Osaka University Knowledge Archive

Title	myo-Inositol欠乏Saccharomyces carlsbergensisの代謝異常
Author(s)	富田, 多嘉子
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30052
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【9】

氏名・(本籍)	富田多嘉子（とみたたかこ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 1845 号
学位授与の日付	昭和 44 年 11 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**myo-Inositol 欠乏 Saccharomyces carlsbergensis の代謝異常**
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 岩田平太郎

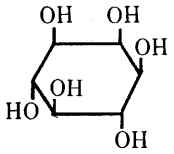
論文内要の要旨

要旨

myo-inositol (m-I) は，遊離の型やヘキサ燐酸エステルの塩 (phytin) として，あるいは phosphatidyl inositol として広く天然に存在する。古くより動物，微生物の成長増殖における必須因子として知られ，近年では phosphatidyl inositol として膜透過に関する作用，vervascose 生合成における補酵素としての作用等が証明されている。しかし他のビタミンと異り m-I は動物においてある程度生合成されるために欠乏状態をおこし難く，したがって作用機作においてある程度合成されるために欠乏状態をおこし難く，したがって作用機作に関する研究は m-I を生合成しにくい酵母を用いて進められてきた。

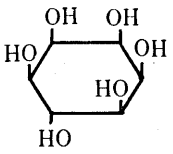
Ghosh らは m-I 要求性酵母 Saccharomyces carlsbergensis (S. carls) において m-I 欠乏により細胞壁に glucan が蓄積し正常な分裂，増殖が阻害されることを報告した。Lewin は m-I 欠乏下長期間にわたって同酵母を培養した際，菌体中に中性脂肪が増加し，培養液中に acetoin (Act) の蓄積することをみとめた。これらの結果は m-I の生化学的役割を間接的に反映しているものであるが，いまだ m-I の作用を分子レベルでとええたものではない。

著者は上述の S. carls における Act の異常蓄積は m-I 欠乏に特異的であり，muco-inositol または epi-inositol などの異性体の添加では Act の異常蓄積が消失しないこと，また培養条件によっては100～1000倍もの Act が短時間培養で蓄積することをみとめたので，これを指標として正常酵母と m-I 欠乏酵母の諸性質を対比させることにより，m-I の生体内における役割を明らかにしようと試みた。



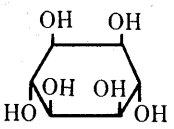
(Ⅰ)

myo－inositol



(Ⅱ)

epi－inositol



(Ⅲ)

muco－inositol

Ⅰ. m-I 欠乏による S. carls の代謝異常発現の条件

m-I 欠乏による S. carls 培養液中における Act の蓄積は，m-I 欠乏に特有のものであり，m-I の添加によってのみ回復しその立体異性体である epi-inositol または muco-inositol の添加では無効であった。

m-I 欠乏による Act の蓄積には好気的培養が必要であり Act 濃度は種々の因子により大きく変動した。試験した培地のうち Atkin らの培地が Act の蓄積に最適であり，48時間培養で m-I 欠乏培養液中の Act 濃度は 8 μmoles/mg cell に達し正常菌に対する欠乏菌の Act 蓄積比はおよそ1000倍であった。培地の pH は pH 4.0～6.0 の範囲で影響がみられなかった。窒素源として用いる casamino acids は，そのロットにより Act 蓄積比を変動させた。

補酵素となる lipoic acid, NAD 培地への添加は m-I 欠乏に対して著明な効果を示さなかった。しかしピルビン酸脱炭酸酵素 (pyruvate decarboxylase) (PDC) の補酵素となる thiamine を培地より除去すると M-I 欠乏によって生ずる特有の Act 蓄積は消失した。

Ⅱ. m-I と S. carls の呼吸・醗酵との関係

培地に炭素源として glucose の代りに fructose, sucrose を用いても glucose の場合と同様に m-I 欠乏による菌の増殖抑制，Act の蓄積がみられた。しかし galactose は特異的で，galactose 培地では m-I 要求性が低下し m-I 欠除培地においても菌の報殖抑制，Act の蓄積は全くみられなかった。glucose, fructose, sucrose, mannose 生育菌の酸素吸収は m-I 欠乏により正常時の25～43%にまで低下したが，galactose 生育菌では76%にまで抑制されるにすぎなかった。一方炭酸ガス発生は前の 4 糖生育菌において，m-I 欠乏によりわずかに増加 (10～30%) がみられた。

glucose, galactose, fructose, sucrose, mannose 生育菌において m-I 欠乏による増殖抑制，呼吸阻害，Act 蓄積の間に互に強い関係があり，増殖または呼吸抑制が大きければ大きい程より高い Act の蓄積がみとめられた。しかし acriflavin 処理により得られた S. carls の呼吸欠損酵母 (respiration deficient mutant) (RD mutant) では，m-I 欠乏による Act の蓄積は全くみとめられなかった。

Ⅲ. m-I 欠乏菌と正常菌の諸性質の比較

培養液中の glucose 消費状態は正常菌と m-I 欠乏菌で大いに異なり，残存 glucose 量を始めとする種々の培養液中の因子が Act の消長に当然大きい影響を与える。そこでこの問題を除外するために24時間生育静止菌を用いて Act の生成，分解，Act 生成反応の基質である

glucose の取り込みにつき m-I 欠乏菌と正常菌の性質を比較した。

m-I 欠乏菌は glucose を基質として正常菌の約6倍の Act (192mμmoles/mg/hr) を生成した。基質となる glucose の取り込みは両菌で差はみとめられないが，反応系へ m-I を添加することにより欠乏菌の glucose の取り込みは高まり，それにともなうAct 生成の増加がみられた。生成された Act の分解は両菌で殆んど差がみられなかった。

Ⅳ. m-I とピルビン酸脱炭酸酵素との関連

m-I をそれぞれ 0, 50, 150, 500 μg/20ml を含有する培地で培養した菌体より抽出した PDC 活性はそれぞれ 0.009, 0.05, 0.123, 0.128 μmole CO_2/mg protein/min であり，培地中のm-I 濃度の増加にともなって PDC の活性化がみられた。casamino acids の amino acid 分析値にもとづく純 amino acid 混合物を casamino acids に代用すると m-I 濃度の増加にともなう培養液中の Act 濃度の減少は，casamino acids を用いた場合と非常によく一致したが m-I による PDC の活性化現象は再現されなかった。したがって，m-I による PDC の誘導または活性化に casamino acids 中に存在する amino acids 以外の因子が補足的役割を演ずると考えられる。

Ⅴ. m-I 欠乏にともなう Act の生成機構

Ⅲ. において S. carls による Act の蓄積は m-I 欠乏の結果あらわれる間接的な原因による可能性は除外された。そこで正常菌，欠乏菌を glucose 中で一定時間醗酵させてその活動を瞬間的に停止させ菌体中の代謝産物量をそれぞれ特異酵素を用いて定量し関連酵素活性や解糖中間体の濃度から Act 生成機構の解明を試みた。

PDC の基質であり，Act の前駆物質である菌体中の pyruvic acid (Ryr) 濃度は 5.93×10^{-3} M (正常菌)，1.27×10^{-3} M (欠乏菌) であり，acetaldehyde 濃度は 4.38×10^{-2} M (正常菌)，10.46×10^{-2} M (欠乏菌) で Pyr に対する acetaldehyde 濃度は正常菌で 7.4，欠乏菌で82.5であった。一方培養液中にも m-I 欠乏により24時間後に acetaldehyde の異常な蓄積がみとめられた。欠乏菌から抽出したアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase) (ADH) 活性は正常菌の約2倍で，PDC 活性は正常菌の約⅓であった。遊離 acetaldehyde は菌体より抽出した PDC による Pyr 脱炭酸反応を非拮抗的に阻害し，同酵素による Act 生成反応は遊離 acetalcehyde 濃度により全く影響されなかった。

結　　論

1) S. carls 4228(ATCC 9080) を m-I 欠乏培地で好気的条件下に培養すると菌の増殖は約⅓～⅕に抑制され培養液中に Act が異常に蓄積する。この量は m-I 欠乏の程度に応じて増加し，m-I の添加により消滅するが，他の立体異性体例えば muco-inositol や epi-inositol の添加は無効であるので m-I 欠乏に特異な現象である。

2) glucose 培地では添加する m-I 量に応じて酵母の増殖および呼吸が抑制され Act の生成がおこるが galactose 培地ではこの現象はほとんど認められない。また RDmutant では m-I 欠乏によるAct の蓄積は全くみとめられない。このことは Act の生成のために呼吸酵素系の存在が必要であると推定される。

3) m-I 欠乏静止菌は glucose または Pry を基質として異常な Act 生成能を示し，一方欠乏菌体内において多量の acetaldehyde が蓄積する。Act 生成にあずかる一酵素である PDC 活性は培地の m-I 濃度に依存し欠乏菌では極めて低い。また遊離 acetaldehyde は菌体より抽出した PDC による Pyr の脱炭酸反応を非拮抗的に阻害し同酵素による Act 生成反応は遊離 acetaldehyde 濃度に全く依存しない。m-I 欠乏による Act の蓄積には好気的条件が必須であり，RD mutant ではこの現象がみられないこと，PDC による Pyr の代謝に酸素は要求されないが，PDH による反応では要求されること，さらに PDH による Act 生成は遊離 acetaldehyde により非常に促進されること，以上の事実は m-I 欠乏による Act の生成は PDC よりもむしろ PDH による反応であることを強く示唆している。

4) ミトコンドリア内の一連の電子伝達系酵素活性には，m-I などを含有する燐脂質の存在が不可欠であることから，m-I 欠乏 → 呼吸酵素活性の低下 → TCA サイクルの回転遅延と acetaldehyde の上昇→Act の生産といった関連により説明することができる。

論文の審査結果の要旨

酵母 Saccharomyces carlsbergensis を myo-Inositol 欠乏培地で好気条件下に培養するとき報殖抑制とともにアセトインが異常に蓄積される現象について培養条件を検討するとともに RD 変異菌において起らず，呼吸酵素系がアセトイン生成に必要であることを明かにした。イノシトール欠乏時アセトインの蓄積は好気的条件を必要とし焦性ブドウ酸からアセトアルデヒドを経てアセトインの異常蓄積を起こす機構を酵素反応より解明し，イノシトールの生物学的意義を間接的に明確にした。よって本論文は薬学博士の学位を授与するに価値あるものと認める。