

氏 名	山 田 友 紀 子 やま だ ゆ き こ
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 339 号
学位授与の日付	昭 和 56 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	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Biosynthetic Pathway of Riboflavin in <i>Eremothecium ashbyii</i> and <i>Bacillus subtilis</i> (<i>Eremothecium ashbyii</i> と <i>Bacillus subtilis</i> におけるリボフラビン 生合成経路に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 岩 井 和 夫 教 授 上 久 保 正 教 授 千 葉 英 雄

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は高リボフラビン生産菌 *Eremothecium ashbyii* 及びアデニン・リボフラビン要求性変異株 *Bacillus subtilis* AJ 1988 を用いて、これまで未解決であったリボフラビン生合成における中間体 6, 7-dimethyl-8-(1'-D-ribityl) lumazine (以下 DMRL と略記する) の前駆体を検出・単離しその化学構造を明らかにするとともに、この化合物が前駆体として機能していることを証明した研究成果をとりまとめたものである。

まず、*E. ashbyii* の休止菌体に trapping agent として dimeric diacetyl を添加して培養したところ DMRL 及び中間体の誘導体と思われる緑色蛍光物質の蓄積が見出された。しかし、この蛍光物質は ribityllumazine 誘導体であることまでは明らかとなったが、不安定なため最終的な同定はできなかった。そこで、より安定な形で中間体の誘導体を得るために trapping agent として glyoxal を添加して *E. ashbyii* の休止菌体を培養し、生成・蓄積された緑色蛍光物質を単離し、8-(1'-D-ribityl) lumazine (以下 8-RL と略記する) であることを決定した。この 8-RL は、(1) trapping agent の glyoxal 無添加時には検出されず glyoxal の添加によってはじめて生成が検出される、(2) glyoxal 0.1%までの添加ではその生成蓄積はリボフラビンの生合成に対して負の相関性を示し、0.1%添加時に最大となった、(3) *in vitro* において glyoxal は 4,5-diaminopyrimidine 誘導体と縮合してプテリジン誘導体を生成することが知られていることなどの事実から、リボフラビン生合成における中間体の誘導体であると考えられ、その中間体の構造は 5-amino-2,6-dihydroxy-4-(1'-D-ribitylamino) pyrimidine (以下 ADRAP と略記する) であることが示唆された。しかし、この ADRAP は riboflavin synthase (EC 2.5.1.9) による酵素反応の副産物としても知られている化合物であるので、その可能性を除くために riboflavin synthase を欠くアデニン・リボフラビン要求性変異株 *B. subtilis* AJ 1988 を用いて同様の実験を行い、この変異株においても *E. ashbyii* におけるのと同様に 8-RL の生成蓄積されることが実証された。

ついで、ADRAP がリボフラビン生合成の中間体として機能していることを明らかにするために *B.*

subtilis AJ 1988 の休止菌体に [2-¹⁴C] グアニンを添加して培養し、生成蓄積される 8-RL と DMRA との比放射能を比較したところ、両者の値はよく一致した。また GTP cyclohydrolase II を欠く *Saccharomyces cerevisiae* N189 に対して ADRAP は生育促進効果を示した。これに対して、従来、中間体としての可能性が示唆されていた 2,4,5-triamino-6-hydroxypyrimidine は中間体とはなり得ないことをトレーサー実験などによって証明した。

これらの結果から、*E. ashbyii* 及び *B. subtilis* におけるリボフラビンの生合成は GTP を出発物質とし、リボース残基がはずれることなく、二・三の中間体を経由して ADRAP が生成し、さらに DMRL を経て生合成されるものであると結論している。

論文審査の結果の要旨

リボフラビンの生合成経路については、これまでに、出発物質が GTP であること、及びリボフラビン直前に位置する前駆体は 6,7-dimethyl-8-(1'-D-ribityl) lumazine (以下 DMRL と略記する) であることなどが明らかにされてきた。しかしながら、GTP と DMRL との間に位置する中間体については実験的な証明はなかった。本論文では高リボフラビン生産菌 *Ermothecium ashbyii* 及びアデニン・リボフラビン要求性変異株 *Bacillus subtilis* AJ 1988 を用いてこのリボフラビン生合成における DMRL の直前に位置する前駆体を検出・単離し、その化学構造を明らかにするとともに、この化合物が前駆体として機能していることを実証している。

リボフラビン生合成経路における DMRL の前駆体は通常の培養条件ではほとんど全く検出されないが、著者はまず、高リボフラビン生産菌 *E. ashbyii* の休止菌体に各種の trapping agent を添加して培養する方法を用いることによって、その前駆体の誘導体を生成・蓄積させ得ることを見出した。ついで種々検討の結果、trapping agent として 0.1% glyoxal の添加が最も良いことを認め、この条件下で休止菌体の培養を行うことによって新しい緑色蛍光物質が生成・蓄積されることを見出し、このものを結晶状に単離し、8-(1'-D-ribityl) lumazine (以下 8-RL と略記する) であることを決定した。そして、この 8-RL の性質及び *E. ashbyii* の休止菌体における動態から、8-RL は DMRL の前駆体の誘導体であり、この前駆体の構造は 5-amino-2,6-dihydroxy-4-(1'-D-ribitylamino) pyrimidine (以下 ADRAP と略記する) であることを提示した。また riboflavin synthase (EC 2.5.1.9) を欠くアデニン・リボフラビン要求性変異株 *B. subtilis* AJ 1988 においても、*E. ashbyii* におけるのと同様の結果が得られることを明らかにしている。

ついで *B. subtilis* AJ 1988 の休止菌体に [2-¹⁴C]-グアニンを添加して培養し、生成・蓄積される 8-RL と DMRA との比放射能を比較すると両者はよく一致していること及び GTP cyclohydrolase II を欠く *Saccharomyces cerevisiae* N 189 に対して ADRAP は生育促進効果を示すことなどから、ADRAP はリボフラビン生合成の中間体であり、DMRL の前駆体として機能していることを明らかにしている。

このように本論文はこれまで未解決であったリボフラビンの生合成経路の解析のために新しい手法を開発すると共に、この方法を利用することによって DMRL の前駆体は ADRAP であることをはじめて実験的に証明し、かつこの化合物が前駆体として機能していることを明らかにしたものであって生化学及び

ビタミン学の分野に貢献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。