

# 琉球大学学術リポジトリ

## 細菌の細胞懸濁液によるタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応について(農芸化学科)

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語:<br>出版者: 琉球大学農学部<br>公開日: 2008-02-14<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 当山, 清善, 宮里, 興信, 当間, 孝子, 左右田, 健次<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4426">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4426</a>                                   |

# 細菌の細胞懸濁液によるタウリン-ピルビン酸 アミノ基転移反応について

当山清善\* 宮里興信\* 当間孝子\*\* 左右田健次\*\*\*

Seizen TOYAMA, Koshin MIYAZATO, Takako TOMA, and Kenji SODA:  
On the transamination reaction of taurine with pyruvate in the cell  
suspension of a soil bacterium

## I 緒 言

$\alpha$ -アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基を $\alpha$ -ケト酸へのアミノ基転移反応を触媒する酵素(トランスアミナーゼ)はすべての生物に存在し、本酵素の生理的意義ならびに酵素化学的性質が明らかにされている。また、 $\omega$ -アミノ基を有する $\beta$ -アラニンや $\gamma$ -アミノ酪酸などのような $\omega$ -アミノ酸をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応を触媒する酵素の存在が動物、植物および微生物において見いだされている(1, 3, 4)。しかし、スルホン酸基を有し一種の含硫 $\omega$ -アミノ酸であるタウリン(2-アミノエタンスルホン酸)をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応についての研究報告はこれまでなかった。

本研究は、細菌におけるタウリンの代謝過程に関与する酵素の性質を明らかにすることを目的としており、最近、筆者ら(6, 7)は細菌の無細胞抽出液中に $\alpha$ -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とするタウリンアミノ基転移酵素が存在することを明らかにした。本報においては、タウリン培地に生育する土壌から分離した細菌の菌体におけるタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応を触媒する酵素の存在を調べるとともに、反応の2, 3の性質について検討したので報告する。

## II 実験方法

1. 使用菌株： 供試菌株は、前報(8)において土壌から分離したタウリンを含む培地に良好な生育を示すW-64菌の細菌(未同定)である。

2. 培地組成および培養方法： グリセリン-ペプトン培地は前報で設定した組成、すなわち、グリセリンおよびペプトン各0.5%、第一および第二リン酸カリウム各0.1%、硫酸マグネシウム0.01%および酵母エキス0.01%の培地である。 $\omega$ -アミノ酸培地は、グリセリンおよびペプトンを除いた上記の培地にタウリン、 $\beta$ -アラニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸などの $\omega$ -アミノ酸を唯一の炭素源および窒素源として0.4%、酵母エキス0.01%を加えた組成である。培養は培地100mlを500ml容振とうフラスコに入れ菌接種後30°C、20~22時間振とう培養して行なった。休止細胞液は、遠心分離して

\* 琉球大学農学部農芸化学科

\*\* 宝酒造株式会社中央研究所

\*\*\* 京都大学化学研究所

集めた菌体を0.85%の食塩水で3回洗浄した後0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁させて調製した。

3. 分析方法： 酵素反応で生成するアミノ酸は、Sodaら (5) の方法に従い円形濾紙クロマトグラフィで分離したアミノ酸を銅イオン添加のニンヒドリン呈色により定量した。菌体量およびpH値の測定は前報のとおりである。

4. アミノ基転移反応酵素活性の測定法： 酵素反応液の組成はタウリンなどのアミノ基供与体  $20 \mu\text{ moles}$ , ピルビン酸などのアミノ基受容体  $20 \mu\text{ moles}$ , リン酸緩衝液 (pH8.0)  $40 \mu\text{ moles}$ , 休止細胞懸濁液  $1 \sim 7 \text{ mg}$  (乾燥菌体量として), 総量  $1.0 \text{ ml}$  とした。酵素反応は  $37^\circ\text{C}$ , 60分間行ない, 25%三塩化酢酸  $0.1 \text{ ml}$  を加えて反応を止め, 遠心分離によって除菌した上澄液について生成したアミノ酸を定量した。コントロールは反応液組成からアミノ基供与体を除き同様に行なった。酵素活性は生成アミノ酸量 ( $\mu\text{ moles}$ ) / 乾燥菌体量 ( $\text{mg}$ ) / 反応時間 (60分) で表わした。

### III 実 験 結 果

#### 1. 培地組成とタウリンーピルビン酸アミノ基転移酵素活性

炭素源としてタウリン, グルコースおよびグリセリン, 窒素源としてタウリンおよびペプトンなどを含む各培地にW-64菌株を培養して得られる生菌体を用い, タウリンをアミノ基供与体とするタウリンーピルビン酸アミノ基転移酵素活性を調べた。その結果はTable 1に示す如くである。表から明らかのように, タウリンのみを含む培地で生育した菌体は本酵素活性を示すが, グルコースータウリンおよびグルコースーペプトン培地で得た菌体はほとんど本酵素活性を有していない。一方, グリセリンータウリンおよびグリセリンーペプトン培地の菌体はタウリン培地と同程度の活性を示す。本実験に供したW-64菌株は, 前報で示したとおり, 窒素源としてタウリンよりも, ペプトンを含む培地において生育が良好である。しかし, 酵素活性はグリセリンータウリンおよびグリセリンーペプトン培地で同じであるので, 酵素が培地にタウリンを加えることによって誘導生成されたとは考えられない。従って, 培地組成としてはタウリンを含む培地よりも, 菌体生育および酵素活性共に高い値を示すペプトンを含むグリセリン培地が適当である。良好な生育を示すグルコースを含む培地で得た菌体が本酵素活性を示さない理由は不明である。

#### 2. 酵素活性に及ぼす培地中の $\omega$ -アミノ酸の影響

タウリンーピルビン酸アミノ基転移酵素活性は培地にタウリンを加えても増大しないことがわかったので, 次にタウリン以外の $\omega$ -アミノ酸を唯一の炭素源および窒素源として培地に加えることにより酵素活性が増加するかどうかを調べた。Table 2で明らかのように, 培地に $\beta$ -アラニンを加えることにより活性が増大し, タウリン培地で得た菌体の約2倍の活性を示した。 $\gamma$ -アミノ酪酸および $\epsilon$ -アミノカプロン酸を含む培地の菌体では活性の増加がみられなかった。 $\beta$ -アラニン培地ではタウリン培地にみられるようなpHの低下もなく, 生育が良好であった。また, グリセリンおよびペプトンとともに $\beta$ -アラニンを培地に加えると生育もよく, 活性も増大することがわかった。

#### 3. タウリンおよび $\beta$ -アラニン培地で生育した菌体の $\omega$ -アミノ酸アミノ基転移酵素活性

Table 1に示したように,  $\beta$ -アラニンを含む培地で得たW-64菌株の生菌体は比較的高いタウリンアミノ基転移酵素活性を有する。次にタウリンならびに $\beta$ -アラニンを含む培地で生育させた各菌体を用いて各種 $\omega$ -アミノ酸をアミノ基供与体とする酵素活性を調べた。すなわち, アミノ基受容体としてピルビン酸を用い, 各 $\omega$ -アミノ酸を基質とし反応後生成する $\alpha$ -アラニンを測定した。その結果はTable 3に示すとおりである。タウリン培地から得た菌体は基質として用いた4種の $\omega$ -アミノ酸に対して活性を示すが, その活性値は極めて低い。一方, タウリンの代りに $\beta$ -アラニンを含む培地から得

**Table 1. Taurine: pyruvate transaminase activity of the intact cells of W-64 strain grown in various media**

| Carbon and nitrogen source of the medium | Specific activity |
|--|-------------------|
| Taurine                                  | 0.042             |
| Glucose-taurine                          | 0.003             |
| Glucose-peptone                          | 0.003             |
| Glycerin-taurine                         | 0.043             |
| Glycerin-peptone                         | 0.042             |

W-64 strain, a bacterium isolated from soil, was grown aerobically at 30°C for 20 hrs, and the cells harvested and washed were used as the enzyme source. The composition of the growth medium was as follows: 0.05% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% dipotassiumphosphate, 0.005% magnesium sulfate, 0.01% yeast extract, and carbon and nitrogen source (0.3% taurine, 0.5% glycerine, 0.5% peptone, or 0.5% glucose). Transaminase activity was assayed by measuring  $\alpha$ -alanine formed in the reaction mixture. The assay system contained 20  $\mu$  moles of taurine, 20  $\mu$  moles of pyruvate, 40  $\mu$  moles of potassium phosphate buffer, pH 8.0, and cell suspension in a final volume of 1.0 ml. Incubation was carried out at 37°C for 60 min. An enzyme unit was defined as the amounts of enzyme required to form 1  $\mu$  mole of  $\alpha$ -alanine per 60 min. The specific activity was expressed as units per mg of dried cells.

**Table 2. Taurine:pyruvate transaminase activity of the intact cells of W-64 strain grown in the medium containing  $\omega$ -amino acid.**

| Carbon and nitrogen source of the medium | Specific activity |
|--|-------------------|
| Taurine                                  | 0.043             |
| $\beta$ -Alanine                         | 0.105             |
| $\gamma$ -Aminobutyrate                  | 0.032             |
| $\epsilon$ -Aminocaproate                | 0.037             |

Enzyme source was the intact cells of W-64 strain grown in the medium containing 0.4%  $\omega$ -amino acid, the source of carbon and nitrogen. Other conditions are the same as shown in Table 1.

**Table 3.  $\omega$ -Amino acid transaminase activity of the intact cells of taurine and  $\beta$ -alanine-grown W-64 strain**

| Amino donor               | Enzyme source       |                              |
|---------------------------|---------------------|------------------------------|
|                           | Taurine-grown cells | $\beta$ -Alanine grown cells |
|                           | (specific activity) |                              |
| Taurine                   | 0.042               | 0.104                        |
| $\beta$ -Alanine          | 0.061               | 0.632                        |
| $\gamma$ -Aminobutyrate   | 0.038               | 0.784                        |
| $\epsilon$ -Aminocaproate | 0.028               | 0.268                        |

Enzyme source was the intact cells of W-64 strain grown in the medium containing 0.4% taurine on  $\beta$ -alanine as the source of carbon and nitrogen. Taurine,  $\beta$ -alanine,  $\gamma$ -aminobutyrate and  $\epsilon$ -aminocaproate were used as the amino donor in the enzyme assay system. Other conditions are given in Table 1.

た菌体はどの $\omega$ -アミノ酸に対しても高い活性を示している。培地に $\beta$ -アラニンを加えると、タウリンを除く $\omega$ -アミノ酸に対して10倍から20倍活性が高められる。従って、これらの $\omega$ -アミノ酸をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応を触媒する菌体中の酵素の生成が培地に $\beta$ -アラニンを加えることによって誘導されることを示している。タウリンをアミノ基供与体とした場合には、他の $\omega$ -アミノ酸に比して活性の増加は低い。これは誘導生成された本酵素の基質特異性に基因するものと考えられる。

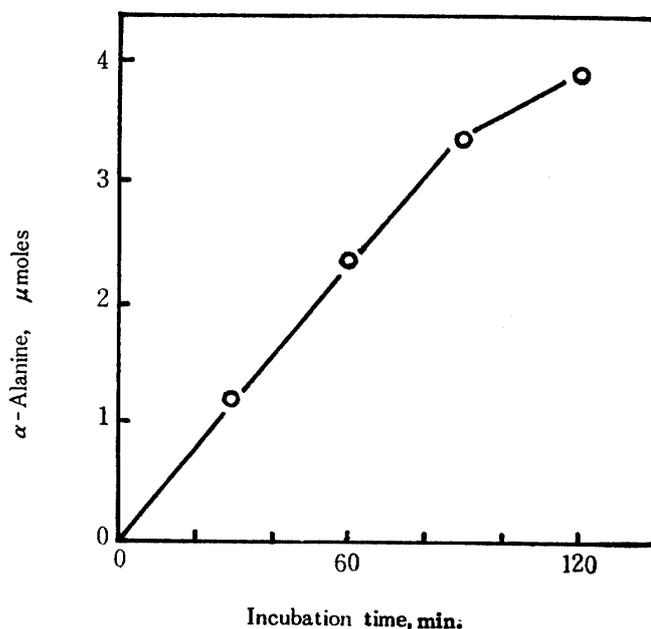
#### 4. タウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応で生成する $\alpha$ -アラニン

$\omega$ -アミノ酸をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応を触媒する酵素活性が培地中の $\beta$ -アラニンによって増大することが明らかになったので、 $\beta$ -アラニン生育菌体を用いたウリンをアミノ基供与体とする反応について調べた。Fig. 1はタウリンとピルビン酸を基質とした場合における反応時間と反応で生成する $\alpha$ -アラニンの量との関係を示したものである。反応時間とともに $\alpha$ -アラニンの生成が増大し、反応60分間まで直線的に増加している。

酵素反応に用いる菌体重量と $\alpha$ -アラニンの生成量との関係を示したものがFig. 2である。反応液中の菌体量が増加するとともに $\alpha$ -アラニンの生成が増大し、菌体量が5 mgまでほぼ直線的に増大する。このように $\alpha$ -アラニンの生成量が反応時間ならびに使用菌体量に比例することは、本酵素反応において基質であるピルビン酸がアミノ基受容体となっていることを示すものである。

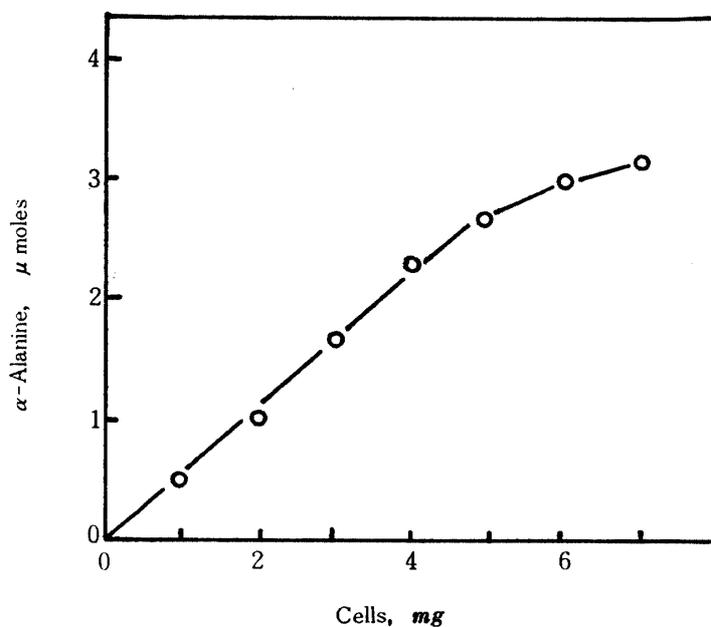
#### 5. タウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応

タウリンおよびピルビン酸を基質として菌体を作用させると $\alpha$ -アラニンが生成することが明らかになったので、次に $\alpha$ -アラニンの生成条件を検討した。その結果はTable 4に示す如くである。反応系からタウリンあるいはピルビン酸を除くと $\alpha$ -アラニンの生成は全くみられない。また、反応混液中に菌体が存在しないと $\alpha$ -アラニンは生成しない。従って、本反応における $\alpha$ -アラニンの生成にはアミノ基供与体、アミノ基受容体の両者が必要であることがわかる。



**Fig. 1. Time course of the formation of  $\alpha$ -alanine in taurine-pyruvate transaminase reaction**

Enzyme source was the  $\beta$ -alanine-grown cells (4.0 mg, dry weight) of W-64 strain. Other conditions are the same as Table 1.



**Fig. 2. Effect of cell concentration on the formation of  $\alpha$ -alanine in taurine-pyruvate transaminase reaction**

The enzyme reaction was carried out for 60 min. Other conditions are the same as shown in Fig. 1 except the indicated cell concentrations.

**Table 4. Transaminase reaction between taurine and pyruvate**

| Enzyme assay system | $\alpha$ -Alanine formed |
|---------------------|--------------------------|
| Complete system     | 2.71                     |
| Minus taurine       | 0                        |
| Minus pyruvate      | 0                        |
| Minus cells         | 0                        |

$\beta$ -Alanine-grown cells (5.0 mg) were used in the enzyme reaction.  
Other conditions are the same as described in Table 1.

#### 6. 酵素反応とアミノ基受容体

Table 3 に示したように、 $\beta$ -アラニン生育菌体はピルビン酸をアミノ基受容体とした $\omega$ -アミノ基転移反応を触媒することが明らかになったのであるが、次にアミノ基受容体の特異性を調べた。Table 5 はピルビン酸、 $\alpha$ -ケトグルタール酸およびオキザル酢酸をアミノ基受容体として4種の $\omega$ -アミノ酸について、反応で生成するアミノ酸を測定した結果である。表から明らかなように、本菌体酵素による反応におけるアミノ基受容体としては、ピルビン酸が良好な基質となり、 $\alpha$ -ケトグルタール酸およびオキザル酢酸はほとんど基質となり得ないことがわかった。このことから菌体中の酵素は、ピルビン酸をアミノ基受容体し、 $\omega$ -アミノ酸をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応を特異的に触媒するものと考えられる。

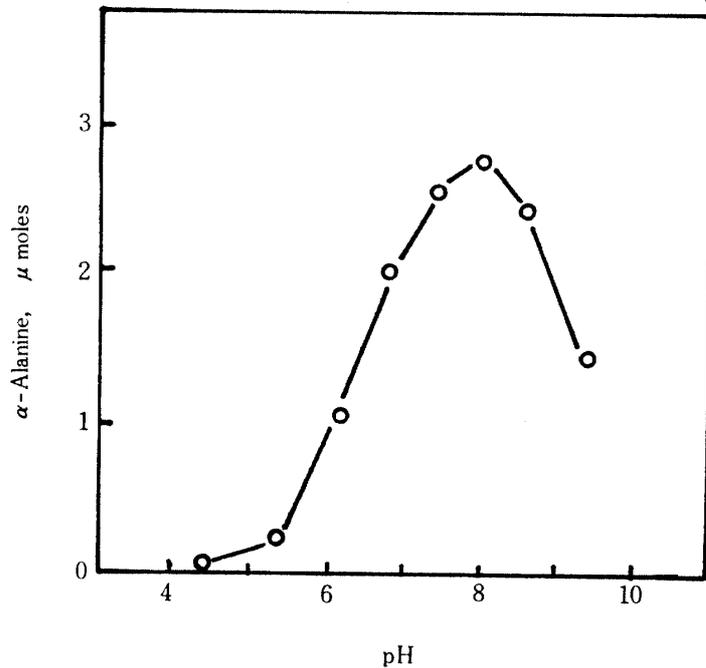
**Table 5. Transaminase activity between  $\omega$ -amino acids and three amino acceptors**

| Amino donors              | Amino acceptors |  |             |
|---------------------------|-----------------|--|-------------|
|                           | Pyruvate        | $\alpha$ -Ketoglutarate<br>(specific activity) | Oxalacetate |
| Taurine                   | 0.103           | 0  | 0           |
| $\beta$ -Alanine          | 0.630           | 0.001  | 0           |
| $\gamma$ -Aminobutrate    | 0.784           | 0.001  | 0           |
| $\epsilon$ -Aminocaproate | 0.265           | 0  | 0           |

The enzyme activity was assayed by measuring the corresponding amino acids formed in transamination reaction between  $\omega$ -amino acids and amino acceptors.  $\beta$ -Alanine-grown cells were used as the enzyme source. Other conditions are the same as described in Table 1.

#### 7. 酵素活性に及ぼすpHの影響

タウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応に及ぼす影響を調べたのがFig. 3 である。本反応の最適pHは8.0付近にあり、pH 5 以下では酵素反応は起らない。また、pHが9.0以上になると酵素活性が低下してくる。



**Fig. 3. Effect of pH on the activity of taurine-pyruvate transaminase activity**  
 $\beta$ -Alanine-grown cells (4.0mg) were used as the enzyme source. The following buffers (final concentration, 0.1 M) were used. Sodium acetate, pH 4~5; potassium phosphate, pH 6~8; Tris-HCl, pH 8~9; borate, pH 9~10. Other conditions are the same as shown in Table 1.

#### IV 考 察

本実験で使用した細菌，W-64菌株はタウリンを含む培地における生育が悪く，前報(8)で設定したグリセリンーペプトン培地において良好な生育を示す。しかし，良好な生育を示すペプトンを含む培地で生育させた菌体のタウリンーピルビン酸アミノ基転移酵素活性は極めて低く，タウリンを培地に加えても活性の増加はみられない。従って，菌体中における本酵素の生成は菌体の生育度とも関係なく，また培地に加えるタウリンによっても影響されない。本酵素活性と培地に加える $\omega$ -アミノ酸との関係を調べた結果， $\beta$ -アラニン培地から得た菌体の酵素活性が高く，また $\beta$ -アラニン， $\gamma$ -アミノ酪酸および $\epsilon$ -アミノカプロン酸などをアミノ基供与体とした酵素活性が著しく高められた。このことは培地中の $\beta$ -アラニンによって $\omega$ -アミノ酸の関与する酵素が誘導生成されることを示すものである。1961年，Hayaishiら(2)は*Pseudomonas*属細菌の $\beta$ -アラニンーピルビン酸アミノ基転移酵素が培地中の $\beta$ -アラニンによって誘導生成されることを報告している。供試W-64菌株は培地に $\gamma$ -アミノ酪酸および $\epsilon$ -アミノカプロン酸を加えると $\beta$ -アラニンの関与する酵素活性も高められることが確かめられた。

W-64菌株の菌体はタウリンとピルビン酸を基質として $\alpha$ -アラニンの生成反応を触媒しており，反応系から両基質を除くと全く $\alpha$ -アラニンの生成がみられない。従って，反応で生成した $\alpha$ -アラニンはアミノ基転移反応によって生成されたものと考えられる。本実験においては，タウリンがアミノ基転移反応を受けて生成する物質についての単離同定は行なわなかったが，タウリンー $\alpha$ -ケトグルタル酸アミノ基転移反応においてすでに明らかにしたように(6, 7)，本物質はスルホアセトアルデヒドであろう。本酵素反応，反応生成物ならびに酵素の性質については菌体の無細胞抽出酵素液を用いて検

討中である(9)。

## V 要 約

土壌などの試料から分離した細菌, W-64菌株の菌体懸濁液を酵素液としてタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応を触媒する酵素について調べ, 次の結果を得た。

1. 菌体のタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応活性は培地に $\beta$ -アラニンを加えることによって著しく増大した。
2. 酵素反応における $\alpha$ -アラニンの生成にはタウリンおよびピルビン酸の両基質が必要であった。生成する $\alpha$ -アラニンの量は反応時間および酵素量に比例した。アミノ基受容体としてはピルビン酸が良好な基質であった。反応の最適pHは8.0付近にあった。
3.  $\beta$ -アラニン含有培地で得た菌体はピルビン酸をアミノ基受容体として $\beta$ -アラニン,  $\gamma$ -アミノ酪酸および $\epsilon$ -アミノカプロン酸をアミノ基供与体とするアミノ基転移反応も触媒した。

## 文 献

1. Guirard, B. M. and Snell, E. E. 1964 Vitamin B<sub>6</sub> function in transamination and decarboxylation reactions., *Comp. Biochem.*, **15**: 138~199
2. Hayaishi, O., Nishizuka, Y., Tatibana, M., Takashita, M. and Kuno, S. 1961 Enzymatic studies on the metabolism of  $\beta$ -alanine, *J. Biol. Chem.*, **236**: 781~790
3. Meister, A. 1965 "Biochemistry of the amino acids," 2nd ed. p. 338~369 Academic Press Inc., New York
4. Snell E. E. and Di Mary, S. J. 1970 "The Enzymes (ed. by Boyer, P. D.)," Vol. II, p. 335~350, Academic Press Inc., New York
5. Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms, *Agr. Biol. Chem.* **25**: 811~819
6. 当山清善, 左右田健次 1971 細菌におけるタウリン- $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応について, *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. **24**: 50~57
7. Toyama, S. and Soda, K. 1972 Occurrence of taurine- $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase in bacterial extracts, *J. Bacteriol.* **109**: 533~538
8. 当山清善, 当間孝子, 宮里興信 1973 タウリン培地に生育する細菌の分離と生育条件の検討, 琉球大学農学部学術報告 **20**: 95~103
9. 当山清善, 安田正昭, 宮里興信, 左右田健次 1973 細菌におけるタウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ反応, 昭和48年度日本農芸化学大会, 講演要旨集, p. 321

## Summary

This paper presents the enzyme catalyzing the transamination of taurine with pyruvate in the cell suspension of W-64 strain, a bacterium which utilizes taurine as a sole carbon and nitrogen source.

1. The transaminase activity of the cells was enhanced greatly by addition of  $\beta$ -alanine to the growth medium.
2. In the enzyme reaction, both taurine and pyruvate as substrate were required to

produce  $\alpha$ -alanine. The formation of  $\alpha$ -alanine proceeded linearly as a function of incubation time and cell concentration. Pyruvate was one of the best amino acceptor. The pH optimum of the reaction was around 8.0.

3.  $\beta$ -Alanine-grown cells also catalyzed the transamination reaction of  $\gamma$ -aminobutyrate,  $\beta$ -alanine,  $\epsilon$ -aminocaproate, and taurine in this order with pyruvate.