

氏名	佐々木克之 さ さ き かつ ゆき
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第 270 号
学位授与の日付	昭和 48 年 3 月 23 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	理学研究科 化学専攻
学位論文題目	微生物における β -メチルリンゴ酸およびチトラマル酸の代謝に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 香月裕彦 教授 波多野博行 教授 丸山和博

論文内容の要旨

種々の生物体には、チトラマル酸やイタコン酸などのように、側鎖にメチル基またはメチレン基などをもちた C_5 -分岐二塩基酸が含まれていることが知られている。これらの一群の有機酸の代謝については、断片的な研究があるに過ぎず、その相互関係や生理的役割については、ほとんど明らかにされていない。

β -メチルリンゴ酸は C_5 -分岐二塩基酸に属する一つの酸であり、代謝中間体としてはたらくことが想像されていたが、その存在や代謝反応に関しては、全く報告がなされていなかった。

申請者は、これらの分岐二塩基酸を活潑に代謝する一種の土壌菌の無細胞抽出液または部分精製酵素標品を用い、 β -メチルリンゴ酸の代謝に関して、次に述べる知見を明らかにした。

まず、無細胞抽出液にチトラコン酸を加えると、 β -メチルリンゴ酸（恐らくエリスロ型異性体と考えられる）とチトラマル酸を生じることを、ガスクロマトグラフィーによって確かめた。前者は、NAD を加えてさらに反応を続けると、脱炭酸を起し、 α -オキソ酪酸を生じるが、後者については、分取ガスクロマトグラフィーによって単離し、その旋光度を調べたところ、左旋性であることが分った。したがって、この反応は恐らくエリスロ型 β -メチルリンゴ酸が、順次、脱水反応と加水反応を受けて、中間体であるチトラコン酸を経て、(-)チトラマル酸を生じる反応であることが明らかにされた。次に、この酵素と、ロイシン合成にあずかる一つの酵素であるメチルチトラコナーゼとの異同を明らかにする目的で、クロマトグラフィーによる両者の分離が試みられた。しかし、両者は常に同じ画分に溶出されるので、上記の反応は β -メチルチトラコナーゼによって触媒されると考えられた。

チトラマル酸は本菌の無細胞抽出液によって開裂反応を受けるが、それは上記反応によって生成する(-)異性体ではなく、(+)異性体であることが以下の実験によって分った。すなわち、化学合成によって得られた(±)チトラマル酸を、ATP と CoA の存在下に加えて反応させると、ピルビン酸とアセチル-CoA とに開裂することが分った。(+)および(-)チトラマル酸をそれぞれ調製して調べた結果、前者のみが反応した。この場合、煮沸した酵素液を加えて反応させると、数倍の活性化が見られ、その活性化因子はコハク

酸であることが証明された。結局、コハク酸は ATP と CoA とにより活性化されてサクシニル-CoA となり、(+)-チトラマル酸との間に CoA の転移を起し、生成した(+)-チトラマリル-CoA がピルビン酸とアセチル-CoA とに開裂することが明らかにされた。開裂反応は可逆反応であり、 ^{14}C -アセチル-CoA とピルビン酸とを加えて反応させると、 ^{14}C -(+)-チトラマル酸が生じることが確かめられた。(+)チトラマル酸とサクシニル-CoA とから出発する開裂方向の反応に対し、 Mg^{++} または Mn^{++} は促進作用を示し、EDTA の添加は反応を完全に阻止した。また、チオシアニオンなどのアニオンは Hofmeister 系列にしたがって阻害効果を示した。最初に EDTA を加えて反応させた後、過剰量の Mg^{++} を加えてさらに反応させると、強い活性化が見られた。このことは反応の途中に、(+)-チトラマリル-CoA が蓄積していたことを示す。CoA 転移酵素と開裂酵素との分離は、試みられた限りでは、成功しなかった。上記の方法で、両反応を区別して測ると、CoA 転移反応はコハク酸およびその構造類似体によって強く阻害された。本酵素は菌を種々の培地で培養しても常に高い活性を示し、常在性酵素である点において *Pseudomonas* の場合とは異った挙動を示した。

参考論文 1) 土壤菌による β -メチルリンゴ酸の脱水素的脱炭酸反応を扱ったもので、2) は黄色ブドウ球菌のテトラサイクリン耐性機構を扱ったものである。

論文審査の結果の要旨

申請者の共同研究者中野により、土壤菌を用いて研究が行われ、 β -メチルリンゴ酸の生成機構ならびにその脱水素的脱炭酸反応(参考論文 1)が発見された。しかし、 β -メチルリンゴ酸と他の C_5 -分岐二塩基酸との相互関係については全く不明の状態であった。申請者は β -メチルリンゴ酸の脱水・加水反応によるチトラマル酸への異性化反応を予想し、中間体と考えられるチトラコン酸を基質として加え、その紫外外部吸収の減少を測定することにより、酵素活性の定量法を確立した。これら分岐二塩基酸の相互分離は困難な問題であるが、申請者はガスクロマトグラフィーを用いることによりこれを解決した。この反応によって生成する β -メチルリンゴ酸の異性体は恐らくエリスロ体と思われ、脱水素的脱炭酸反応を受けると同型であることが証明された。また、チトラマル酸の光学活性を調べたところ、左旋性を示した。これまでの報告によれば、生体中において生成するチトラマル酸の光学活性については、その多くは全く触れておらず、これを扱った報文中においても、右旋性および左旋性の両方の記載が見られた。とくに、チトラマル酸の生成反応とその旋光度との関係については、統一的な解釈が行なわれておらず、困乱した状態にあった。申請者の研究は、はじめて同一生体から左旋性および右旋性両方の光学活性をもつチトラマル酸の生成を証明し、この問題に明快な解決を下したものである。また、上記の C_5 -分岐二塩基酸の代謝系と TCA サイクルを中心とする中間代謝との連結点が、(+)-チトラマリル-CoA が可逆的に開裂してピルビン酸およびアセチル-CoA を生じる反応であることを証明した申請者の研究も、重要な貢献を行ったといえることができる。

申請者の研究によって明らかにされた β -メチルリンゴ酸からチトラコン酸を経て(-)-チトラマル酸を生成する反応は、この反応に固有な酵素によって触媒されるのではなく、ロイシン生合成に関与する β -メチルチトラコナーゼによって触媒されると考えられる。しかし、このことは決して上記反応の重要性を減じ

るものでなく、生体中におけるこれらの酸の存在がこの代謝系の重要性を物語っている。

上記の C_5 -分岐二塩基酸は、これを唯一の炭素源として生長した大腸菌や *Pseudomonas* によって代謝されるが、グルコース培地上に生育させた場合には代謝されない。後者の場合には、分岐二塩基酸はむしろ菌の内呼吸を強く阻害することが知られている。この阻害作用は生化学的にも興味ある問題として注目されているが、その機構は全く不明の状態である。申請者の用いた土壌菌の場合には、上記の場合とは全く異り、(+)-チトラマル酸の開裂反応は試みられた限り、全ての培地から得られる菌について強い活性が見られた。申請者が指摘しているように、この問題を解決する上に勝れた系とすることができる。

参考論文 2) は黄色ブドウ状球菌のテトラサイクリン耐性機構が特異的膜透過性減少に基いていることを明らかにしたものである。

これを要約すれば、申請者の主論文の研究は、 β -メチルリンゴ酸の新反応、とくに、他の C_5 -分岐二塩基酸との関係や末端酸化系への流入機構を明らかにした勝れた研究である。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。