

氏名	大 森 齊 おお もり ひとし
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 363 号
学位授与の日付	昭 和 49 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	工 学 研 究 科 工 業 化 学 専 攻
学位論文題目	<b>Studies on the biochemical role of vitamin B<sub>12</sub> in photosynthetic bacteria</b> (光合成細菌におけるビタミン B <sub>12</sub> の生化学的役割に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 福 井 三 郎    教 授 河 西 三 省    教 授 松 浦 輝 男

### 論 文 内 容 の 要 旨

コバルトを含む有機金属錯体であるビタミン B<sub>12</sub> の単離とその構造決定以来このビタミンの生体内での機能に関して盛んな研究が展開されている。本論文はビタミン B<sub>12</sub> の生化学的役割をさらに詳細に知る目的で、ビタミン B<sub>12</sub> を著量生産する光合成菌において、このビタミンの関与する酵素系の検討及びその生理的意義を明らかにしようとしたものであり、4編より構成されている。

第1編では、紅色非イオウ細菌のグルタミン酸代謝におけるビタミン B<sub>12</sub> の関与を研究している。

*Rhodospseudomonas spheroides*, *Rhodospirillum rubrum* はグルタミン酸を炭素源として嫌気条件で増殖する。この場合、グルタミン酸の代謝を、<sup>14</sup>C-グルタミン酸を用いて無細胞系で調べ、β-メチルアスパラギン酸を経てメサコン酸へ交換されることを証明した。この反応は B<sub>12</sub> 補酵素に依存していたことから、これらの菌では、グルタミン酸の利用にクエン酸回路に依存しないグルタミン酸異性化酵素を経る系が関与していることが明らかとなった。グルタミン酸は同時に α-ケトグルタル酸、α-ヒドロキシンググルタル酸にも変換された。後者は更に B<sub>12</sub> 補酵素関与メチルマロニル CoA 異性化酵素を含む代謝系によりコハク酸まで代謝されることを示している。

第2編では2種の光合成菌における B<sub>12</sub> 依存メチオニン合成酵素の証明とその部分精製について述べている。*Chromatium D* は B<sub>12</sub> を合成できないが、メチオニン合成酵素をアポ酵素として保有することを明らかにした。アポ酵素は細胞内 (*in vivo*) 及び試験管内 (*in vitro*) で B<sub>12</sub> 化合物により速かにホロ化された。244倍精製されたホロ酵素は、アデノシルメチオニン依存性が低くメチル B<sub>12</sub> を結合した活性型であると推定され、反応の至適 pH は 7.5~7.8 であった。一方 B<sub>12</sub> 生産性の *Rsp. rubrum* のメチオニン合成酵素は常にホロ酵素として存在しており、部分精製された標品は、アデノシルメチオニン及び還元剤に対し完全な依存性を持ち、典型的な B<sub>12</sub> 依存メチオニン合成酵素の性質を示した。反応の至適 pH は酸性側にあり 6.5~6.75 であることが認められた。

第3編では光合成菌の B<sub>12</sub> 依存メチオニン合成酵素量と菌体内の B<sub>12</sub> 濃度の相関について明らかにして

いる。前述の *Rsp. rubrum Chromatium D* では、酵素量に対する  $B_{12}$  の効果が著しく異っていた。*Chromatium D* は  $B_{12}$  の有無にかかわらず一定量のアポタン白を生成した。この事は  $B_{12}$  欠乏菌体を  $B_{12}$  と接触させた後、全酵素量を測定してみるとタン白合成阻害剤の有無によって全く差が見られないことから結論している。一方 *Rsp. rubrum* では本酵素は全てホロ酵素として存在しており、 $Co^{2+}$  欠乏培地で培養すると  $B_{12}$  生成量が減少し同時にメチオン合成酵素の比活性も低下した。 $B_{12}$  欠乏菌体を  $B_{12}$  と接触させると約2時間後から酵素活性が上昇し6時間で正常な細胞の比活性に達した。この過程は完全に  $B_{12}$  に依存しており、タン白合成阻害剤で抑制された。この事実は  $B_{12}$  との接触による酵素比活性の上昇は、あらかじめ存在していたアポ酵素のホロ化によるものではなく、新たな酵素タン白の合成の結果であることを意味する。 $^3H-CNB_{12}$  を用い  $^3H-B_{12}$ -酵素複合体として酵素量を測定することにより、この現象を確認した。

他の  $B_{12}$  生産菌、*Streptomyces olivaceus*, *Corynebacterium simplex* でも同様な結果を得て、 $B_{12}$  生産菌ではメチオン合成酵素の合成量と  $B_{12}$  の細胞内濃度に強い相関があることを証明した。一方  $B_{12}$  非生産菌である大腸菌のメチオン合成酵素はその量が  $B_{12}$  に依存せず、*Chromatium D* のものと同様に挙動することを示した。この結果は補欠分子が、そのアポタン白の合成を何らかの機構で調節している有力な実例を与えたものである。

第4編では光合成菌におけるメチオン合成酵素系及びその調節について述べている。*Chromatium D* には  $B_{12}$  非依存メチオン合成酵素活性が認められ、 $B_{12}$  欠乏菌体ではこの酵素によってメチオンが合成されているものと推定される。本酵素は  $B_{12}$  及びメチオンによってレプレッションをうけ、特に後者は酵素活性も阻害することが認められた。 $B_{12}$  を与えた菌体中にメチオニンの増加が起らなかったこと、メチオンでは増殖阻害が起るのに  $B_{12}$  では全く起らないことから両者の作用は独立と推測される証拠を与えた。 $B_{12}$  が充分存在する場合、メチオンは  $B_{12}$  依存酵素と量の低下した  $B_{12}$  非依存酵素の両方で合成されるものと考えられるが、この場合後者はメチオンによるフィードバック阻害で調節されることを明らかにした。一方 *Rsp. rubrum* では  $B_{12}$  依存メチオン合成酵素の活性にかかわらず  $B_{12}$  非依存メチオン合成酵素活性は認められず、 $B_{12}$  依存酵素がもっぱらメチオン合成に関与していることを示す結果を得た。

### 論文審査の結果の要旨

ビタミン  $B_{12}$  は構造、化学的性質、生化学作用の面からきわめて興味深い生理活性物質であり、動物、原虫及び細菌の生命現象に演じる役割にかんし盛んな研究が行なわれている。一般に光合成細菌は光合成作用に必要な細菌クロロフィルとともに、生合成経路の前半部が共通するビタミン  $B_{12}$  をよく生合成するが、その生化学的意義に関しては従来充分な研究が行なわれていない。

本論文はビタミン  $B_{12}$  生合成能を持つ紅色非イオウ細菌、*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas spheroides* と、コバルトの欠除したビタミン  $B_{12}$  類似体は作るが完全なビタミン  $B_{12}$  を生合成する能力を持たない紅色イオウ細菌 *Chromatium D* を用いて、これらの光合成細菌の代謝におけるビタミン  $B_{12}$  関与の酵素系の意義を解明し、またビタミン  $B_{12}$  生合成と酵素タン白質生合成との関係について興味深い

現象を発見した研究を4編にまとめている。得られた成果の主要なものは次の通りである。

(1) *Rsp. rubrum*, *Rps. spheroides* にビタミン B<sub>12</sub> 補酵素依存のグルタミン酸異性化酵素が存在することを始めて証明した。この両菌は嫌気条件でグルタミン酸を単一炭素源としてよく繁殖するが、この場合グルタミン酸の一部は上記酵素により β-メチルアスパラギン酸に変換され、さらにメサコン酸を経てピルビン酸とアセチル CoA へと変化することを無細胞抽出液を用いる実験で明らかにした。またグルタミン酸の一部は α-ケトグルタル酸, α-ヒドロキシグルタル酸を経て、その後ビタミン B<sub>12</sub> 補酵素依存メチルマロニル CoA 異性化酵素を含む代謝系によりコハク酸まで代謝されることも示した。これらのビタミン B<sub>12</sub> の関与する代謝系の存在が明らかにされたことは、上記の光合成細菌におけるクエン酸回路を経由しない菌体成分構成材料の供給経路の存在を示したものとして意義が大きい。

(2) ビタミン B<sub>12</sub> の関与する重要な酵素の1つである N<sup>5</sup>-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステイン・メチル基転移酵素(メチオニン合成酵素)が *Rsp. rubrum* に存在することを証明した。一方、完全なビタミン B<sub>12</sub> を合成できない *Chromatium D* もメチオニン合成酵素のアポたん白質を保有しており、細胞内 (*in vivo*) でも試験管内 (*in vitro*) でもビタミン B<sub>12</sub> 類により活性化ホロ酵素となることを示し、種々の酵素化学的性質を明らかにした。

(3) ビタミン B<sub>12</sub> 生合成能を持つ *Rsp. rubrum* を Co<sup>2+</sup> 濃度を調節して培養することにより菌体内ビタミン B<sub>12</sub> 含量を変化せしめ、メチオニン合成酵素が常にホロ酵素としてのみ存在し、しかもその含量はビタミン B<sub>12</sub> 生合成量と対応することを示した。さらに、ビタミン B<sub>12</sub> 不足菌体に外部よりビタミン B<sub>12</sub> をとりこませると、数時間後に本酵素量の増加が起こるが、これがたん白質合成阻害剤により阻止されることを証明した。一方ビタミン B<sub>12</sub> 生合成能のない *Chromatium D* では、かかる現象は起こらないことを示した。既にメチオニン合成酵素のように強固に結合したビタミン B<sub>12</sub> を活性部位として保持する酵素では、ビタミン B<sub>12</sub> 生合成と酵素たん白質生合成間に密接な関係があることを証明し、さらに *Streptomyces olivaceus*, *Corynebacterium simplex* などの微生物においても証明した。

(4) *Chromatium D* ではメチオニン合成はビタミン B<sub>12</sub> に依存しないメチオニン合成酵素により営まれることを示し、外部よりビタミン B<sub>12</sub> を与えてビタミン B<sub>12</sub> 依存メチオニン合成酵素を活性化せしめた場合のビタミン B<sub>12</sub> 非依存酵素系のレプレッション機構による調節を明らかにした。

以上を要するに、本論文は学術的にも応用的にも興味深い光合成細菌において、ビタミン B<sub>12</sub> の関与する種々の酵素の存在を証明し、それらの代謝的意義を示し、さらにメチオニン合成酵素におけるビタミン B<sub>12</sub> 生合成と酵素たん白質生合成間の関連を明らかにしたものであり、学術上ならびに実用上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。