

氏 名	村 井 忠 司
	むら い ただ し
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 250 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 5 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌の NAD および NADP 要求性リンゴ酸酵素の代謝機能
論文調査委員	(主 査) 教 授 香 月 裕 彦 教 授 波 多 野 博 行 教 授 由 良 隆

論 文 内 容 の 要 旨

申請者の研究室においては、さきに大腸菌に NAD および NADP をそれぞれ要求する二種のリンゴ酸酵素が存在し、前者がアスパラギン酸によるアロステリックな活性化を受けるという事が見出された。一方、Sanwal らは後者がアセチル CoA によって阻害的な調節を受けることを報告した。

申請者は上記両酵素の代謝機能を明らかにする目的で、酵素合成の調節機構について検討し、ついで、 C_4 -二塩基酸からアセチル CoA が生成する経路を ^{14}C -標識法を用いて検討した。

まず、大腸菌 W 株の細胞を種々の炭素源で生長させ、両酵素のレベルの変動を調べたところ、両酵素ともグルコース培地で最も低く、NAD 酵素はリンゴ酸培地、また、NADP 酵素はグルタミン酸あるいはアスパラギン酸培地で最も高かった。リンゴ酸培地にグルコースを加えると両酵素とも顕著な抑制を受けたが、リンゴ酸の濃度が増加するにしたがい、NAD 酵素に対するグルコースの抑制効果は解除されたのに反し、NADP 酵素は影響を受けなかった。リンゴ酸に酢酸、乳酸、あるいはグリセロールを添加すると、NADP 酵素は顕著な抑制を受けたが、NAD 酵素は影響を受けなかった。乳酸およびグリセロールからアセチル CoA を生成する反応は不可逆であることから、アセチル CoA (栄養的に酢酸) が、単独であるいは他の代謝物質と協同的に NADP 酵素の栄養的リプレッサーとして機能している可能性が予想された。そこで高濃度の酢酸またはビルビン酸を用いて培養した場合における NADP 酵素のレベルを調べたところ、酵素レベルの抑制は認められなかった。また菌体内のアセチル CoA 濃度を測定した結果、酵素レベルとの相関関係を示さなかった。しかし酢酸およびビルビン酸の両者を炭素源とした場合、NADP 酵素の顕著な抑制が認められた。つぎにビルビン酸脱水素酵素を欠く大腸菌の突然変異株を、ビルビン酸に種々の濃度の酢酸を添下した培地に生長させ、NADP 酵素のレベルを調べたところ、酢酸濃度の増加につれて減少した。これらの事実から、両酵素がグルコースによる抑制を受けるとともに、NAD 酵素はリンゴ酸による誘導、また NADP 酵素は酢酸およびビルビン酸による協同的な抑制を受けることが明らかになった。

つぎにリンゴ酸培地に生長させた菌に ^{14}C -コハク酸を与え、 C_4 -二塩基酸からアセチル CoA 誘導体である脂肪酸への ^{14}C のとりこみを検討した結果、アセチル CoA のアセチル基はコハク酸の 2, 3 位の炭素に由来し、1, 4 位の炭素に由来しないことが判明した。この事実は、リンゴ酸からアセチル CoA を合成する反応がリンゴ酸酵素によって遂行され、リンゴ酸開裂酵素によるものでない可能性を支持している。

以上の知見および両酵素のアロステリックな性質を総合し、二種のリンゴ酸酵素の代謝機能に関して次のような提唱を行なった。すなわち、NAD 酵素はリンゴ酸を異化的に代謝する役割を担い、これに対して NADP 酵素は第一にリンゴ酸からアラニン、バリン、ロイシン等のアミノ酸の生合成に必要なピルビン酸の供給、第二に TCA 回路の作動や脂質の生合成に必要なアセチル CoA を供給するという役割を担っている。

参考論文 1-3 は、主論文のある部分の速報、ならびに二種のリンゴ酸酵素の存在の発見と、NAD 酵素のアロステリックな性質の発見に関する論文であり、また 4 は、生体における多塩基酸ならびにオキソ酸のガスクロマトグラフィーによる新定量法に関する論文である。

論文審査の結果の要旨

代謝調節に関する研究の進展に伴い、生体内において酵素は多くの場合、一方向の反応を触媒し、個々の代謝機能を担っていることが次第に明らかにされようとしている。一般に生体外にとり出した酵素は、正逆両方向の反応を触媒するので、従来の酵素化学的研究から酵素の代謝機能を推定することはきわめて困難であった。現在この問題の解明に用いられる主な方法は次の 4 つである。すなわち、1) 代謝経路上の特定の酵素を欠損した変異株の栄養要求性の検討、2) 酵素合成を調節する因子の解明、3) もしその酵素がアロステリック酵素である場合にはその調節因子の研究、4) その酵素の基質となる物質の、代謝の流れにおける挙動の追跡がそれである。

リンゴ酸酵素はほとんど全ての生体から証明されているが、要求される補酵素はほとんど NADP である。これに反して NAD 要求性のリンゴ酸酵素は少数の生物から証明されているに過ぎず、同一の生体から両酵素が証明されたのは大腸菌が最初であった。最近その他の生体においても両酵素が存在する可能性が指摘されているが、未だその詳細は出されていない。リンゴ酸酵素の代謝機能に関しては、これまでに様々な説が出されていたが、上記の理由により、両酵素を区別して論じたものは全く見当らなかった。申請者の提出した説は、はじめて両酵素の機能の違いを明確にした画期的な論文である。

大腸菌においては、 C_3 -酸と C_4 -ジカルボン酸との間の相互転換は主としてリンゴ酸酵素、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼ、および PEP カルボキシキナーゼによって遂行されることは早くから報告されていた。それぞれの酵素の機能に関して、Kornberg らは大腸菌における炭酸固定は PEP カルボキシラーゼによって遂行され、リンゴ酸酵素はむしろ脱炭酸の方向に働くものと考えた。また、PEP カルボキシキナーゼが異常に低い変異株が、グルコースを添加しない培地では生長できないという Hsieh らの観察から、リンゴ酸酵素は C_4 -ジカルボン酸からの糖新生の役目を担っていないことは明らかである。

申請者はこれらの大腸菌変異株を用いた研究結果を考慮し、有機酸代謝および関連化合物の微量分析法に関する豊富な学識経験を基礎とし、主として酵素合成の調節ならびにラジオアイソトープトレーサー法を応用した代謝の流れの解析によって、論文要旨に述べたような結論に到達した。

申請者の提出したリンゴ酸酵素の代謝機能は、主として主論文でとり扱った酵素合成の調節に関する実験結果、および参考論文(1-3)、ならびに Sanwal らによる両酵素のアロステリック効果に関する実験結果を根拠にしたものである。しかし、すでに述べた Kornberg や Hsie の観察や、申請者が主論文で行なった代謝の流れの結果とも矛盾しないものである。申請者の研究はリンゴ酸酵素の代謝機能に関する研究としてはもっとも組織的であり、実験的裏づけに富む優れた研究である。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。