

氏 名
授 与 学 位
学 位 授 与 年 月 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規
研 究 科 ， 専 攻 の 名 称

まき きか しょうの すけ
匂 坂 勝 之 助
農 学 博 士
昭 和 35 年 7 日 21 日
学 位 規 則 第 5 条 第 1 項
東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科
博 士 課 程 (農 芸 化 学 専 攻)

学 位 論 文 題 目

酵 母 に お け る リ ジ ン の 生 合 成 に
関 する 研 究

指 導 教 官
論 文 審 査 委 員

東 北 大 学 教 授 志 村 憲 助
東 北 大 学 教 授 志 村 憲 助
東 北 大 学 教 授 有 山 恒
東 北 大 学 教 授 植 村 定 治 郎

論文内容要旨

近年アミノ酸代謝に関する研究がいろいろな生物について活潑に行なはれ、すでに大部分のアミノ酸についてはその基本的な合成および分解反応が明らかにされるにいたった。これらの研究を通じて生化学は遺伝学、免疫学などより緊密な関係を有するようになり、それに伴って基本的な生化学反応の重要性は一層強く認められてきた。

周知の如くリジンは動物における必須アミノ酸の一つであり、特に成長期には多量の摂取を必要とするとも云はれているが、スレオニンと共に植物性の蛋白質食品に少なく栄養学的にも注目されているアミノ酸である。このような動物に対する必須性のほかに、著者は次の二点すなわち微生物によるリジンの生合成および分解反応には他のアミノ酸と異なり全く異なつたいくつかの反応形式が存在していること、および蛋白質へのインコーポレーションにおいても一般のアミノ酸とは可成異なつた挙動を示すことに興味をもつた。著者はリジンを通じて蛋白質の生合成機構を知り、また動物におけるリジンの必須性をも追求してこれらの関連から生命現象の一端をうかがい知ることを念願としているが、本論文はこれに先だつて、基礎的な反応である α -リジンの生合成機構、について酵母を用いて得た結果をまとめたものである。なお酵母を選んだ理由は、当時酵母に於けるリジンの生合成経路ならびにその機構が明らかでなく、また酵母が実験材料として容易に入手出来て酵素源としても好適の性質を有していることによるものである。

論文は 10 章に分けて整理してある。第 1 章では簡単に概略を述べ、酵母以外の微生物について得られた現在まで (1960 年 3 月) の報告を附記した。実験は第 2 章から第 9 章までの 8 章にわたつて述べたあと、第 10 章で一般的な考察を行なつた。この論文の主要な部分は α -アミノアジピン酸- δ -カルボキシル基の還元反応機構に関する考察についやした。それはカルボキシル基の還元反応が酵素化学的に興味ある問題であり、また α -アミノアジピン酸を径るリジン生合成経路の主要な反応段階であると考えたからである。

まづ、第 2 章では従来リジンの代謝系に関係することが見出されていた種々のアミノ酸について、酵母においてリジンの前駆体となるか否かを検討した。この結果、酵母の生細胞では α -アミノアジピン酸から著量のリジンが生成することがわかり、この際グルコースの添加と好气的条件が必要で、2, 4-ジニトロフェノールやソジウムアザイドのような ATP の生成を阻害する試薬によって生成量が著しく減少することを知つた。これらのことはリジンの生成にエネルギーの必要なことを示しているが、後に無細胞抽出液で ATP の必要であることを明らかにした。

第 3 章では C^{14} -酢酸、 C^{14} -グルコースなどの化合物を用いて酵母のリジン合成経路を検討し、殆んど大部分のリジンが α -アミノアジピン酸を径て合成されていることを知り、更に α -アミノアジピン酸が酵母中に微量ながら存在することも確かめた。以上のようにして酵母におけるリジン生合成経路の概略を知り得たので第 4 章では α -アミノアジピン酸-6- C^{14} を用いてこのアミノ酸の代謝経路を追求した。この実験によって、 α -アミノアジピン酸の第一次代謝産物としてはリジンのみが生成し、このリジンの一部分は α -オキシ- ϵ -アミノカプロン酸と δ -アミノバレリアン酸になっていることがわかつた。D- α -アミノアジピン酸は利用されない。

以上の生細胞で得られた知見を基にして、つぎに無細胞抽出液によって α -アミノアジピン酸からリジンを生成せしめる実験に入った。研究の初期においては、直接リジンの生成を認めることは困難であつたので、 α -アミノアジピン酸の還元生成物が蓄積していることを推定し、第 5 章では還元生成物の定量法を研究した結果、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用い

る新しい方法を確立することが出来た。以後において α -アミノアジピン酸の還元機構を解明し得たのは、この定量法が確立したことによるものである。またこの章では α -アミノアジピン酸の還元生成物の分離法を詳述した。第6章では酵母の無細胞抽出液から α -アミノアジピン酸の還元反応を接触する酵素の部分精製および酵素の性質を取扱った。この酵素 (α -アミノアジピン酸還元酵素と命名した) による α -アミノアジピン酸- δ -カルボキシル基の還元反応には ATP, TPNH および Mg^{++} が必要で、グルタチオンで活性化される。DPNH は TPNH の代りにならない。この還元反応の最適 pH は 7.8~8 附近、DL- α -アミノアジピン酸に対する k_m は $1.06 \times 10^{-3} M$ であった。この δ -カルボキシル基の還元反応ではカルボキシル基の活性化反応機構が中心的な問題と考えられたので、第7章ではカルボキシル基の活性化に伴う ATP のピロリン酸結合の開裂機構について検討を加えた。すなわち ATP のピロリン酸結合の α - β あるいは β - γ いずれの開裂が起るかによつて、放射性オルトリン酸あるいはピロリン酸のいずれかが逆反応の際に ATP にとりこまれることを利用して活性化機構の解明を行なった。この実験の結果、 α -アミノアジピン酸還元酵素は ATP とピロリン酸との交換反応を行ない、この反応は Mg^{++} が必要で α -アミノアジピン酸で特異的に活性化されることが明らかになった。またこの章では、阻害剤の影響、グルタチオンの効果および最適 pH などから、 α -アミノアジピン酸の還元反応は二段階で進行することなどについて論じ、活性化 α -アミノアジピン酸は δ -アデニル- α -アミノアジピン酸であると結論した。第8章では還元反応機構と関連させて還元生成物の構造および若干の性質について記した。活性化 α -アミノアジピン酸から生成する還元産物の可能な構造は δ -アデニル- α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒドであるが、実際反応液から分離した還元産物は温和な熱処理で容易に AMP と Δ^1 -ピペリジン-6-カルボン酸 (α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒドの環状体) を与えた。これらのことは逆に本論文で提出したカルボキシル基の新しい還元機構を支持している。このようなカルボキシル基の還元機構は従来全く考えられていなかったもので要約するとつぎのようにあらわされる。

- 1) α -アミノアジピン酸 + ATP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ δ -アデニル- α -アミノアジピン酸 + ピロリン酸
- 2) δ -アデニル- α -アミノアジピン酸 + TPNH · H⁺ \rightarrow δ -アデニル- α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + TPN⁺
- 3) δ -アデニル- α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + H₂O \rightarrow α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + AMP

第9章では上述の機構によって α -アミノアジピン酸より生成したセミアルデヒドからリジンが生成する反応について述べた。

以上、 α -アミノアジピン酸からリジンが生成する反応を酵母を用いて研究し、リジンの前駆体として α -アミノアジピン酸を明らかにし、さらに従来推定にとまっていた α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒドの存在を p -ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いる新しい方法により検出、定量することにより α -アミノアジピン酸- δ -カルボキシル基の還元機構を明らかにした。還元反応の中間体としてアデニルアミノ酸が関与しているということを示したのは本研究が最初のものである。

審査結果要旨

周知の如くリジンは動物における必須アミノ酸として重要であるが、一般に植物性蛋白質には少く、栄養上の補給が最も必要とされているアミノ酸の一つである。本研究は、リジンの生合成経路および動物に対する必須性の機作を明らかにする目的で、研究材料として酵母をえらび、酵素化学的にその代謝経路を解明しようとして行なわれたものである。

論文は10章よりなる。先づリジンの前駆体を検索する目的で、酵母の生細胞を用い推れる種々の化合物についてその可能性を検討した結果、 α -アミノアジピン酸より著量のリンが生成することを明らかにし、その合成反応にはエネルギー代謝系が関与することを推定した(第2章)。ついで C^{14} -酢酸、 C^{14} -グルコースを用いて α -アミノアジピン酸を径でリジンが合成されることを確認した(第3章)。さらに α -アミノアジピン酸-6- C^{14} を用い、この化合物から殆んど同程度の比放射能を有するリジン- ϵ - C^{14} が得られることを証明した(第4章)。

以上の生細胞で得られた知見を基にして、 α -アミノアジピン酸より酵素反応としてリジンを生成せしめる研究に入り、 α -アミノアジピン酸の δ -カルボキシル基の還元生成物を、著者の発見した

p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いる新しい方法を利用して検出、定量し、さらにカラムクロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーにより分離することに成功した(第5章)。この酵素を α -アミノアジピン酸還元酵素と命名した。この還元反応にはATP、TPNH および Mg^{++} が必要で、グルタチオンにより活性化される(第6章)。本酵素はATPとピロリン酸との交換反応を行ない、反応は α -アミノアジピン酸の活性化と還元との2段階に進行し、活性化反応では δ -アデニル- α -アミノアジピン酸が生成することを結論した(第7章、第8章)。さらにこの還元酵素により生成した δ -セミアルデヒドより酵素的にリジンが生成することを明らかにした(第9章)。

以上の事実から、 α -アミノアジピン酸からリジンに至る反応経路として次の機作を提出した。

- 1) α -アミノアジピン酸 + ATP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ δ -アデニル- α -アミノアジピン酸 + ピロリン酸
- 2) δ -アデニル- α -アミノアジピン酸 + TPNH-H⁺ \rightarrow δ -アデニル- α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + TPN⁺
- 3) δ -アデニル- α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + H₂O \rightarrow α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + AMP
- 4) α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド + アミノ酸 \rightarrow リジン + α -ケト酸

以上リジンの生合成経路を酵母を用いて研究し、リジンの前駆体として α -アミノアジピン酸を明らかにし、さらに従来推定にとどまっていた α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒドの存在を、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いる新方法により検出、定量し、 α -アミノアジピン酸- δ -カルボキシル基の還元機構を明らかにした。カルボキシル基の還元反応の中間体としてアデニル化合物の形成を示したのは本研究が最初のものである。本研究はアミノ酸の代謝研究の基礎に寄与するのみならず、栄養学上および醗酵法によるリジンの生産に対しても寄与する所少なくなく、農学博士の学位を授与するに充分なるものと認める。