

氏 名	竹 谷 茂 たけ たに しげる
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 529 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 5 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	酵 母 の ス テ ロ ー ル エ ス テ ル 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 教授 川出由己

### 論 文 内 容 の 要 旨

高等動物におけるコレステロールおよびその脂肪酸エステルは、いわゆる動脈硬化症とも関連し、近年とみに注目され、多くの研究がなされている。これに対して、動物について研究対象として用いられている酵母については、生合成に関する研究は多いが、ステロールエステルに関する研究は少い。エステルの生成および加水分解に与る酵素に関する研究に至っては皆無の状態であった。その原因の一つは、従来から用いられているステロールおよびそのエステルの抽出法が不完全であることであった。

申請者は、まず、酵母菌体をアセトンで処理し、菌体は減圧乾燥し、アセトン抽出液は濃縮した。乾燥菌体はジメチルスルフォキシドを加え、加熱後、石油エーテルで脂質を抽出した。他方の濃縮液についても、石油エーテル抽出を行ない、脂質を抽出した。両脂質画分は合わせて、薄層クロマトグラフィーを行ない、ステロールおよびそのエステルとに分離した。分析に供する酵母中のステロールおよびそのエステルを  $^{14}\text{C}$  で標識するためには、メチル基を  $^{14}\text{C}$  で標識した *L*-メチオニンを加え、酵母菌体をグルコースを含むリン酸緩衝液中で20分間振とうし、その後、非放射性 *L*-メチオニンを多量加えてパルスラベルを行なった。この酵母について、放射能を指標として、上記の抽出法を用いて分析を行なった結果、この方法は既知の方法よりも高い値を与えることがわかった。

次に酵母を好気条件下に培養し、生長に伴うステロールおよびそのエステルの含量を調べた。その結果、遊離ステロール含量はほぼ一定の割合に保たれたが、エステルは急激に増加し、遂には両型ステロールの90%以上にも達した。菌を、グルコースを含むリン酸緩衝液中で振とうし、いわゆる好気適応を行なったが、成長は起らないにもかかわらず、好気培養の場合と同様な現象が認められた。ついで、菌を新しい培地に移し、嫌気条件下で生長させたと、蓄積していたエステルの急激な加水分解が起り、遊離ステロールが増加した。以上は、ガスクロマトグラフィーによる定量結果であるが、同様にして放射性ステロールの分析を行なったところ非常に異なる結果が得られた。すなわち、実験を行なった限りでは、好気条件下において、遊離およびエステル型ステロールの割合は一定に保たれていた。これに反して、嫌気条件下ではエステルの加水分解速度はさらに大であった。遊離およびエステル型ステロールのステロール組成を

ガスクロマトグラフィーによって調べた結果、両者は非常に異っていた。前者の主成分はエルゴステロールであったが、後者ではチモステロールがもっとも多く、このほか、エルゴステロール、フェコステロール、エピステロールおよびラノステロールなどが含まれていた。

ついで、菌から Triton X-100 を用いてエステル加水分解酵素を抽出した。Triton が存在しなければ、酵素は全く抽出されず、終濃度 0.3% において最適効果を示し、それ以上の濃度では活性の低下が見られた。酵素反応は 1 時間まではほぼ直線的に進行したが、それ以上の反応は停止した。このほか、酵素や基質の濃度を種々に変え、酵素活性に及ぼす影響についても研究したが、いずれの場合にも与えた基質の 12~14% が加水分解したに過ぎず、それ以上反応は進行しなかった。酵素は広範囲のステロールエステルに作用し、低い基質特異性を示した。本酵素は好気条件下に生長した酵母細胞内においてはミトコンドリア画分に分布していたが嫌気条件下に生長したものでは、ミトコンドリアの他にチトプラズマ画分にも分布していた。培養条件を変えても、酵素量はほとんど変動しなかった。

ステロールエステル合成酵素についても、Tween 80 を用いて、その抽出に成功し、反応の性格を研究した結果、本酵素は Acyl CoA : sterol-O-acyltransferase であることを示した。本酵素のレベルも培養条件の変動によって影響を受けず、細胞内においてはミクロゾーム画分に分布していた。

以上の結果を総合して、酵母細胞内におけるステロールエステルの生理機能について新しい学説を提出している。

参考論文においてはステロールエステルならびにステロールの生合成機構が研究されている。

### 論文審査の結果の要旨

微生物細胞に含まれるステロールおよびその脂肪酸エステルの存在形態に関しては諸説あり、従来の抽出法を用いても、その抽出量は一定しないことが知られていた。申請者はこの点に注目し、新しい方法を考案した。抽出効果を比較した結果、検討した方法の中では、本法がもっとも優れた結果を与えた。これを用いて行なわれた実験の中で、嫌気条件下の酵母細胞内においてエステルが加水分解されるという発見は、エステルの生理機能を考える上に、重要な意義をもつものである。このことを発見することができたのは、優れた方法を用いて実験を行なったからにほかならない。なお、種々の培養条件下における酵母細胞内でのステロールおよびそのエステルの分布を明らかにした。この研究は、今後検討を要する箇所も残されているが、得られた知見は、これらの化合物の生理機能を解明していく上に貴重なものである。

次に、エステルの加水分解および生成に与る酵素についてであるが、多くの人々によって探求されたのにかかわらず、これまで証明されていなかった。申請者は幾多の努力を重ねた結果、それぞれに適した界面活性剤を用いて可溶化に成功し、その存在を証明した。両酵素とも、酵母からの証明としては最初の報告であり、脂質生化学の研究分野に貢献するところ大である。

申請者は、両酵素の酵素化学的性質を明らかにしたのにとどまらず、その細胞内分布を明らかにした。また、種々の条件下で培養した酵母細胞内の両酵素のレベルを測定し、いずれも、ほとんど変動しないことを明らかにした。この結果、酵母細胞内のミクロゾームにおいて合成されたステロールの一部は直ちにエステル化された後、膜成分となる遊離ステロールを除いて、大部分はミトコンドリアに運ばれ、貯えら

れることが推測される。必要に応じて、とくに嫌気条件下では、ミトコンドリアもしくはこれがリシスを起して生じたオルガネラにおいてエステルの加水分解が起り、生じた脂肪酸はエネルギー源として利用される。また、遊離ステロールは新しくつくられた膜質の成分として利用されるものと思われる。換言すれば、多量の遊離ステロールの蓄積は細胞にとって不都合であるので、過剰分はエステルに転換され貯蔵物質として細胞に貯えられ、環境変化に応じて、これを加水分解して利用されるものと理解することができる。これを完全に証明するには今後さらに多くの研究が必要であることはいうまでもない。しかしながら申請者の研究はステロールエステルの生理機能を解明する上に大きな貢献をなしたことは確言できる。

参考論文は、ステロールの生合成ならびにエステルに関する諸問題を扱ったものであり、いずれも優れた研究である。

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。