

氏 名	本 多 進 ほん だ すずむ
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	論 工 博 第 628 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 9 月 25 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	Studies on regulation and physiological significance of coenzyme B ₁₂ -dependent diol and glycerol dehydratases (ビタミン B ₁₂ 補酵素関与ジオール脱水酵素及びグリセロール 脱水酵素の調節と生理的意義に関する研究)
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

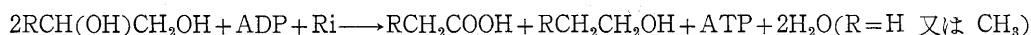
論 文 内 容 の 要 旨

補酵素型ビタミンB₁₂ (B₁₂ 補酵素) は分子内にコバルト炭素 (Co-C) シグマ結合を有する複雑な有機金属化合物であり、水素移動を伴う脱離・異性化・還元など約10種類の生化学反応に補酵素として関与する重要な生理活性物質である。B₁₂ 補酵素の触媒作用は、それが酵素タンパク質と結合することにより Co-C 結合が活性化され開裂することによって由来すると考えられているが、アポ酵素と補酵素の相互作用や Co-C 結合を開裂させる機作については現在未解決のまま残されている。本論文で取扱われているジオール脱水酵素及びグリセロール脱水酵素は、B₁₂ 補酵素の作用機作や Co-C 結合活性化にあずかる諸因子の解明に最も頻繁に用いられてきた B₁₂ 補酵素関与酵素であるが、生物の代謝における意義に関しては不明のまま今日に至った。

本論文は細菌における両酵素の生合成及び活性の調節及び生理的意義に関する研究をまとめたものである。内容は4部から成る。第Ⅰ部はジオール脱水酵素のアポ酵素産生に及ぼす諸条件の検討と、ジオール脱水酵素の生理的意義、すなわち 1,2-ジオールの嫌氣的代謝経路に関する研究、第Ⅱ部はグリセロール脱水酵素の生理的意義に関する研究、第Ⅲ部はジオール脱水酵素の酵素化学的側面より活性の調節機構を追究した研究、第Ⅳ部は細胞内の B₁₂ 補酵素レベルの変動によりなされる活性の調節機構に関する研究である。

第Ⅰ部では、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724 を 1,2-プロパンジオールあるいは 1,2-エタンジオールなど種々の炭素源を用いて、嫌氣的、好氣的あるいは硝酸呼吸により培養し、アポ酵素レベルに及ぼす諸条件を検討した。その結果、ジオール脱水酵素は 1,2-プロパンジオールあるいは 1,2-エタンジオールによる嫌氣的培養時に著量に誘導生成されること及びグルコースによりアポ酵素の生合成が著しく抑制されることを見出し、ジオール脱水酵素がグルコースによる catabolite repression を受ける典型的な誘導酵素であることを明らかにした。さらに、従来 *K. pneumoniae* ATCC 8724 においてジオール脱水酵素とグリセロール脱水酵素の区別が不明瞭であったが、本菌ではグリセロールによる嫌氣的培養時にも同一

のジオール脱水酵素が生成することを、精製ジオール脱水酵素に対するウサギ抗血清を用いた免疫二重拡散法により証明した。つぎに、*K. pneumoniae* ATCC 8724 の菌懸濁液あるいは粗酵素液を 1,2-プロパンジオールや 1,2-エタンジオールと一定時間保温し反応生成物を酵素的にあるいはガスクロマトグラフィーで定量した結果、1,2-ジオールはジオール脱水酵素、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ及びアセテートキナーゼの諸酵素により順次相当するアルデヒド、アシル CoA、アシルホスフェート、最後にカルボン酸に変換され、アルデヒドはその一方でアルコールデヒドロゲナーゼにより相当するアルコールに変換されるという代謝経路を解明し、 B_{12} 補酵素関与ジオール脱水酵素による最初の脱水反応が律速段階であることを明らかにした。全体の反応は以下の通りである。



第Ⅱ部では、グリセロール脱水酵素の本来の基質がグリセロールであるにもかかわらず *in vitro* のグリセロール脱水反応中に見出されていた不可逆的失活現象が、グリセロール脱水酵素の生理的意義を考察する際の障害となっていたので、トルエン処理によって低分子物質の透過能を亢進させた菌体を用いた新規手法により *in vivo* での反応を推測した。*K. pneumoniae* ATCC 25955 のトルエン処理菌体でのグリセロール脱水酵素の種々の反応速度定数は粗酵素液のそれらと全く同一であり、電子顕微鏡による観察でトルエン処理菌と未処理菌の間に本質的な差異を認め得なかったことから、トルエン処理菌のグリセロール脱水酵素は *in vivo* に酷似した環境にあることが判明した。トルエン処理菌によるグリセロール脱水反応は ATP 及び二価金属イオン (Mn^{2+} あるいは Mg^{2+}) 存在下では、酵素の不可逆的失活が認められず、かつ ATP 及び二価金属イオン添加により失活した酵素が再活性化される現象を見出した。粗酵素液でのグリセロール脱水反応には両因子は何ら影響を与えなかった。これらの結果は、失活した酵素の再活性化機構が *in vivo* に存在することを示唆し、*in vivo* でのグリセロール脱水反応は正常に進行しグリセロール脱水酵素がグリセロールの嫌氣的代謝に重要な役割を果たしていると推察した。あらゆる酵素反応は永続的に初速度を保持して進行することはあり得ず、反応の進行に伴い酵素の失活は免れ得ない。*in vivo* では酵素や補酵素の代謝回転により酵素の失活は補填されるので正常な反応速度を保持するが、本例のように反応中の急激な失活も、しかるべき再活性化機構の存在によって補なわれるものと予想される。本研究の結果は、このような補填機構の存在の 1 例を示したもので、興味深い成績と考えられる。

第Ⅲ部では、ジオール脱水酵素を構成する F と S と命名された 2 つの異種コンポーネントの相互作用を検討することにより、ジオール脱水酵素の調節に作用する因子を調べている。ジオール脱水酵素活性がキレート化剤である EDTA あるいは EGTA により顕著に阻害されることを見出し、原子吸光分析により本酵素が Ca を 2 個含有する金属酵素であることを証明した。ディスクゲル電気泳動及びゲルろ過の結果から、EDTA は 2 種のコンポーネントへの解離を促進することが判明し、Ca はジオール脱水酵素の高次構造の保持に必須であることを明らかにした。これらの結果から、ジオール脱水酵素は *in vivo* においてコンポーネントへの解離会合により酵素活性が調節され、Ca が直接的又は間接的に解離会合に影響を与えている可能性を示した。

第Ⅳ部では、 B_{12} 補酵素レベルの変動によってなされるジオール脱水酵素活性の調節機構に検討を加えるため、 $[^3H]$ CN- B_{12} を用いて *K. pneumoniae* ATCC 8724 のビタミン B_{12} 取込み系を調べた。その結果、

K. pneumoniae ATCC 8724 には *Escherichia coli* に類似の輸送系、すなわち膜表面に存在する結合タンパク質への吸着と考えられるエネルギー非依存性の迅速な取込み段階である第一過程と、それに続いて生じるエネルギーに依存したゆるやかな内部への取込み段階である第二過程からなる輸送系が存在することを明らかにした。さらに、1価陽イオンが存在しない緩衝液中では EDTA がビタミン B₁₂ の取込みを著しく阻害する事実を見出し、この結果から膜表面のレセプタータンパク質とビタミン B₁₂ の結合の性質を推察した。

論文審査の結果の要旨

ビタミン B₁₂ 補酵素は、高分子物質を除いては自然界で最も複雑な構造を持つ有機コバルト化合物で、その構造と化学的ならびに生化学的機能の関係、細胞内への吸収および生体内輸送の機構、生合成経路、生理作用などに多くの未解決の問題が残されている重要な生理活性物質である。ジオール脱水酵素とグリセロール脱水酵素は B₁₂ 補酵素の作用機構の研究に広く応用されている代表的な B₁₂ 補酵素依存酵素であるが、これらの酵素を生産する細菌における生理的意義、細胞内における量ならびに活性の調節様式についてはこれまで不明のままであった。

本論文は *Klebsiella pneumoniae* を用いて両酵素の生合成ならびに活性の調節、及び生理的意義について重要な情報を得た研究をまとめたものである。主要な成果を以下に列記する。

(1) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724 におけるジオール脱水酵素アポ・タンパク質の基質による誘導生成、グルコースによる“異化代謝産物抑制”の諸現象を証明した。

(2) 上記細菌における 1,2-プロパンジオール、1,2-エタンジオールの嫌氣的代謝経路をはじめて確定し、それぞれの最初の過程である B₁₂ 補酵素依存ジオール脱水酵素によるジオール類のプロピオンアルデヒド、アセトアルデヒドへの反応が律速段階となることを証明した。

(3) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 では、グリセロールは B₁₂ 補酵素依存グリセロール脱水酵素により β -ヒドロキシプロピオンアルデヒドに脱水されたのち嫌氣的に代謝される。ところが、同酵素を細胞外 (in vitro) でグリセロールに作用させると脱水反応は数分間で停止し酵素は不可逆的に失活してしまう。この細胞内 (in vivo) と細胞外での現象の矛盾を解明するため、トルエン処理で細胞膜の透過性を高めた菌体を用いる手法により、細胞内では ATP と 2 価金属イオン (Mn²⁺ または Mg²⁺) の存在下失活した酵素を再活性化する機構が働いていることを発見した。

(4) ジオール脱水酵素が 1 モル当り Ca を 2 個含有し、Ca はこの酵素の各成分が集合し活性発見に必要な高次構造を形成するのに必須であることを証明した。

(5) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724 における、外部のビタミン B₁₂ の細胞内への取込み機構を調べて、エネルギー非依存性の迅速な第 1 過程とエネルギーを必要とする輸送系に依存する第 2 過程から成ることを明らかにした。

以上を要するに本論文は、B₁₂ 補酵素を要求し、その作用機構の研究に広く用いられている *Klebsiella pneumoniae* のジオール脱水酵素、グリセロール脱水酵素の量ならびに活性の調節に関係する興味深い諸性質を、酵素化学的及び微生物化学的の両面から明らかにしたものであり、学術上ならびに実際上寄与

るところが少ない。

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。