

固定化チアミナーゼ I を利用したチアミンおよび そのリン酸エステル類の自動定量法

持田 和男*・中村 利家*・藤田 啓二*

Kazuo MOCHIDA, Toshiie NAKAMURA and Keiji FUJITA
Automatic Determination of Thiamine and Its Phosphates
by the Use of Immobilized Thiaminase I

緒 言

チアミナーゼ I (Thiaminase I, EC 2.5.1.2) は、チアミンのチアゾール部と他の適当な塩基との交換反応を触媒し、(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) を生成する。著者らは先にこのチアミナーゼ I の固定化標品を用いた Pm 誘導体の調製法について報告した²⁾。固定化酵素は、かかる反応触媒としての利用の他に、各種化合物の自動定量法にも利用可能である。

生体内のチアミンは、遊離型の他にリン酸エステル型として存在する。中でもチアミンピロリン酸は総チアミン量の大部分を占め、補酵素として主要な生体内化学反応に関与している。これらチアミンの定量法は、遊離型チアミンの定量を基本とし、リン酸エステル型チアミンはタカジアスターゼなどによるリン酸基の切断後、遊離型チアミンとして測定されるが、長時間を要する⁴⁾。

著者らはチアミナーゼ I が塩基交換反応によってチアミンのみならずそのリン酸エステル類をも分解すること、およびピリジンとの塩基交換産物ヘテロピリチアミン (HPT) の酸化物ヘテロピリクロームが強い蛍光を発することに注目し、これを利用したチアミンおよびそのリン酸エステル類の定量法を開発すると共に、固定化チアミナーゼ I を利用することによって、その定量法の自動化を計ることを考えた。

本研究では、固定化チアミナーゼ I の利用に関する研究の一環として、研究室でごく一般的に所有されている装置を用いた簡便なチアミンの自動定量法について報告する。

実験材料および方法

1. 材料

酵素源としての菌株は、よく知られている *Bacillus thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa および著者らの単離した *Bacillus thiaminolyticus* strain B⁵⁾ 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やそのリン酸エステル類、交換塩基であるピリジンおよびその他の試薬はいずれも和光純薬製品を用いた。

2. 酵素の調製⁶⁾

B. thiaminolyticus Matukawa et Misawa 株および strain B 株をペプトン液体培地 (ペプトン 1%, 肉エキス 1%, NaCl 0.5%) で 37°C, 168 時間培養してえた上澄液に、80% 飽和量の硫酸を加え、その沈殿画分を少量の水に溶解した後 1mM 2-メルカプトエタノール添加リン酸緩衝液 (0.02M, pH 6.8) に対して透析したものを固定化用チアミナーゼ (それぞれ、TMM および TSB と略す) とした。

3. 固定化酵素の調製⁶⁾

TMM および TSB を含むカップリング緩衝液 (0.5 M NaCl 添加 0.1M NH₄HCO₃ 溶液, pH 8.3) を、粉末 1g から調製した膨潤 CNBr-activated Sepharose 4B と共に、25°C で 2 時間振とうすることによって、固定化チアミナーゼ I 標品 (それぞれ、Sepharose 4B-TMM および Sepharose 4B-TSB と略す) を調製した。

* 生物汚染化学研究室

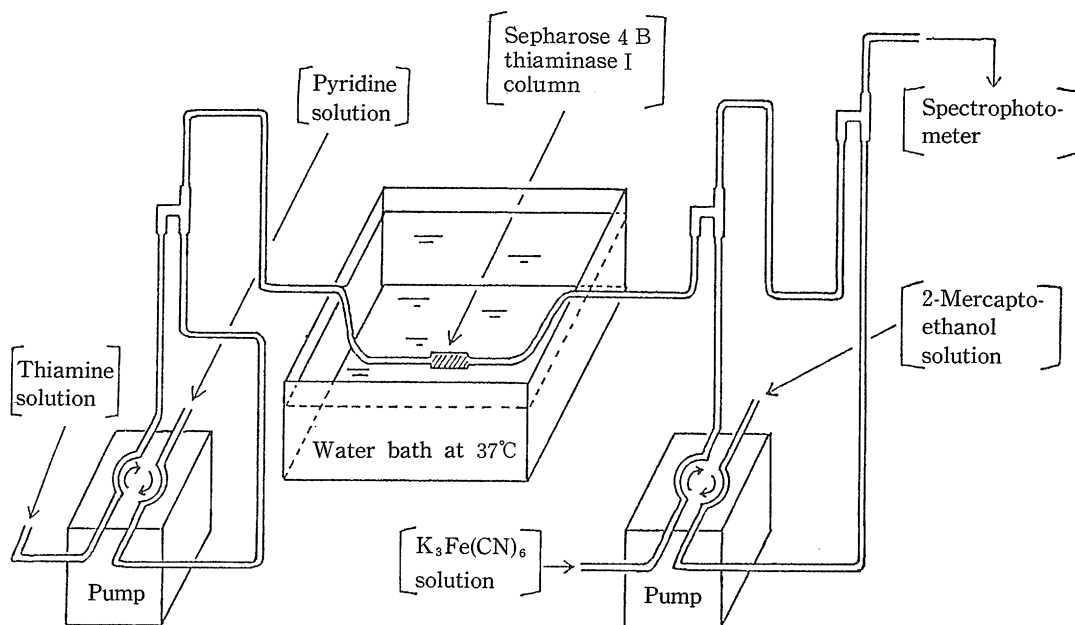


Fig. 1. Apparatus for the automatic determination of thiamine.

4. 固定化チアミナーゼ I によるチアミンリン酸エステル類の分解試験

3mM のチアミン、チアミンモノリン酸 (TMP) またはチアミンピロリン酸 (TPP) 水溶液 2ml, 100mM ピリジン水溶液 (pH 5.5) 2ml および 0.15M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5) 4ml からなる混合溶液に、固定化酵素標品 50mg を添加し、50°C で 20 分間振とう反応した。反応終了後、その 0.8ml を取り 20% メタリン酸溶液 0.2ml を加えた後、村田らの HPT 定量法の手順に従って、吸光度 (386nm) または蛍光強度 (励起光 410nm, 発光 480nm) を測定した。

5. チアミン自動定量装置

チアミンおよびそのリン酸エステル類の自動定量装置の概略を第 1 図に示した。シリコンチューブ (内径 1mm, 外径 3mm) で接続した各区間の距離は、チアミン (またはピリジン) 溶液から三方接続器までが 50cm, 三方接続器から固定化酵素カラムまでが 150cm, 固定化酵素カラムから三方接続器までが 40cm, 赤血塩溶液から三方接続器までが 130cm, 三方接続器から次の三方接続器までが 160cm, 2-メルカプトエタノール溶液から三方接続器までが 70cm および 三方接続器から測定装置までが 40cm である。

測定装置は島津分光光度計 UV-120-20 および日立分光光度計 650-10 S を用いた。また使用したポンプは、

東京理化機械製マイクロチューブポンプ MP-3 で、目盛はいずれも 2 に調整した。この時の最終流速は 1.5ml/min であった。

実験結果および考察

本研究のチアミン自動定量装置の測定原理は、チアミン (水溶液) を大過剰のピリジン (100mM, 0.15M クエン酸-リン酸緩衝液 pH 5.5) と共に、37°C の恒温水槽に浸した Sepharose 4B 固定化チアミナーゼ I カラム (φ0.4×5cm, 両端に海砂を充填) を通過せしめて HPT に変換した後、アルカリ性赤血塩 (1% 赤血塩 - 20% NaOH (2/3, v/v)) で酸化してヘテロピリクロームにし、それを分光光度計 (386nm) または蛍光光度計 (励起光 410nm, 発光 480nm) で測定することである。その際、過剰の赤血塩は 2-メルカプトエタノール (1% 水溶液) で分解した。赤血塩分解剤として通常用いられる H₂O₂ は気泡を生じるため使用できなかった。

Sepharose 4B-TMM 100mg を充填したカラムを用い、フローセルを装備した蛍光光度計で 5μM のチアミンを測定した際のチャートを第 2 図に示した。図中に見られる小さな鋸歯状の波はマイクロチューブポンプの脈流のために生じたものであり、中央部のやや大きな波はチアミン溶液を洗浄用水溶液に切り換えたために生じたものである。この図における高さがチアミン濃度の関数

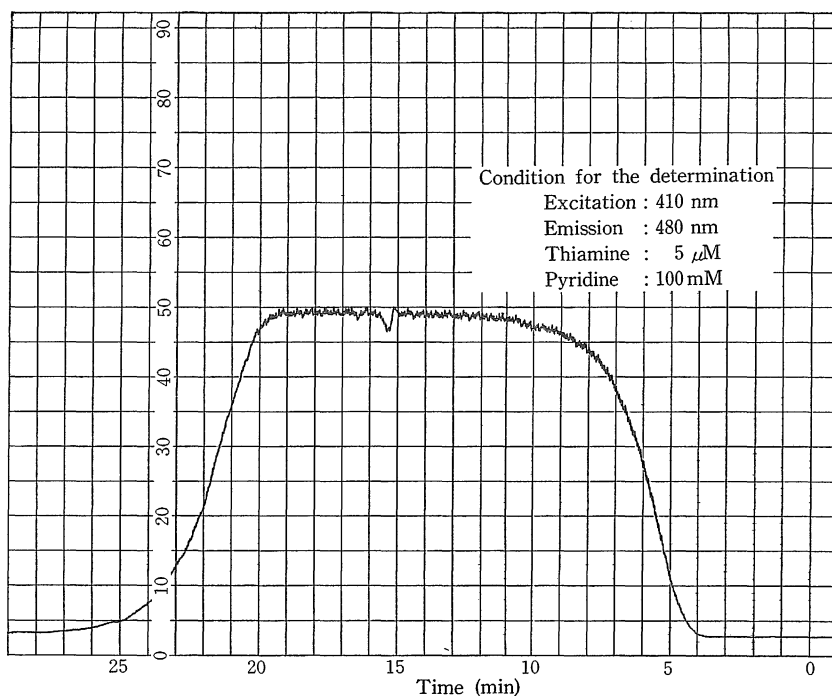


Fig. 2. Fluorescent intensity chart.

となる。このようにして測定して得た相対蛍光強度と注入チアミン濃度との関係を第3図に示した。同様に分光々度計を用い、386nmの吸光度と注入チアミン濃度との関係を示したのが、第4図である。両測定法ともに、よい直線関係が得られた。チアミンの定量限界濃度は、蛍光々度法で 1μ M、可視部吸光々度法で 100μ M 程度であり、前者が約100倍秀れていた。

ところで、生体内におけるチアミンの大部分は補酵素として TPP の形で存在し、一部が遊離型チアミン、TMP およびチアミントリリン酸 (TTP) として存在すると言われている³⁾。したがって、本装置がこれらチアミントリリン酸エステル類の定量法としても使用可能であ

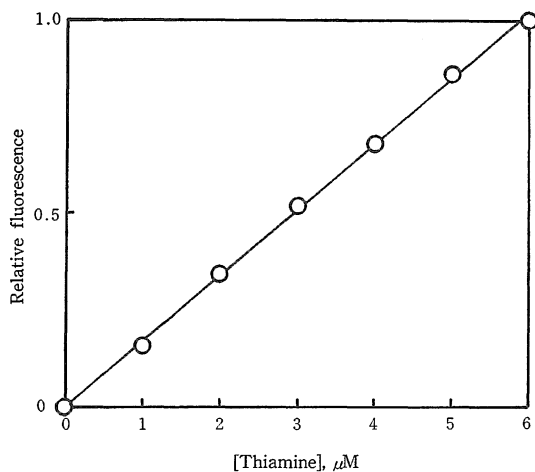


Fig. 3. Plot of relative fluorescence vs. the concentration of thiamine.

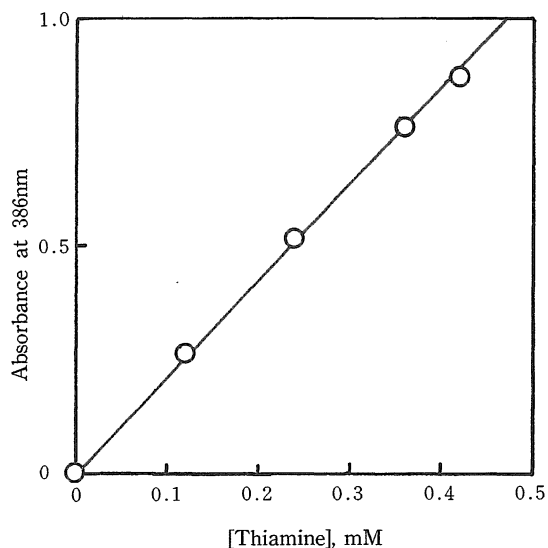


Fig. 4. Plot of the absorbance at 386 nm vs. the concentration of thiamine.

Table 1. Relative reactivities of thiamine, TMP, and TPP by the Sepharose 4B-immobilized thiaminase I.

Enzyme used ^{*1}	Relative reactivity (%)					
	Visible spectrum ^{*2}			Fluorescent spectrum ^{*3}		
	Thiamine	TMP	TPP	Thiamine	TMP	TPP
TMM ^{*4}	100	101	100	100	100	97
T S B ^{*5}	100	100	100	100	97	99

*1 50 mg

*2 386 nm

*3 Excitation : 410 nm, emission : 480 nm

*4 From *Bacillus thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa*5 From *Bacillus thiaminolyticus* strain B

ば、より有用な定量装置になるものと思われる。そこで、入手のできなかつた TTP を除く他のチアミンリン酸エステル類について、その固定化チアミナーゼ I との反応性を調べ、第 1 表に示した結果をえた。吸光々度法および蛍光々度法のいずれにおいても、HPT の生成が確認できた。しかも、その生成量は実験誤差の範囲内でチアミンから得られたそれと差がなく、固定化酵素の種類によっても変化しなかつた。恐らく TTP も同様にチアミナーゼ I の基質となり得ると考えられるので、本装置は生体内の総チアミン量の測定に適用可能であろうと思われる。

手近にある装置を用いて、簡便なチアミンおよびそのリン酸エステル類の自動定量法を開発するのが本研究の目的であった。ここでは autosampler を使用しなかつたので半自動定量法となったが、それを使用すれば当初の目的を充分果たし得るものとする。本定量法の特徴は、チアミンおよびそのリン酸エステル類いずれも同じ HPT を生成することであり、反応を完全に進行させておけば検量線が 1 本で済むところにある。したがって、本装置は総チアミン量の測定には最も適しているものと考えられる。

要 約

固定化チアミナーゼ I を用いたチアミンおよびそのリ

ン酸エステル類の自動定量法を検討した。

チアミナーゼ I はチアミンおよびそのリン酸エステル類とピリジンとの塩基交換反応を触媒し、いずれもヘテロピリチアン (HPT) を生成した。チアミンおよびそのリン酸エステル類は、この HPT を自動的に分析することによって定量できた。このシステムは総チアミン量の定量に適していると考えられた。

引 用 文 献

1. K. MURATA: Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine, ed. by N. SHIMAZONO and E. KATSURA, Igaku Shoin, Tokyo, 1965, pp. 220.
2. 持田和男・中村利家・藤田啓二: 島根大農研報 18: 188-192, 1984.
3. 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.
4. 糸川嘉則: ビタミン 56: 543-551, 1982.
5. 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.
6. 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.
7. 江幡淳子・村田希久: ビタミン 18: 497-501, 1959.

Summary

An automatic method for the determination of thiamine and its phosphates by the application of immobilized thiaminase I was examined.

Thiaminase I catalyzed the base-exchange reaction of the thiamine phosphates as well as thiamine with pyridine, forming heteropyrithiamine (HPT). The contents of thiamine and its phosphates were determined by automatically analyzing HPT formed by the enzyme reaction. It was considered that this system was suitable for the determination of total thiamine.