

氏名	永井純 ながい じゆん
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第59号
学位授与の日付	昭和38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	イタコン酸および類縁有機酸の代謝に関する研究

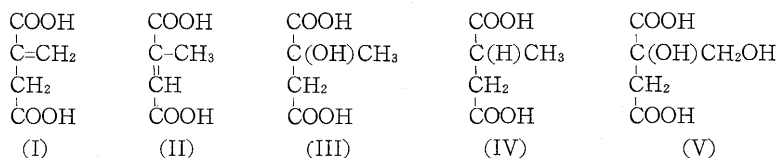
論文調査委員 (主査) 教授 田中正三 教授 後藤良造 教授 國近三吾

論文内容の要旨

Itaconic acid は *Aspergillus itaconicus* および *Asp. terreus* の生産物として発見されたメチレン側鎖をもつ C₅ の二塩基有機酸である。この酸は哺乳動物の肝で代謝されてピルビン酸と酢酸とに分解することが判明しており、その中間過程もほぼ解明されている。しかし、微生物における Itaconic acid の代謝に関する研究は少なく、前述のコウジカビでは cis-Aconitic acid の脱炭酸によって生成することがわかっているが、Itaconic acid 自身の運命については明らかでなく、また、Itaconic acid の異性体である Mesaconic acid や水加物である Citramalic acid がある種の細菌によってピルビン酸と酢酸とに分解するとの報告がある程度にすぎない。

著者は、これらの研究結果から推して、Itaconic acid およびこれと類縁の有機酸の代謝過程は、含水炭素や脂肪酸の好氣的分解経路として生物細胞に普遍的に認められる TCA 回路ときわめて密接な関係をもつことを推測し、*Pseudomonas fluorescens* についてこの有機酸の代謝を詳細に研究した。

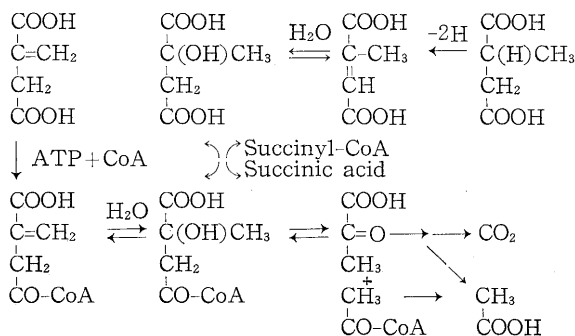
この細菌は、あらかじめ Itaconic acid を含む培地に培養すると、Itaconic acid (I)・Mesaconic acid (II)・Citramalic acid (III)・Methyl succinic acid (IV)・Itatartaric acid (V) を酸化分解するようになり、これの菌体抽出液に (I) を加えると、(III) とピルビン酸とが生成することが認められた (参考論文その1)。著者は、この事実からこれらの有機酸が同じ代謝過程で分解されるとして、主論文ではこの過程のそれぞれの段階の確証を行なっている。すなわち、主論文第1部では、まず (I) を含む培地で好気培養した細菌を音波処理したのち高速遠心分離法で上澄液をとり、これを粗酵素液として、これに (I) を加えて分解生成物を詳しくしらべ、(III)・乳酸および酢酸の生成を確認した。つぎに、この粗酵素液を0.75



飽和の硫安沈殿にかけて助酵素類をできるだけ除去したものを用いて同じ実験を行なうと、乳酸の代わりにピルビン酸が生成するから、乳酸は粗酵素液に含まれている乳酸脱水素酵素の作用で生成した二次的産物であることがわかった。また、この (I) の分解には Cofactor として ATP, CoA および Mg^{++} が必要であり、さらに上述の (I) の分解をヒドロキシラミンの共存の下で行なわせると、Itaconohydroxamate が生成することが判明した。この結果から著者は、(I) が Itaconyl-CoA の形に活性化されたのち変化するものと考え、粗酵素液から Itaconyl-CoA の合成酵素の分離証明を試みた。すなわち、粗酵素液を炭素未処理、プロタミン処理、硫安分画、リン酸カルシウムゲル吸着を組み合わせた方法で処理して、CoA, ATP および $MgCl_2$ の共存の下で (I) から Itaconyl-CoA を生成する酵素の標品をえた。このものは至適 pH7.8 で (I) のほかにコハク酸にも作用して Succinyl-CoA を生成する。そこで Succinyl-CoA 合成酵素と Itaconyl-CoA 合成酵素との異同について、さらに詳細な検討を行なって、一応両者は同一物であるとの結論に達している。また、この酵素は Acetyl-CoA や Acyl-CoA 合成酵素とは全く別個のものであることを明らかにしている。

主論文第 2 部では、まず C^{14} -DL-Citramalic acid を基質とした場合粗酵素液によって放射性の (I)・(II)・ピルビン酸および二酸化炭素と放射能をもたない酢酸とが生成することを認めた。このうち乳酸はピルビン酸の還元生成物であり、二酸化炭素はピルビン酸の酸化分解で生じたものであることを確かめた。また、上の分解には Cofactor として CoA, ATP, GSH, TPP および Mg^{++} が必要であることを認め、(III) のピルビン酸への分解には、CoA 化合物の生成にあずかる酵素とそれを分裂させる酵素とが共働していることを推定し、これらの分離証明を行なった。すなわち、粗酵素液をプロタミン処理、硫安分画、リン酸カルシウムゲル吸着、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーなどを組み合わせた方法によって処理し、この粗酵素液には Succinyl-CoA から (III) に CoA を転移させて Citramalyl-CoA をつくる酵素と、Citramalyl-CoA を分解して Acetyl-CoA とピルビン酸とにする Citramalyl-CoA-pyruvate-lyase とが存在することを確かめた。

著者らは、参考論文その 2 において、粗酵素液が (IV) を分解して (III) と酢酸とをつくることおよびこの変化に Citramalyl-CoA-pyruvate-lyase が必要なことを認めており、また、参考論文その 3 において、(II) に水を添加して (III) を生成する酵素が、粗酵素液に存在することも確認している。これらの結果と主論文の研究とを総合して著者は *Pseudomonas fluorescens* における (I) の代謝過程をつぎのように取りまとめている。

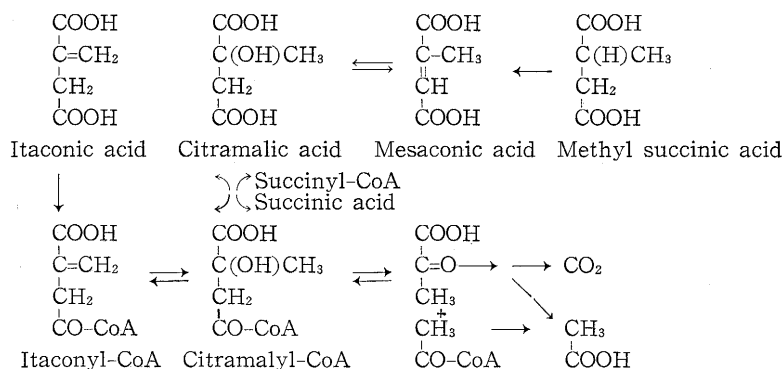


上の分解は (I) を含む培地で培養した細菌について認められるものであり、(I) の代わりにグルコースを加えた培地に生育したものでは (I) からピルビン酸の生成が非常に少ない。この原因について著者は、関係酵素の活性の差異を詳細にしらべ、培養条件を異にした細菌の間では Citramalyl-CoA-pyruvate-lyase の活性に大差があるが、他の酵素には差異が認められないことを明らかにしている。

参考論文その 1, その 2 およびその 3 については既に述べたが、その 4 では、*Bacillus macerans* におけるピオチン欠乏が β -オキシ酪酸の脱水素能の低下をきたす理由について詳細な研究を行ない、ピオチンはこの脱水素酵素のアポ酵素の生合成に何等かの形で関係するとの結論をえている。

論文審査の結果の要旨

主論文は、Itaconic acid を含む培地で培養した *Pseudomonas fluorescens* が Itaconic acid および Citramalic acid を分解する過程を、菌体抽出物によるこれらの有機酸の分解生成物の精査、この分解に必要な Cofactor 類の追究、関連酵素類の分離などの結果から解明しようとしたものであり、参考論文に収めた結果をも総合してこの代謝過程をつぎのようにまとめている。



この間、菌体抽出液から Itaconyl-CoA 合成酵素、Succinyl-CoA から Citramalic acid への CoA 転移酵素および Citramalyl-CoA をピルビン酸と Acetyl-CoA とに分裂させる酵素の分離精製に成功し、それぞれの性質を明らかにしており、また、Citramalyl-CoA 分裂酵素は Itaconic acid 添加によって誘導生成される酵素であることをも確認している。

要するに、著者の学位論文は、微生物における Itaconic acid の代謝過程を明らかにして、これが好気的な生物細胞に広く認められる TCA 回路と関係があることを示唆したものであり、代謝生化学の立場から高く評価することができる。

よって、本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。