

【 43 】

氏名	川口昭彦
	かわぐちあきひこ
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第173号
学位授与の日付	昭和45年1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	Control of Ergosterol Biosynthesis in Yeast [Existence of Lipid Inhibitors]

(酵母におけるエルゴステロール生合成の調節〔脂質性阻害物質の存在〕)

論文調査委員 (主査) 教授 香月裕彦 教授 加治有恒 教授 由良 隆

論文内容の要旨

ステロールは動物・植物・酵母などに広く分布しており、その生合成経路に関しては、動物のコレステロールの場合について、ほぼその大綱は明らかにされている。しかし、その生理的役割については、細胞の膜構造の形成に必要であるという事実を除けば、ほとんど不明の状態であるといつてよい。むしろ動物の場合には、過剰の蓄積は胆石や動脈硬化などの原因をなすと考えられており有害な面が注目されている。したがって、以上の見地からステロール生合成の調節機構を解明することは極めて重要な意義をもつものである。

古くから動物にコレステロールを多く含む食餌を与えると、動物自身のステロール生合成能は激減することが知られている。最近になり、ステロール生合成経路のうち影響を受ける箇所は β -オキシ- β -メチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) からメバロン酸 (MVA) へ至る還元段階であることが判明し、コレステロール食を与えた場合、その反応にあずかる酵素の合成能が抑制されることが発見された。しかし、その酵素の活性に対してはコレステロールそのものは全く影響を与えず、むしろコレステロールから二次的に導かれる胆汁酸が強い阻害効果を示すことが報告された。これらの事実から、HMG-CoA 還元酵素は調節酵素であることが予想されるにもかかわらず、未だその証明がなされていない。まして、胆汁酸の阻害機構に関しては全く不明の状態である。

申請者はこの問題の解決のためにいろいろな点で取り扱いの容易な酵母を実験材料として選んだ。酵母は好気条件ではエルゴステロールを生成するが、嫌気条件ではその生合成能を失い、その結果生長因子としてこれを要求するに至る。この事実を利用して、申請者は酵母を嫌気培養し、エルゴステロールを十分量与えた場合と与えない場合とについて、そのステロール生合成能を調べた。まず $1-^{14}\text{C}$ -酢酸を与え、不ケン化物 (スクアレン、ステロールなどから成る) への ^{14}C の取りこみの経時変化を調べたところ、エルゴステロールを加えた培地では、成長の初期には ^{14}C の取りこみは高い値を示したが、成長が進むにつれ、取りこみは急速に減少した。これに反し、エルゴステロールを含まない培地では、取りこみ量は非

常に高い値を示した。この事実から酵母のエルゴステロール生合成系においても、動物の場合と同様な調節が働いている可能性が示唆された。次に無細胞抽出液を用いて実験を進め $1-^{14}\text{C}$ -酢酸から ^{14}C の不ケン化物への取りこみに対するエルゴステロールの添加効果を調べたが全く無効であった。これに反して、菌体をクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出して得た脂質は強い阻害作用を示した。この阻害作用は基質として ^{14}C -HMG-CoA を用いた場合には全く認められなかった。この実験結果から酵母の脂質中には、動物の場合と同様に、HMG-CoA の還元反応を特異的に阻害する阻害物質が存在することが明瞭になった。この酵母の脂質をエーテルに溶かし、アルカリで振ることにより有効因子は酸性区分に存在することがわかったが、これをさらにシリカゲルクロマトグラフィーにかけて脂肪酸と分離し、さらに薄層クロマトグラフィーにかけたところ、4個のスポットに分れた。これら4種の物質はいずれも強い阻害活性を示したが、最も強い物質は、最初から約2000倍に精製されることになり、 $52\mu\text{g/ml}$ で酢酸から不ケン化物の生成を50%阻害した。これに反して、酢酸から脂肪酸への取りこみに対しては全く阻害効果を示さなかったため、この阻害物質の作用は特異的なものといえる。この物質の構造は未だ決定されていないが、一つの可能性としてカルボキシル基と水酸基をもつことが示唆されており、動物の胆汁酸に似た物質ではないかと考えられている。

酵母の生菌に ^{14}C -エルゴステロールを与えて培養し、これから酸性脂質を分離し、最後に薄層クロマトグラフィーにかけると、上記4つの物質に相当する場所に ^{14}C の取りこみが見られることが判明した。この結果から、これらの阻害物質は、エルゴステロールから導かれる正常な代謝産物であることが推定される。これまで酵母においてはエルゴステロールが最終生産物と考えられていたが、この研究により動物の場合と同様に、エルゴステロールはさらに代謝され、酸性脂質を生じることが明らかになった。また、この研究は、酸性脂質がエルゴステロール生合成能を調節していることを支持する実験結果を与えたものであり、有意義な価値ある研究といえることができる。

参考論文1)は上記主論文の基礎をなすものであり、嫌気条件下で酵母を培養するに際し、 ^{14}C -酢酸から脂肪酸への取りこみが、エルゴステロール添加の有無によって影響を受けないのに反し、ステロールへの取りこみはエルゴステロール添加により阻害されることを示したものである。

参考論文2)は光合成菌の無細胞抽出液におけるグルタミン酸生合成が光嫌気条件下においては、暗好気条件下におけると同様に、トリカルボン酸サイクルを経て行なわれることを明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

ステロール生合成の調節機作を解明することは代謝生理学において重要な問題であると考えられているが、実験材料として動物を用いることは種々の困難が伴う。申請者は、このため、生菌および無細胞抽出液のステロール生合成能が高く、また培養条件の設定を行ないやすいなどの多くの長所を有しているという理由から、酵母を用いることを計画した。すなわち、申請者は酵母が好気条件下ではエルゴステロールを合成することができるが、嫌気条件下で培養する場合にはエルゴステロールを生長素として要求する事実を巧みに利用して実験系の設定を行なった。この生菌を用いた実験により、酵母においても、動物の場

合と同様に、ステロール生合成の調節機構が存在する可能性を指摘することが出来た。

次いで、無細胞抽出液を用いて実験を進めた結果、エルゴステロールそれ自身はその生合成に対する阻害作用を示さないが、酵母の脂質が強い阻害作用を示すことを発見した。しかも、ステロール生合成経路の中で阻害を受ける個所は、動物の場合と同様に、HMG-CoA の還元段階であることを認めた。阻害因子はまだ単離するには至っていないが、約2000倍に精製することに成功した。また、この因子は種々の化学的性質から胆汁酸に似た挙動を示すことを確めた。この酸性脂質が正常な代謝産物であることは、次のように証明することができた。すなわち、¹⁴C-エルゴステロールを別個に調整し、これを酵母に与えて反応させ、これから脂質を抽出し、阻害因子の精製法に従って精製し、最後に薄層クロマトグラフィーにかけ、4個のスポットに一致する点に高い放射活性を証明することができた。

これまで、酵母においてはエルゴステロールが最終代謝産物と考えられていたが、この研究により、動物の場合と同様に、エルゴステロールはさらに代謝される可能性が明らかにされた。しかもエルゴステロール代謝によって生成すると考えられる酸性脂質が、ステロール生合成の中間段階である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、ステロール生合成活性を調節している可能性を指摘したものである。

以上を総合し、この研究は巧みに実験系を設定し、これまで不明であった酵母のステロール代謝に新しい経路の存在を指摘し、しかも、未同定の酸性脂質がそのステロール生合成の調節にあずかっている可能性を明らかにした価値ある研究ということが出来る。

また、参考論文 1) は、上記申請論文の基礎をなす重要な知見を明らかにしたものであり、参考論文 2) は、光合成を行なう細菌を種々の環境の下においた時の代謝の切り換えを研究し、その調節を論じた論文である。

よって、申請論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。