



Title	-Amino isobutyric acid の代謝 : 第 3 報 -Amino isobutyric acid の酵素による分解
Author(s)	田原, 哲士; 本間, 守; 下村, 得治
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(1), 12-18
Issue Date	1969-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11782
Type	bulletin (article)
File Information	7(1)_p12-18.pdf



[Instructions for use](#)

α -Amino isobutyric acid の代謝

第3報 α -Amino isobutyric acid の酵素による分解

田原 哲士・本間 守・下村 得治

(北海道大学農学部農芸化学科生物化学教室)

Metabolism of α -amino isobutyric acid

Part 3. Enzymatic decomposition of α -amino isobutyric acid

Satoshi TAHARA, Mamoru HONMA and Tokuji SHIMOMURA

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received December 20, 1968

緒 言

α -Amino isobutyric acid (2-methyl alanine, AIB) は α 位に水素を持たないアミノ酸であるが、これが一部の細菌の窒素源となることは古くから知られており¹⁹⁾、又酵母による特異的分解を利用して、 α -dialkyl amino acids の DL 分割の試み¹¹⁾ も行なわれている。近年になって、アミノ酸吸収のモデルアミノ酸として AIB を用いた実験^{4), 13)} に於いて、細菌によって AIB が僅かながら分解されることが観察されたこと及び酵素の分解の知られていない AIB や α -methyl serine の非酵素的分解モデル¹⁰⁾ が報告されたことから、 α -dialkyl amino acids の分解的代謝を酵素レベルで解明しようとする機運があった。 α -dialkyl amino acids の酵素の分解の最初の報告は1962年 E. M. WILSON ら²⁰⁾ による、極めて基質特異性の高い hydroxy-methyl transferase によるメチロール基転移反応である。一方、先に述べた非酵素的 AIB 分解のモデル実験では、脱炭酸又は脱炭酸に続いてアミノ基転移がおこり、アミノ酸はそれぞれイソプロピルアミン又はアセトンになる分解様式が与えられている。前の酵素反応は Pyridoxal phosphate (PLP), tetrahydrofolic acid を Cofactor とする one carbon unit の転移、後の非酵素的反応は脱炭酸の先行するアミノ基転移反応で、いずれも α 位に水素原子の存在を必要としない新しい型のアミノ酸分解である。KALYANKAR らの非酵素的モデル反応と類似の酵素反応については G. H. AASLESTAD ら (1964)¹⁾ が土壌から分離した細菌の生菌及び粗抽出液により、AIB がアセトンへ分解され

ることを初めて報告した。G. B. BAILEY ら²⁾ は1967年細菌からの精製酵素が AASLESTAD らのものと同じ反応を行ない基質特異性が広いことを観察している。

本報告は、AIB を窒素源として、土壌から分離した *Pseudomonas* sp. の生菌及び抽出酵素による AIB の分解についての一連の実験に関するものである。AASLESTAD ら、BAILEY ら、本実験の酵素に共通していることは、PLP が補酵素となり、 α -dialkyl amino acids の脱炭酸及びアミノ基転移を同時に行ない対応ケトンを生成すると思われること、アミノ基受容体としてケト酸の存在が必要であることなどである。

実験方法

1. 供試菌株

1965年高知県で採取した土壌より分離したもので生理及形態から *Pseudomonas* sp. と認められた。

2. 培 養

液体振盪培養には glucose 30 g, AIB 4 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.13 g を水道水 1 l に溶解、pH 6.6 に調整した培地を用い、生菌の取得、菌株の保存には同じ組成の固体培地を用いた。培養はシャーレ又は ROWX ビンの平板で行なったが、AIB に適応した大量の wet cell を得るには上記培地に酵母エキス 0.01% を加え、金属製の箱 (5×23×34 cm) を使用し、30°C、40時間の培養を標準とした。培養後、菌体を 0.07 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、ガーゼで濾過、遠心分離 (1400 r.p.m., 15 min.) して水をきった沈澱を wet cell とした。

3. α -dialkyl amino acids の調製

H. T. BUCHERER ら³⁾の方法により、ケトン、シアン化カリウム、炭酸アンモニアからヒダントインを合成これを60%硫酸で加水分解⁹⁾してアミノ酸を得た。

4. 酵素実験

粗酵素液による酵素実験についてはそれぞれの実験結果に添えて述べる。精製操作中及び精製酵素の活性測定は、AIB 150 μ moles, ビルビン酸ソーダ 20 μ moles, PLP 0.2 μ mole, リン酸緩衝液 (最終濃度 0.1 M, pH 7.45) を含む全容 2 ml で行ない、30°C, 10 分間保持後、0.3 N-硫酸 3 ml を加えて反応を止め、生成するアセトンを定量した。1 酵素単位は、上記実験条件で、1 分間に 1 μ mole のアセトンを生成する酵素量で示し、比活性は、蛋白 1 mg 当りの単位数で示した。

5. 定量法

蛋白の定量は、R. F. ITZHAKI らのビュレット法⁶⁾と 280 m μ の吸収により、アセトン及び AIB の定量は第1報⁵⁾の記載に従った。

実験結果

AIB を窒素源とする合成液体培地で供試菌を培養すると、AIB の減少に相当して培地中にアセトンが蓄積する。AIB の代謝産物がアセトンであることは、2,4-dinitrophenyl hydrazone (2,4-DPH) を調製して、融点、ペーパークロマトグラフィー、吸収スペクトル、元素分析によって確認した。

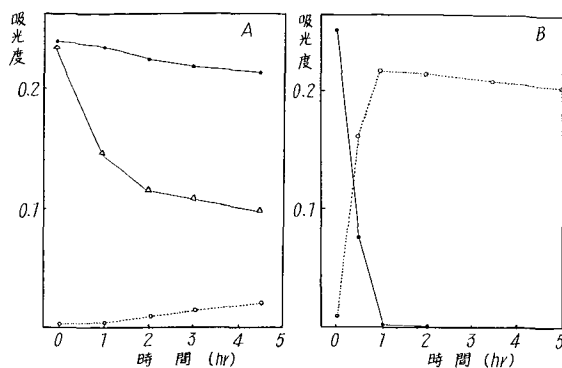
1. 生菌の AIB 分解性

AIB を含む合成及び天然固体培地に生育した wet cell による AIB の分解とアセトンの生成を調べた (第1図)。第1図 A, B の比較から、培地の違いにより AIB の分解能に大きな差があることがわかる。全 AIB と生成アセトン量の和はほぼ一定となり、細胞内 AIB は加熱操作 (沸騰水浴 4 分) により細胞外へ漏出してゆくとされる。天然培地に生育した生菌を合成培地に移して AIB に 18 時間適応させた後、AIB の分解速度を調べたところ、合成培地に生育したものの約 1/2 であった。

これらのことから AIB の分解能は AIB によって誘導されるものと考えられる。更に AIB 適応菌はイソバリンよりメチルエチルケトンを生じた。天然培地に増殖した生菌にはこの作用がみられないことから、イソバリン分解能も AIB によって誘導されるものであろう。

2. 生菌による AIB 分解の様式

緩衝液に懸濁した生菌による基質 (AIB-1-¹⁴C, AIB-3-¹⁴C) のアセトンへの分解を調べた。アセトンの 2,4-



第1図 生菌の AIB 分解性

A: 肉汁培地に培養した菌

B: AIB を窒素源とする合成培地に培養した菌

反応条件: 50 ml 三角フラスコ, AIB 1 mg, wet cell 200 mg, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 全容 9 ml, 28°C, 振盪

定 量: 反応液 1 ml 中のアセトン, AIB を吸光度 (500 m μ) で示した

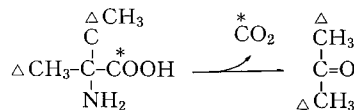
●—●—: 全 AIB (反応液を加熱後遠沈, 上澄の AIB を定量)

—△—△—: medium 中の AIB.

—○—○—: 生成アセトン

第1表 生菌による放射活性基質の分解

分解方法	放射活性基質	アセトン-2,4-DPH に相当するスポットの放射活性
(1) 生菌による	AIB-1- ¹⁴ C	—
	AIB-3- ¹⁴ C	+
(2) 次亜塩素酸ソーダによる	AIB-1- ¹⁴ C	—
	AIB-3- ¹⁴ C	+



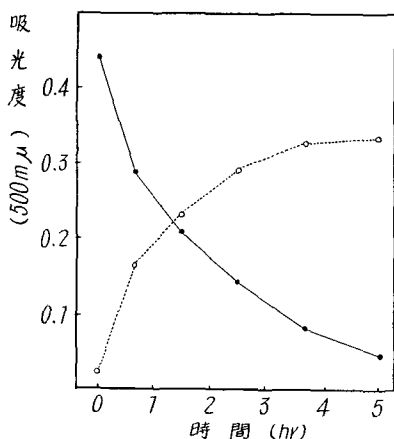
- (1); AIB 3 mg, wet cell 700 mg, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 全容 20 ml, 28°C, 2 時間振盪後、遠沈上澄を水蒸気蒸溜し、溜出液から 2,4-DPH を調製し、ペーパークロマトグラフィーを行なった。(Heptane-Methanol, 2:1 v/v)¹⁷⁾

- (2); 実験方法の項参照⁵⁾

DPH を調製し、ペーパークロマトグラムのスポットの位置と放射活性の有無を観察した。対照として、次亜塩素酸ソーダによる AIB の分解も調べられた (第1表)。この結果、AIB からアセトンへの変化は、アミノ基とカルボキシル基の脱離によることが確認された。

3. 粗酵素実験

wet cell の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.45) 懸濁液 (wet cell 20 g/40~10 ml) をフレンチプレスにかけて細胞を破碎後、同緩衝液で稀釈し、20000×g で 20 分間遠沈した上澄を粗酵素液とした。粗酵素液による AIB の分解、アセトンの生成を第2図に示した。AIB の減少とアセトンの生成はよく対応しており、AIB に対する酵素活性は、生成するアセトン量によって測定されることがわかる。



第2図 粗酵素による AIB の分解

反応条件： 酵素液 30 ml (蛋白 10 mg/ml), AIB

溶液 (1 mg/ml) 6 ml, 28°C, 振盪反応

定 量： AIB, 反応液 2 ml に水 4 ml を加え沸騰水中で 4 分加熱、沈澱を遠心分離で除いた上澄 3 ml 中の AIB の量 (●—●). アセトン, 反応液 2 ml に 0.5 N-H₂SO₄ 4 ml を加え遠心分離した上澄 3 ml 中のアセトンの量 (○—○).

4. 酵素活性に対する Pyruvate, PLP の添加効果

粗酵素液は透析によって殆んど活性を示さなくなる。AASLESTAD ら¹⁾は本反応に於て補酵素として PLP 及びアミノ受容体として Pyruvate の添加効果が大きいことを指摘した。そこで本実験でも粗酵素液、透析酵素液に対する PLP, Pyruvate の効果を調べた (第2表)。透析酵素液に PLP, Pyruvate を加えた時の活性は、粗酵素液に両者を加えた場合とほとんど差がなかった。透析酵素液に対して PLP のみの添加は、効果は少ないが、Pyruvate は粗酵素液に Pyruvate のみ添加した場合と同程度の活性がみられる。従って透析による活性の低下は Pyruvate 又はそれに代り得るものが失われるためであろう。粗酵素液に PLP 又は Pyruvate を単独で加えれば、それぞれの場合、同程度の活性増大がみられる

第2表 PLP, pyruvate の酵素活性に対する効果

反応液成分	相対活性 (%)
粗 酵 素 液	14.4
" + PLP	30.8
" + pyruvate	29.2
" + PLP + pyruvate	100
" + cysteine + pyruvate	7.5
" + cysteine + pyruvate + PLP	24.6
透析酵素液	3.0
" + PLP	6.3
" + pyruvate	30.4
" + PLP + pyruvate	100
" + cysteine + pyruvate	5.1
" + cysteine + pyruvate + PLP	14.5

反応条件： 酵素液 (蛋白 5.6 mg), AIB 2 μ moles, pyruvate 2 μ moles, PLP 0.2 μ mole, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3), 全容 1 ml, 30°C, 30 分間静置反応, 0.5 N-H₂SO₄ 2 ml を加えて反応を停止, 生成するアセトンを定量, cysteine (1 μ mole) は酵素液と 10 分間ブレインキュベイトした。

が、再者を加えた時の 1/3 以下にすぎず、粗酵素液中の二つの Cofactor は最大活性を与えるには不十分な量しか存在していないことがわかる。又、システインの添加は活性に大きな阻害を与えること、その阻害が PLP の添加により緩和されることから、PLP が補酵素として反応に関与していると思われる。硫酸塩析を行なうと、PLP, Pyruvate の共存の時にのみ、もとの活性が再現される。塩析酵素に PLP, Pyruvate を加えてリン酸緩衝液による活性の pH 依存性を調べたところ、最適 pH は 7.3~7.6 であったがこの値は AASLESTAD ら (pH 7.8)¹⁾, BAILEY ら (pH 8.0~8.5)²⁾ の値より低い。

5. 酵素の精製

Pyruvate, PLP の共存の下における AIB からアセトンへの変化を目安として精製を行なった。使用緩衝液はすべてリン酸第二ソーダ、リン酸第一カリ混合液である。

Step 1. フレンチプレス処理後の粗酵素液 (比活性 0.14~0.15) に固体硫酸を 0.35 飽和まで加え、4°C に 2 時間放置、沈澱を 15000×g で遠沈し、沈澱を 10⁻⁴ M PLP を含む 0.1 M 緩衝液 (pH 7.45) に溶解し、流水に 1 夜透析後硫酸 0.25 飽和とし、2 時間放置後 15000×g で遠沈、上澄を硫酸 0.35 飽和にし、4°C, 4 時間静置後上と同じく、遠沈、溶解、透析した。これを硫酸 0.25~0.35 飽和

第3表 酵 素 の 精 製

精 製 段 階	液 量 (mℓ)	蛋 白 (mg)	比 活 性 (unit/mg· protein)	収 率 (%)
粗 抽 出 液*	470.0	7003	0.146	100
硫安 0.25~0.35 画分 (Step 1)	55.0	704	1.19	82
リン酸カルシウムゲル溶出 (step 2)	207.0	196	3.15	61.5
第1回クロマトグラフィー (濃縮) (step 3)	44.5	66	5.60	36.1
再クロマトグラフィー	溶出液 (step 4)	30.0	21.1	7.89
	濃 縮 (step 4')	2.0	17.2	7.46

* 寒天培地 7ℓ を用いて得た wet cell 109 g から出発

画分とした。操作はすべてアンモニアで中性に保ちながら行なった。

step 2. 透析した酵素液にリン酸カルシウムゲル¹⁸⁾を蛋白の約3倍量加えて30分攪拌後遠沈、沈澱を水、0.002 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) で十分洗浄後、0.02 M 同緩衝液で溶出 (3回) を行なった。

Step 3. DEAE セルローズを M/50 リン酸緩衝液 (pH 7.45) で飽和させた後 2×30 cm のカラムを調製、リン酸カルシウムゲルから溶出したまま、又は硫安塩析濃縮後流水に透析した酵素液を流し、上記 M/50 緩衝液 100 mℓ で洗浄する。同緩衝液をベースとして 0.05~0.5 M 塩化カリの濃度勾配で溶出分画を行なった。溶出は 2 mℓ/分とし 10 mℓ 毎に分画し、比活性 5 以上の区分を集めた。

Step 4. 第1回の分画によって得た酵素液に等容の飽和硫安溶液を加えて蛋白を沈澱濃縮後、PLP を加えて流水に透析した酵素溶液を第1回と同じ条件で分画した。比活性 7.5 以上の画分を集めて硫安塩析、PLP を加えずに 20 時間 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.45) に透析して最終的な酵素液を得た。DEAE セルローズから溶出した際の比活性は BAILEY ら²⁾ の場合とほぼ同じ大きさ

であった。BAILEY らは更に硫安塩析により比活性が増大することを報告しているが、本酵素では比活性がやや低下した。

6. 精製酵素の性質

最終精製段階の酵素は、吸収スペクトルに関する実験から他の多くの transaminase とは異なって、PLP が安定な結合型では存在していないように思われた。そこで透析や塩析による PLP の脱離を、活性の面から調べた (第4表)。酵素と PLP の結合は透析には比較的安定であるが塩析によって活性は 1/9 に低下する。このことから補酵素と蛋白の結合は比較的弱いものと思われる。更にこの塩析酵素に AIB を加えて透析を行なえば PLP を加えないかぎり、酵素活性はほとんどみられなくなる。

本酵素に対する金属の影響についても調べた。AIB 分解のモデル反応では、2 価カチオンによりアセトンの生成が阻害さたといわれている¹⁰⁾。又、AASLESTAD ら¹⁾は脱塩水に透析することにより酵素の活性増大を観察して、重金属の除去による効果であるとしている。実験の結果は、Cu⁺⁺ にやや阻害作用 (10⁻³ M で 25% 阻害) がみられたが、Mg⁺⁺、Al⁺⁺⁺ 及び EDTA は 10⁻³ M

第4表 酵素活性と PLP との関係

酵 素 液 の 処 理	酵 素 活 性		活性の比較 (II)/(I) (%)
	PLP (0.1 mM) 添加 (I)	PLP 無添加 (II)	
(1) 硫安塩析, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.45) に透析 (step 4')	1.593	0.115	7
(2) step 3 の酵素液に PLP を添加して流水に透析, DEAE-cellulose カラム分画	1.068	0.680	64
(3) (1) の酵素液に AIB を添加して流水に透析	0.550	0.005	<1

使用した酵素の比活性は、(1) 7.46, (2) 7.44, (3) 5.87

酵素反応は実験方法の項参照

反応量は生成アセトンの定量値を 500 mμ の吸光度で示した

濃度で数パーセントの阻害を与えるにすぎなかった。

7. 反応の化学量論性

反応の化学量論性に関する実験結果を第5表に示した。先に述べた反応式のそれぞれの基質、反応生成物の間には化学量論的な一致がみられた。この種のデータは AASLESTED ら¹⁾, BAILEY ら²⁾ も得ているが前者は粗酵素液による測定結果でバラツキが大きく、後者は一部の化合物を定量したものである。

第5表 反応の化学量論性

測定物質	反応前 (μ mole)	反応後 (μ mole)	変化量 (μ mole)
carbon dioxide	0.94	11.05	10.11
acetone	0.0	9.80	9.80
AIB	10.0	0.0	10.0
pyruvate	19.40	9.56	9.84
alanine	0.0	9.24	9.24

反応条件； Step 2 の酵素液 (1.26 単位), PLP 50 μ g, 0.09 M リン酸緩衝液 (pH 7.45), 全容 2.8 ml, 30°C. Warburg 検圧計で 40 分間反応後, 2N-H₂SO₄ 0.2 ml を加えて反応を停止した。
Pyruvate は硫酸セリウムで分解し生成する炭酸ガスから算出¹⁴⁾, alanine は E. W. YEMM ら²¹⁾ に従いニンヒドリンによる比色定量。

8. 酵素の基質特異性について

本酵素は α -dialkyl amino acids の脱炭酸とアミノ基転移とを同時に行なうと思われるので、酵素による脱炭酸量によってアミノ基質特異性を調べた (第6表)。BAILEY ら²⁾ も、精製酵素の特異性がかなり広いことを示唆している。ケト基質特異性は、AIB をアミノ基質とした場合、ケト基質が Pyruvate の時の活性を 100 とすると、 α -keto butyric acid は 81, α -keto-glutaric acid と phenyl pyruvic acid は 0 であった。

又、本酵素により DL- α -amino butyric acid, pyridoxamine のアミノ基は Pyruvate に転移されるが、L-valine, L-aspartic acid から Pyruvate へ、L-alanine から oxalacetate へのアミノ基転移は殆んど行なわれないことが、ペーパークロマトグラフィーによって明らかになった。

9. みかけの MICHAELIS 定数

PLP をも基質とみなせば、アミノ基転移酵素には基質が3つあることになり、それぞれの基質に対する MICHAELIS 定数 (K_m) が存在する。それぞれの基質に

第6表 アミノ基質に対する特異性

基質	CO ₂ 生成量 (μ mole)	相対活性 (%)
AIB	7.23	100
DL-2-methyl-2-aminovaleric acid	2.72	38
DL-2-methyl valine	2.72	38
2-ethyl-2-aminobutyric acid	2.90	40
DL-isovaline (2-methyl-2-aminobutyric acid)	3.97	55
L-alanine	0.09	1
DL-2-methyl serine	3.44	48
DL-2-methyl DOPA	0.117*	2
DL-2-methyl-glutamic acid	0	0
l-amino-cyclopropane-l-carboxylic acid	0	0

反応条件： Step 3 の酵素 (1.26 単位), アミノ基質 10 μ moles, pyruvate 20 μ moles, PLP 0.2 μ mole, 0.9 M リン酸緩衝液 (pH 7.45), 全容 2.8 ml, 30°C, 20 分間反応。基質の分解は検圧法により炭酸ガス生成量を測定した。

* 反応生成物であるケトンが検出できなかった。

第7表 みかけの K_m 値

対象基質	PLP 濃度 (mM)	AIB 濃度 (mM)	pyruvate 濃度 (mM)	K_m (M)
1. PLP	0.001~0.1	75	10	2.1×10^{-5}
2. AIB	0.1	2.5~75	10	4.8×10^{-3}
3. pyruvate	0.1	5	0.625-30	??*
	0.1	75	0.6-10	??*

1. Step 4' の酵素液に AIB を添加して透析した酵素液 (アポ酵素)。

2., 3. Step 4 の酵素液。その他の実験条件は方法の項を参照。

* Pyruvate 濃度が高くなると顕著な反応阻害がみられるため LINEWEAVER-BURK のプロットは直線を与えない。

** AIB 濃度が大きい時は pyruvate 濃度を変化させても反応速度は極めて僅かしか変化しない (K_m が極めて小さい)。

対する絶対的な K_m の求め方も知られているが^{7), 16)}, 便宜上, 2つの基質を一定に保ち、他の基質の濃度変化と反応速度変化から得られるいわゆるみかけの K_m 値を求めることが広く行なわれている。本酵素のみかけの K_m 値は第7表の如くであった。Pyruvate 濃度が AIB に対してかなり大きい部分では、反応の阻害を示す。こ

れは不活性な複合体である abortive complex (Enzyme-PLP-Pyruvate)^{(7), (8), (16)} の形成に起因するものと思われ興味ある問題である。

10. 熱処理に対する保護剤の効果

本酵素の熱処理に対する補酵素、基質の単独又は2つの組合わせの保護効果は第8表に示されている。アミノ基質は殆んど保護効果はないが PLP 又は Pyruvate の添加はやや有効であった。一方 PLP と AIB の両者の添加は保護効果を増大し、特に PLP と Pyruvate の共存は、それぞれ単独の場合のほぼ2倍の残存活性を示した。これは保護効果という面からみれば相乗的な効果といってもよいであろう。

N. OGASAWARA⁽¹⁵⁾ は Kynurenine transaminase の熱処理に対し PLP と keto glutaric acid が、本実験と同様な保護効果を示すことを報告している。

第8表 熱処理に対する保護剤の効果

熱 処 理	生成アセ トンO.D. 500 m μ	残 存 活 性 (%)	保護効 果 (1) との差
1. 酵素のみ	.136	34.7	—
2. 酵素+pyruvate	.164	43.2	8.5
3. " +PLP	.163	42.9	8.2
4. " +AIB	.134	35.5	0.8
5. " +PLP+AIB	.200	52.6	17.9
6. " +PLP+pyruvate	.307	80.8	46.1
対照 (熱処理なし)	.380	100	—

熱 処 理： 0.13 M リン酸緩衝液 (pH 7.45) 1.5 ml, step 4 の酵素 (蛋白 57 μ g), PLP 0.2 μ mole, AIB 150 μ moles, pyruvate 20 μ moles, 50°C, 5 分間加熱後氷冷水で冷却。

活性測定： 欠ける基質を加え全容 2 ml とする。方法の項参照。

考 察

AIB のアセトンへの分解は、最近 BAILEY ら⁽²⁾ の精製酵素 (95% 以上の純度という) による実験でも言われているように単一の酵素による脱炭酸とアミノ基転移反応に基づくと考えられる。本実験において、中間体と考えられる種々の化合物 (methacrylic acid, isobutyric acid, α -hydroxy isobutyric acid, isopropylamine, isopropanol) に生菌や粗酵素を作用させたところ、isopropanol のみ生菌によってアセトンを生成した。しかし AIB がアセトンへ分解されるような反応条件下では

isopropanol はアセトンに変化せず、上記化合物は直接の中間体とは考えられない。

α -dialkyl amino acids の α -カルボキシル基を切断し、アミノ基をケト酸に転移して、ケトンを生成する本酵素は、transferase と lyase の両区分に渡っており、AASLESTAD らの 2-methyl alanine decarboxylase, BAILEY ら⁽²⁾ の α -dialkyl amino acid transaminase という名称は必ずしも妥当ではない。その名称又は分類上の位置については今後検討されねばならない。

最終精製段階の酵素について吸収スペクトル (リン酸緩衝液中 pH 7.45) を調べたところ、吸収ピークは 279 m μ , 332 m μ , 390 m μ にみられその大きさは 1.00:0.14:0.06 であった。この吸収スペクトルは PLP が蛋白と特異的に結合して生ずるシフトは示していない。更にこの酵素液に過剰の PLP を添加した場合、390 m μ のピークは 5 m μ ぐらい長波長側にシフトするが、遊離の PLP の吸収が加算されたものと大差なかった。AIB の添加は 390 m μ の吸収をやや低下させ、330 m μ 付近の吸収を増大させる。これらの吸収スペクトルの解析や、酵素溶液中の PLP が透析には比較的安定であるが、硫酸塩析によって殆んど失なわれてしまうこと、PLP に対するみかけの K_m 値がかなり大きいこと等から、PLP と酵素蛋白の結合は比較的弱いものと思われる。BAILEY ら⁽²⁾ もこれらのことを指摘している。

W. T. JENKINS ら^{(7), (8), (16)} も述べているように transaminase の反応液中では不活性な abortive complex (Enzyme-PLP-Pyruvate, Enzyme-PMP-Alanine) が形成されると考えられる。本酵素の場合、Pyruvate に対する K_m 値測定に際して Pyruvate の AIB に対する相対濃度の大きい部分では Pyruvate による反応の阻害が顕著であること、熱処理に対して PLP, Pyruvate それぞれ単独では、保護効果は小さいが両者を加えると相乗的な保護効果がみられることなどの結果は、より安定な abortive complex (特に Enzyme-PLP-Pyruvate) の形成を考えることによって説明されうものと思われる。

要 約

土壌から分離された *Pseudomonas* sp. を使用して AIB の酵素的分解に関する一連の実験を行なった。

1. 生菌により AIB は適応的に脱アミノ、脱カルボキシルのもとにアセトンに分解される。

2. 酵素反応には AIB のアミノ基受容体としてケト酸、補酵素として Pyridoxal phosphate (PLP) が関与しており、粗抽出液の状態では、2つの Co-factor とも

最大活性を与えるには不十分な量しか存在していない。

3. PLP, Pyruvate を加えた酵素反応で AIB からアセトンへの分解を目安として酵素の精製を行ない、精製酵素について吸収スペクトル及びみかけの K_m の測定、金属の影響を調べた。

4. 酵素反応の化学量論性が確認され、アミノ基質、ケト基質について、酵素の基質特異性が調べられた。

5. 酵素の熱安定性に対する PLP と Pyruvate の共存による相乗的な保護効果、Pyruvate による酵素反応の阻害から、abortive complex 形成の可能性について考察した。

本報文をまとめるに当たり、細菌の取り扱い方に懇切な御指導をいただいた北海道大学農学部蚕学教室、飯塚敏彦氏、実験の一部を担当した中村浩三氏に厚く感謝する。

参 考 文 献

- 1) AASLESTAD, H. G. and A. D. LARSON 1964. J. Bacteriol. 88: 1296.
- 2) BAILEY, G. B. and W. B. DEMPSEY 1967. Biochemistry. 6: 1526.
- 3) BUCHERER, H. T. and V. A. LIEB 1934. J. Prakt. Chem. 141: 5.
- 4) CBRISTENSEN, H. N. and J. C. JONES 1962. J. Biol. Chem. 237: 1203.
- 5) 本間 守・下村得治 1969. 北大農学部邦文紀要 7: 1.
- 6) ITZHAKI, R. F. and D. M. GILL 1964. Anal. Biochem. 9: 401.
- 7) JENKINS, W. T. 1963. "Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis" ed. E. E. SNELL et al. p. 139. Pergamon press London.
- 8) JENKINS, W. T. and I. W. SIZER 1960. J. Biol. Chem. 235: 620.
- 9) JACOBSON, R. A. 1946. J. Am. Chem. Soc. 68: 2628.
- 10) KALYANKAR, G. D. and E. E. SNELL 1962. Biochemistry 1: 594.
- 11) KURONO, K. 1922. Biochem. Z. 134: 424.
- 12) MANDELS S.・R. KOPPLEMAN and M. E. HANKE 1954. J. Biol. Chem. 209: 327.
- 13) MARQUIS, R. E. and P. GERHARDT 1964. J. Biol. Chem. 239: 3361.
- 14) MEISTER, A. 1952. J. Biol. Chem. 197: 309.
- 15) OGASAWARA, N. 1962. J. Vitaminol (Kyoto) 8: 292.
- 16) SAIER, M. H. and W. T. JENKINS 1967. J. Biol. Chem. 242: 91.
- 17) SCHEPARTZ, A. J. 1961. J. Chromatog. 6: 185.
- 18) SINGER, T. P. and E. B. KEARNEY 1950. Arch. Biochem. 29: 190.
- 19) STEPHENSON, M. 1949. "Bacterial metabolism" ed. 3, p. 183. Longmans Green and Comp. London.
- 20) WILSON, E. M. and E. E. SNELL 1962. J. Biol. Chem. 237: 3171, 3180.
- 21) YEMM, E. W. and E. C. COCKING 1955. Analyst 80: 209.