



Title	Thiaminase I 産生機構に関する基礎的研究
Author(s)	西井, 正博
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30571
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	にし 西	い 井	まさ 正	ひろ 博
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	2517	号	
学位授与の日付	昭和47年3月25日			
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	Thiaminase I 産生機構に関する基礎的研究			
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣			
	(副査) 教授 上原 喜八郎 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温			

論文内容の要旨

緒 論

B. thiaminolyticus の菌体外酵素である Thiaminase I の産生に関する研究は少なく、その産生機構は不明な点が多かった。著者は B. thiaminolyticus の洗浄菌体を用いて非増殖系で Thiaminase I 産生を行なわせることに成功し、この系を用いて Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制ならびに Thiaminase I の菌体外への分泌など Thiaminase I 産生機構について基礎的知見を得ることができた。

本 論

(1) B. thiaminolyticus の増殖系および非増殖系における Thiaminase I 産生について

Thiaminase I 産生と Culture Age との関係を検討し、生理的变化にともなう酵素産生の変動を探究することは、Thiaminase I の産生機構解明における生理学的なアプローチのひとつとして重要な基礎的知見であるといえる。

増殖培地において Thiaminase I 産生は対数期後期以後の菌で行なわれた。菌体を室温下で洗浄してクエン酸培地にけん濁すると、菌の増殖はおこらずに、Thiaminase I が lag 期間なしに産生された。クエン酸培地にグルコースあるいはグリセリンを添加したとき、菌の増殖がいくらかおこり、Thiaminase I 産生はかなり抑制された。クエン酸培地に CM あるいはアクチノマイシン D を添加すると Thiaminase I 産生のほとんどが阻害された。

以上の結果から B. thiaminolyticus の Thiaminase I 産生が Culture Age の古い菌で行なわれていること、また本研究において考案したクエン酸培地は非増殖系培地として Thiaminase I 産生に適した培地であることが明らかとなった。

(2) Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制について

Thiaminase I 産生は基質である Thiamine の添加により抑制されるが、その機構は全く明らかにされていなかった。この Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制を非増殖系での Thiaminase I 産生系を用いて検討した。

クエン酸培地に Thiamine を添加したとき、培養液の菌量の増加をひきおこすことなく Thiaminase I の de novo 合成が抑制されることを抗 Thiaminase 抗体を用いて明らかにした。Thiaminase I 産生が抑制された菌体は Thiamine を含まない新しい培地でも Thiaminase I を産生しなかった。¹⁴C-Thiamine をとりこんだ菌体には、Thiamine, TMP, TDP としての放射活性とわずかではあるがリン酸化型 MHT の放射活性も検出された。Thiaminase I 産生は MHT および OMPm の添加では抑制されなかったが、Thiamine 拮抗物質である Pyrithiamine, Oxythiamine, Amprolium あるいは Dimethialium の添加により抑制された。

以上の結果から Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制が菌体内のリン酸化型 Thiamine 量のみに基づくものではないことが明らかとなり、リン酸化型 Thiamine のみならず遊離型 Thiamine あるいはピリミジン構造とそのメチレン橋で結合している 4 級窒素含有の芳香環をもつ化合物がこの抑制に働くこと、また分解生成物であるチアゾール部分はこの抑制に関与しないことが推察された。

(3) Thiaminase I の菌体内局在部位およびその存在様式について

菌体外蛋白質と同じ蛋白質が菌体にも存在するときに、その菌体内での局在部位およびその存在様式を検討することは菌体外蛋白質の分泌機構に重要な示唆を与える。

菌体を MBS あるいは Diazo-NDS と反応させると、菌体内の Thiaminase I 活性は阻害されたが、Glutamic Dehydrogenase 活性は阻害されなかった。抗 Thiaminase 抗体を菌体と反応させた場合には、菌体内の Thiaminase I 活性を中和することができなかった。菌体を 0.58M NaCl を用いて Osmotic Shock することにより菌体内の Thiaminase I のほとんどが遊離したが、0.58M ショ糖を用いた場合にはこのような遊離はおこらなかった。菌体を Broun 細胞ホモゲナイザーで破壊すると、Thiaminase I 活性は 10,000 xg および 100,000 xg 遠沈の沈殿画分にはみられず、上清にのみ存在していた。Sephadex G-100 によるゲルろ過において菌体内と菌体外の Thiaminase I は同じ画分に溶出してきた。抗 Thiaminase 抗体を用いた免疫電気泳動においても菌体内と菌体外の Thiaminase I 標品は同じ位置に唯一の沈降線を示した。Double Diffusion 法で得られた抗 Thiaminase 抗体の沈降線において、菌体内と菌体外 Thiaminase I 標品の沈降線は融合していた。菌体内の Thiaminase I の一部は CM 存在のクエン酸培地で遊離するが、菌体外 Thiaminase I として検出されたものは CM 無添加で産生された菌体外 Thiaminase I の約 3 分の 1 であった。

以上の結果から菌体内の Thiaminase I のほとんどが細胞質膜の透過関門の外側である Periplasmic Space に菌体外 Thiaminase I と同じ構造で存在していることが明らかとなり、合成された Thiaminase I は合成と同時に細胞膜を通過し、一部はそのまま菌体外へ、一部は Periplasmic Space に保持された後に、菌体外へ遊離することが推察された。

結 論

B. thiaminolyticus の菌体外酵素である Thiaminase I は Culture Age の古い菌で産生されるが、

洗淨菌体をクエン酸のみを炭素源としたクエン酸培地にけん濁させることにより、菌を増殖させずに、lag 期間なしで Thiaminase I 産生を行なわせることが可能になった。この非増殖系培地は菌の生理的な面においても Thiaminase I 産生に適したものであり、この系を用いて Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制および菌体外への分泌について検討を行なった。

Thiamine による Thiaminase I 産生の抑制は菌体内のリン酸化型 Thiamine 量にのみ基づくものではないことが明らかとなり、リン酸化型 Thiamine のみならず遊離型 Thiamine あるいはピリミジン構造とそのメチレン橋で結合している 4 級窒素含有の芳香環をもつ化合物がこの抑制に働くこと、また分解生成物であるチアゾール部分はこの抑制に関与しないことが推察された。

菌体内に存在する Thiaminase I のほとんどは細胞質膜の外側である Periplasmic Space に菌体外 Thiaminase I と同じ構造で存在していることが明らかとなり、合成された Thiaminase I は合成と同時に細胞質膜を通過し、一部はそのまま菌体外へ、一部は Periplasmic Space に保持された後に菌体外へ遊離することにより Thiaminase I の分泌が行なわれることが推察された。

論文の審査結果の要旨

Bacillus thiaminolyticus による Thiaminase I が Culture age の古い菌で、クエン酸のみを炭素源とした培地で菌を増殖させずに Lag 期間なしで行なわれることを見出し、本方法により Thiaminase I は合成されるとただちに菌体外へ、他は Periplasmic Space に保持されて後菌体外へ遊離されることを明らかにし、菌体内 Thiaminase I は菌体外のそれと同一の構造をしていることを明らかにした。菌体外蛋白質の産生機構解明に新しい方向を見出したものと云えるので薬学博士の学位を授与するに値する論文である。