

酵素的塩基交換反応を利用したチアミンアナログの調製

持田 和男^{*}・中村 利家^{*}・藤田 啓二^{*}

Kazuo MOCHIDA, Toshiie NAKAMURA and Keiji FUJITA
Enzymic Preparation of Thiamine Analogues by the
Utilization of a Base-Exchange Reaction

緒 言

チアミンは主要な生体内化学反応に対する必須の補酵素成分である。その生物活性に着目した多数のチアミンアナログが合成され、医薬や動物薬として実用化されたものも少ない¹⁾。またチアミンの生理的意義はその補酵素作用のみでは説明しえない。例えばニューロン間の神経伝達にもチアミンが重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。したがって、チアミンアナログの中には様々な機能を発現する有用なものが含まれている可能性がある。

著者らは既にこのチアミンを塩基交換反応によって分解するチアミナーゼ I (thiaminase I, EC 2.5.1.2) について、新たな産生菌を見出すと共にその酵素学的性質や固定化酵素の調製法を報告した²⁾。本酵素の特徴は基質特異性が広いことで、交換塩基として芳香族アミン類、ヘテロ環アミン類、SH 化合物など多岐にわたる化合物を利用できる。それ故、反応生成物である (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル) メチル誘導体 (Pm 誘導体) の種類もまた豊富となる。したがって、種々のチアミンアナログの簡便な調製法として本酵素反応の利用が可能で、その場合固定化酵素の使用は再利用が可能という点で有利である。

本研究では、非固定化あるいは固定化チアミナーゼ I を利用して 10 種類の Pm 誘導体を調製したので報告する。なおチアミンアナログの有効な利用法を検索するために行った単離化合物の生物活性については、別途報告の予定である。

実験材料および方法

1. 材料

使用菌株は、平板希釈法によって宍道湖干潟土壌より

* 生物汚染化学研究室

分離した *Bacillus thiaminolyticus* strain B²⁾ を用いた。

酵素固定用担体である CNBr-activated Sepharose 4B は、Pharmacia 社の製品を使用した。反応基質であるチアミンおよび交換塩基類はいずれも和光純薬製品を用いた。

2. 酵素の調製²⁾

B. thiaminolyticus strain B をペプトン液体培地 (ペプトン 1%, 肉エキス 1% および NaCl 0.5%) に接種し、37°C、168 時間培養した後、冷却下 (0°C) で遠心分離 (7,000rpm, 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添加 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。この溶液を大量の同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³⁾

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 NaHCO₃ 溶液, pH 8.3) 25ml に加え、25°C で 2 時間振とうした。濾集した 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。濾集した Sepharose 4B は、カップリング緩衝液でよく洗浄した後、0.5M NaCl 添加 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) および 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 各 200ml で交互に 5 回洗浄した。次いで 1mM 2-メルカプトエタノール添加 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄し、これを固定化酵素標品とした。

4. 酵素活性の測定法³⁾

非固定化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。固定化酵素

標品の活性測定は、固定化酵素標品 4~6mg を用いて上記 HPT 改良法により行った。

なお、1 酵素単位 (U) は毎分 1 μ mole 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 らの方法に準じて定量した。固定化酵素標品のタンパク質量は、固定化に際して用いた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. チアミンの定量

単離チアミンアナログ中のチアミン含量は、BrCN を用いたチオクロム法および *Lactobacillus furmentum* IFO3071 株を用いた生物検定法によって測定した。

7. チアミンアナログの調製法

(1) 非固定化酵素標品による調製

1) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル チオフェノール (Pm-チオフェノール)

チアミン塩酸塩 2.02g とチオフェノール 1.32g を水 150ml に加え、窒素ガス気流中 10% NaOH 溶液で pH を 5.5 に調整した後非固定化酵素標品 (比活性²) 1 ml (Total U 50) を添加し、37°C で 48 時間静置反応させた。反応後 NaCl 30g を加え、10% NaOH 溶液で pH を 8 に調整した後室温に放置した。生成した Pm-チオフェノールの沈殿を濾集し、水から再結晶した。

2) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル *o*-アミノチオフェノール (Pm-*o*-アミノチオフェノール)

チアミン塩酸塩 2.02g と *o*-アミノチオフェノール 2.26g を水 100ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を 5.5 に調整した後非固定化酵素標品 1ml を添加し、37°C で 48 時間反応させた。反応後生じた沈殿 (Pm-*o*-アミノチオフェノールと *o*-アミノチオフェノールの混合物) を濾集した。この沈殿は乾燥後ベンゼン 30ml に懸濁し、可溶性の *o*-アミノチオフェノールを除去した。一方先の濾液は 100°C、10 時間の加熱処理による除蛋白後、NaCl 10g と 10% NaOH 溶液 10ml を加えて放置した。生じた Pm-*o*-アミノチオフェノールの沈殿を濾集し、先のベンゼン処理沈殿と併せ、水から再結晶した。

3) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル チオ安息香酸 (Pm-チオ安息香酸)

チアミン塩酸塩 2.02g とチオ安息香酸 2.49g を水 100ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を 5.5 に調整した後非固定化酵素標品 1ml を添加し、37°C で 48 時間反応させた。反応後生じた Pm-チオ安息香酸の沈殿を濾

集し、水から再結晶した。

4) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル システイン (Pm-システイン)

チアミン塩酸塩 2.02g とシステイン塩酸塩 4.20g を水 100ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を 5.5 に調整した後非固定化酵素標品 2.43ml (Total U 122) を添加し、37°C で 48 時間反応させた。反応後生じた沈殿 (シスチン) を除去し、次いで 100°C、10 時間の加熱処理をして除蛋白した。濾液を pH 7 に調整した後 *n*-BuOH 50ml で 3 回抽出操作を行ってチアゾールを除去した。水層は約 3ml まで減圧濃縮した後、0.02M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) で平衡化した CM-セルロースカラム (ϕ 2 \times 40cm) に充填した。水 100ml で洗浄した後、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) で溶出 (分取量: 10g/tube) した。各画分はペーパークロマトグラフィー (東洋濾紙 No. 50, *n*-BuOH/MeOH/H₂O (2/1/1, v/v/v)) にかけた後、該当画分 ($R_f=0.32$) を集めた。これを約 5ml まで減圧濃縮し、一夜室温に放置後生じた Pm-システインの沈殿を濾集した。

(2) 固定化酵素標品による調製

1) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル ピリジン, (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル α -ピコリンおよび (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル ピペリジン (Pm-ピリジン, Pm- α -ピコリンおよび Pm-ピペリジン)

チアミン塩酸塩 2.02g と、ピリジン 4.75g または α -ピコリン 2.79g あるいはピペリジン 2.55g を水 100ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を 5.5 に調整した後固定化酵素標品 (比活性⁹) 100mg (Total U 23) を添加し、37°C で 48 時間振とう反応させた。反応後、固定化酵素標品を濾別し、濾液は 1N HCl 溶液 20ml を加えて酸性にした後シロップ状となるまで減圧濃縮した。これに EtOH 30ml を加えて一夜放置後生じた Pm-ピリジンまたは Pm- α -ピコリンあるいは Pm-ピペリジンの沈殿を濾集した。

2) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル アニリン (Pm-アニリン)

チアミン塩酸塩 4.05g とアニリン 11.18g を 0.15M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5) 700ml に加えた後、固定化酵素標品 200mg (Total U 46) を添加し、37°C で 72 時間振とう反応させた。反応後固定化酵素標品を濾別し、濾液を約 300ml まで減圧濃縮した。これに NaCl 60g を添加し、10% NaOH 溶液で pH を 8 に調整した後室温に放置した。生じた Pm-アニリンの沈殿を濾集し、水から再結晶した。

Table 1. Structure and yield of thiamine analogues isolated.

Thiamine analogue	Structure	Yield	
		g	%
Pm*-thiophenol		0.85	61
Pm-o-aminothiophenol		0.61	41
Pm-thiobenzoic acid		1.16	75
Pm-aniline		1.62	64
Pm-nicotinamide		0.28	18
Pm-pyridine		0.78	48
Pm-cysteine		0.19	13
Pm-quinoline		0.42	22
Pm-α-pycoline		1.40	82
Pm-piperidine		0.65	42

* Pm- : (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl) methyl =

3) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル キノリン (Pm-キノリン)

チアミン塩酸塩 2.02g とキノリン 1.20g を水 200ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を5.5に調整した後、固定化酵素標品 200mg を添加し37°Cで72時間振とう反応させた。反応後固定化酵素標品を濾別し、濾液は1N HCl 溶液 10ml を加え酸性とした後、約 15ml まで減圧濃縮し、EtOH 30ml を加えた。室温に放置後、生じた沈殿を濾集した。得られた沈殿を少量の水に溶解した後、10% NaOH 溶液 10ml を加え室温に放置した。生じたガム状の沈殿を濾集し水で洗浄した後、30% MeOH 水溶液 10ml に加えスパチュラでよく攪拌し結晶化させた。これを濾集し、1N HCl 溶液 10ml に溶解した後減圧濃縮した。これに EtOH 20ml を加え一夜室温に放置後、生じた Pm-キノリンの沈殿を濾集した。

4) (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル ニコチンアミド (Pm-ニコチンアミド)

チアミン 2.02g とニコチンアミド 2.20g を水 100ml に加え、10% NaOH 溶液で pH を5.5に調整した後固定化酵素標品 100ml を添加し、37°Cで48時間振とう反応させた。反応後固定化酵素標品を濾別し、濾液は約20

ml まで減圧濃縮した。これに NH₄HCO₃ 1g を加えアルカリ性にした後、シロップ状となるまで再び減圧濃縮した。EtOH 20ml を加え一夜放置後生じた沈殿を濾集し、少量の水に溶解した後 Amberlite IRC-50 カラム (径 2.5×40cm) に充填した。約 300ml の水で洗浄した後、0.025N HCl 溶液 500ml で溶出(分取量: 10g/tube) した。各画分は前述のペーパークロマトグラフィーにかけた後、該当画分 (R_f=0.39) を集めた。これを約 5ml まで減圧濃縮し、一夜放置後生じたPm-ニコチンアミドの沈殿を濾集した。

実験結果および考察

チアミナーゼ I の塩基交換反応によって得られた10種類の(2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル誘導体(Pm 誘導体)の構造と収量および収率を第1表に示した。Pm-チオフェノール、Pm-o-アミノチオフェノールおよび Pm-チオ安息香酸は、水溶解性が低く反応の進行と共に沈殿として析出するため、また Pm-システインは副反応物であるシスチンが沈殿するため、いずれも固定化酵素標品の使用が困難で非固定化酵素標品を用いて調製した。Pm-ニコチンアミド、Pm-システインおよび Pm-キノリンを除けば、いずれも40%以上の収

Table 2. Mp and R_f values of thiamine analogues isolated.

Thiamine analogue	Mp (°C)		R _f ^{*1}
	Obsd.	Lit.	
Pm-thiophenol	147-148	—	0.86
Pm- <i>o</i> -aminothiophenol	123-125	—	0.78
Pm-thiobenzoic acid	149-151	—	0.87
Pm-aniline	167-169	167-169 ^{*2}	0.81
Pm-nicotinamide	216-218	192-193 ^{*3}	0.39
Pm-pyridine	252-253	248-253 ^{*3}	0.48
Pm-cysteine	220-222	220 ^{*4}	0.32
Pm-quinoline	260-262	260-262 ^{*2}	0.56
Pm- α -pycoline	234-236	—	0.51
Pm-piperidine	225-226	—	0.52

*1 Paper : Toyo No. 50, solvent : *n*-BuOH/MeOH/H₂O (2/1/1, v/v/v).

*2 From Ref. 8.

*3 From Ref. 9.

*4 From Ref. 10.

率が得られた。低収率化合物のうち、前二者は簡便な分離精製法が見出せずカラムクロマトグラフィーを、また後者はガム状産物として得られたためその結晶化操作をそれぞれ必要とした。ペーパークロマトグラフィーによって確認した反応の進行度は、いずれの化合物もほぼ完全であった。したがって、それらの操作が収率低下を招いたものと思われ、改良の余地がある。

これら10種類の単離化合物の融点およびペーパークロマトグラフィーにおける R_f 値を第2表に示した。いずれの化合物も、Dragendorff 試薬、Ninhydrin 試薬および紫外線照射 (254nm) による検出法でペーパークロマトグラフ的に単一であることを確認した。ピリミジン環とベンゼン環が -CH₂-S- や -CH₂-N- で結合している化合物 (Pm-チオフェノール, Pm-*o*-アミノ

チオフェノール, Pm-安息香酸および Pm-アニリン) の R_f 値 (0.78~0.91) は比較的高く、疎水性が強い。事実これらの化合物はいずれも有機溶媒によく溶け、水には難溶であった。そのため、これらの化合物は水から再結晶することが可能であった。他方、これら4種と Pm-システインを除いたチアミンアナログはいずれも水に易溶であったので、塩酸塩として結晶化した。これら水溶性のチアミンアナログの融点は疎水性のそれらに比べかなり高い値を示した。Pm-システインは他のアナログと異なり、有機溶媒にも水にもほとんど溶解せず、酸あるいはアルカリ溶液にのみ可溶であった。文献⁸⁾ 既知の化合物のうち、Pm-アニリン⁹⁾、Pm-ピリジン⁹⁾、Pm-キノリン¹⁰⁾ および Pm-システインの融点は文献値⁸⁾ と比較的良好一致したが、Pm-ニコチンアミドのそれは

Table 3. Thiamine content in thiamine analogues isolated.

Thiamine analogue	Thiamine content (%)	
	Thiochrome method	Bioassay method
Pm-thiophenol	0.0	0.0
Pm- <i>o</i> -aminothiophenol	0.0	0.0
Pm-thiobenzoic acid	0.0	0.0
Pm-aniline	0.0	0.0
Pm-nicotinamide	0.0	0.0
Pm-pyridine	0.4	0.0
Pm-cysteine	0.8	0.0
Pm-quinoline	0.9	0.0
Pm- α -pycoline	12.0	1.8
Pm-piperidine	84.0	23.8

文献値よりかなり高い値を示した。遊離型 Pm-ニコチンアミドの融点は179-181°Cであり、塩酸塩であるか否かによって約35°Cの差を示した。したがって、不完全な塩形成は融点降下を招くと思われ、文献値に疑問が持たれる。

第3表に単離チアミンアナログ中のチアミン含量を示した。チアミンの化学的定量法であるチオクロム法と *L. furmentum* の資化性を利用した生物検定法で測定したものである。前者はチアミンアナログがチアミン同様に酸化されチオクロム様化合物を形成する場合に、また後者はチアミンアナログが資化される場合に、正確な値を示さない欠点を持つ。両者によるチアミン含量の定量結果は、いずれの場合も生物検定法の値がチオクロム法のそれより小さく、かつ Pm-ピペリジンを除く他のチアミンアナログにチアミンがほとんど含有されていないことを示している。異常に高いチアミン含量を示した Pm-ピペリジンの場合は、融点がチアミンのそれ (248°C) よりかなり低いことや紫外部の吸収波形がチアミンのそれとかなり異なることから考えて、むしろ両定量法の妨害が起った可能性が高い。

なお、Pm 誘導体の簡便な調製法として試みた本酵素的調製法は、水可溶性の基質に対してのみ利用できるものである。水不溶性の基質の場合には、溶解度をあげるために有機溶媒の添加が必要となるが、本酵素の有機溶媒に対する耐性は低い。したがって、この点の改善がより広範なチアミンアナログを調製するための鍵となると思われ、現在継続検討中である。

要 約

チアミンアナログの酵素的調製法を検討した。チアミンナーゼ I はチアミンのチアゾール部をアニリン、ピリジン、システイン等と交換し、2-ヒドロキシアルキル

-4-メチル-5-β-ヒドロキシエチルチアゾールを遊離する反応を触媒する。10種類の(2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)メチル誘導体(Pm 誘導体)が非固定化あるいは Sepharose 4B 固定化チアミンナーゼ I の塩基交換反応を利用することによって調製された。単離された Pm 誘導体は Pm-チオフェノール、Pm-*o*-アミノチオフェノール、Pm-チオ安息香酸、Pm-アニリン、Pm-ピリジン、Pm-α-ピコリン、Pm-ニコチンアミド、Pm-キノリン、Pm-ピペリジンおよび Pm-システインである。これら化合物の物理化学的性質を調べた。

引用文献

1. 日本ビタミン学会編：ビタミン学 II，東京化学同人，東京，1980，pp. 3.
2. 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.
3. 持田和男・藤田啓二・尾添嘉久・鈴木喜六：島根大農研報 16：177-182，1982.
4. 江幡淳子・村田希久：ビタミン 18：497-501，1959.
5. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
6. 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書第2巻，産業図書，東京，1965，p. 579-585.
7. 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書第1巻，産業図書，東京，1969，p. 387-403.
8. 長谷川栄一・上田潔：生化学 25：81-84，1953.
9. 松川泰三・万木庄次郎：薬学雑誌 71：1423-1427，1951.
10. K. MURATA, S. HASE, H. Ikehata and S. MITANI: J. Vitaminology 7: 141-149, 1961.

Summary

The enzymic preparation of thiamine analogues was examined. Thiaminase I catalyzes an exchange reaction of the thiazole moiety of thiamine with aniline, pyridine, cysteine etc., liberating 2-hydroxyalkyl-4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole. Ten kinds of (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl)methyl derivatives (Pm derivatives) were prepared by the utilization of the base-exchange reaction of free or Sepharose 4B-immobilized thiaminase I. Pm derivatives isolated were Pm-thiophenol, Pm-*o*-aminothiophenol, Pm-benzoic acid, Pm-aniline, Pm-pyridine, Pm-α-pycoline, Pm-nicotinamide, Pm-quinoline, Pm-pyperidine, and Pm-cysteine. The physicochemical parameters of these compounds were determined.