

|             |                                                                                                                                                |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 鍋 島 成 泰<br>なべ しま しげ やす                                                                                                                         |
| 学 位 の 種 類   | 工 学 博 士                                                                                                                                        |
| 学 位 記 番 号   | 工 博 第 544 号                                                                                                                                    |
| 学位授与の日付     | 昭 和 53 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 Role and Regulation of Glyoxylate Cycle<br/>in Hydrocarbon-utilizable Yeasts</b><br>(炭化水素資化性酵母におけるグリオキシル酸回路の役割と調節に<br>関する研究) |
| 論文調査委員      | (主査)<br>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

本論文は、炭化水素を炭素源として生育する *Candida* 属酵母において、糖合成に関連する重要な代謝経路の1つであるグリオキシル酸回路の役割と調節に関して行なった研究をまとめたものである。

第1部では、炭化水素の代謝におけるグリオキシル酸回路の生理的役割とグリオキシル酸回路の重要な酵素であるイソクエン酸分解酵素 (ICL) の酵素生合成レベルでの調節機構に関する研究をまとめている。第1章では、炭化水素生育時とグルコース生育時における菌体多糖類の合成能力を比較検討し、炭化水素生育時において生体に必要な多糖類の生合成が順調に行なわれていることを示し、炭化水素から糖を合成するための補完的な代謝回路が働いていることを示す結果を得た。第2章では、種々の *Candida* 属酵母を異なった炭素源で生育させ、グリオキシル酸回路酵素である ICL とりんご酸合成酵素 (MS) の酵母の増殖に伴う菌体内レベルを詳細に比較した結果、グリオキシル酸回路が炭化水素からの糖合成において重要な役割を果たしていることを確認している。さらに *Candida tropicalis* における ICL 合成がグルコースの存在で抑制され、炭化水素により促進されることが認められた。第3章では *C. tropicalis* と *C. lipolytica* における ICL 生合成の調節機構の差異について詳細に調べている。*C. tropicalis* においては培地より供給されるビオチンが ICL 合成の調節因子となることを発見し、グルコース生育時にビオチンが不足すると、グルコースによる ICL 合成の抑制が解除され ICL レベルが上昇することを示した。第4章では、ビオチンによる ICL 合成調節の機作とその生理的意義について述べている。ビオチンの不足は、ビオチンを補酵素とするピルビン酸カルボキシラーゼとアセチル CoA カルボキシラーゼの菌体内レベルを低下させ、菌体内ピルビン酸含量の増大とオキサリ酢酸の減少を起こすことが認められた。この事実から、ビオチン生合成能の弱い *C. tropicalis* ではビオチン欠乏時にオキサリ酢酸が不足するが、この条件下では ICL 合成が促進されてグリオキシル酸回路によるオキサリ酢酸の供給が行われるという合目的性のある調節様式が働くことが明らかにされた。さらに、ビオチンによる ICL レベルの調節が他の *Candida* 属酵母にも存在することを証明し、酵素における ICL レベルの調節機構

として、グルコースによる抑制とは別に、オキサリ酢酸のような  $C_4$  化合物の不足を補うための誘導機構の存在することを提唱した。

第2部では、グリオキシル酸回路と密接な関連のあるくえん酸回路とグリオキシル酸回路との代謝分担と両者の相互調節機構に関する知見を得るために、*C. tropicalis* におけるイソくえん酸の ICL による代謝とイソくえん酸脱水素酵素 (ICDH) による代謝との関係を、炭素源の相違による両酵素の細胞内レベルの変動と、それぞれの活性に及ぼす関連代謝中間体の効果の面より詳細に調べている。第1章では、*C. tropicalis* の NAD 依存 ICDH と NADP 依存 ICDH をそれぞれ精製し、NAD 依存 ICDH は AMP, ADP, くえん酸で活性化され、生体エネルギーレベルと関連して活性の調節が起こることを明らかにし、一方 NADP-ICDH はグリオキシル酸とオキサリ酢酸とによる協奏的阻害を強く受けることを示した。第2章では、*n*-アルカン生育菌体とグルコース生育菌体から ICL の分離精製を行って、両者の DEAE-セルロースクロマトグラフィーなどの挙動が異なることを示している。両菌体の ICL とも種々の糖分解経路の中間代謝物により活性が阻害されるが、特に6-ホスホグルコン酸、ホスホエノールピルビン酸により活性が阻害されることが認められた。*n*-アルカン生育菌体では特殊な細胞内小器官であるマイクロボディの顕著な発達が見られ、ICL と MS はこの細胞内小器官に存在することが著者の属する研究室で証明されているが、この場合はイソくえん酸はマイクロボディ内でグリオキシル酸回路によって代謝されるものであり、ICL と MS は炭素源の種類によるマイクロボディの出現と消失に伴って量的に変動することを示した。

### 論文審査の結果の要旨

*n*-アルカンを原料とする醗酵に関する実際的な研究はきわめて盛んに行われているが、微生物により *n*-アルカン分子の炭素が菌体構成成分に利用される場合の代謝の流れは、糖質原料の場合とは全く異なるにもかかわらず、その代謝経路に関与する酵素系に関する基本的研究は質、量ともに見るべきものが少ない。本論文は、グルコースと *n*-アルカンの両者を炭素源として利用しうる数種の *Candida* 属酵母を用いて、グリオキシル酸回路酵素の細胞内レベルが炭素源の種類による代謝の流れの相違に応じて合目的性を持って変化する事実、特にイソくえん酸分解酵素 (ICL) の調節現象を詳細に調べたものであり、得られた主要な成果として次のものが挙げられる。

(1) 代表的な *Candida* 属酵母を用い、*n*-アルカン生育時にもグルコース生育時と同様に糖類の生合成が順調に進行していることを示し、この場合 *n*-アルカンの分解により生じるアセチル CoA から  $C_4$  化合物生成へと導くグリオキシル酸回路が活潑に働くためであることを明らかにした。

(2) グリオキシル酸回路の重要な酵素 ICL の生合成が、*n*-アルカンによる促進とグルコースによる抑制を受けるだけでなく、培地のビオチン不足時にグルコースによる抑制の解除が起こる現象を発見し、ビオチン依存酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼのレベルの低下による細胞内オキサリ酢酸プールの減少を補うようにグリオキシル酸回路の働きが高まる合目的的な代謝調節機構の存在することを示した。

(3) 細胞内でイソくえん酸をグリオキシル酸回路へ導入する ICL とくえん酸回路へ導入するイソく

えん酸脱水素酵素 (ICDH) の NAD 依存と NADP 依存の 2 種類を、グルコースと n-アルカンに生育した *C. tropicalis* より分離精製し、それぞれの性質を調べた。NAD 依存 ICDH は AMP, ADP, くえん酸で活性化され生体エネルギーレベルと関係する調節を受けることを示し、一方 NADP 依存 ICDH は グリオキシル酸とオキサリ酢酸とによる協奏的阻害を受けることを明らかにし、炭素源に応じて代謝の流れが巧妙にくえん酸回路とグリオキシル酸回路に振り分けられるようになっていることを証明した。ICL は 6-ホスホグルコン酸、ホスホエノールピルビン酸などにより活性が阻害されるが、n-アルカン生育菌体ではグリオキシル酸回路の鍵酵素である ICL とりんご酸合成酵素はマイクロボディ中に存在し、中間代謝産物による活性調節によるよりも酵素の局在性と量の増減による調節を受けることを明らかにした。

以上を要するに、本論文は n-アルカンを炭素源、エネルギー源として酵母が生育する場合に、n-アルカンの酸化分解によるアセチル CoA の生成と糖の新生合成とを連結する重要な代謝経路であるグリオキシル酸回路の意義とその合目的的な調節機構とを実証したものであって、学術上ならびに実際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。