

氏 名	玉 尾 嘉 邦 たま お よし くに
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	工 博 第 189 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 45 年 1 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	タミンB ₁₂ 補酵素に関する2, 3の生化学的研究

論文調査委員 (主 査) 教授 福井三郎 教授 穴戸圭一 教授 野崎 一

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B₁₂ の補酵素型である α -(5,6-dimethylbenzimidazolyl)-Co-5'-deoxyadenosylcobamide (B₁₂ 補酵素と略称する) は corrin 核の中心原子のコバルトと上方配位子の 5'-デオキシアデノシル基の 5' 位炭素とがシグマ結合をした構造をもち、自然界にはじめて発見された有機コバルト化合物として特異な物質である。この補酵素は約 6 種類の水素転移を伴う生化学反応に関与することが知られているが、アポ蛋白との相互作用によりコバルト-炭素結合が不安定化して生じた 5'-デオキシアデノシル。カルボニウムイオンが水素陰イオン授受の活性点となるという説が現在もっとも有力である。

本論文は B₁₂ 補酵素のコバルト-炭素結合の生成と開裂を生化学的に研究したもので、とくに B₁₂ 分子を修飾した場合の影響をしらべている。

第 1 編第 1 章はプロピオニバクテリウム・シャーマニーを用いて増殖細胞、休止細胞および粗酵素液の各段階におけるシアノ B₁₂ およびアクォ B₁₂ からの B₁₂ 補酵素生成過程を研究した結果を述べている。いずれの場合にもアクォ B₁₂ に比しシアノ B₁₂ は補酵素に転換されにくいことが確認されたが、酵素反応の経過を分光学的方法で追跡し B₁₂ の 3 価のコバルトが 2 段階の還元を受けて 1 価になったのち 5'-デオキシアデノシル・カチオンが親電子的に結合して B₁₂ 補酵素が生成する過程を明らかにし、シアノ B₁₂ が補酵素型に変換されにくいのは生化学的に還元される速度が遅いことによることを示した。

第 1 編第 2 章ではシアノ B₁₂ を酸加水分解して corrin 核につく三つのプロピオン酸アミド基全部あるいは 1 部をプロピオン酸基に変えたシアノ B₁₂ カルボン酸類が、プロピオニバクテリウム・シャーマニーにより補酵素型に変換されるかどうかをしらべている。その結果、添加培養実験では菌体中にとりこまれた B₁₂ カルボン酸はすべて 5'-デオキシアデノシル化されており、しかもカルボキシル基のすべてか、または 1 部がアミド化されていることを認めた。さらに部分精製酵素を用いてシアノ B₁₂ カルボン酸類の 5'-デオキシアデノシル化反応を比較した結果、カルボキシル基の数が増加するにつれて補酵素型に変換されにくく、とくにモノカルボン酸の 3 種の異性体では b 側鎖がカルボキシル基となったものは B₁₂ と同様の

速度で変換されるのにたいし、d 側鎖および e 側鎖がカルボン酸のものは補酵素型に変化されにくいことが認められた。これらの結果からプロピオニバクテリウム・シャーマニーの酵素による 5'-デオキシアデノシル化には corrin 核の d 側鎖および e 側鎖のプロピオン酸アミド基の存在が必要であると結論した。

第 1 編第 3 章ではビタミン B₁₂ 要求菌であるラクトバチルス・ライヒマニーを B₁₂ を欠如しデオキシリボシル化合物を補足した培地に生育せしめて得られた B₁₂ が欠乏し DNA 対 RNA の比が小さい異常菌体を用いて、これにアクト B₁₂ またはシアノ B₁₂ を接触させた場合の菌体内デオキシリボシル化合物および DNA 生合成をしらべて、添加した B₁₂ が菌体中へとりこまれて B₁₂ 補酵素になるのにつれてデオキシリボシル化合物含量の増加と DNA 対 RNA の比が上昇することを示した。

第 2 編はエーロバクター・エーロゲネスにおける B₁₂ 補酵素関与のプロパンジオール脱水酵素の、基質による誘導生成と同酵素にたいする B₁₂ 補酵素類似体の補酵素活性をしらべたものである。

エーロバクター・エーロゲネスを嫌気培養する場合に培地に適量の 1,2-プロパンジオールを添加することによりプロパンジオール脱水酵素の生合成が誘導され生成量が増加するとともに、生成したアポ酵素の安定性が良くなることを発見して同酵素の生産のための有利な条件を設定した。

つぎに B₁₂ 補酵素の corrin 核の三つのプロピオン酸アミド基の全部または 1 部が遊離のプロピオン酸基となった B₁₂ 補酵素カルボン酸類を調製し、プロパンジオール脱水酵素のアポ蛋白にたいする結合と生じたホロ酵素の触媒活性を検討した。その結果、B₁₂ 補酵素モノカルボン酸の三つの異性体はいずれも B₁₂ 補酵素の K_m の 10~20 倍にあたる $9 \sim 16 \times 10^{-6} \text{M}$ の K_m 値を示し、3 個のプロピオン酸アミド基はそれぞれアポ蛋白との結合に同様に関与しているが決定的な影響は与えない、しかし生じたホロ酵素の活性発現のためには e 側鎖が酸アミドであることが重要で b 側鎖はほとんど関係のないことを明らかにした。第 1 編の結果と合すると、B₁₂ の corrin 核の e 側鎖が酸アミド基であることが 5'-デオキシアデノシル化酵素にたいしてもプロパンジオール脱水酵素にたいしても必須であることが示された。

B₁₂ 補酵素の corrin 核の 10 位のメチン部の水素をハロゲンで置換した 10-クロロ B₁₂ 補酵素と 10-ブロモ B₁₂ 補酵素を調製し、プロパンジオール脱水酵素にたいする親和性と生じたホロ酵素の活性をしらべた結果、アポ酵素との結合性は 10 位にハロゲンを導入してもほとんど影響されないが、B₁₂ 補酵素の活性の発現に必要なコバルト-炭素結合の可逆的開裂がハロゲン基の導入により起こりにくくなることを明らかにし、コバルト-炭素結合の開裂様式にたいする情報を与えた。

論文審査の結果の要旨

ビタミン B₁₂ 補酵素は corrin 核の中心原子のコバルトに上方より 5'-デオキシアデノシル基の 5'-炭素がシグマ結合をした構造を持つ自然界にはじめて発見された有機コバルト化合物である。この化合物の生化学作用として現在 6 種類の水素移動を伴う異性化、脱離、および還元反応を触媒することが知られているが、作用の発現に際してコバルト-炭素結合の活性化と開裂が必要であると考えられている。

この論文はビタミン B₁₂ 補酵素の構造上および機能上もっとも重要なコバルト-炭素結合の生化学的な生成および開裂を研究したもので、とくに B₁₂ 分子のいろいろの部位を修飾することによって現われる影響をしらべた点に特長が見られる。本研究において得られた主な成績は次の諸点である。

(1) Corrin 核は側鎖として三つのアセトアミド基と3つのプロピオン酸アミド基があるが、 B_{12} 分子の生成の中間段階でアミド化が起こるものと考えられており、アミド化と補酵素に特有の5'-デオキシアデノシル基のコバルト部への導入の関係に興味を持たれていた。本研究では B_{12} を酸処理してプロピオン酸アミド基の全部または1部を加水分解した B_{12} カルボン酸同族体を調製し、 B_{12} 補酵素生産菌のプロピオニバクテリウム・シャーマニーの増殖菌体、休止菌体および無細胞抽出液を用いてプロピオン酸側鎖の数および位置と5'-デオキシアデノシル化反応との関係をしらべた。その結果5'-デオキシアデノシル化酵素にたいしb側鎖が遊離のプロピオン酸基である B_{12} -b-モノカルボン酸は容易に5'-デオキシアデノシル化されるがd側鎖またはe側鎖がプロピオン酸基の異性体は補酵素型に変換されにくく、すくなくとも上記の菌の5'-デオキシアデノシル化酵素にたいして基質となるためにはd側鎖およびe側鎖のアミド基の存在が必要であることを証明し、 B_{12} 補酵素の生成経路に情報を与えた。

(2) ビタミン B_{12} 要求菌であるラクトバチルス・ライヒマニーにおいて、 B_{12} がデオキシリボシル化合物の生成になんらかの役割を演じていることが内外で推測されていたが、関与する B_{12} の形態および反応機構については定説がなかった。

著者はラクトバチルス・ライヒマニーを B_{12} を欠如しデオキシリボスクレオシル化合物を補足した培地に培養して、 B_{12} が不足しDNA対RNAの比が著しく低い異常な菌体を得て、この菌体を B_{12} 含有培地に再培養した時に菌体内にとりこまれた B_{12} の型とDNA対RNA比の正常値への回復をしらべた。この結果、外部より添加した B_{12} は菌体内で全部補酵素型に変換し、かつ B_{12} 補酵素の生成につれてリボスクレオシル化合物からデオキシリボスクレオシル化合物への還元が進行することを示した。この発見は、リボスクレオシル化合物のリボース部の還元 B_{12} 補酵素が関与することを示す情報を与えたもので、 B_{12} 補酵素関与のリボスクレオチド還元酵素反応の確立に重要な役割を演じたものである。

(3) エーロバクタ・エーロゲネスの生産するプロパンジオール脱水酵素は B_{12} 補酵素を必要とするが、反応に際して補酵素のコバルト-炭素結合がどのように開裂するのかについての定説がない。この研究ではコバルト-炭素結合の性質とcorrin核の10位のメチン部との相互関係に注目して、 B_{12} 補酵素の10-ハロゲノ誘導体を調製して、アポ蛋白との結合性と生じたホロ酵素の触媒活性をしらべた。その結果、10位に塩素、臭素を導入してもアポ蛋白との親和性は大きく影響されないが、ホロ酵素におけるコバルト-炭素結合の開裂が困難になることを示し、開裂機構に示唆を与えた。

(4) 前記の B_{12} カルボン酸類の補酵素型を調製し、プロパンジオール脱水酵素のアポ蛋白との結合および生じたホロ酵素の活性にたいしcorrin核のプロピオン酸アミド基の位置がどのように関係するかをしらべた。その結果、アポ蛋白との結合にはプロピオン酸アミド基のどれか1個をプロピオン酸基に変えても決定的な影響を生じないが、e側鎖が遊離のプロピオン酸基の場合には酵素活性が現われず、ホロ酵素の立体構造の維持にe側鎖のアミド基を介して補酵素とアポ蛋白が結合する必要があることを示した。なおエーロバクター・エーロゲネスによるプロパンジオール脱水酵素の基質による誘導生成と安定化現象を発見し、同酵素生産のための最適条件を設定している。またシアノ B_{12} とアクオ B_{12} を原料とする生化学的な B_{12} 補酵素生成反応を分光学的方法で追跡して、反応機構について解析した。

以上を要するに、この論文は有機化学的にも生化学的にも興味深い化合物であるビタミン B_{12} 補酵素の

コバルト-炭素結合の生成および開裂機構に関し、分子の1部を修飾した類縁体を用いて研究することにより、種々の重要な知見を得たものであり、学術上および実際上貢献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の価値を有するものと認める。