

【 28 】

|         |  |
|---------|--|
| 氏名      | 角 谷 嘉 子<br>かく たに よし こ  |
| 学位の種類   | 理 学 博 士  |
| 学位記番号   | 理 博 第117号  |
| 学位授与の日付 | 昭 和 42 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  | <b>STUDIES ON ISOPRENOID BIOSYNTHESIS BY THE YEAST</b><br>(酵母のイソプレノイド生成に関する研究) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 田 中 正 三 教 授 後 藤 良 造 教 授 波 多 野 博 行                                 |

論 文 内 容 の 要 旨

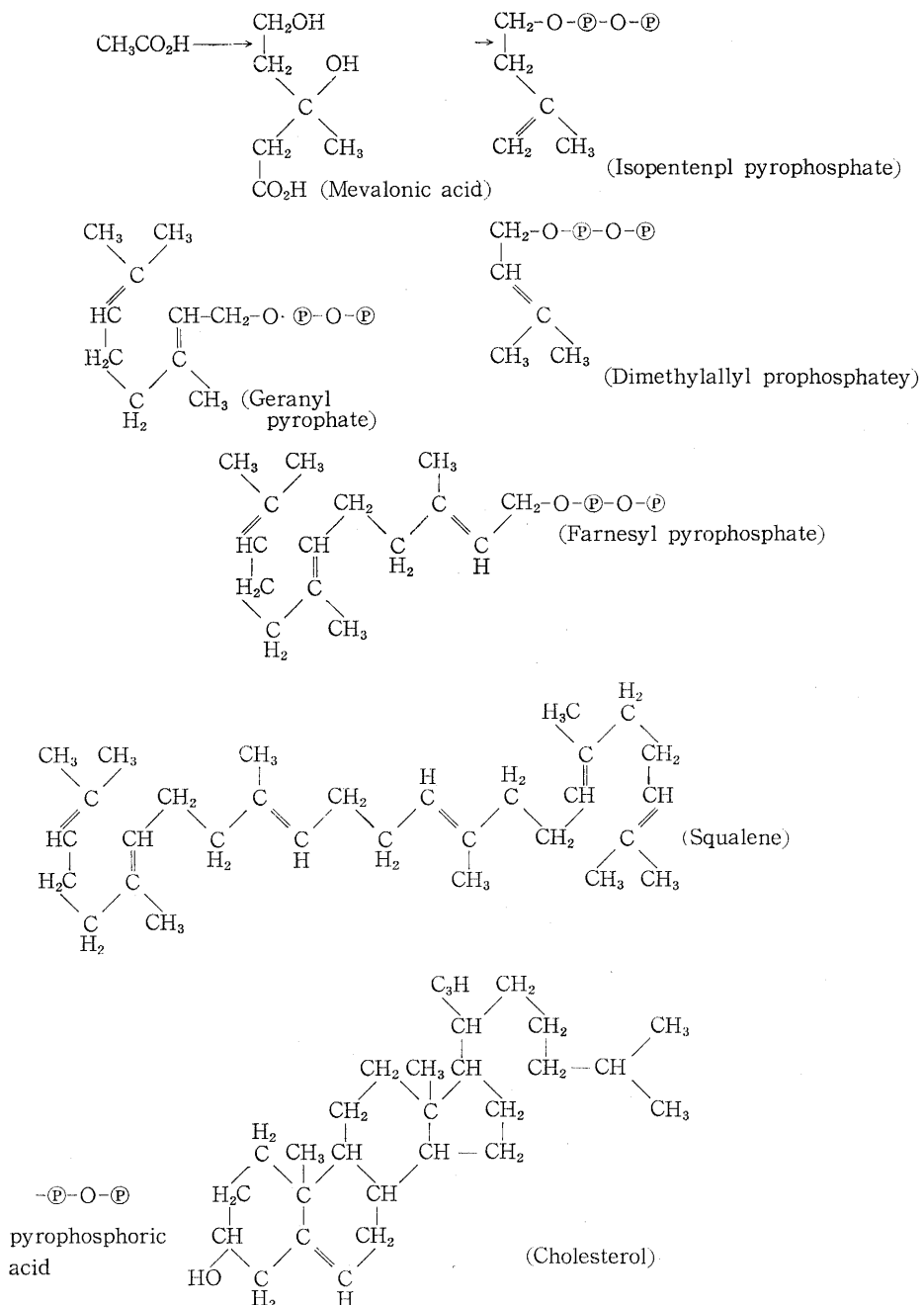
生物界にはイソプレン (C<sub>5</sub>) 骨格の重合した化学構造をもつ化合物が広く分布しており、これらはイソプレノイドと総称されている。高等植物の精油成分であるモノテルペン (C<sub>10</sub>)、セスキテルペン (C<sub>15</sub>)、樹脂やサポニンにみられるジテルペン (C<sub>20</sub>)、トリテルペン (C<sub>30</sub>)、天然ゴム (C<sub>5n</sub>)、広く脂質にみられるカロチノイド (C<sub>40</sub>) やトリテルペンから誘導されるステロール類などがその例であり、また、ビタミン E、ビタミン K、ユビキノンなどにもイソプレノイドの側鎖が結合している。

イソプレノイドの生合成過程に関しては Bloch らの Cholesterol についての優れた研究があり、大要を図 I に示すように、酢酸を出発物質として Mevalonic acid を経て C<sub>5</sub> の Isopentenyl pyrophosphate ができ、これを単量体として Tail-to-head の脱ピロリン酸縮合で三量体の Farnesyl pyrophosphate を生成し、この三量体二分子間で Tail-to-tail の縮合が行なわれて C<sub>30</sub> の炭化水素の Squalene を生じ、これの酸化、環化、脱メチルなどの変化で Cholesterol ができることが明らかにされている。天然ゴムや Carotenoid などの生合成も Cholesterol と同じような過程を経て行なわれると考えられている。重合度の異なる多数のイソプレノイドが存在することは、生物によって重縮合に際してある種の調節が行なわれていることを示唆するものであるが、これに関する知見はほとんどえられていない。

申請者の研究は比較的多種類のイソプレノイドを生産するといわれていた酵母の *Sporobolomyces shibatanus* について、その含有するイソプレノイドの分離、確認と、生育過程におけるそれらの消長についてしらべ、さらに、天然、非天然の阻害剤を利用してイソプレノイド生合成における調節機構解明の手掛りをも掴もうとしたものである。

主論文第一部では、まず、この酵母の含有するイソプレノイドを確認している。従来この酵母は  $\beta$ -carotene を多産することで知られており、このほかに Neurosporene,  $\zeta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene を含有するとの報告がある。申請者は大量培養した酵母を 600 メッシュのカーボランダムで磨砕した後、10%のピロガロールを含む酒精カリと共に 80°C で20分間ケン化し、不ケン化物をヘキサンで抽出し、メタノール

表 1



で不活性化したアルミナを用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、Carotenoid、Sterol および Ubiquinone に分画した。Carotenoid 画分は、さらに、活性アルミナと不活性アルミナとを 5 : 1 の比に混合したカラムを用い、混合比の異なるエーテルとヘキサンの混液で溶出するクロマトグラフィーで、Neo-β-carotene、β-Carotene、ζ-Carotene、γ-Carotene、Neurosporene および Torulene にわけ、それぞれに

表 I Sporobolomyces shibatanus の carotenoid 含量

| Carotenoid   | 対 照       | Diphenylamine 阻害 |
|--------------|-----------|------------------|
|              | μg/g (乾体) | μg/g (乾体)        |
| Phytofluene  | —         | 0.1              |
| ζ-Carotene   | 0.5       | 0.1              |
| γ-Carotene   | 1.8       | —                |
| Neurosporene | 0.7       | —                |
| β-Carotene   | 7.3       | 0.6              |
| Torulene     | 8.0       | 0.1              |

ついて主として吸収スペクトルを用いて確認した。吸光度測定で定めた各 Carotenoid の含量は表 I に示すようであった。つぎに、他のイソプレノイドについては、それぞれの画分をさらに沪紙クロマトグラフィーにかけて精製し、Ubiquinone は吸収スペクトルや酸化還元による吸収スペクトル曲線の変化および NaBH<sub>4</sub> 処理のあとネオテトラゾリウムによる特異の発色などをしらべて確認した。この Ubiquinone のイソプレノイド側鎖の重合度は既知のものとの比較検討によって C<sub>50</sub> であることをきめた。Sterol の画分は精製で単一の化合物と判定されたが、常法によってこれが Ergosterol であることを確かめた。なお、これらのほかに、この酵母には構造不明のキノンが含有されていることも判明した。

つぎに、この酵母の生育過程におけるイソプレノイドの消長について精査した結果、Ergosterol が生長初期には多量含有されているが、生長に伴い Sterol は急減し、逆に Carotenoid と Ubiquinone が増加することがわかった。

Diphenylamine は有色 Carotenoid の生成を妨げる特異的な阻害剤であることが知られているが、申請者は上述の Sporobolomyces shibatanus のイソプレノイド生産に及ぼす Diphenylamine の影響についても研究を行なった。酵母の生長を阻害しない濃度 (2 mg/250 ml) の Diphenylamine を培養液に添加すると、表 I に示したように、Carotenoid、特に、共役二重結合の多い有色 Carotenoid の生成は激減する。イソプレノイドの中で最も著しい阻害をうけるものは Carotenoid の生成であるが、他のイソプレノイドも酵母の生育にしたがって急激に含量が減じた。

表 II

| 阻 害 剤          | 濃 度                  | 生長量 (g) | Sterol (μg/g) | Carotenoid (μg/g) |            |            |          |
|----------------|----------------------|---------|---------------|-------------------|------------|------------|----------|
|                |                      |         |               | 総 量               | γ-Carotene | β-Carotene | Torulene |
| 対 照            | —                    | 1.8     | 875           | 63.7              | 18.7       | 27.2       | 17.6     |
| NDGA           | 6.0×10 <sup>-5</sup> | 1.7     | 728           | 43.1              | 5.9        | 28.9       | 8.3      |
| “              | 1.2×10 <sup>-4</sup> | 1.7     | 697           | 33.1              | 5.3        | 21.0       | 7.1      |
| α-Tocopherol   | 1.0×10 <sup>-3</sup> | 1.9     | 347           | 21.4              | 4.1        | 10.9       | 6.4      |
| “              | 5.0×10 <sup>-3</sup> | 1.9     | 358           | 15.4              | 3.7        | 7.7        | 4.0      |
| p-Hydroquinone | 1.0×10 <sup>-3</sup> | 1.8     | 504           | 42.2              |            |            |          |

主論文第二部では Diphenylamine の影響から類推して、酸化作用に関連をもつ生体成分や遷移元素のイソプレノイド生成に及ぼす影響をしらべている。抗酸化剤として知られている Nordihydroguaiaretic acid (NDGA),  $\alpha$ -Tocopherol および p-Hydroquinone を、酵母の生長にほとんど影響しない濃度で培養液に加えて酵母を培養すると、予測通りイソプレノイド含量は著しく減少することが認められた(表II), また, O-Phenanthroline, Diphenyl carbazide,  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl などのキレート剤を用いてマンガンや鉄などの遷移元素の影響についてしらべた結果では、マンガンを欠く場合に特にイソプレノイドの生成が著しい阻害をうけることがわかった。

これらの結果から申請者は, Carotenoid の共役二重結合の生成には酸素が必要であり, Diphenylamine や天然の抗酸化剤がこの段階で阻害を示すことは知られていたが, イソプレノイド生合成過程でこの段階以外にも酸化を必要とするところがあるとしている。

#### 参 考 論 文

その 1, Sporobolomyces shibatanus の無細胞抽出液により, 無色 Carotenoid の Phytoene  $\beta$ -Carotene を変化させることに成功した研究である。

その 2, その 1 の実験に対する酸素の影響をしらべたものである。

その 3, グリセロリン酸の  $\alpha$ - および  $\beta$ - 異性体の滷紙クロマトグラフィーによる分離に関する研究である。

その 4, グリセロリン酸の異性体の分離に関する大量処理法についての研究である。

その 5, グリセロリン酸の不飽和脂肪酸に対する抗酸化性の研究で,  $\alpha$ - 異性体のみがこの作用をもつことを明らかにしたものである。

#### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生物界に広く分布しているイソプレノイドにはテルペン類, サポニン, 天然ゴム, カロチノイド, ステロールなどの数多くの種類がある。これらのイソプレノイドの生合成過程については Cholesterol に関する詳細な研究があり, 酢酸を出発物質として単量体の Isopentenyl pyrophosphate を生じ, これの脱ピロリン酸的縮重合によって種々のイソプレノイドを生ずるとされている。この場合縮重合の仕方によって重合度の異なるものや化学構造の異なるイソプレノイドが生成することは推定できるが, この調節機構については全く解明されていない。

申請者の主論文は酵母の Sporobolomyces shibatanus のイソプレノイドの生合成について研究したものであり, まず, これの生産する多種類のイソプレノイドを詳細に研究して, 6 種類の Carytenoid, Ergosterol, Ubiquinone (UQ<sub>10</sub>) および化学構造未定のキノンが含有されていることを確かめた。つぎに, これらのイソプレノイドが酵母の生育過程で如何に消長するかをしらべ, 生育の時期によってこれらの生成が異なることを明らかにした。さらに, Diphenylamine, Nordihydroguaiaretic acid,  $\alpha$ -Tocopherol, p-Hydroquinone などの天然, 非天然の抗酸化剤やマンガンなどの遷移元素が, この酵母のイソプレノイド生産に及ぼす影響について詳しくしらべ, これらの阻害剤の添加やマンガン欠乏によってイソプレノイドの生産が著しく減少することを認めた。特に, Diphenylamine については知られていた

Carotenoid の共役二重結合生成に対する阻害が、他の抗酸化剤添加やマンガン欠乏の場合にも顕著に現われることを明らかにした。

これらの結果は、Carotenoid における二重結合の生成以外の段階においても酸化を伴う化学変化があることを示すもので、イソプレノイド生合成に際しての調節機構の解明に曙光を与える研究として代謝生化学の発展に寄与するところが大きい。

参考論文 5 編もそれぞれ価値ある研究であり、生化学における申請者の学識と研究能力とをうかがうことができる。

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。