

氏 名(本籍) おく 奥 やま 山 まき 牧 を 夫

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 3 6 9 号

学位授与年月日 昭和 4 1 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
(博士課程)内科学専攻

学位論文題目 Alpha-Ketoglutarate-dependent Oxidation
of Glyoxylic Acid Catalyzed by Enzymes
from Rhodopseudomonas Spheroides.
(α -ケトグルタン酸関与によるグリオキシ
ル酸酸化回路)

(主 査)

論文審査委員 教授 鳥 飼 龍 生 教授 菊 地 吾 郎

教授 吉 沢 善 作

論文内容要旨

緒言

近年グリオキシル酸(以下Gox)は生化学的に非常に活性な物質である事が明らかになり、生体内に於ける代謝的役割が注目されるようになって来た。即ちGoxはある種の細菌や酵母等に於てグリオキシル酸回路の主要構成員であり、動物系に於てはグリニンのかなりの部分がGoxを経て代謝される事が知られている。又GoxのTCA回路抑制作用が報告され、物質代謝調節への関与も検討されている。しかしGox代謝の詳細はなお明らかでない。本論文は光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides*を用いて、新たにGoxの循環的な代謝経路の存在する事を証明した研究の報告である。

実験材料及び実験方法

嫌気明条件下で培養した *R. spheroides* の無細胞抽出液を粗酵素標品として用い、その30乃至40%硫酸飽和画分を部分的純化酵素標品として用いた。 $^{14}\text{CO}_2$ は炭酸バリウムとして放射能を測定。ケト酸は2,4-デニトロフェニルヒドラゾン(以下2,4-DNPH)として抽出、濾紙クロマトグラフィー(以下PC)により分離同定。有機酸はエーテル抽出し二次元PCで分離同定した。アミノ酸は二次元PCにより分離、ニンヒドリンにて発色せしめ位置を確認した。

実験結果

Gox及び α -ケトグルタル酸(以下 α -Kg)を同時に粗酵素液と孵置すると両ケト酸の著明な減少が見られ、しかも両者はほぼ等量消失する。グルタミン酸(以下Glu)にも α -Kgと同様の効果が認められる。オキサロ酢酸、ピルビン酸にはこの添加効果は見られない。GluはGoxとの間にアミノ基転移を行い α -Kgを生じて反応すると考えられた。以上の反応は熱処理酵素液では全く起こらない。次にこの反応に於ける生成物を知る為[1, 2- ^{14}C] Goxと非放射性 α -Kgを基質として反応させ反応液中の放射性物質を分析して見ると、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生が認められ、ケト酸画分では反応系にGoxと α -Kgが共存する場合に限り橙赤色の色調を有する2,4-DNPHが分離され、この物質には強い放射能が認められた。又 α -Kgも放射能を帯びる事が判明した。有機酸では2種の放射性有機酸が分離された。アミノ酸には $^{14}\text{CO}_2$ 取込みは認められない。

[5- ^{14}C] α -Kgと非放射性Goxを基質とした場合も全く同様の生成物が認められた。この場合にはコハク酸にも放射能が認められた。次いで生成物を同定し反応の機構を明らかにする為に各炭素を夫々 ^{14}C で標識した α -Kg及びGoxを基質として反応させ各生成物への ^{14}C と取込みを検討した。その結果橙赤色の2,4-DNPHを生ずるケト酸はGoxの全炭素と α -Kgの第

2炭素以下の炭素骨格から成る事、従がつて α ケト β オキシアチビン酸(以下 α K β H A)である事が推定された。 ^{14}C 活性を示めた有機酸はGoxの第2炭素と α -Kgの第2以下の炭素から成る α オキシングタル酸(以下 α -Hg)及びそのラクトンである事が推定され、この推定は合成標品との対比により確認された。反応により生ずる放射性 α -Kgは α -Hgと同一炭素骨格を有する。以上の成績より、Goxと α -Kgはカルボリガーゼ反応によつて縮合して α -Kgの第1炭素を失い α K β H Aとなり、更に脱炭酸して α -Hgを生じ、次いで脱水素を受けて α -Kgを再生する代謝回路の存在が推定されたが、この回路の妥当性は各生成物のラベリングパターンを更に詳細に検討する事によつて確められた。この反応に関与する縮合酵素及び α K β H Aよりの脱炭酸を触媒する酵素は硫酸分画により比活性が約4倍上昇した。又 α -Hg脱水素酵素が粗酵素液及び部分的純化酵素標品に存在する事は別に分光光度法による測定によつても証明され、更にその可逆性が確められた。次に部分的純化酵素を用いて本反応の酵素化学的性質を ^{14}C O_2 発生量、 α K β H A生成量を指標に検討した結果、両生成物の産生量は反応開始後45分迄は直線的に増加する事、酵素使用量と完全に対応する事、至適PHは7.2である事が示めされた。又Goxと α -Kgの至適濃度比は2対1であり、過剰の α -Kgによる基質阻害は認められなかつた。この反応にはTPP, NAD, マグネシウムイオンが要求された。フェナチンメトサルフェート及びP-クロロ安息香酸は α K β H Aよりの脱炭酸を著しく阻害した。磷酸イオンはこの段階の反応を促進した。 α -Hgからの脱水素には酸素が必要である。縮合酵素はGox及び α -Kgに特異的に作用し、他のケト酸は基質となり得なかつた。

考 按

以上の実験結果より、 α -Kgが関与し数段の反応を経てGoxが完全に酸化される未だ報告されていない代謝経路の存在が確められ、その機構が明らかになつた。各段階の反応は夫々異なる酵素により触媒される。 α K β H Aより α -Hgを生ずる反応は新しい反応であり、その触媒酵素は α K β H A脱炭酸酵素とよばれるべき酵素である。この脱炭酸酵素及び縮合酵素は硫酸分画により約4倍純化された。一方、動物系に於てはNakada及びSund(1958年)はラット肝ミトコンドリア(以下MT)に於てGoxはGlutと縮合してNホルミルグルタル酸となつて代謝されると報告したが、これに対しCrawhall及びWatts(1962年)はラット及びヒト肝MTによる[1- ^{14}C] Goxよりの $^{14}\text{CO}_2$ 生成はGlut添加で増大するが α -Kgが更に添加効果が大きであると述べ、又Nホルミルグルタル酸は中間代謝産物ではないと報告した。著者等はラット肝MTを用いてCrawhall等の実験を追試確認すると共にR.Spheroidesに於けると全く同様の代謝産物を生ずる事を認めた。この事実からラット肝に於てもGoxはR.spheroidesで見出された α -Kgの関与する代謝経路を経て代謝されると考えられる。以上の様にこの代謝経路が動物系に於ても認められる事は本経路が生物界にかなり普遍的な反応である事を示めしている。

審 査 結 果 の 要 旨

著者の研究は光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides* を用いて、新たにグリ
オキシル酸(以下 G_{ox}) の循環的な代謝経路の存在を証明したものである。著者は始めに G_{ox}
及び α -ケトグルタル酸(以下 $\alpha-K_g$) を同時に粗酵素液と孵置すると両ケト酸の著明な減少が
見られ、しかも両者はほぼ等量消失する事を発見し、この現象の生化学的機転を ^{14}C 標識化合物
を用いて解析した。先ずこの反応に於ける生成物として、 $^{14}C O_2$ の他に、橙赤色の色調を有す
る 2, 4 DNPH を与えるケト酸が分離され、この物質には強い放射能が認められた。又 $\alpha-K_g$
も放射能を帯びる事が判明した。有機酸では 2 種の放射性有機酸が分離された。次いで生成物を
同定し、反応の機構を明らかにする為に各炭素を夫々 ^{14}C で標識した $\alpha-K_g$ 及び G_{ox} を基質と
して反応させ各生成物への ^{14}C 取込みを検討した結果、橙赤色の 2, 4 DNPH を生ずるケト酸
は α -ケト- β オキシアデピン酸(以下 $\alpha-K-\beta-HA$) であり、 ^{14}C 活性を示めた有機酸
は α -ヒドロキシグルタル酸(以下 $\alpha-Hg$) 及びそのラクトンである事が明らかにされた。
以上の成績より、 G_{ox} と $\alpha-K_g$ はカルボリガーゼ反応によつて縮合して $\alpha-K_g$ の第 1 炭素を失
い $\alpha-K-\beta-HA$ となり、更に脱炭酸して $\alpha-Hg$ を生じ、次いで脱水素を受けて $\alpha-K_g$ を再
生する代謝回路の存在が推定されたが、この回路の妥当性は各生成物のラベリングパターンを更
に詳細に検討する事によつて確かめられた。次にこの反応に関与する縮合酵素及び $\alpha-K-\beta-$
 HA よりの脱炭酸を触媒する酵素を硫酸分画により分別部分精製し、各反応段階の酵素反応を速
度論的に解析し反応の性格を明らかにした。

以上の実験結果より、 $\alpha-K_g$ が関与し数段の反応を経て G_{ox} が完全に酸化される未だ報告さ
れていない代謝経路の存在が確かめられ、その機構が明らかになった。著者は更にラット肝に於
ても G_{ox} は *R. spheroides* で見出された $\alpha-K_g$ の関与する代謝経路を経て代謝される事を
示めたが、これにより本経路が生物界にかなり普遍的な反応である事が示唆される。以上のよ
うに本論文はこれまで未知の代謝系の存在を発見したものであり、大きな意義を持つている。

したがつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。