

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

源田智子・尾寄八郎

山口大学教育学部生物学研究室

Purification and Molecular Properties of Malate Dehydrogenase from a Glutamate-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum*

Tomoko GENDA and Hachiro OZAKI

(Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University)

(Received September 27, 2002)

Malate dehydrogenase (MDH) [EC 1.1.1.37] was extracted from *Brevibacterium flavum* cells by disruption in a blender containing glass beads. The enzyme was purified to homogeneity by using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl and AF-Blue Toyopearl column chromatographies. MDH was purified 200-fold with 11% yield. Its amino-terminal sequence (residues 1 to 8) matched to the sequence (residues 2 to 9) of the MDH from *Corynebacterium glutamicum* (GenBank accession number, CAC83073). The molecular weight of the native enzyme was 130,000. The protein was a homotetramer, with a subunit molecular weight of 33,000. Lineweaver-Burk plots of the MDH reactions at pH 6.5 were linear with respects to NADH, NADPH and oxalacetate, indicating no allosteric effect in this enzyme. The enzyme has almost equal k_{cat} values in the both reaction systems of NADH-oxalacetate and NADPH-oxalacetate. But K_m values of the former with respect to the substrates were much smaller than the latter.

はじめに

グルタミン酸生産菌である *Brevibacterium flavum* の TCA サイクルの酵素の中で、クエン酸合成酵素 [EC 4.1.3.7]、¹⁾ イソクエン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.42]^{2,3)} と α -ケトグルタル酸脱水素酵素 [EC 1.2.4.2]⁴⁾ については代謝調節の観点ですでに研究されている。本菌ではまだ研究されていない TCA サイクル上の酵素の一つであるリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) に

関しては、最近、分類学上近縁でしかも、グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* での研究結果が報告されている。^{5,6)} それによると、従来から知られているMDH [EC 1.1.1.37] の他に、細胞膜結合型でキノンを補酵素としているMDHすなわちMQO [EC 1.1.99.16] (正確には malate:quinone oxidoreductase) も同時に存在し、本来のTCAサイクルの酸化作用(呼吸)にはこのMQOが役目をになっていると提唱しており、もう一つのMDHの代謝上の役目は分からないと報告している(表1と図1)。一方、大腸菌(*Escherichia coli*)にもこの両酵素が同時に存在しているが、MDHの方が本来の酸化作用に関与しているとの報告もある。⁷⁾ そこで、当研究室ではMDHの本来の役目を再確認する目的で、*B. flavum* を用いて研究を開始した。この論文では同菌からのMDHの精製と分子形態について報告する。

表1 リンゴ酸脱水素酵素の種類

EC Number	日常名	補酵素	反応式
1.1.1.37	MDH	NAD(H)	Malate + NAD ⁺ = Oxalacetate + NADH
1.1.1.82	MDH	NADP(H)	Malate + NADP ⁺ = Oxalacetate + NADPH
1.1.99.16	MQO	Quinone	Malate + Quinone = Oxalacetate + Reduced quinone

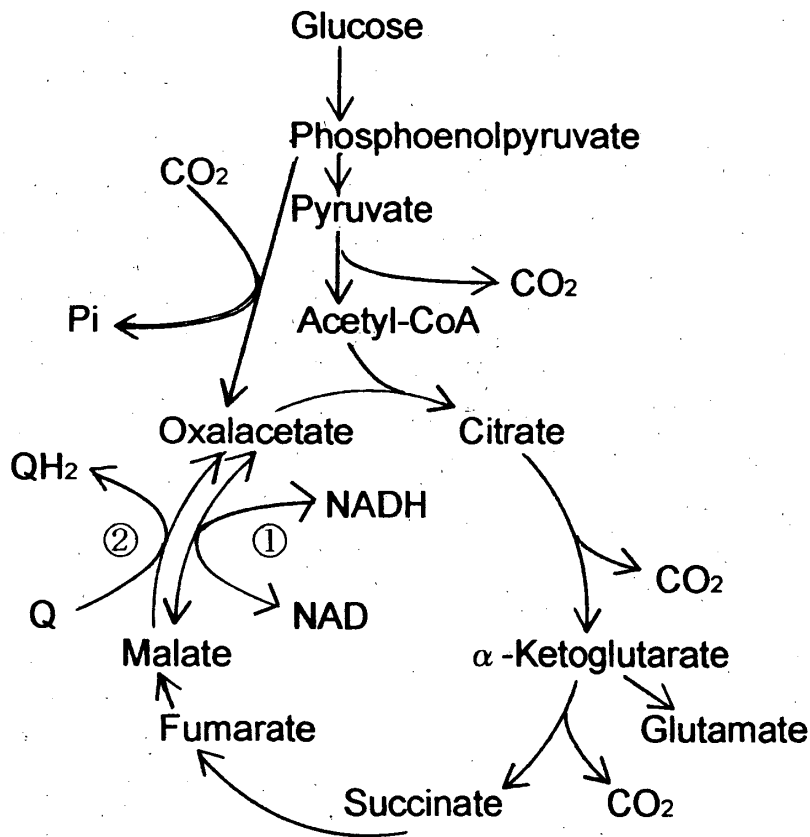


図1 細菌のTCA回路とその近辺の代謝の略図

実験方法

1. 菌株及び培養

この研究で使用した菌株は *Brevibacterium flavum* 2247 (ATCC 14067) である。完全寒天培地 (CM-2S) の組成 (1 l 当たり、pH 7.0 KOH で) はポリペプトン 10g、酵母エキス 10g、NaCl 5g、シヨ糖 5g と寒天 20g で、120℃、20分間殺菌した。種培養と主培養にはクエン酸培地 (Cit-med) を用いた。その培地組成 (1 l 当たり、pH 7.3、NaCl で) はクエン酸 2 Na·2 H₂O 20g、グルコース 2g、豆濃 (大豆タンパク質酸加水分解物: 全N=3.5g/dl) 4 ml、硫酸アンモニウム 10g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄·7 H₂O 0.4g、FeSO₄·7 H₂O 10mg、MnSO₄·7 H₂O 8.1mg、サイアミン塩酸塩 100 μg、d-ビオチン 30 μg と消泡剤 (AZ-20R) 0.2 ml で 115℃、15分間殺菌した。CM-2S に 30℃、24hr 生育した菌体 1 白金耳を Cit-med を 50ml 含む 500-ml 坂口フラスコに接種して 120rpm、30℃、24hr 振とうした。この種培養フラスコの 4 本分のブロス を 20 l の Cit-med を含む ジャーファーメンターに接種して 250rpm、30℃、23hr 通気 (1 l / 1 / min) 攪拌培養を行った。得られたブロス を ジャープレス遠心機 (17,500rpm) で遠心して集菌し、菌体を 0.2% KCl で洗浄し、-20℃ で保存した。

2. 無細胞抽出液の調製

洗浄菌体 30g (湿重量) を 30ml の buffer A (0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.5、20mM KCl、1 mM MgCl₂、0.1mM EDTA と 2 mM dithiothreitol (DTT)) に懸濁し、ガラスビーズ 100g (Sigma 106 ミクロン以下) と共に 200-ml ガラス専用容器に入れてブレンダー (Oster Mini-Blend. Wisconsin, USA) 中で氷水冷却しながら菌体を破碎した。破碎液を 30,000×g で遠心分離し、ガラスビーズ画分は buffer A で洗浄 2 回行い、抽出液と洗液とを混ぜて 100,000×g で 30分間遠心し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

3. MDHの精製

洗浄菌体 212g より上記の方法で得られた 1010ml の抽出液に結晶硫酸を加えて 60% 飽和にし、遠心分離して得られた上清に更に硫酸を加えて 80% 飽和にして生じた沈殿を遠心により集め、buffer A に溶かして、これに再び硫酸を加えて、同様な方法で 40%~70% 飽和沈殿画分を buffer B (0.05M Tris-HCl buffer を含む以外は buffer A と同じ) に溶解し、buffer B に対して透析した。透析した酵素液 (約 70ml) を予め buffer B で平衡にした DEAE-Toyopearl 650M カラム (2.6×34cm) に通して酵素を吸着させた後 200ml の buffer B でカラムを洗浄し、1 l の buffer B と 1 l の 0.3M NaCl を含む buffer B を用いてグラジエント溶出を行った。次に MDH 溶出画分を再び buffer B に対して透析し、これを (約 100ml) 予め 0.05M NaCl を含む buffer B で平衡にした DEAE-Toyopearl 650M カラム (1.9×25cm) に通した後、同

じ buffer 80ml でカラムを洗浄し、400ml の 0.05M NaCl を含む buffer B と 400ml の 0.2M NaCl を含む buffer B とを用いて、グラジエント溶出を行った。得られた MDH 溶出画分を下記に示すアフィニティクロマトに使用した。MDH 溶出画分を再び buffer B に対して透析し、これを (約 60ml) AF-Blue-Toyopearl 650ML (1.7×10cm) に通した後、20ml の buffer B でカラムを洗浄し、100ml の buffer B と 100ml の 1 M NaCl を含む buffer B を用いてグラジエント溶出を行った。次に MDH 溶出画分をアミコン限外ろ過器 (RM-10膜) を用いて濃縮した。

4. 酵素活性測定法

MDH 活性: 反応混液 (全容量 1 ml) は 100mM Tris-HCl buffer, pH 8.5、1 mM オキザロ酢酸 (OAA)、0.1mM MnCl₂、0.2mM NADH と 20 μ l の MDH 液 (buffer B で希釈後) を含む。反応は室温 (20~23 $^{\circ}$ C) で行い、酵素添加により開始し、340nm での吸光度の変化の初速度を Gilford Response 分光光度計で測定した。

マリックエンザイム (ME): 反応混液 (全容 1 ml) は 100mM Tris-HCl buffer, pH 8.5、5 mM L-リンゴ酸、0.1mM MnCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.2mM NADP と 20 μ l の ME 液 (buffer B で希釈後) を含み、酵素添加により反応を開始し上記と同様に反応初速度を測定した。

酵素活性単位は一分間に 1 μ mol の NADH の減少量または NADPH の増加量をもたらす酵素活性量を 1 ユニット (U) とした。

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法⁹⁾ で行った。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

未変性タンパク質電気泳動 (Native-PAGE) は ATTO-コンパクト PAGE system を用い 10% ゲルで行った。ゲル中のタンパク質は Coomassie brilliant blue R-250 で染色した。

6. 分子量の測定

ゲルろ過法: Buffer B 1 ml にチオグロブリン (bovine、670,000) 3 mg、ウレアーゼ (soybean、480,000-490,000) 1 mg、カタラーゼ (bovine、248,000) 2 mg、アルコール脱水素酵素 (yeast、150,000) 0.5mg、パーオキシダーゼ (horse radish、40,000) 0.5mg、チトクローム C (horse heart、12,5000) 0.5mg と精製 MDH 標品 50 μ l を加え、Toyopearl HW-50 または HW-60 カラム (1.9×40cm) と buffer B を用いてゲルろ過を行った。

SDS-PAGE 法: 精製 MDH 標品を常法により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 $^{\circ}$ C、2 分で変性させ、12.5%ゲルを用いて上記 5. と同様に電気泳動した。この時標準タンパク質として牛血清アルブミン (68,000)、オバラミン (45,000)、

トリプシノーゲン (bovine、26,000)、トリプシンインヒビター (soybean、20,000) と α -ラクトアルブミン (bovine、14,400) を用い、上記 5. 同様にゲルを染色した。

7. N末端アミノ酸配列決定

精製 MDH 標品を Tris-tricine buffer を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンにブロットイングし、膜上のタンパク質スポットをタンパク質シークエンサー (Perkin-Elmer、476A または Procise 492) にかけた。

実験結果

1. MDHの精製

以前の初歩的な培養実験より *B. flavum* をグルコース培地よりもクエン酸培地で培養した方が高い MDH 活性が観察されたので、今回はクエン酸培地で生育した菌体から MDH を抽出した。抽出には大量の菌体量 (湿重量 212g) から出発したので、約 30g ずつ小分けにしてガラスビーズ法で抽出を行った。今回採用したガラスビーズ法は超音波破碎法よりも大量の菌体破碎には大変有効であることがわかった。精製過程の結果は表 2 に示した。まず、硫酸塩析によるタンパク質の分画では本酵素は硫酸濃度 60-80% という比較的高い飽和度で塩析されることがわかった。再硫酸分画した結果、MDH 活性の回収は 90% 以上であった。この高い回収率は本酵素が硫酸によって活性化されたためと考えられる。

表 2 *Brevibacterium flavum* からのリンゴ酸脱水素酵素の精製
菌体 212 g (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)	MDH 活性	
			全活性 (U) *	比活性 (U/mg蛋白質)
抽出液	1010	9,747	25,220	2.6
硫酸分画 (第 1) (0.6~0.8飽和沈殿)	69	2,329	21,666	9.3
硫酸分画 (第 2) (0.5~0.7飽和沈殿)	67	1,500	24,321	16.2
DEAE-Toyopearl (第 1) (0→0.3M NaCl)	100	384	19,800	51.6
DEAE-Toyopearl (第 2) (0.05→0.2M NaCl)	60	70	13,400	191
AF-Blue Toyopearl	66	11.5	6,312	548
限外濾過 (PM10)	9	5.4	2,796	517

*1 U = 1 μ mol NADH→NAD/min

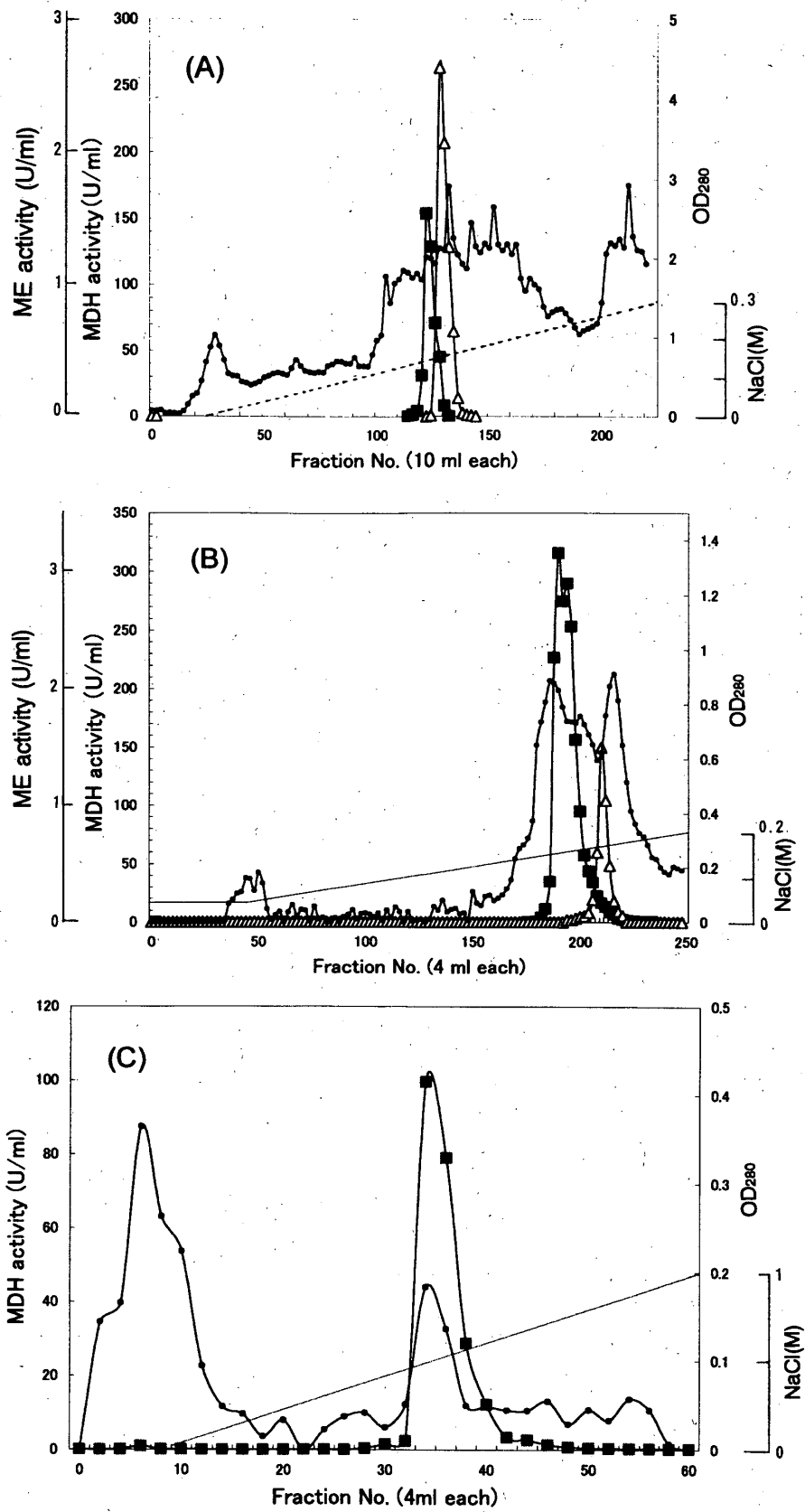


図2 第1回DEAE-Toyopearl (A)、第2回DEAE-Toyopearl (B) と AF-Blue-Toyopearl (C) カラムクロマトグラフィー
MDH活性、■；ME活性、▲；OD₂₈₀、●。

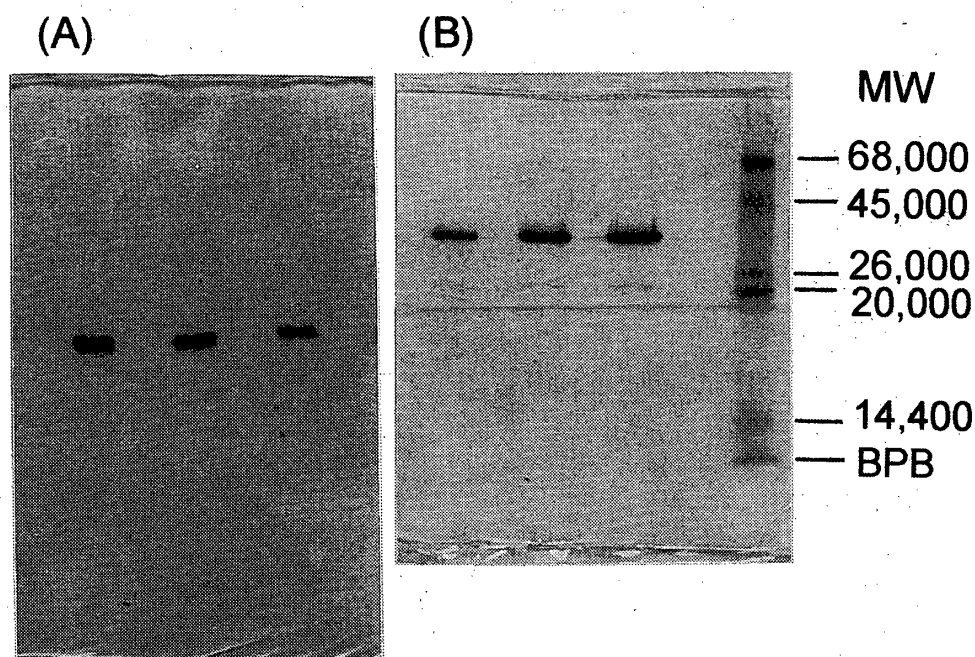


図3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)
(A) Native PAGE (B) SDS-PAGE

次に DEAE-Toyopearl でクロマトを行った結果、図 2 A に示すように、MDH と ME とは完全に分離していなかったため、MDH 画分を再クロマトを行った。今度は NaCl 濃度勾配を更に小さくした。その結果、図 2 B に示すように、両酵素はお互いにほぼ完全に分離した。次に、アフィニティクロマトを行った。その結果、図 2 C に示すように、MDH 活性の溶出曲線の山はタンパク質 (OD₂₈₀) の山に一致した。従って本酵素は均一に精製されたと考えられる。MDH 溶出画分を限外ろ過により濃縮した結果、回収率は 44% と悪く、おそらく、ろ過膜に結合してしまったと考えられる。最終的に比活性は約 200 倍に増加し、収率は約 11% であった。この濃縮酵素の native-PAGE を行った結果、図 3 A に示すように、単一のタンパク質のバンドが観察された。この結果からも、本酵素は均一に精製されたと思われる。

2. MDH の分子状態

本酵素標品をゲルろ過法で分子量を測定した結果、Toyopearl HW-50 を用いた時は 125,000 (図 5 A) が得られ、Toyopearl HW-60 を用いた時は 135,000 の値 (図 5 B) が得られた。この二つの値の平均値 130,000 を本酵素の分子量とした。次に、SDS-PAGE を行った結果、図 3 B に示すように単一のタンパク質のバンドが観察され、サブユニットは一種類であることがわかった。分子量マーカーでの検量曲線 (図 4) から、サブユニットの分子量は 33,000 であった。従って本酵素は 四量体 (homotetramer) である。本酵素タンパク質のアミノ基 (N) 末端のアミノ酸配列を調べた結果、図 6 に示すように、NSPQNVST の配列が得られた。このとき一種類の N 末配列が観察されたので、本酵素は均一のタンパク質であることが更に裏付けられ

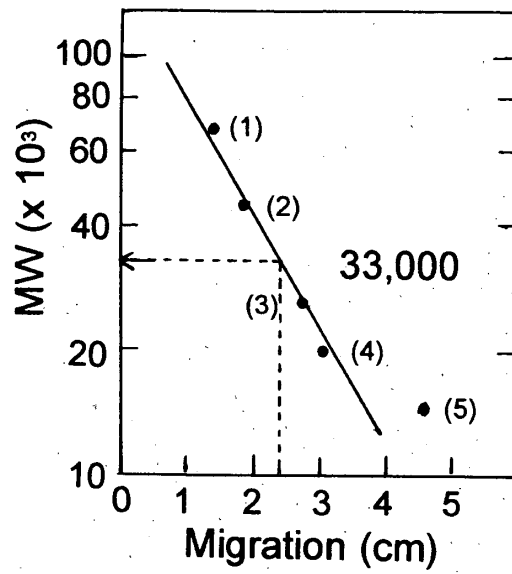


図4 図3 Bから得られた移動距離と分子量との関係
(1), (2), (3), (4), (5) の点は図3 Bの分子量
マーカーを分子量の大きい順にプロットしたもの。

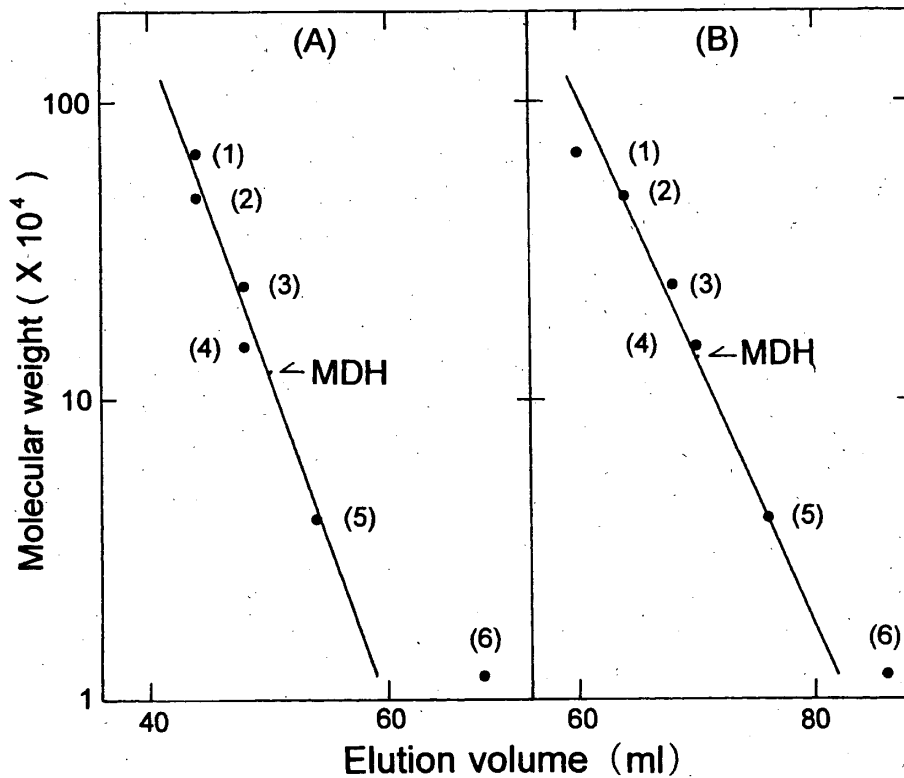


図5 ゲルろ過における溶出位置と分子量との関係
Toyopearl HW-50 (A) と Toyopearl HW-60 (B) カラムを使用。
分子量マーカー：(1) thyroglobulin、(2) urease、(3) catalase、
(4) alcohol脱水素酸素、(5) peroxidase、(6) cytochrome C

B. fla NSPQNVST

<i>C. glu</i>	MSFQVSIK	KVTVTGAAGQ	ISYSLRWRIA	NGEVFGTDP	VELKLEIPQ	ALGGAEGVAM	60
	ELLDSAPPL	RNITITADAN	EAFDGANAAP	LVGAKPRGK	EERADLLANN	GKIFGPQGA	120
	INDNAADDI	VLVGNPANT	NALIASAAP	DVPASRFNAM	MRLDHNRAIS	QLATKLRGS	180
	AEFNNIVWG	NHSATQFPDI	TYATVGGEKV	TDLVDHDWYV	EEFIPRVANR	GAEIIEVRGK	240
	SSAASAASSA	IDHMRDWWQ	TEAWSSAIP	STGGYGIPEG	IFVGLPTVSR	NGEWEIVEGL	300
	EISDFQRARI	DANAQELQAE	REAVRDLL				328

図6 *B. flavum* MDH分子のアミノ基末端配列と *C. glutamicum* MDH分子の全アミノ酸配列
C. glutamicum MDHのアミノ酸配列は GenBank accession No. CAC83073から入手した。

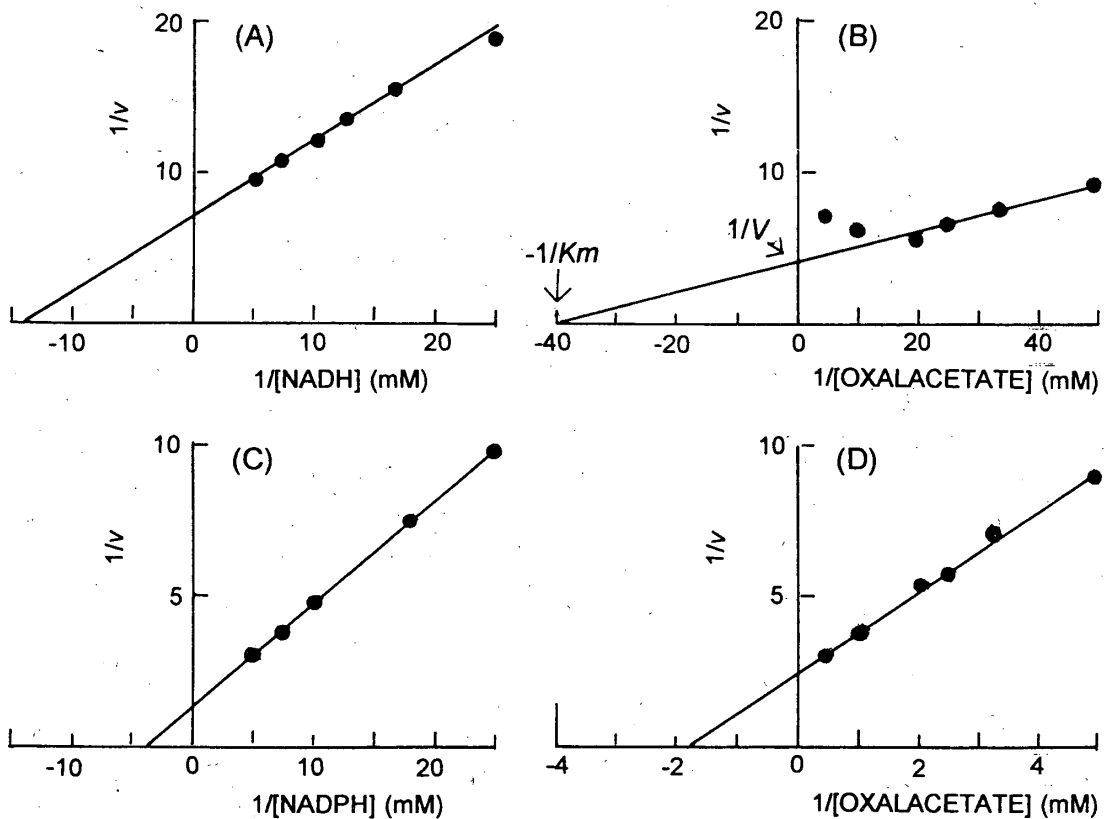


図7 *B. flavum* MDH反応のpH6.5におけるLineweaver-Burkプロット
 NADH-oxalacetate 反応系 (A) (B)。
 NADPH-oxalacetate 反応系 (C) (D)。
 $v = OD_{430} / \text{min}$

た。本酵素がMDH反応をするときに、サブユニットの存在のためにアロステリック効果を示すかどうかを調べた。本酵素の反応の最適 pH は NADH、NADPH の両補酵素に対して同じ 6.5であったので、この pH で Lineweaver-Burk プロットを行った。まず、NADH-oxalacetate 反応系では、図7 A と B に示すように直線が得られた。従って、アロステリック効果は示さないと考えられる。なお、図7 B の中で、高濃度のオキサロ酢酸の曲線が上昇しているのは基質阻害による結果と考えられる。また、NADPH-oxalacetate 反応系では、図7 C と D に示すように、いずれも直線が見られた。従って、両反応系でアロステリック効果は観察

表3 *B. flavum* のMDHの動力学的パラメーター
 図7より計算された値を示す。

反応系	基質	K_m (M) $\times 10^{-5}$	k_{cat}^* (S^{-1}) $\times 10^2$	k_{cat}/K_m ($M^{-1}S^{-1}$) $\times 10^6$
NADH-OAA	NADH	7.0	2.0	2.8
	OAA	2.5	3.6	14.0
NADPH-OAA	NADPH	25	2.8	1.12
	OAA	55	1.5	0.27

OAA = oxalacetate

* k_{cat} (catalytic center activity触媒中心活性=酸素分子が
 1秒間に触媒する基質の分子数÷活性中心の数(n))の求め方:
 使用酸素分子数(A): MDH(分子量=130,000, $n=4$)
 $0.6mg/ml$ を $0.02ml$ 添加した場合= $1.2/1.3 \times 10^{-10}$

反応した基質の分子数(B): (V =図7の縦軸交点 $1/V$ より)
 $\times (1/6.22) \times (1/60) \times 10^{-6} = (V) \times (1/373.2) \times 10^{-6}$

\therefore MDH分子活性= $B/A = (V) \times 29$

MDH触媒中心活性= $(V) \times 29 \times (1/4)$

もし酸素液をC倍希釈後、 $0.02ml$ 使用した場合は

MDH触媒中心活性(k_{cat})= $(V) \times 29 \times (1/4) \times C$

されなかった。これらのプロットから動力学的パラメーターを求めた結果を表3にまとめた。
 両反応系間では k_{cat} の値がほぼ等しかったので、生体内では、基質が十分にある時は両補酵
 素は同等に作用することになる。しかし、基質との親和性を示す K_m 値はNADH系は
 NADPH系よりも小さい値を示したので、基質が低濃度の場合はNADH系が主に作用してい
 ると考えられる。両パラメーター値の比 k_{cat}/K_m は一般に酵素本来の活性の強さ比較に用
 いられるが、NADH-oxalacetate反応系の方が約10倍高い値を示した。

考 察

*B. flavum*のMDHの分子量は130,000、サブユニットは33,000であり、本酵素は四量体で
 ある。本菌と同様にグルタミン酸生産菌であり、分類学上近縁の*C. glutamicum*の分子量は
 $60,000^{9)}$ 、サブユニットは $39,000^{9)}$ と $33,000^{9)}$ と報告されている。従って、
*C. glutamicum*のMDHは二量体と考えられる。これまでの文献では、すべての真核生物と
 大部分の細菌(真性)のMDHの分子量は60,000から70,000である。また、*Bacillus*属と多

くのグラム陽性の細菌（真性）の MDH は四量体で 120,000 から 150,000 である。¹⁰⁾ *B. flavum* はグラム陽性であるので、本菌の酵素は後者のグループの性質に一致する。補酵素特性に関しては、動物と細菌（真性）の MDH は NAD (H) 特異的に作用し、NADP (H) には作用しないか、または、ごくわずかしき作用しないと一般に言われている。これまでの文献では、すべて pH 8.0 付近での測定により補酵素特異性を調べている。この論文のように中性付近の pH 6.5 で比較した報告は見あたらない。表 3 で示すように、*k_{cat}* 値では両補酵素でほぼ同等の値を示した結果はこの論文が初めてと思われる。生体内の pH は中性と考えられるので、今回の結果は生体内の代謝調節を推測する上で参考になると考えられる。酵素タンパク質のアミノ基末端のアミノ酸配列では、図 6 に示すように、*C. glutamicum* のそれと一致した。しかし、*B. flavum* では末端の M (メチオニン) が検出されなかった。この違いは *C. glutamicum* MDH のアミノ酸配列は遺伝子解析から決定したためと思われる。

謝 辞

アミノ基末端のアミノ酸配列を測定して頂いた山口大学農学部の高橋進博士と山本芳実博士および同大医学部の渡部省二博士に厚く感謝する。

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) Van Der Rest, M.E., Frank, C. and Molenaar D., Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, **182**, 6892-6899(2000).
 - 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-273 (1951).
 - 9) Koide, H., Yoshikawa, N. and Kimura, K., Japan Kokai Tokkyo Koho 26396 (Feb. 27, 1979)
 - 10) Murphey, W.H., Kitto, G.B., Everse, J. and Kaplan, N.O., Malate dehydrogenases. I. A survey of molecular size measured by gel filtration. *Biochemistry*, **6**, 603-610 (1967).