

## スサビノリのグルタミン酸脱水素酵素について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	佐藤, 実 佐藤, 美和 土屋, 靖彦
巻/号	41巻3号
掲載ページ	p. 337-341
発行年月	1975年3月

## スサビノリのグルタミン酸脱水素酵素について

佐藤 実・佐藤美和・土屋靖彦

(1974年11月26日受理)

Occurrence of Glutamate Dehydrogenase in Purple Laver, *Porphyra yezoensis*Minoru SATO\*<sup>1</sup>, Yosikazu SATO\*<sup>1</sup>, and Yasuhiko TSUCHIYA\*<sup>1</sup>

The reaction catalyzed by L-glutamate dehydrogenases (E. C. 1.4.1.2-4; GDH) is one of the principal routes by which ammonia is incorporated into organic nitrogen. GDH has been isolated from a wide variety of sources including higher plants and animals, and bacteria; however, as yet, there is very little information regarding the occurrence of this enzyme in seaweed. The present investigation was undertaken to elucidate the property of GDH from purple laver, *Porphyra yezoensis*.

The highest GDH activity was found in the 0.5-0.7 ammonium sulfate fraction of tissue extracts. GDH from the purple laver was specific to NADP as the coenzyme. The optimum pH for enzyme activity was approximately 7.7. The  $K_m$  values for GDH- $\alpha$ -ketoglutaric acid, -ammonium sulfate, -NADPH, -glutamic acid and -NADP were found to be  $5.0 \times 10^{-4}$  M,  $5.3 \times 10^{-3}$  M,  $7.6 \times 10^{-5}$  M,  $1.4 \times 10^{-2}$  M and  $1.8 \times 10^{-5}$  M respectively.

グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) によつて触媒される反応はアンモニアを有機態窒素に取り込む重要な経路の一つである。すなわちグルタミン酸と NAD\*<sup>2</sup> または NADP\*<sup>3</sup> のいずれかとの間の酸化還元を触媒し、 $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸を生成する。これによつてアンモニアを同化する大きな役目を果たすと共に、一方この逆反応によつてグルタミン酸を TCA サイクルに合流させ、炭水化物とアミノ酸代謝をつなぐという意味をもつて重視される。

従来、陸上動植物、微生物および単細胞藻類の GDH に関する研究は比較的多く見られるが、水産植物特に大型海藻に関してはわずかに JACOBI<sup>1)</sup> のアオサ *Ulva lactuca* についての報告があるにすぎない。DAVID<sup>2)</sup> らは高等植物において NAD および NADP の両方を補酵素として  $\alpha$ -ケトグルタル酸の還元的アミノ化反応を触媒する GDH を報告している。陸上植物同様に、アンモニアを積極的に同化するところの水産植物にとつても、この GDH は重要な役割をもつと思われ、その存在と性質を知る事はひとり海藻の増養殖上に基礎的知見を加えるのみでなく、陸上植物等との比較生化学的観点からも意義が甚だ深い。今回はスサビノリの GDH に関する実験を行ない、それが NADP だけを補酵素とする特性のあることを見いだした。以下、スサビノリ GDH の諸性質について報告する。

## 試料および実験方法

**試料** 試料のスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は岩手県三陸町崎浜地先の海苔養殖施設で入手し、直ちに実験試料とした。なお試料の一部は  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結貯蔵して用いた。

\*<sup>1</sup> 北里大学水産学部水産食品学研究室 (Laboratory of Marine Food Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku-cho, Kesen-gun, Iwate Prefecture, 022-01 Japan)

\*<sup>2</sup> NAD Nicotinamide adenine dinucleotide.

\*<sup>3</sup> NADP Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

**酵素液の調整** スサビノリを純水で軽く洗い余分の水分を乾燥ろ紙で除いた後、包丁で細かく切り、これに3倍量の pH 7.6, 0.05 M リン酸緩衝液と少量の塩酸洗浄海砂を加えて、氷冷乳鉢でよく磨碎し、酵素を抽出した。これを 2°C, 10,000×g で 20 分遠心分離して得られた上澄を塩析して、その硫酸 50~75% 飽和沈殿画分を 2°C, 10,000×g で 20 分遠心分離する。この沈殿物を集めて pH 7.6, 0.05 M リン酸緩衝液に透析した後、さらに 2°C, 10,000×g 20 分遠心分離して得られた上澄液を酵素液とした。

**酵素活性の測定** GDH 活性の測定は BULEN<sup>3)</sup> らの方法に準じ NADH あるいは NADPH の 340 nm の吸光度の減少を島津自記分光光度計 UV-200 で測定した。酵素反応液の組成は、0.2 M  $\alpha$ -ケトグルタル酸, 0.2 ml; 0.4 M 硫酸アンモニウム, 0.2 ml; 1 mg/ml NADPH (又は NADH), 0.5 ml; 0.25 M トリス-塩酸緩衝液 2.0 ml。これを 2 分間 30°C に保つた後、適当に希釈した酵素液 0.1 ml を加えて反応を開始させる。その 1 分後における吸光度を測定し、ついで 6 分後の吸光度を求めて、その減少値より酵素活性を求めた。1 分間に 1  $\mu$  mole の補酵素を酸化する酵素量をもつて 1 酵素単位とした。比活性は蛋白 1 mg 当りの酵素単位で表わした。

**蛋白量の定量** 牛血清アルブミンを標準物質として銅フォーリン法によつて定量した。

**電気泳動および活性部位の検出** ディスク電気泳動は分離用 7.5%, 濃縮用 2.5% のアクリルアミドゲルを用いトリス-グリシン緩衝液 pH 8.3 で行なつた。なお泳動後直ちに FINE, COSTELLO<sup>4)</sup> らのテトラゾリウム法に従つてゲルの酵素活性部位を検出した。

### 結果および考察

**補酵素特異性** スサビノリ GDH の補酵素特異性を調べた結果を Table 1 に示す。それによるとスサビノリには補酵素として NADP だけを利用する GDH の存在が認められた。一方動植物等に広く存在する NAD-GDH 活性はスサビノリの抽出液そのものおよび硫酸分画を行ない濃縮した酵素液にも全く観察されなかつた。また電気泳動ゲルのテトラゾリウム染色法によつても NAD-GDH が同様に検出されなかつた (Fig. 4)。一般に高等植物において従来知られている NAD 依存性の GDH (E. C. 1.4.1.2) の他に、それぞれの活性には差はあるが NAD と NADP の両方を利用できる GDH (E. C. 1.4.1.3) が存在するといわれる。<sup>2,5)</sup> 微生物のアカバノカビ<sup>6)</sup> や *Thiobacillus*<sup>7)</sup> では NAD と NADP を別々に利用する 2 種類の GDH (E. C. 1.4.1.2 と 1.4.1.4) が、また *Lactobacillus*<sup>8)</sup> では NADP 依存性の GDH (E. C. 1.4.1.4) だけが存在するといわれる。一方、アオサの GDH は NAD の方がよく利用されるといわれる。しかし、これが NAD(P)-GDH (E. C. 1.4.1.3) 型か、NAD-, NADP-GDH (E. C. 1.4.1.2 と 1.4.1.4) 型なのかは明らかでない。スサビノリ GDH が NADP だけを特異的に利用する点では高等植物よりむしろ微生物の型 (E. C. 1.4.1.4) に近いと思われる。なお、クロレラでは培養液の窒素源を硝酸塩からアンモ

Table 1. Specificity of GDH for its coenzyme

The assay solution consisting of 0.5 ml of 1 mg/ml NAD(P)H, 0.2 ml of 0.4 M ammonium sulfate and 2.0 ml of 0.25 M Tris buffer, pH 7.7 (purple laver) or pH 8.3 (spinach leave), was preincubated at 30°C for 2 minutes, and then mixed with 0.1 ml of enzyme solution. The optical density of the reaction mixture was measured at 340 nm in the course of 6 minutes. An enzyme unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the oxidation of 1  $\mu$  mole of NAD(P)H per minute. Specific activity is given in enzyme unit per mg of protein.

GDH source	Coenzyme	Protein ( $\mu$ g/ml)	Enzyme activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg)
Purple laver	NADP	78	11.2	143.6
	NAD	780	0	0
Spinach	NADP	100	3.0	30.0
	NAD	100	12.3	123.7

ニア塩に変えることにより、NAD-GDH: NADP-GDH が 5:1 から 1:33 に変化するという報告<sup>9)</sup>や、一方セイヨウカボチャの NAD-GDH アイソザイムの数が発芽の段階で1個から7個へ増えるという報告<sup>9)</sup>がある。スサビノリ GDH が元来 NADP に特異的であり、NAD は全成長段階を通じて全く利用されないのか、あるいはそれが一時的なものであつて栄養状態や成長段階で NAD-GDH が誘導されて NAD も利用されるのかは、今後さらに検討する必要がある。

**至適 pH** Fig. 1 はスサビノリ GDH 活性と pH の関係を示したものである。これにより至適 pH が 7.7 付近にあることがわかる。この値はアカパンカビ<sup>9)</sup>や *Lactobacillus*<sup>9)</sup> で観察された 8.2~8.5 より低

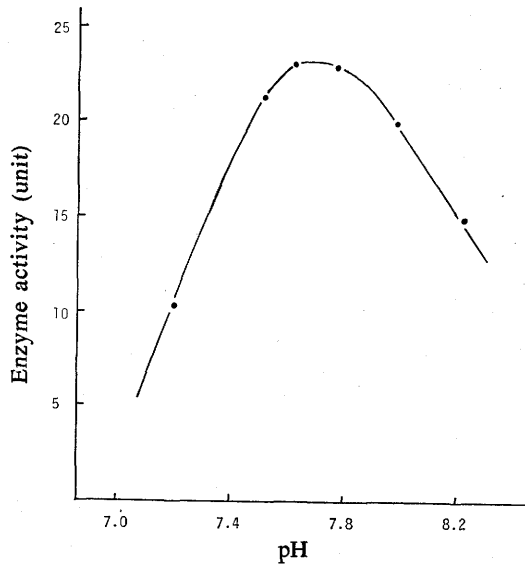


Fig. 1. Effect of pH on the activity of GDH from purple laver.

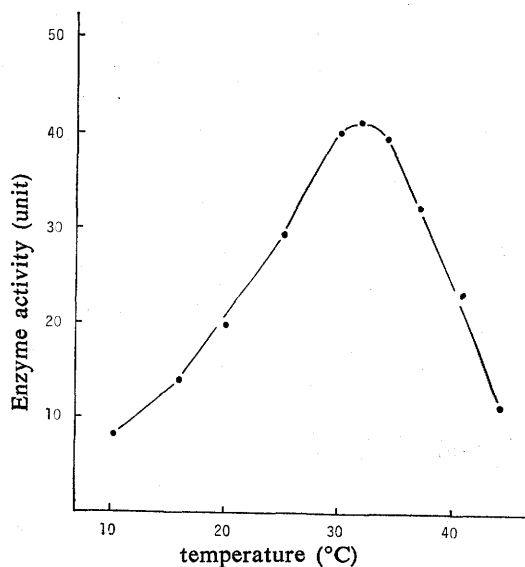


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of GDH from purple laver.

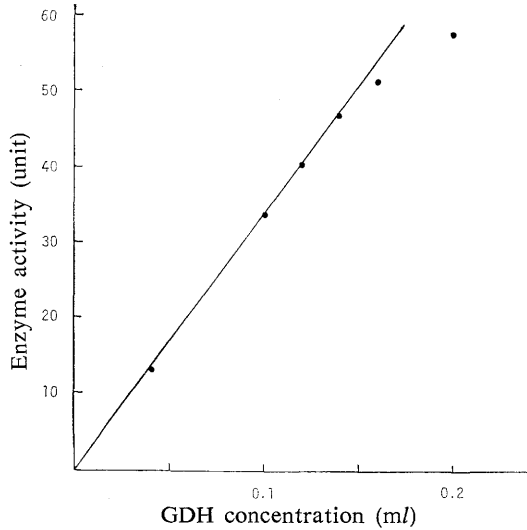


Fig. 3. The relation between GDH concentration and its activity.

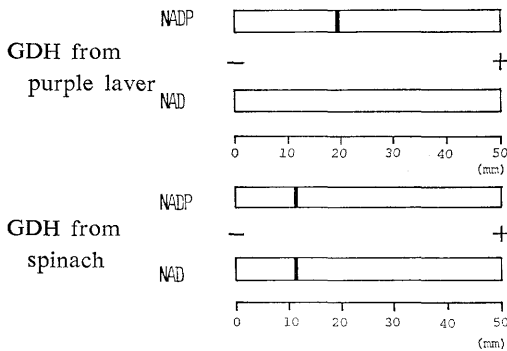


Fig. 4. Disc electrophoretic patterns of GDH from purple laver and spinach. Electrophoresis was performed by 7.5% polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer (pH 8.3), at 3.0 mA per tube. The GDH activities were detected on the gels with a tetrazolium assay.

Table 2.  $K_m$  values for purple laver GDH at pH 7.7

Substrate	$K_m, M$
NADPH	$7.6 \times 10^{-5}$
$\alpha$ -ketoglutaric acid	$5.0 \times 10^{-4}$
Ammonium sulfate	$5.3 \times 10^{-3}$
NADP	$1.8 \times 10^{-5}$
Glutamic acid	$1.4 \times 10^{-2}$

く, *Thiobacillus*<sup>7)</sup> の 7.5 に近い。

**温度の影響** スサビノリ GDH について、至適 pH 7.7 で 10~45°C の温度範囲で 5 分間反応を行なった。その結果 Fig. 2 に示すごとく 5 分間反応させた時の反応量は 32°C 付近で最も大きく、45°C 付近では失活が著しかった。

**酵素活性と酵素量の関係** Fig. 3 に見られるように本測定条件下では少なくとも 45 酵素単位

(unit) まで酵素量と酵素活性が比例する。

**硫酸分画** スサビノリ NADP-GDH は抽出液の硫酸アンモニウム塩析で 50~70% 飽和分画に強い活性が表われた。この段階で比活性は約 4 倍になった。50% 飽和硫酸分画は 50~70% 飽和硫酸分画とくらべて沈殿量が約 10 倍で、比活性は 1/50 程度であつた。なおこの分画は酵素活性測定の際となる多量の赤色色素を含んでいた。一方 70~90% 飽和硫酸分画は沈殿量、酵素活降とも微少であつた。

**ディスク電気泳動による活性部位の検出** Fig. 4 はスサビノリ酵素液とホウレンソウ葉部酵素抽出液(硫酸 30~70% 飽和沈澱分画) とをディスク電気泳動した後、ゲルをテトラゾリウム染色法を用いて GDH 活性部位を検出した図である。スサビノリ GDH は NADP-GDH にはつきりと観察されるが、NAD-GDH は酵素量をいろいろと変えて行なつたにもかかわらず検出されなかつた。なおホウレンソウの NADP-

NAD-GDH はほぼ同位置に検出され、スサビノリ NADP-GDH とは明らかに異なり別種の酵素と思われる。

**反応基質の Km 値** 逆反応を含めた各反応基質の Km 値を LINEWEAVER-BURK 法により求めた結果を Table 2 に示した。これによるとスサビノリ GDH の各基質の Km 値は *Thiobacillus*<sup>7)</sup> の NADP-GDH (E. C. 1.4.1.4) で得られた Km 値に近く、サメ<sup>10)</sup> などの NADP-GDH (E. C. 1.4.1.3) の値とは異なっていた。

#### 文 献

- 1) G. JACOBI: *Planta*, **49**, 561-577 (1957).
- 2) W. L. DAVID: *Phytochem.*, **12**, 2631-2634 (1973).
- 3) W. A. BULEN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **62**, 173-183 (1956).
- 4) I. H. FINE and L. A. COSTELLO: in "Methods in Enzymology" (ed. by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN), vol. 6, Academic Press, New York, 1963, pp. 958-972.
- 5) K. CHOU and W. E. SPLITTSTOESSER: *Plant Physiol.*, **49**, 550-554 (1972).
- 6) B. D. SANWAL and M. LATA: *Canad. J. Microbiol.*, **7**, 319-328 (1961).
- 7) H. B. LEJOHN, I. SUZUKI and J. A. WRIGHT: *J. Biol. Chem.*, **243**, 118-128 (1968).
- 8) D. J. TALLEY, L. H. WHITE and R. R. SCHMIDT: *ibid.*, **247**, 7927-7935 (1972).
- 9) E. GALAS: *Zesz. Nauk. Politech. Lodz., Chem. Spozyw.*, No. 13, 5-95 (1966); *Chem. Abstr.*, **67**, 7518 (1967).
- 10) L. CORMAN, L. M. PRESCOTT and N. KAPLAN: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1383-1390 (1967).