

# 琉球大学学術リポジトリ

## Corynebacterium sepedonicum の結晶 L-オルニチントランスアミナーゼ： 反応生成物の同定(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安田, 正昭, 当山, 清善, 与那覇, 和雄, 左右田, 健次, Yasuda, Masaaki, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo, Soda, Kenji メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4023">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4023</a>

*Corynebacterium sepedonicum* の結晶L-オルニチン  
トランスアミナーゼ：反応生成物の同定<sup>†</sup>

47

安田正昭\*・当山清善\*・与那覇和雄\*  
左右田健次\*\*

Masaaki YASUDA, Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHARA and Kenji  
SODA: Crystalline L-ornithine transaminase from  
*Corynebacterium sepedonicum*: Identification of reaction product

Summary

The reaction product of L-ornithine with crystalline L-ornithine transaminase from *Corynebacterium sepedonicum* (IFO 3306) was investigated. The formation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate was shown by amino acid analysis and paper electrophoresis of the reaction product. These findings revealed that the terminal amino group of L-ornithine is transaminated to yield  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate. Therefore, glutamate- $\gamma$ -semialdehyde is produced directly from L-ornithine. Glutamate formed was identified as the L-enantiomer with L-glutamate dehydrogenase.

緒 言

L-オルニチンは尿素サイクルをはじめとする哺乳動物のアミノ酸代謝において重要な役割を担っている塩基性アミノ酸である。L-オルニチントランスアミナーゼは、L-オルニチンからプロリンへの代謝経路に関与する酵素であり、本酵素に関する研究は主として哺乳動物、特にラット肝臓を対象として行われてきた<sup>6,7)</sup>。一方、微生物の酵素に関する研究は極めて小さい。

筆者ら<sup>18)</sup>は細菌のL-オルニチン代謝過程に関与するトランスアミナーゼの性質を明らかにするために各種細菌の無細胞抽出液を用いてL-オルニチントランスアミナーゼの活性の分布を調べたところ、*Bacillus sphaericus* や *Corynebacterium sepedonicum* などに酵素活性が高いことを見出した。また、筆者ら<sup>14,16,17,18)</sup>は、*Bacillus sphaericus* の無細胞抽出液から本酵素の単離・精製を行ない、微生物酵素として初めて結晶化に成功し、本酵素の詳しい酵素化学的性質を明らかにした。さらに、筆者ら<sup>15)</sup>は、*Corynebacterium sepedonicum* の無細胞抽出液より本酵素の精製、結晶化を行った。本報においては、本菌における結晶L-オルニチントランスアミナーゼのL-オルニチンに対する作用特性について検討したので報告する。

<sup>†</sup>本論文の要旨は日本農芸化学会昭和52年度全国大会（昭和52年4月横浜市）で発表した。

\* 琉球大学農学部農芸化学科

\*\* 京都大学化学研究所

琉球大学農学部学術報告 29: 47 ~ 52 (1982)

## 実験方法

### 1 供試試薬

L-オルニチン,  $\alpha$ -ケトグルタル酸, ピリドキサル5'-リン酸は半井化学K.K.より購入した。o-アミノベンツアルデヒドはSmith<sup>9)</sup>の方法により化学合成した。 $\Delta^1$ -ピロリン-2-カルボン酸はD-アミノ酸化酵素を用いてD-プロリンから, $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸はL-リジン $\alpha$ -ケトグルタル酸 $\epsilon$ -トランスアミナーゼを用いてL-オルニチンからSodaとMisono<sup>10)</sup>の方法でそれぞれ酵素的に調製した。

### 2 供試菌と培養方法

供試菌は *Corynebacterium sepedonicum* IFO 3306である。培養液組成は, L-オルニチン 0.1%, ペプトン 0.5%, グリセリン 0.2%, 酵母エキス 0.05%,  $K_2HPO_4$  0.2%,  $KH_2PO_4$  0.2%, NaCl 0.2%とし, 2 N NaOH で pH 7.2 に調整した。菌の培養は30 l 容ジャーフェメンターを用いて 30°C, 18 hr 通気攪拌培養により行なった。菌体を遠心分離により集菌後 0.85% NaCl で2回洗浄後, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) でさらに洗浄した。洗浄菌体は使用するまで -20°C で保存した。

### 3 酵素の調製

L-オルニチントランスアミナーゼの精製, 結晶化は, 前報<sup>15)</sup>に従い, *Corynebacterium sepedonicum* の無細胞抽出液から行なった。

### 4 酵素反応生成物の調製

酵素反応混液の組成は, L-オルニチン 20  $\mu$ mol,  $\alpha$ -ケトグルタル酸 20  $\mu$ mol, ピリドキサル5'-リン酸 0.5  $\mu$ mol 及び L-オルニチントランスアミナーゼで, 総量 1.0 ml とした。酵素反応は 37°C で 30 分間行なった。反応液に 25% トリクロル酢酸を添加して反応を止め, その上澄液を分析に供した。

### 5 イオン交換クロマトグラフィー

反応生成物はアミノ酸分析装置 (JLC-6 AH, 日本電子社製) を用いて分析した。分析条件は, JEOL LCR-2 のカラム ( $\phi$  0.5  $\times$  45 cm) を用い, 0.2 N クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.25), 50°C であった。

### 6 濾紙電気泳動

濾紙電気泳動は Soda と Misono<sup>10)</sup> の方法により行なった。即ち, 高圧濾紙電気泳動装置 (Handex HC-HEP, 白井松社製, 大阪) と 東洋濾紙 (No. 53, 15  $\times$  53 cm) を用いて, 2 KV, 60 分間電気泳動を行なった。電気泳動を行なった濾紙を乾燥させた後, 0.1% o-アミノベンツアルデヒド-アセトン溶液を噴霧することにより反応生成物を同定した。

## 実験結果

### 1 酵素反応生成物のペーパークロマトグラフィー

L-オルニチントランスアミナーゼ反応により $\alpha$ -ケトグルタル酸から生成する反応生成物はペーパークロマトグラフィー (東洋濾紙: No. 53 A, 展開剤: フェノール: エタノール: アンモニア: 水 = 15: 4: 0.1: 1) によりグルタミン酸と同定された。本酵素反応で生成したグルタミン酸の分光学的特性は, L-グルタミン酸脱水素酵素により定量的に脱水素されることから L-型であることが証明された。

## 2. 酵素反応生成物と $o$ -アミノベンツアルデヒドとの反応で得られる呈色化合物の吸収スペクトル

L-オルニチントランスアミナーゼ反応によりL-オルニチンから生成する酵素反応生成物について検討した。まず、標準物質である $\Delta^1$ -ピロリン-2-カルボン酸と $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸に $o$ -アミノベンツアルデヒドを添加して37°C, 30分間放置したところ、435, 440 nm にそれぞれ吸収極大を有する黄色化合物が得られた。(Fig 1., Curve 2, 3)。酵素反応液に $o$ -アミノベンツアルデヒドを添

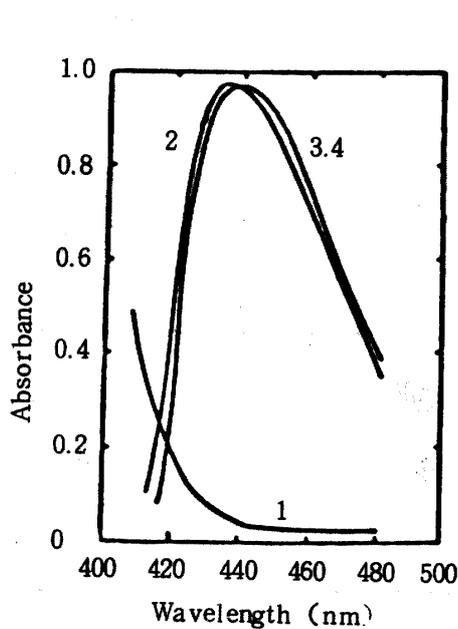


Fig 1.

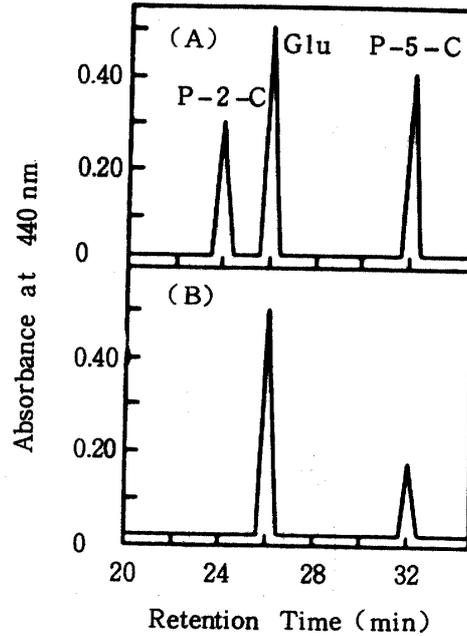


Fig 2.

Fig. 1. Absorption Spectra of Colored Product of  $\Delta^1$ -Pyrroline-2-Carboxylate,  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate and the Enzyme Product with  $o$ -Aminobenzaldehyde.

$\Delta^1$ -Pyrroline-2-carboxylate,  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate and the enzyme reaction product were incubated with  $o$ -aminobenzaldehyde (25 mM) in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 8.0) at 37°C for 30 min. Curve 1; Spectrum of  $o$ -aminobenzaldehyde, Curve 2; Spectrum of the colored product of  $\Delta^1$ -pyrroline-2-carboxylate with  $o$ -aminobenzaldehyde, Curve 3; Spectrum of the colored product of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate with  $o$ -aminobenzaldehyde, Curve 4; Spectrum of the enzyme reaction product with  $o$ -aminobenzaldehyde.

Fig. 2. Ion-Exchange Chromatography of the Reaction Product formed from L-Ornithine and  $\alpha$ -Ketoglutarate.

A reaction mixture containing 20  $\mu$ mol of L-ornithine, 20  $\mu$ mol of  $\alpha$ -ketoglutarate, 0.5  $\mu$ mol of pyridoxal 5'-phosphate, 100  $\mu$ mol of potassium phosphate puffer (pH 8.0), and 20  $\mu$ g of enzyme in a final volume of 1.0 ml was incubated at 37°C for 30 min. The reaction products were analyzed with a JEOL, JLC-6AH amino acid analyzer (a JEOL, LCR-2 column (0.5 by 45 cm) at 50°C in 0.2 N sodium citrate buffer, pH 3.25). (A) Authentic  $\Delta^1$ -pyrroline-2-carboxylate (P-2-C), glutamate (Glu), and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate (P-5-C); (B) reaction products.

加して同様に37℃, 30分間放置したところ, 黄色の呈色化合物が観察され, その吸収スペクトルは440 nm に吸収極大を有することがわかった (Curve 4)。従って, 本呈色化合物は  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸と  $\delta$ -アミノベンツアルデヒドとのキナゾリニウム塩であることが示唆された。

### 3. 酵素反応生成物のイオン交換クロマトフィー

酵素反応生成物を同定するために全自動アミノ酸分析装置を用いて反応液の分析を行なった結果を Fig 2 に示した。L-オルニチントランスアミナーゼ反応により生成した反応生成物の保持時間はグルタミン酸と  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸と一致した。

### 4. 酵素反応生成物の濾紙電気泳動

L-オルニチントランスアミナーゼ反応によりL-オルニチンから生成される酵素反応生成物を確認するために, 高圧濾紙電気泳動を行った (Fig. 3)。L-オルニチンに由来する酵素反応生成物は  $\Delta^1$ -ピロリン-2-カルボン酸ではなく,  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸であることが確認された。

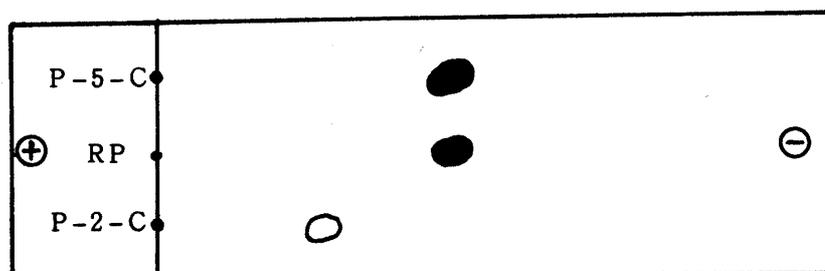


Fig. 3. Paper Electrophoresis of the Product from L-Ornithine. The experimental conditions are described in the text.

Abbreviation: P-2-C; authentic  $\Delta^1$ -pyrroline-2-carboxylate, P-5-C; authentic  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate, RP; reaction product

## 考 察

L-オルニチントランスアミナーゼはL-オルニチンからプロリンへの代謝経路に関与することで, 生理的に重要な役割を演じている酵素であり, 動物<sup>1,6,7)</sup>, 植物<sup>2,4,8,11)</sup>, 原生動物<sup>3)</sup>, 微生物<sup>5,13,14)</sup>, など生物界に広く分布している。本酵素のアミノ基供与体はL-オルニチンで, 基質特異性が極めて高い。D-オルニチン, L-リジン, プトレッシン,  $\delta$ -アミノ吉草酸には全く作用しなかった<sup>14,15)</sup>。L-オルニチンと $\alpha$ -ケトグルタル酸との間のアミノ基転移反応においてL-オルニチンの2個のアミノ基 ( $\alpha$ 位,  $\delta$ 位)のうちどちらのアミノ基が転位反応を受けるかについて検討した。

L-オルニチンの $\alpha$ 位のアミノ基がアミノ基受容体 ( $\alpha$ -ケトグルタル酸)に転移されるならば,  $\alpha$ -ケト- $\delta$ -アミノ吉草酸ができるが, そのものは非酵素的に脱水閉環をして  $\Delta^1$ -ピロリン-2-カルボン酸に変化する。一方,  $\delta$ 位のアミノ基がアミノ基受容体に転移されるならば, その結果としてグルタミン酸- $\gamma$ -セミアルデヒドの脱水閉環物である  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸に変化することが知られている。Corynebacterium sepedonicum の酵素による反応生成物は, イオン交換クロマトグラフィー及び高圧濾紙電気泳動などの実験結果から  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸であることが同定された。また, 核磁気共鳴による分析結果からL-オルニチントランスアミナーゼ反応によってL-オルニチンの $\delta$ -プロトンの脱離が行なわれるが $\alpha$ -プロトンは全く変化しないことが谷沢ら<sup>12)</sup>によって明らかにさ



2. Hasse, K., Ratyck, O. T. und Salnikow, J. 1967 Transaminierung und Decarboxylierung von Ornithin und Lysin in höheren Pflanzen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **348**: 843-851.
3. Hill, D. L. and Chambers, P. 1967 The biosynthesis of proline by *Tetrahymena pyriformis*, Biochim. Biophys. Acta, **148**: 435-447.
4. Mestichelli, L. J. J., Gupta, R. N. and Spenser, I. D. 1979 The biosynthetic route from ornithine to proline, J. Biol. Chem., **254**: 640-647.
5. Middelhoven, W. J. 1964 The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta, **93**: 650-652.
6. Peraino, C., Bunville, L. G. and Tahmisian, T. N. 1969 Chemical, physical and morphological properties of ornithine aminotransferase from rat liver, J. Biol. Chem., **244**: 2241-2249.
7. Sanada, Y., Shiotani, T., Okuno, E. and Katunuma, N. 1976 Coenzyme-dependent conformational properties of rat liver ornithine aminotransferase, Eur. J. Biochem., **69**: 507-515.
8. Seneviratne, A. S. and Fowden, L. 1968 Diamino acid metabolism in plants with special reference to  $\alpha, \beta$ -diamino propionic acid, Phytochemistry, **7**: 1047-1056.
9. Smith, L. I. and Opie, J. W. 1955 in Organic Syntheses (Horning, E. C., ed.), Coll. Vol. **3**, P. 56-58, Wiley, New York.
10. Soda, K. and Misono, H. 1968 L-Lysine- $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase II. Identification of a product,  $\Delta^1$ -piperidine-6-carboxylic acid, Biochemistry, **7**: 4102-4109.
11. Splitoesser, W. E. and Fowden, L. 1973 Ornithine transaminase from *Cucurbita maxima* cotyledons, Photochemistry, **12**: 785-790.
12. 谷沢克行, 麻田恭彦, 味園春雄, 沢田誠二, 安田正昭, 左右田健次 1980 細菌のリジン及びオルニチン $\omega$ -トランスアミナーゼ反応の立体化学, 生化学 **52**: 617.
13. Vogel, R. H. and Kopac, M. J. 1960 Some properties ornithine  $\delta$ -transaminase from *Neurospora*, Biophim. Biophys. Acta, **37**: 539-540.
14. Yasuda, M., Misono, H., Soda, K., Yonaha, K. and Toyama, S. 1979 Purification and crystallization of L-ornithine:  $\alpha$ -ketoglutarate  $\delta$ -aminotransferase from *Bacillus sphaericus*, FEBS Letters, **105**: 209-212.
15. Yasuda, M., Toyama, S., Yonaha, K. and Soda, K. 1980 Purification and crystallization of L-ornithine:  $\alpha$ -ketoglutarate  $\delta$ -aminotransferase from *Corynebacterium sepedonicum*, Bull. Inst. Res. Kyoto University, **58** (3): 366-370.
16. Yasuda, M., Toyama, S., Rando, R. R., Esaki, N., Tanizawa, K. and Soda, K. 1980 Irreversible inactivation of L-ornithine:  $\alpha$ -ketoglutarate  $\delta$ -aminotransferase by gabaculine, Agric. Biol. Chem., **44**: 3005-3006.
17. Yasuda, M., Tanizawa, K., Toyama, S. and Soda, K. 1980 Enzymatic microdetermination of L-ornithine and L-lysine, J. Appl. Biochem., **2**: 510-515.
18. Yasuda, M., Tanizawa, K., Misono, H., Toyama, S. and Soda, K. 1981 Properties of crystalline L-ornithine:  $\alpha$ -ketoglutarate  $\delta$ -aminotransferase from *Bacillus sphaericus*, J. Bacteriol. **148**: 43-50.
19. 安田正昭, 当山清善, 与那覇和雄, 左右田健次 1981 *Corynebacterium sepedonicum* のL-オルニチントランスアミナーゼ, 琉大農学報 **28**: 101-109.