

琉球大学学術リポジトリ

Corynebacterium sepedonicum の L-オルニチントランスアミナーゼ(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 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4053

Corynebacterium sepedonicum の L-オルニチントランスアミナーゼ†

安田正昭*・当山清善*・与那覇和雄*・左右田健次**

Masaaki YASUDA, Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHA and Kenji SODA : L-Ornithine Aminotransferase from *Corynebacterium sepedonicum*

I 緒 言

L-オルニチントランスアミナーゼ (L-Ornithine : 2-oxo-acid aminotransferase (EC 2.6.1.13)) 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重要な役割を演じている酵素であり、動物^{1,10)}、植物^{17,20)}、微生物^{12,16,22)} など生物界に広く存在している。本酵素は 1951 年 Quastel と Witty¹⁴⁾ によって動物組織中にはじめて発見された。1953 年、*Neurospora*²⁾ においてもその存在が明らかにされたものの、その後本酵素に関する研究は主として動物、特にラット肝臓を対象として行なわれ^{5,6,9,13)}、微生物の酵素についての研究は極めて少ない。

筆者ら²⁴⁾ は細菌の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ことを目的として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活性の分布を調べた結果、*Bacillus sphaericus* や *Corynebacterium sepedonicum* などに酵素活性が高いことを見出した。さらに、筆者ら^{23,25)} は、*Bacillus sphaericus* の無細胞抽出液から本酵素の精製、結晶化を行ない酵素化学的性質を明らかにした。本報においては、*Corynebacterium sepedonicum* の L-オルニチントランスアミナーゼの生産条件と酵素の性質について検討したので報告する。

II 実 験 方 法

1. 供試菌株

供試菌株は *Corynebacterium sepedonicum* (IFO 3306) である。

2. 培養液組成及び培養方法

培養液組成は L-オルニチン 0.10%、ペプトン 0.50%、グリセリン 0.20%、酵母エキス 0.05%、 KH_2PO_4 0.20%、 K_2HPO_4 0.20%、 NaCl 0.10% で pH 7.2 に調整し、120°C、20 分間滅菌して使用した。供試菌株の前培養は培養液 5.0 ml を試験管に採り 30°C、20 時間振とうして行ない、本培養は 500 ml

† 本論文の要旨は日本農芸化学会関西支部・西日本支部合同大会 (昭和 51 年 10 月高知市) 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 28 : 101 ~ 109 (1981)

容振とうフラスコに培養液 150ml を採り、前培養菌体を接種し 30℃ で 20 時間振とうして行なった。

3. 酵素液の調製

本培養の菌体を遠心分離により集菌後、0.85% 食塩水で 2 回洗浄し、さらに 0.1 mM ピリドキサル 5'-リン酸を含む 0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) で洗浄した。洗浄菌体に酸化アルミニウムを加え乳鉢中で破碎し、上記緩衝液を加えて抽出を行なった。遠心分離により酸化アルミニウム及び細胞残渣を除去し、上清液を上記緩衝液に対して一夜透析したものを酵素液として用いた。

4. 蛋白質の測定

酵素溶液中の蛋白質の測定は Lowry ら⁸⁾ の方法に従って行なった。

5. 酵素活性の測定

酵素反応混液の組成は L-オルニチン 20 μmol, α-ケトグルタル酸 20 μmol, ピリドキサル 5'-リン酸 0.1 μmol, リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 100 μmol および酵素で、総量 1.0 ml とした。酵素反応は 37℃ で 30 分間行ない、25% 三塩化酢酸 0.10 ml を加えて反応を停止した。遠心分離により除蛋白質を行ない、上清液について生成したグルタミン酸の定量を行なった。グルタミン酸の定量は Soda ら¹⁸⁾ の方法に準じてペーパークロマトグラフィー・ニンヒドリン法で行なった。酵素活性の単位は反応 1 分間に生成するグルタミン酸の μmol 数で表わし、比活性は蛋白質 1 mg あたりの単位数で表わした。

III 実験結果

1. 培養時間と酵素活性

Corynebacterium sepedonicum IFO 3306 菌株をオルニチン 0.10% を含むペプトン培地で各時間振とう培養し、菌体生育ならびに L-オルニチントランスアミナーゼ活性を調べた結果を Fig. 1 に示した。菌体生育と酵素活性は培養 6 時間から 12 時間目にかけて急激に増大し、培養 18 時間目で最大に達した。菌体中の酵素活性は 48 時間培養菌体でもほぼ同程度の活性を維持することがわかった。

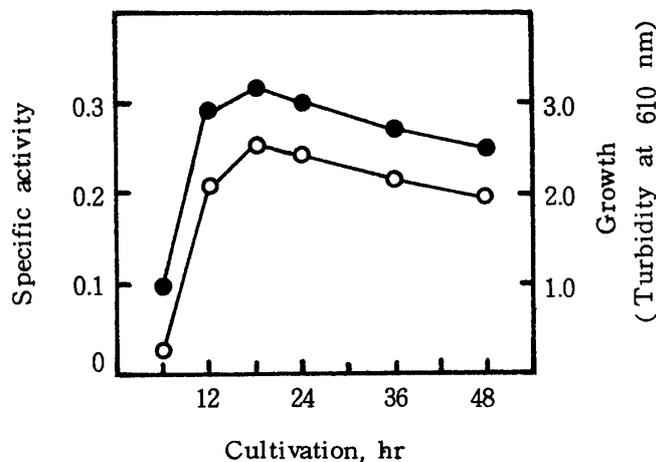


Fig. 1. Effect of Cultivation Time on the Production of L-Ornithine: α-Ketoglutarate Aminotransferase by *Corynebacterium sepedonicum*.

Corynebacterium sepedonicum IFO 3306 was grown in the following conditions. The growth medium consisted of 0.1% L-ornithine, 0.5% peptone, 0.2% glycerol, 0.05% yeast extract, 0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 and 0.1% NaCl. The bacterium was inoculated in 150 ml of the medium in a 500 ml flask. Cultivation was carried out 30°C for the time indicated on a reciprocal shaker. The cells harvested by centrifugation were washed with 0.85% NaCl. The washed cells were disrupted by grinding with aluminum oxide and extracted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH7.2) containing $10^{-5}M$ pyridoxal 5'-phosphate. The supernatant solution obtained by centrifugation was dialyzed against the same buffer and employed as the enzyme source. The standard reaction system consisted of 20 μ mol of L-ornithine, 20 μ mol of potassium α -ketoglutarate, 0.1 μ mol of pyridoxal 5'-phosphate, 100 μ mol of potassium phosphate buffer (pH8.0) and enzyme in a final volume of 1.0 ml. Reaction was carried out at 37°C for 30 min and terminated with 0.1 ml of 25% trichloroacetic acid. The glutamate formed was determined by paper chromatography. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme required for the formation of 1 μ mol of glutamate per min. The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

Growth (-●-), Enzyme Activity (-○-)

2. 酵素生産に及ぼす培地中のアミノ酸の影響

L-オルニチントランスアミナーゼ生産に及ぼす培地中のアミノ酸の影響を調べるためにペプトン、グリセリンを含む基本培地に各種アミノ酸を加えて供試菌株の培養を行なった。培養後の菌体から粗酵素液を調製し酵素活性を調べたのがTable Iである。

Amino Acids (0.2%)	Specific Activity
None	0.090
L-Arginine	0.181
L-Citrulline	0.100
L-Lysine	0.098
L-Glutamate	0.071
β -Alanine	0.070
γ -Aminobutyrate	0.094
L-Ornithine	0.262

Table I. Effect of Amino Acids in the Medium on L-ornithine : α -Ketoglutarate Aminotransferase Activity.

Corynebacterium sepedonicum IFO 3306 was grown in the growth medium contained 0.2% of an amino acid, and the enzyme activity was determined as described in Fig. 1.

酵素活性は培地中のL-オルニチンおよびL-アルギニンにより増大することが明らかになった。L-グルタミン酸、L-リジン、 γ -アミノ酪酸などのアミノ酸は酵素活性の増大には全く寄与しなかった。

さらに、ペプトン-グリセリン培地に各種濃度のL-オルニチンを加えて培養して得た菌体中の酵素活性を調べた結果、活性は培地中のL-オルニチン濃度に依存し、0.3%濃度で最大の活性を示した。従って、本酵素は培養液中のL-オルニチンによって誘導的に生成されることが明らかになった。

3. L-オルニチン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応と反応生成物の同定

α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とするL-オルニチントランスアミナーゼ反応においてグルタミン酸の生成条件について検討を行なった。Table IIには、オルニチン含有培地で培養して得た菌体の無細胞抽出液を酵素液として用い、各種反応系におけるグルタミン酸の生成について調べた結果を示した。

Table II Aminotransferase Reaction between L-Ornithine and α -Ketoglutarate.

The complete reaction system contained 20 μ mol of L-ornithine, 20 μ mol of potassium α -ketoglutarate, 0.1 μ mol of pyridoxal 5'-phosphate, 100 μ mol of potassium phosphate buffer (pH 8.0) and 0.50 mg of enzyme in a final volume of 1.0ml. After incubation at 37°C for 30 min, glutamate formed was determined on a paper chromatography.

Reaction system	L-Glutamate formed (μ moles)
Complete system	4.00
Minus L-ornithine	0
Minus α -Ketoglutarate	0
Boiled enzyme	0

酵素反応混液からL-オルニチンまたは α -ケトグルタル酸を除いた系ではグルタミン酸の生成は見られず、また煮沸して失活させた酵素を用いた系でもグルタミン酸の生成は見られなかった。

本酵素反応で生成したグルタミン酸の光学的特性をD-アミノ酸酸化酵素とL-グルタミン酸脱水素酵素を用いて検討したところ、酵素反応で生成されたグルタミン酸はD-アミノ酸酸化酵素で酸化されず、またL-グルタミン酸脱水素酵素によって定量的に脱水素されることからL-型であることが同定された。

本酵素反応におけるL-グルタミン酸の生成量は酵素蛋白質の濃度に比例し、酵素反応時間に比例することが明らかになった (Fig. 2)。

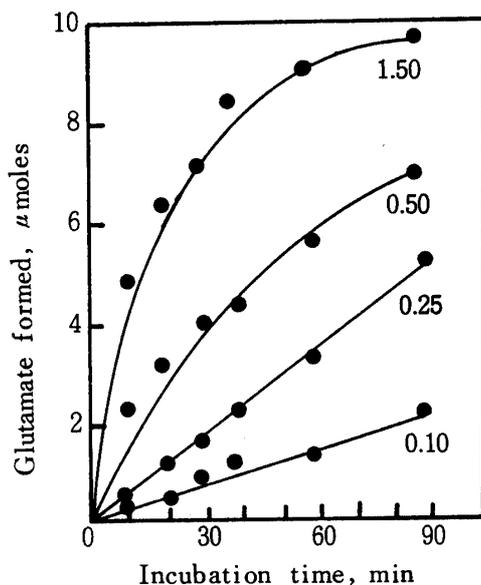


Fig. 2. L-Glutamate Formation as a Function of Amount of Enzyme and Incubation Time.

Incubation was carried out for the indicated periods in the presence of various amounts of enzyme. The numbers in the figure indicate the amount of enzyme protein employed (mg).

4. 酵素反応の化学量論

酵素反応を行ない、反応基質と反応生成物をそれぞれ定量し、反応が化学量論的に進行しているかどうかを検討した結果を Table III に示した。L-グルタミン酸の生成量は基質のL-オルニチンおよび α -ケトグルタル酸の減少量に等しく、本酵素反応が化学量論的に進行することが証明された。

Table III. Stoichiometry of L-Ornithine : α -Ketoglutarate Transamination Reaction

Incubation time (min) ^a	L-Ornithine decreased (μ moles) ^b	α -Ketoglutarate decreased (μ moles) ^c	L-Glutamate increased (μ moles) ^b
0	0	0	0
15	4.21	4.20	4.15
30	6.90	6.85	6.92
60	9.62	9.69	9.63

^a Enzyme used was 1.0 mg

^b L-Ornithine and L-glutamate were determined on a paper chromatography.

^c α -Ketoglutarate was determined spectrophotometrically after its conversion to 2,4 dinitrophenylhydrazine according to the procedure of Friedeman and Haugen.³⁾

5. 酵素活性に及ぼすpHの影響と安定性

L-オルニチントランスアミナーゼ活性とpHとの関係を知るために、各pHで酵素反応を行ない酵素活性を調べた (Fig. 3(A))。最も高い酵素活性はpH 8.0付近で得られ、pH 7.0以下あるいは9.0以上では活性が低下した。

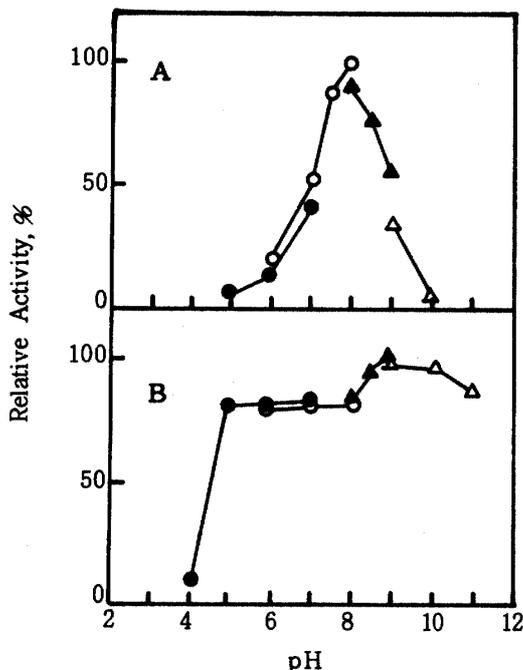


Fig. 3. Effect of pH on Activity of L-Ornithine: α -Ketoglutarate Aminotransferase (A) and the Enzyme Stability (B).

The enzyme was prepared from *Corynebacterium sepedonicum* IFO 3306. The activity was assayed at various pHs (A). The enzyme was incubated at various pHs and 50°C for 5 min, and the activity was then assayed at pH 8.0 (B). Buffer used: McIlvaine buffer (—●—), Potassium phosphate buffer (—○—), Tris-HCl buffer (—▲—), Glycine-KCl-KOH buffer (—△—).

酵素反応を各pHで50°C、5分間加温したのちpH 8.0で酵素活性を調べた (Fig. 3(B))。本酵素はpH 5.0-8.0、8.0-11.0まで幅広いpH範囲で安定であった。

6. 酵素活性に及ぼす温度の影響と酵素の安定性

L-オルニチントランスアミナーゼ活性と温度との関係調べるために、各温度で酵素反応を行ない酵素活性を調べた (Fig 4 (A))。

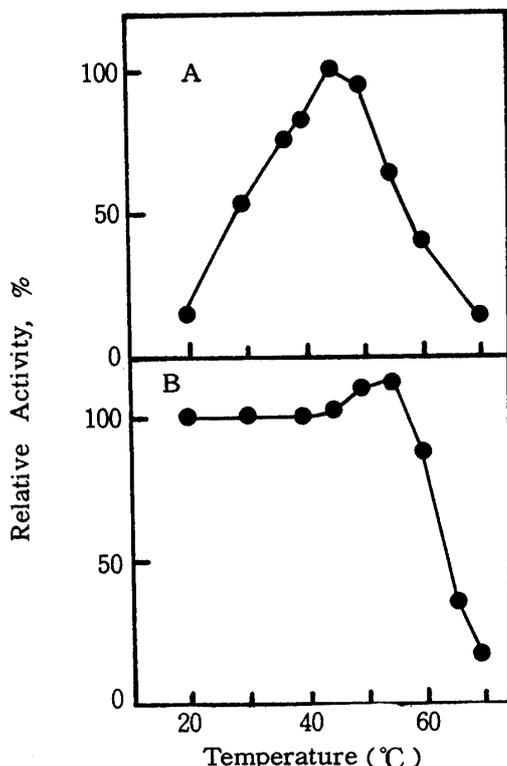


Fig. 4. Effect of Temperature on L-Ornithine : α -Ketoglutarate Amino-transferase (A) and the Enzyme Stability (B).

The enzyme was prepared from *Corynebacterium sepedonicum* IFO 3306. The activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 8.0 for 5 min, and the activity was then assayed. Other conditions were the same as Fig. 1.

酵素反応の最適温度は45°Cにあり、50°Cにおいても高い活性を示した。

酵素液をpH 8.0に調製し、各温度で5分間保持したのちの残存活性を調べた (Fig. 4(B))。本酵素は55°Cまでは安定であり、60°C以上では急激な熱失活を受けた。なお、本酵素は45-55°Cの熱処理により活性の増大が観察された。

IV 考 察

L-オルニチンは動物、植物、微生物のアルギニン代謝やプロリン代謝において重要な役割を果たしているアミノ酸である。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として重要な位置を占めており、動物の酵素については多くの研究が行なわれ特にラット肝臓の酵素が単離、精製され、酵素化学的性質が明らかにされている^{5,7,9,13,15}。一方、微生物の酵素に関しては、最近著者ら²³⁻²⁶が *Bacillus sphaericus* のL-オルニチントランスアミナーゼの精製、結晶化を行ない、酵素化学的性質を明らかにした。

本研究で、*Corynebacterium sepedonicum* の無細胞抽出液中にもL-オルニチンと α -ケトグルタル酸からL-グルタミン酸の生成反応を触媒する酵素の存在が明らかになり、本酵素反応が化学量論的に進行することが証明された。L-オルニチンと α -ケトグルタル酸との反応においてアミノ基転移反応を受けるL-オルニチンのアミノ基が調べられ、哺乳動物の肝臓の酵素及び *Neurospora crassa* の酵素ではL-オルニチンの δ 位(末端)のアミノ基が転移反応を受けることが知られている^{2,5,13,15}。一方、植物の酵素は α 位のアミノ基転移反応を触媒することが報告されている^{4,11}。

Bacillus sphaericus から得た酵素は δ 位のアミノ基転移反応を触媒した^{23,24)}。*Corynebacterium sepedonicum*の酵素についてはどのアミノ基が転移反応に関与するか不明であり今後検討する予定である。

*Corynebacterium sepedonicum*のL-オルニチントランスアミナーゼ生産力は培地中のアミノ酸の影響を受け、特にL-オルニチン、L-アルギニンによって酵素活性が増大することが明らかになった。L-アルギニンによる酵素活性の増大に関しては筆者ら^{24,26)}が*Bacillus sphaericus*についてすでに明らかにしたように、培地中のL-アルギニンが菌体内に取り込まれたのち、菌体中に存在するアルギナーゼによりL-オルニチンに変換され、本オルニチンが酵素の誘導生成に関与しているものと考えられる。

*Corynebacterium sepedonicum*のL-オルニチントランスアミナーゼの反応最適pHは8.0であった。ラット肝臓⁶⁾、*Bacillus sphaericus*²³⁾の酵素の最適pHはそれぞれ8.0および8.5であり、動物および細菌起源酵素の反応最適pHが8.0-8.5付近にあることを示している。本酵素の熱安定性は45℃までは全く変化しないが45-55℃の間で酵素活性の増大が観察された。この熱活性化現象は細菌のL-リジン ϵ -トランスアミナーゼ¹⁹⁾やタウリントランスアミナーゼ²¹⁾においても報告されている。今後、*Corynebacterium sepedonicum*のL-オルニチントランスアミナーゼの単離、精製を行ない詳しい性質を調べる予定である。

V 要 約

Corynebacterium sepedonicum (IFO 3306)の無細胞抽出液中にL-オルニチンをアミノ基供与体としたアミノ基転移反応を触媒するトランスアミナーゼの存在が明らかになった。最も高い酵素活性は、本菌株をL-オルニチン(0.3%)またはL-アルギニンを添加した培地(ペプトン、グリセリンを含む)でpH 7.2, 30℃, 18-20時間振とう培養して得た菌体で得られた。本酵素は培地中のL-オルニチンまたはL-アルギニンにより誘導的に生成された。本酵素はL-オルニチンと α -ケトグルタル酸との間のアミノ基転移反応を触媒しL-グルタミン酸を生成し、化学量論的に反応が進行した。本酵素の反応最適pHは8.0で、反応最適温度は45℃であった。

参 考 文 献

1. Baich, A. and Ratzlaff, K. 1980 Ornithine aminotransferase in chick embryo tissues, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 19:411-414.
2. Fincham, J. 1953 Ornithine transaminase in *Neurospora* and its relation to the biosynthesis of proline, Biochem. J., 53:313-320.
3. Friedeman, T. and Haugen, G. E. 1943 Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine, J. Biol. Chem., 147:415-442.
4. Hasse, K., Ratych, 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.
5. Kalita, C. C., Kerman, J. D. and Strecker, H. J. 1976 Preparation and properties of ornithine-oxo-acid aminotransferase of rat kidney comparison with the liver enzyme, Biochim. Biophys. Acta, 429:780-797.
6. Katunuma, N., Matsuzawa, Y. and Tomino, I. 1964 Studies on ornithine-ketoacid transaminase. I. Purification and properties, J. Biochem., 56:499-503.

7. Kito, K. Sanada, Y. and Katunuma, N. 1978 Mode of inhibition of ornithine aminotransferase by L-canaline, *J. Biochem.*, **83**:201-206.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
9. Lyons, R. T. and Pitot, H. C. 1977 Hormonal regulation of ornithine aminotransferase biosynthesis in rat liver and kidney, *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**:472-479.
10. Meister, A. 1954 Enzymatic transamination reaction involving arginine and ornithine, *J. Biol. Chem.*, **206**:587-596.
11. 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.
12. Middelhoven, W. J. 1964 The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **93**:650-652.
13. 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.
14. Quastel, J. H. and Witty, R. 1951 Ornithine transaminase, *Nature*, **167**:556-556.
15. 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.
16. Scher, W. I. Jr. and Vogel, H. J. 1957 Occurrence of the ornithine delta-transaminase: a dichotomy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **43**:796-803.
17. Seneviratne, A. S. and Fowden, L. 1968 Diamino acid metabolism in plants with special reference to α , β -diamino propionic acid, *Phytochemistry*, **7**:1047-1056.
18. Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms Part III. L-Lysine- α -ketoglutaric acid transaminase reaction, *Agric. Biol. Chem.*, **25**:811-819.
19. Soda, K. and Misono, H. 1968 L-Lysine- α -ketoglutarate aminotransferase. II. Purification, crystallization, and properties, *Biochemistry*, **7**:4110-4119.
20. Splitstoesser, W. E. and Fowden, L. 1973 Ornithine transaminase from *Cucurbita maxima* cotyledons, *Phytochemistry*, **12**:785-790.
21. Toyama, S., Misono, H. and Soda, K. 1978 Properties of taurine: α -ketoglutarate aminotransferase of *Achromobacter superficialis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **523**:75-81.
22. Vogel, R. H. and Kopac, M. J. 1960 Some properties ornithine δ -transaminase from *Neurospora*, *Biochim. Biophys. Acta*, **37**:539-540.
23. Yasuda, M., Misono, H., Soda, K., Yonaha, K. and Toyama, S. 1979 Purification and crystallization of L-ornithine: α -ketoglutarate δ -aminotransferase from *Bacillus sphaericus*, *FEBS Letters*, **105**:209-212.
24. 安田正昭, 当山清善, 与那覇和雄, 味園春雄, 左右田健次 1980 *Bacillus sphaericus* のオルニチン: α -ケトグルタル酸, δ -トランスアミナーゼ, *発酵と工業*, **38**:364-365.
25. Yasuda, M., Toyama, S., Rando, R. R., Esaki, N., Tanizawa, K. and Soda, K. 1980 Irreversible inactivation of L-ornithine: α -ketoglutarate δ -aminotransferase by gabaculine,

- Agric. Biol. Chem., 44:3005-3006.
26. Yasuda, M., Tanizawa, K., Toyama, S. and Soda K. 1980 Enzymatic microdetermination of L - ornithine and L - lysine, J. Appl. Biochem., 2:510-515.

SUMMARY

The production and some properties of the enzyme which catalyzes transamination between L - ornithine and α - ketoglutarate were described. The enzyme was found in the cell - free extract of *Corynebacterium sepedonicum* (IFO 3306). In order to find the medium conditions required for the improvement of the enzyme production by this strain, the organism was grown in the medium containing L - ornithine or L - arginine. The best enzyme production was obtained when the organism was grown in the medium (initial pH 7.2) containing L - ornithine (0.3%) at 30°C for 18 - 20 hr under aerobic conditions. The cell - free extract of the strain grown under the conditions mentioned above catalyzed the transamination reaction between L - ornithine and α - ketoglutarate to produce L - glutamate. This enzymatic transamination was found to proceed stoichiometrically. The enzyme had the maximum reactivity at pH 8.0 and 45°C for the transamination reaction.