

## Sepharose 4B 固定化チアミナーゼ I の酵素学的性質

持田和男\*・藤田啓二\*・尾添嘉久\*・鈴木喜六\*\*

Kazuo MOCHIDA, Keiji FUJITA, Yoshihisa OZOE,  
and Kiroku SUZUKI  
Enzymological Properties of Sepharose  
4B-Immobilized Thiaminase I

### 緒 言

チアミナーゼ I (Thiaminase I, EC 2. 5. 1. 2) は、チアミン (第 1 基質) 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、ピリジンなど他の適当な塩基 (第 2 基質) に転移する反応を触媒する<sup>1)-3)</sup>。このチアミナーゼ I は、*B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa<sup>1)2)</sup> のそれが著名であるが、著者らが見出した *B. thiaminolyticus* strain B のそれは、Matsukawa et Misawa 株とは、若干性質を異にしていた。

他方、これらチアミナーゼ I によって生成される転移反応物群は、ピリチアミンに代表される有用なチアミンアナログを含むばかりでなく、第 1 基質の選択によっては、葉酸アナログともなりうる注目すべき化合物群である。

著者らはこれらのアナログ合成に、このチアミナーゼ I の利用を計画したが、その際、固定化チアミナーゼ I を使用した方が有利であると判断した。一般に、酵素を固定化すると、酵素の pH 安定性や熱安定性が増大するばかりでなく、酵素の再利用が可能となるなど種々の利点が付与される<sup>5)</sup>。

そこで、本研究では前記 2 菌株から得られるチアミナーゼ I を、種々の固定化法のうち最も固定化率の高かった、CNBr-activated Sepharose 4B を用いた担体結合法によって固定化し、得られた固定化チアミナーゼ I の酵素学的諸性質を比較検討することによって、前述アナログ合成の際の適性酵素の選択等に関する基礎資料を得ようとした。

\* 生物汚染化学研究室

\*\* 食品化学研究室

### 実験材料および方法

#### 1. 試 薬

CNBr-activated Sepharose 4B は Pharmacia 社、牛血清アルブミンは Sigma 社の製品を使用した。反応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。

#### 2. 酵素の調製

*B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa あるいは *B. thiaminolyticus* strain B をペプトン液体培地 (ペプトン 1%, 肉エキス 1%, NaCl 0.5%) に接種し、37°C、168 時間培養した後、冷却下 (0°C) に遠心分離 (8,000 rpm, 10min) して菌体を除去した。得られた培養上澄液に 80% 飽和量の硫酸を加え、低温下 (5°C) に一夜放置後、生じた沈殿を冷却下 (0°C) における遠心分離 (7,000rpm, 20min) により集め、少量の 1mM 2-メルカプトエタノールを含んだ 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8, 以後 A 緩衝液と称する) に溶解した。この溶液を大量の A 緩衝液に対して一夜透析 (5°C) したものを酵素標品とした。

#### 3. 固定化酵素の調製

粉末 1g から調製した膨潤 CNBr-activated Sepharose 4B を、上記酵素標品を含むカップリング緩衝液 (0.5M NaCl を含む 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3) 25ml に加え、25°C で 2 時間振とうした。滲集した Sepharose 4B はカップリング緩衝液でよく洗浄し、トリス-HCl 緩衝液 (0.05M, pH 8.0) 100ml に加え、再び 25°C で 2 時間振とうした。滲集した Sepharose 4B は、カップリング緩衝液でよく洗浄した後、0.5M NaCl をそれぞれ含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) および 0.1M ホ

Table 1. Immobilization of Two Thiaminases I

Enzyme	Used		Immobilized			Not immobilized	
	Total protein (mg)	Total activity (U)	Total protein* (mg)	Total activity (U)	Ratio** (%)	Total protein (mg)	Total activity (U)
T.S.B.	30	97	17.4	160	165	12.6	0
T.M.M.	30	167	9.4	122	73	20.6	60

\* Used total protein-Not immobilized total protein.

\*\* (Immobilized total activity/Used total activity)×100.

ウ酸緩衝液 (pH 8.5) 各 200ml で交互に 5 回洗浄した。次いで、この Sepharose 4B を A 緩衝液で洗浄し、それを供試固定化酵素標品として以後の実験に用いた。

#### 4. 酵素活性の測定法

酵素標品の活性測定は、村田らのヘテロピリチアミン (HPT) 改良法に準じて行った。すなわち、チアミン (1.5mM)、ピリジン (25.0mM)、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5, 37.5mM) および酵素液 (0.5ml) を含む全量 2.0ml の反応液を 50°C で 20 分間保温して反応させた後、20%メタリン酸 0.5 ml を加えて反応を停止させた。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 分間放置した。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 量を定量した。

固定化酵素標品の活性測定は、固定化酵素標品 4~6 mg を含む上記組成の基質溶液 8 ml を入れた L 字管 (内径 16mm, 長さ 90mm) を、上記条件下において、TOYO INCUBATOR TC-1 で 20 分間往復振とうして得た反応液 0.8ml に、20%メタリン酸 0.2ml を加えて反応停止液とし、これに含まれる HPT 量を測定して求めた。

なお、1 酵素単位 (U) は毎分 1 μmole の HPT を生成する酵素量と定義した。

#### 5. 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、Lowry らの方法<sup>8)</sup>に準じて定量した。固定化タンパク質量は、使用した全タンパク質量から非固定化タンパク質量を差し引くことによって求めた。

#### 6. 固定化酵素標品の反復利用性試験

チアミン (1.5mM)、ピリジン (25.0mM) およびクエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5, 75.0mM) を含む全量 40ml の基質溶液に、固定化酵素標品 40mg を加え、

37°C、20分間振とうして反応を行った。反応終了後直ちに濾過し、反応液と固定化酵素とを分離した。反応液は、酵素の活性値算出のため、その一部 (0.8ml) に 20%メタリン酸溶液 (0.2ml) を加えた後 HPT 量測定に供した。他方、濾集した固定化酵素は、前述緩衝液 20ml で洗浄した後、再び基質溶液 40ml に加えて反応を行うという方法で、計 20 回の反復利用をした。その際、得られた各回の反応液は前述の如く HPT 定量に供した。

### 実験結果および考察

#### 1. 酵素の固定化率

2 種の菌株から得られた thiaminase I の、CNBr-activated Sepharose 4B を用いての担体結合法による固定化に際して、使用した酵素および得られた固定化酵素、非固定化酵素の各標品のタンパク質量および活性量を第 1 表にまとめた。

表から明らかなおと、酵素活性の固定化率は、*B. thiaminolyticus* strain B の thiaminase I (T.S.B.) で 165%、また *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa のそれ (T.M.M.) で 73% と、いずれも非常に高い値を示した。特に T.S.B. では固定化率が 100% を超え、著しい活性の増大が認められた。T.M.M. についてもわずかながら活性の増大が認められる。すなわち、固定化率の計算法を  $(\text{Immobilized total U} / \text{Used total U}) \times 100$  から  $((\text{Used total U} - \text{Not immobilized total U}) / \text{Used total U}) \times 100$  に変えると、前者の値が後者のその 1.14 倍となるからである。これらの活性増大が、遊離酵素と固定化酵素との間の活性測定方法におけるわずかな差異 (振とうの有無) によるものとは考え難い。したがって、これらの活性増大は、酵素の固定化による (1) 酵素反応阻害因子の除去、あるいは (2) 酵素分子の立体構造や活性部位近傍の環境の変化に伴う酵素反応の活性化に起因しているものと考えられる。

#### 2. 固定化酵素標品の酵素学的諸性質

固定化酵素標品を用いて、酵素反応の至適 pH と至適温度および 1 時間の前処理における酵素の pH 安定性

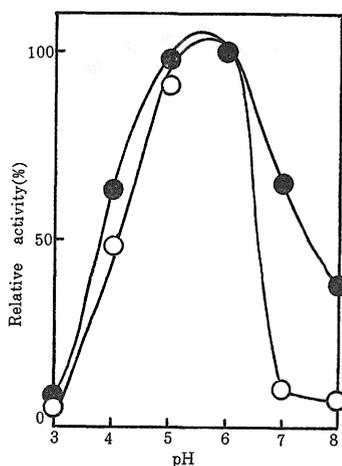


Fig. 1. Optimal pH of Enzyme Reaction.  
○—○ : T.M.M.  
●—● : Immobilized T.M.M.

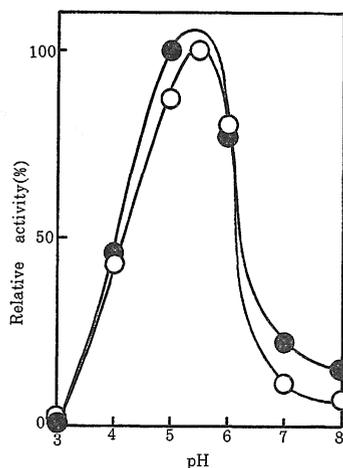


Fig. 2. Optimal pH of Enzyme Reaction.  
○—○ : T.S.B.  
●—● : Immobilized T.S.B.

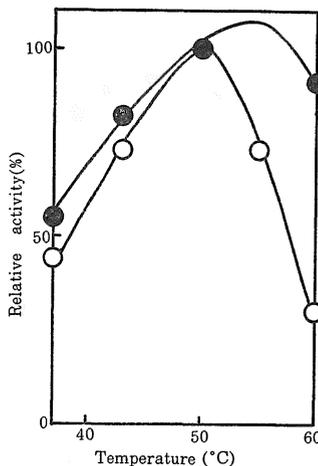


Fig. 3. Optimal Temperature of Enzyme Reaction.  
○—○ : T.M.M.  
●—● : Immobilized T.M.M.

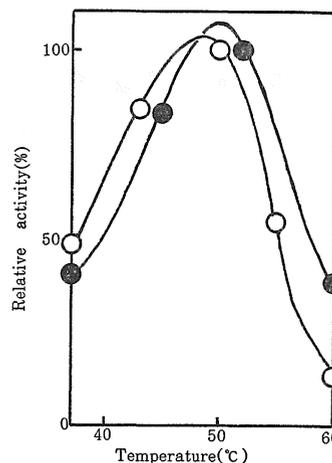


Fig. 4. Optimal Temperature of Enzyme Reaction.  
○—○ : T.S.B.  
●—● : Immobilized T.S.B.

と熱安定性について調べた結果を、対応する非固定化酵素標品のそれと共に、それぞれ第1図から第8図に示す。

酵素を固定化することによって、至適温度が若干上昇する傾向が見受けられ、固定化 T.M.M. 標品では約 5°C 上昇した。しかし、至適 pH については、固定化前後でほとんど変化が見られなかった。これに対して、酵素の安定性は、pH および熱安定性共に、固定化によってかなり増大した。特に熱安定性の増大は著しく、非固定化 T.S.B. 標品および T.M.M. 標品の活性がそれ

ぞれ約 50°C および 60°C ではほぼ完全に失われるのに対して、固定化 T.S.B. 標品および T.M.M. 標品のそれは、それぞれ約 93% および 87% 残存していた。これは、酵素の固定化によって、タンパク鎖の運動が制約され、熱による酵素分子の立体構造の乱れが防止されたためであろう。

ところで、酵素の固定化によって活性が増大したことは既に述べた。この活性の増大が、酵素反応の  $K_m$  および  $V_{max}$  のいずれにより強く反映されているかを調

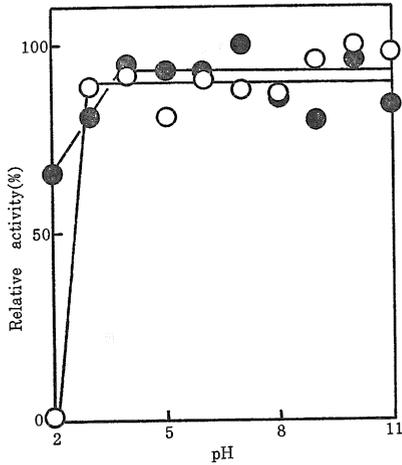


Fig. 5. pH-Stabilities of T.M.M. and Immobilized T.M.M.  
 ○—○ : T.M.M.  
 ●—● : Immobilized T.M.M.

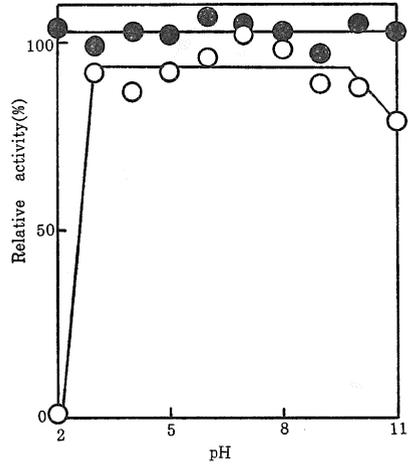


Fig. 6. pH-Stabilities of T.S.B. and Immobilized T.S.B.  
 ○—○ : T.S.B.  
 ●—● : Immobilized T.S.B.

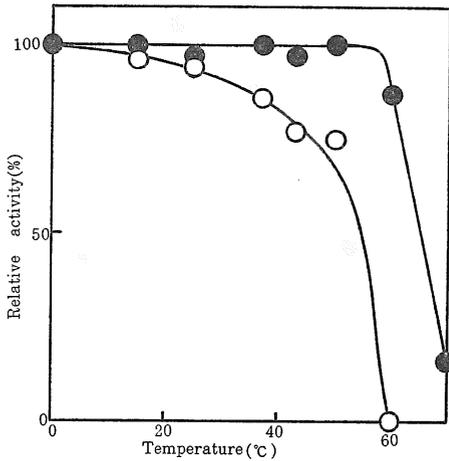


Fig. 7. Thermo-Stabilities of T.M.M. and Immobilized T.M.M.  
 ○—○ : T.M.M.  
 ●—● : Immobilized T.M.M.

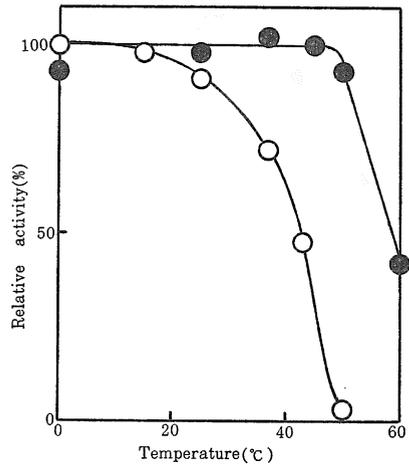


Fig. 8. Thermo-Stabilities of T.S.B. and Immobilized T.S.B.  
 ○—○ : T.S.B.  
 ●—● : Immobilized T.S.B.

べるために、酵素反応の動学的解析を試みた。T.M.M.<sup>3)</sup> および T.S.B.<sup>4)</sup> の触媒する塩基交換反応が ping pong mechanism によって進行することは既に明らかにされており、本研究における動学的解析もそれに従って行った。第2表はその結果を示したものである。これから、酵素を固定化すると、酵素反応に対して  $V_{max}$  が正の効果を、また  $K_m$  が負の効果を及ぼしていることがわかる。したがって、酵素の固定化による活性の増

大は、 $V_{max}$  の増大に起因していると考えられる。チアミンに対する  $K_m$  値が低下した固定化 T.M.M. 標品の場合でも、ピリジンに対するそれがかかなり増大しているので、基質取り込みに関しては相殺され、全体として  $V_{max}$  の増大が活性の増大に寄与していると思われる。

### 3. 固定化酵素標品の反応触媒としての利用性

#### (1) 固定化酵素標品の長期保存安定性

固定化酵素の保存性は、それを利用しようとする立場

Table 2. Kinetic Parameters for a Base-Exchange Reaction Catalyzed by Four Enzyme Preparations.

Parameter	T.M.M.	Immobilized T.M.M.	T.S.B.	Immobilized T.S.B.
$V_{max}^*$	9.5	29.2	5.0	20.5
$K_m^{**}$	Thiamine	0.2	0.7	1.3
	Pyridine	11.0	32.6	32.9

\*  $\mu\text{mol HPT}/\text{min}/\text{mg protein}$ .

\*\* mM.

からは重要な問題である。そのため、固定化酵素の長期間の保存性について、次のような条件下で調べた。1つは固定化酵素標品を固体状態のまま冷所 ( $4^\circ\text{C}$ ) に放置する方法、他は固定化酵素標品を種々の緩衝溶液中に懸濁させた状態で冷所 ( $4^\circ\text{C}$ ) に放置する方法であり、それらの結果を第3表にまとめた。前者の保存方法による固定化 T.M.M. 標品の安定性は極めて良好で、調製後315日でさえなお99%の活性が残存していた。これに対して、この方法による固定化 T.S.B. 標品の安定性はあまり良好とは言えない。後者の保存方法においては、中性付近での保存性が良いが、非固定化酵素標品の保存性がかなり良いため、極端な酸性ないし塩基性領域を除いて、固定化によってそれが向上したとは言えない。しかし、固定化 T.S.B. 標品については、前者の保存方法に比べて後者のそれが優れていると思われる。

### (2) 固定化酵素標品の反復利用性

酵素の固定化によって得られる最大の利点は、その反復利用が可能となることである。したがって、連続酵素反応時の酵素の安定性は、その触媒としての利用の可否を決定する重要な因子である。そのため、本研究でも実験方法の項で述べた方法によって、固定化酵素の反復利用時における活性の変化を調べ、その結果を第9図に示した。図から明らかのように、20回の固定化酵素の反

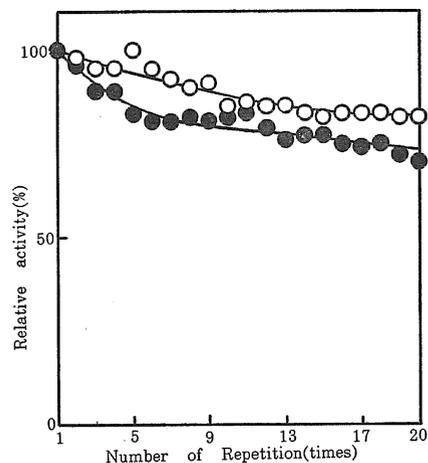


Fig. 9. The Stabilities of Immobilized Enzymes against Continuous Utilization.  
○—○ : Immobilized T.M.M.  
●—● : Immobilized T.S.B.

復利用の結果は、固定化 T.M.M. 標品で約20%の、また固定化 T.S.B. 標品で約30%の活性の低下が観察されたに止まった。したがって、いずれの酵素標品も充分その反復利用性があると判断できる。

Table 3. Storage Stabilities of Four Enzyme Preparations at  $4^\circ\text{C}$ .

State	pH	Time* (day)	Residual activity (%)			
			T.M.M.	Immobilized T.M.M.	T.S.B.	Immobilized T.S.B.
Gel	—	145	—	104	—	62
	—	315	—	99	—	47
Suspension	3	145	14	60	22	76
	5	145	112	84	82	90
	7	145	71	73	75	75
	9	145	117	74	93	88
	11	145	93	9	54	84

\* After immobilization.

以上1~3の項目の結果を総括すると、化合物合成反応の触媒としては、熱安定性、保存安定性および反復利用性の点から、固定化 T.M.M. 標品が固定化 T.S.B. 標品より優れていると考えられる。

より優っていた。

これらの結果は、固定化 T.M.M. が固定化 T.S.B. より、反応触媒としての利用性という点で、優れていることを示している。

## 要 約

*B. thiaminolyticus* の2株 (strain B 株および Matsukawa et Misawa 株) が生産するチアミナーゼ I (それぞれ, T.S.B. および T.M.M.) を CNBr-activated Sepharose 4B によって固定化し, 得られた固定化標品の酵素学的性質を調べた。

固定化 T.S.B. および T.M.M. の全活性量は, それぞれ固定前標品のその165および73%であった。また固定化によって, 至適 pH および温度がほとんど変わらなかったのに対して, pH および熱安定性はかなり増大した。pH 5.5 および 50°C におけるチアミン-ピリジン系の塩基交換酵素反応の  $V_{max}$  および  $K_m$  値は, チアミン-T.M.M. 系の  $K_m$  値を除いて, いずれも固定化によって増大した。

4°C における固定化 T.M.M. の保存性は非常に良好で, その活性が調製後315日でさえほとんど変化しなかったのに対して, 固定化 T.S.B. のそれはかなり低下した。また, バッチ法によって調べた固定化酵素標品の反復利用性も固定化 T.M.M. の方が固定化 T.S.B.

## 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, p. 220.
3. G. E. LIENHARD: Biochemistry **9**: 3011-3020, 1970.
4. 持田和男・尾添嘉久・藤田啓二・鈴木喜六: 島根大農研報 **15**: 131-137, 1981
5. 千畑一郎編: 固定化酵素, 講談社, 東京, 1980, pp.87.
6. 日本生化学会編: 生化学実験講座 **5**(下), 東京化学同人, 東京, 1975, pp.642.
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.

## Summary

The bacterial thiaminases I produced by *B. thiaminolyticus* strain B and *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa (T. S. B. and T. M. M., respectively) were immobilized by CNBr-activated Sepharose 4B, and their enzymological properties were examined.

The total activities for the immobilized T. S. B. and T. M. M. obtained were 165 and 73 percents, respectively, of those for the native preparations. Although optimal pH and optimal temperature were virtually unchanged by the immobilization, pH- and thermostabilities were considerably increased.

The kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ), determined for the base-exchange reaction between thiamine and pyridine at pH 5.5 and 50°C, showed that the immobilization resulted in appreciable increases in both  $V_{max}$  and  $K_m$  values, except for the  $K_m$  value of a thiamine-T. M. M. system.

Upon being stored at 4°C, the immobilized T. M. M. was very stable and its activity was virtually unchanged at 315 days after immobilization, whereas the immobilized T. S. B. was considerably unstable. The stability of the immobilized T. M. M. against continuous utilization, determined by a batch method, was also superior to that of the immobilized T. S. B.

These results suggest that the immobilized T. M. M. is more excellent than the immobilized T. S. B. as judged from the viewpoint of their use for catalysts.