

氏名	長 沢 透 なが さわ とおる
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 249 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE METABOLISM OF CHOLINE ESTERS IN PSEUDOMONADS (シュエードモナス属細菌のコリンエステル代謝に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 橋 英 一 教 授 栃 倉 辰 六 郎 教 授 山 田 秀 明

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は微生物，特に *Pseudomonas* 属細菌におけるコリンエステルの代謝機構の解明ならびにその応用に関して行った研究の結果をまとめたものである。

従来コリンの代謝に関する研究は主として神経組織，血液，肝臓などの動物組織を用いて行われてきた。著者はアセチルコリンやブチリルコリンを単一炭素源，窒素源として微生物が生育する現象を見出し，本研究に着手した。

まず多数の微生物の洗浄菌体および無細胞抽出液についてコリンエステルの加水分解活性を検索した結果，*Pseudomonas* 属細菌にのみ活性が認められ，さらにそのうちの *fluorescent* 群に特異的であった。

アセチルコリンの加水分解活性の強かった *Pseudomonas aeruginosa* からコリンエステラーゼを抽出し，電気泳動的，超遠心的に単一な精製酵素標品を調製して，その酵素化学的諸性質を検討した。本酵素は基質特異性，阻害剤に対する挙動などの面で動物のアセチルコリンエステラーゼと類似した性質を示すことが明らかとなった。

次にブチリルコリン加水分解酵素を *Pseudomonas polycolor* から抽出，精製し，電気泳動的，超遠心的に単一な標品を得た。本酵素は基質特異性が広く，各種のエステルを水解したが，ウマ血清の酵素と異なりアセチルコリンに作用しなかった。熱に対して安定であり，阻害剤に対しては動物酵素と類似の挙動を示した。

コリンエステルが加水分解をうけて生成するコリンの分解経路について検討したところ，コリン→ベタインアルデヒド→ベタインの系が存在することを見出した。第一段階の酸化反応活性は無細胞抽出液の particulate 画分に存在し，トリトン処理により可溶化すると phenazine methosulfate の共存下でのみ活性が認められた。第二段階の酸化反応を触媒する酵素は超遠心上澄液に存在し，NADP および NAD を補酵素とする脱水素酵素であった。両酵素ともコリンによって誘導され，また非常に高い基質特異性を示した。このことを利用して NADP の還元を 340nm で測定するコリンの簡便定量法を確立した。

さらに化学的に合成された多くの有用な化合物がコリンエステラーゼの阻害剤であることから、微生物コリンエステラーゼの阻害剤の検索を種々の微生物の培養液を用いて行った。*Penicillium* sp. C-81 の菌体抽出液から阻害物質を結晶状に単離し、理化学的諸性質を明らかにするとともに動物コリンエステラーゼなども阻害することを認めた。

論文審査の結果の要旨

従来コリンエステルの代謝に関する研究は主として神経組織、血液、肝臓などの動物組織を対象にして行われてきた。

著者は微生物がアセチルコリンやブチリルコリンを単一炭素源、窒素源として分解、利用する現象を見出し、細菌におけるコリンエステルの加水分解およびコリンの酸化過程について検討を加えた。さらに細菌のコリンエステラーゼの活性阻害を指標として、各種微生物の培養液および菌体抽出液中の新しい生理活性物質の検索を行った。主な成果は次のとおりである。

(1) 多数のカビ、酵母、細菌の洗浄菌体および無細胞抽出液についてコリンエステルの加水分解活性を調べた結果、*Pseudomonas* 属細菌にのみ活性が検出された。またアセチルコリンおよびブチリルコリンは、それぞれ *Ps. aeruginosa* および *Ps. polycolor* により特異的に強く水解された。

(2) *Ps. aeruginosa* からアセチルコリンエステラーゼを電気泳動のおよび超遠心的に単一にまで精製して、その酵素化学的諸性質を明らかにした。興味あることには、本酵素は基質特異性、阻害剤に対する挙動などの面で動物の酵素ときわめて類似していた。一方ブチリルコリンエステラーゼを *Ps. polycolor* から単一タンパクにまで精製して、その諸性質を解明した。本酵素の特徴として、熱に対して安定であること、基質特異性は比較的広いが、ウマ血清の酵素と異なりアセチルコリンを水解しないことなどが指摘された。

(3) コリンエステルの水解で生成するコリンの分解経路について研究し、*Ps. aeruginosa* にコリン脱水素酵素とベタインアルデヒド脱水素酵素を見出した。前者は particulate 画分に存在し、トリトン処理で可溶化された。後者は可溶画分に存在し、約 500 倍に精製された。本酵素は補酵素や金属イオン要求性の面で肝臓の酵素と異なる性質を示した。

(4) コリンエステラーゼの新しい阻害物質を検索する目的で、多数の微生物についてブチリルコリンエステラーゼに対する阻害活性を調べた。その結果、*Penicillium* sp. C-81 株の菌体抽出液に阻害物質を見出したので、これを結晶状に単離して理化学的諸性質を明らかにするとともに各種エステラーゼに対する阻害作用を解析した。

以上のように、本論文は細菌におけるコリンエステル代謝について重要な新知見をもたらしたもので、醸酵生理学および微生物生化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。