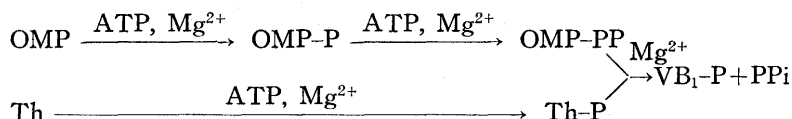


氏 名	田 中 孝 男
	た なか たか お
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 164 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Biosynthesis of Vitamin B₁ in Higher Plants (高等植物のビタミンB ₁ 生合成に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 満 田 久 輝 教 授 岩 井 和 夫 教 授 廣 海 啓 太 郎

論 文 内 容 の 要 旨

パン酵母抽出液を酵素源として ATP, Mg²⁺ の共存下で 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) と 4-methyl-5 (β-hydroxyethyl) thiazole (Th) からビタミン B₁ が生合成されることを Harris らが1955年に報告して以来, 1959~1961年にかけて Brown, 能勢および Leder によって次に示す生合成経路が明らかにされた。



著者は *in vivo* における B₁ 生合成の実験として大豆根の分離培養ならびに緑葉切片への基質の真空注入の実験によって, OMP, Th を前駆体として ATP の関与を必要とする B₁ 生合成系が存在することを明らかにし, さらに *in vitro* における B₁ 生合成系を追究した。高等植物から B₁ 生合成系を抽出しようとする試みは, 酵母等で生合成経路が解明された今日でも明瞭な結果を得るに至っていない。その理由の一つは *in vitro* で一度生成した B₁ が急激に分解することである。植物の分解因子は thiaminase のほか polyphenol, flavonoid 類による B₁ disulfide型への酸化が考えられる。そこで本研究では, 緑葉を冷アセトン処理することによって, アセトン可溶性物質を除去し, 酵素系を抽出したところ, ホウレン草はじめ各種の緑葉について, ATP と Mg²⁺ の共存下で OMP と Th を基質とする overall の B₁ 生合成系の抽出に成功した。本酵素系は, あらかじめ OMP, ATP, Mg²⁺ と preincubation することによって活性を増し, OMP-pyrophosphate (OMP-PP) を一方の基質とする時, 反応初期の lag phase が消失した。また Th, Th monophosphate (Th-P) のいずれを他方の基質として用いた場合も, 反応速度は OMP < OMP monophosphate (OMP-P) < OMP-PP の順に増大した。また Th-P は Th より活性が高かった。全反応に Mg²⁺ は必須であり, OMP-PP と Th-P を基質とした場合は ATP によって阻害されたが, その他の反応には ATP が必須であった。反応産物は *Lactobacillus fermenti* を用いて B₁

monophosphate (B_1 -P) と同定している。これらの事実から高等植物において、 B_1 -P は OMP と Th が ATP によってそれぞれ $OMP-P \rightarrow OMP-PP$ および $Th-P$ に活性化された後、 Mg^{2+} の関与のもとに pyrophosphate を遊離、縮合して生合成されることが明らかとなった。パン酵母、ダイコン緑葉から抽出した TMP pyrophosphorylase の反応機構、ATP による阻害形式はよく一致している。本酵素は SH 酵素であり、ATP を調節部位に結合することによって触媒活性を調節する一種の調節酵素と考えることができ、生体内微量成分であるビタミンの生合成調節の一様式と考えられる。

論文審査の結果の要旨

Thiamine pyrophosphate の decarboxylase, dehydrogenase, transketolase の補酵素としての生化学的意義およびその作用機作に関しては、かなり詳しく知られているが、 B_1 の生合成およびその調節機構は現在なお十分には解明されていない。微生物が 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) と 4-methyl-5 (β -hydroxyethyl) thiazole (Th) を前駆体として B_1 を生合成することが *in vitro* で明らかにされたのは、1936年 Williams らによって B_1 の構造が解明されて約20年を経過したのちである。1955年 Harris らはパン酵母抽出液を酵素源として ATP, Mg^{2+} の共存下で OMP と Th から B_1 が生合成されることを報告して以来、微生物について幾多の研究があるが、動物にとって最大の B_1 供給源である高等植物の B_1 生合成に関する研究は、2, 3 の報告以外に見るべき成果はない。著者は、高等植物における B_1 生合成経路を *in vivo* および *in vitro* の両系で明らかにすると同時に、その調節機構を酵素レベルで究明することを目的としている。

まず、*in vivo* における B_1 生合成に関する研究として、大豆根の分離培養の実験を行なっている。切り取った発芽根端部約 1 mm を glucose, 無機塩を含む寒天培地上で無菌的に 1 週間培養し 50~100 mm に成長した根端部約 10 mm を再び切り取り培養を続けた結果、培地中に B_1 あるいは OMP と Th を同時に添加 (10^{-9} ~ $10^{-3}M$) した場合にのみ、分離根は成長し続けた。さらに緑葉切片 (約 5×5 mm) に OMP, Th を含むリン酸緩衝液を真空注入し、 $28^\circ C$ において暗所で 24 時間 incubate した後、 B_1 を定量したところ、10 種類以上の植物ではすべて B_1 含量が増加し、 $10^{-2}M$ の基質濃度においては数倍から 10 数倍に達した。

さらに *in vitro* における B_1 生合成系を明らかにするため、緑葉を冷アセトン処理することによって B_1 分解因子を除去する方法を確立し、高等植物においてはビタミン B_1 -P は OMP と Th が ATP の存在のもとで、それぞれ $OMP-P \rightarrow OMP-PP$ および $Th-P$ に活性化されたのち、 Mg^{2+} の関与のもとに pyrophosphate を遊離、縮合して生合成されることを実証している。これらの知見は *in vivo* で得られた成績と一致し、酵母、*E. coli* で見出されている経路とも矛盾しない。このほか B_1 生合成の調節機構、TMP pyrophosphorylase (EC 2. 5. 1. 3) の速度論的解析についても有意義な研究を行なっている。

以上のように、本研究の成果は植物生化学、ビタミン学に寄与するところが極めて大きい。

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。