

氏 名	林 光 則 はやし みつ のり
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 617 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 7 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	微生物によるテトラピロール化合物生成に関する研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 福 井 三 郎 教 授 小 島 次 雄 教 授 松 浦 輝 男

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は微生物によるポルフィリン、コリノイドなどのテトラピロール化合物生成を取り扱ったもので、2編12章から成っている。第1編では配位子またはコリン核側鎖の異なる種々のコリノイド同族体の微生物定量法、薄層クロマトグラフによる分別法などを検討し、第2編ではプロピオン酸菌、光合成細菌、酢酸菌におけるポルフィリンとコリノイドの生合成と代謝的意義を検討したものである。

第1編第1章ではコリノイドにたいする感度と特異性の優れた原虫 *Euglena gracilis* Z 株を用いる定量法につき検討し、コリノイドの代表としてシアノ・コバラミンを例にとれば $0.125 \sim 1.25 \mu\text{g}/\text{tube}$ (5 ml) の低い濃度範囲で良好な検量曲線を得る定量条件の設定に成功した。また同菌にたいする NaCl の影響を調べ、設定した定量法を用いることにより、海水中のビタミン B₁₂ の定量を行なうことのできることを示した。

第2章では上方配位子、下方配位子あるいはコリン核側鎖の変化した種々のコリノイド同族体を分離するための薄層クロマトグラフィーを研究したものであり、コリノイド同族体の構造に起因する諸性質を考慮に入れて、分離能の優れた数種の吸着剤と溶媒の組合せを求めた。即ち、Aluminium oxide G のときイソアミルアルコール：酢酸：水 (18:1:1)、Kieselgel G のとき2-ブタノール：水：アンモニア水 (28%) (100:36:14)、Kieselgur G のときイソアミルアルコール：酢酸：水 (18:1:1)、P-セルロースのとき1%酢酸を含む水飽和2-ブタノール、DEAE-セルロースのとき2-ブタノール：水 (5:1) が分離良好であることを示し、*Propionibacterium shermanii*, *P. arabinosum* 菌体中のコリノイド類の分離に適用して好結果をおさめた。

第3章は各種のコリノイド化合物の微生物定量に関する基礎研究として、定量用菌の *Escherichia coli* 215 および *Ochromonas malhamensis* にたいするヒドロクソ・コバラミン、メチル・コバラミンの a, b 異性体、B₁₂ 補酵素の活性をシアノ・コバラミンを対照として比較した結果を取扱ったものである。

第4章ではコリノイド定量菌の *Euglena gracilis* E. coli にたいするコバルト・ポルフィリン類縁物質

の効果を調べ、*Euglena* にたいしてコバルト・ポルフィリンはビタミン B_{12} と類似の増殖促進作用を示し、増殖した菌体からはビタミン B_{12} 活性を持つ物質が検出されるのにたいし、*E. Coli* はコバルトポルフィリンを利用できないことを認めた。

第2編第1章ではクエン酸回路が欠除するとされている *Acetobacter suboxydans* の菌体内のコリノイドの型と役割について研究し、 B_{12} 補酵素が主成分であることを証明するとともに、菌体抽出液中に B_{12} 補酵素依存の β -メチルアスパラギン酸異性化酵素活性を確認した。この事実はクエン酸回路を欠く本菌では、メサコン酸 $\rightleftharpoons\beta$ -メチルアスパラギン酸 $\rightleftharpoons$ グルタミン酸の経路がグルタミン酸代謝に重要な役割を演じていることを示すものである。

第2章は光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* をコバルト塩含有培地に振盪培養および静置培養し、ポルフィリン類、バクテリオ・クロロフィル、コリノイド生成を調べ、さらにコリノイドの型を研究した結果を述べている。乾燥菌体単位重量あたりの上記テトラピロール化合物の生成量は適度の光照射下で静置培養した方が振盪培養よりも多く、また振盪培養時の菌体内のコリノイドはほとんど全てが B_{12} 補酵素であるのにたいし静置培養菌体には下方配位子の変化した同族体が含まれていることを確認した。コリノイド、ポルフィリン、ヘム、バクテリオ、クロロフィルの生成割合に及ぼす鉄塩、生合成中間体、抗生物質の影響も調べている。

第3章は *Rhodopseudomonas spheroides* の光合成能欠除変異株によるコリノイド、ポルフィリンの生合成能を調べている。これら変異株は、その性質上暗所好気下で培養されたが、コリノイド、ポルフィリン類の生成量、型は光合成能の有無による影響を受けなかった。

第4章は *Rhodopseudomonas spheroides* をコバルト欠除培地に振盪暗培養したときにコバルト欠除コリノイドが菌体内に生成することを証明したものであり、この物質は *Chromatium* のコバルト欠除コリノイドと若干性質を異にすることを示している。

第5章は炭化水素を炭素源とする *Rhodopseudomonas spheroides* のビタミン B_{12} 生成を調べたもので、炭素源として有機窒素化合物を用いて好気暗培養すれば、十分な増殖とかなりの量のビタミン B_{12} を生成することを示した。

第5章は *Propionibacterium shermanii* の菌体をコリノイド生合成の前駆物質である δ -アミノレブリン酸 (ALA) と接触保温し、菌体内に生成するコリノイドの型を経時的に追跡した研究を述べたもので、本菌におけるコリノイド生成の経路はコビリン酸から Factor V_{1a} , cobinamide を経て完全型コリノイドを形成し、コバルト部分への 5'-デオキシアデノシル基の配位はおそくともコビリン酸ジアミドの段階で行なわれることを強く示唆する成績を得ている。

第7章では *Propionibacterium arabinosum* 洗浄菌体を用いて、コビンアミドと2-チオアデニンまたは6-メチルメルカプトプリンから、これらの塩基を下方配位子成分とする特殊な完全型コリノイドを生成せしめ、生化学的活性を検討している。

第8章は *Propionibacterium shermanii* によるポルフィリン、コリノイド生合成の代謝調節の情報を得る目的で、関連化合物を添加して、両者の生成にたいする効果を調べたものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は光合成細菌、プロピオン酸菌、酢酸菌を対象として、生化学的に興味深いテトラピロール化合物であるコリノイド、ポルフィリン、バクテリオ・クロロフィルの生合成と代謝的意義について研究した成績をまとめたものである。得られた結果の主要なものとして、次の事項が列挙される。

(1) 上方または下方配位子、コリン核側鎖の異なる各種コリノイドを分離するための薄層クロマトグラフィーの条件を設定した。

(2) きわめて微量のコリノイドを検出、定量するために原虫 *Euglena gracilis* Z 株を用いる測定法を確立した。

(3) コリノイド要求性微生物である *Escherichia coli* 215 *Euglena gracilis* Z 株, *Euglena gracilis* var. *bacillaris* にたいする各種コリノイドの微生物活性を明らかにした。またこれらの菌にたいするコバルト・ポルフィリンの作用を調べ、*Euglena* では利用されて菌体内でビタミン B₁₂ の性質を持つ物質に変化することを示す結果を得たが、*Escherichia coli* ではかかる現象を認められないことを明らかにした。

(4) クエン酸回路の欠除した *Acetobacter suboxydans* の菌体中に補酵素型ビタミン B₁₂ が存在し、かつ同補酵素に依存する β -メチルアスパラギン酸異性化酵素の存在を確認した。この事実から、本菌ではグルタミン酸の代謝がメサコン酸、 β -メチルアスパラギン酸を経由する経路で営まれることを明らかにした。

(5) 光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides* のコリノイド、ポルフィリン、バクテリオ・クロロフィル生合成と培養条件の関係、生合成経路関連物質の添加による代謝調節などを詳細に研究した。とくに、*R. spheroides* をコバルト欠除培養液に培養することにより弱塩基性のコバルト欠除コリノイドを菌体内に生成せしめたことは興味深い。

(6) *Propionibacterium shermanii* 菌体をコリノイド生合成の前駆物質である δ -アミノプリン酸 (ALA) と接触保温して、菌体内に生じるコリノイドの型を経時的に追跡することにより、コリン核の側鎖の変化、下方および上方配位子の結合の経過を知る手がかりを与えた。

(7) *Propionibacterium arabinosum* 菌体をコビンアミドと2-チオアデニンまたは6-メチルメルカプトプリンとに接触保温することにより、これらの塩基を分子内に導入した非天然型のコリノイドを調製し、生物活性と生化学作用を明らかにした。

以上を要するに、本論文は微生物を用いて生化学的に重要なコリノイド、ポルフィリンなどのテトラピロール化合物の生合成と生化学的意義、特殊な構造を持つ類縁体の調製などを取扱ったものであり、学術上および工業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。