

(様式第 13 号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 藤光 洋志

題目: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)

---

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。また原核生物では脱水素酵素によりコリンを分解しているが、*Arthrobacter* 属細菌のみコリン酸化酵素を有している事が報告されている。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る事が明らかとなった。またその際、NAD<sup>+</sup>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た。

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<sup>+</sup>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た。

TMA-ブタノール脱水素酵素について、*Fusarium* 由来酵素は *Pseudomonas* 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 C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> 程度の中鎖アルコールを認識した。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。

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、真核生物で報告が無く、本研究が初めて検出したと考えられる。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出来なかった。

続いて、これらの化合物より下流の酵素として、 $\gamma$ -ブチロベタインを認識する酵素をスクリーニングした。 $\gamma$ -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。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 $\gamma$ -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、土壌分離菌 *Agrobacterium* sp. 525a を  $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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。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。

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た。

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。

$\gamma$ -ブチロベタイン  $\rightarrow$   $\gamma$ -ブチロベタイン CoA  $\rightarrow$  クロトノベタイン CoA  $\rightarrow$  L-カルニチル CoA  $\rightarrow$  3-デヒドロカルニチル CoA  $\rightarrow$  グリンベタイン 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ベタインの間をつなぐ経路が明らかになる事が期待された