

Bacillus aneurinolyticus のチアミナーゼII (第1報)

—分光学的活性測定法—

中 塚 敏 之

(栄養学研究室)

Thiaminase II of *Bacillus aneurinolyticus* (Part 1) A Spectrophotometric Assay Method

Toshiyuki NAKATSUKA

緒 言

従来、チアミナーゼII (EC3.5.99.2) の活性はチアミンを基質とし、基質減少量をチオクローム法で測定する¹⁾²⁾か、反応生成物ヒドロキシメチルピリミジン (PmCH₂OH) を陰イオン交換樹脂で分離し、その生成量を測定する³⁾方法が用いられてきた。しかし、どちらの方法も操作が繁雑であり、またチアミンがアルカリ領域では非酵素的にも分解するため正確かつ迅速な酵素活性の測定を行うことが困難であった。

著者はアルカリ中で安定なキノリノチアミン (PmQ) を基質とする簡便な新しい活性測定法を確立した。

実験方法

キノリノチアミン [PmQ. (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl)-methylquinolinium bromide hydrobromide] の合成。

PmQは藤田の方法⁴⁾により合成した。PmCH₂OH 1gを10% HBr 酢酸溶液 70mlとともに100°C、2時間加熱する。放冷後吸引口過し、残渣をエーテルで洗浄、乾燥し、2-methyl-4-amino-5-bromomethyl pyrimidine hydrobromide (PmCH₂Br:HBr) の粗結晶 1.95 g を得た。キノリン 3.3ml 中に PmCH₂Br:HBr 1.85 g を加え、沸とう浴中で1時間加熱した。放冷後、生じた結晶を細かく碎き、エーテルで洗浄し乾燥した。

乾燥した結晶を少量の水に溶かし、これに8倍量のエタノールを加え、一夜冷蔵庫に放置した。生じた結晶は吸引口過し、エタノール、エーテルの順に洗浄した。こ

の結晶をもう一度再結晶させ、1.38 g の PmQ 結晶を得た。この結晶は薄層クロマトグラフィーで単一のスポットを与えた。

酵素活性の測定

活性測定は日立ダブルビーム自記分光光度計 624 型を用いた。測定中セルは恒温セルホルダーにより、37°C に保たれた。

石英セルに予め 37°C に温めた基質 (PmQ) 溶液およびリン酸緩衝液 (pH7.0) を終濃度がそれぞれ 200 μM, 50 mM になるように加え、適当量の酵素溶液と蒸留水を加え全量を 3 ml とし、すばやくかく拌し、318 nm の吸光度の減少を記録した。

吸光度の減少速度と PmQ の分子吸光係数から酵素活性の測定を行った。

酵素液の調整

Bacillus aneurinolyticus をペプトン—肉エキス培地 (ペプトン 1%, エーリッヒ肉エキス 1%, NaCl 0.5%) で 37°C, 48時間培養した。培養液を遠心分離 (0°C, 10,000rpm 10min) して菌体を集め、0.9% NaCl で2回洗浄した。

洗浄菌体を 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) にけん濁し、超音波処理した後、遠心分離し上澄を集め、無細胞抽出液を得た。

この抽出液に 30% 飽和になるように結晶硫酸を加え、生じた沈でんを遠心分離 (0°C, 10,000rpm, 30min) して除いた。上澄に 70% 飽和になるように硫酸を加え、一夜放置した後、沈でんを遠心分離により集め、最小量の

25mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に溶かし, 50倍量の同緩衝液 (1 mM 2-メルカプトエタノールを含む) に対し, 4℃で一夜透析した。外液を新しくし, さらに一夜透析した。透析同液を遠心分離して不溶物を除き, 上澄を-20℃に保存し, これを酵素標品とした。

実験結果および考察

Fig 1 はPmQの紫外吸収スペクトルである。318nmにPmQ特有の吸収が見られる。その分子吸光係数は 7.6×10^3 であった。このスペクトルはpH 6~11の間で変化が見られず, PmQはこのpH領域で構造的な変化を起こさないものと思われる。一方, PmQが酵素的分解を受けた際生成する物質のうちPmCH₂OHは318nmに吸収がなく,

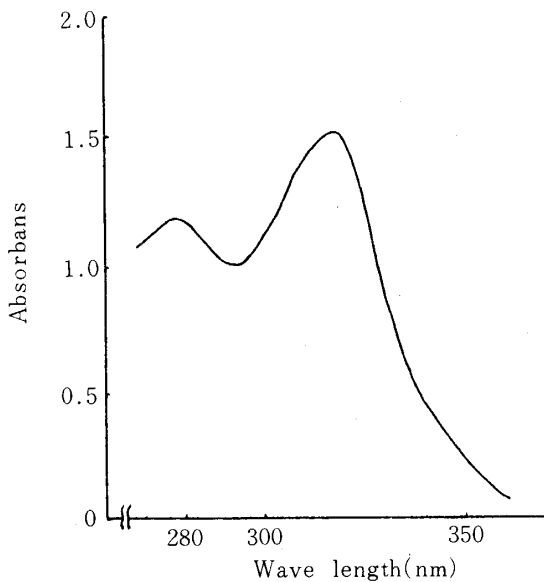


Fig 1 UV Spectrum of PmQ Solution

Concentration of PmQ: 200 μM in Na phosphate buffer (pH7.0)

キノリンは6以上のpHではほとんど非電離型として存在し, 318nmの吸収は小さく無視できる。従って, 反応速度を求める際反応生成物による吸収の補正を行う必要はなかった。

PmQがチアミナーゼIIにより分解されることを確認した。0.2mM PmQを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 3 mlを加え, 37℃, 20分間保温した。次に沸とう水中に1分間浸して酵素を失活させた。氷冷後, 4 mlのn-アミルアルコールを4 ml加え, はげしく振とうする。

この条件ではキノリンは完全にn-アミルアルコール層に移行するが, PmQおよびPmCH₂OHは移行しない。遠心分離 (1,000rpm, 3 min) 後, 上層をとり, 3 mlにエ

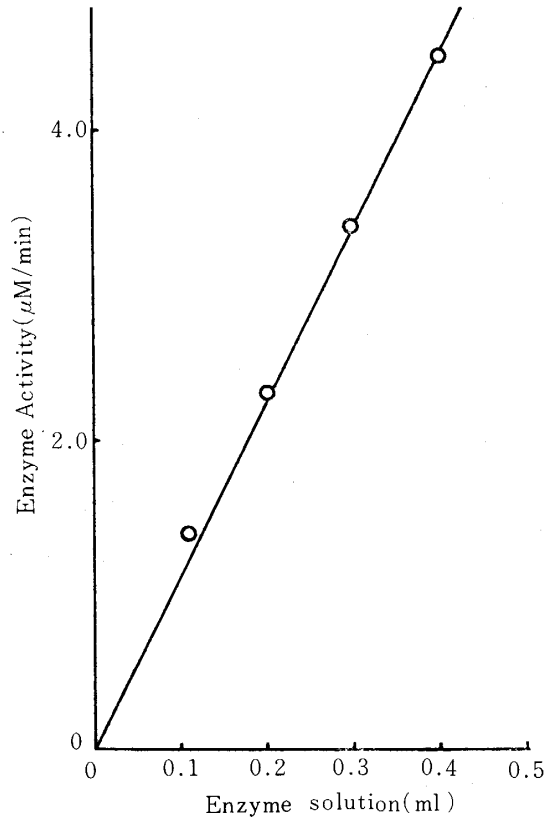


Fig 2 Effect of Enzyme Solution added on Reaction Rate

タノール, 濃塩酸混液 (2 : 1) 0.1mlを加え, その紫外吸収スペクトルを調べた。そのスペクトルは, キノリン塩酸溶液のスペクトルと一致し, PmQがチアミナーゼIIによって分解されることを確認した。

Fig 2は酵素液量に対し, 318nmの吸光度減少速度をプロットしたものである。減少速度は酵素量に比例することが確認された。また, 基質の分解率が, 30%以上になるまでは分解速度は時間に比例した。これらの結果から, この方法により活性の測定が可能なる事が明らかになった。

Fig 3は, 基質濃度に対し, 反応速度をプロットしたものである。200 μMの基質はほぼ酵素を飽和させる量であり測定条件として適切であると考えられる。なお, この図の数値をLineweaver-BurkのプロットにするとPmQのKm値は約20 μMとなった。

Fig 4は活性に対するpHの影響を示したものである。至適pHは9.4でアルカリ側にあることがわかった。

チアミンは酸性では安定であるが, アルカリでは不安定であり種々の構造変化を生じることが知られている⁵⁾⁶⁾。従って, チアミンの酵素的分解を考える際にはチアミンの

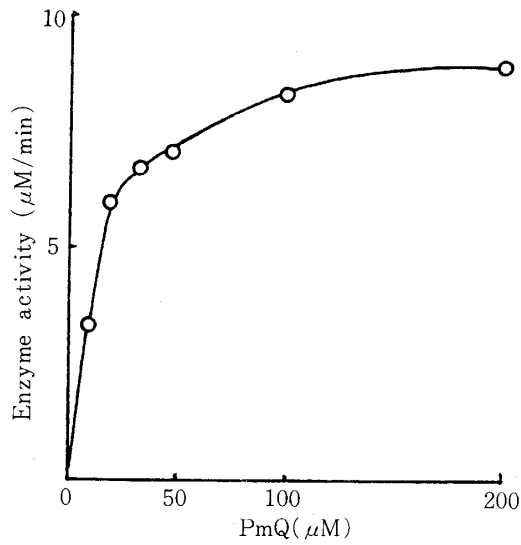


Fig 1 Effect of Substrate Concentration on Enzyme Reaction Rate

Volume of enzyme solution added: 0.1 ml

構造的変化による実効基質濃度の低下，チアミンの非酵素的分解等の影響を補正する必要がある。特に9以上のpHではその影響が大きく，酵素的な分解の解析の大きな障害となっている。一方，PmQはアルカリ側でも安定であり，構造的な変化を生じないため，反応速度の解析に極めて有用である。反応生成物のキノリンは6以上のpHでは，318nmの光をほとんど吸収しないが，pH6以下では電離型（キノリニウムイオン）が増加し318nmに強い吸収を示す。

pH6以下で活性を測定する時はこの補正を行う必要がある。

おわりに，本研究のご指導ならびに本稿のご校閲を賜

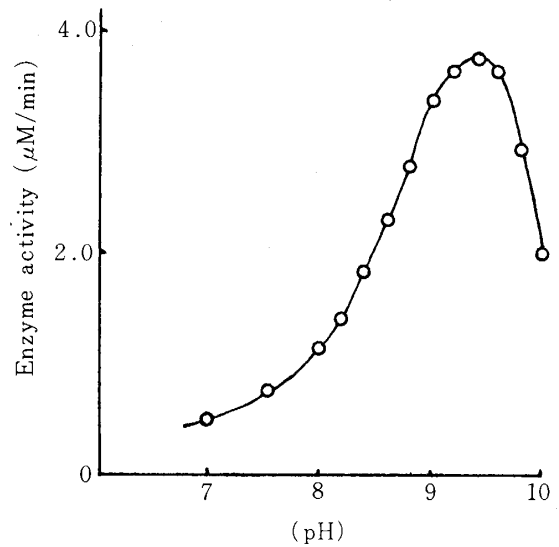


Fig 4 Effect of pH on Enzyme Activity

わった島根大学農学部助教授，鈴木喜六博士に深謝致します。

文 献

- 1) A. Fujita, "Adv. in Enzymol." ed. by F. F. Nord Interscience, New York, **15** 388 (1954)
- 2) J. L. Wittliff, A. L. Airth, "Methods in Enzymol" ed. by, D. W. McCormick, L. D. Wright. Academic Press, New York **18A**, 234 (1970)
- 3) 榎原栄一，酵素化学シンポジウム **14** 124 (1960)
- 4) A. Fujita et al *J. Biol. Chem.*, **196** 289 (1952)
- 5) R. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **57** 1856 (1935)
- 6) 松川，岩津，薬誌 **70** 28 (1950)

(昭和58年1月20日受理)