

氏 名	鈴 木 喜 六 すず き き ろく
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 479 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	<i>Bacillus thiaminolyticus</i> のチアミナーゼ I の可逆的不活性化反応に関する研究

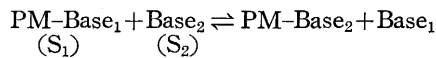
(主 査)
論文調査委員 教 授 小野寺幸之進 教 授 緒方浩一 教 授 廣海啓太郎

論 文 内 容 の 要 旨

チアミナーゼ I はチアミンと他の塩基との間の塩基交換反応を触媒する酵素である。本論文は *Bacillus thiaminolyticus* の産生するこの酵素について、その塩基交換反応の機構や生化学的意義を追究し、論考した結果をまとめたものである。

この研究では *B. thiaminolyticus* YUSM 1001 株を用い、酵素液としては、培養上澄液から硫酸分画、透析して濃縮したものを供試した。酵素活性の測定はヘテロピリチアミン (HPT) 法の一変法による。

1. この酵素が触媒する



[PM-: (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl) methyl]

の反応で、酵素液を13種類のチアミン関連物質 (S₁) とピリジン (S₂) とともに、1時間、37°C で保温し、酵素活性を測定すると、S₁ となる化合物のすべてによって活性が80~87%低下した。しかし他の化合物ではこの低下は起らなかった。活性の低下した酵素液を1 mM のメルカプトエタノールに対して透析し、チアミンを除いた後、1時間、37°C で保温すると活性が大部分回復した。これは S₁ による酵素の不活性化が可逆的であることを示唆する。一方また、ピリジン (S₂) も活性の変化に関連することがわかった。そこで酵素を種々の濃度のピリジンおよび HPT とともに保温し、活性の変化をしらべた結果、次のことが明らかとなった。

(1)ピリジンは HPT による活性の低下を抑制する。(2)ピリジンは活性の低下した酵素の活性を回復させる。(3)HPT はピリジンによる活性の回復を抑制する。(4)各基質が高濃度 (HPT で1 mM, ピリジンで10 mM) のときは、互いに他の基質の効果を完全に抑制する。(5)酵素活性測定液中ではチアミンとピリジンとが普通、高濃度で共存するため、活性化も不活性化も起らない。

供試した限りのすべての S₂ 化合物 (芳香族アミン, N-複素環化合物, SH化合物など) で、ピリジン

と同じ効果が見られた。このことから、*B. thiaminolyticus* のチアミナーゼ I には活性型（または高活性型）と不活性型（または低活性型）とが存在し、相互に転換することが明らかとなった。

なお、 S_1 による不活性化と、 S_2 による活性化の条件を検討して、それぞれの反応の温度条件、至適 pH および反応次数を明らかにした。

2. HPT とアニリン (Base_2) とを基質とし、反応によって生成する PM- Base_2 を定量して酵素反応の初速度を測定した。HPT 濃度の逆数に対して、4 種類の定濃度のアニリン共存下で測定した初速度の逆数をプロットすると、平行直線群が得られた。したがって、この酵素反応は Ping Pong Bi Bi mechanism であり、中間体として S_1 の PM 部分が酵素に転移された PM-enzyme が生成するものと推定される。

3. 種々の濃度の S_1 と酵素液とを反応 (pH 6.5, 30°C) させ、不活性化の初速度 (v) を測定し、 $1/v$ を $1/s_1$ に対してプロットすると直線が得られた。これから $V_{\max}/2$ を与える S_1 濃度を決定した。また、1 mM の HPT による不活性化速度に対して、共存するピリジンの影響をしらべ、その結果から、不活性化反応は PM-enzyme を経由して進行することを示唆している。

一方、不活性化された酵素液を用いて活性化の初速度 (v) を測定した。活性化には S_2 が不可欠であり、 $1/v$ を $1/s_2$ に対してプロットすると直線が得られた。これから 10 mM (飽和濃度) のピリジンの活性化速度に対しての共存する HPT の影響を明らかにした。そして不活性化反応の解析から、不活性型は PM 結合型として生成されると推定した。なお、不活性型にも活性型と同じく二つの型 (PM 結合型と非結合型) が存在し、この低活性型が塩基交換反応を触媒する能力をもつと結論した。これらの結果に基づいて、チアミナーゼ I の可逆的不活性化反応の機構の模式図を提出している。

4. さらに、この酵素の生化学的意義を明らかにする実験を行ない、チアミナーゼ I では、低活性型がこの酵素の本態で、その機能としては、菌体へのチアミンの取り込み過程に関与する可能性があることを指摘している。

論文審査の結果の要旨

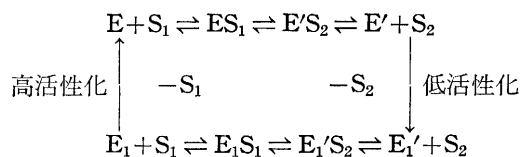
チアミナーゼ I はチアミンを第 1 基質 (S_1) とし、他の塩基 (第 2 基質, S_2) との間の塩基交換反応を触媒する酵素で、約 30 年前にその存在が明らかにされた。生物界におけるこの酵素の分布については多くの研究が報告され、部分的精製酵素液も得られていたが、生化学的意義については明らかでなかった。

著者は *B. thiaminolyticus* の産生するチアミナーゼ I について実験中、この酵素を S_1 のみと保温すると、酵素活性が著しく低下するという現象を見いだした。そこで、その反応を追究し、この活性の変動に対する S_1 と S_2 との作用を詳細にしらべ、次のような知見を得た。

(1) この酵素には活性が異なる二つの型が存在し、それらは相互に可逆的に変化する。(2) 活性型酵素によって触媒される反応は Ping Pong Bi Bi mechanism である。(3) 活性型酵素はチアミンとの保温により不活性型に変わり、その活性化には S_2 を必要とする。(4) *B. thiaminolyticus* の菌体には不活性型（または低活性型）酵素が存在し、それは活性型に先立って出現する。(5) チアミナーゼ I の産生は培地チアミン量によって著しく影響される。(6) チアミナーゼ I はチアミンの生合成には関与しない。

著者はこれらの知見に基づき、チアミナーゼ I の可逆的不活性化について、次の反応機構を提出した。

酵素反応（高活性型）



酵素反応（低活性型）

E: 高活性型酵素, E₁: 低活性型酵素

E', E₁': 両酵素の PM 結合型

このように本研究は *B. thiaminolyticus* のチアミナーゼ I について、基質による可逆的不活性化反応という極めて特異な現象を発見し、その反応機構や生化学的意義を明らかにしたもので、生化学や酵素化学の分野に貢献するところが多い。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。