

氏 名	千代延 智 三 ちよのぶ とし かず
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	論 農 博 第 777 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	STUDIES ON KETOGLUCONATE METABOLISM OF ACETIC ACID BACTERIA (酢酸菌のケトグルコン酸代謝に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 杉倉辰六郎 教 授 上久保 正 教 授 山田秀明

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は代表的な酢酸菌を用いて、グルコン酸、2-ケトグルコン酸および5-ケトグルコン酸の代謝に関与する酵素、2-ケトグルコン酸レダクターゼ (2 KGR)、5-ケトグルコン酸レダクターゼ (5 KGR) および補酵素無関与のグルコン酸脱水素酵素 (GADH)、2-ケトグルコン酸脱水素酵素 (2 KGDH) を精製して酵素化学的性質を検討するとともに、ケトグルコン酸代謝におけるそれぞれの酵素の役割を解析した結果をまとめたものである。その内容は以下のように要約される。

I. 2-ケトグルコン酸レダクターゼおよび5-ケトグルコン酸レダクターゼの分布: 2 KGR と 5 KGR の分布を酢酸菌26株について調べた。両酵素は *Gluconobacter* 属に広く分布しており、*Acetobacter* 属には NADPH 存在下で両ケトグルコン酸を還元する酵素が存在するにもかかわらず、グルコン酸の NADP 存在下での酸化はほとんどみられなかった。

II. 2-ケトグルコン酸レダクターゼの精製、結晶化および性質: *Gluconobacter liquefaciens* の菌体抽出液から NAD(P)H 関与の 2 KGR を熱処理、DEAE-セファデックス、ハイドロキシルアパタイトなどを用いて 40% の回収率で約 760 倍に精製し、無色の六角板状の結晶として初めて単離した。本酵素は 120,000 の分子量をもち、また SDS 電気泳動から分子量 42,000 のサブユニット 2 つと 34,000 のサブユニット 1 つから構成されることがわかった。本酵素は D-グルコン酸、2-ケト-D-グルコン酸間の転換反応以外に、酸化反応では D-ガラクトン酸と L-イドン酸を、還元反応では 2-ケト-D-ガラクトン酸とオキシビルビン酸を良好な基質とした。ついで *Acetobacter rancens* の菌体抽出液から NAD(P)H 関与の 2 KGR を約 3700 倍に精製し、長方板状の結晶として単離した。本酵素は 120,000 の分子量をもち、8 つのサブユニット (分子量 15,000) から成ることがわかった。本酵素は基質特異性など先の *G. liquefaciens* の 2 KGR と類似していたが、グルコン酸酸化能が極端に低いことや 2-ケトグルコン酸に対する比活性がきわめて高いことなどの特徴を有していた。

III. 5-ケトグルコン酸レダクターゼの精製および性質: *G. liquefaciens* の菌体抽出液から NADPH 関与の 5 KGR を 25% の収率で約 120 倍に精製した。本酵素は先の 2 KGR と異なり、D-グルコン酸と 5-ケ

トグルコン酸間の転換反応のみを触媒し、基質特異性はきわめて高かった。また本酵素は 2 KGR と異なり、SH 化合物によって安定化されなかった。しかし基質のグルコン酸、5-ケトグルコン酸によってきわめて安定化された。

Ⅳ. グルコン酸脱水素酵素および 2-ケトグルコン酸脱水素酵素の分布と可溶化：GADH は *Gluconobacter* 属に広く分布し、2KGDH 活性は特に色素生成菌に観察された。酢酸菌以外の酸化細菌では、GADH は特に *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia* 属にその活性がみられたが、2 KGDH 活性は全く検出されなかった。さらに GADH, 2 KGDH 両酵素とも細胞の particulate fraction のみに存在し、界面活性剤による可溶化は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 1% トリトン X-100 処理を 5℃, 9 時間行なった場合に最適であった。

論文審査の結果の要旨

酢酸菌のグルコース代謝型式は *Pseudomonas* などの一般酸化細菌に比べてきわめて特異的であり、5-ケトグルコン酸、2,5-ジケトグルコン酸、D-リキシウロン酸およびパイロン化合物の生成は独り酢酸菌のみがもつ特性である。しかしながら、これら酸化醗酵の酵素化学的機構についてはいまだ充分明らかにされていない。著者は本細菌群のケトグルコン酸代謝に関与する酵素について詳細な研究を行なった結果、以下に要約されるような成果をあげた。

I. 2-ケトグルコン酸レダクターゼ (2 KGR), 5-ケトグルコン酸レダクターゼ (5 KGR), グルコン酸脱水素酵素 (GADH) および 2-ケトグルコン酸脱水素酵素 (2 KGDH) の分布を調べ、*Gluconobacter* と *Acetobacter* の両属における酵素活性の差異が従来の分類の知見とよく一致することを認めた。今後、自然界より分離される酢酸菌の同定において、本研究の結果は重要な指針を提供するものと考えられる。

Ⅱ. *Gluconobacter liquefaciens* の菌体抽出液から NAD(P)H 関与の 2 KGR を精製し、結晶として単離した。本酵素 (分子量 120,000) は D-グルコン酸と 2-ケト-D-グルコン酸間の転換以外に、酸化反応では D-ガラクトン酸と L-イドン酸を、還元反応では 2-ケト-D-ガラクトン酸とオキシビルビン酸を良好な基質とした。ついで *Acetobacter rancens* から 2 KGR を結晶として単離し、その諸性質を明らかにした。本酵素 (分子量 120,000) はグルコン酸酸化活性が極端に低いことや 2-ケトグルコン酸に対する活性がきわめて高いことで特徴的であった。

Ⅲ. *G. liquefaciens* から 5 KGR を約 120 倍に精製して、その性質を明らかにした。本酵素は前記 2 KGR とは異なり、D-グルコン酸と 5-ケト-D-グルコン酸間の転換反応のみを触媒した。

Ⅳ. 酢酸菌の GADH, 2 KGDH 両酵素とも細胞の particulate fraction のみに存在し、界面活性剤によって可溶化された。両酵素と前記ケトグルコン酸レダクターゼを比較した結果を総合して、酢酸菌におけるケトグルコン酸生成は particulate dehydrogenase によること、一方、soluble reductase は細胞内グルコン酸濃度の調節に寄与するものであると考察した。

以上のように、本論文は酢酸菌の糖代謝の分野に新しい知見を加えたものであって、微生物生産学および醗酵化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。