

氏 名	山 本 憲 二 やま もと けん じ
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 294 号
学位授与の日付	昭 和 54 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	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON BIOSYNTHESIS OF AMINOSUGAR NUCLEOTIDES IN MICROORGANISMS (微生物におけるアミノ糖ヌクレオチドの生合成に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 杉倉辰六郎 教 授 松下雪郎 教 授 木村 光

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物を用いる UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) と UDP-*N*-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc) の調製法について検討するとともに、UDP-GlcNAc pyrophosphorylase を酵母とカビから精製して酵素化学的性質を究明した結果をとりまとめたものである。その内容は以下のように要約される。

I. 微生物による UDP-GlcNAc および UDP-GalNAc の調製：パン酵母の乾燥菌体を用いる UDP-GlcNAc の醗酵生産条件について種々検討した結果、UDP-GlcNAc の対 UMP (50 mM 使用) 収率は24時間反応で約50%に達した。ついで本醗酵法で得られた UDP-GlcNAc を基質とし、細菌の特異的エピメラーゼを活用する UDP-GalNAc の調製法を開発した。すなわち、UDP-GlcNAc 10 mM を含む反応液に *Bacillus subtilis* の無細胞抽出液を作用させ、約35%の収量で UDP-GalNAc を得た。

II. パン酵母の UDP-GlcNAc pyrophosphorylase の精製と酵素化学的性質：パン酵母の無細胞抽出液中に本酵素活性を初めて見出すとともに、反応生成物を同定した。本酵素はきわめて不安定であったが、SH 保護剤である Dithiothreitol を添加することにより安定化されることを見出した。この現象を利用して、市販パン酵母から各種クロマトグラフィーにより本酵素を約 380 倍に精製した。本酵素はゲル濾過法により約36,000, SDS 電気泳動法により約40,000の分子量を有するモノマーであることが示された。本酵素の至適および安定 pH は 7.5~8.5 であった。酵素活性の発現には Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} などの2価カチオンが必要であり、 Mg^{2+} により最も賦活された。本酵素は Dithiothreitol や Dithioerythritol により安定化されるばかりでなく著しく活性化されたが、2-mercaptoethanol にはいずれの効果もみられなかった。本酵素は UDP-GlcNAc に対して高い基質特異性を示し、他の糖ヌクレオチドには全く作用しなかった。UDP-GlcNAc 合成反応における基質ヌクレオチド三リン酸については UTP のみ有効であった。

III. *Neurospora crassa* の UDP-GlcNAc pyrophosphorylase の精製と酵素化学的性質：16時間から24時間培養した菌体をアルミナ磨砕して得られた無細胞抽出液を出発物質として、各種クロマトグラフィー

により本酵素を単一にまで精製した。本酵素はゲル濾過法により約 37,000, SDS 電気泳動法により約 41,000 の分子量をもつモノマーであった。沈降定数は 4.9 S で、275 nm 付近にのみ吸収極大を有していた。本酵素の至適 pH は 7.5, 安定 pH は 6.5~7.0 付近であった。本酵素はパン酵母の酵素に比べて凍結保存に対して安定であった。また酵母の酵素と同様に、Dithiothreitol と Dithioerythritol によって特異的活性化と著しい安定化をうけた。

Ⅳ. ウリジンによる UDP-GlcNAc pyrophosphorylase の阻害：パン酵母および *N. crassa* の本酵素活性がウリジンにより特異的に阻害される現象を見出した。*N. crassa* の酵素では、1 mM のウリジン添加で約 50% の活性阻害が起こり、透析すると可逆的に酵素活性が回復した。このウリジン阻害について考察し、生体内における本酵素の調節因子としての生理的役割を指摘した。

論文審査の結果の要旨

ウリジンをヌクレオシド残基とする糖ヌクレオチドのなかで、特に UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) は種々のアミノ糖含有多糖類の生合成において中心的役割を演ずる化合物である。その糖部分の C-4 エピマーである UDP-*N*-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc) も細胞のリポ多糖や血液型物質の生合成に関与する重要なアミノ糖ヌクレオチドである。

まず著者は、酵母を利用して UMP とグルコサミンから UDP-GlcNAc を効率よく醗酵生産する反応条件について検討するとともに、醗酵法で得られた UDP-GlcNAc を基質として *Bacillus subtilis* の特異的エピメラーゼによる UDP-GalNAc への変換反応を解析し、アミノ糖ヌクレオチドの新しい調製法を開発した。

ついで UDP-GlcNAc の生合成に関与する UDP-GlcNAc pyrophosphorylase をパン酵母から単一に精製することに成功した。本酵素は動・植物起源のものを含めて初めて純化されたものである。本酵素（分子量 36,000~40,000）は Dithiothreitol や Dithioerythritol により安定化されるばかりでなく著しく活性化される特徴を有していた。また UDP-GlcNAc に対して高い特異性を示し、他の糖ヌクレオチドには全く作用しなかった。

さらに著者は、*Neurospora crassa* の生育と UDP-GlcNAc pyrophosphorylase の活性との関係を調べ、16 時間から 24 時間培養した菌体から本酵素を単一にまで精製した。本酵素はゲル濾過法により約 37,000, SDS 電気泳動法により約 41,000 の分子量をもつモノマーであった。沈降定数は 4.9 S で、275 nm 付近にのみ吸収極大を有していた。また酵母の酵素と同様に、Dithiothreitol などによって特異的安定化および活性化をうけた。著者の見出した本酵素に対する SH 保護剤の効果は、一般酵素の精製および Kinetics の面からもきわめて興味深い知見である。

最後に著者は、酵母および *N. crassa* の UDP-GlcNAc pyrophosphorylase の活性がウリジンにより特異的に阻害される現象について種々解析を行なっている。著者の明らかにしたウリジンによる本酵素の阻害は多糖類生合成の調節の面から注目に値する。

以上のように、本論文は微生物によるアミノ糖ヌクレオチドの生合成の分野に新しい知見を加えたものであって、微生物生産学および微生物生理学の進歩に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。