
acyl-CoA synthetase	WP_026617856.1	<i>Ensifer</i> sp. TW10	82%
acyl-CoA synthetase	WP_046118830.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. PC2	81%
acyl-CoA synthetase	WP_050744489.1	<i>Shinella</i>	81%
acyl-CoA synthetase	KQY36125.1	<i>Rhizobium</i> sp. Root483D2	81%

Diagram illustrating the domain structure of a protein sequence, with domains highlighted by boxes and lines pointing to their respective regions in the sequence. The domains are:

- N-terminal homologous sequences**: Located at the beginning of the protein.
- CoA binding domain**: Located near the N-terminus.
- Succinyl-CoA ligase like flavodoxin domain**: A large central domain.
- ATP-grasp domain**: Located at the C-terminus.

Sequence alignment showing conserved regions across species: *Agrobacterium* sp. 525a, *Rhizobium*, *Ensifer* sp. TW10, *Sinorhizobium* sp. PC2, *Rhizobium* sp. YR295, and *Shinella* sp. DD12. Conserved residues are indicated by asterisks (*).

```

Agrobacterium sp. 525a MEASMTT--RPLDRLIRPKSIAVFGGKEARRVIEQCCKMGFAGEIWPVHPKLDDVLGRK 58
Rhizobium             -----MTT--RPLDRLIRPKSIAVFGGKEARRVIEQCCKMGFAGEIWPVHPKLDDVLGRK 53
Ensifer sp. TW10      -----MTTTPRSLDRLIRPRSIAVFGGKEARRVIEQCCKMGFAGTIWPVHPRBEELGRR 55
Sinorhizobium sp. PC2 -----MTTTPRSLDRLIRPRSIAVFGGKEARRVIEQCCKMGFAGTIWPVHPRBEELGRR 55
Rhizobium sp. YR295  -----MT--RSLDRLIRPKSIAVFGGKEARRVIEQCCKMGFTGDIWPVHPKQDEIFGRR 52
Shinella sp. DD12    ---MAGIARNTPLDRLIRPKSIAVFGGKEARRVIFQCCKMGFSGEIPVHPPREDEILGRK 57
                        .*****:*****:***** *:****:* *****: *::*:**

Agrobacterium sp. 525a CYRSVADLPAAPDAAFVGVNRQLTIEIRDLRSARGAGGAIACYASGFREAVNELSDGNELO 118
Rhizobium             -----CYRSVADLPAAPDAAFVGVNRQLTIEIRDLRSARGAGGAIACYASGFREAVNELSDGNELO 113
Ensifer sp. TW10      -----CYRSVADLPEAPDASFVGNRLTIEIRDLAARGAGGAVCYASGFREAAELADGNELO 115
Sinorhizobium sp. PC2 -----CYRSVADLPEAPDASFVGNRLTIEIRDLAARGAGGAVCYASGFREAAELADGNDLO 115
Rhizobium sp. YR295  -----CYRSVAELPAAPDASFVGVNRQLTIEIRDLAARGAGGAIACYASGFREAVSELADGNDLO 112
Shinella sp. DD12    -----CYRSVADLPGAPDASFVGVNRELTIIGIIRDLRSARGAGGAVCYASGFREAVSELSDGDLO 117
                        *****:*** ***:***** ** *****:*****:*****.....*:**:*:***

Agrobacterium sp. 525a SALVEAAGDMAVVGPNICYGINMLDGLLWPDQHGMLRVERGVAVLTSQSSNIACNVSMQM 178
Rhizobium             -----SALVEAAGDMAVVGPNICYGINMLDGLLWPDQHGMLRVERGVAVLTSQSSNIACNVSMQM 173
Ensifer sp. TW10      -----EALVAAAGDMPVVGPNICYGINMLDGLLWPDQHGMLRVERGVAVLTSQSSNIACNISMOK 175
Sinorhizobium sp. PC2 -----EALVAAAGDMSVVGPNICYGINMLDGLLWPDQHGMLRVERGVAVLTSQSSNIACNISMOK 175
Rhizobium sp. YR295  -----DALVAAAGDMPVVGPNICYGINALDGLLWPDQHGMLRVERGVAVLTSQSSNIACNISMOK 172
Shinella sp. DD12    -----KALVAAAGMMPVLPNCYGINMLDGLLWPDQHGMLRTEKGVAVLTSQSSNIACNISMOK 177
                        .*** ***:**.:***** ***** ***** *.:*****:*****:***

Agrobacterium sp. 525a RGLPLAYLMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLAKRARELKK 238
Rhizobium             -----RGLPLAYLMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLAKRARELKK 233
Ensifer sp. TW10      -----RGLPLAYVMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLATRARELRK 235
Sinorhizobium sp. PC2 -----RGLPLAYVMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLATRARELRK 235
Rhizobium sp. YR295  -----RGLPLAYVMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLAARARDLKK 232
Shinella sp. DD12    -----RGLPLAYLMTAGNQAQMGSLDLACAVIEDPRVTAVGLHIEGFDSEIALERLQORARDLKK 237
                        *****:***** ***:**.:**.*.*****:*****:***:*. ***:**

Agrobacterium sp. 525a PUVTLKVGKSEAAQLATVSHASLAGNDVSSALLARLIGRVDLPELLETLLKLLHLHG 298
Rhizobium             -----PUVTLKVGKSEAAQLATVSHASLAGNDVSSALLARLIGRVDLPELLETLLKLLHLHG 293
Ensifer sp. TW10      -----PUVTLKVGKSEAAQAATVSHASLAGNDRVSSALLARLIGRVDLPELLETLLKLLHLHG 295
Sinorhizobium sp. PC2 -----PUVTLKVGKSEAAQAATVSHASLAGNDRVSSALLARLIGRVDLPELLETLLKLLHLHG 295
Rhizobium sp. YR295  -----PUVTLKVGKSEAAQLATVSHASLAGNDVSGALLERLIGRVDLPELLETLLKLLHLHP 292
Shinella sp. DD12    -----PUVTLKVGKSEQAQLATVSHASLAGNDVSSALLARLIGRVDLPELLETLLKLLHLVAG 297
                        ***** ** * ***** **.* *****:*****:*****

Agrobacterium sp. 525a TLKSPDISSMSCSGGEASLMADAGVGRKVVYRALKDQROPLRESLGMVTISNPLDYHT 358
Rhizobium             -----TLKSPDISSMSCSGGEASLMADAGVGRKVVYRALKDQROPLRESLGMVTISNPLDYHT 353
Ensifer sp. TW10      -----PLPNADISSMCSGGEASLMADAGVRRS VNFRLKEEQRRLRESLGMVTIANPLDYHT 355
Sinorhizobium sp. PC2 -----PLPNADISSMCSGGEASLMADAGVRRS VNFRLKEEQRRLRESLGMVTIANPLDYHT 355
Rhizobium sp. YR295  -----PLKSLDVSSMCSGGEASLMADAGVRRKTVFRALKDEQROPLRESLGMVTIANPLDYHT 352
Shinella sp. DD12    -----PLPNADISSMCSGGEASLMADAGVRRKVVYRALKDQROPLRESLGMVTISNPLDYHT 357
                        .* * ***** ***** *..:***: ** * ****:****:*****

Agrobacterium sp. 525a FVWGNREKQTTAFSMMKGDYAINLIVLDFPRQDRCDAAADWVTTCDVIDASRATGAVAG 418
Rhizobium             -----FVWGNREKQTTAFSMMRGDYAMNLI VLDFFPRQDRCDAAADWVTTCDVIDASRATGAVAG 413
Ensifer sp. TW10      -----FVWGNREKQTAAFAAMRRGGYALNLI VLDFFRLDRCDAAADWVTTCEAVIDAADATGAVAG 415
Sinorhizobium sp. PC2 -----FVWGNREKQTAAFAAMRRGGYALNLI VLDFFRLDRCDAAADWVTTCEAVIDAADATGAVAG 415
Rhizobium sp. YR295  -----FVWGNLEKQTTAFSMMKGDYAINLIVLDFPRQDRCDAAADWVTTCEAVIASAKATGAVAG 412
Shinella sp. DD12    -----FVWGNREKQTAAFTTMEGGYGLNLI VLDFFRLDRCDASDWITTCCHAVIDAATGAVAG 417
                        ***** :*****:*** **.*.:**:* ***** ** ***:** ***:**

Agrobacterium sp. 525a IVASLGENMPEETALRLMAEKVVPFSGIEEALTACEISAEIGRLWAQPEAGPLLAVSHSE 478
Rhizobium             -----IVASLGENMPEETALRLMAEKVVPFSGIDEALTACEIAAEIGRLWSQDAEPLLVSHSE 473
Ensifer sp. TW10      -----IVASLGENMPEETALSLMAGVVPFSGIDEALAAAEATAAIGASWARAAAPLLQVRPDT 475
Sinorhizobium sp. PC2 -----IVASLGENMPEETALSLMAGVVPFSGIDEALAAAEATAAIGASWARAAAPLLQVRPDT 475
Rhizobium sp. YR295  -----IVASLGENMPEETALSLMASGVVAFSGIDEALAAAEISAGIGASWAKPAPEPLLSAASE 472
Shinella sp. DD12    -----IVASGENMPEETAEMLMQNGVVPFSGIEEALAAADAAAGIGEARWOPASPLLVGGE 477
                        *****:*****:*** **.* **:* *****:*. : ** * **:. ** *

Agrobacterium sp. 525a GDSVTLSEHEAKSELAAFGLTIPOGLTAEATAEQAADAAEKLGFPPVVLKGGVAHKTEAGA 538
Rhizobium             -----GESATLSEHEAKTELAFFGVTIPQGLTAEATAEQAADAAEKLGFPPVVLKGGVAHKTEAGA 533
Ensifer sp. TW10      -----GHAVTLTEAEAKSEL SASGITVPNGITAEATAEQAADAAEKLGFPPVVLKGLGVAHKTEAGA 535
Sinorhizobium sp. PC2 -----GHAVTLTEAEAKSEL SASGITVPNGITAEATAEQAADAAEKLGFPPVVLKGLGVAHKTEAGA 535
Rhizobium sp. YR295  -----GEIITISESEAKAEALAKFGLVVPMGKVALTAEAAADAEKLGFPPVVLKGLGVAHKTEAGA 532
Shinella sp. DD12    -----GEPVTLTEHEAKQALAAHGLAVPKGLTAEATAEAAAANAEKLGFPPVVLKGLGVAHKTEAGA 537
                        *. **:* ** * : *.:** * ** * ** * *****:***** *****

Agrobacterium sp. 525a VKLNLASREAVLEAARAMAGVASGYLVEKMKVPAEELVIGAMRDPVAGPVLTVGAGGIL 598
Rhizobium             -----VKLNLASREAVLDAAKAMAGVASGYLVEKMKVPAEELVIGAMRDPVAGPVLTVGAGGIL 593
Ensifer sp. TW10      -----VKLNLASRDEVLAQAAGMASVASGYLVERMIKPVAEELVIGAMRDPVAGPALTVGAGGIL 595
Sinorhizobium sp. PC2 -----VKLNLASRDEVLAQAAGMASVASGYLVERMIKPVAEELVIGAMRDPVAGPALTVGAGGIL 595
Rhizobium sp. YR295  -----VKLNLADRSQSVLDAADAMAGVASGYLVEKMIKPVAEELVIGALRDPVAGLVLTGAGGIL 592
Shinella sp. DD12    -----VKLNLADRAAVLAAAKTMADVAGSGLVLEKMKVPAEELVIGAMRDPVAGPVLTVGAGGIL 597
                        *****.* ** * * *****:*****:*****:*****:*****.***:*****

Agrobacterium sp. 525a VELLEDSAILTLPDENAIRKALSGLKVAKLLGGYRQPKGVDALVAVASVAVSVVSN 658
Rhizobium             -----VELLEDSAILTLPDENAIRTALSGLKVAKLLGGYRQPKGDIDALVAVASVAVSVVSN 653
Ensifer sp. TW10      -----VELLEDSAILTLPTEEAIEAIAAGLKS HKLLDGYRGGPKGDDVAALIRTVAAVASVVAAN 655
Sinorhizobium sp. PC2 -----VELLEDSAILTLPTEEAIEAIAAGLKS HKLLDGYRGGPKGDDVAALIRTVAAVASVVAAN 655
Rhizobium sp. YR295  -----VELLEDSAILTLPTEPEAIEAIAAGLKS HKLLDGYRGGPKGDIQALSAVAVASVVAAN 652
Shinella sp. DD12    -----VELLEDSAILTLPTEDEAIEAIAAGLKS HKLLDGYRGGPKGDIQALSAVAVASVVAAN 657
                        *****:***** ** *.:** * ** * ***** ** *.:** *.:** *.:**

Agrobacterium sp. 525a ASMIEEVDINPIMVLEPGLGTVAADALIRRRRGA 693
Rhizobium             -----ASMIEEVDINPIMVLEPGLGTVAADALIRRRGTGA 688
Ensifer sp. TW10      -----ASKLEELDINPIMVLEPGLGTVAADALIRRRK--- 687
Sinorhizobium sp. PC2 -----ASKLEELDINPIMVLEPGLGTVAADALIRRRK--- 687
Rhizobium sp. YR295  -----AAKLEELDINPIMVLEPGLGTVAADALIRRRK--- 684
Shinella sp. DD12    -----ASITIEELDINPIMVLEPGLGTVAADALIRLRKNP- 691
                        *: **:* ***** ** * ***** **

```

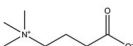
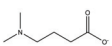
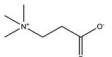
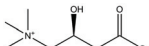
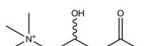
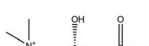




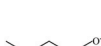
Figure 21. Comparison of γ -butyrobetainyl CoA synthetase with homologous proteins. These enzymes are shown with host strain names: *Agrobacterium* sp. 525a, γ -butyrobetainyl CoA synthetase; *Rhizobium*, acyl-CoA synthetase (WP_056322240.1); *Ensifer* sp. TW10, acyl-CoA synthetase (WP_026617856.1); *Sinorhizobium* sp. PC2, acyl-CoA synthetase (WP_046118830.1); *Rhizobium* sp. YR295, acyl-CoA synthetase (WP_037209640.1); and *Shinella* sp. DD12, CoA-binding domain-containing protein (WP_023513347.1).

(4.3.3) 基質特異性

部分精製した野生株由来酵素およびリコンビナント酵素の基質特性を、ヒドロキサム酸法で評価した。結果を Table. 13 に示す。両酵素とも γ -ブチロベタインを最も良い基質として認識した。また *N*-ジメチルアミノ酪酸を中程度認識した。 MgCl_2 の代わりに MnCl_2 を用いた場合、野生株酵素では活性があがる傾向にあったが、リコンビナント酵素では活性は半減した。核酸関連化合物については ATP の代わりに GTP を用いると両酵素とも著しく活性が下がるか、全く代替できないという結果であった。リコンビナント酵素でのみの評価だが、ATP の代わりに ADP、AMP は利用できなかった。

また γ -ブチロベタイン、CoA、ATP について、酵素反応速度パラメーターを求めた (Table. 14)。またこのパラメーターを求めた際、CoA と ATP については基質阻害が確認された (Fig. 22)。

Table 13. Substrate specificity of wild and recombinant γ -butyrobetainyl CoA synthetase.

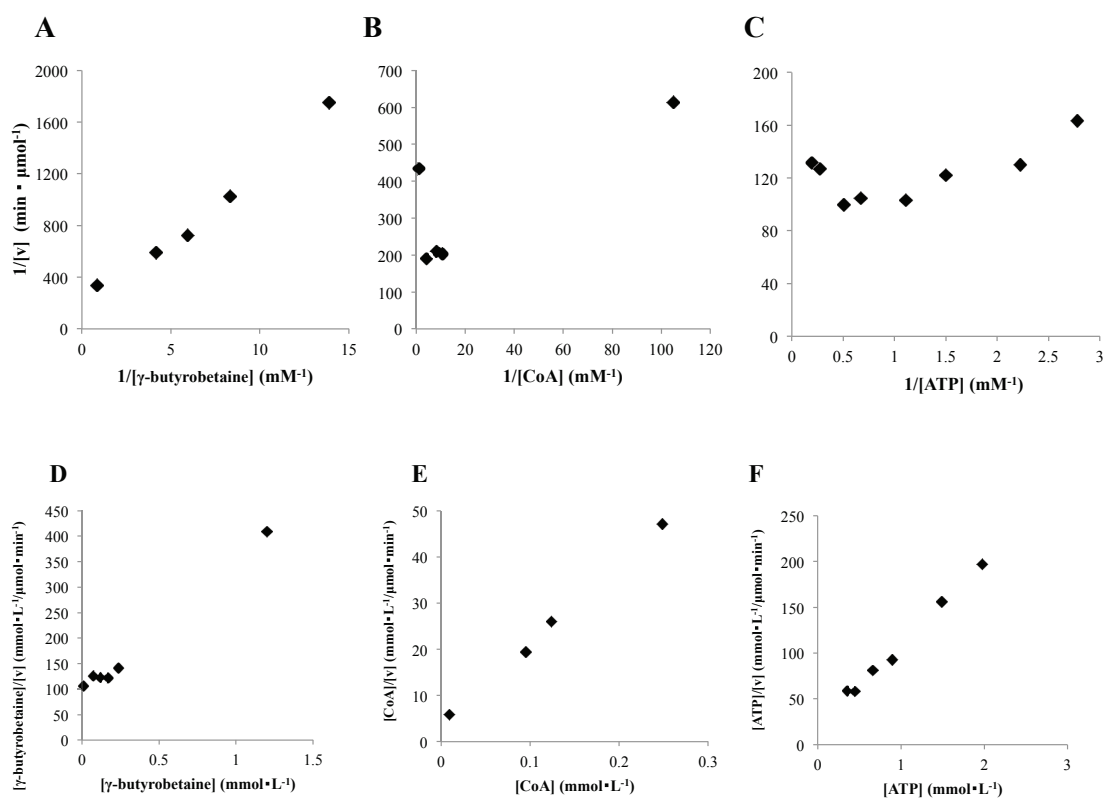
Substrate		Relative activity (%)	
		Wild-type	Recombinant
γ -butyrobetaine		100	100
<i>N</i> -dimethylaminobutyric acid		55	42
β -alaninebetaine		0.7	7.8
<i>D</i> -carnitine		18	8.3
<i>D,L</i> -carnitine		NT	6.0
<i>L</i> -carnitine		6.7	3.1
3-dehydrocarnitine		NT	0
glycinebetaine		0	0
monomethylaminobutyric acid		2.4	0
γ -aminobutyric acid (GABA)		0	0
butyric acid		0	0
$MnCl_2$		117	54
GTP		14	0
ADP		NT	0
AMP		NT	0

Note: $MnCl_2$ or GTP, ADP, and AMP were replaced with $MgCl_2$ or ATP of the same concentration (3.6 mM). NT, not tested.

Table 14. Kinetic parameters of recombinant γ -butyrobetainyl CoA synthetase.

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$)
γ -butyrobetaine	0.69	0.65	0.94
CoA	0.02	0.29	15
ATP	0.24	1.15	4.8

Notes: K_m and k_{cat} value were calculated using suitable kinetic plots. γ -butyrobetaine values were calculated using a Michaelis–Menten plot (Fig. 22A). CoA and ATP values were calculated using a Hanes–Woolf plot (Fig. 22E and 22F).

**Figure 22.** Kinetic profiles of γ -butyrobetainyl CoA synthetase with several substrates.

(4.3.4) pH および温度に対する反応性

リコンビナント酵素を用い、pH および温度に対する反応性をヒドロキサム酸法で評価した (Fig. 23)。反応至適温度は 35°C であった。種々の温度で 30 分インキュベートした後、活性を評価した結果、熱安定性について 35°C まで安定であったが、45°C では完全に失活した。反応至適 pH は 8.2 であったが、リン酸カリウム buffer では特に活性が低い結果が得られた。pH 安定性については、本酵素は比較的広い範囲で安定である事が分かった。

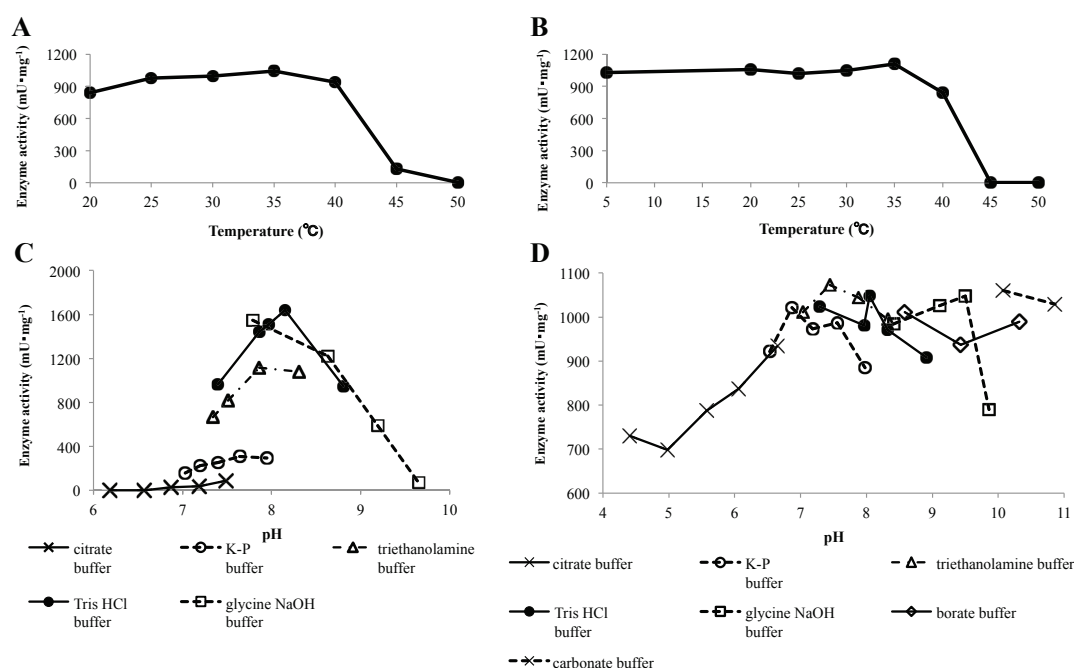


Figure 23. Effects of temperature and pH on enzyme activity and stability of recombinant γ -butyrobetainyl CoA synthetase: (A) optimum temperature, (B) temperature stability, (C) effect of pH on enzyme activity, and (D) pH stability of recombinant enzyme. Experimental conditions are specified in *Materials and Methods*.

(4.3.5) 酵素反応生成物の同定

HPLC を用い、酵素反応生成物を分析した。Fig. 24 に示すように、酵素反応の結果 ATP が減少する事に伴い ADP が増加する事が確認できた。一方、AMP とと思われるピークは検出されなかった。酵素カップリング法でも酵素反応生成物を確認したが、ADP を検出するために用いるピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素添加条件で活性が検出できた。

以上の結果から、本酵素は酵素反応生成物として AMP ではなく ADP を生成すると決定した。

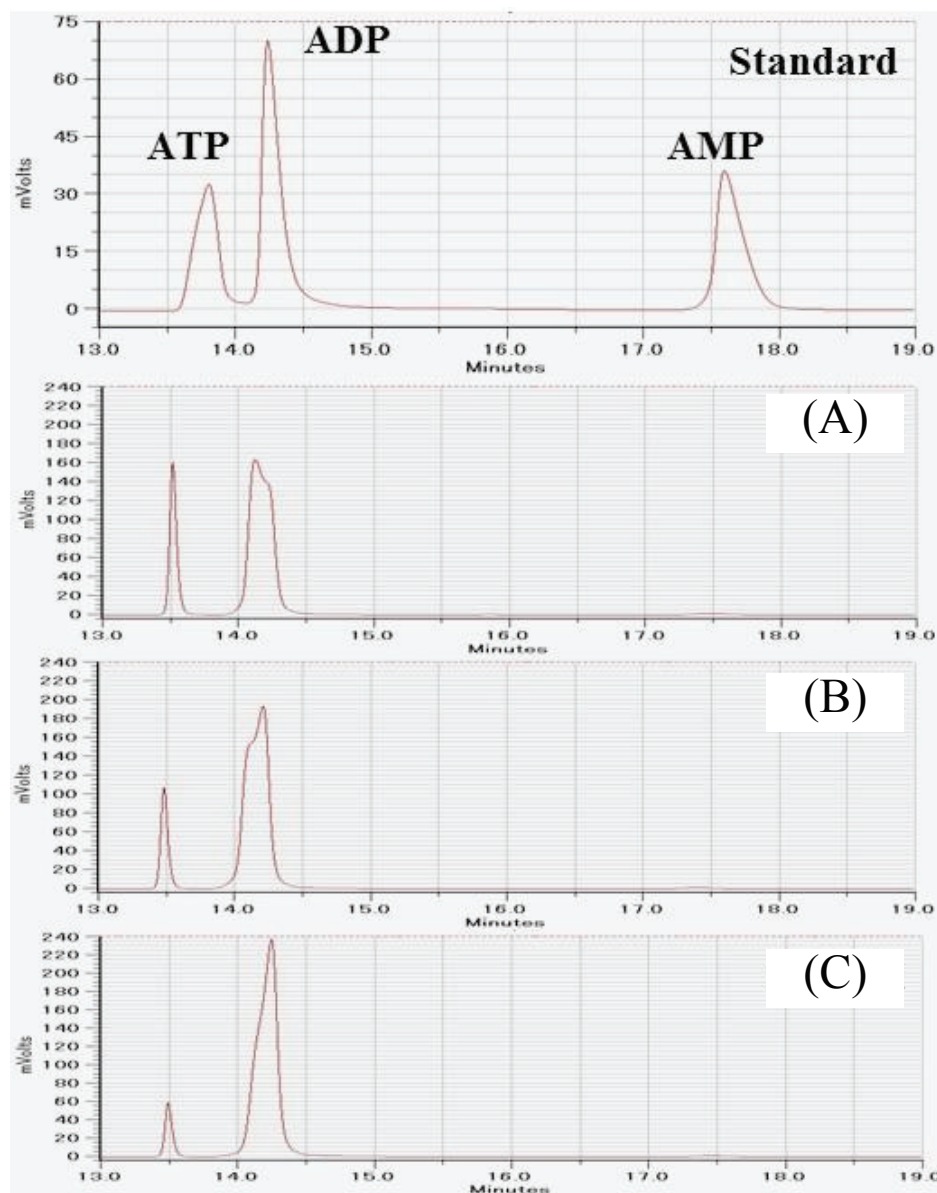


Figure 24. Identification of reaction products of partially purified γ -butyrobetainyl CoA synthetase obtained using an HPLC system equipped with a Jupiter C18 column (5 μ m, 300 \AA , 250 \times 4.60 mm) at a flow rate of 1 mL/min. The assays were conducted with different reaction times: (A) 30 min, (B) 60 min, and (C) 120 min.

(4.3.6) γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素遺伝子および 周辺 ORF の解析

本酵素遺伝子配列をホモロジー検索にかけた結果、相同性が最も高い遺伝子配列は *Sinorhizobium fredii* NGR234 complete genome (Accession No. CP001389.1) 由来の配列であり、その相同性は 79%であった (Table. 15)。

また本酵素遺伝子を含む前後の ORF についても配列決定を試みた。ホモロジー解析の結果、リゾビウム科細菌において本酵素遺伝子を含めて前後にホモログ遺伝子が存在し、オペロンを形成している事が推測できた。Fig. 25 に上述の *Sinorhizobium fredii* NGR234 の本酵素遺伝子ホモログ (推定機能:アシル CoA 合成酵素) を含む前後の ORF について示す。これら遺伝子の推定機能から考えると、このオペロンは γ -ブチロベタイン (ないし類似化合物) の β 酸化分解に関わると推測された。また本章考察で後に述べるが、これまで不明であった L-カルニチン分解の過程で 3-デヒドロカルニチンとコリン分解系とをつなぐ可能性がある ORF (Hypothetical protein, Fig. 25) も発見する事ができた。

Table 15. Comparison of nucleotide sequence of γ -butyrobetainyl CoA synthetase with other sequence

Origin	Accession No.	Max score	Query cover	Nucleotide sequence identity
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234, complete genome	CP001389.1	1384	97%	79%
<i>Ensifer adhaerens</i> OV14 chromosome 1 sequence	CP007236.1	1325	97%	79%
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 main chromosome, complete sequence	HE616890.1	1323	97%	79%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> strain RMO17, complete genome	CP009144.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011, complete genome	CP004140.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm41 complete genome	HE995405.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11, complete genome	CP001830.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> AK83 chromosome 1, complete sequence	CP002781.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C, complete genome	CP002740.1	1273	97%	78%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 complete chromosome	AL591688.1	1273	97%	78%

が報告され (Lindstedt G et al., 1970)、その諸性質が報告されている (Lindstedt G et al., 1977)。一方、L-カルニチンは γ -ブチロベタインを原料として、工業的に生産されている。その時に *Agrobacterium* あるいは *Rhizobium* 属の CoA が関与する β 酸化類似経路を利用して生産すると考えられている (Lonza, 1998)。しかし、この CoA 関与の酵素群については、精製はもちろん活性を検出したという報告も無い。

本研究で新奇に発見された本酵素の基質特異性を検討したところ、Table. 13 で示すように、 γ -ブチロベタインおよび N-ジメチルアミノ酪酸をよく認識した。N-ジメチルアミノ酪酸は人工的に合成された化合物のため、*Agrobacterium* 内の生理的条件では γ -ブチロベタインに特異的に作用しているものと考えられる。また興味深いのは野生株由来酵素、リコンビナント酵素ともに D-カルニチンおよび L-カルニチンについては D-カルニチンを良い基質として認識する傾向があったという事である。D-カルニチンも非天然の化合物であると考えられており、どうして本酵素が D-カルニチンを認識するのかは不明である。研究に使用した *Agrobacterium* sp. 525a は D-カルニチン培地生育し、D-カルニチン脱水素酵素を産生する事が報告されている (Setyahadi S et al., 1997)。このことも本酵素の D/L-認識に関わっている可能性はあるが詳細は不明である。

本酵素の性質検討の際、ゲルろ過により分子質量の推定を行った。結果で示したように Fig. 20 で示したように本酵素は 130 ± 15 kDa であり、ホモダイマー構造を有していると考えられる。

また驚いた事にゲルろ過を行った際の活性回収率は 10%以下であり、比活性もゲルろ過前の強陰イオン交換樹脂 (Mono-Q) サンプルの 20%程度まで下がってしまった。ゲルろ過による溶出図を Fig. 26 (280 nm における吸光度を測定) に示した。Fig. 26 に示すように、大きなピークが 3 つ検出された。本酵素活性は、一番大きい分子質量を示す最初のピークで検出された。一方で分子量 20 kDa 程度と 1-2 kDa 程度の低分子画分に強いピークが検出されたが、これらの画分に酵素活性は無かった。そこで 1-2 kDa 程度のフラクションを 1 番目の酵素活性のあったピークと混ぜて活性を測定したところ、酵素活性が 1.5-2 倍程度に活性が回復した。このことから、何らかの補因子が本酵素に関わっている可能性がある。

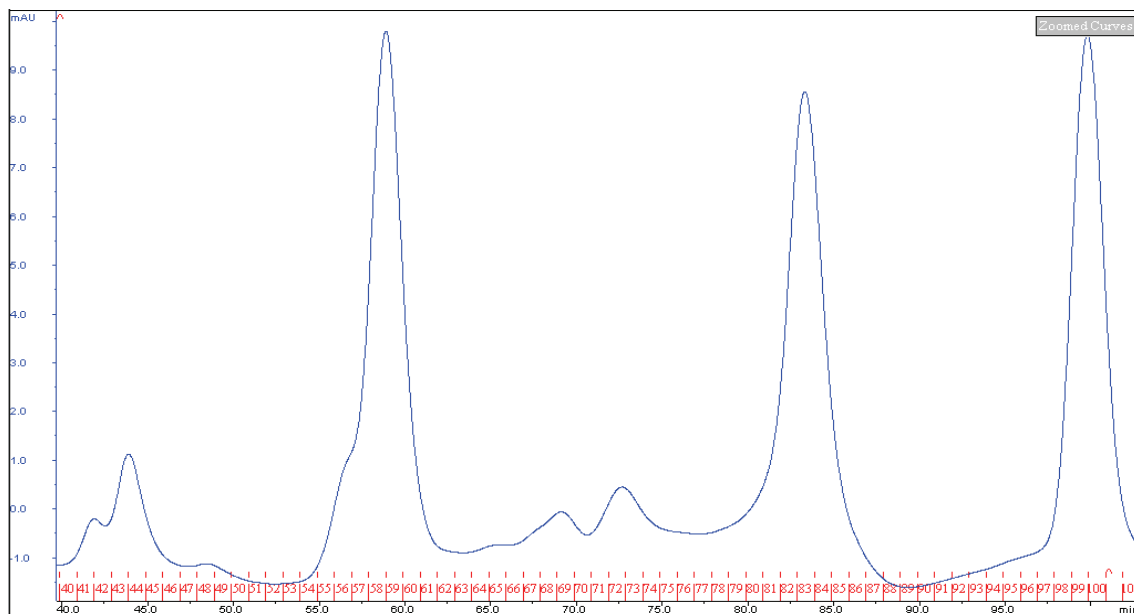


Figure 26. The elution curve of Superdex 200 increase column chromatography. First strong peak has enzyme activity. The estimated molecular masses of second and third peaks are 20 kDa and 1-2 kDa.

また Fig. 25 に示したように、本酵素遺伝子はオペロンを形成していると推定される。BLAST 検索によって見つかった本酵素遺伝子のホモログの多くで、類似した推定機能を持った ORF が保存されていたことから、オペロンを形成していると推定した。前後の ORF の推定機能はどれも β 酸化類似の酵素であり、これまでの情報とも一致する。

このオペロンの中で特に興味深いのは一番上流にある「Hypothetical protein」である。この ORF は十分な機能推定ができていないようで、この配列でホモロジー検索をかけても機能の推定ができていない酵素がほとんど見つからなかった。しかし最も関連がありそうな酵素として 3-keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme が見つかった。本酵素はリジンの分解に関わる酵素として報告されており (Kreimeyer A et al., 2007)、基質となる 3-keto-5-aminohexanoate は 3-デヒドロカルニチンと比較的近い構造を有している。3-keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme の酵素反応式を Fig. 27 (Annett K et al., 2007 より引用) に示す。このようにカルボニル部分を攻撃する事で、リジンの側鎖由来の C-C 結合を開裂させている。

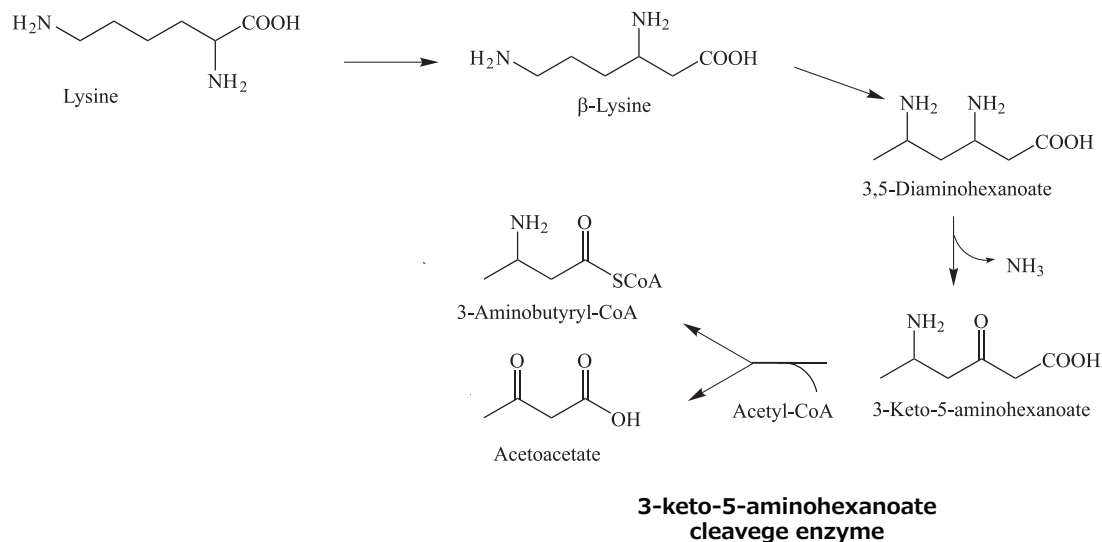


Figure 27. 3-Keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme involving lysine degradation.

このカルボニル部分は 3-デヒドロカルニチンで言うと、L-カルニチン脱水素酵素反応によって酸化される、3 位部分に相当する。もしこの部分が開裂するとグリシンベタインないしその誘導体が産生すると考えられる。

また Fig. 27 の反応では加水分解ではなくチオリシス反応が起こっている事が示されている。L-カルニチンに関わる 3-デヒドロカルニチンからグリシンベタインへの代謝経路をつなぐ反応は、Fig. 27 に類似した反応ではないかと推測している。

本研究でクローニングした酵素は種々のアシル CoA 合成酵素と類似していたが、そのほとんどすべてがアシル CoA 合成酵素としか推定されておらず、どのような基質を認識する酵素か推定できていないようだった (Table. 12)。本研究により、これらの酵素が γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素として、推定されることが考えられる。また Table. 12 には示していないが、いくつかの酵素は NDP-forming (反応副生成物として ADP や GDP を産生する酵素) と推定されていた。

L-カルニチンの工業生産に関する特許 (Lonza, 1998) には、 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素をコードする ORF (BcoA) の制限酵素地図が記載されているが、Fig. 19 で示したように、本研究でクローニングした遺伝子とは制限酵素

地図が一致しなかった。それ故、本酵素と工業生産に用いられている酵素は全く別の酵素の可能性が示唆された。また特許で述べられている酵素は AMP-forming 酵素と記述されている。一方、本研究でクローニングした酵素は ADP-forming であった。加えて、本酵素は Fig. 23C で示したようにリン酸カリウム buffer では活性が著しく低下する。これは反応 (副) 生成物が ADP と Pi であることを支持する結果である。

以上の結果から、本研究では新奇の酵素のクローニングに成功したと判断した。本酵素と類似の反応を触媒する酵素として2つの酵素が報告されている。ひとつは *Pseudomonas aeruginosa* 由来の PA1999-2000 の転写産物である。本転写産物は3-デヒドロカルニチル CoA 合成酵素と報告されており (Wargo MJ and Hogan DA, 2009)、本転写産物は *P. aeruginosa* のカルニチン異化に必須であると考えられている。もうひとつは *Escherichia coli* 由来の CaiC 転写産物である。本転写産物はカルニチン存在下で嫌気条件の時、他の cai タンパク質と協調して、カルニチンを電子受容体として利用する生理的機能があると考えられる (Bernal V et al., 2008)。しかしこれらの塩基配列と本酵素遺伝子の配列は全く異なる。

以上の理由から本酵素は全く新しい酵素であると考えられる。

結論

本論文では、第4級アンモニウム化合物分解経路およびその経路に関与する酵素について諸性質を明らかにし、これまでに報告されている他の類似酵素などと比較しながら、新たな知見を見つける事を目的として、研究・実験・調査した詳細について報告する。

生体内で代表的な第4級アンモニウムのひとつにコリンがある。この化合物は高等生物においては神経伝達物質のアセチルコリンの構成因子として重要な役割を占めているが、あらゆる生物にとって普遍的に重要なのは生体膜を構成するホスファチジルコリンの構成因子としての機能である。そのため多くの生物はコリンを恒常的に利用している。またそれ故、コリンを資化できる微生物も多く存在する事が容易に想像できる。

微生物におけるコリンの分解については種々の報告がある。たとえばカビ等の糸状菌はコリン酸化酵素を用い、コリンを分解している。また原核生物において、*Pseudomonas* 属細菌や大腸菌 (*E. coli*) は脱水素酵素によりコリンを分解しているが、*Arthrobacter* 属細菌や *Alcaligenes* 属細菌はコリン酸化酵素を有している事が報告されている。またコリンを窒素源として生育できる酵母はコリンを水酸化酵素により分解している。

このように生物よって分解経路、分解酵素は大きく異なる。そこでコリンアナログである 4-N-トリメチルアミノ-1-ブタノール (TMA-ブタノール) の分解菌について研究が行われた。原核生物である *Pseudomonas* sp. 13CM は TMA-ブタノールを単一の炭素・窒素源として生育でき、またその際、 NAD^+ 依存型 TMA-ブタノール脱水素酵素を利用している事が明らかとなっている。

前述のようにコリンの場合は原核生物と真核微生物で分解酵素が異なることから、本研究では真核微生物由来の新奇 TMA-ブタノール分解酵素をスクリーニングした。その結果、*Fusarium merismoide* var. *acetilereum* が選抜され、TMA-ブタノール分解酵素が詳細に調べられた。検討の結果、本菌は原核生物と同じ NAD^+ 依存型 TMA-ブタノール脱水素酵素を生産している事が明らかとなった。

TMA-ブタノール脱水素酵素について、*Fusarium* 属由来の酵素は *Pseudomonas* 属由来の酵素と比べて、基質特異性が広くトリメチルアミノアルコールだけで

なく、ジメチルアミノアルコール、アミノアルコール、また直鎖の1級アルキルアルコールも認識した。炭素鎖の長さは C₄-C₈ 程度の中鎖アルコールを認識した。またコリンやエタノールといった短鎖のアルコールは認識せず、コリンやエタノールの分解経路と TMA-ブタノールの分解経路は重複していない事がうかがえた。一般に第4級アンモニウム化合物を認識する酵素は基質特性が狭い事が知られている。本酵素のように広い基質特異性を持っている事は珍しい酵素であると考えられた。また、一部のアルコール同士を比較するとアミノ基やトリメチルアミノ基も認識しており、アルキルアルコールよりはアミノアルコールを認識する傾向にあった。

第4級アンモニウム化合物分解酵素について、*Pseudomonas* 酵素ではトリメチルアミノ基を認識する anionic site と反応を受ける部分 (TMA-ブタノールであれば、アルコール部分) を認識する catalytic site の2つの基質認識部位があると考えられていたが、本酵素の分析により *Pseudomonas* 酵素とは異なる基質認識機構がある事が推測された。

また、TMA-ブタノールの分解経路について、本酵素の下流に存在する酵素についても検討した結果、4-N-トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素、L-カルニチン脱水素酵素活性が検出できた事から、その分解経路も *Pseudomonas* 属細菌の分解経路と同じである事が推定された。L-カルニチン脱水素酵素については、真核生物では今までに報告が無く、本研究が最初の報告である。L-カルニチン脱水素酵素については性質検討のため、精製を試みたが保存安定性が悪く断念した。また3-デヒドロカルニチンより下流の酵素については活性を検出する事ができなかった。本菌がどのような分解経路で TMA-ブタノールを分解しているのか、興味深いがこれ以上の研究は困難と判断し、次の研究に移る事にした。

続いて、これらの化合物より下流の酵素として、 γ -ブチロベタインを認識する酵素をスクリーニングした。 γ -ブチロベタインはL-カルニチンの工業生産の際、前駆体として用いられている。その際、特許によると CoA が関与した分解経路を通じ、L-カルニチンが生産されていると考えられた。CoA が関与する分解経路はL-カルニチンでも存在が示唆されていたが、その報告から約50年間、CoA 関与の酵素活性を検出したという報告はなかった。

そこで γ -ブチロベタインを含むいくつかの第4級アンモニウムを用いて、CoA 関与の酵素についてスクリーニングを行った。その結果、D-カルニチン資化性を有していると報告されている、土壌分離菌 *Agrobacterium* sp. 525a を γ -ブチロベタインを単一の炭素・窒素源として培養した時に、 γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素を発現させる事が明らかとなった。本酵素を精製し、いくつかの性質を調べると共に、クローニングを試み、本酵素遺伝子のクローニングに成功した。野生株由来酵素、リコンビナント酵素ともに γ -ブチロベタイン、ジメチルアミノ酪酸等を認識し、基質特性は狭い傾向にある事が分かった。酵素反応生成物を分析した結果、本酵素は ATP を基質として消費した後、AMP ではなく ADP を産生するユニークな酵素であることが分かった。

また精製の過程でゲルろ過に供すると活性が著しく低下するという現象が確認できた。そのゲルろ過の際、低分子溶出領域で、大きなピークがふたつ観察された。それらの推定分子質量は約 20k Da と 1-2 kDa であった。1-2 kD の分画をゲルろ過済みの酵素と混合すると、完全ではないものの活性が回復した。この事から本酵素には何らかの補因子が関わっている事が推測できた。

その機能や、種々の情報から本酵素は L-カルニチン工業生産に用いられている CoA 関与の分解経路の反応初発の酵素とほぼ同じ反応を触媒する酵素であると考えられた。一方、L-カルニチン工業生産に関わる特許情報では反応 (副)生成物が AMP と報告されており、本酵素は性質が異なる。また特許によると遺伝子上に存在する報告されている制限酵素認識部位 7 つが本酵素では全くなく、特許で報告されている酵素と本酵素は互いに異なる酵素であると考えられた。

本酵素遺伝子をホモロジー検索にかけるとリゾビウム科細菌類のアシル CoA 合成酵素と推測されている ORF が多数列挙された。その遺伝子はどれもゲノムプロジェクトなどで遺伝子配列のみ決定され、その機能については不明な部分が多いと考えられ、分子生物学的な実験が隆盛を極める中、本研究のような古典的な手法を用いた研究でないと、明らかにできない領域もある事が示唆された。

Agrobacterium sp. 525a ゲノムの本酵素遺伝子を含む、周辺遺伝子を解析した結果、本酵素も含め 5 つの ORF がオペロンを組んでいる事が推測された。それ

それぞれの推定機能から考えるとこのオペロンは次のような分解経路を形成していると考えられた。

γ -ブチロベタイン $\rightarrow\gamma$ -ブチロベタインニル CoA \rightarrow クロトノベタインニル CoA \rightarrow L-カルニチルCoA \rightarrow 3-デヒドロカルニチルCoA \rightarrow グリシンベタインニルCoA ないしグリシンベタイン

オペロンを分析することで、長らく謎であった3-デヒドロカルニチンとグリシンベタインの間をつなぐ分解経路が明らかになる事が期待された。

謝辞

本研究を行うにあたって、数多くの方に助けて頂きました。

鳥取大学農学部名誉教授 森信寛先生には毎日の実験から、研究室の運営の事、仕事の事等、公私にわたり長年支えて頂きました。本当に感謝申し上げます。

鳥取大学農学部准教授 有馬二郎先生には本論文提出あたってご推薦頂いただけでなく、英文校閲や執筆の相談等、多岐に渡り親身になって助けて頂きました。感謝申し上げます。

ハルツーム大学農学部准教授 Isam Ali Mohamed Ahmed 先生には論文執筆の面などで多くのご助言を頂きました。誠にありがとうございます。鳥取大学農学部教授 一柳剛先生には論文執筆の指導だけでなく、 γ -ブチロペタインの有機合成など様々な面でご指導頂きました。大変感謝しております。鳥取大学大学院連合農学研究科教授 児玉基一朗先生には長年のご研究で集められた糸状菌を本研究にご提供頂きました。誠にありがとうございます。鳥取大学工学部教授 大城隆先生には糸状菌の培養や内部アミノ酸配列の取得などでご指導頂きました。誠にありがとうございます。島根大学生物資源科学部教授 澤嘉弘先生には酵素の活性検出や精製方法など、さまざまな面でご指導頂きました。心から感謝申し上げます。鳥取大学工学部技術部 水田敏史博士には酵素の精製で大変お世話になりました。ありがとうございました。

鳥取県産業技術センター食品開発研究所の皆様には、本論文の執筆にあたり大変助けて頂きました。特に鳥取県産業技術センター食品開発科長 加藤愛氏と米子工業高等専門学校助教 遠藤路子先生には、本論文執筆で大変お世話になりました。感謝申し上げます。

また本論文に関連する投稿論文の共著者の皆様にも多くの面で助けて頂きました。谷山優子氏には TMA-ブタノール脱水素酵素の精製、諸性質検討の研究の多くの部分を助けて頂きました。田島沙英氏には TMA-ブタノール脱水素酵素の諸性質検討の中でも鉄に関連する研究で助けて頂きました。松本彬氏には野生株由来の γ -ブチロペタイン CoA 合成酵素の精製や諸性質検討で助けて頂きました。田窪沙也加氏にはリコンビナントの同酵素を用いた研究で助けて頂きました。福井明子氏には野生株での同酵素の生産条件検討で助けて頂きま

した。岡田一真氏には同酵素の活性検出で助けて頂きました。また共著者ではありませんが、東海彰太氏には γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素が関わるオペロンの研究で助けて頂きました。皆さんで行った研究では、最適化条件が見つかった実験もあれば、予想通りの結果が得られない実験もありましたが、あらゆる面で皆さんの助けが無ければ、本研究を遂行することができなかつたと痛感しています。本当にありがとうございます。

鳥取大学農学部微生物工学研究室、生命機能化学研究室的皆様には公私にわたり大変にお世話になりました。実験が上手くいかないとき、上手くいったとき、何につけても助けて頂き、また励まして頂きました。

最後に長年にわたる研究生生活を支援下さいました父 信正、母 久恵に心から感謝申し上げます。本当にありがとうございます。

引用

- Ahmed IAM, Arima J, Ichiyangi T, Sakuno E, Mori N. Isolation and characterization of homocholine-degrading *Pseudomonas* sp. strain A9 and B9b. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010;26(8):1455–1464.
- Annett K, Alain P, Christophe L, David V, Claudine M, Marcel S, Jean W. Identification of the Last Unknown Genes in the Fermentation Pathway of Lysine. *J. Biol. Chem.* 2007;282:7191–7197.
- Antti N, Janne K, Pasi K, Niklas W, Tapani R. Extreme Halophiles Synthesize Betaine from Glycine by Methylation. *J. Biol. Chem.* 2000;275(29):22196–22201.
- Bari MdR, Akai N, Arima J, Mori N. Evaluation of genes encoding 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and 4-*N*-trimethylamino-1-butanol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 13CM. *Int. J. Agric. Biol.* 2013;15:238–244.
- Bernal V, Areense P, Blatz V, Mandrand-Berthelot MA, Canovas M, Iborra JL. Role of betaine:CoA ligase (CaiC) in the activation of betaines and the transfer of coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 2008;105:42–50.
- Clemens U, Roswitha F, Fritz P. What to learn from a comparative genomic sequence analysis of l-carnitine dehydrogenase. *Monatshefte fur chemie* 2005;136:1365–1381.
- Denis R, David R, Andrew DH. Evidence from Engineering that Decarboxylation of Free Serine is the Major Source of Ethanolamine Moieties in Plants. *Plant Cell Physiol.* 2003;22(11):1185–1191.
- Elleuche S, Antranikian G. Bacterial group III alcohol dehydrogenase – function, evolution and biotechnological applications. *OA Alcohol.* 2013;1(1):3.

- Elleuche S, Fodor K, von der Heyde A, Klippel B, Wilmanns M, Antranikian G. Group III alcohol dehydrogenase from *Pectobacterium atrosepticum*: insights into enzymatic activity and organization of the metal ion-containing region. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98(2):4041–4051.
- Enokibara S. Purification and characterization of alkaliphilic choline oxidase of *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012;76(12):2219–2224.
- Fan F, Ghanem M, Gadda G. Cloning, sequence analysis, and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004;421(1):149–158.
- Frederic MV, Ronald JAW. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 2002;361:417–429.
- Gabriella P, Guillermo K, Choukri BM. A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *PNAS.* 2004;191(16):6206–6211.
- Gadda G, Powell NLN, Menon P. The trimethylammonium headgroup of choline is a major determinant for substrate binding and specificity in choline oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004;430:264–273.
- Gilson MK, Straatsma TP, Mccammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Sliman I, Sussman JL. Open back door in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* 1994;263: 1276–1278.
- Grabinska-Sota E. Evaluation of impact of quaternary ammonium chlorides on water environment. Academic Edition Politechnika Śląska, Gliwice. 2004.
- Hans-Peter K. Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. lett.* 1997;147:1–9.

- Hanschmann H, Ehricht R, Kleber HP. Purification and properties of L(-)-carnitine dehydrogenase from *Agrobacterium* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 1996;1290: 177–183.
- Hashimoto Y, Hosaka H, Oinuma K, Goda M, Higashibata H, Kobayashi M. Nitrile pathway involving acyl-CoA synthetase: overall metabolic gene organization and purification and characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 2005;280(10):8660–8667.
- Hassan M, Morimoto S, Murakami H, Ichiyanagi T, Mori N. Purification and characterization of 4-*N*-Trimethylamino-1-butanol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. 13CM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007;71(6):1439–1446.
- Hassan M, Okada M, Ichiyanagi T, Mori N. 4-*N*-Trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase: Purification and characterization of an enzyme from *Pseudomonas* sp. 13CM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008a;72(1):155–162.
- Hassan M. Enzymatic studies on the degradation of 4-*N*-Trimethylamino-1-butanol by *Pseudomonas* sp. 13CM. Ph.D. thesis, Tottori University, Tottori, Japan. 2008b.
- Ikuta S, Imamura S, Misaki H, Horiuti Y. Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biochem.* 1977;82(6):1741–1749.
- Jakob AS. Biosynthesis of choline and betaine. *Am. J. Clin. Nutr.* 1958;6(3):200-215.
- Jamie AM, Matthew JW. Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology.* 2015;161:1161–1174.
- Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, Hjelmqvist L, Jornvall H, Eklund H. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* 1998;7:2106–2117

- Karin S, Frederic MV, Ben D. Enzymology of the Carnitine Biosynthesis Pathway. IUBMB Life. 2010;62(5):357–362.
- Kaufman R, Broquist HP. Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 1977;252:7437–7439.
- Knoll LJ, Johnson DR, Gordon JJ. Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. J. Biol. Chem. 1994;269(23):16348–16356.
- Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z, Gregory JC, Org E, Wu Y, Li L, Smith JD, Tang WHW, DiDonato JA, Luskis AJ, Hazen SL. γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. Cell Metab. 2014;20(5):799–812.
- Kolthoff IM, Leussing DL, Lee TS. Reaction of Ferrous and Ferric Iron with 1,10-Phenanthroline. III. The Ferrous Monophenanthroline Complex and the Colorimetric Determination of Phenanthroline. J. Am. Chem. Soc. 1950;72(5):2173–2177.
- Kreimeyer A, Perret A, Lechaplais C, Vallenet D, Médigue C, Salanoubat M, Weissenbach J. Identification of the Last Unknown Genes in the Fermentation Pathway of Lysine. J. Biol. Chem. 2007;282(10):7191–7197.
- Kulla HG. Enzymatic hydroxylations in industrial application. Chimia 1991;45:81–85.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–685.
- Lindstedt G, Lindstedt S, Midtvedt T, Tofft M. Inducible γ -butyrobetaine-degrading enzymes in *Pseudomonas* species AK 1. J. Bacteriol. 1970;101(3):1094–1095.

- Lindstedt G, Lindstedt S, Midtvedt T, Tofft, M. The formation and degradation of carnitine in *Pseudomonas*. *Biochemistry* 1967;6(5):1262–1270.
- Lindstedt G, Lindstedt S, Nordin I. Purification and properties of γ -butyrobetaine hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1. *Biochemistry* 1977;16(10):2181–2188.
- Lindstedt G, Lindstedt S, Tofft M. γ -Butyrobetaine hydroxylase from *Pseudomonas* sp AK 1. *Biochemistry* 1970;9(22):4336–4342.
- Lindstedt G, Lindstedt S. Cofactor requirements of γ -butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1970;245(16):4178–4186.
- Lonza. Genes for butyrobetaine/crotonobetaine-L-carnitine metabolisms and their use for microbiological production of L-carnitine. 1998 US Patent 5759824.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–275.
- Lu X, Zhang P, Li Q, Liu H, Lin X, Ma X. Cloning, expression and characterization of a gamma-butyrobetaine hydroxylase gene bbh from *Pseudomonas* sp. L-1. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica* 2012;52(5):602–610 (in Chinese).
- Meadows JA, Wargo MJ. Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* 2015;161:1161–1174.
- Meyer H-P, Robins KT. Large scale bioprocess for the production of optically pure L-carnitine. *Monatshefte für Chemie* 2005;136:1269–1277.
- Mohamed AIA, Jiro A, Ichiyanagi T, Sakuno E, Mori N (2010) Isolation and characterization of homocholine degrading *Pseudomonas* sp. strain A9 and B9b. *World J Microbiol Biotechnol* 26(8):1455–1464

- Mori N, Kasugai T, Kitamoto Y, Ichikawa Y. Purification and some properties of carnitine dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. Agric. Biol. Chem. 1988;52(1):249–250.
- Mori N, Mitsuzumi H, Kitamoto Y. Purification and characterization of carnitine dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. YS-240. J. Ferment. Bioeng. 1994;78(5):337–340..
- Mori N, Shirakawa K, Uzura K, Kitamoto Y, Ichikawa Y. Formation of ethylene glycol and trimethylamine from choline by *Candida tropicalis*. FEMS Microbiol. Lett. 1988;51:41–44.
- Nagasawa T, Kawabata Y, Tani Y, Ogata K. Choline dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* A-16. Agric. Biol. Chem. 1975;39(7):1513–1514.
- Nagasawa T, Mori N, Tani Y, Ogata K. Characterization of choline dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* A-16. Agric. Biol. Chem. 1976;40(10):2077–2084.
- Reid MF, Fewson CA. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenase. Crit. Rev. Microbiol. 1994;20(1):13–54.
- Richard AK, Harry PB. Biosynthesis of Carnitine in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 1977;252(21):7437–7439.
- Rontein D, Nishida I, Tashiro G, Yoshioka K, Wu WI, Voelker DR, Basset G, Hanson AD. Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. J. Biol. Chem. 2001;276(38):35523–35529.
- Seim H, Loster H, Claus R, Kleber HP, Strack E. Splitting of the C-N-bnd in carnitine by an enzyme (trimethylamine forming) from membrane of *Acinetobacter calcoaceticus*. FEMS Microbiol. Lett. 1982;15:165–167.

- Setyahadi S, Ueyama T, Arimoto T, Mori N, Kitamoto Y. Purification and properties of a new enzyme, D-carnitine dehydrogenase, from *Agrobacterium* sp. 525a. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61(6):1055–1058.
- Silman I, Harel M, Axelsen P, Raves M, Sussman JL. Three-dimensional structures of acetylcholinesterase and of its complex with anticholinesterase agents. *Biochem. Soc. Trans.* 1994;22:745–749.
- Soupene E, Kuypers FA. Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2008;233(5): 507–521. doi:10.3181/0710-MR-287.
- Sussman JL, Harel M, Frolof F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253:872–879.
- Sussman JL, Harel M, Silman I. 3-Dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem.Biol. Interact.* 1993;87:187–197.
- Tang WHW, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 2014;124(10):4204–4211.
- Thibodeaux CJ, Van der Donk WA. Converging on a mechanism for choline degradation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(52):21184–21185.
- Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 2011;34(1):3–15.
- Vaz FM, Van GS, Ofman R, Ijlst L, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;250(2):506-510.

- Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 2002;361:417–429.
- Wargo MJ, Hogan DA. Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism. *Microbiology* 2009;155:2411–2419.
- Williams D.E, Reisfeld R.A. Disk electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new conditions of pH and buffer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964;121:373–381.
- Yamada H, Mori N, Tani Y. Properties of choline oxidase of *Cylindrocarpum didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 1979;43(10):2173–2177.
- Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 2005;208:2819–2830.
- コーンスタンプ, 生化学, 第5版. 東京化学同人. 1998.
- 亀谷将史, 逆進化は "specialist" の壁を破るか?—酵素工学の視点から—. *生
物工学会誌* 第92巻(5), p.238. 2014.
- 駒田 旦, 青木 孝之, 小川 奎. フザリウム 分類と生体・防除, 全国農村教育協
会. 2010.
- 戸田年総, タンパク質の酸化修飾と老化. *基礎老化研究* 2011;35(3):17–22.
- 高木信幸. *Fusarium*属糸状菌の4-トリメチルアミノ-1-ブタノール分解について.
卒業論文, 鳥取大学. 2005.
- 長沢透, 森信寛, 谷吉樹, 山田秀明. 微生物におけるコリンの分解代謝. *ビタ
ミン*. 1980;54(3):77–88.
- 藤光洋志. カルニチン生合成酵素に関する研究: 4-トリメチルアミノブチルア
ルデヒド脱水素酵素の精製と諸性質の検討. 修士論文, 鳥取大学. 2009.

要旨

200 株以上の真核微生物から、4-*N*-トリメチルアミノ-1-ブタノール (TMA-ブタノール) を単一の炭素・窒素源とする培地で、TMA-ブタノール脱水素酵素活性をもった *Fusarium merismoides* var. *acetilereum* を見出した。本株は NAD⁺依存性脱水素酵素を生産していた。また 4-*N*-トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素および L-カルニチン脱水素酵素を TMA-ブタノール分解酵素として発現していた。この事から本株での TMA-ブタノール分解経路は *Pseudomonas* sp. 13CM と同じ経路をたどると考えられた。つまり TMA-ブタノール→4-*N*-トリメチルアミノブチルアルデヒド→ γ -ブチロベタイン→L-カルニチン→3-デヒドロカルニチンである (第 1 章)。

TMA-ブタノール脱水素酵素の分子質量は SDS-PAGE で 40 kDa、ゲルろ過法で 140 kDa と推定され、本酵素はホモ 4 量体構造を有していると考えられた。TMA-ブタノール脱水素酵素は pH 7.5–9.0 で安定であった。また 30°C 程度までは安定であったが、それ以上の温度では活性が減少した。また温度 45°C、pH 9.5 の条件で最も活性が強かった。一般に第 4 級アンモニウム化合物分解酵素は基質特性が狭いといわれているが、本酵素の基質特性は広く、ブタノールより長い炭素鎖を持った直鎖のアルキルアルコールやアミノアルコールを認識した。本論文は TMA-ブタノール脱水素酵素および L-カルニチン脱水素酵素活性を、真核生物から検出・諸性質について検討した初めての論文である (第 2 章)。

上記の研究 (第 1-2 章) では 3-デヒドロカルニチン以降の代謝経路については明らかにできなかった。そこで、 γ -ブチロベタインを単一の炭素・窒素源として生育できる微生物のスクリーニングを行った。その理由は、 γ -ブチロベタイン、L-カルニチンの分解経路で、CoA が関与する酵素の存在が示唆されていたためである。しかしこれまでの研究では、誰も上述の酵素活性は検出できなかった。100 株以上の微生物を用い、種々の検討を行った結果、土壌分離細菌である *Agrobacterium* sp. 525a からユニークな性質を持った γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素活性を検出する事に成功した (第 3 章)。

本酵素の 1 次構造はリゾビウム科由来の ATP 依存性アシル CoA 合成酵素と 70-95% の相同性を示した。多くのアシル CoA 合成酵素が AMP を反応副生物と

して産生するのに対し、本酵素の特徴的な性質は ADP を産生する事であった。本酵素の見かけ上の K_m 値は γ -ブチロベタイン、CoA、ATP に対し、それぞれ 0.69 mM、0.02 mM、0.24 mM であった (第 4 章)。

Abstract

From investigation of 200 over eukaryotic microbes, *Fusarium merismoides* var. *acetilereum* is identified as which uses 4-*N*-trimethylamino-1-butanol (TMA-butanol) as the sole source of carbon and nitrogen. The fungus produced NAD⁺-dependent TMA-butanol dehydrogenase when it was cultivated in medium containing TMA-butanol. In addition, 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and L-carnitine dehydrogenase are expressed as TMA-butanol degradation enzymes. Therefore, the TMA-butanol degradation pathway of *F. merismoides* var. *acetilereum* is presumably the same as that of *Pseudomonas* sp. 13CM: TMA-butanol → 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde → γ -butyrobetaine → L-carnitine → 3-dehydrocarnitine (Chapter I).

TMA-butanol dehydrogenase showed molecular mass of 40 kDa by SDS-PAGE and 160 kDa by gel filtration, suggesting that it is a homotetramer. TMA-butanol dehydrogenase is stable at pH 7.5–9.0. It exhibits moderate stability with respect to temperature (up to 30 °C). Additionally, it has optimum activity at 45 °C and at pH 9.5. Whereas it is predicted that quaternary ammonium degradation enzyme has specific substrate, the enzyme has broad specificity to various alkyl alcohols and amino alkyl alcohols, the carbon chains of which are longer than butanol. This thesis is the first study examining TMA-butanol dehydrogenase and L-carnitine dehydrogenase from eukaryotic microbe (Chapter II).

In these studies (Chapter I, II), the downstream pathway of 3-dehydrocarnitine was not revealed. Therefore I investigated several microorganisms, which can use γ -butyrobetaine as the sole source of carbon and nitrogen. Because CoA-related enzymes were predicted on γ -butyrobetaine and L-carnitine degradation pathway. But no one can detect these enzyme activities. From 100 over organisms and more over investigation, a unique γ -butyrobetainyl CoA synthetase activity was detected from soil-isolated *Agrobacterium* sp. 525a (Chapter III).

The primary structure of the enzyme shares 70–95% identity with those of ATP-dependent microbial acyl-CoA synthetases of the Rhizobiaceae family. As

distinctive characteristics of the enzyme of this study, ADP was released in the catalytic reaction process, whereas many acyl CoA synthetases are annotated as an AMP-forming enzyme. The apparent K_m values for γ -butyrobetaine, CoA, and ATP were, respectively, 0.69 mM, 0.02 mM, and 0.24 mM (Chapter IV).

本論文に関連する投稿論文

- (1) Fujimitsu, Hiroshi; Taniyama, Yuko; Tajima, Sae; Mohamed Ahmed Ali, Isam; Arima, Jiro; Mori, Nobuhiro. Purification and characterization of 4-*N*-trimethylamino-1-butanol dehydrogenase from *Fusarium merismoides* var. *acetilereum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2016;80(9):1753–1758.

This article is corresponding to chapter 1 and 2 of the thesis.

- (2) Fujimitsu, Hiroshi; Matsumoto, Akira; Takubo, Sayaka; Fukui, Akiko; Okada, Kazuma; Mohamed Ahmed Ali, Isam; Arima, Jiro; Mori, Nobuhiro. Purification, gene cloning and characterization of γ -butyrobetainyl CoA synthetase from *Agrobacterium* sp. 525a. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2016;80(8):1536–1545.

This article is corresponding to chapter 4 of the thesis.