

アノイリナーゼの研究：食品による栄養摂取障害の一例
— (3) アノイリナーゼ活性測定法 —

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.**

—(3) Assay methods for thiaminases —

Takahiro NISHIMUNE, Hideki OKAZAKI and Masaru SAITO*

Abstract

Methods for the detection and measurement of thiaminase activity were reviewed. Epidemiological studies on the etiology of a Seasonal Ataxia in Nigerians in connection with thiaminase in the larvae of *Anaphe benata*.

Key words : Thiaminase, Aneurinase, assay method, cerebellar ataxia Seasonal Ataxia
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。

アノイリナーゼが過去にヒトの健康障害を起こした事例を前号(2)で紹介した。以下に現在でも同様の健康障害が起こっていると考えられる事例を紹介する。アフリカ西海岸にあるナイジェリア西部の町 Ikare (Ikare-Akako) 及び Ilesa (Ilesha) は熱帯雨林の北部に位置しているが、40年以上前から雨期になると小脳性の運動失調と激しい振戦（企図振戦）及び眼球振盪を示す患者が多発し、座ると軀幹部の平衡障害があり、時に嚥下困難も見られた⁽⁵⁸⁾。この国では蛋白栄養源としてアフリカ蚕 (African silkworm) の幼虫を食べる事を一部の研究者が奨励しており、このものの栄養価は鶏卵と類似しているという分析結果も報告されている⁽⁵⁹⁾。このため低所得者層ではこの幼虫 (*Anaphe benata* Butler 分類学的には鱗翅類シャチホコガ科 Lepidoptera, Notodontidae) をローストした後

* 武蔵野栄養専門学校

シチューに入れて食べる事が多く、雨期である7月～9月を中心に市場で市販されており、大量に飼養 (mass rearing) する事が推奨される事もある。

ところが前述の運動失調—振戦症状の患者の発症が雨期を中心に季節的に集中している事から疫学的研究が進み、アフリカ蚕幼虫の食後すぐに発症する事が判明して、両者の関係が疑われていた⁽⁶⁰⁾。発症状況の概略はナイジェリアの Ile-Ife にある Obafemi Awolowo 大学神経科の B. Adamolekun と Ikare にある Ibikunle 病院の F. R. Ibikunle によると人口6万人の Ikare の町で1993年の雨期に1126人の季節性運動失調患者が入院したが、これは人口の1.87%であり、重症例では意識障害もあるが死者はなく、全入院患者の71%がこの病気である事、総合ビタミン剤の投与による治療が有効であり、患者年齢は2歳から70歳、男女比は1:3.25であった⁽⁶¹⁾。

そこでAdamolekunは本症が急性ビタミンB₁欠乏症であるとの仮説を立て、患者を2群に分けて偽薬対照を含む所謂二重盲検法によりビタミンB₁投与が病状に及ぼす影響を検討したところ、明確な改善効果が示された⁽⁶²⁾。この業績に対しAmerican Academy of Neurologyは1993年の第45回年会においてInternational Award in Neuro-epidemiologyを与えており、受賞講演においてB. Adamolekunはローストしたアフリカ蚕の幼虫のシチューにアノイリナーゼが含まれている可能性は非常に高く、平素のビタミンB₁不足傾向の食生活がこれによって一気に悪化したものという見解を発表している⁽⁶³⁾。このアノイリナーゼについては、その他の抗ビタミンB₁物質の可能性も含めて今後の研究によって証明されるものと考えられるが、この症例は原因食（アフリカ蚕幼虫）のアノイリナーゼが原因の可能性が大きく、この酵素の性質を解明し、例えば(2)で述べたアポリジニ達のデンジ草胞子嚢果の調理法のようにこれを失活させる調理法を考案すれば当該国の低所得階層の栄養改善に資するものと考えられる。

(3) 活性測定法

3-1 蛍光測定による活性検出法

現在用いられているアノイリナーゼの活性測定法及び検出法を表6に示す。ビタミンB₁は放射活性測定や微生物定量を除けば蛍光定量法が最も感

度が良く(0.05 μ gの定量は容易である)、従って他の測定法に比べて酵素による少量の分解も検出可能となるから活性検出法には好適である。しかし、残存基質を測定する方法であるため感度を上げようとして少量のビタミンB₁から反応を開始する事が多い。従って、酵素反応の初速度を基質大過剰で測ることは困難で、蛍光検出法では酵素は基質で飽和されない事が多い。普通Kmの10倍濃度を飽和条件とするが、3-1例では2.5 μ Mで反応する(Kmは表5参照)。活性測定法としては反応産物の定量が原理的に望ましく、この方法で測定すると添加基質の80%以上が分解したときに急激に反応速度が低下する事が報告されている⁽⁶⁴⁾。これは基質飽和度の低下(図2参照)と、反応が平衡に近づいた事(6式, 13式参照)によると考えられる。

以下にアノイリナーゼの検出法及び定量法の実験例を示す。

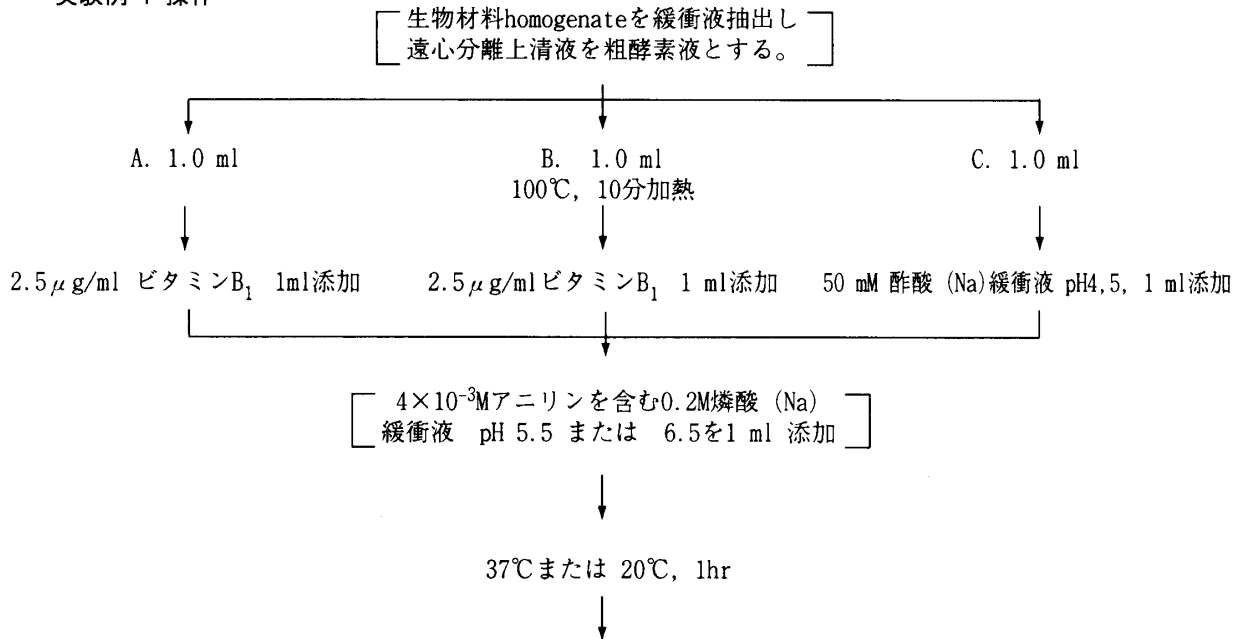
【実験例1】蛍光測定による食品中アノイリナーゼの活性検出法⁽⁹⁾⁽⁷⁴⁾(表6の7)

大きなハマグリ又は良く成長したアサリ(数個以上)の貝殻を除き内容の重さを測る。これに市販の精製海砂を適量加えて乳鉢内で組織を磨砕しつつ重量の数倍量の0.05M磷酸(Na)緩衝液pH6.0を加え、10倍量まで同bufferを加えてから30 $^{\circ}$ C, 15分間温浸し、4 $^{\circ}$ C, 5000xg, 10分遠心分

表6 アノイリナーゼ活性の主な測定法と検出法

活性測定法	文献
1. ビタミンB ₁ と第2基質アニリンの反応産物の吸光度(248nm)を測る方法	Wittliff(50), Douthit(65)
2. ビタミンB ₁ とピリジンの反応産物の吸光度(386nm)を測るヘテロピリB ₁ 法	江幡(64)
3. ビタミンB ₁ の減少を蛍光定量で測る方法	Airth(66)
4. キノリノチアミンを基質とし分解にともなう318nmの吸光度の減少を測る方法	中塚(40)(53)
5. 反応で生じるH ⁺ をHCO ₃ ⁻ 緩衝液によりCO ₂ ガスとして測る方法	Kenten(67), Evans(68)
6. ビタミンB ₁ の分解で生じるThを放射性ビタミンB ₁ を用いて測る方法	Edwin(20)
検出法(活性の有無を判定する事を主たる目的としたもの)	
7. ビタミンB ₁ の分解を蛍光定量法で測る方法	藤田(24), 林(69)
8. ビタミンB ₁ の分解により生ずるThを放射性ビタミンB ₁ を用いて測る方法	Edwin(70), Agee(48)
9. アノイリナーゼIの抗血清を反応させ、免疫拡散沈降法で環の大きさを測る法	Wittliff(71)
10. ビタミンB ₁ の分解で生じるB ₁ チアゾールをDragendorff試薬で検出する方法	世良(72)
11. 分解されないビタミンB ₁ をジアゾ試薬で呈色させ脱色環で検出する方法	Abe(73)

実験例 1 操作



BrCN 6 ml と20% NaOH 4 ml を加える。2.5 μg/ml ビタミンB₁ 液 1 ml+H₂O 2 ml も同時に酸化, 100%蛍光とする。

計算

$$([B] - [A]) \div ([B] - [C]) = \text{分解率 (\%)}$$

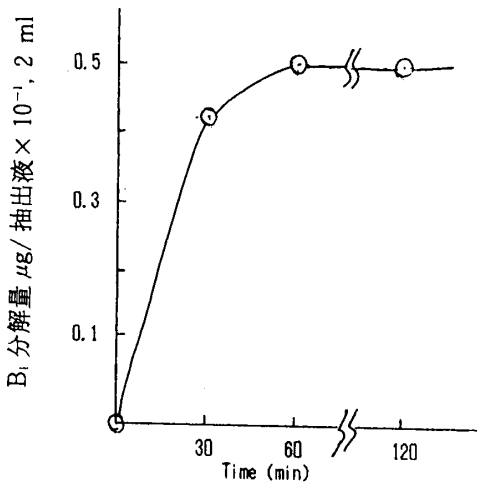


図3 あさりの水抽出液の活性⁽⁹⁾

離の上清液を酵素液として用いる。ポリトロン等の組織ホモジナイザーが利用できる時はbufferを加えて冷却しながらホモジナイズする。シイタケは新鮮材料(10個以上)を貝類と同様に破碎し, 0.05Mリン酸ナトリウム buffer, pH6.5を用いて抽出するが重量あたりのアノイリナーゼ含量が貝類に比べて少ないので添加buffer量は湿重量の数

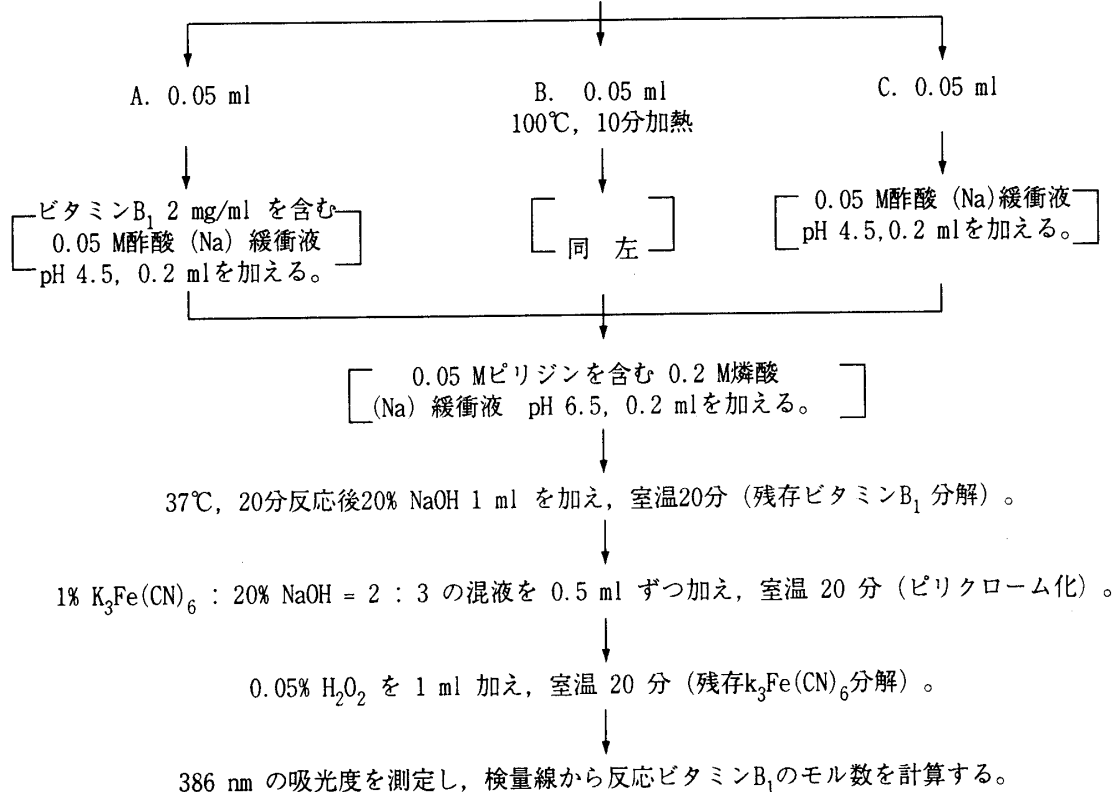
倍以下とし, 20℃で浸出する。このようにして得た酵素液は少々濁度が有っても使用出来る。

この酵素液を1 mlずつ3本の試験管(A, B, C)に分注し, Bは100℃, 10分加熱して加熱対照実験に用いる。Cは基質ビタミンB₁を加えない対照実験(盲検とも呼ぶ)として用いる。主実験AとBにビタミンB₁ 2.5 μg/ml溶液(0.05M酢酸ナトリウム buffer pH 4.5) 1 mlを加える(終濃度2.5 μM, 基質量は実験目的によって0.5-3.0 μgが用いられる。) Cには pH 4.5 buffer 1 mlを加える。続けて(基質単独では阻害⁽⁷⁵⁾ ⁽⁷⁶⁾) A, B, Cに4 × 10⁻³M アニリンを含有する0.2M磷酸ナトリウム buffer, pH5.5 (貝類の場合) 又は pH 6.5 (シイタケの場合) を1 ml加える。3本の試験管を37℃(貝類) 又は20℃(シイタケ) で60分間温浸し, 終了後, BrCN液 6 mlを加え, 更に20% NaOH 4 mlを加える。別途ビタミンB₁ 2.5 μg/ml液 1 mlにH₂O 2 mlを加えた後, BrCN 6 mlと20%NaOH 4 mlを加えて標準チオクローム液とし, これを蛍光光度計の100%等に合わせてA, B, Cの蛍光を読む。ビタミンB₁分解率は

実験例 2 操作

B. thiaminolyticus を普通ブイヨン +0.1% 酵母エキス 10 ml で培養

遠心分離上清を粗酵素液とする。



$([B] - [A]) \div ([B] - [C]) \%$ で計算される。 $[A] = [C]$ の場合は酵素を希釈するか反応時間を短くする。定量的な酵素活性を得る目的には B_1 分解率が50%—80%の結果が得られるように、酵素の希釈倍数を数段階作り同時に反応を行なう事が必要である。この方法では分解ビタミン B_1 の μg 数をもって酵素活性の単位とする事が通例である。BrCN の調整法及びピチオクローム蛍光測定法は文献⁽⁶⁵⁾ の通りである。

【実験例 2】分光光度計測定による細菌アノイリナーゼの活性測定⁽⁶⁴⁾ (表 6 の 2)

アノイリナーゼ I を産生する *Bacillus thiaminolyticus* を 0.1% 酵母エキスを加えた普通ブイヨン培地にて 4—5 日間 37°C で培地表面積を大きくして静置培養し、4°C, 5000 xg, 10 分間の遠心分離で培養液上清を得、これを酵素液とする。酵素

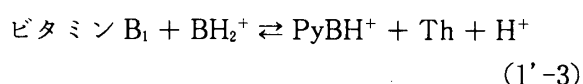
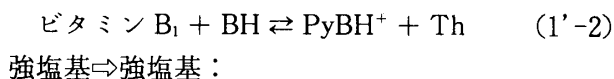
液 0.05 ml を 3 本の試験管 A, B, C に取り、B は 100°C, 10 分処理し加熱対照実験とする。C は基質を加えない。A と B にビタミン B_1 2 mg/ml 溶液 (0.5 M 酢酸ナトリウム buffer pH 4.5) 0.2 ml を加える (終濃度 2.8 mM)。C には同じ pH 4.5 buffer 0.2 ml を加える。A, B, C に 0.05 M ピリジンを含む 0.2 M 磷酸ナトリウム buffer, pH 6.5 0.2 ml を加える。30°C (又は 37°C⁽⁶⁴⁾) で 20 分反応後、20% NaOH 1 ml ずつを A, B, C に加え 20 分以上室温で放置し残存 B_1 を分解する。次に 1% $K_3Fe(CN)_6$ 4 容と 20% NaOH 6 容の混液を別途準備し、これを A, B, C に 0.5 ml ずつ加え、室温 20 分放置 (反応産物をピリクロームに酸化) の後、0.05% H_2O_2 1 ml を加えて室温で 20 分放置し過剰の $K_3Fe(CN)_6$ を分解する。この反応液の 386 nm の吸光度を C を対照として分光光度計で測定する。この方法では 1 μmol 以下の既知量のビタミ

ン B₁ とやや過剰量の酵素でアノイリナーゼ反応を行ない、完全分解（平衡状態まで反応させるの意で(13)式からほぼ定量的）の後、上述の方法でピリクロームを形成させて検量線を作っておき（1.0 μmol はほぼ1.44の吸光度を与え、原点を通る直線関係が成立する⁽⁶⁴⁾）、検体の吸光度から生成 μmol 数を算定してこれを酵素活性の単位とする。また実験例1の方法に比べ約70倍量の基質を分解する。これは実験例1ではビタミン B₁ 濃度が K_m（表5参照）に対し充分大過剰とならず、従って最大反応速度を与えないためである。（図2参照）。

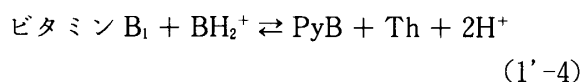
【実験例3】マノメトリーによるアノイリナーゼ I 活性の連続測定⁽⁶⁷⁾（表6の5）

実験に用いるアノイリナーゼ I は粗抽出液から比活性で10倍以上に精製したものをを用い、H⁺ の生じる副反応（例えばATPの水解等）を含まない酵素とする。ワールブルグ検圧計を用い全量 3.0 ml 中に 3 mM ビタミン B₁、0.05M アニリン、0.05M NaHCO₃ を含むように各化合物を 2.7 ml 中に調製し、pH 7.5 に調節し 37℃ で平衡させ、副室より 0.3 ml の酵素（pH 7.5）を加えて反応を開始する。以後経時的に CO₂ の発生を読む。ガス相は CO₂: N₂ = 5:95 (v/v) とする。

この測定は式(1)右辺の H⁺ を H⁺ + HCO₃⁻ ⇌ H₂CO₃ ⇌ CO₂ (溶解) ⇌ CO₂ (気相) の平衡反応によって当モル量の CO₂ ガスに置換することによって行なうが、使用する置換塩基 (B⁻) と反応産物 (Py-B) が弱塩基か強塩基かによって(1')式（弱塩基⇌弱塩基の場合、前号参照）の他に、弱塩基⇌強塩基：



強塩基⇌弱塩基：



の反応形式が可能である。(1'-2)の場合 H⁺ の遊離はなく(1'-4)では2モル相当量の遊離となる。BH, PyB の pK_a は 37℃ で表7の値であることが知られている。

ビタミン B₁ 過剰の条件で実測すると CO₂ 発生量 / ビタミン B₁ 分解量の比は pH 7.5 で表7の通りであった。この方法で CO₂ 発生 μl/h と酵素量の間には 400 μl CO₂ 以上まで直線関係が成立し、1時間以上直線的な CO₂ 発生が追跡出来る。本法は各種のビタミン B₁ 誘導体で定量法の無いものにつきアノイリナーゼの基質としての活性を測定することが出来る。特徴は活性の連続的な変化の追跡が可能である。欠点は pH 巾を固定する必要があり自由な選択は出来ない。又第2塩基や反応産物の pK_a が未知の場合、測定可能かどうかの予備試験が必要である。

【実験例4】反応産物 (B₁ チアゾール) の Dragendorff 試薬による検出⁽⁷²⁾（表6の10）

本法はアノイリナーゼ産生細菌のスクリーニングに用いる事を目的にしたものである。アノイリナーゼ産生の良い培地 2 ml に 4~5 日間培養し、培養液を低速遠心分離（培養試験管のまま 1000 rpm × 5min 程度）で培養上清液（少々濁りがあっても良い）とする。この検液約 1 ml と、必要に応じて 100℃ 15 min 処理したもの約 1 ml（通常省略可）を別の試験管に取り、0.5M 磷酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5、0.1 ml 中に ビタミン B₁ HCl 1mg、pyridoxine (PIN) 1 mg 又は cystein HCl 1 mg を

表7 アノイリナーゼ反応産物の CO₂ 置換係数

BH	pKa	CO ₂ /ビタミンB ₁	BH, PyB	pKa	CO ₂ /ビタミンB ₁
Pyridine	5.1	0	Piperidine	10.8	1.15
Aniline	4.4	0.89	Pyrimidinylaniline	6.3	
Trimethylamine	9.5	0.99	Pyrimidinylpiperidine	8.0	

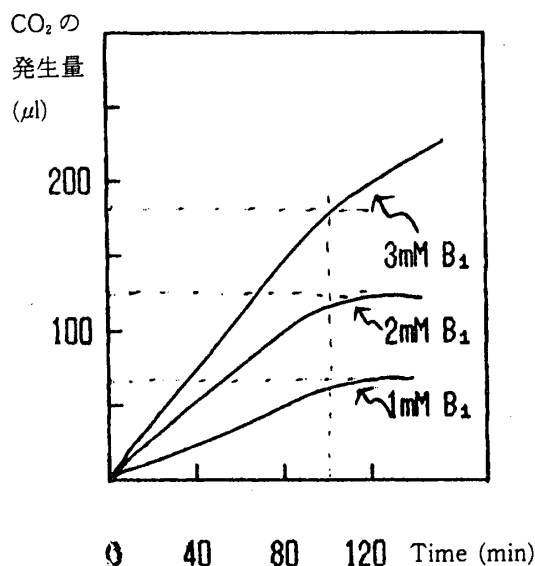


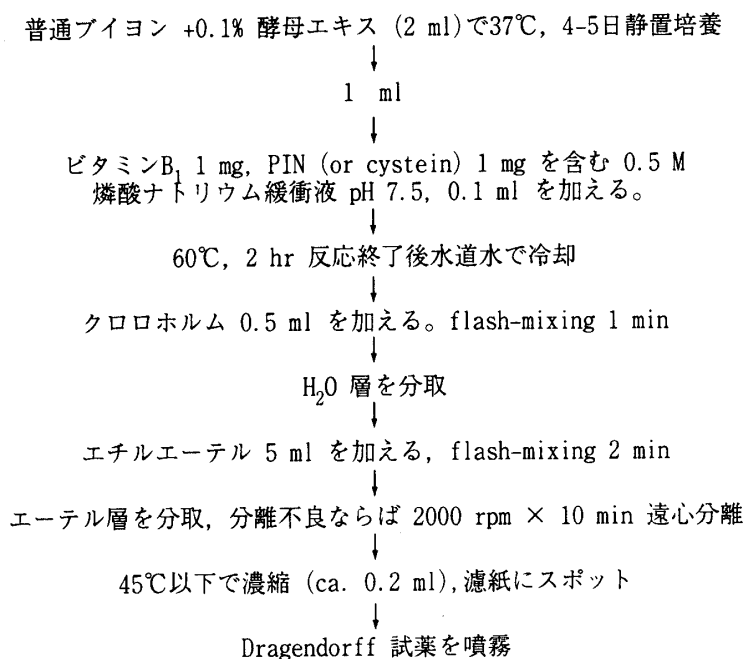
図4 マノメトリーによるアノイリナーゼ反応経過の追跡

Dragendorff 試薬を噴霧する。酵素反応の結果生じた B₁ チアゾールは赤橙色を呈する。

第2塩基の添加効果の有無でI型かII型かの判定も可能であるがこの場合は培養液の使用量を0.1-0.2 mlとする。近縁種の内*B. alvei*が疑陽性を示すことがある。

Dragendorff 試薬は次の様に作る。1 g の次硝酸ビスマスを出るだけ少量の濃塩酸に溶解し、28%アンモニア水でアルカリ性とし、生じた水酸化ビスマスを三角ロート上の濾紙に集め、蒸留水で充分洗って硝酸イオンを除く。この沈殿をガラス棒で試験管に出来るだけ移し、出来るだけ少量の濃塩酸に溶解し、1.5 g/ml KI 溶液 2 ml を加え、70%酢酸で 50 ml とする。褐色スプレー瓶中で 4℃ 1 月は保存出来る (刈米, 橋本: 薬学雑誌

実験例 4 操作



溶解し pH 7.5 に調節したもの 0.1 ml を加え、60℃, 2 hr 反応する (高濃度緩衝液は塩析効果のために必要)。反応終了後室温に冷却、クロロホルム 0.5 ml を加えて混合、水層を別の試験管に移す。これにエーテル 5 ml を加え、充分混合 (2 min) エーテル層を別試験管に取る (分離不良の時は低速遠心分離)。エーテル層を 0.2 ml 程度に、45℃以下で濃縮、全量を濾紙にスポットし、

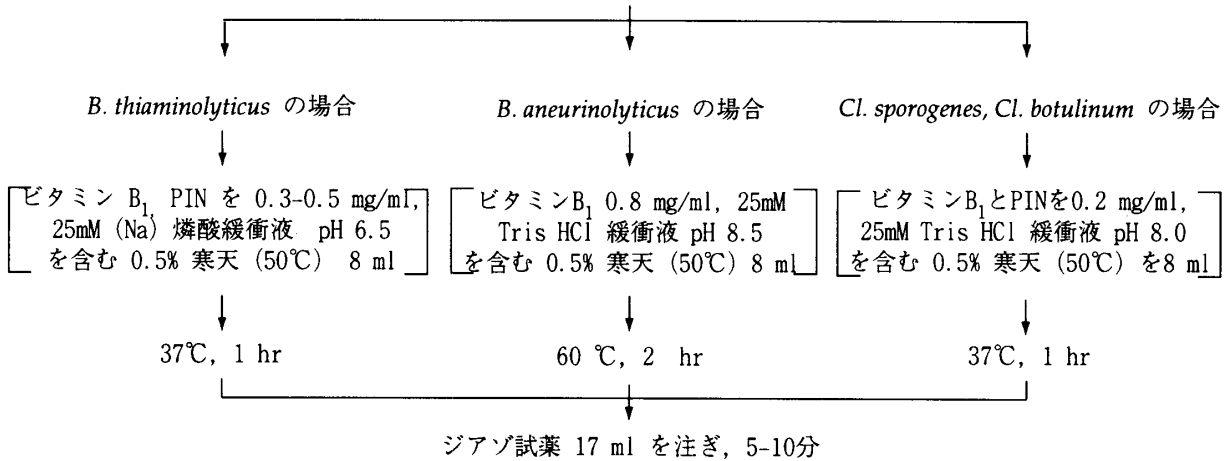
71, 436(1951))。

【実験例 5】ジアゾ試薬によるアノイリナーゼ産生クローンの検出法⁽⁷³⁾ (表 6 の 11)

普通寒天に 0.1% 酵母エキスを加えた平板培地 (25 ml/9cmφ) で 37℃, 4 日培養して得た孤立コロニーの上から次の組成の軟寒天を 50-55℃ に冷却した後、8 ml 流し固める。*B. thiaminolytic*

実験例 5 操作

普通寒天 +0.1% 酵母エキス (25 ml/9 cm シャーレ) 接種, 37°C, 4 日 (*B. thiaminolyticus* は2日) 培養



us (MM菌) の場合: ビタミン B₁ と Pyridoxine (PIN) を 0.3-0.5 mg/ml (活性が強い時は多くする), 25 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5, 0.5% 寒天。*B. aneurinolyticus* (KA 菌) の場合: ビタミン B₁ 0.8 mg/ml, 25mM TrisHCl 緩衝液 pH 8.5, 0.5% 寒天。アノイリナーゼ型別不明の時はこれに Pyridoxine 0.8 mg/ml を追加し, KA 菌と同条件で以下反応する。*Clostridium sporogenes*, *Clostridium butulinum* の場合はガスパック法等で嫌気培養し: ビタミン B₁ と Pyridoxine を 0.2 mg/ml, 25 mM Tris HCl 緩衝液 pH 8.0, 0.5% 寒天。酵素反応は KA 菌の場合 60°C, 2 hrs, MM 菌と嫌気性菌の場合 37°C, 1 hr。反応後 17 ml のジアゾ試薬を平板上に注ぎ 5-10 分後液を捨て, B₁ 分解帯 (アノイリナーゼ活性) を黄色に検出する。ビタミン B₁ は赤紫色を呈する。

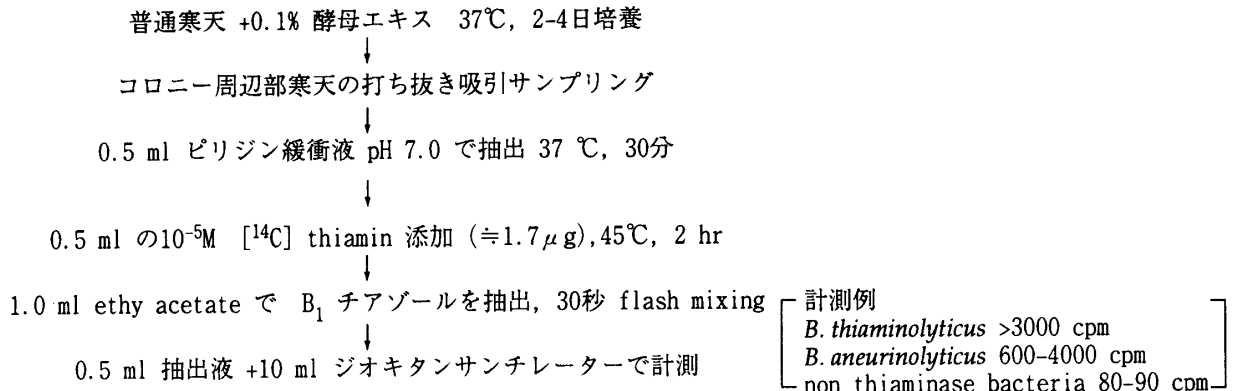
ジアゾ試薬は次の様に作る⁽⁷³⁾。(i) p-aminoacetophenone 0.6 g を 9 ml の濃塩酸に溶かし, 水で 100 ml とする。(ii) NaNO₂ 23g を水 100 ml に溶かす。(iii) NaOH 20 g と NaHCO₃ 28g を水 350 ml に溶かす。これらは褐色ビン中 4°C, 1 月保存出来る。用時に (i) 0.8 ml, (ii) 0.2 ml, H₂O 10ml を混ぜ, (iii) 6 ml をこれに添加した後直ちに平板培地の上に注ぐ。

【実験例 6】放射性ビタミン B₁ を用いる活性検出法⁽⁴⁸⁾⁽⁷⁰⁾ (表 6 の 8)

普通寒天に 0.1% 酵母エキスを加えた平板培地で 37°C, 2-4 日培養して得たコロニーについて, その周辺縁を中心に寒天面に垂直に駒込ピペット (先端の内径 1 mm で先端ガラス厚の小さい 10 ml 前後の容量のもの) を打ち込み, 吸引しつつ引き上げてシリンダー状の寒天とその上端の菌層をサンプリングし, 試験管に移す。この試験管に予め 0.5 ml のピリジン緩衝液を分注しておく。ピリジン緩衝液は 100 ml の 0.2 M 磷酸 (Na) 緩衝液 pH 7.0 に 30 μl のピリジンを加える。これを 37°C で 30 分保温して酵素を抽出する。次に 0.2 M 磷酸 (Na) 緩衝液 pH 7.0 に 1 × 10⁻⁵ M の放射性ビタミン B₁ (チアゾール部分を標識したもので 2 mCi/mmol 程度で充分, 比放射能が低いときは計測時間を延長する。) を溶解した基質液 0.5 ml を加え, 45°C, 2 時間保温する。冷却後 1.0 ml の ethyl acetate を加え, flash mixing 30 秒の後, そのまま低速遠心分離 (1000 rpm × 2 分程度), 上清液 0.5 ml をバイアルに取り, ジオキサンシンチレーター 10 ml を加えて計測する。

この様な平板上のコロニー活性とは別に, 溶液系で酵素反応を行ない (Thiazole-2-¹⁴C) thiamin を用いる) 反応産物の B₁ thiazole-2-¹⁴C を薄層クロマトグラフィー (シリカゲル G) 上で分離, 液

実験例 6 操作



体シンチレーションカウンターで計測する方法もある⁽⁴⁸⁾。

【実験例 7】放射性ビタミンB₁を用いる活性測定法^{(20) (77) (78)} (表 6 の 6)

ヒツジ糞便⁽⁷⁸⁾の凍結乾燥品を充分粉碎し, 10倍 (w/w) 量の0.1M 磷酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に分散, blending, 低速遠心分離, 上清液を酵素液とする。糞便を直腸から直接採取し-20℃保存の後, 活性測定に用いることもある⁽⁷⁷⁾。反すう胃胃液⁽¹⁸⁾の場合CCN (Cerebrocortical necrosis) 動物の死体から病理解剖時に胃液を採取し直ちにドライアイス凍結し, 分析まで-20℃に保つ。分析時モスリン数枚を重ねた袋に入れて搾る。通過液を冷凍遠心にかけ, 澄明な上清液とした後, 酵素活性を測定する検液とする。胃液の採取に胃管を導入した例もある⁽⁷⁹⁾が死後採取が多い⁽⁷⁸⁾。こうして酵素液を作り, その0.2 ml を用い, 0.2 mM [14 C] ビタミンB₁ (2- 14 C-thiazole) (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$), ± 100 mM pyridine とし, 37℃, 15分反応させる。終了後 ethyl acetate 1.0 ml にて30秒-1分 flash mixing で [14 C] thiazole を抽出し, その内 0.5 ml を用いてトルエンシンチレータを加えて計測する。

3-2 基質

表 6 に示した活性測定法ではアニリン, ピリジンなどの第 2 基質を用いているが, その他にも種々の有機塩基やチオール化合物が反応する事が

知られている。此らを表 8 にまとめて示す。この様なアノイリナーゼの第 2 基質は Sealock らが見出し, m-ニトロアニリンを用いて反応産物を結晶化し, 別途合成品と一致することを確認し, 反応形式を明らかにした⁽⁸⁰⁾。その後藤田らも各種有機塩基, チオール化合物等を検索し, ヘテロピリチアミンなど多数の反応産物を明らかにした⁽⁸¹⁾。又同時にこれらの反応産物と Th (B₁ チアゾール) からビタミンB₁が合成されるというアノイリナーゼの逆反応を証明した^{(86) (87)}。さらに村田らも生物細胞に存在する物質等との反応産物を同定している (文献⁽⁴⁹⁾参照)。この様な第 2 基質の中にはニコチン酸やアミン酸, タウリン, ピリドキシンなどが含まれているがアノイリナーゼの細胞内の生理機能と結び付けて理解するには至っていない。

3-3 基質特異性

種々のビタミン B₁ の構造類似体についてアノイリナーゼの基質としての活性を検討してみた結果を示すと表 9 の様になる。これらの基質の中にはビタミン B₁ 磷酸エステルがあるが生物細胞中のビタミン B₁ は大部分が磷酸化されており, 従ってアノイリナーゼ II はこれには作用しない。又, 易吸収性のビタミン B₁ 誘導体として医薬品にも多用されているアリルジスルフィド型も含まれており, これが腸内細菌のアノイリナーゼの作用を受け難いことがわかる⁽⁹²⁾。又, ビタミン B₁ が生物細胞内で実際に機能する時の反応中間体に近い形

表8-1 アノイリナーゼ I の第2基質と反応産物






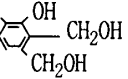


第2基質(BH)	反応産物(Py-B)	研究者
ニトロアニリン	Py-NH- 	Sealock & Davis (80)
ピリジン	Py-+N 	Heteropyrithiamin
アニリン	Py-NH- 	Fujita(81), 小塚 (82), 田代 (83), 能勢 (37)
キノリン	Py-+N 	長谷川, 上田 (84), 小塚 (82)
ニコチン酸	Py-+N 	Pyrimidylnicotinic acid
ピリドキシン (PIN)	Py-+N 	Pyrimidylpyridoxin
タウリン	Py-S 	Kupstas & Hennessy (89)
ヒポタウリン	Py-S 	Icthiamin
システイン	Py-SCH ₂ CH(NH ₂)COOH	Barnhurst & Hennessy (90)
リジン	Py-NH(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)COOH	小塚 (82), 田代 (83), Murata et al. (86)
プロリン	Py-N - CH-COOH (CH ₂) ₃	Murata & Ebata (87)
		Thomas, Watkin, Evans, Evans (91)

表8-2 第2基質の反応促進効率^{(注)(24)}

第1基質	アノイリナーゼ					第2基質	アノイリナーゼ				
	貝類	魚類	細菌	ワラビ	ケイトウ		貝類	魚類	細菌	ワラビ	ケイトウ
アニリン	1500	120	700	690	600	3-アミノピリジン	1000	35	490	720	550
0-アミノ安息香酸	1400	110	170	50	180	ピリドキシン (PIN)	- 8	- 7	96	22	
m-アミノ安息香酸	1300	80	45			キノリン	45	120	1400	200	340
p-アミノ安息香酸	550	60	10	67	140	ニコチン酸	0	0	270	640	
m-ニトロアニリン	580	25	70	100	300	2CH ₃ -4NH ₂ -5-CH ₂ OH-Py	- 84	- 35	600	- 11	- 28
P-ニトロアニリン	510	20	10	83	100	2-CH ₃ -4-OH-Py	21	21	350		
ホモスルファミン	45	5	500			2-CH ₃ -4-OH-5-CH ₂ OH-Py	10	12	250		
フェニルヒドラジン	500	86	- 40			2-CH ₃ -4-NH ₂ -Py	- 43	0	720		
αナフチルアミン	1200	47	100			L-システイン	107	37	700	19	25
ピリジン	120	130	1100	790	630	グルタチオン	50	16	380		
2-アミノピリジン	750	20	380	750	580	NaHS	80	9	1410		
3-アミノピリジン	1000	35	490	720	550	γアセトγSH-propanol	700	55	1200		

(注) 数字は無添加の活性に対して1 mM の濃度での活性増加率(%) を, Py はB₁ピリミジンを示す。

表9 アノイリナーゼの基質特異性

Substrate	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	アノイリナーゼによる分解程度			(参考文献)
					アノイリナーゼ I		アノイリナーゼ II	
					貝類(シダ)	<i>B. thiaminolyticus</i>	<i>B. aneurinolyticus</i>	
ビタミンB ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ OH	H-	+++ (+++)	+++	+++	
ビタミンB ₁ 1磷酸	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ O (P)	H-		+++	-	
ビタミンB ₁ 2磷酸	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ O (P)(P)	H-		+++	-	(27)
ビタミンB ₁ 3磷酸	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ O (P)(P)(P)	H-		+++	-	
α Hydroxyalkyl-2-B ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ OH	RCHOH-		+++	-	(93) (94)
OxyB ₁	CH ₃ -	-OH	-C ₂ H ₄ OH	H-	-	-	++	(27)
2-ThioB ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ OH	S-	-	-	+++	(27)
4'-AminomethylB ₁	CH ₃ -	-NHCH ₃	-C ₂ H ₄ OH	H-	-	-	+	(27)
2'-OxymethylB ₁	HOCH ₂ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ OH	H-	+++	+++	+++	(27)
2'-EthylB ₁	C ₂ H ₅ -	-NH ₂	-C ₂ H ₅ OH	H-	+++	+++	+++	(27)
O-AcetylB ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ OCOCH ₃	H-	+++	+++		(27)
5-ChloroethylB ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-C ₂ H ₄ Cl	H-	+++	+++	++	(27)
5-EthylcarboxyB ₁	CH ₃ -	-NH ₂	-COOC ₂ H ₅	H-	+++	+++	++	(27)
B ₁ -disulfide					++ (±)	±	-	(27)
Pyrimidinylpyridine					+++	+++	++	(27)
B ₁ propylsulfide					+~+++ (++~+++)	+	+	(27)
B ₁ allylsulfide					+~+++ (++~+++)	++	+	(27)
B ₁ alkylsulfides					-	-	-	(49)
DiacetylB ₁					++ (++++)	+	+	(27)
O, S-DiacylB ₁					-	-	-	(49)
DibenzoylB ₁					+ (-)	+	-	(27)
S-CarbalkoxyB ₁					-	-	-	(49)

のαヒドロキシエチルチアミンがアノイリナーゼ I によって分解される事が注目されるが、αヒドロキシエチルチアミンが補酵素として機能している時は2磷酸エステル の形であり、しかも酵素蛋白質に結合している状態なので、この様な形でのビタミンB₁にアノイリナーゼが作用するかどうかは更に検討が必要と思われる。

文 献

58 Osuntokun, B. O.: British Medical Journal 3, 589 June (1972)
 59 Ashiru, M. O.: Ecology Food Nutrition 22,

313-320, (1988)

60 Adamolekun, B.; Lancet 341, 629 (1993)
 61 Adamolekun B. & Ibikunle F. R.; Acta Neurol. Scand. 90, 309-311, (1994)
 62 Adamolekun B., Adamolekun W. E., Sonibare, A. D. Sofowora G.; Neurology 44, 549-551, (1994)
 63 Adamolekun B.; Neurology 43, 1419, (1993)
 64 江幡淳子, 村田希久; ビタミン 18, 497-501 (1959)
 65 Douthit, H. A., Airth, R. L.; Arch. Biochem. Biophys. 113, 331-337 (1966)

- 66 Wittliff, J. L., Airth, R. L.; *Methods in Enzymol.* **18A**, 229-238 (1970)
- 67 Kenten, R. L.; *Biochem. J.* **69**, 439-448 (1958)
- 68 Evans, W. C., Evans, I. A., Thomas, A. J., Watkins, J. E., Chamberlain, A. G.; *Brit. Vet. J.* **114**, 180-198 (1958)
- 69 林 良二; *ビタミン* **10**, 205-210 (1956)
- 70 Edwin, E. E. et al.; *J. Appl. Bacteriol.* **44**, 305-312 (1978); *Methods in Enzymol.* **62D**, 113(1979)
- 71 Wittliff, J. L., Mandy, W. J., Airth, R. L.; *Biochemistry* **7**, 2380-2384 (1968)
- 72 世良行男; *山口医学* **25**, 13-23 (1976); 林 良二; *ビタミン* **38**, 224 (1968)
- 73 Abe, M., Nishimune, T., Ito, S., Kimoto, M., Hayashi, R.; *FEMS Microbiol. Let.* **34**, 129-133(1986)
- 74 Ono, T., Kawasaki, M.; *J. Vitaminol.* **14**, 179-186 (1968)
- 75 Suzuki, K. et al.; *Biochim. Biophys. Acta* **293**, 111-117 (1973)
- 76 Agee, C., Airth, R. L.; *J. Bacteriol.* **115**, 957-965 (1973)
- 77 Linklater, K. A., Dyson, D. A., Morgan, K. T.; *Research Vet. Sci.* **22**, 308-312 (1977)
- 78 Spicer, E. M., Horton, B. J.; *Aust. vet. J.* **57**, 230-235 (1981)
- 79 Cushnie, G. H., Richardson, A. J., Lawson, W. J., Sharman, G. A. M.; *Vet. Rec.* **105**, 480-482 (1979)
- 80 Sealock, R. R., Davis, N. C.; *J. Biol. Chem.* **177**, 987-988 (1949)
- 81 Fujita, A. et al.; *J. Biol. Chem.* **196**, 289-295, 297-303 (1952)
- 82 小塚駿一; *生化学* **23**, 154-163 (1951)
- 83 田代敏夫; *生化学* **23**, 239-244 (1951)
- 84 長谷川栄一, 上田 潔; *生化学* **25**, 81-84 (1953)
- 85 Murata, K. et al.; *J. Vitaminol.* **14**, 12-20 (1968)
- 86 Murata, K. et al.; *J. Vitaminol.* **7**, 141-149 (1961)
- 87 Murata, K., Ebata, J.; *Nutritio Dieta Basel* **8**, 116-125 (1966)
- 88 二五田公俊; *ビタミン* **48**, 285-293 (1974)
- 89 Kupstas, E. E., Hennessy, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5217-5220 (1957)
- 90 Barnhurst, J. D., Hennessy, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 356-358 (1952)
- 91 Thomas, A. J., Watkin, J. E., Evans, I. A., Evans, W. C.; *Biochem. J.* **61**, viii (1955)
- 92 坂本真人; *ビタミン* **7**, 364-366 (1954)
- 93 Shiobara, Y. et al.; *J. Vitaminol.* **11**, 308-312 (1965)
- 94 Tengo, K., Murata, K.; *ビタミン* **43**, 172-178 (1971)
- 95 Nishimune, T., Ito, S., Abe, M., Kimoto, M., Hayashi, R.; *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **34**, 543-552(1988)