

アノイリナーゼの研究：食品による栄養摂取障害の一例
——(2) アノイリナーゼ反応の基礎的性質——

西宗 高弘 岡崎 英規 斎藤 勝*

**Studies on Thiaminase : A case of
lesion in human nutrient utilization by another food component.**

——(2) Fundamentals of thiaminase reaction——

Takahiro NISHIMUNE, Hideki OKAZAKI, Masaru SAITO*

Abstract

Thermodynamics of thiaminase reaction was reviewed and the relevant data were discussed to the negation of the possibility of reverse thiaminase reaction as the primeval route of thiamin biosynthesis. Enzymological characteristics of thiaminases of various origins were summarized.

Key word : Thiaminase, Aneurinase, Free energy change.

キーワード：チアミナーゼ，アノイリナーゼ，自由エネルギー変化。

表1 アノイリナーゼ研究史における主要論文リスト（追加）

(20) <i>B. aneurinolyticus</i> の分類学と	SHIDA, O., TAKAGI, H. ら1994 ⁽³³⁾
<i>B. migulanus</i> のアノイリナーゼ	

アノイリナーゼが原因の養殖水産業や畜産業での被害について前報(1)で述べた。以下にアノイリナーゼ中毒で人命が失われた事件を紹介して(2)の前文とする。

事件は1901年にオーストラリア連邦が独立する以前の1860～61年に起った。ヨーロッパ人として初めてオーストラリア大陸の南北縦断を試みたBurke, Wills, King, Grayの4人のうち3人が旅行中に死亡したのである⁽³⁴⁾。その経緯の詳細はWillsの日記に残されていたが、ビタミンB₁が発見される50年も前に書かれたものであるのに4人

の症状は重症のビタミンB₁欠乏症そのものであった。

英国Loyal Societyによって認められた探検旅行の目的は当初、内陸の気象、地理調査のほかに、動植物の新種の発見など多目的であったが、やがて他のチームとの縦断競争になった結果、多数の科学者は途中で分離、待機させ、小人数で先を急ぐことになり、補給体制も充分でなくなった上に、モンスーンで旅行日程が遅れて食糧の備蓄が無くなった。仕方なく4人は次第に土地で入手できる食糧に依存し始め、アボリジニが小川で採取して火で炙って食べていたムラサキイガイ

* 武蔵野栄養専門学校

*Velesunio ambiguus*を食べ始めた。4人が生で食べたか焼いたかは不明だが、一行のラクダは貝を採取していた小川で死亡したことなどが日記に記されている。このムラサキガイは勿論アノイリナーゼ I を含んでいる。

やがて一行は救援隊から見捨てられたことを知り、食糧が殆ど無いので、土地のアボリジニの一族が常食していたデンジ草の胞子嚢果の粉末を食べ始めた。わらび葉中毒による馬や羊のビタミン B₁ 欠乏症は後年多数の報告がなされたが（後章で詳述）、4人が食べたデンジ草 *Marsilea drummondii* の葉は、わらび葉の100倍のアノイリナーゼ I を含んでおり、胞子嚢果はわらびの2～3倍のアノイリナーゼ I を含んでいる。最初の犠牲者 Gray は、次第に歩行困難、無口になった。本能的に小麦粉（唯一のビタミン B₁ の供給源であった）が自分に必要であることを知っていたようで、他にかくれてオートミールを作って食べているところを発見されたりするが、ある朝死亡していた。4人はデンジ草を食べ始める前から脚気の前駆症状を示していた。即ち、彼らの足は麻痺状態に近く、数ヤード歩くことやわずかな坂を登ることが大仕事であり、足が自由にならない感覚は彼らがかかって経験したことの無いほどの苦しみと落胆を伴うものであった。やがて死んだ馬の肉を食べねばならないような食糧不足の状態になり、デンジ草の粉末を自分たちで作って食べ始めると、この足の弱まりと痛みは筋肉の代謝異常、体温の低下を伴い、ついに動けなくなり、Burke, Wills は死亡する。Wills は自分の脈が48で非常に弱く、足と腕は骨と皮である、デンジ草の粉末は十分にあったが、体力はどんどん弱くなったと記述している。最後の頃は King が他の3人の食糧のデンジ草を集め、体力不足で粉に出来ないので煮沸したと記録している。1人残った King は、デンジ草、魚、カラスなどの野鳥を食べて生活している土地のアボリジニに助けられて生き長らえ、終に救助されるが後年も足が不自由のままであった。

悲劇の原因については、4人はデンジ草を粉碎してヨーロッパ流にケーキやパンに調理したが、オーストラリア内陸の高温に適応したデンジ草のアノイリナーゼは耐熱性が高く、たとえば沸騰水

中で15分加熱した胞子嚢果は十分に発芽する。それに対して、アボリジニは水を多量に加えてから粉碎し、薄いペースト状にしてしばらく放置し、水でさらして食べていた。この方法ではビタミン B₁ と共に第2基質となる塩基性物質が希釈されてしまい、ビタミン B₁ 分解活性は急速に低下する。Wills らはこの方法を見せてもらったが、その意味を理解出来なかったので、日記にデンジ草粉末の水による薄いペーストを非常に不審ないかがわしいもの (a most insinuating article) と記している。

Wills は自分たちは十分満腹するまで食べても何か栄養分が欠乏していることに気づいており、それを補充するのにスベリヒユ科植物のマツバボタンの葉が良いことを見出しており、それを食べることで旅程を伸ばせたと述べている。ビタミンの概念の無い時代の発見であった。

上述のように、水でさらすとアノイリナーゼを含むデンジ草の毒性が無毒化できることを理解するためには、アノイリナーゼの酵素学的性質の理解が不可欠であり、以下にその詳細を述べる。

(2) アノイリナーゼ反応の基礎的性質

アノイリナーゼはビタミン B₁ を分解する酵素、即ち、蛋白質触媒であるから自分自身は変化せず、繰り返し分解反応を進めることが出来るが蛋白質であることから最適の温度があって熱に弱い、最適の pH があって酸、アルカリに弱い、蛋白質分解酵素の作用を受ける、などの性質もある。これらの性質はアノイリナーゼを検出する時や、動物体内でのアノイリナーゼの働きを考える時重要な手掛りとなる。

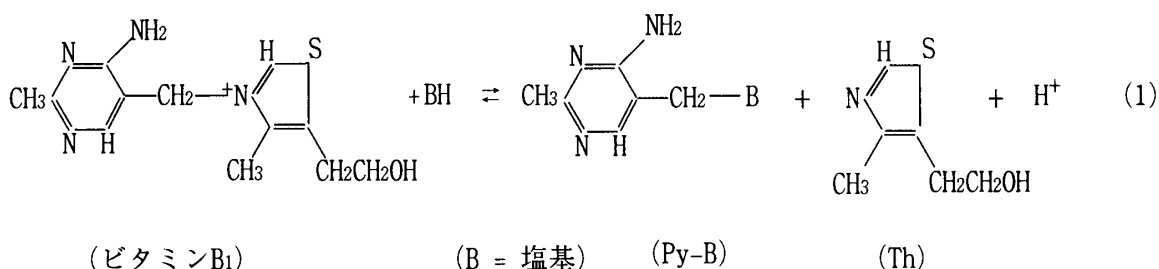
(2)–1 反応

アノイリナーゼには前述の通り2種類あってアノイリナーゼ I、アノイリナーゼ II と呼んでいるが触媒する反応が異なる。ビタミン B₁ は分解されてそれぞれ次の反応の様に2つの部分に分かれる。

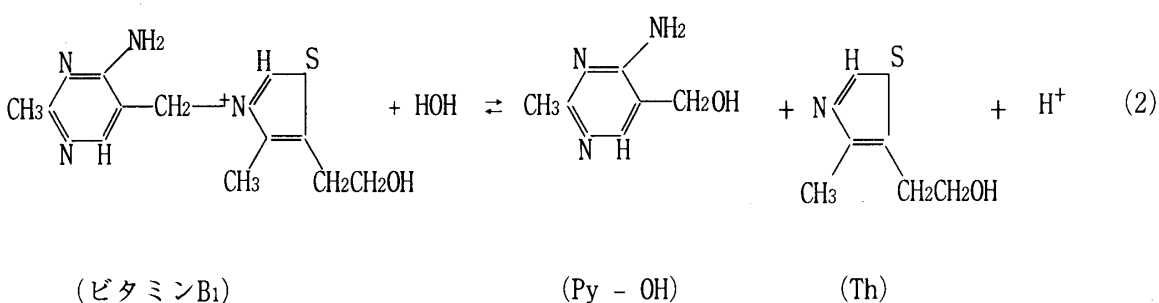
(Py = ビタミン B₁ 分子のピリミジン部分, Th = ビタミン B₁ 分子のチアゾール部分)

反応の結果生じる反応式右側の化合物はビタミン

アノイリナーゼ I (Thiamin: base 2-methyl-4-aminopyrimidine methyltransferase EC 2.5.1.2) の反応



アノイリナーゼ II (Thiamin hydrolase EC 3.5.99.2) の反応



B₁の働きが無いので、ヒトや動物に欠乏症状が出る。即ちビタミンB₁分子の一部分を構成するPyOH (B₁ピリミジンと呼ぶ)及びTh (B₁チアゾールと呼ぶ)にはビタミンB₁の働きは無い。また、アノイリナーゼの量を測る時には、一定時間反応後、反応式左側の残存ビタミンB₁を測るか、右側の反応産物のPyOH, Py-B又はThの量を測る。

(2)ー2 熱力学

アノイリナーゼは何らかの細胞必須成分の原始合成反応を触媒していた化石酵素であるという仮説が提示されていることは(1)で述べた⁽³²⁾。その細胞必須成分がビタミンB₁である可能性は僅かであることも同時に記したが、B₁合成の可能性が殆んど無いことを以下に少し詳しく説明する。

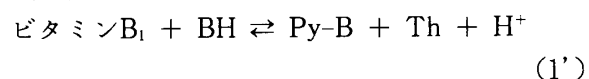
アノイリナーゼは蛋白質触媒であるから無機触媒(白金触媒など)と違って生物細胞の体温付近の温度で反応を進めることが出来るが、これはアノイリナーゼ分子が本来安定なビタミンB₁分子と結合することによって、B₁ピリミジン部分とB₁チアゾール部分の間の化学結合を非常に不安定にし、切断のためのエネルギー(反応の活性化エ

ネルギー)をビタミンB₁分子単独の場合に比べて小さくするためである。

酵素によって小さくなった活性化エネルギーの値を実験によって知るために、酵素共存下の反応速度が温度を変えた時どう変わるかを測り、アレニウスプロットを行なうことによって計算で出す⁽³⁵⁾。この様にするとアノイリナーゼの場合も確かに活性化エネルギーは酵素の存在で著しく小さくなる(後述)。しかし、反応は化合物に含まれる総自由エネルギーが減少する方向にしか進行しない。図1でΔGが減少する方向にのみ進行する。ところでアノイリナーゼによるビタミンB₁の分解反応は可逆的であると報告されている^{(36), (37), (38)}。このことからアノイリナーゼの存在意義がビタミンB₁の合成にあるのかという疑問が生じる。

図1の様にΔGがマイナスの方向にしか反応は進行しないのに、この様な可逆反応はどうして可能であるのか。ΔGの値が両辺化合物の濃度によって決まるからである。

式(1), (2)は簡単に書くと、



又は、

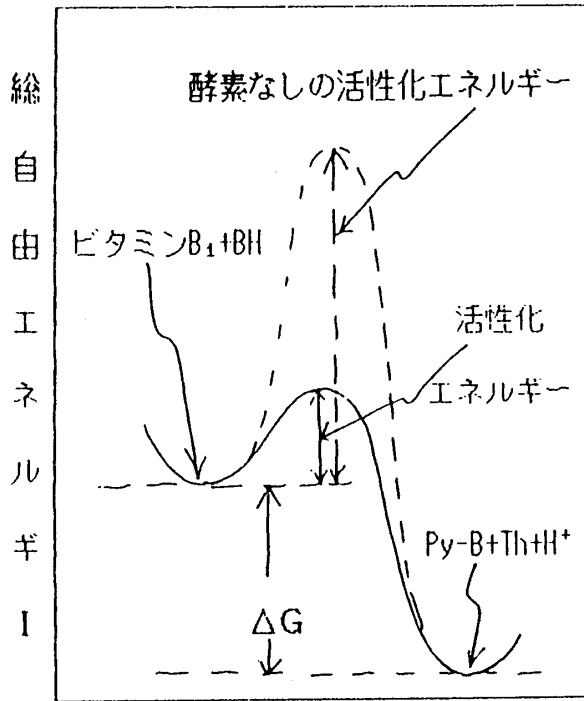
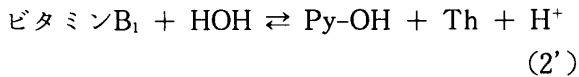


図1 反応の進行



となり、質量作用の法則から(1')式について右方向の反応速度は、

$$v_1 = k_1 [\text{ビタミンB}_1] \times [\text{BH}] \quad (3)$$

左方向の反応速度は

$$v_2 = k_2 [\text{Py-B}] \times [\text{Th}] \times [\text{H}^+] \quad (4)$$

[] は濃度（厳密には活量）を示す。

k_1, k_2 は反応の速度常数で、各反応の固有の性質を示す常数だが、酵素を加えて活性化エネルギーを低下させ、反応が容易に進行するようにして測定してみると、各反応物質の自由エネルギー含量を反映する値となる。

触媒存在下に反応を進行させるとやがて平衡に達して見かけ上停止し、この時左右両方向の反応が同速度で進行している。従って、 $v_1 = v_2$ 即ち、

$$\begin{aligned} k_1 [\text{ビタミンB}_1] \times [\text{BH}] \\ = k_2 [\text{Py-B}] \times [\text{Th}] \times [\text{H}^+] \end{aligned} \quad (5)$$

反応の平衡常数を K とすると、

$$K = \frac{[\text{Py-B}] \cdot [\text{Th}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{ビタミンB}_1] \cdot [\text{BH}]} = \frac{k_1}{k_2} \quad (6)$$

(アノイリナーゼ II の場合は、 $\text{BH} = \text{HOH}$, $\text{Py-B} = \text{Py-OH}$) と表される。ところで、ある反応が右方向に進行したとき自由エネルギーが出せる（仕事ができる）かどうか、即ち ΔG がマイナスかどうかは左辺化合物が平衡濃度より高濃度かどうかによって決まる。これを数値で表現するため、実際の各化合物の濃度比と、平衡時の各化合物の濃度比の差を計算してみる。即ち、

$$\begin{aligned} \Delta G = RT \ln \frac{[\text{Py-B}]_3 \times [\text{Th}]_3 \times [\text{H}^+]_3}{[\text{ビタミンB}_1]_3 \times [\text{BH}]_3} \\ - RT \ln K \end{aligned} \quad (7)$$

[]₃ は反応液中の実際の濃度を示す。

K は(6)式の通り平衡時の各化合物の濃度比であるから、 $-RT \ln K$ は各反応固有の値となる。今、実際の濃度が $[\text{Py-B}]_3$, $[\text{Th}]_3$, $[\text{ビタミンB}_1]_3$, $[\text{BH}]_3$, $[\text{H}^+]_3$ 全て $1 \text{ mol}/(1 \text{ M})$ の場合を仮定すると、

$$RT \ln \frac{[\text{Py-B}]_3 \times [\text{Th}]_3 \times [\text{H}^+]_3}{[\text{ビタミンB}_1]_3 \times [\text{BH}]_3} = 0$$

この時の $\Delta G(7)$ を 25°C で測って ΔG° (標準自由エネルギー変化) と表現するが、これは各反応に固有の常数である。即ち反応に関与する各分子種が $1 \text{ mol}/\text{liter}$ の濃度で、温度が標準条件 (25°C)、気圧が 1 気圧の時は(7)より、

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k = -2.303 RT \log K \quad (8)$$

(R は気体常数で $1.987 \text{ calorie}/\text{mol}/^\circ\text{K}$, T は絶対温度 $^\circ\text{K}$, \ln は自然対数, Δ は反応前後の差を意味)

平衡常数 K と標準自由エネルギー変化 ΔG° はこの様に直接相関している。例えば、平衡常数 K が 0.001 の場合、式の右边が非常に少量で平衡に達してしまう。即ち、 ΔG° が $+$ の時には右方向に僅しか進まないし ((7) で ΔG がマイナスである事が反応進行の条件)、仮に右边の化合物から出発すると左辺方向に自然に進行する。また、 ΔG° が大

きくマイナスの反応では例え右辺化合物から出発しても僅しか左辺に進まず平衡に達してしまう。

表 3

K	log	ΔG°
0.0001	-3	4091 cal
0.1	-1	1364 cal
10	1	-1364 cal
1000	3	-4091 cal

しかし、実際の反応では各化合物の濃度は(1'), (2')式の左辺が著しく高い(ビタミンB₁の分解反応をみるとき)、あるいは右辺が著しく高い(ビタミンB₁合成反応を見るとき)ので、右方向の反応の ΔG 即ち

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Py} - \text{B}] \cdot [\text{Th}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{ビタミンB}_1] \cdot [\text{BH}]} \quad (9)$$

(アノイリナーゼⅡの場合はBH = HOH, Py-B = Py-OH)を取っても、その逆の左方向への ΔG を取っても平衡に達するまではマイナスの値を示す。ところでアノイリナーゼ反応の場合、反応の平衡はどちらに傾いているのか。(1), (2)式を見て気が付く事は反応式右辺のH⁺濃度が生物細胞内では10⁻⁷M(中性)と著しく低い。これでは質量作用の法則(4)から逆反応(ビタミンB₁合成反応)はその速度に限界が有る事は明らかである(式(13)参照)。しかしながら濃度次第で(9)の ΔG が正、即ち逆反応の自由エネルギー変化が負となり逆反応の進行が可能となることがわかる。

この結果は、一見奇妙な感じもするが、ある反応系の自由エネルギーの変化量を構成している要素を物理化学的に理解するともっとはっきりする。ある反応の前後における自由エネルギーの変化は熱含量(エンタルピー)の変化と、分子のばらつき具合を示す量(エントロピー)の変化の和である。従って、

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

と表す。ここで ΔH は熱含量変化で理想溶液(近似的に低濃度溶液)では溶質分子の総量には依存するが濃度には依存しない。即ち温度、圧力が一定の反応では分子個々の化学結合エネルギーの大小の差などを示し、反応は必ず ΔH が減少する方

向に進むが、反応の方向はこの要素だけで決まるのではなく、もう一つの反応方向決定要因の ΔS が重要である。(1'), (2')式左辺の分子集団としてのばらつき具合(エントロピー)を右辺のばらつき具合と比べてその差を示したものと考えることが出来、 ΔS は必ず増加する方向に反応は進む。この ΔS は本質的に濃度に依存する量であって、濃度 c_1 から c_2 への変化に伴うエントロピー変化量は $\Delta S_{1-2} = -R \ln(c_2/c_1)$ で計算される。従って濃度の希釈は(10)式の ΔG にマイナスの要因を加味し反応の進行を可能にする事がわかる。この様に単一の化学反応は、条件によって変化しない値 ΔG° (標準自由エネルギー変化)があまり大きくない時は、それに関与する化合物の濃度を上下することによって正、逆両方向の反応が可能である(アノイリナーゼ反応の ΔG° は後述)。ところが、単一反応の組み合わせによる連続反応(例えばブドウ糖や高級脂肪酸の細胞による合成と分解)を必要に応じて正あるいは逆方向に進行させるためには、第1反応の調節は可能でもそれに続く第2反応以降の化合物濃度を調節することが難しく、又、同じ酵素の正逆の反応を別々に活性化したり抑制したりすることが殆ど不可能なので生物細胞内では合成と分解が両方とも重要な反応である場合は原則として別々の酵素を持っている。(例えばEmbden-Mayerhoff-Parnas経路とGluconeogenesis経路、脂肪酸 β 酸化経路と生合成経路など)。この様なわけでアノイリナーゼの細胞内での働きを考える場合はビタミンB₁の合成か分解かどちらか一方が生理的に重要で、両方向が重要とは考え難い。この酵素の存在する意味は何であろうか。生物細胞にある酵素の働きが不明の場合は、出来ればその酵素を作れない細胞(欠損突然変異を持った細胞)を人工的に作り出して、性質がどのように変化しているかを調べる。この実験に細菌の細胞を用いると結果が大変に速く出るので大腸菌等を用いることが多いが、アノイリナーゼの場合は最近までアノイリナーゼを持った細胞か、突然変異によって欠落した細胞か、を測定区別する簡便な方法(アノイリナーゼクローン検出法)が無く、活性測定に大変な細胞量と時間を必要としたため、この様な欠損変異株はいまだ報告

表4 種々の材料に含まれるアノイリナーゼ I の活性化エネルギー^{(35) (39)}

粗酵素材料 ⁽³⁵⁾	20-30℃	30-40℃	部分精製酵素材料 ⁽³⁹⁾	20-80℃
ハマグリ	5,500	4,300	デンジソウ	14,400 (Calorie/mol)
ふな肝	8,300	2,100	イワシダ	14,400
ふな腎	8,800	5,200	ワラビ	14,400
細菌	11,600	9,000	ムラサキイガイ	14,400
ワラビ	9,400	8,600	<i>B. aneurinolyticus</i>	16,100 ⁽⁴⁰⁾ / 38℃

特定の第2基質は加えていない。30分反応の結果である⁽³⁵⁾。

されていない。

酵素の働き（反応の方向）を推論するために ΔG^0 （表3）が重要であるが、その計算の前に活性化エネルギーの実測値はどんな値を示しているだろうか（図1参照）。その測定法は、一般に温度が高いと反応溶液の各分子の熱運動は活発になり、互いに衝突する回数も多くなるので反応速度は大きくなり、酵素が安定であるかぎり温度が高

$$\log k = -\frac{E_a}{2.303R} \times \frac{1}{T} + \log A$$

い方が反応は進みやすくなる。そこで Arrhenius は実験値を説明するための経験式として（ E_a は活性化エネルギー）

$$\text{または } k = A e^{-E_a/RT} \quad (11)$$

を提出した。温度 T_1, T_2 (°K) における反応速度定数 k_1, k_2 は、最大反応速度に比例するから、 $\log v$ を温度 T_2, T_1 で測定し、従軸に $\log v$ を、横軸に $1/T$ を取ってグラフを描くとマイナス勾配の直線が一定の温度巾の中で得られる。

この直線の勾配が $-E_a/2.303R$ を示すから反応の活性化エネルギー E_a を計算出来る（アルニウスプロット）。アノイリナーゼ反応についても粗酵素を用いた測定値が報告されており、概値がどんなものかを理解する上で参考になるので表4に示す。

(2)ー3 ΔG_0 の試算

図1の ΔG を求めるには ΔG_0 と反応物質の濃度を与えられればよく(9式)、 ΔG_0 を求めるには平衡定数 K が与えられれば良いことがわかったが(8式)、 K を正確に求めるには活性測定の諸条件が満足されている必要があるので、活性測定の基礎的条件を逆反応の可能性の検討の一環として

述べる。従来から行われているアノイリナーゼ活性測定法（後章で詳述）では必要な条件が満たされていないことが多い。

「淡水魚にアノイリナーゼが含まれている」などと記述するためにはアノイリナーゼの量を測らねばならない。活性測定は目的酵素の触媒としての働きをある定まった時間、最もその酵素に適した条件（至適条件）で発揮させ、その触媒作用の結果出来る反応産物の量を測定して酵素の量（活性単位）とする。即ち、機能を測定して酵素蛋白質の物質に代える。この方法は実用的で、このことから理解できるように酵素の触媒する化学反応は極めて限られている。酵素蛋白質の性質や大きさは、それを作っているアミノ酸の種類、配列、数によってきまるが、千数百種類の既知の酵素はそれぞれ異なった性質と大きさを持っている。酵素の作用をうける第1基質ビタミン B_1 は第2基質 BH と化学的に反応するためには、互いに分子同士が衝突しなければならない。酵素アノイリナーゼが存在するとこの大きな分子の表面にビタミン B_1 と BH が結合し、反応は酵素蛋白質表面で進行する。

酵素表面で基質が結合し反応が行なわれる場所は活性中心（又は触媒部位—catalytic site）と呼んでいるが、これを普通鍵穴に例える。この時基質は鍵に相当し、鍵と鍵穴の関係は極めて厳密である（基質特異性が高い）。細胞を破壊したままのサンプルでは千数百種類の酵素が共存しているがビタミン B_1 と結合することの出来る酵素は数種類に限られており、しかもビタミン B_1 を(1)、(2)式の様に分解することの出来る酵素はアノイリナーゼだけである。

さて、活性を測定するためには、アノイリナーゼの活性が十分に発揮出来る至適条件を与えてや

る必要がある。その為には、基質ビタミンB₁や第2基質のBHが大過剰に存在することが必要となる。また、反応産物が全く無いかそれに近い状態が望ましく、特に可逆反応の場合は、反応産物の蓄積は逆反応の可能性を意味する。そこで活性測定は正確には反応初速度、即ち反応産物の無いと考えられる条件での反応速度を測定する。どの程度過剰の基質を用いれば良いかは酵素と基質の結合親和性によって異なる。この親和性の目安となる値としてミハエリス常数 (K_m) を用いる。

酵素によって触媒された反応は基質濃度を増やすと図2の双曲線のように初速度が増加する。ミハエリス常数k_mは最大反応速度V_{max}の1/2の反応速度を与える基質濃度に一致する。V_{max}は酵素を基質で完全に飽和させた時の反応速度を意味する。これらの常数の間関係は酵素反応初期の定常状態を整理することによって導かれる。

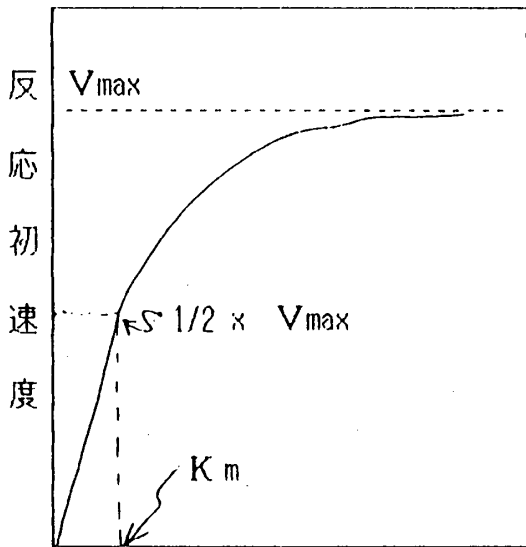


図2 基質濃度 [S]

今(1)式の反応はPingPongメカニズムで進行すると報告されている(即ち両方の基質が結合する前に反応産物のひとつが酵素から離れる)ので^{(42), (41)}, 簡単の為に生成物を2分子種と仮定し(PingPongBiBi), EはアノイリナーゼI, PINは第2基質(B), V₁, V₂はそれぞれ右方向, 逆方向の最大反応速度を表すものとする,

$$K = \left(\frac{V_1}{V_2} \right)^2 \times \frac{K_m \text{ Py-PIN} \times K_m \text{ Th}}{K_m \text{ B}_1 \times K_m \text{ PIN}} \quad (12)$$

の関係が平衡常数Kとミハエリス常数K_m, 最大反応速度V_{max}の間に成立する⁽⁴³⁾。

ここで精製アノイリナーゼI (*Clostridium sporogenes* 菌)の実測値⁽⁴⁴⁾は,

$$V_1 = 6.2 \text{ nmol/min.ug}, V_2 = 5.3 \text{ nmol/min.ug}, K_m \text{ Py-PIN} = 3.3 \times 10^{-5} \text{M}, K_m \text{ Th} = 1.1 \times 10^{-4} \text{M}, K_m \text{ B}_1 = 2.1 \times 10^{-5} \text{M}, K_m \text{ PIN} = 3.1 \times 10^{-5} \text{M}$$

これらの値を(12)式に代入すると

$$K = 7.38 \times 10^2 \quad (13)$$

従って(8)より

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ &= -2.303RT \log K \\ &= -3910 \text{ calorie/mol} \end{aligned}$$

この値を表3のΔG°と比較すると明らかに反応平衡はビタミンB₁の分解の方向に傾いている事がわかる。従ってアノイリナーゼの細胞内での生理的な働きはビタミンB₁の合成ではないと考えられる。

なお、逆反応は遅く、逆反応基質濃度が充分ならば約1時間は直線的に進行させることが出来る。しかし細胞内の機能と同様に、試験管内でアノイリナーゼの活性を測定するにも、本質的に分解に傾いている反応(1)式であるので、ビタミンB₁の分解を見るのがより適当と考えられる。なお能勢も粗酵素を用いて平衡常数の測定を試みた⁽³⁷⁾。

以上は(1)式, (2)式の逆方向の進行についての検討であるが、アノイリナーゼがビタミンB₁生合成前駆体の生合成に関与しているという報告がある^{(56) (57)}。これによると *Saccharomyces cerevisiae* のアノイリナーゼIIはアミノメチルピリミジンを分解(脱アミノ)し、オキシメチルピリミジン(Py-OH)というビタミンB₁合成の前駆物質を作る((2)式参照)。これによってオキシメチルピリミジンを要求する変異株の増殖が見られるようになる。

表5-1 アノイリナーゼの性質
アノイリナーゼ I

反応形式	塩基置換反応			塩基置換反応
	ビタミンB ₁ , ThMP ^{*1} , ThDP ^{*2} , ThTP ^{*3}			
基質特異性 ^{**}	ビタミンB ₁ , ThMP ^{*1} , ThDP ^{*2} , ThTP ^{*3}			カタクチイワン
酵素材料	<i>B. thiaminolyticus</i> (MM菌)	<i>Cl. sporogenes</i>		
分子量	44000 ⁽⁴⁸⁾ , 42000 ⁽²¹⁾	43000 ⁽⁴⁹⁾	42000	
至適pH	5.8-6.8	6.5	8.0	5.5
至適温度	37℃	30℃	30℃	(30%失活/65℃,15min)
KmビタミンB ₁	8.7×10 ⁻⁶ M	0.9×10 ⁻³ M	2.1×10 ⁻⁵ M	
アニリン	2.9×10 ⁻³ M			
ピリジン		1.0×10 ⁻³ M		
ピリドキシン			3.1×10 ⁻⁵ M	
キノリノB ₁				
Vmax (mmol/min.g)	19.	560.	61.	
阻害特質	Hg ⁺ モノヨード酢酸		重金属イオン, pCMB	pCMB
活性化物質			SH化合物, Ca ²⁺	cystein
精製度 ^{**}	単一蛋白質		単一蛋白質	粗酵素
	0.10μKat/mg ⁽³⁹⁾	1.08μKat/mg ⁽³⁹⁾	1.01μKat/mg ⁽³⁹⁾	
研究者	Wittliff, Airth ⁽⁵⁰⁾	Ebata, Murata ⁽⁵¹⁾	Kobayashi ⁽⁴⁴⁾	

*1 ビタミンB₁リン酸, *2 ビタミンB₂リン酸, *3 ビタミンB₃リン酸, **詳細後述

表5-1 アノイリナーゼの性質 (つづき)
アノイリナーゼ II

反応形式	加水分解反応	
	アノイリナーゼ I	(菌体内酵素)
基質特異性 ^{**}	ビタミンB ₁ , OxyB ₁ , S-B ₁	ビタミンB ₁
酵素材料	<i>B. aneurinolyticus</i> (KA菌)	<i>B. aneurinolyticus</i> (KA菌)
分子量	100000	180000
至適pH	8.6	9.4
至適温度	60℃ ⁽⁵²⁾	65℃
KmビタミンB ₁	3.0×10 ⁻⁶ M	
アニリン		
ピリジン		
ピリドキシン		
キノリノB ₁	13.0×10 ⁻⁶ M ⁽⁵³⁾	8.4×10 ⁻⁶ M
Vmax (mmol/min.g)	3.9	
阻害特質	芳香族アミン, 重金属イオン	Zn ²⁺
活性化物質	システイン, EDTA	SH化合物
精製度 ^{**}	結晶蛋白質	単一SDS-PAGE band
研究者	Ikehata ⁽⁵⁴⁾	中塚 ⁽⁴⁰⁾⁽⁵⁵⁾

(2)-4 酵素の性質

この様に活性測定に反応の方向を選び、Km に対して充分の濃度の基質 (ビタミン B₁ と第 2 基質 BH) を加えるだけでなく、至適温度が保たれていること、水素イオン濃度 pH が適当であるこ

とが必要でアノイリナーゼ I は pH6.5-6.8 (*B. thiaminolyticus* のアノイリナーゼの場合); アノイリナーゼ II は pH8.6 などが用いられる (表 5 参照)。又阻害金属イオン等は除かねばならないが、Ca²⁺ イオン等活性を強める目的で添加する場合も

表5-2 アノイリナーゼの性質⁽⁴⁹⁾

アノイリナーゼ I

反応形式	塩基置換反応			
基質特異性	ビタミンB ₁ (その他?)			
酵素材料	デンジソウ	イワンダ	ワラビ	ムラサキイガイ
	<i>Marsilea drummondii</i>	<i>Cheilanthes sieberi</i>	<i>Pteridium esculentum</i>	<i>Velesunio ambiguus</i>
分子量	115,000	107,000	93,000	110,000
至適pH	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0
至適温度	65℃	60℃	63℃	65℃
(50%失活温度)				
KmビタミンB ₁	3×10 ⁻⁶ M	3×10 ⁻⁶ M	3×10 ⁻⁶	3×10 ⁻⁶ M
アニリン	1.4×10 ⁻⁶ M	1.4×10 ⁻⁶ M	5.1×10 ⁻⁶ M	2.0×10 ⁻⁶ M
ピリジン	2.5×10 ⁻⁶ M	0.7×10 ⁻⁶ M	5.0×10 ⁻⁶ M	0.7×10 ⁻⁶ M
ニコチン酸	25.×10 ⁻⁶ M	29.×10 ⁻⁶ M	55.×10 ⁻⁶ M	0.9×10 ⁻⁶ M
Vmax				
阻害物質	1μM pCMB, Ag ⁺	1μM pCMB	1μM pCMB	1μM pCMB
活性化物質	3 mM SH compound			
精製度	major PAGE band (2.07 μKat/mg)	partially purified (0.30 μKat/mg)	partially purified (0.25 μKat/mg)	partially purified (0.10 μKat/mg)
研究者	McCleary & Chick ⁽³⁹⁾	McCleary & Chick ⁽³⁹⁾	McCleary & Chick ⁽³⁹⁾	McCleary & Chick ⁽³⁹⁾

ある。この様に酵素活性の測定に関連して種々の性質に関する情報が必要になるが、それらを表5にまとめて示した。

部分精製チアミナーゼについては未解明の点も多く、魚⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾や貝⁽⁴⁷⁾のチアミナーゼは2種類の酵素が存在するという報告がある(文献23参照)が確認されていない。

文献

- (33) Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Yano, H., Abe, M., Udaka, S., and Komagata, K.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 143-150 (1994)
- (34) Earl, J. W. and McCleary, B. V.: *Nature* Apr 21, 683-684 (1994)
- (35) 能勢善嗣, 岡本武士郎: *生化学* **25**, 109-112 (1953)
- (36) Fujita, A., et al.: *J. Biol. Chem.* **196**, 313-320 (1952)
- (37) 能勢善嗣: *生化学* **23**, 249-259 (1951)
- (38) 池畑秀夫: *ビタミン* **7**, 524-526 (1953)
- (39) McCleary, B. V. and Chick, B. F.: *Phytochem.* **16**, 207-213 (1977)
- (40) 中塚敏之, 鈴木喜六, 中野長久, 北岡正三郎: *ビタミン* **61**, 485-492 (1987)
- (41) Lienhard, G. E.: *Biochemistry* **9**, 3011-3020 (1970)
- (42) 鈴木喜六, 中塚敏之: *生化学* **49**, 952 (1977)
- (43) Haldane's equation in Dixon and Webb: *Enzymes* 3rd ed. 1979
- (44) 小林 進: *ビタミン* **49**, 111-119, 185-194 (1975)
- (45) 石原 忠, 紀成尚志, 保田正人: *日本水産学会誌* **39**, 55-59 (1973)
- (46) Deolalkar, S. T. and Sohonie, K.: *Nature* **173**, 489-490 (1954)
- (47) Reddy, K. K., Giri, K. V., and Das, R.: *Enzymologia* **12**, 238-245 (1948)
- (48) Agee, C., Wilkins, J. H. and Airth, R. L.: *J. Bacteriol.* **115**, 949-956 (1973)
- (49) Murata, K.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **378**, 146-156 (1982)
- (50) Wittliff, J. L. and Airth, R. L.: *Biochemistry* **7**, 736-744 (1968)
- (51) Ebata, J., and Murata, K.: *J. Vitaminol.* **7**,

アノイリナーゼの研究：食品による栄養摂取障害の一例

- 115-121 (1961)
- (52) Kimura, R., Sakakibara, M. and Katumata, M.: J. Vitaminol. **4**, 199 (1958)
- (53) 中塚敏之, 安田賢児：ビタミン **50**, 204 (1976)
- (54) Ikehata, H.: J. gen. appl. Microbiol. **6**, 30-39 (1960)
- (55) 中塚敏之ら：ビタミン **62**, 15-22 (1988)
- (56) Kimura, Y. and Iwashima, A.: Occurrence of thiaminase II in *Saccharomyces cerisiae*. *Experientia* **43**, 888-890 (1987)
- (57) 木村祐子：京府医大誌 **104** (1), 111-121 (1995)