

氏 名	藤 井 克 彦 ふじ い かつ ひこ
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	工 博 第 227 号
学位授与の日付	昭 和 45 年 9 月 24 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 FORMATION AND FUNCTION OF VITAMIN B₁₂ AND RELATED COMPOUNDS IN HYDROCARBON-UTILIZING MICROORGANISMS (炭化水素資化性微生物におけるビタミン B ₁₂ とその関連化合物の生成および機能に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 矢 戸 圭 一 教 授 野 崎 一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は炭化水素醗酵によるビタミン B₁₂ およびその関連化合物の生成と生化学的意義に関する研究の結果をまとめたもので、緒論、本論 3 部 7 章および結論よりなっている。

緒論では微生物による炭化水素の利用、特に正アルカンの分解代謝の機構、およびビタミン B₁₂ の醗酵生産と B₁₂ の関与する生化学反応についての従来の知見を要約し、さらに本研究を行なうに至った背景と研究内容の概要を記している。

本論第 1 部は炭化水素醗酵によるビタミン B₁₂ 生産に関する研究結果を扱ったものである。

第 1 章では炭化水素資化性細菌のビタミン B₁₂ 生産性を従来の糖質および天然栄養源をもとにした醗酵培地と正アルカンを炭素源とした無機塩からなる培地の両者で比較し、炭化水素醗酵を行なった時のほうがビタミン B₁₂ の生成量および菌体内含量が一般に多く、かつ生成した B₁₂ が大部分菌体内に保持されていることを明らかにしている。さらに *Corynebacterium simplex* ATCC 6946 の炭化水素培地での培養法を検討することにより最大収量約 1 mg/l の成績をあげることができ、ビタミン B₁₂ の工業生産に対する炭化水素醗酵の応用の可能性を示している。

第 2 章では炭化水素醗酵でつくられる菌体内 B₁₂ の形態を天然型 B₁₂ の抽出法として知られている 80% 熱アルコールで抽出した試料について、イオン交換クロマトグラフィー、濾紙電気泳動、濾紙分配クロマトグラフィー、可視部および紫外部吸収スペクトル、プロパンジオール脱水酵素系における補酵素活性などで検討し、大部分が 5, 6-ジメチルベンズイミダゾールを下方塩基にもつ補酵素型 B₁₂ であることを確認している。

第 2 部は炭化水素資化性細菌 *Corynebacterium simplex* におけるビタミン B₁₂ の生化学的役割に関する研究の結果を述べている。

第 1 章では従来から示唆されていた脂肪酸代謝での B₁₂ の意義を調べる基礎実験として種々の正アルカンで生育させた本菌の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーをもとにした化学的および物理的方法で調べ、

正アルカンと脂肪酸の代謝経路を検討したところ、正アルカンは末端メチル基が酸化された後大部分が β 酸化機構で、一部が α 酸化機構で分解代謝されることを明らかにしている。また結核菌類以外の細菌としては最初の例である10-メチル分枝酸が増殖基質の正アルカンの鎖長に応じて特異的に合成されることを述べている。

第2章では B_{12} と脂肪酸代謝の関連性を細胞内の B_{12} レベルの大きく異った菌体間の脂肪酸組成を比較することにより検討したところ、飽和脂肪酸の比含量は両菌体間でほとんど差が認められなかったのに反し、 Δ^9 のモノ不飽和酸と10メチル分枝酸の比含量には顕著な差が認められることを示している。次にメチル分枝酸の生合成に関する酵素段階での実験から本脂肪酸は複合脂質中に含まれる Δ^9 のモノ不飽和酸の2重結合にS-アデノシルメチオニンのメチル基が還元的に転移してつくられることを示し、 B_{12} 一不足菌体では次章で述べている B_{12} 関与のメチオニン合成系のホロ酵素量およびメチオニン合成酵素の賦活剤であるS-アデノシルメチオニンの細胞内存在量が共に低いことが作用して引き続くメチル分枝酸合成に影響を及ぼすという結論を出している。

第3章にはビタミン B_{12} 関与のメチオニン合成系の性質に関する研究結果が記されており、メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからのメチオニン合成には触媒量のS-アデノシルメチオニンと還元剤の存在が必須であるのに対しメチル B_{12} からのメチオニン合成にはこれらの要求性が認められないことを示し、かつこれらの要求における基質と酵素の賦活剤であるS-アデノシルメチオニンの酵素に対する親和性を K_m 値を求めて調べた結果本菌のメチオニン合成酵素は大腸菌のそれに比してメチル B_{12} の K_m 値が非常に低いことを明らかにし、従来の知見を考慮に入れてその反応機構を論じている。さらに供試菌では本酵素のアポ酵素は B_{12} 一不足菌においても存在せず、酵素タン白が補酵素によって誘導生合成される現象の一例であることを論じている。

第3部はビタミン B_{12} と構造および生合成経路での関連化合物であるコバルトポルフィリンに関する研究の結果を扱っている。

第1章は *Corynebacterium simplex* によるコバルトポルフィリン生成に関する研究であり、このコバルト錯体はビタミン B_{12} とほぼ同じレベルで菌体内に存在するがヘム系色素よりはかなり少ないこと、又コバルトポルフィリンは菌の増殖促進効果をもつことを述べている。さらにコバルトポルフィリンのポルフィリン部分を吸収スペクトル、濾紙分配クロマトグラフィなどの方法で調べたところコプロポルフィリンⅢ型であることが結論されている。

第2章ではコバルトポルフィリンの性質を酸化還元的面から検討を加え溶媒の極性と配位子の種類により特異な酸化還元反応を受けることを吸収スペクトルの変化から明らかにし、この性質がコバルトポルフィリンの生体内での役割を示唆するものと推論している。

結論には本研究の結果の総括と将来への展望が記されている。

論文審査の結果の要旨

この論文は各種の正アルカンを炭素源として種々の細菌を培養した場合に、ビタミン B_{12} およびコバルト・ポルフィリンが生成することを認めて、これらの物質が炭化水素資化性細菌の生理において演じる役

割について研究した結果をまとめている。

本研究で得られた主な成績は次の通りである。

(1) 炭化水素の醗酵によるビタミン B_{12} の生産をはじめて企てた。その結果として、*Corynebacterium simplex* ATCC 6946 をはじめとする数種の細菌を用いることにより、約 1 mg/l のビタミン B_{12} が生産されることを示し、炭化水素を炭素源とするビタミン B_{12} の工業生産に基礎を与えた。

また炭化水素を炭素源とした場合のほうが炭水化物を炭素源とした場合よりも、菌体内 B_{12} 含有量が高く、かつその大部分が補酵素型 B_{12} の代表的形態である 5, 6—ジメチルベンズイミダゾリル・コバミド補酵素であることを確認した。

(2) 各種の正アルカンを炭素源として培養した *Corynebact. simplex* の菌体脂質の脂肪酸組成を調べて、正アルカンは末端メチル基が酸化されて脂肪酸となったのち、大部分は通常の β 酸化経路で分解されるが、一部分は α 酸化機構で代謝され、また 10—メチル分枝酸が増殖基質の正アルカンの鎖長に応じて特異的に生成していることを示した。とくに注目される事実として、培地のコバルト含有量を変化させることにより得られた B_{12} 含有量の異なる菌体間の Δ^9 モノ不飽和酸と 10—メチル分枝酸を比較した結果、 B_{12} 充分菌体ではメチル分枝酸含量が対応する鎖長のモノ不飽和酸含量よりも著しく高く、 B_{12} 不足菌体では逆の関係が成立することを認めた。

(3) 炭化水素を利用する好気性細菌である *Corynebact. simplex* がメチオニン生合成の最終段階を接触する N^5 —メチルテトラヒドロ葉酸—ホモシスチンメチルトランスフェラーゼをもつことを証明し、その性質が従来知られている嫌気性細菌の大腸菌の酵素といくつかの点で異なることを示し、また *Corynebact. simplex* における本酵素が B_{12} により誘導生合成されるものであり、菌体内 B_{12} レベルにより本酵素の比活性が左右されることを証明した。またモノ不飽和酸のメチル分枝酸への酵素的変化のメチル供与体が B_{12} 関与のメチオニン生合成反応によって供給される S—アデノシルメチオニンであることを確かめた。これらの事実にもとづいて、 B_{12} 不足菌体では B_{12} 関与のメチオニン合成系の最終段階の N^5 —メチルテトラヒドロ葉酸—ホモシスチンメチルトランスフェラーゼのホロ酵素量およびその賦活剤であり、またメチル分枝酸のメチル供与体である S—アデノシルメチオニンの細胞内存在量が共に低くなるためにモノ不飽和酸のメチル分枝酸への転換が低下するという結論を下した。

(4) *Corynebact. simplex* を炭化水素培地で比較的低い通気下で培養すると培養上清中にいまだ知られていなかったオリゴペプチドと結合したコバルトポルフィリンが蓄積することを見出した。この物質のポルフィリン部分は種々の性質からコプロポルフィリンⅢ型の構造をもつことが証明された。さらに菌体内にも、このコバルト・ポルフィリンが B_{12} と同程度含有されていることが確認された。

コバルト・ポルフィリンは従来生体内に存在することが知られていないものであるが、溶媒の極性と配位子の種類により特異な酸化還元反応を受けることを分光学的方法で明らかにし、生体内での役割に示唆を与える成績を得た。

以上要するに、炭化水素に培養した細菌の菌体内にビタミン B_{12} の補酵素型とコバルト・ポルフィリンが生成することをはじめて示し、これらの物質の生理的意義を解明する興味ある現象を認めたもので、学術上、工業上寄与するところがすくなくない。

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。