

大腸菌におけるデオキシリボシル転移反応について:
チミジンフォスホリラーゼ及びプリンヌクレオシ
ドフォスホリラーゼによるデオキシリボシル転移
反応

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4617

大腸菌におけるデオキシリボシル転移反応について

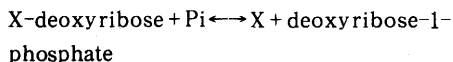
—チミジンフォスホリラーゼ及びプリンヌクレオシドフォスホリラーゼによるデオキシリボシル転移反応—

金沢大学医学部第二生化学講座 (主任: 久野 滋教授)

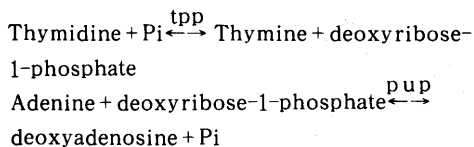
林 道 子

(昭和50年5月13日受付)

動物および微生物において種々の nucleoside の加リン酸分解あるいは nucleoside と核酸塩基相互間の pentose 転移反応は nucleoside 代謝上重要な役割を果たしている。この加リン酸分解反応は nucleoside phosphorylase によって



の如く可逆的に触媒される。一般的には反応は生体内で右側に進行し主として catabolism に関与すると考えられるが、充分な deoxyribose-1-phosphate 供給下では nucleoside 合成を行うことができる。deoxynucleoside の phosphorylase として thymidine phosphorylase (tpp) と purine nucleoside phosphorylase (pup) の2種が知られている^{1)~3)}。これに対して deoxynucleoside の pentose 転移反応すなわち Transdeoxyribosylation (TDR 反応) は何れの生物内でも重要な反応として存在するが、これを触媒する酵素、trans-N-deoxyribosylase は現在迄のところ乳酸菌類でのみ見出され^{4)~6)}、他の生物には独立した酵素として存在していない。従って他の生物における purine および pyrimidine 間の TDR 反応は tpp と pup の両酵素の共同作用によるものと考えられてきた⁷⁾⁸⁾。すなわち



の連続した反応によって転移反応が行われる。この反応は両酵素の性質から考えて *in vitro* で当然起り得

る反応ではあるが、必ずしも *in vivo* で同じ反応形式で起ることは意味しない。上記の反応が効果的に起るためには中間体の deoxyribose-1-phosphate が充分量産生されることが必要であり、事実 *in vitro* での TDR 反応は *in vivo* での反応に比して著しく遅いことが知られている⁹⁾。しかしながら大腸菌では上記の2酵素の何れかが欠除した場合 TDR 反応が起らないことから *in vivo* の反応も両酵素が関与していることは間違いなく⁹⁾、*in vivo* では効果的に TDR 反応を行うために両酵素の物理的配置等に未知の機構が存在しているものと推定される。本研究では大腸菌から分離精製した tpp および pup の性質と *in vitro* での TDR 反応の条件および特性を明らかにする目的で行われた。その結果 *in vitro* において見られる TDR 反応は上記の2反応の単なる連鎖によるものではなく、恐らく両酵素は弱い相互作用によって complex を形成し、この complex によって TDR 反応が行われているものと推定された。

方 法

酵素源として大腸菌 Y70-22 を用いた¹⁰⁾。本菌は thymine 要求性で tpp と pup を constitutive に産生する。菌は nutrient broth で培養し stationary phase に達した菌を集めて酵素抽出を行った。

使用した薬品はすべて市販のものを用いた。Controlled-Pore Glass, CPG-10-240-(120/240) は ELECTRO-NUCLEONICS, INC. より購入した。

酵素反応の測定

tpp 活性の測定は Razzel および Khorana¹¹⁾ の方法によった。すなわち 16mM の thymidine, 0.05M succinate-0.05M sodium arsenate (pH6.0) と酵

Transdeoxyribosylation Activity in *Escherichia coli*. Transdeoxyribosylation catalyzed by thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase. Michiko Hayashi, Department of Biochemistry (II) (Director: Prof. S. Kuno) School of Medicine, Kanazawa University.

素を含む反応液 (0.20ml) を10分間37°Cで反応させた後、1.5mlの0.3N NaOHを加え、300m μ の吸光度を測定した。吸光度1.0の増加が0.471 μ Moleの thymine 生成に相当する。1 μ Moleの thymine を1分間に生成する酵素量を1 unit とした。

pup 活性の測定は Tsuboi および Hadson¹²⁾ の方法の変法¹⁴⁾を用いた。すなわち 5 mM deoxyguanosine, 0.1M sodium acetate-0.05M sodium arsenate (pH6.0) と酵素を含む反応液 (0.25ml) を37°C10分間反応させた後、0.5mlの20%Na₂CO₃を加え、更に0.75mlの6倍希釈の Phenol Reagent を加えて37°C20分間静置した後、660m μ での吸光度を測定した。吸光度1.0の増加が guanine 0.278 μ Mole生成に相当する。1 μ Moleの guanine を1分間に産生する酵素量を1 unit とした。

TDR 活性は Munch-Petersen の方法¹³⁾に多少の変更を加えた¹⁴⁾。すなわち 4 mM の thymidine, 1mM の adenine, 10 μ Mのリン酸, 0.016M acetate buffer (pH6.5) および酵素液を含む0.50mlの反応液を37°C30分間反応させた後、10N過塩素酸 0.025mlを加えて反応を止め、この間生じた deoxyribose リン酸および deoxyadenosine を Burton の法¹⁵⁾により測定した。tpp による thymidine 分解を補正するため adenine を除いた反応液を同様に処理し、この値を上記の値から差引いたものを TDR 活性とした。1分間に1 μ Moleの deoxyadenosine を生成する酵素量を1 unit とした。

蛋白量は Lowry 等の方法¹⁶⁾で Bovine serum albumine を standard として測定した。

結 果

酵素の精製

6 gの菌を Taketo 及び Kuno¹⁴⁾の方法に従って osmotic shock を行い、上澄液 (shocked fluid) 30mlを得た。これを図1に示した方法で精製を行った。すなわち shocked fluid を蒸留水に対して12時間透析した後、遠心して上清と沈澱に分けると、tpp の大部分は上清に、pup の大部分は沈澱に集った。

tpp : 上記の上清を80%飽和の硫酸で沈澱し、その沈澱を約1mlの0.05M Tris-Cl pH7.5に溶解し Sephadex G-200 (2.6 \times 50cm) カラムクロマトグラフィーを行った。tpp は pup より僅かに遅れて流出するのでその活性部を集めて80%飽和の硫酸で沈澱させ、少量の0.05M Tris-Cl pH7.5に溶解した後、同緩衝液に対して透析を行った。遠心後上清をあらかじめ0.2M KCl-0.05M Tris-Cl pH7.5で平衡化した CPG-

10 カラム (1.6 \times 30cm) に流し、次に同緩衝液で溶出した。活性部分を集めて透析した後、0.2M KCl-0.02 M glycylglycine pH8.0で平衡化した CPG-10 カラムに流し、同緩衝液を250ml流した後、0.02M glycylglycine pH8.0で溶出した。混在する pup は0.2 M KClを含む緩衝液で溶出され、tpp は後者の緩衝液で溶出される。

pup : shocked fluid を透析して得られた沈澱を0.05M Tris-Cl pH7.5に溶解し、遠心により不溶物を除去した後、DEAE-cellulose カラム (2.6 \times 30cm) に吸着させた。カラムはあらかじめ0.05M Tris-Cl pH7.5で平衡化、酵素を吸着させた後、KClを含む緩衝液の linear gradient で溶出した (0.05M Tris-Cl pH7.5-0.6M KCl in 0.05M Tris-Cl pH7.5 各500 ml)。pupを含むフラクションを合して透析を行った後、同一条件で再びクロマトグラフィーを行った。活性を含むフラクションを合した後80%飽和の硫酸で塩析し、少量の0.05M Tris-Cl pH7.5に溶解し、同緩衝液で透析を行った。この酵素液をあらかじめ0.2M KCl-0.02M glycylglycine pH8.0で平衡化した CPG-10カラム (1.6 \times 30cm) に流し、同緩衝液で溶出した。表1に両酵素の精製結果を示す。何れの酵素も shocked fluid から約50倍に精製された。しかしディスク電気泳動では酵素活性と一致する主 band の他に2、3の淡い band が認められた。

Fig. 1. Purification scheme of thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase.

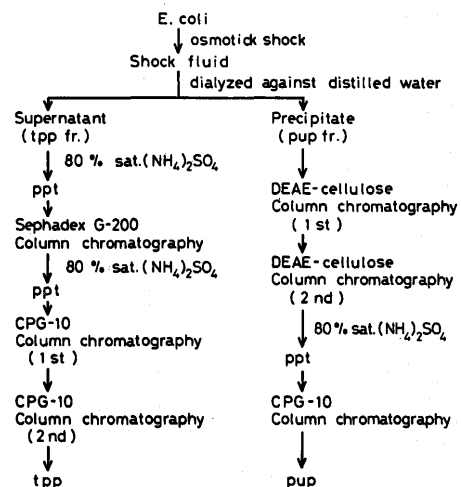


Table I Purification of purine nucleoside phosphorylase and thymidine phosphorylase

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity		Yield (%)		Specific activity (units/mg)	
			pup (units)**	tpp (units)*	pup	tpp	pup	tpp
Osmotic shock fluid	30	142	159	178	100	100	1.12	1.25
Precipitate of dialyzed shock fluid	6.0	42.6	88.6	12.9	56		1.89	
DEAE cellulose (1st)	47		58.0	8.89	36			
DEAE cellulose (2nd)	29	1.42	43.8	2.12	27		34.0	
CPG-10	7.5	0.39	2.58	0	1.6		66.8	
Supernatant of dialyzed shock fluid	31	32.3	5.48	98.6		62		3.18
Sephadex G-200	1.8	1.72	1.32	48.8		30		28.8
CPG-10 (1st)	3.8	0.40	0.368	23.7		14		58.1
CPG-10 (2nd)	22	0.18	0	11.8		7		66.0

* One unit of thymidine phosphorylase activity is defined as the amount required to produce 1 μ mole of thymine per min.

** One unit of purine nucleoside phosphorylase activity is defined as the amount required to produce 1 μ mole of guanine per min.

tpp および pup のカラムクロマトグラフィーにおける挙動：

図2に tpp および pup の Sephadex G-200 クロマトの挙動を示す。pup は tpp よりも多少早く溶出され、TDR 活性は両酵素の中間部に認められるが、両酵素の完全分離はできなかった。

図3は DEAE-cellulose クロマトの挙動であるが、Sephadex G-200 の場合と逆に tpp が pup よりも少し早く溶出されてくる。緩衝液あるいは塩濃度を種々変えて溶出条件を検討したが、両酵素の完全分離は不可能であった。

図4および図5に CPG-10 カラムにおける挙動を示す。0.02M glycylglycine pH7.0あるいはpH8.0で溶出すると tpp および pup の何れも略々 void volume の部に溶出される。これに対して0.2M KCl-0.02M glycylglycine pH7.0では何れの酵素もカラ

ムに吸着されて溶出されない。また0.2M KCl-0.02M glycylglycine pH8.0で溶出した場合 pup は溶出されてくるもののカラム容積の約2倍の溶出液が必要であり、tpp はpH7.0の場合と同様溶出することはできない。従って0.2M KCl-0.02M glycylglycine pH8.0で tpp と pup を完全に分離することが可能である。この高塩濃度での吸着は CPG-10 の非特異的吸着を妨げる polyethylene glycol を溶出液に添加することによって完全に防ぐことができる。しかし塩濃度の上昇によって吸着が増大する理由は不明である。

tpp および pup による thymidine, adenine 間の TDR 反応：

tpp および pup 存在下で thymidine と adenine より deoxyadenosine の産生、すなわち TDR 反応が見られる。この反応はそれぞれの酵素の加リン酸分解反応に比して極めて遅いが図6に示されている

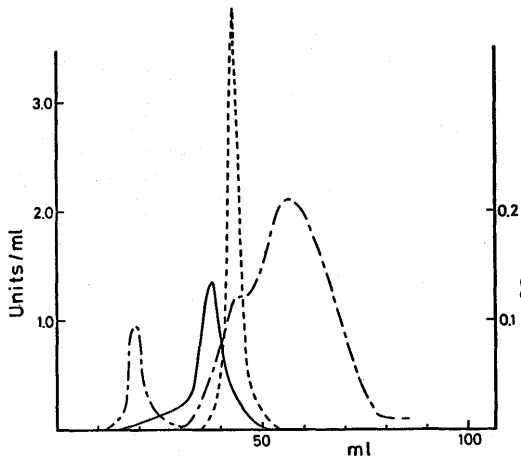


Fig. 2. Gel filtration pattern of shock fluid through Sephadex G-200. To a column (2.6 × 50 cm) equilibrated with 0.05 M Tris-Cl pH 7.5, 2 ml of shock fluid (containing 22 units of tpp and 6.8 units of pup) was applied and eluted with 0.05 M Tris-Cl pH 7.5. Activity was measured as described in "METHODS" — — — , protein; ······ , tpp; and ——— , pup.

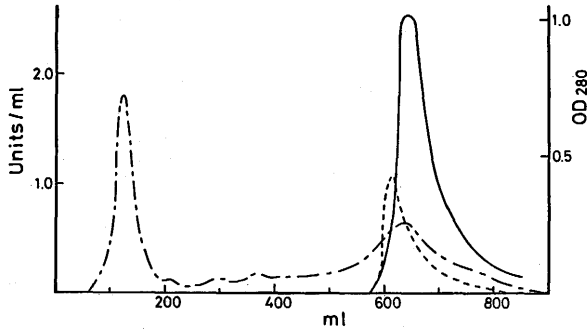


Fig. 3. Chromatography of thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase on DEAE cellulose column. For experimental details, see "RESULTS". Column size (2.6 × 30 cm) — — — , protein; ······ , tpp; ——— , pup

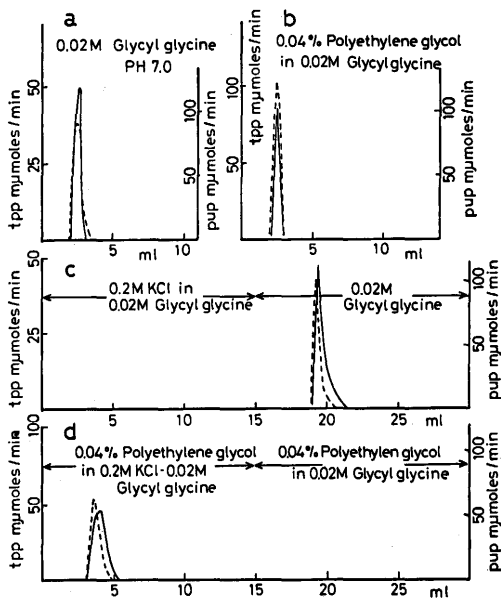


Fig. 4. Chromatography of thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase on CPG-10 at pH 7.0. The 0.50 units of tpp and 0.65 units of pup in a volume of 0.2 ml were applied on a column of CPG-10 (0.5 × 30 cm), and eluted with a) 0.02 M glycylglycine pH 7.0, b) 0.04% polyethylene glycol in 0.02 M glycylglycine pH 7.0, c) 15 ml of 0.2 M KCl in 0.02 M glycylglycine pH 7.0 followed by 0.02 M glycylglycine pH 7.0, and d) 15 ml of 0.04% polyethylene glycol in 0.2 M KCl-0.02 M glycylglycine pH 7.0 followed by 0.04% polyethylene glycol in 0.02 M glycylglycine pH 7.0. ——— , tpp; ······ , pup.

Fig 5. Chromatography of thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase on CPG-10 at pH 8.0. Methods were same as described in Fig 4, except being used the buffer, pH 8.0.

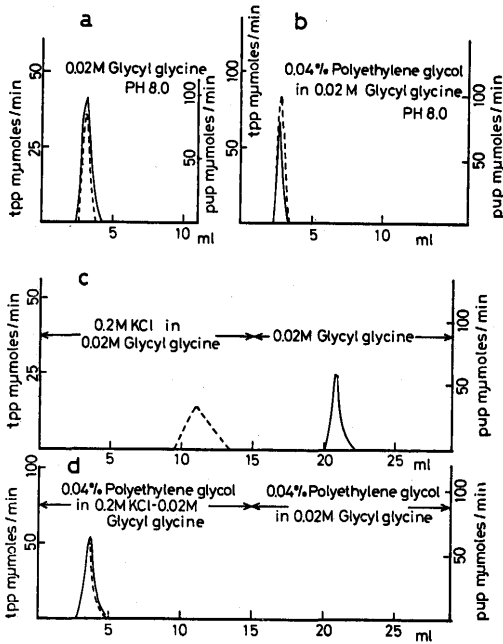


Fig 6. Dependency of transdeoxyribosylation on inorganic phosphate. The experiment carried out as described in "METHODS", except the concentration of inorganic phosphate.
 ●—●, activity in the presence of adenine;
 ○—○, activity in the absence of adenine;
 △—△, the difference (transdeoxyribosylation activity).

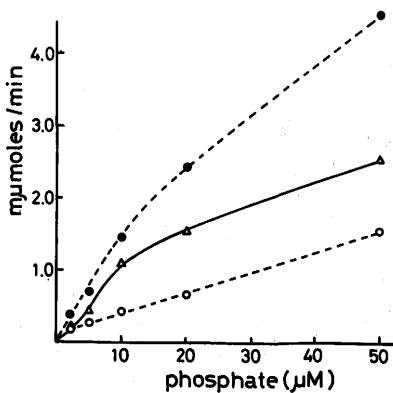


Fig 7. PH optima of thymidine phosphorylase, purine nucleoside phosphorylase and transdeoxyribosylation. Activity was measured as described in "METHODS" except being used the indicated buffer.

- a) Purine nucleoside phosphorylase
 ●—●, 0.1 M acetate buffer;
 △—△, 0.1 M imidazole buffer.
 b) Thymidine phosphorylase
 ●—●, 0.05 M succinate buffer;
 △—△, 0.05 M imidazole buffer.
 c) Transdeoxyribosylation activity
 ●—●, 0.016 M acetate buffer;
 x—x, 0.016 M Tris-maleate buffer;
 △—△, 0.016 M Tris-Cl buffer.

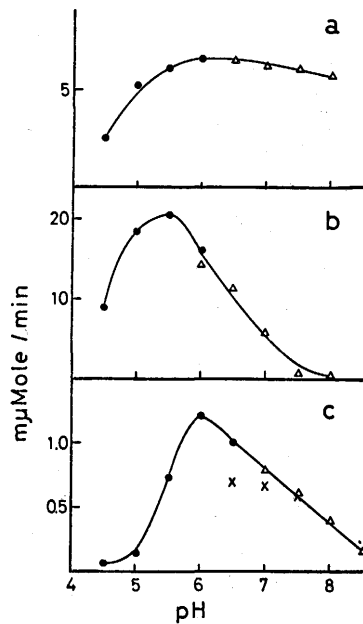


Table II. Km value for inorganic phosphate

Enzyme	Km
Thymidine phosphorylase	1.7 mM
Purine nucleoside phosphorylase	0.98 mM
Trans-N-deoxyribosylation	0.040mM

様に無機リン酸の存在が絶対に必要である。しかしながら無機リン酸に対するKm値を求めた所 TDR 反応に対しては40 μ Mであった。この値は tpp 又は pup の加リン酸分解反応に対するKm値よりも著しく小さく、特に tpp のKm値の約1/400である(表2)。

TDR 反応の至適pHは約6で tpp および pup の加リン酸分解反応の至適pHの略々中間値を示した(図7)。

酵素濃度と TDR 反応：

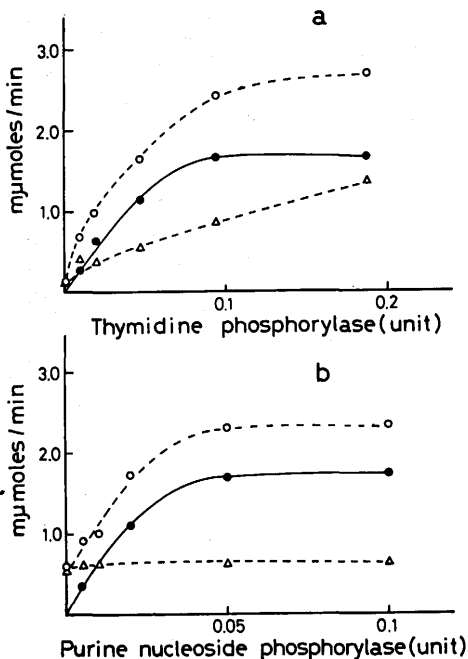
Pyrimidine nucleoside と purine 間の TDR 反応は tpp と pup の両酵素が必要である。pup を一定量使用した場合、unit 量として約5倍の tpp で活性は飽和に達し、tpp を一定にした時は約3倍の pup で飽和値に達する。両酵素間で特に stoichiometric な関係はない(図8)。

Fig 8. Effect of Enzyme concentration on transdeoxyribosylation activity.

a) 0.02 unit of purine nucleoside phosphorylase plus 0 to 0.2 unit of thymidine phosphorylase.

b) 0.018 unit of thymidine phosphorylase plus 0 to 0.1 unit of purine nucleoside phosphorylase.

○-----○, activity in the presence of adenine;
 △-----△, activity in the absence of adenine;
 ●-----●, the difference (transdeoxyribosylation activity).



TDR 反応に対する KCl の影響：

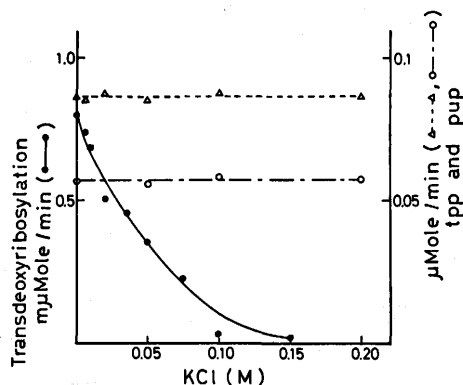
tpp あるいは pup の加リン酸分解反応は反応液中に KCl を加えても全く活性に変化はない。しかし tpp および pup による TDR 反応は KCl の添加によって著しく阻害される(図9)。すなわち反応液中に約0.04Mの KCl を加えることによって活性は半減し、0.15Mで殆んど活性を失った。

考 察

大腸菌では thymine 又は thymidine の利用は deoxynucleotide としては唯一の salvage pathway である¹⁷⁾。thymidine は野生株においても効果的に利用されるが、thymine の利用は特異的な変異株か又は他の deoxynucleoside が共存しないと効果的に利用は期待できない¹⁸⁾。thymine と他の deoxynucleoside の共存下では thymine は極めて速かに thymidine に合成される。このことは deoxyribose 部が効果的に thymine に移されていることを示している。この TDR 反応を触媒する酵素として乳酸菌類では Trans-N-deoxyribosylase が存在し、高度に精製されその性質、反応機構等についてもよく検討されている。しかしこの酵素は現在の所乳酸菌のみに限定されている様に思われる。従って他の生物における TDR 反応は Trans-N-deoxyribosylase 以外の酵素によって触媒されていることになる。

Fig 9. Effect of KCl on transdeoxyribosylation activity, thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase. Activity was measured as described in "METHODS" except additional KCl was included in the reaction mixture.

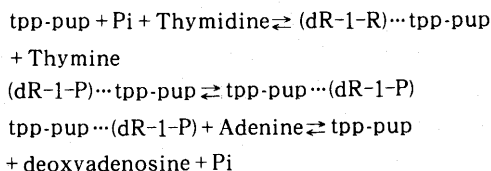
△-----△, thymidine phosphorylase;
 ○-----○, purine nucleoside phosphorylase;
 ●-----●, transdeoxyribosylation activity.



TDR 反応中 purine 相互間又は Pyrimidine 相互間の反応 (base exchange reaction) については主として動物細胞抽出液についていくつかの報告があり^{19)~23)}, nucleoside phosphorylase と異なる酵素の存在を示唆する報告¹⁹⁾もあるものの, 大部分は無機リン酸依存性が認められている^{20)~23)}. その際 pup による反応は deoxyribose-1-phosphate が酵素から遊離する典型的な加リン酸分解の可逆的の反応によるとされているが²⁰⁾, tpp による反応ではリン酸に対する Km 値が小さく, 中間体の deoxyribose-1-phosphate は enzyme bound 状態として存在し²⁰⁾かつ通常の加リン酸分解反応の至適 pH (約 6) と異った至適 pH (約 7) を示した²¹⁾. 従って tpp 依存性の pyrimidine 間の TDR 反応は加リン酸分解反応と異った enzyme conformation で行われている可能性がある²⁰⁾ pyrimidine-purine 間の TDR 反応は *in vivo* で tpp と pup の両酵素の必要なことは先に報告した⁹⁾. 本研究で *in vitro* における thymidine と adenine 間の TDR 反応を調べた結果, 予測通り無機リン酸依存性ではあるが無機リン酸に対する Km 値は 40 μM で加リン酸分解による Km 値より著しく小さい. 特に本研究での assay 法では初反応が thymidine の tpp による加リン酸分解反応であるが, tpp の加リン酸分解に対する Km は 1.7 mM で TDR 反応の約 400 倍の高値を示した.

更に tpp および pup の加リン酸分解反応には反応液中に KCl を加えても全く影響がないにも拘わらず, TDR 反応は KCl 存在に著るしく感受性であった. これらの事実は TDR 反応は加リン酸分解反応と異った conformation を持つ酵素によって行われている可能性が高い. この conformation の実体は不明であるが, tpp と pup 間に弱い相互作用があるのかも知れない. 大腸菌の tpp と溶連菌の pup を組合せた場合, TDR の効率が homologous な組合せに比し低い事も, かかる相互作用の存在を示唆するものと考えられる²⁴⁾.

従って反応形式として



の順で進行するのではないかと推定された. CPG-10 カラムクロマトで tpp および pup が一般的な蛋白の性質と異って塩濃度を増加するとカラムに対する吸

着が増加することは或は conformation 変化によるのであろう.

この様な *in vitro* での TDR 反応の証明にも拘らず *in vitro* での活性は *in vivo* での TDR 反応に比して極めて緩徐にしか進行しない. 従って *in vivo* での反応に対しては tpp および pup の両酵素が complex として活性部が非常に接近した状態で効果的な反応が起っているものと推定され, この状態を示唆する data も得られている²⁵⁾. しかしその実態は今後の研究にまたねばならない.

稿を終えるに当り, 御指導と御校閲を賜りました久野滋教授, 武藤明助教授に心から御礼申し上げます.

文 献

- 1) Deutsh, W., & Laser, R. : Z. physiol. Chem., **186**, 1 (1930).
- 2) Klein, W. : Z. physiol. Chem., **231**, 125 (1935).
- 3) Kalckar, H. M. : J. Biol. Chem., **167**, 477 (1947).
- 4) Macnutt, W. S. : Biochem. J., **50**, 384 (1952).
- 5) Rouch, A. H., & Betz, R. F. : J. Biol. Chem., **233**, 261 (1958).
- 6) Beck, W. S., & Levin, M. : J. Biol. Chem., **238**, 702 (1963).
- 7) Munch-Petersen, A. : European J. Biochem., **6**, 432 (1968).
- 8) Imada, A., & Igarasi, S. : J. Bacteriol., **94**, 1551 (1967).
- 9) 武藤 明, 林 道子, 久野 滋 : 生化学, **41**, 526 (1969).
- 10) Okada, T., Torii, H., & Kuno, S. : Jap. J. Genetics., **44**, 193 (1969).
- 11) Razzell, W. E., & Khorana, H. G. : Biochim. Biophys. Acta, **28**, 563 (1958).
- 12) Tsuboi, K. K., & Hadson, P. B. : J. Biol. Chem., **224**, 879 (1956).
- 13) Munch-Petersen, A. : Biochim. Biophys. Acta, **142**, 228 (1967).
- 14) Taketo, A., & Kuno, S. : J. Biochem., **72**, 1557 (1972).
- 15) Burton, K. : Biochem. J., **62**, 315 (1964).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr,

- A. L., & Randall, R. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 17) Karlström, H. O. : European J. Biochem., 17, 68 (1970).
- 18) Budman, D. R., & Pardee, A. B. : J. Bacteriol., 94, 1546 (1967).
- 19) Pinto, B., & Touster, O. : J. Biol. Chem., 241, 772 (1966).
- 20) Krenitsky, T. A. : J. Biol. Chem., 243, 2871 (1968).
- 21) Ziminerman, M., & Seidenberg, J. : J. Biol. Chem., 239, 2618 (1964).
- 22) Abrams, R., Edmonds, M., & Libenson, L. : Biochim. Biophys. Acta, 20, 310 (1965).
- 23) Tarr, H. L. A., Roy, J. E., & Yamamoto, M. : Can. J. Biochem., 46, 407 (1968).
- 24) Taketo, A., & Taketo, Y. : J. Biochem., 75, 1341 (1974).
- 25) 細野久子 : 十全医会誌, 84, 60 (1975).

Abstract

Thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase were partially purified from *E. coli* cells by column chromatography on DEAE-cellulose, sephadex G-200 and CPG-10. The properties of transdeoxyribosylation between thymidine and adenine catalyzed by these purified enzyme preparation were investigated. The trans-deoxyribosylation was absolutely dependent on the presence of inorganic phosphate. However, the K_m value for inorganic phosphate in transdeoxyribosylation was 40 μ M which was approximately 1/400 of that of thymidine phosphorylase. The optimal pH was around 6. The transdeoxyribosylation was so sensitive to salt in the incubation medium, that 0.2 M KCl inhibited the reaction completely though thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase activities were unaffected. Both thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase were strongly adsorbent to CPG-10 at pH 7.0 in the presence of 0.2 m KCl, while no adsorption was observed without KCl. This unusual property together with the above results suggested that the transdeoxy-ribosylation between thymidine and adenine was not a simple consecutive reaction of thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase, but due to a complex formed by weak interaction between two enzymes. On higher concentration of KCl, the enzymes would probably change their conformational structure to result in failure to interact, inability of effective transdeoxyribosylation, and unusual behavior on CPG-10.
