

Title	芽胞発芽時に特異的に作動するグルコース代謝経路について
Author(s)	尾谷, 三枝子
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35766
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【5】

氏名・(本籍)	尾 谷 三 枝 子
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 7 9 2 3 号
学位授与の日付	昭 和 6 2 年 1 2 月 9 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	芽胞発芽時に特異的に作動するグルコース代謝経路について
論文審査委員	(主査) 教 授 近 藤 雅 臣 (副査) 教 授 岩 田 平 太 郎 教 授 三 浦 喜 温 教 授 内 田 駿

論 文 内 容 の 要 旨

ある種の細菌は環境条件に対応して芽胞を形成する能力を有している。この休眠芽胞中には各種の代謝反応を営むために必要な一連の酵素系が既に含まれているが、ATPのような高エネルギーリン酸化合物は殆ど存在せず、代謝的に不活性な状態を長期間維持することができる。しかし、グルコースのような発芽剤と接触する芽胞は直ちに発芽を開始し、高い代謝能力を発揮し得る発芽芽胞に転換される。この過程において、グルコースの代謝そのものは発芽の始動には必須ではないことが既に知られているが、発芽芽胞における各種の代謝能力がグルコースの代謝によって顕著に促進されることもまた事実である。

一方、グルコース脱水素酵素(GDH)はNADの還元を伴って、グルコースを直接グルコン酸に酸化する反応を触媒している。本酵素は栄養型細胞には全く認められず芽胞にのみ特異的に存在すること、又本酵素を欠損した変異芽胞は正常な発芽活動を営めない等の理由から考えて、本酵素が発芽と密接に関連していることに疑問の余地はない。しかし、その役割に関しては未だ推論の域を脱していないのが現状である。

このような現状を踏まえ、演者はGDHの生理的意義を解明する目的で以下に示す研究に着手した。まず、従来不明であった発芽時のグルコン酸生成経路の寄与率を明らかにすることを試みた。さらに、GDH反応により生成したグルコン酸がその後さらに代謝されて酢酸にまで分解されていく過程についても検討を加え、その代謝経路を解明した。グルコン酸が生成される際同時に生じたNADHが芽胞の呼吸鎖によって再酸化される時、ATPが効率よく供給される事を示し、GDHの芽胞発芽時における役割の一端を明らかにした。

なお、特に述べない限り本研究においては生化学的な解析が最も進んでいる *Bacillus megaterium* QM B 1551 菌芽胞を使用した。

芽胞発芽時の主要なグルコース代謝経路を調べる目的のため、 $[1-^{14}\text{C}]$ -と $[6-^{14}\text{C}]$ グルコースからの $^{14}\text{CO}_2$ 発生量の差からペントースリン酸経路 $[2-^3\text{H}]$ グルコースからの $^3\text{H}_2\text{O}$ の生成量から解糖系、さらにグルコン酸蓄積量からグルコン酸生成経路の寄与率を測定した。その結果、グルコースは発芽開始後速やかに代謝されその速度は $60\text{nmol}/\text{min}/\text{mg spores}$ にも達することが判明した。その際、ペントースリン酸経路の寄与率は20%程度であり、従来の報告とほぼ一致することが判明した。また、TCA回路が発芽時には作動していないことも併せて確認された。

一方、従来主要経路であると提唱されてきた解糖系の寄与率が実際には20-30%とかなり低いことが示され、むしろ、従来定量的な検討がなされなかったグルコン酸生成経路の寄与率が最も高いことが立証された。この結論は関連酵素活性の比較や解糖系阻害剤を用いた検討によっても支持された。さらに、アラニンをも最も有効な発芽剤とする *B. megaterium* ATCC 19213 菌や *B. subtilis* Marburg 菌芽胞においても同様にグルコン酸生成経路の活性が高いことを明らかにした。

芽胞発芽時に蓄積された多量のグルコン酸はその後更に代謝されて発芽後成育期の細胞に認められる高い代謝活性の維持に貢献するものと予想される。ところで、グルコン酸の代謝経路の詳細については従来全く検討がなされていなかった。それは、まずグルコン酸代謝能を欠損した変異芽胞及びその復帰変異株に分離して検討を加えた。その結果、グルコン酸は全てグルコノキナーゼ (GNK) によってリン酸化されて6-フォスフォグルコン酸に転換されることを証明した。

次に、 $[1-^{14}\text{C}]$ -、 $[2-^{14}\text{C}]$ -、 $[3, 4-^{14}\text{C}]$ -、および $[6-^{14}\text{C}]$ グルコン酸を調製し、常法通り $^{14}\text{CO}_2$ の回収率から代謝経路の同定を試みた。しかしながら、この方法では1位と4位の炭素から共に高い $^{14}\text{CO}_2$ の発生が認められ、Entner-Doudoroff経路およびペントースリン酸経路のいずれによっても説明可能な結果となってしまった。それ故、最終産物の一つのである酢酸に着目して、より詳しい検討を続けた。その結果、Entner-Doudoroff経路の関与は否定され、グルコン酸は全てペントースリン酸経路によって代謝されることが明らかとなった。この結論の妥当性はペントースリン酸経路のkey enzymeであるtransketolase欠損変異株を分離してその代謝活性を比較することによっても最終的に確認された。

従来、ATPは発芽開始2分目以後に始まる3-phosphoglycerate (3PG) poolの嫌氣的代謝によって供給されるものと考えられてきた。しかし、演者は芽胞発芽直後からグルコースが活発に代謝されてグルコン酸に酸化され、その際同時にNADHの生成を伴うことに着目し、好氣的なATP産生機構が関与している可能性を検討した。その結果、グルコースの存在下では発芽開始2分目までに既にNADHの生成していることを示し、さらに呼吸鎖によってそのNADHが再酸化されることを明確にした。つぎに、 $^{32}\text{P}_i$ が有機リン酸化合物に取り込まれる反応を利用して、好氣的なATP産生が3PG分解の始動以前に認められることを立証した。

さらに多量のATP供給を必要とすることが知られているRNA合成活性についても検討を加えた。この際、hexokinase欠損変異株を分離し、その芽胞におけるRNA合成速度が野生株と全く差のないこ

とを確認した。以上に示した結果は、解糖系によるグルコースの代謝と発芽初期における3PGの嫌氣的分解を同時に阻害することが知られているKFの存在下においても確認された。これらの一連の実験事実は、嫌氣的な3PGの分解や解糖系によるグルコース代謝よりも、GDHによるグルコン酸生成反応の方が発芽初期段階のATP産生にはむしろ重要であることを明確に示している。

以上の示した通り、GDHはATPが枯渇した環境条件下でもグルコースの代謝を開始せしめ、同時に好氣的なATP供給を可能にすることによって、芽胞発芽過程の活性化に重要な役割を演じていることが明確となった。

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞発芽時のグルコン酸生成経路を明らかにし、この経路の発芽現象への寄与が大であることを証明した。すなわち、発芽時グルコン酸と共に生成されたNADHは発芽直後から3呼吸鎖によって再酸化され効率よくATPを供給すること、生成したグルコン酸はその後リン酸化され、ペントースリン酸経路によって酢酸にまで代謝されることなどを明らかにした。これらの事実はグルコース脱水素酸素の働きによりATPが枯渇した環境条件下でもグルコースの代謝を開始させ、同時に好氣的なATP供給を可能にすることによって、芽胞発芽過程の活性化に重要な役割を演じていることを裏付けるものである。この新しい経路の発見は細胞芽胞発芽機構の研究に重要な知見を与えるものであり、薬学博士を授与するに値するものと判定した。