

氏 名	加 藤 忠 克 か とう ただ かつ
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 60 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 9 月 28 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	微生物を用いる補酵素型ビタミン B ₁₂ およびその類縁物質に関する研究
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

本論文は緒論2章、本論3編11章および結言よりなり、ビタミン B₁₂ の生体内における重要な活性型として、グルタミン酸・β-メチルアスパラギン酸、コハク酸・メチルマロン酸、および1,2-プロパンジオール・プロピオンアルデヒド間の異性化反応を触媒する「B₁₂ 補酵素」の、微生物による生産と作用機構の解明、およびメタン、メチオニン、デオキシリボヌクレオチド生成反応に関与するビタミン B₁₂ の構造の研究を内容としている。

緒論ではこの研究を行なうに至った背景と意義について詳しく述べている。即ち、1948年に肝臓より抗貧血ビタミンとして複雑なコバルト錯化合物であるシアノコバラミンが単離され、その後配位子あるいはコリン核側鎖を異にする多くの類縁体が発見されたにもかかわらず、シアノコバラミンがビタミン B₁₂ の本体と考えられてきたこと、1958年に至って数種微生物菌体より「B₁₂ 補酵素」が発見されるにおよんでシアノコバラミンは生体内における真の活性型でない事実が明らかにされ、B₁₂ の生理活性の酵素化学的研究が生化学の分野における重要な問題の一つとなったことを説明している。

本論第1編では、天然物中に存在するビタミン B₁₂ を自然の形態のままで分別定量するための基礎的研究と、これを動物飼料にたいするビタミン B₁₂ 強化剤として用いられるバチルス・メガテリウム菌体粉末に適用した結果をとりあつかっている。

第1章では、シアノコバラミンで動物実験値ともっとも近い結果を与えるオクロモナス・マルハメンシスにたいする非シアノ型 B₁₂ の活性に関する従来の研究結果が不一致であった原因を明らかにし、シアノ型 B₁₂ と同等の活性をもつことを確立した。つぎに浜紙電気泳動法と大腸菌、ラクトバチルス・ライヒマニーおよびオクロモナスを用いたバイオオートグラフィーを組合せた天然物中の B₁₂ 各型の分別定量法を考案し、前記の微生物菌体製品中数種の未知非シアノ型 B₁₂ の存在することを発見している。

第2章では、上述の未知 B₁₂ 類縁体の主なものがコバラミンのヌクレオチド部分の欠けたコピンアミドおよびそのカルボン酸型類縁体であることを示し、これらをイオン交換セルロース・クロマトグラフィー

により分画単離する方法を述べている。

第2編では、プロピオニバクテリウム・シャーマニーによる「B₁₂ 補酵素」(5, 6-ジメチル・ベンズイミダゾールコバミド・コエンチム)の生産を述べている。

第1章では、第1編で述べた飼料の B₁₂ 強化用として安価に市販されている菌体製品中より大量に得られるコビンアミドを前駆体とし、ヌクレオチド部の生合成材料として、5, 6-ジメチル・ベンズイミダゾールを共存させてプロピオニバクテリウム・シャーマニー培養することにより、チクレオチド部をもつコバミドが生成する過程につき検討している。つぎに生成したコバミドの形態をしらべ、既知化合物であるヒドロキシコバラミンのほか陰極側へ速やかに動くものと陽極側に動くものと、2種の未知のコバミドの存在を認め、前者は当時バーカーらが発表した「B₁₂ 補酵素」、後者は蛋白結合型 B₁₂ の挙動を示すことを証明している。

第2章では「B₁₂ 補酵素」のより直接の前駆物質としてヒドロキシコバラミンあるいはシアノコバラミンを添加して培養することにより、5'-デオキシアデノシル基が生化学的に容易に導入されて、ほぼ定量的に「B₁₂ 補酵素」に転換されることを証明し、菌体よりの抽出から結晶化に至る一連の精製法を設定している。

第3章では、「B₁₂ 補酵素」結晶をより有利に取得する方法として、あらかじめ安価な固体培地に培養した菌体とヒドロキシコバラミンを接触保温させることにより、第2章の添加培養法の約10倍の濃度である 1 l 中 50mg の「B₁₂ 補酵素」の生産に成功している。

第4章では、プロピオン酸菌によりシアノコバラミンとヒドロキシコバラミンが菌体中へとりこまれて「B₁₂ 補酵素」に転換される過程を研究したものである。

第5章では、コビンアミドを単独に添加培養した場合にプロピオニバクテリウム・シャーマニー菌体中に生じた橙黄色の光に不安定な未知 B₁₂ 類縁体の性質を分光学的研究、微生物活性および補酵素活性などによりしらべて、「B₁₂ 補酵素」のヌクレオチド部が欠けた「コビンアミド補酵素」と称すべき物質であることを示している。

第3編は、メタン菌、ラクトバチルス・ライヒマニー、放線菌および酵母において、代謝に関与するビタミン B₁₂ の形態と作用機構を研究したものである。

第1章では、従来からビタミン B₁₂ を大量に生産することが知られている放線菌についてしらべて、生産された B₁₂ は主として培養上清中に存在し、少量の「B₁₂ 補酵素」以外に数種の構造不明の類縁物質から成ることを述べている。

第2章ではメタン菌体中に「B₁₂ 補酵素」の存在することを確認し、つぎにシアノコバラミンを添加して培養する場合その20~30%が「B₁₂ 補酵素」に転換して菌体中に検出されることを示し、この事実にもとづいてメタン生合成における同補酵素のメチル基転移作用について考察を加えている。

第3章はビタミン B₁₂ 要求菌であるラクトバチルス・ライヒマニーについて行なった研究成果である。この菌を用いてデオキシリボ核酸の生合成にビタミン B₁₂ が関係するという結果が従来からえられているが、B₁₂ の作用形態および作用機構とも不明であった。本研究ではヒドロキシコバラミンと該菌の B₁₂ 欠如菌体とを接触させた時に、菌体中に「B₁₂ 補酵素」が生成し、接触上清中には「B₁₂ 補酵素」および未

知類縁体が検出されることを認めた。この結果から生体内におけるリボヌクレオチドよりデオキシリボヌクレオチドの生成する反応が、「B₁₂ 補酵素」による 1,2-ジオールの分子内酸化還元反応と類似した機構により行なわれることを推定している。

第4章では酵母のもつアデノシル基導入反応を利用して、ヒドロキシコバラミンより「B₁₂ 補酵素」を得ることを試みた結果を述べている。予想に反して酵母とヒドロキシコバラミンの接触により「B₁₂ 補酵素」は生成しなかったが、コリン核にオリゴペプチドまたはヌクレオチド・ペプチドが配位したと推定される光に不安定な新しい B₁₂ 類縁物質を得ている。

結言では微生物による「B₁₂ 補酵素」製造方式の設定、B₁₂ 群化合物の化学構造と補酵素活性、可視部吸収スペクトルと配位子との関係などにつき、本研究でえられた成績と他の研究者の結果とを総括して論述している。

論文審査の結果の要旨

ビタミン B₁₂ が核酸、蛋白の生合成などの重要な代謝反応に関与していることは動物実験の結果などから推定されていたが、酵素化学的の解明はほとんどなく、また最近までシアノコバラミンが自然界に存在する活性型であると考えられており補酵素型の存在は知られていなかった。

本論文の研究は、まずこの点を明らかにする目的で天然試料よりの抽出法、イオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーおよび浜紙電気泳動法と微生物定量法との組合せによる各種ビタミン B₁₂ 類縁体の分別定量法を設定して種々の微生物菌体または培養上清中に存在する B₁₂ 群化合物の自然の形態をしらべた。その結果、当時の通念と異なって天然物中には各種の非シアノ型 B₁₂ 同族体が存在することを証明した。つぎに動物飼料にたいするビタミン B₁₂ 強化剤として用いられているバチルス・メガテリウム菌体製品中に、ビタミン B₁₂ の完全構造（コバミド型）よりヌクレオチド部の欠けたコビンアミド同族体が大量に含まれていることを認め、これを前駆体としてプロピオン酸菌によるビタミン B₁₂ の醗酵生産を試みた。この研究中プロピオン酸菌体中に未知の B₁₂ 同族体が生合成されることを発見し、その性質が当時バーカー等、ついでリネン等により発表されたグルタミン酸・β-メチルアスパラギン酸、コハク酸・メチルマロン酸あるいは 1,2-プロパンジオール・プロピオンアルデヒド間の異性化反応に補酵素として働く「B₁₂ 補酵素」と一致することを確認した。「B₁₂ 補酵素」はビタミン B₁₂ のコバルト部に 5'-デオキシアデノシル基が結合したもので、光またはシアニオンにより容易に分解される不安定な化合物であり、当時化学合成法が知られていなかった。

本研究はプロピオン酸菌を用いてコビンアミドと5,6-ジメチルベンズイミダゾールまたはより近い前駆体であるヒドロキシコバラミン、シアノコバラミンを「B₁₂ 補酵素」に転換せしめ、これを結晶として単離する実用的な製造方式を設定した。この際、コビンアミドを単独に前駆体とすると光およびシアニオンに不安定な黄褐色の未知の B₁₂ 類縁体が生成することを認め、この物質の理化学的性質および補酵素活性、微生物活性をしらべた結果「コビンアミド補酵素」と称すべき新「B₁₂ 補酵素」類縁体であることを示した。同一の物質は相前後して、それぞれ独立に欧米でも発見された。また、この研究中シアノコバラミンがヒドロキシコバラミンに比し細菌菌体中へとりこまれて「B₁₂ 補酵素」となりにくいことを示した

が、両者の医学的効果の差の原因について示唆を与えたものである。

ビタミン B_{12} が関係するものと考えられている生化学反応として、他にデオキシリボヌクレオチド生成またはメタン生成などがあるが、これらの反応におけるビタミン B_{12} の作用機構も活性型も知られていない。本研究ではそれぞれ適当な微生物を対象として、この問題に検討を加えている。すなわち、メタン菌菌体中に「 B_{12} 補酵素」が存在することを証明し、またシアノコバラミンが「 B_{12} 補酵素」に高収率で転換されることを示した事実は、メタン生成反応においても「 B_{12} 補酵素」が補酵素として関与するという仮説を裏書きするものであると考えられる。ビタミン B_{12} がリボヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドへの還元に関係することはビタミン B_{12} 要求菌のラクトバチルス・ライヒマニーで研究されているが、この場合外部より与えられたヒドロキシコバラミンまたはシアノコバラミンは菌体中にとりこまれて「 B_{12} 補酵素」となり、培養上清中の B_{12} 群物質は「 B_{12} 補酵素」あるいは一部構造が変化した類縁体となっていることを示した。この結果は「 B_{12} 補酵素」がデオキシリボヌクレオチド生成反応に関与していることを推定せしめるものであるが、最近酵素化学的な証明が米国で行なわれた。以上の結果から、本論文では「 B_{12} 補酵素」の示す各種異性化反応、デオキシリボヌクレオチド生成反応、メタン生成反応およびメチオニン生成反応における補酵素作用を、同補酵素のコバルトと 5'-デオキシアデノシル基間の結合が切断されて生じた還元状態のコバルト部分におけるプロトンまたはメチル陽イオンの受授にもとづいて一貫した説明を試みている。この考えは現在のところ完全に証明されていないが、裏書きする事実が発表されつつある。

酵母は容易にメチオニンを S-アデノシルメチオニンに変化するが、この作用に着目して酵母とヒドロキシコバラミンを接触保温することにより「 B_{12} 補酵素」に転換せしめることを試みたが、予期に反しオリゴペプチドまたはヌクレオチド・ペプチドのついた新誘導体の生成が認められた。このものの生理活性は明らかにされていない。これを要するに本論文は、重要な生理作用をもつ「 B_{12} 補酵素」を微生物を用いて製造する実用的な方法を確立すると同時に、ビタミン B_{12} の関係する種々の興味ある生化学反応機構を解明する有力な手がかりを与えたものであって、学術上、工業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価値あるものと認める。