

土壤由来性細菌の生産するチアミナーゼ I の 精製とその酵素学的性質

持田和男*・尾添嘉久*・藤田啓二*・鈴木喜六**

Kazuo MOCHIDA, Yoshihisa OZOE, Keiji FUJITA, Kiroku SUZUKI
Purification and Enzymological Properties of the Bacterial
Thiaminase I Produced by a Strain Isolated from Soil

緒 言

チアミナーゼ I (Thiaminase I, EC 2.5.1.2) は、シダ植物 (ワラビなど)、細菌 (*B. thiaminolyticus* など)^{1,2)}、魚介類 (コイやシジミなど) に分布し、チアミン分子中の (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル) メチル基部位を、他の適当な塩基 (例えば、アニリンなどの芳香族アミン、ピリジンなどの N-複素環化合物、システインなどの SH 化合物) に転移する反応を触媒する。¹⁾⁻³⁾ この酵素の精製は、*B. thiaminolyticus* Matsukawa et al.⁴⁾ Misawa のそれが村田ら⁵⁾ および Airth⁶⁾ らによって、また *Cl. sporogenes* のそれが小林によって行われ、それぞれ超遠心的にあるいは電気泳動的に単一の酵素標品が得られている。

著者らはこの酵素の転移反応生成物がチアミンや葉酸のアナログであることに注目し、それらの拮抗体合成にこの酵素の利用を企画した。チアミンや葉酸のアナログを幅広く得るためには、基質特異性の異ったチアミナーゼ I 標品を必要とする。そのため、土壤中からチアミナーゼ I 生産菌の検索を行い、得られた菌株のうち Strain B と名付けた *B. thiaminolyticus* の一菌株が生産する粗酵素標品が、酵素学的性質において *B. thiaminolyticus* Matsukawa et al. のそれと若干異なることを認めた。そこで、この酵素の精製を試みたので、精製酵素の若干の性質と共に、報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

平板希釈法によって、宍道湖干潟土壌より分離した 1

菌株, *Bacillus thiaminolyticus* Strain B を用いた。

なお、本菌の検索に用いたチアミナーゼ I 活性の新測定法および本菌の菌学的性質については、別に報告する予定である。

2. 試薬

DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 は Pharmacia 社, Hydroxylapatite は日本ケミカル社の製品である。牛血清アルブミンは Sigma 社製, 分子量決定に用いた標準タンパク質は Boehringer 社の分析キットのものである。また基質であるチアミンやピリジン、およびその他の試薬は、和光純薬製品を使用した。

3. 酵素活性の測定

酵素活性の測定は、村田らの HPT (ヘテロピリチアミン)⁷⁾ 改良法によって行った。すなわち、チアミン (1.5mM)、ピリジン (25.0 mM)、クエン酸・リン酸緩衝液 (特に断らない限り pH 6.5, 37.5 mM) および酵素液 (0.5ml) を含む全量 2.0ml の反応液を 37°C で 20 分間保温して反応させた後、20%メタリン酸 0.5ml を加えて反応を停止させる。この反応停止液 1ml に 10%水酸化ナトリウム溶液 2ml を加え、37°C で 60 分間保温して未反応のチアミンを分解した後、1%赤血塩-20%水酸化ナトリウム混液 (2:3, v/v) を加えて室温に 15 分間放置する。次いで、0.1%過酸化水素水 0.5ml を加えて過剰の赤血塩を分解した後、HPT の変換生成物であるヘテロピリクロームが示す 386 nm における吸光度を測定することによって、HPT 量を定量する。酵素反応停止液中 1 mM の HPT から生成したヘテロピリクロームの吸光度は 1.40 であった。また 1 酵素単位 (IU) は毎分 1 μmole の HPT を生成する酵素量と定義した。

* 生物汚染化学研究室

** 食品化学研究室

4. タンパク質の定量

タンパク質量は牛血清アルブミンを標準として、⁸⁾ Lowry らの方法に準じて定量した。なお、酵素標品は必要に応じて 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析して定量に供した。また、カラムクロマトグラフィーの溶出液に対しては、必要に応じて吸光光度法 (280 nm) を併用した。

5. ディスク電気泳動

⁹⁾ ミツミ科学産業製の電気泳動装置を使用し、永井の方法に準じて行った。すなわち、7.5% のポリアクリルアミドゲル、電極槽緩衝液として Tris-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用い、カラム 1 本当り 4mA の定電流で約 1 時間泳動した。タンパク質の染色は 1% アミドシュワルツ 10B 液で 1 時間行い、7% 酢酸で脱色した。

6. 分子量の測定

¹⁰⁾ Andrews の方法に従って、0.4M 塩化ナトリウム含有 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2×120cm) を用い、流速 0.35 ml/min および分取量 1.5g/tube の条件下で標準および酵素タンパク質のゲル濾過を行い、酵素タンパク質の分子量を決定した。標準タンパク質としては、Cytochrome C (分子量 12,500), Chymotrypsinogen A (25,000), 卵白 Albumin (45,000), 牛血清 Albumin (68,000) および Aldolase (158,000) を使用した。

実験結果

1. 酵素の精製

(Step 1) 粗酵素液の調整

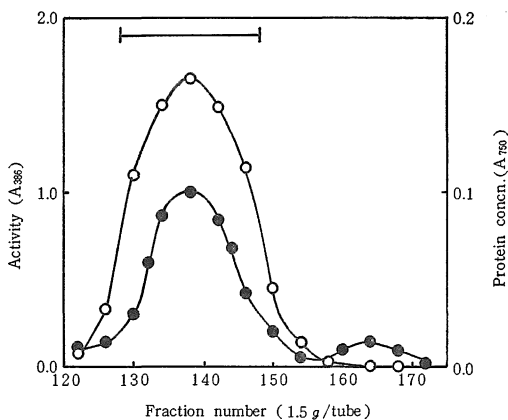


Fig. 1. Gel Filtration Patterns of Hydroxylapatite Fraction on Sephadex G-100 Column.

○—○ : Thiaminase I activity.

●—● : Protein concentration.

—|—| : Fraction pooled.

Strain B を肉エキス-ペプトン培地で 37°C, 168 時間静置培養した培養液を、冷却下 (0°C) において遠心分離 (8,000 rpm, 10 min) し、得られた上澄液 (15.5 l) を粗酵素液として用いた。なお、以下の精製操作は全て 0—5°C の恒温室内で行い、緩衝液は、特に断らない限り、1 mM の 2-メルカプトエタノール (ME) を含んだ 0.02M のリン酸緩衝液 (pH 6.8, 以後 A 緩衝液と称する) を用いた。

(Step 2) 硫酸分析

前記粗酵素液に 80% 飽和相当量の硫酸を加えた溶液を一晩放置後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 min) した。得られた沈殿を少量の A 緩衝液に溶かした後、その溶液を大量の A 緩衝液に対して一晩透析した。

(Step 3) DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

あらかじめ A 緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (5×100cm) に透析溶液を吸着させた後、A 緩衝液 (2l) で洗浄し遊離のタンパク質を除去した。その後、A 緩衝液に塩化ナトリウムを添加することによって作製した stepwise elution 溶液 (塩化ナトリウム濃度 : 0.2, 0.3 および 0.4M) 各 2 ベッド容積相当量で溶出 (流速 : 40 ml/hr, 分取量 : 15g/tube) した。0.4M 塩化ナトリウム含有溶出液中の活性画分を集めた後、これに 80% 飽和相当量の硫酸を添加し、塩析を行った。遠心分離 (8,000 rpm, 15 min) によって集められた沈殿を少量の 0.4M 塩化ナトリウム含有 A 緩衝液 (以後 B 緩衝液と称する) に溶かした後、同緩衝液に対して透析を行った。

(Step 4) Sephadex G-100 column chromatography (1st)

前記溶液 (2.5ml) を、あらかじめ 1.0M 塩化ナトリウム含有 A 緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2×50cm) に充填した後、同緩衝液で溶出 (流速 : 21 ml/hr, 分取量 : 3 g/tube) した。活性画分を集め、凍結乾燥した後、残渣を少量の B 緩衝液に溶かし、同緩衝液に対して透析を行った。

(Step 5) Hydroxylapatite column chromatography

前記溶液 (3ml) を、あらかじめ 0.2M 塩化ナトリウム含有 A 緩衝液で平衡化した Hydroxylapatite カラム (1.5×10cm) に吸着させ、同緩衝液 20ml で洗浄した。次いで、同緩衝液中のリン酸濃度を増加させることによって作製した stepwise elution 溶液 (リン酸濃度 : 0.05, 0.10, 0.15 および 0.20M) 各 20ml で溶出 (流速 : 21 ml/hr, 2.5 g/tube) した。0.15~0.20M リ

Table 1. The Purification of Thiaminase I from Strain B.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Culture filtrate	4154	4123.0	1.0	1.0	100.0
0-80%(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt	3666	1933.6	1.9	1.9	88.3
DEAE Sephadex A-50	2500	82.2	30.4	30.4	60.2
Sephadex G-100 (1st)	1350	23.6	57.2	57.2	32.5
Hydroxylapatite	354	3.0	118.0	118.0	8.5
Sephadex G-100 (2nd)	285	1.1	259.1	259.1	6.9

ン酸濃度溶出液中の活性画分を集め、B緩衝液に対して透析した後、凍結乾燥した。残渣を少量の同緩衝液に溶かし、再度同緩衝液に対して透析した。

(Step 6) Sephadex G-100 column chromatography (2nd)

前記試料 (1ml) を、あらかじめB緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2×120cm) に充填した後、同緩衝液で溶出 (流速：21ml/hr, 1.5g/tube) した。活性画分 (第1図) を凍結乾燥した後、残渣を少量のB緩衝液に溶かした。その溶液を同じ緩衝液に対して透析して最終精製酵素標品とした。

以上の各精製過程における活性画分の総活性、総タンパク質量、比活性、収量および純化度を第1表にまとめた。最終精製酵素標品は、培養上澄液の260倍に精製されており、収率は7%であった。

2. ディスク電気泳動

各精製段階ごとに試料を採り、アクリルアミドゲルディスク電気泳動を行った結果を第2図に示した。最終精製酵素標品は単一のタンパクバンドを与え、電気泳動的

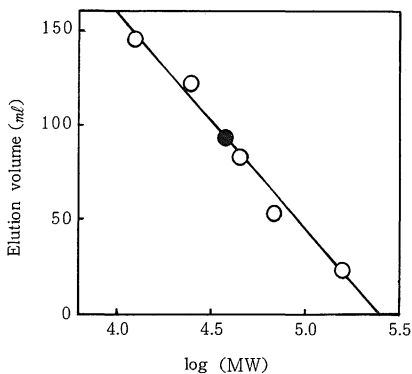


Fig. 3. Molecular Weight Estimation of the Enzyme by the Gel Filtration on Sephadex G-100.

○ : Standard protein.
● : Thiaminase I.

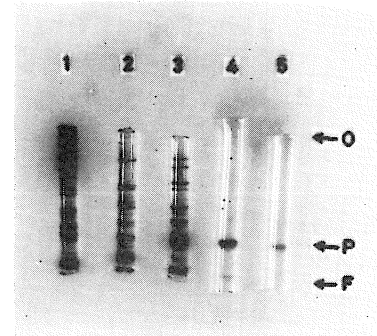


Fig. 2. Polyacrylamide Gel Electrophoresis Patterns on the Enzyme Preparations in Several Purification Steps.

1 : (Step 2) Ammonium sulfate fractionation.
2 : (Step 3) DEAE-Sephadex A-50.
3 : (Step 4) Sephadex G-100 (1st).
4 : (Step 5) Hydroxylapatite.
5 : (Step 6) Sephadex G-100 (2nd).
O : Origin.
P : Protein (Thiaminase I).
F : Front (BPB).

に均一であることが確められた。

3. 精製酵素の分子量

Sephadex G-100 を用いたゲル濾過法による分子量測定の結果を第3図に示した。本菌の生産するチアミナーゼ I の分子量は約 37,000 であると評価した。

4. 精製酵素の性質

1) 至適 pH

0.15M のクエン酸緩衝液を用いて、2.5~8.0の各 pH で調べられた至適 pH は5.0であった (第4図)。

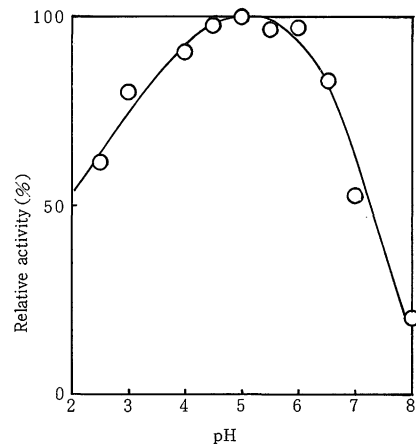


Fig. 4. Optimum pH for Enzyme Activity.

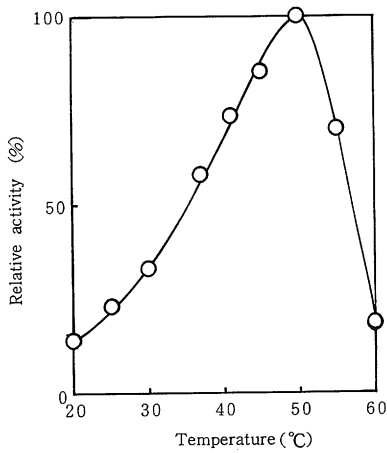


Fig. 5. Optimum Temperature for Enzyme Activity.

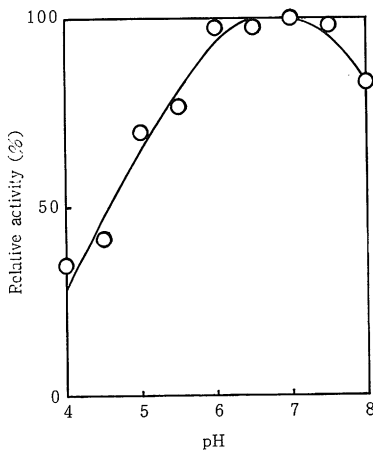


Fig. 6. pH-Stability of the Purified Enzyme.

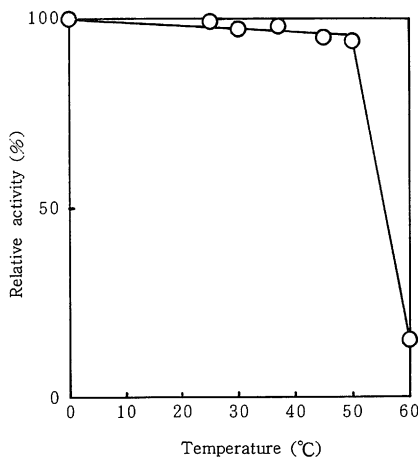


Fig. 7. Thermo-Stability of the Purified Enzyme.

Table 2. Effects of Metal Ions on the Activity of Purified Thiaminase I from Strain B.

Additive (1mM)	Relative activity (%)
None	100
LiSO ₄	105
NaCl	96
KCl	96
CuSO ₄	5
MgSO ₄	98
CaCl ₂	91
ZnSO ₄	84
MnCl ₂	100
FeSO ₄	78
AgNO ₃	0
HgCl ₂	0

2) 至適温度

0.15M のクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて、20～60°C の各温度で調べられた至適温度は50°Cであった (第5図)。

3) pH 安定性

至適温度 (50°C) 条件下において、2.5～8.0の各 pH 溶液中20分間の予温による酵素活性の変化から求めた (第6図)。pH の安定領域は 6.0～7.5 で、それより酸性、アルカリ性いずれの側に傾いても急激に活性が低下した。

4) 熱安定性

0.15M のクエン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて、25～60°C の各温度、20分間の予温による酵素活性の変化から求めた (第7図)。熱安定領域は 50°C 以下で、60°C では酵素活性をほとんど失った。

5) 金属イオンの影響

金属イオンの終濃度が 1mM になるように、酵素活性分析用溶液に加えて、pH 5.0 および50°C の反応条件下における酵素活性の変化を調べた(第2表)。Cu²⁺、Ag⁺、Hg²⁺ で著しい阻害が、また Zn²⁺、Ca²⁺ でかすかな阻害が認められた。しかしながら、Mn²⁺ によ

Table 3. Effects of Inhibitors on the Activity of Purified Thiaminase I from Strain B.

Additive (0.1 mM)	Relative activity (%)
None	100
NaN ₃	101
NaAsO ₂	95
PCMB	3
EDTA	98
ICH ₂ COOH	96

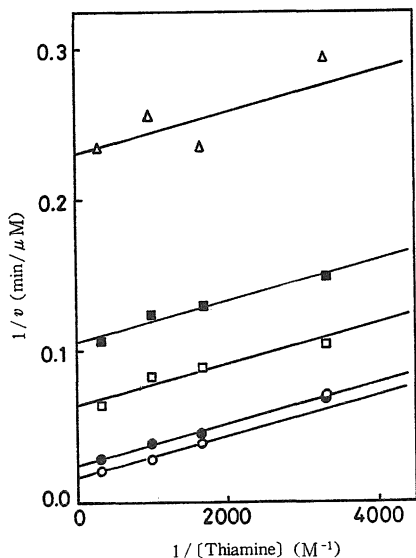


Fig. 8. Lineweaver-Burk Plot
[Pyridine]: 6.0 (○), 3.0 (●), 1.0 (□),
0.6 (■), and 0.3 (△) mM.

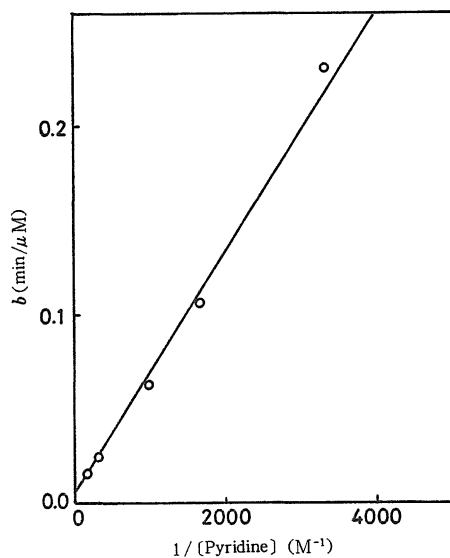


Fig. 9. Plot of b (Intercept in Fig. 8) vs.
 $1/[Pyridine]$.

ては阻害されなかった。

6) 阻害剤の影響

阻害剤の終濃度が 0.1 mM になるように、酵素活性分析用溶液に加えて、pH 5.0 および 50°C の反応条件下における酵素活性の変化を調べた (第 3 表)。PCMB では著しい阻害が認められたが、NaAsO₂, EDTA, ICH₂COOH では阻害が認められなかった。

7) K_m および V_{max}

pH 5.0 および 50°C の反応条件下において、基質濃度を変化させた時の反応速度 (v) を求めた。チアミンおよびピリジンの終濃度 (それぞれ $[S_1]$ および $[S_2]$) は、0.3, 0.6, 1.0, 3.0 および 6.0 mM のうちの 4 ~ 5 段階の濃度を選んだ。また用いた酵素量 ($[E]$) は 0.448 μ g (分子量を 37,000 とすれば反応溶液中では 1.5×10^{-2} μ M に相当する) であった。その結果は、第 8 図に示されているように、 $1/v$ と $[S_1]$ との間には直線関係が得られた。その直線は、 $[S_2]$ を変えることによって、横軸に沿って平行移動した。それぞれの直線の縦軸切片の値 (b) とその際の $[S_2]$ の逆数との関係をプロットしたのが第 9 図であり、ほぼ直線関係が得られた。この直線の縦軸切片 ($1/V_{max}$) から V_{max} が 200 μ M HPT/min (=120 mg thiamine/mg protein/min), 同様に傾き (K_b/V_{max}) からピリジンに対する K_m 値すなわち K_b が 12.8 mM および第 8 図における直線の傾き (K_a/V_{max}) からチアミンに対する K_m

値すなわち K_a が 2.7 mM なる値をそれぞれ得た。

考 察

細菌性チアミナーゼ I の精製については、*B. thiaminolyticus* M. M. および *Cl. sporogenes* のそれが報告されている⁴⁾⁻⁶⁾。しかしながら、著者らが土壌中から単離した *B. thiaminolyticus* Strain B の生産するチアミナーゼ I は、前二者のそれと若干異なっていると思われる。そこで本菌の生産するチアミナーゼ I の精製を試み、肉エキスーペプトン培養上澄液 15.5 ℓ から精製酵素 (比活性 259.1 U/mg) 1.1mg を得た。特筆すべきことに、本酵素は 0.2M 以上特に 0.4M 以上のイオン強度の溶液でなければ沈殿した。そのため、一連の操作においては、SH 基保護剤である ME (1mM) と共に 0.4M の塩化ナトリウムを添加したリン酸緩衝液を用いた。この最終精製酵素標品はディスク電気泳動的に均一であることを確認した (第 5 図)。

この精製チアミナーゼ I の酵素学的性質を、*B. thiaminolyticus* M. M. から得られたチアミナーゼ I のそれと共に、第 4 表にまとめた。本酵素の至適 pH は 5.0、至適温度は 50°C であり、村田ら⁴⁾や Airth らの報告⁵⁾とは異なる。また pH 安定性は 6.0~7.5 とかなり狭く、熱安定性も 50°C 以下で、Airth らの報告する 60°C 以下より低く、本酵素の方が若干不安定なようである。本酵素の活性は、Cu²⁺, Ag⁺, Hg²⁺ の各金属イオンや PCMB によってほとんど完全に阻害され、本酵素が SH 酵素

Table 4. Properties of Thiaminase I.

Property	Thiaminase I		
	Strain B	<i>B. thiaminolyticus</i> M. M.	
		Murata <i>et al.</i> ^{a)}	Airth <i>et al.</i> ^{b)}
Optimum pH	5.0	6.5	5.8
Optimum temp. (°C)	50	30	25
pH-stability	6.0–7.5	—	—
Thermo-stability (°C)	50	—	60
Inhibition	Metal ion	Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺	Mn ²⁺ Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺
	Inhibitor	PCMB EDTA ICH ₂ COOH	—
Molecular weight	37,000	40,000	44,000
Km (mM)	Thiamine	2.7	0.9
	Pyridine	12.8	1.0
V _{max} (mg thiamine/mg protein/min)	120	30.5	6.4

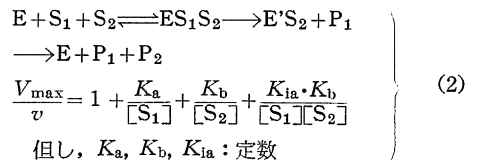
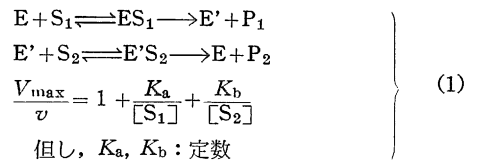
a) From Ref. 4.

b) From Ref. 5.

であることを示唆している。他方本酵素の活性は、村田らの報告と異なり、EDTAには全く阻害されないことから、活性発現に金属イオンは関与していないと思われる。²⁾ また村田らは、植物、魚、細菌などから単離されたチアミナーゼ I の活性がいずれも Mn²⁺ イオンによってかすかに阻害され、かつ細菌由来のものは ICH₂COOH によってほぼ完全に阻害されると述べている。しかし本酵素の活性は、両者によって阻害されなかった。他方、本酵素の分子量は、Sephadex G-100 によるゲル濾過法によっ、約37,000であると評価した。これは沈降係数から求められた *B. thiaminolyticus* M. M. 産生チアミナーゼ I の分子量 44,000⁵⁾ あるいは 40,000⁴⁾、電気泳動法によって求められた *Cl. sporogenes* 産生チアミナーゼ I の分子量42,000⁶⁾ に比べ、若干小さかった。

本酵素の触媒する塩基交換反応の機構は、反応速度の動力学的解析の結果、Ping Pong mechanism であることがわかった。*B. thiaminolyticus* M. M. 産生チアミナーゼ I については、既に G. E. Lienhard³⁾ が同様の機構で反応が進行することを報告している。すなわち、酵素反応が、式1の如く Binary complex (ES₁ または E'S₂) を形成して進行する場合には、いくつかの定濃度の基質 S₂ (または S₁) のもとで、基質 S₁ (または S₂) に対する Lineweaver-Burk のプロットを作図すると平衡直線群となり、式2の如く Ternary complex (ES₁S₂) を形成して進行する場合には、同様のプロットが交叉直線群となることから、両反応機構を区別することができる。本酵素の塩基交換反応の場合には、第8図の如く平衡直線群が得られ、前者の機構であ

ると決定した。この機構に基づく動力学的定数は、第8図および第9図の各直線の傾きと縦軸切片の値から計算し、最大反応速度 V_{max} は 200 μM HPT/min、ミカエリス定数 K_m はチアミンおよびピリジンに対してそれぞれ 2.7 および 12.8 mM なる値を得た。これらの値は、村田らの値より、V_{max} で4倍以上大きく、また K_m でもチアミンで3倍、ピリジンで13倍大きいものであった。また、使用した酵素量から turnover number を約 13,000/min と評価した。



本菌の生産するチアミナーゼ I は、0.2M 以上のイオン強度のもとでしか溶解しないことと併せ、以上の如き酵素学的性質から、*B. thiaminolyticus* M. M. のそれは異質の酵素であると結論した。

要 約

土壌中から単離した *B. thiaminolyticus* Strain B の生産するチアミナーゼ I の精製を行って、その酵素学的性質を調べた。

培養上澄液を80%硫酸分画および DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 (1st), Hydroxylapatite, Sephadex G-100 (2nd) の各カラムクロマトグラフィーに順次かけ、ディスク電気泳動的に単一の酵素標品を得た。この酵素の分子量は、37,000 であった。至適 pH および至適温度は、それぞれ5.0および50°Cであった。この酵素の活性は Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} のような金属イオンおよび PCMB によって著しく阻害された。

この酵素が触媒する塩基交換反応の動力学的パラメーターを、pH 5.0 および 50°Cの条件下で調べた。チアミンおよびピリジンに対する K_m 値はそれぞれ 2.7 および 12.8 mM であり、 V_{\max} は 120mg/thiamine/mg protein/min であった。

これらの性質を *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa や *Cl. sporogenes* から得られたチアミナーゼ I のそれと比較検討した。

引用文献

1. A. FUJITA : Adv. Enzymol. **15** : 389-421, 1954.
2. K. MURATA : Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine, ed. by N. SHIMAZONO and E. KATSURA, Igaku Shoin, Tokyo, 1965, p220.
3. G. E. LIENHARD : Biochemistry **9** : 3011-3020, 1970.
4. J. EBATA and K. MURATA : J. Vitaminol. (Tokyo) **7** : 115-121, 1961.
5. J. L. WITTLIFF and R. L. AIRTH : Biochemistry **7** : 736-744, 1968.
6. 小林進 : ビタミン **49** : 45-51, 1975.
7. 江幡淳子・村田希久 : ビタミン **18** : 497-501, 1959.
8. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL : J. Biol. Chem. **193** : 265-275, 1951.
9. 永井裕 : 蛋白質 核酸 酵素 **11** : 744-749, 1966.
10. P. ANDREWS : Biochem. J. **91** : 222-233, 1964.

Summary

Purification and enzymological properties of the bacterial thiaminase I produced by *B. thiaminolyticus* Strain B isolated from soil has been described.

By applying the culture filtrate of the bacteria to ammonium sulfate fractionation and chromatographic fractionation using a DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 (1st), Hydroxylapatite, and Sephadex G-100 (2nd), an enzyme preparation having *ca.* 260 times as much specific activity as that of the original crude enzyme was obtained. The enzyme was homogeneous on polyacrylamide disc gel electrophoresis and had a molecular weight, estimated by gel filtration, of 37,000 daltons. The optimum pH and the optimum temperature were 5.0 and 50°C respectively. The metal ions such as Cu^{2+} , Ag^+ , and Hg^{2+} , and PCMB remarkably inhibited the activity of the enzyme.

The kinetic parameters for the base-exchange reaction of the enzyme were determined at pH 5.0 and 50°C. The K_m values for thiamine and pyridine were 2.7 and 12.8 mM, respectively, and the V_{\max} value was 120 mg/mg protein/min, expressed as the amount of thiamine decomposed.

These properties were compared with those of thiaminases from *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa and *Cl. sporogenes*.