

***Corynebacterium glutamicum* からのフマラーゼの精製と 基質アナログ阻害**

源田智子・渡部省二¹・尾寄八郎²

Purification of Fumarase from *Corynebacterium glutamicum* and
Inhibition by Substrate Analogs

Tomoko GENDA, Shoji WATABE¹, and Hachiro OZAKI²

(Received September 29, 2006)

Fumarase (EC 4.2.1.2) from *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067 was purified to homogeneity. Its amino-terminal sequence (residues 1 to 30) corresponded to the sequence (residues 6 to 35) of the deduced product of the fumarase gene of *C. glutamicum* (GeneBank accession no. BAB98403). The molecular mass of the native enzyme was 200 kDa. The protein was a homotetramer, with a 50-kDa subunit molecular mass. The homotetrameric and stable properties indicated that the enzyme belongs to a family of Class II fumarase. Equilibrium constants (K_{eq}) for the enzyme reaction were determined at pH 6.0, 7.0, and 8.0, resulting in $K_{eq} = 6.4, 6.1, \text{ and } 4.6$ in phosphate buffer, while 16, 19, and 17 in the non-phosphate buffers, respectively. Among amino acids and nucleotides tested ATP inhibited the enzyme. Substrate analogs, *meso*-tartrate, D-tartrate, and pyromellitate, inhibited the enzyme competitively, and D-malate in mixed-type.

はじめに

グルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* (従来 *Brevibacterium flavum* と呼ばれた) の T C A サイクルの酵素に関する研究はこれまでに多数報告されているが、¹⁻⁶⁾ 当研究室では最近、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) (図1) の研究結果を報告した。^{7,8)} 今回はまだ研究されていないフマラーゼ (FUM) (図1) の研究結果を報告する。本酵素 (fumarase or fumarase hydratase (EC 4.2.1.2)) は T C A サイクル上でフマル酸からリンゴ酸への変換反応を可逆的に触媒する。この酵素の研究は主に哺乳類のものが対象で、微生物ではあまり研究されていなかった。大腸菌 (*Escherichia coli*) では3種類のフマラーゼが報告されている⁹⁾ : FumA、FumB、FumCである。FumAとFumBはclass I型と呼ばれ、分子量120

1 山口大学医学部保健学科基礎検査学講座、2 元山口大学教育学部理科教育
略語 : MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid;
TES, *N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid

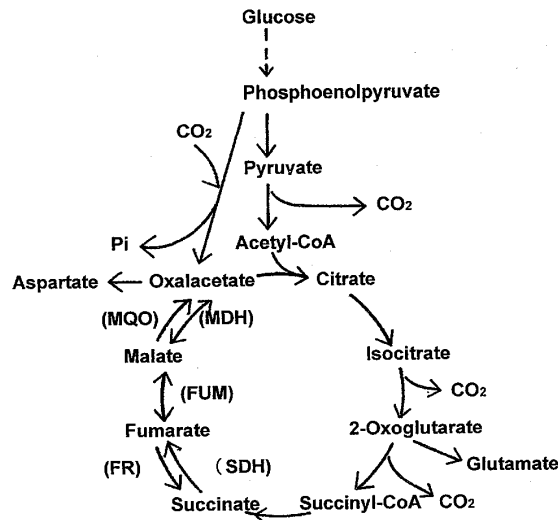


図1 *Corynebacterium glutamicum* の TCA 回路とその近辺の代謝経路の略図

MDH, malate dehydrogenase; MQO, malate:quinone oxidoreductase
FUM, fumarase; SDH, succinate dehydrogenase; FR, fumarate reductase.

kDa、二量体で不安定な酵素である。FumC は class II 型と呼ばれ、分子量が200kDa、四量体で安定な酵素である。哺乳類のフマラーゼは FumC に相当する性質を持っている。¹⁰⁾

本酵素に関する近年の研究はブタ心筋、^{11,12)} 大腸菌、^{13,14)} や酵母^{15,16)} の酵素を用いて、フマラーゼ酵素分子上での反応機構の解明に集中して来ているので、当研究室では、*C. glutamicum* の精製酵素標品を用いて、反応機構解明に向けての研究の第一歩として各種基質アナログのフマラーゼ反応に対する影響を主に調べた。

実験方法

1. 菌株及び培養

この研究で使用した菌株は *C. glutamicum* ATCC14067 (*B. flavum* no. 2247) である。完全寒天培地 (CM-2) はポリペプトン、10；酵母エキス、10；NaCl、5；寒天、20 (g/l、pH7.0) を120℃で20分間殺菌した。種母培養と主培養に用いる培地 (G₃₀) の組成 (g/l) は glucose、36；urea、10；KH₂PO₄、1；MgSO₄·4H₂O、0.4；FeSO₄·7H₂O、10mg；MnSO₄·4H₂O、8.1mg；thiamine·HCl、100μg；*d*-biotin、30μg；6N HCl、7ml で、種母培養には50mlの G₃₀ 培地を500ml フラスコに入れ、主培養には3 l の G₃₀ 培地を5-リットルのジャーに入れて、115℃で10分間殺菌した (最終 pH7.0)。CM-2 で30℃、24 h 生育した菌体1白金耳を種母培地に接種して30℃、120rpm で24 h 振とうし、得られた培養液全体をジャーに接種して、攪拌200rpm、1 l/l/min で通気し、30℃、20-24 h ジャーファーメンター (丸菱モデル MD-300) を用いて培養した。菌体を遠心分離機で集め、0.2% KCl で洗浄後フリーザー (-20℃) 中に保存した。

2. 無細胞抽出液の調製

洗浄菌体20 g (湿重量) を50mlの50mM リン酸緩衝液 pH7.0 (buffer A) に懸濁し、超音波発生装置 (クボタ201型 9kHz) 中で6℃以下に保ちながら20分間菌体を破碎した。得られた菌体破碎液を30,000×g、20分間遠心分離し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

3. フマラーゼの精製

洗浄菌体合計160g から得られた無細胞抽出液にストレプトマイシン硫酸塩を2.0% (W/V) になるように加え、遠心分離により沈殿画分を除き、上清を硫酸分画した。硫酸0.4から0.6飽和での沈殿画分を buffer A に溶かし、10mM Tris-acetate buffer, pH7.3 (buffer B) に対して透析した。この透析画分を DEAE-Toyopearl 650M カラム (2.64×15cm) を用いてクロマトグラフィーを行った (第1回目、図2A)。Buffer B に溶かした NaCl 濃度勾配 (0.1→0.4 M) によって溶出したフマラーゼ活性画分を buffer B に対して透析した。この透析画分を DEAE-Toyopearl 650M カラム (1.9×11cm) を用いて再クロマトを行った (第2回目、図2B)。ここでは NaCl 濃度勾配 (0.15→3.5 M) で溶出した。得られたフマラーゼ画分に硫酸を2 M になるように加え、Phenyl-Toyopearl 650M カラム (1.5×10 cm) を用いて疎水クロマトグラフィーを行った (第1回目、図3A)。使用 buffer は 10mM K-phosphate buffer, pH7.3 (buffer C)、硫酸濃度勾配 (2→0 M) で溶出を行った。得られたフマラーゼ画分を同じ大きさのカラムで再疎水クロマトを行った (第2回目、図3B)。ただし、ここでの硫酸濃度勾配は1.0→0 M であった。ここで得られたフマラーゼ活性曲線の山の右半分は狭雑タンパク質の山と重なっているように思われたので、左半部分をプールして精製酵素画分にした。

4. フマラーゼ活性測定方法

標準測定方法：100mM sodium phosphate buffer, pH7.3、50mM sodium L-malate と 20 μl の酵素液 (10mM の同 buffer で適宜希釈) を含む全容 1 ml を反応液として、酵素液添加で反応を開始し、室温 (20-23°C) で反応させて 250nm での吸光度の変化を分光光度計 (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech Co. UK) を用いて測定し、その初速度を酵素活性とした。フマール酸の分子吸光係数、 $1.45 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 250nm¹⁷⁾ を用いて 1 分間に 1 μmol のフマール酸を形成する活性の強さを 1 unit とした。逆反応は 10mM sodium fumarate を基質として用い 290nm での吸光度の変化を同様な方法で測定した。この波長でのフマール酸の分子吸光係数は $0.109 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 290nm¹⁷⁾ を用いた。タンパク質は Lowry 法¹⁸⁾ で定量した。

5. ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)

未変性タンパク質の電気泳動には 7.5% ゲルを用い、ATTO-Compact PAGE system (ATTO Co. Tokyo) 中で泳動し、Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。

6. 分子量の測定

ゲルろ過法：1 ml の 50mM Tris-HCl buffer, pH7.5 に チオグロブリン (bovine, 670kDa) 3 mg、ウレアーゼ (soybean, 480-490kDa) 1 mg、カタラーゼ (bovine, 248kDa) 2 mg、アルコール脱水素酵素 (yeast, 150kDa) 0.5mg と精製フマラーゼ標品 20 μl を加え Toyopearl HW-60 カラム (1.9×40cm)、そして同 buffer を用いてゲルろ過を行った。

SDS-PAGE 法：精製フマラーゼ標品を常法に従ってドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と 2-メルカプトエタノール存在下 100°C、2 分 で変性させ、SDS を含む 11% ゲルを用いて上記 5. の system で電気泳動した。この際、標準分子量として Sigma (St. Louis, Mo, USA) から購入した分子量キットを用いた。

7. N末端アミノ酸配列の決定

精製フマラーゼ酵素標品をタンパク質シーケンサー (ABI, Model 476A) に掛けてアミノ基末端のアミノ酸配列を決定した。

実験結果

1. フマラーゼの精製

菌株 no. 2247の無細胞抽出液をストレプトマイシン処理、硫酸分画、DEAE-Toyopearl (図2 A B)、及び Phenyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィー (図3 A B) を行ってフマラーゼを精製した。その結果、本酵素は252倍に精製され、回収率は12%であった (表1)。得られた精製標品は電気泳動的に単一のタンパク質であった (図4 B)。

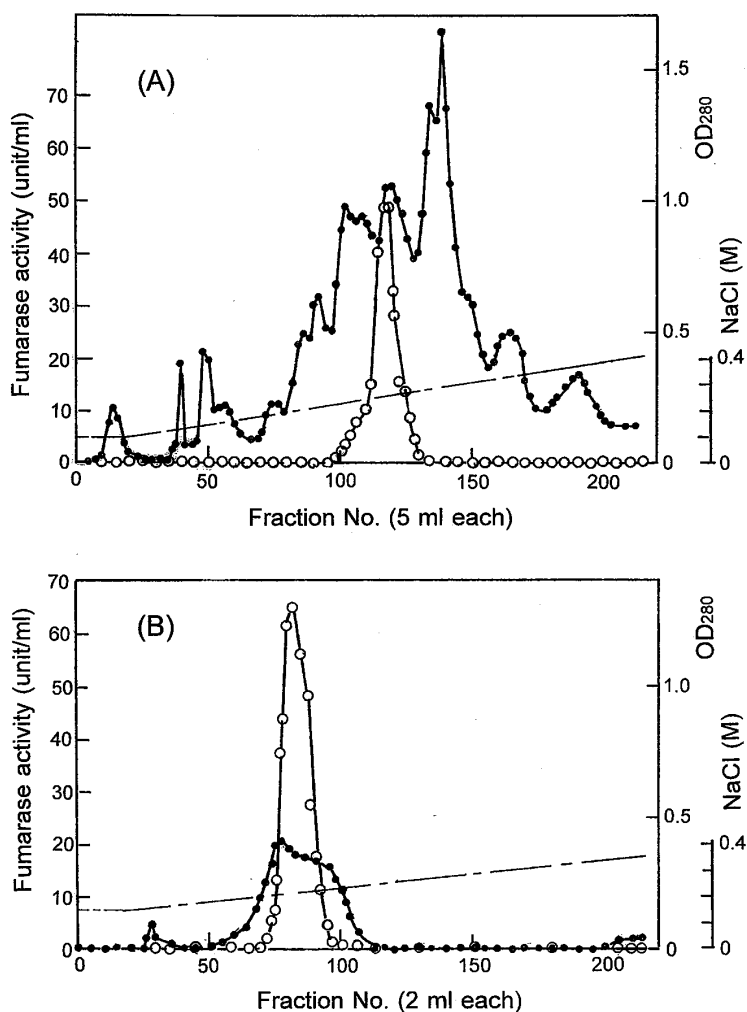


図2 第1回 DEAE-Toyopearl(A)と第2回 DEAE-Toyopearl(B)カラムクロマトグラフィー
○、フマラーゼ活性； ●、OD₂₈₀。

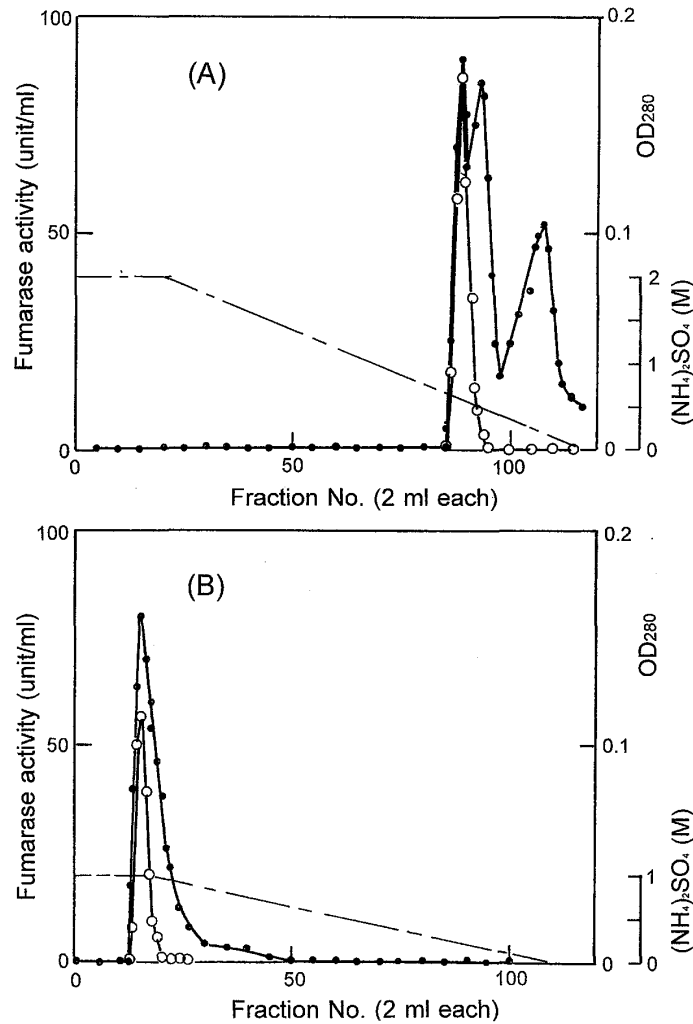


図3 第1回 Phenyl-Toyopearl(A)と第2回 Phenyl-Toyopearl(B) カラムクロマトグラフィー
○、フマラーゼ活性； ●、OD₂₈₀。

表1 *Corynebacterium glutamicum* からのフマラーゼの精製
菌体160g (湿重量) より抽出し精製した。

精製段階	全容量 (ml)	全蛋白質 (mg)	フマラーゼ活性		回収率 (%)	精製度 (倍)
			全活性 (U)	比活性 (U/mg)		
抽出液	390	3342	4173	1.25	100	1
ストレプトマイシン処理	380	3244	3610	1.11	86	0.9
硫酸分画(0.4~0.6飽和沈殿)	24	470	2698	5.74	64	4.5
第1回DEAE-Toyopearl	65	65	2600	40.2	62	32
第2回DEAE-Toyopearl	22	11	1200	109	28	87
第1回Phenyl-Toyopearl	10	4	932	233	22	186
第2回Phenyl-Toyopearl	4	1.6	504	315	12	252

2. フマラーゼの分子状態

この精製酵素をゲルろ過法で分子量を測定した結果、200kDaであった(図5)。次に本酵素標品を常法により変性処理後、SDS-PAGEに掛けた結果、単一のタンパク質バンドが観察され、その分子量は50kDaであった(図4 A C)。従って、本酵素は四量体(homotetramer)であることが分かった。本酵素のアミノ基末端アミノ酸配列30残基を測定した結果、その配列はTEQEFRIEHD TMGEVKVPAK ALWQAQTQRAであった。この配列は*C. glutamicum*の遺伝子配列から演繹されたアミノ酸配列(GenBank accession no. BAB98403)のアミノ基末端から6~35残基に相当していた(図6)。

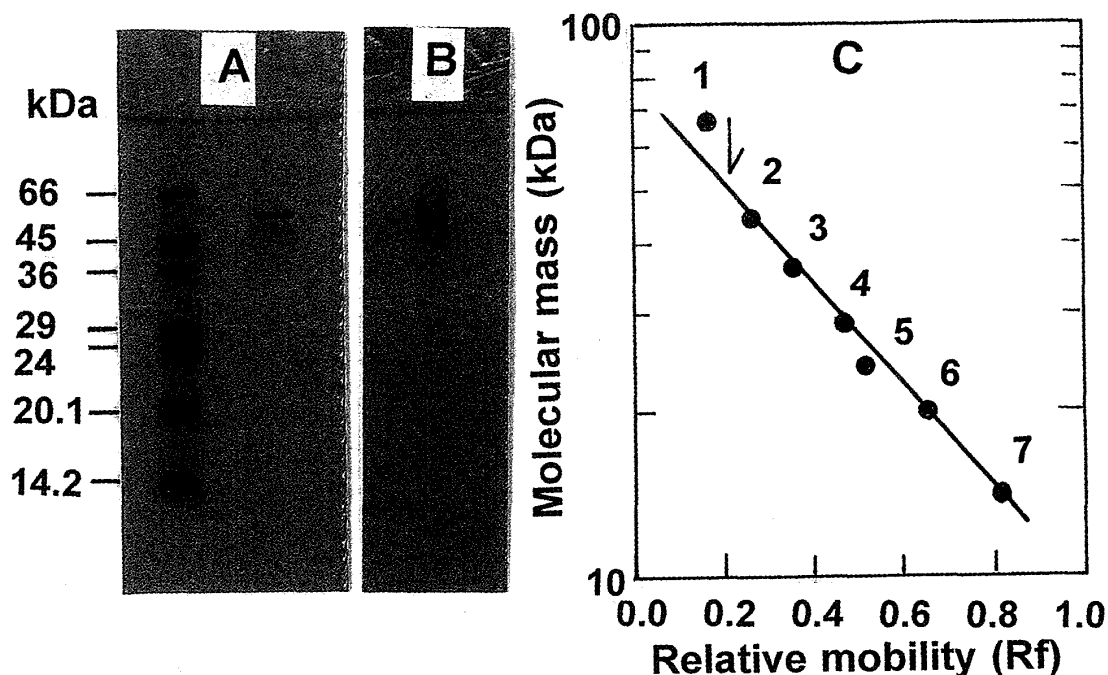


図4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

(A, C)、SDS-PAGE； (B)、Native PAGE。

分子量マーカー：1, albumin, bovine (66 kDa)； 2, albumin, egg (45 kDa)；
3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa)；
4, carbonic anhydrase (29 kDa)； 5, trypsinogen (24 kDa)；
6, trypsin inhibitor (20.1 kDa)； 7, α -lactalbumin (14.2 kDa)

矢印はフマラーゼの Rf を示す。

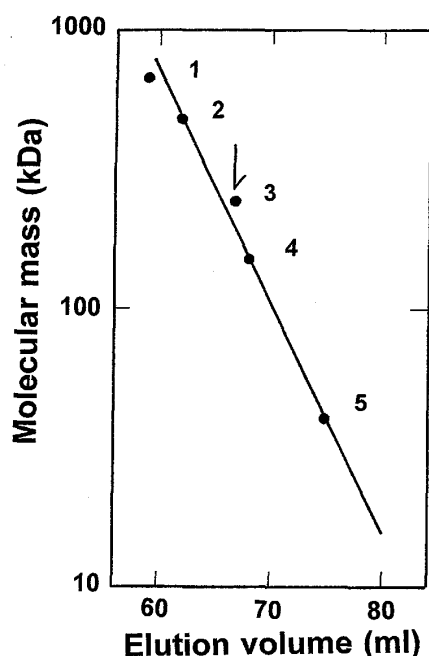


図5 Toyopearl HW-60 カラムによるゲルろ過

分子量マーカー：1, thiogloblin; 2, urease; 3, catalase; 4, alcohol dehydrogenase; 5, peroxidase。矢印はフマラーゼの溶出位置を示す。

分析結果：

TEQEFRIEHD TMGEVKVPAK ALWQAQTQRA

遺伝子より演繹されたアミノ酸配列 (ACCESSION BAB98403):

1 MSDFMTEQEF RIEHDTMGEV KVPKALWQA QTQRAVENFP ISGRGLESAQ IRAMGLLKAA
 61 CAQV NKDSGA LDAEKADAI AAGKEIASGK HDAEFPIDVF QTGSGTSSNM NTNEVIASIA
 121 KANGVEVHPN DHVNMGQSSN DTFPTATHVA ATEAAVNDLI PGLKVLHESL AKKANWSEV
 181 VKSGRTHLMD AVPVTLGQEF GGYARQIQLG IERVEATLPR LGELAIGGTA AGTGINTSAD
 241 FGGKVVAELI NLTDVKELKE AENHFQAQA RDALVEFSGA MRVIAVSLYK IANDIRLMGS
 301 GPLTGLGEIR LPDLQPGSSI MPGKVNPLVC ETATQVSAQV IGNDAAVAFS GTQGQFELNV
 361 FIPVMARNVL ESARLLANTS RVFATRLVDG IEPNEAHMKE LAESSPSIVT PLNSAIGYEA
 421 AAKVAKTALA EGKTIRQTVI DLGLVDGEKL TEEELDKRLD VLAMAHTERE NKF

図6 精製フマラーゼ標品の解析により決定されたアミノ基末端のアミノ酸配列と *C. glutamicum* フマラーゼ遺伝子の塩基配列から演繹された全アミノ酸配列

以上の結果、本酵素が分子量 200 kDa で四量体であることと、安定であるという性質は *E. coli* FumC の性質によく似ている。従って、本酵素は class II 型のフマラーゼに分類されると考えられる。

3. 基質特異性と最適 pH

本酵素標品はフマル酸と L-リンゴ酸には作用したが、他の類縁化合物 (アナログ) には全く作用しなかった。ブタ心筋のフマラーゼで報告されている最適 pH はリン酸緩衝液で測定

されているので、^{19,20} 本酵素においてはリン酸緩衝液と非リン酸緩衝液を用いて最適 pH を測定した。その結果を表 2 に示した。フマル酸→リンゴ酸（正反応）とリンゴ酸→フマル酸（逆反応）の最適 pH はリン酸緩衝液ではそれぞれ pH 6.5 と 8.3 であり、非リン酸緩衝液 (Tris-HCl buffer) ではそれぞれ pH 7.5 と 8.5 であった。リン酸緩衝液での最適 pH の値はブタ心筋の値とほぼ一致した。

表 2 フマラーゼ反応の最適 pH

標準反応条件で正逆両反応の活性を測定した。ただし、使用した緩衝液は次の通りである。

リン酸緩衝液：100 mM sodium phosphate buffer pH 5.0-8.5。

非リン酸緩衝液 (100 mM)：

MES-NaOH buffer, pH 5.0-6.5、TES-NaOH buffer, pH 6.5-7.2、

Tris-HCl buffer, pH 7.2-9.5、glycine-NaOH buffer, pH 8.7-10.0。

緩衝液	最適 pH	
	フマル酸→リンゴ酸	リンゴ酸→フマル酸
リン酸緩衝液	6.5	8.3
非リン酸緩衝液	7.5	8.5

4. 平衡定数

良く知られている Haldane 関係式²¹⁾ (等式 1) を用いて平衡定数 (K_{eq}) を測定した。

$$K_{eq} = V_F K_{mM} / V_M K_{mF} \quad (1)$$

ここで V_F 、 V_M 、 K_{mF} 、 K_{mM} はそれぞれ、フマル酸 (F) 及びリンゴ酸 (M) を基質に用いた時に得られる最大活性 (V) 及びミカエリス定数 (K_m) を示す。両基質を用いて lineweaver-Burk プロットを行い、それぞれの基質の V と K_m を求めて、等式 1 に代入して計算した。中性付近の 3 種の pH、6.0、7.0、8.0 で測定した結果を表 3 に示した。リン酸緩衝液では平衡定数 K_{eq} はそれぞれ、6.4、6.1、4.6 であった。一方、非リン酸緩衝液では K_{eq} はそれぞれ、16、19、17 であった。この結果から本酵素の反応は正反応の方が逆反応よりも 6 倍または 18 倍も活性が高いと言える。両緩衝液のどちらがより生体内の状態を反映しているか分からないが、これら 3 種の pH で K_{eq} 値がほぼ一定であることから、中性付近では本酵素はあまり pH に左右されないと考えられる。

表 3 フマラーゼ反応の平衡定数 (K_{eq})

pH	平衡定数 (K_{eq})	
	リン酸緩衝液*	非リン酸緩衝液**
6.0	6.4	16
7.0	6.1	19
8.0	4.6	17

* 100 mM sodium phosphate buffer

** pH 6.0, 100 mM MES-NaOH buffer

pH 7.0, 100 mM TES-NaOH buffer

pH 8.0, 100 mM Tris-HCl buffer

表4 フマラーゼ活性に対する各種添加物の影響

L-リンゴ酸 (50mM) を基質にして標準反応条件でフマラーゼ活性を測定した。ただし、精製酵素 0.4 μg、100 mM Tris-acetate buffer, pH 7.3と表中に示した濃度の添加物を用いた。

添加物	濃度 (mM)	フマラーゼ活性 (%)	添加物	濃度 (mM)	フマラーゼ活性 (%)
None		100	NaCl	100	94
L-Aspartate	20	106		200	78
	100	122		500	56
	200	128	KCl	100	89
	500	102		200	82
				500	72
L-Glutamate	20	105	(NH ₄) ₂ SO ₄	100	124
	100	118		200	110
	200	113		500	122
	500	121			
Citrate	20	93	MnCl ₂	0.1	104
	100	106		1	105
	200	109			
2-Oxoglutarate	20	94	MgCl ₂	0.2	93
	100	107		2	106
Succinate	20	99			
	100	117			
	200	101			

表5 フマラーゼ活性に対する各種ヌクレオチドの影響

精製酵素 (0.4 μg)、1mM フマル酸と buffer B を含む全容量 1 ml の反応液を用いて各種ヌクレオチドと 2 mM MgCl₂ 存在下または非存在下で反応させた。

添加物	濃度 (mM)	フマラーゼ活性 (100%)	
		2 mM MgCl ₂	
		無添加	添加
None		100	100(152)*
ATP	1	62	26
ADP	1	88	74
AMP	1	125	101
GTP	0.5	105	81
GMP	0.5	97	104
FDP**	1	123	96

* 括弧内の値は MgCl₂ 無添加での活性に対する相対値を示す。

**Fructose 1,6-bisphosphate.

5. 代謝中間体及び無機塩による影響

TCA サイクル有機酸及びこのサイクルに近いアミノ酸について、フマラーゼ活性に対する影響を調べた結果 (表 4)、クエン酸、2-オキソグルタル酸、コハク酸はほとんど影響を示さなかった。L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸は菌体内に高濃度に蓄積されることは以前から知られているので、500mM という高濃度での影響も調べたがあまり影響を示さなかった。上記で用いた有機酸とアミノ酸はナトリウム塩なので無機塩の影響も調べた結果、NaCl と KCl はわずかに阻害を示したが、生理学的に意味のある強さの阻害ではないと思われる。MnCl₂ と MgCl₂ もほとんど影響を示さなかった。この結果は他の生物由来のフマラーゼ全てが Mn²⁺ と Mg²⁺ を要求しないという報告と似ている。

TCA サイクルはアミノ酸以外にエネルギー (ATP) 生成にも関連しているので、ヌクレオチドの影響を調べた。表 5 に示したヌクレオチドのうち ATP と ADP がフマラーゼ活性をこの順に強く阻害した。この際、Mg²⁺ イオンが存在していた方が阻害が著しかった。Mg²⁺ 存在下での ATP 阻害定数を図 8 と同じ方法で調べた結果、その阻害様式は図 8 B と同じ様式で混合阻害であった。その阻害定数 K_i と K_i' の値はそれぞれ 0.3 と 1.6mM であった。ヌクレオチドではないが多くの代謝経路に影響を持つことが知られている FDP (fructose 1,6-bisphosphate) についても調べたが、有意義な影響は見られなかった。

6. 基質アナログ阻害

フマラーゼ反応機構を解明する目的で基質アナログ阻害の阻害様式及び阻害の強さを調べた。

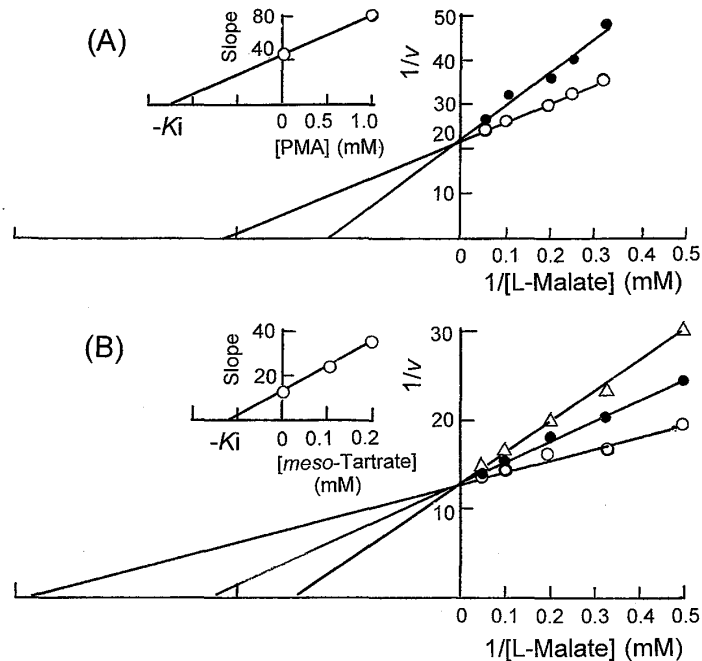


図 7 Pyromellitic acid (PMA) (A) と *meso*-tartrate (B) 存在下でのフマラーゼ反応の Lineweaver-Burk プロットと二次プロット

反応液：100 mM Tris-acetate buffer, pH 7.3, 2~20 mM L-malate と精製フマラーゼ (0.4 μ g) を含む全容 1 ml。250nm での吸光度変化を測定した。

阻害剤無添加、(○)。 (A)、1 mM PMA と精製酵素 4 μ g を添加し、290nm で測定した。PMA 添加、(●)。 (B)、*meso*-tartrate 添加：0.1 mM (●)；0.2 mM (Δ)。

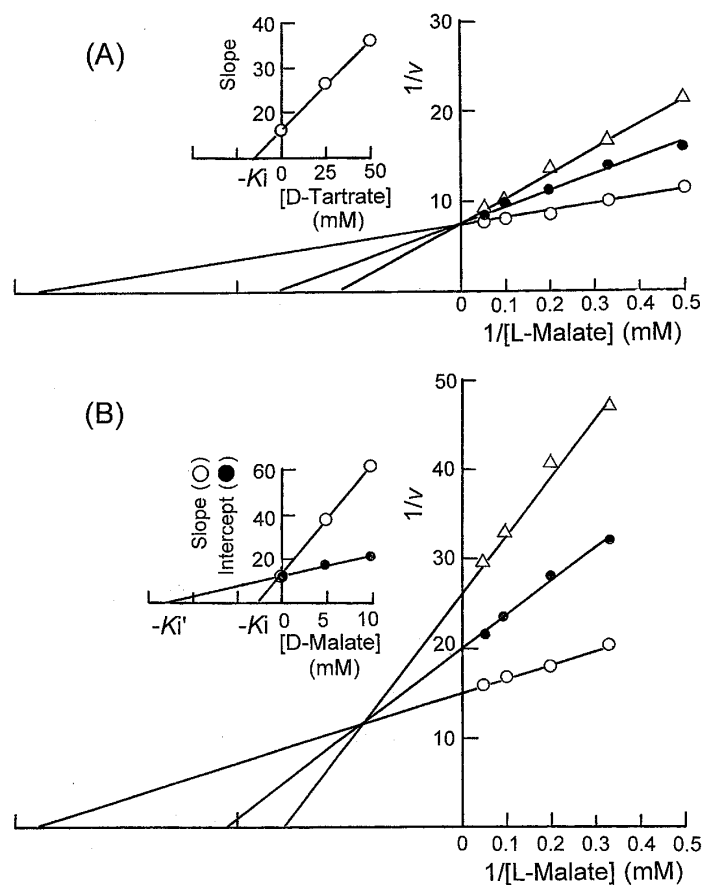


図8 D-Tartrate (A)と D-malate (B) 存在下でのフマラーゼ反応の Lineweaver-Burk プロットと二次プロット

反応条件：図7の説明と同じ。

(A)、D-tartrate 添加：25 mM (●)；50mM (△)。

(B)、D-malate 添加：5 mM (●)；10mM (△)。

表6 各種基質アナログによる *C. glutamicum* フマラーゼの阻害定数 K_i (K_i') 及びブタ心筋と *E. coli* との比較

阻害定数の測定方法については図7と8に示した。ただし、maleate 阻害試験に於いては10mM fumarate を基質として用い、10mMと20mM maleate、と0.8 μ gの酵素を添加し、290nm で測定した。

基質アナログ	阻害定数 K_i (K_i') (μ M)			文献 No.
	<i>C. glutamicum</i>	Pig Heart	<i>E. coli</i>	
Pyromellitate	1.3×10^3	1.0 0.6	1.2	22 11
L-Tartrate	NI*	1.3×10^3	NR**	23
D-Tartrate	1.6×10^4	3.4×10^2	NR	23
meso-Tartrate	1.1×10^2	2.9	NR	23
D-Malate	2.5×10^3 (1.2×10^4)	5.0×10 3.5×10^3	NR	11 24
Citrate	NI	2.2×10	CI***	25,13
Succinate	NI	3.2×10^2	NR	23
Glycine	NI	4×10^3	NR	11
Maleate	NI	1.1×10^4	NR	24

*NI、阻害されない。 **NR、報告されていない。 ***CI、拮抗阻害。

表6に示した9種のアナログについて調べた結果、4種が阻害を示した。この中で最も強い阻害(= K_i 値が最も小さい)を示したのは *meso*-tartrateであった。次いで pyromellitate、D-malate、D-tartrateの順で強い阻害を示した。これらの阻害様式に関しては pyromellitate、*meso*-tartrateと D-tartrateは拮抗阻害であり(図7 A B、図8 A)、D-malateは混合阻害であった(図8 B)。他の生物のフマラーゼと阻害に関しての比較も表6に示した。*E. coli*の酵素での報告は少ないが、pyromellitateで比較すると、このアナログによりブタ心筋と*E. coli*の酵素は著しく阻害されるが、*C. glutamicum*の酵素はごく僅かしか阻害されなかった(K_i 値が約 10^3 も大きい)。ブタ心筋の酵素で阻害が報告されている citrate、succinate、glycine、maleateによって*C. glutamicum*の酵素は阻害されなかった。全体的に本研究の酵素はブタ心筋の酵素より阻害を受けにくいことが分かった。

考 察

この研究で精製されたフマラーゼは分子量、分子形態、及び安定性に於いてブタ心筋や微生物のフマラーゼと良く似ていた。大腸菌には3種のフマラーゼ遺伝子とそれぞれの遺伝子産物、FumA、FumB、FumCが存在するが、⁹⁾本研究の酵素はFumCに相当し、class II型フマラーゼに分類されると考えられる。*C. glutamicum*フマラーゼの特徴は代謝中間体や基質アナログ等で阻害を受けにくいと言う点にあると思われる。代謝中間体の中ではATPが比較的強い阻害($K_i = 0.3\text{mM}$)を示したので、菌体内において本酵素活性は主としてATPによって制御されている可能性がある。また、基質アナログのなかで *meso*-tartrateが最も強い阻害($K_i = 0.11\text{mM}$)を示した。この阻害が見つかったことは今後のフマラーゼ反応機構の解明に役立つと考えられる。すなわち、本アナログ存在下で酵素の結晶が得られればX線解析により、酵素分子上でのこのアナログ分子の結合状態が分かり、その結果として、基質の結合状態も推測でき、反応メカニズムの解明につながると思われる。

謝 辞

本研究の酵素精製に当たり、山口大学農学部の中本芳実博士より貴重な助言を頂きました。紙面を借りて感謝いたします。

引用文献

- 1) Shii, I., Ozaki, H., and Ujigawa, K., Regulation of citrate synthase in *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J. Biochem.*, **82**, 395-405 (1977).
- 2) Shii, I., and Ozaki, H., Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate. *J. Biochem.*, **64**, 45-53 (1968).
- 3) Ozaki, H., and Shii, I., Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition of isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase by organic acids related to the TCA and glyoxylate cycles. *J. Biochem.*, **64**, 355-363 (1968).
- 4) Shii, I., and Ujigawa-Takeda, K., Presence and regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium*

- flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1897-1904 (1980).
- 5) Molenaar, D., van der Rest, M. E., and Petrovic, S., Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 395-403 (1998).
 - 6) Molenaar, D., van der Rest, M. E., Drysch, A., and Yucel, R., Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **182**, 6884-6891 (2000).
 - 7) 源田智子、尾寄八郎、グルタミン酸生産菌 *Brevibacterium flavum* からのリンゴ酸脱水素酵素の精製と分子形態、山口大学教育学部研究論叢、第52巻、第2部、pp29-40 (2002)
 - 8) Genda, T., Nakamatsu, T., and Ozaki, H., Purification and characterization of malate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 562-566 (2003).
 - 9) Woods, S. A., Schwartzbach, S. D., and Guest, J. R., Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 14-26 (1988).
 - 10) Kanarek, L., and Hill, R. L., The preparation and characterization of fumarase from swine heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **239**, 4202-4206 (1964).
 - 11) Beeckmans, S., and Driessche, E.V., Pig heart fumarase contains two distinct substrate-binding sites differing in affinity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31661-31669 (1998).
 - 12) Rose, I.A., Warms, J.V.B., and Kuo, D.J., Proton transfer in catalysis by fumarase. *Biochemistry*, **31**, 9993-9999 (1992).
 - 13) Weaver, T., and Banaszak, L., Crystallographic studies of the catalytic and a second site in fumarase C from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **35**, 13955-13965 (1996).
 - 14) Rose, I.A., and Weaver, T.M., The role of the allosteric B site in the fumarase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3393-3397 (2004).
 - 15) Weaver, T., Lees, M., Zaitsev, V., Zaitseva I., Duke, E., Lindley, P., McSweeney, S., Svensson, A., Keruchenko, J., Keruchenko I., Gladilin K., and Banaszak, L., Crystal structures of native and recombinant yeast fumarase. *J. Mol. Biol.*, **280**, 431-442 (1998).
 - 16) Rose, I.A., How fumarase recycles after the malate→fumarate reaction. Insights into the reaction mechanism. *Biochemistry*, **37**, 17651-17658 (1998).
 - 17) Bock, R. M., and Alberty, R. A., Studies of the enzyme fumarase. I. Kinetics and equilibrium. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1921-1925 (1953).
 - 18) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
 - 19) Massey, V., and Alberty, R. A., Ionization constants of fumarase. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 354-359 (1954).
 - 20) Alberty, R. A., Massey, V., Frieden, C. and Fuhlbrigge, A. R., Studies of the enzyme fumarase. III. The dependence of the kinetic constants at 25°C upon the

- concentration and pH of phosphate buffers. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2485-2493 (1954).
- 21) Dixon, M., Webb, E. C., Thorne, C. J. R., and Tipton, K. F., Equilibrium constant in terms of V and K_m : the Haldane relationship. In "Enzymes" 3rd ed., eds. Dixon, M., and Webb, E. C., Longman Group Limited, London, pp.67-70 (1979).
 - 22) Ueda, Y., Yumoto, N., Tokushige, M., Fukui, K., and Ohya-Nishiguchi, H., Purification and characterization of two types of fumarase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **109**, 728-733 (1991).
 - 23) Wigler, P.W., and Alberty, R.A., The pH dependence of the competitive inhibition of fumarase. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5482-5488 (1960).
 - 24) Massey, V., Studies on fumarase. 4. The effects of inhibitors on fumarase activity. *Biochem. J.*, **55**, 172-177 (1953).
 - 25) Teipel, J. W., Hass, G. M., and Hill, R. L., The substrate specificity of fumarase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 5684-5694 (1968).