



Title	水産動物筋肉の酵素化学的研究 : 5. 軟体類リンゴ酸酵素(malic enzyme)の精製とその性質
Author(s)	柴田, 猛; SHIBATA, Takeshi; 北原, 直 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 16(3), 171-182
Issue Date	1965-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23257
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(3)_P171-182.pdf



水産動物筋肉の酵素化学的研究

5. 軟体類リンゴ酸酵素 (malic enzyme) の精製とその性質

柴田 猛・北原 直・吉村克二

Enzymatic Studies on the Muscle of Aquatic Animals

5. Purification and properties of malic enzyme from molluscan muscle

Takeshi SHIBATA*, Tadashi KITAHARA*
and Katsuji YOSHIMURA*

Abstract

1. The existence of malic enzyme (EC 1.1.1.40 *l*-malate: NADP oxidoreductase), has been discovered in the muscle extract from mollusca. A procedure for the preparation of purified enzyme is presented.

2. After extracting with potassium chloride solution, purification was carried out with fractional precipitation by ammonium sulphate, adsorption with calcium phosphate gel and fractionation by DEAE-cellulose column.

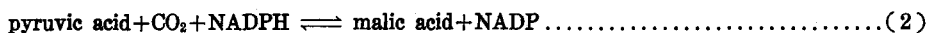
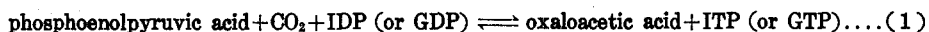
3. In squid muscle (*Ommastrephes sloani pacificus*), the final product had a ten-times higher specific activity. Optimum pH is 7.1-7.2. It is stable between pH 6.5 and 7.5 at 30°C, but unstable at temperatures above 35°C. The enzyme is activated by Mg²⁺ and Mn²⁺ ions. Michaelis constant is 1.33×10⁻³ M for malate and 0.66×10⁻³ M for NADP.

4. In Scallop (*Pecten yessoensis*), the enzyme has been purified three-fold. The behaviour of it on a DEAE-cellulose column was shown to differ from that of squid. Other properties were the same as that of squid, except there was less stability.

5. The significance of the malic enzyme in mollusca was discussed.

結 言

軟体類の筋肉解糖作用の終産物として焦性ブドウ酸が蓄積する¹⁾。この焦性ブドウ酸の利用が問題となる。すなわち焦性ブドウ酸を反応系から除去する速度が、解糖系の制限因子になる。しかしこの焦性ブドウ酸は、イカ筋肉の TCA サイクルにはそのままでは取込まれない²⁾。焦性ブドウ酸が TCA サイクルに利用されるためには、焦性ブドウ酸を脱炭酸して Acetyl Co-A になり、これがオキザル酢酸と縮合してクエン酸にならねばならない。触媒量のオキザル酢酸またはその前駆体の C₄-カルボン酸を加えると、TCA サイクルの縮合酵素による回路は、焦性ブドウ酸が消費するまで回転を続ける。この sparker としてのオキザル酢酸または C₄-カルボン酸を与える反応系としては、



の二つが考えられ前者は phosphopyruvate carboxylase で、後者は malic enzyme である。

* 北海道大学水産学部生物化学教室

著者らは、イカ血液中の Bohr effect の著しい⁸⁾ ことからこの焦性ブドウ酸があるいは炭酸同化に利用されるのではないかと推定して、下記のような実験を行なったところ、malic enzyme (EC 1.1.1.40. *l*-malate: NADP Oxidoreductase) の存在が確認されたので、ここにおいて TCA サイクルと解糖系の連携に重要な役目を持つと想像される malic enzyme の精製および諸性質について研究を行なった。

Malic enzyme は Ochoa⁴⁾ によってはじめて鳩の肝臓に、またその後植物⁵⁾ や昆虫⁶⁾ にも見出された。この酵素の性質は、Ochoa⁷⁻¹²⁾ と Kun¹³⁾ によって詳細に述べられているが、NADP を cofactor として *l*-リンゴ酸を可逆的に酸化脱炭酸して焦性ブドウ酸と炭酸ガスを与え、一方オキザル酢酸をも同時に脱炭酸する二つの性質を持ち、NAD, *d*-リンゴ酸、フマル酸やリンエノール焦性ブドウ酸ではほとんど反応しない。例外として、Ascaris^{14), 15)} の malic enzyme は NAD を cofactor とするがオキザル酢酸を脱炭酸しない。しかしこの二つの性質の分別の試みが成功していないので、malic enzyme はこの二元性の性質を持つことが一般に認められている。また Hiatt¹⁶⁾ らによれば、malic enzyme は肝臓のグリコーゲン合成のための焦性ブドウ酸をリンゴ酸より与える役目をもち、リンゴ酸より TCA サイクルをへてオキザル酢酸を供給する経路を調節する factor の一つであるとも考えられている。この酵素の重要性にもかかわらずその物理化学的性質がこれまで確立されておらず、鳩肝臓より精製が Rutter and Lardy¹⁷⁾ によって行なわれているのみである。

実 験

試料としては、函館近海でとれた市販の新鮮なスルメイカおよびホタテを用いた。抽出には9倍容の 10^{-3} M EDTA を含む 0.15 M KCl 溶液を加え、日本精機製のホモゲナイザーで1分間ホモゲナイズし、4000 r.p.m. 10分遠心分離し、上澄液を酵素液として用いた。精製操作はすべて4°Cの低温で行い、イオン交換クロマトグラフィーは DEAE-セルロースと CM-セルロースを用い、塩酸および苛性ソーダで洗い、水洗後それぞれの緩衝液で緩衝化して使用した。酵素活性は Faulkner 法⁹⁾ の変法を用いた。反応混合液は Tris-緩衝液 (pH 7.4) あるいは磷酸緩衝液 (pH 7.2) 200 μ moles, MgCl₂ 20 μ moles, NADP 0.3 μ mole, *l*-リンゴ酸 10 μ moles を含み、酵素液を添加して全容量を 3.0 ml とする。NADP の 340 m μ の吸収変化によって活性を表示し、 $\Delta E_{340m\mu} = 0.01/\text{min}$ を一酵素単位とした。反応温度は室温で、蛋白含量は 280 m μ の吸収を用いて測定した。紫外線吸収測定は島津製光電光度計 QR-50 型を用いた。基質としての *l*-リンゴ酸、オキザル酢酸および他の試薬はすべて市販品を pH 7.0 に中和して用いた。助酵素は、NBC 製をそのまま使用した。malic dehydrogenase の性活測定は Delbrück ら¹⁸⁾ によった。乳酸脱水素酵素の精製は、Beisenherz et al.¹⁹⁾ に従った。焦性ブドウ酸の定量法は、Friedeman and Haugen 法²⁰⁾ および酵素的²¹⁾ に行なった。オキザル酢酸の測定は、Friedeman²²⁾ によった。またケト酸のクロマトグラフィーは、香月、金行法²³⁾ に従った。

結 果

1) Malic enzyme の確認

イカ筋肉の 0.15 M KCl 抽出液に *l*-リンゴ酸と NADP を添加すると、NADP の還元と焦性ブドウ酸を生ずることが認められた。その根拠は、基質を *l*-リンゴ酸とした場合を Fig. 1 に示す。図より NADP は還元されるが、NAD はほとんど還元されない。反応後トリクロール酢酸で脱蛋白して dinitrophenyl hydrazone 生成物を作り、焦性ブドウ酸を測定した結果を Table 1 示す。オキザル酢酸は、硫酸ニッケル処理で焦性ブドウ酸に分解されるが、表から見られるように、処理前後において変化がないこと、および hydrazone 抽出においても酢酸エチル、ベンゼン抽出でも変りがなく、

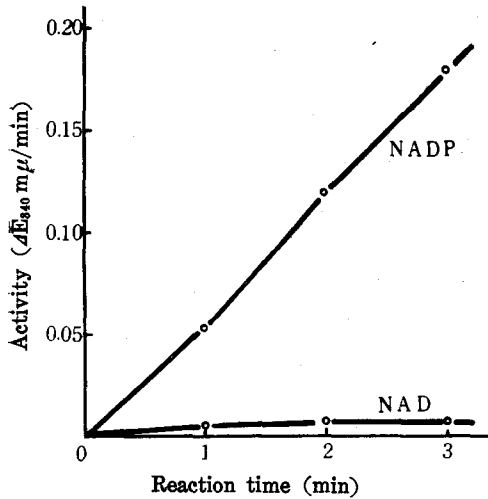


Fig. 1. Reduction of NADP and NAD by squid malic enzyme

Experimental condition was the same as in the text, except that 0.6 μ mole NADP and NAD, and 16.8 units of enzyme (ammonium sulphate fraction) were used

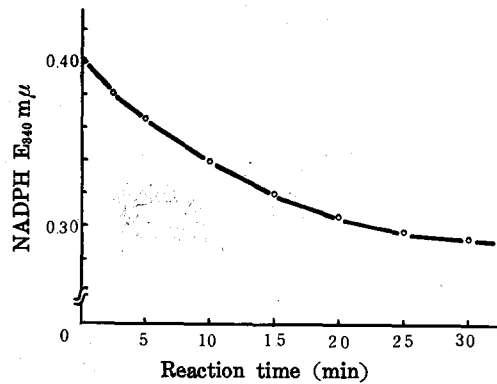


Fig. 2. Reversed reaction of squid malic enzyme

Reaction mixture contained Tris buffer (pH 7.4) 100 μ moles, $MgCl_2$ 20, Na-pyruvate 11.4, $NaHCO_3$ 42, NADPH 0.16 and enzyme (DEAE-cellulose fraction) 155 units in a final volume of 3.0 ml

Table 1. Formation of pyruvate by squid malic enzyme

Reaction mixture contained in a final volume of 3.0 ml: phosphate buffer (pH 7.2) 100 μ moles; $MgCl_2$ 10; NADP 0.28; *l*-malate 50; methylene blue 1.6 and enzyme 162 units (ammonium sulphate fraction). Incubation Temp. 30°C

Reaction time (min)	Colorimetrically ²⁰⁾		Enzymatically ²¹⁾ μ mole/ml
	NiSO ₄		
	with μ mole/ml*	without μ mole/ml	
20	0.73	0.79	0.657
40	1.04	1.04	0.921
60	1.23	1.34	1.110

*) These values are expressed as μ moles per ml of reaction mixture

生成物はすべて焦性ブドウ酸であることを示す。またケト酸の hydrazone ペーパークロマトグラフィーにおいてもオキザル酢酸は認められなかった。筋肉乳酸脱水素酵素の特異性を利用した酵素測定法も比色法と一致し、焦性ブドウ酸であることを認めた。また Table 2 において methyleneblue の NADP の turn-over を促進することによって焦性ブドウ酸が並行して増加することを示す。粗抽出液でフマル酸はこの反応に link しない。フマル酸からリンゴ酸をつくるフマルーゼが存在しないことから TCA サイクルに関するミトコンドリアの malic dehydrogenase が関係しない。焦性ブドウ酸と NADPH と重炭酸ソーダの存在での逆反応を認めた。結果は Fig. 2 にみられるように

Table 2. Effect of methylene blue on pyruvate formation by squid malic enzyme

Reaction mixture contained in a final volume of 1.0 ml: phosphate buffer (pH 7.2) 40 μ moles; $MgCl_2$ 5; NADP 0.2; *l*-malate 20; enzyme (ammonium sulphate fraction) 492 units and methylene blue as indicated in the legende Incubation time 30 min

Concentrations of methylene blue	with $NiSO_4$	without $NiSO_4$
μ mole/ml*	μ mole/ml	μ mole/ml
0	0.22	0.21
0.4	0.51	0.49
0.8	0.80	0.79
1.2	1.15	1.15
1.6	1.36	1.35

*) These values are expressed as μ moles per ml of reaction mixture

NADPH が酸化された。リンゴ酸の存在を確認しなかったが、恐らく逆反応が進行したのではないだろうか。しかしこの反応は、高い酵素濃度と長い反応時間を必要とし、この条件では起りにくいものである。Malic enzyme はオキザル酢酸の脱炭酸作用を行なって焦性ブドウ酸と炭酸ガスに分解する。イカ筋肉の malic enzyme でもこの作用が行なわれ、オキザル酢酸より焦性ブドウ酸が作られることが Table 3 に示される。酵素によって 60 分後では、基質のオキザル酢酸の大部分が脱炭酸されている。この条件でオキザル酢酸の自己分解が行なわれ、焦性ブドウ酸が生成する。見掛け上の malic enzyme 作用は、混在する malic dehydrogenase の作用とこの生じたオキザル酢酸の自己分解の共同作用とも考えられるが、これについては後で論議する。

以上の理由により、リンゴ酸より直接に焦性ブドウ酸が作られ、malic enzyme が存在することを認めた。

2) Malic enzyme の精製

A. イカ筋肉よりの精製法

0.15 M KCl の前記抽出液を 30°C で 10 分間 incubation し 6,000 r.p.m. 10 分遠心分離後 30~

Table 3. Decarboxylation of oxaloacetate by squid malic enzyme

Reaction mixture contained in a final volume of 3.0 ml: phosphate buffer (pH 7.2) 100 μ moles; $MgCl_2$ 10; oxaloacetate 15 and enzyme (ammonium sulphate fraction) 162 units. Incubation Temp. 30°C

Incubation time (min)	Autolysis		Decarboxylation by enzyme	
	colorimetrically	enzymatically	colorimetrically	enzymatically
20	μ mole/ml* 1.22	μ mole/ml 1.42	μ mole/ml 3.45	μ mole/ml 3.05
40	1.69	1.74	4.13	3.63
60	1.93	1.91	4.51	3.85

*) These values are expressed as μ moles per ml of reaction mixture

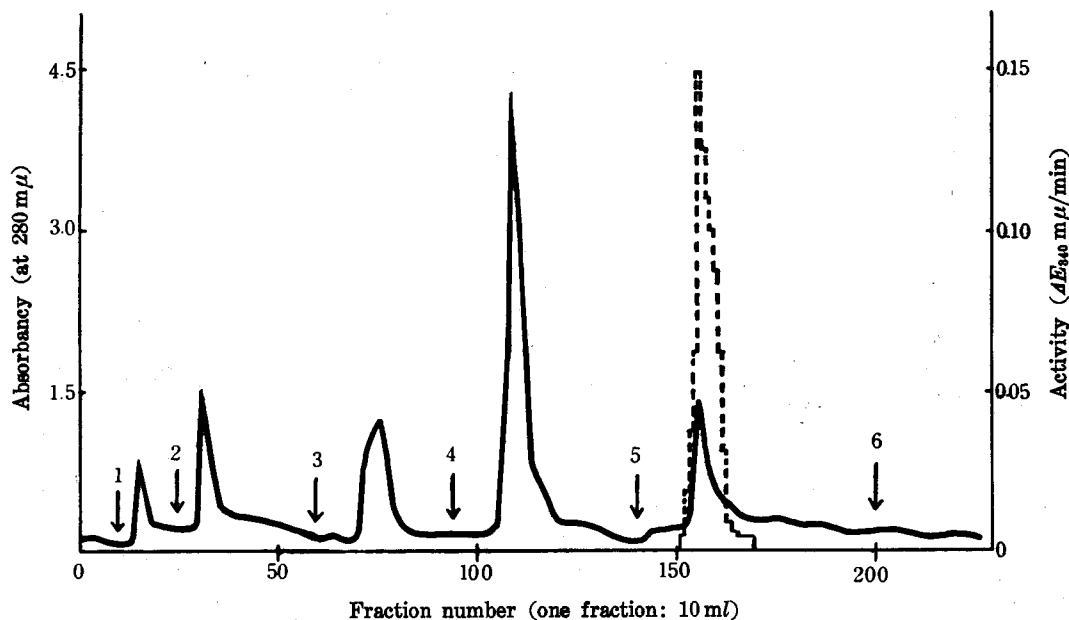


Fig. 3. Chromatography of squid malic enzyme on DEAE-cellulose column at 4°C, pH 7.0

Experiment was carried out with stepwise elution of pH 7.0 phosphate buffer: 1, H₂O; 2, 0.01 M; 3, 0.02; 4, 0.1; 5, 0.2; 6, 0.2 (0.2 M NaCl). Continuous line represents 280 mμ absorbance; broken line activity

60% 飽和硫酸で塩析される区分を集め、0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で一夜透析して硫酸を除き、磷酸カルシウムゲルに吸着させ、pH 7.0 の 0.2 M 磷酸緩衝液にて溶出する。磷酸カルシウムゲル溶出液を 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で一夜透析し DEAE-セルローズカラムに通して磷酸緩衝液で *st. pwis* の法で溶出する。malic enzyme は、0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) にて溶出される。この結果は Fig. 3 に示される。この部分の比活性は、用いた試料の 10~11 倍になった (最大比活性は 653.6)。その精製法の一例を示すと Table 4 のようになる。磷酸カルシウムゲルでは活性の損失が

Table 4. Purification of malic enzyme from squid muscle

Procedure	Volume (ml)	Activity (unit/ml)	Total unit	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity	Yield (%)	
							Protein	Activity
Initial extract	825	252	207900	7.32	6039	34.4	100	100
Incubation at 30°C for 10 min.	820	188	154120	5.31	4355	61.9	72	74
30-60% ammonium sulphate ppt.	72	1485	106920	29.6	2131	103	35	52
Treatment with calcium phosphate	48	586	28129	3.33	160	183	2.6	14
DEAE-cellulose	10	291	2910	0.49	4.9	654	0.08	1.4

多い。磷酸カルシウムゲルでの溶出では最大比活性は 200, 平均すると 100 前後である。しかしイカの場合には、白濁した蛋白がおうおうにして活性の測定の障害になりやすい。この白濁は、磷酸カルシウムゲルで除去することができる。この抽出液の白濁は、後に 50,000 r.p.m. 10 分間の超遠心分離で除去されることを知った。磷酸塩の存在は活性を安定し透析に対しても安定であった。二回の硫酸での塩析は、比活性の増加はさほど認められなかった。硫酸中でも活性を保存するが、硫酸の存在が活性の測定を妨害する。

B. ホタテ貝柱よりの精製法

なおホタテ貝柱を用いてイカ筋肉と同様な操作を行なって精製した。DEAE-セルローズカラムの精製と一般の精製法を Fig. 4 と Table 5 に示す。ホタテ貝柱を用いた時には比活性も約 3 倍増加したのみで DEAE-セルローズカラムにおいて malic enzyme は 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) にて

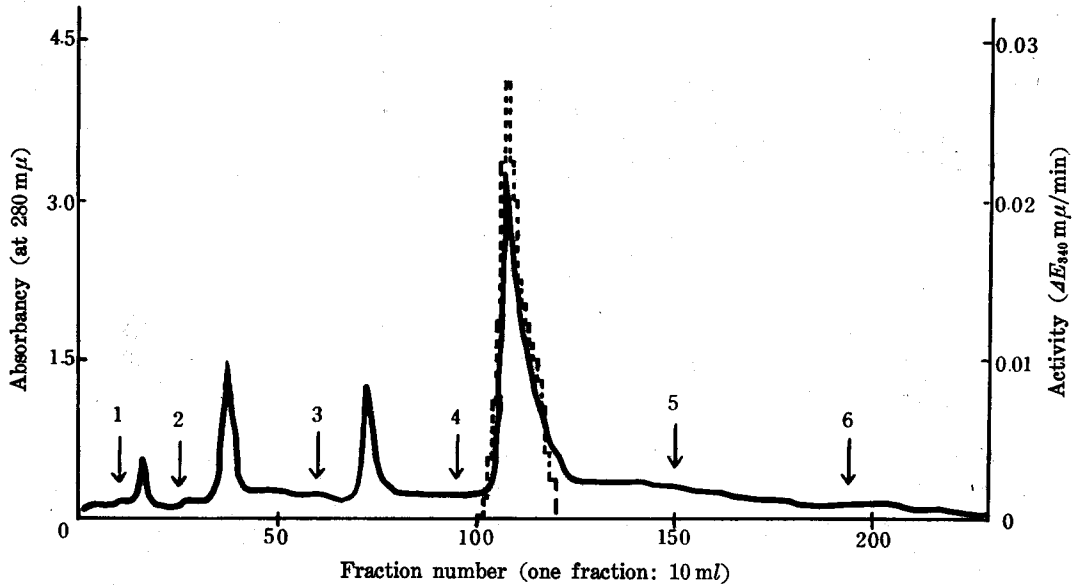


Fig. 4. Chromatography of scallop malic enzyme on DEAE-cellulose column at 4°C, pH 7.0

Experimental condition was the same as in Fig. 3

Table 5. Purification of malic enzyme from scallop muscle

Procedure	Volume (ml)	Activity (unit/ml)	Total unit	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity	Yield (%)	
							Protein	Activity
Initial extract	770	48	36960	7.09	5465	13.5	100	100
Treatment with calcium phosphate	450	24	10800	2.64	1184	36.5	21.7	29.2
30-60% ammonium sulphate ppt.	38	18	684	6.6	246	11.1	4.5	1.8
DEAE-cellulose	10	1.8	180	3.3	33	41.0	0.6	0.8

溶出され、イカ筋肉の場合との違いを示した。イカ筋肉は平滑筋で、ホタテ貝柱は横紋筋で、蛋白の相違によるものと考えられる。酵素の安定性も異なりホタテはイカより不安定である。

DEAE-セルローズカラム精製の試料は、両者とも -20°C の凍結保存で少なくとも数カ月は活性は安定であった。しかし freezing や thawing の繰返しは安定性を失わせる。このカラム溶出液をそのまま凍結保存し諸性質の研究に用いた。CM-セルローズでは吸着されずにそのまま流出した (pH 7.0)。

3) 性質

1. 至適 pH

磷酸緩衝液と Tris 緩衝液を用いて活性の測定を行なった。その結果は Fig. 5 に示される。図より明らかのごとく pH 7.1~7.2 付近が最大で、鳩肝臓の malic enzyme とよく似ている。オキサザル酢酸を基質として脱炭酸作用をワールブルグ検圧計で測定した結果を Fig. 6 に示す。図より脱炭酸の至適 pH は 6.8 であり、鳩肝臓の至適 pH とはかなり違っている。脱炭酸作用の至適 pH と NADPH 吸収より測定した至適 pH はイカ筋肉の場合にはかなり一致している。

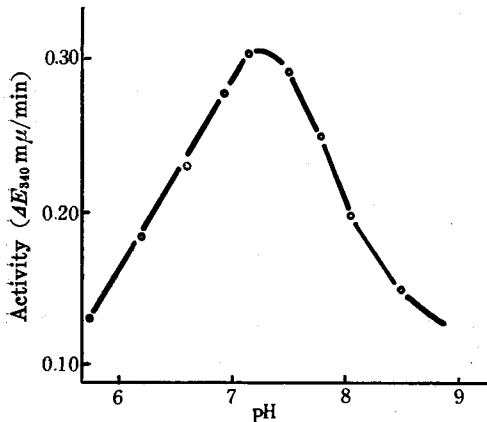


Fig. 5. Effect of pH on squid malic enzyme

Experimental condition was the same as in the text, except that phosphate buffer was used in the range of pH 5.7-7.2

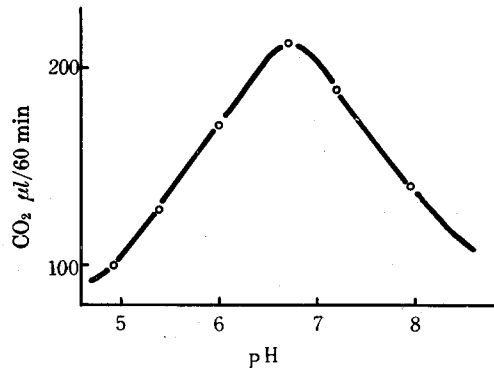


Fig. 6. Effect of pH on oxaloacetate decarboxylation of squid malic enzyme

Reaction mixture contained citrate buffer (pH 4.9-6.4) or veronal buffer (pH 6.6-8.4) 100 μmoles , MnCl_2 1 and enzyme 466 units (ammonium sulphate fraction) in the main cell of Warburg vessel, and oxaloacetate 23 μmoles in one side arm and 3N-sulphuric acid in other. Total volume 2 ml. Incubation temperature at 25°C

2. pH に対する安定性

磷酸緩衝液および緩衝液を用いておのおの pH に 2 時間 30°C で expose してその後 pH 7.2 に中和して活性の測定を行なった。その結果は Fig. 7 に示す。pH に対する安定性は pH 6.5~7.5 付近でもっとも安定である。

3. 金属イオンの効果

この malic enzyme は Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} などの金属を必要とする。 MnCl_2 , MgCl_2 , CoSO_4 そして CaCl_2 の 2 価のイオンを用いてそれぞれの活性の測定を行なった。その結果は Table 6 に示される。標準活性測定法による酵素活性を 100 とした場合、 Mn^{2+} イオンがもっとも酵素を活性化させ、 $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ で 110%, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ で 148%, $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ が最大で 228% それ以上の濃度ではまた減少し

Table 6. Effect of metal ions on squid malic enzyme
 Experimental condition was the same as in the text, except that metal ions were added as indicated

Metal ion (10 ⁻³ M)	Ratio of activity	Metal ion (10 ⁻³ M)	Ratio of activity
Standard Assay (Mg ²⁺ : 6.6)	100	Co ²⁺	
No addition	0	0.03	68
Mg ²⁺		0.10	81
0.16	18	0.23	109
0.33	32	0.33	102
1.0	64	1.6	93
2.3	84	Ca ²⁺	
10	109	0.23	7
Mn ²⁺		0.33	9
0.03	109	1.0	11
0.10	148	1.6	14
0.23	228	3.3	16
0.33	155		
1.0	136		

ていき 3×10⁻⁴ M で 155%, 1×10⁻³ M で 136% とほぼ平衡になる。Mg²⁺ イオンでは標準活性法の濃度より低い 2×10⁻⁴ M で 18% だったのが 1×10⁻³ M で 64%, 1×10⁻² M で 109% とゆるやかに上昇して行き、Co²⁺ イオンは 2×10⁻⁴ M が最大で (109%) それを越すと減少し、Ca²⁺ イオンはあまり効果がなかった。なおホタテ貝柱から得た malic enzyme もイカ筋肉の場合と同様、Mn²⁺, Mg²⁺, そして Co²⁺ イオンなどによって酵素活性を安定化させる。その結果は Fig. 8 に示される。

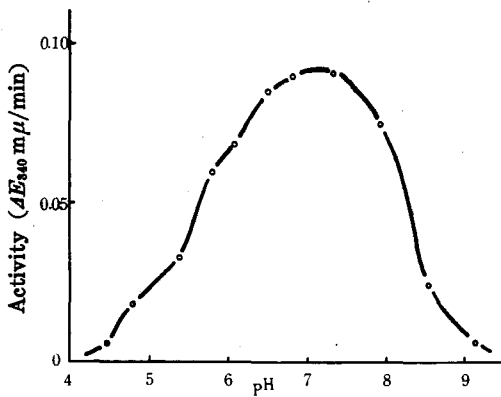


Fig. 7. pH stability of squid malic enzyme

The enzyme was exposed for 2 hours to the pH values given and the activity then tested at pH 7.2. pH 4.4-5.6, acetate buffer; pH 6.0-7.3, phosphate buffer; pH 8.4-9.2, Tris buffer

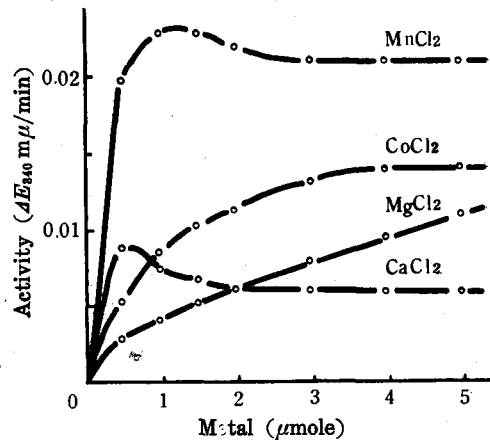


Fig. 8. Effect of metal ions on scallop malic enzyme

Experimental condition was the same as in Table 6, except that phosphate buffer was used save for Mn²⁺

5 μ moles までの間で $MnCl_2$ は、1 μ mole 付近まで急激な上昇を示し、1 μ mol を越すとやや減少して平衡になり、 $CoSO_4$ はゆるやかな上昇カーブをえがき、 $MgCl_2$ は直線状に増加し $CaCl_2$ は 0.5 μ mole 付近が最大でその後はあまり変らない。ホタテ貝柱の malic enzyme もイカ筋肉の malic enzyme と同様 Mn^{2+} イオンによってもっとも酵素活性を安定化させる。

4. 熱に対する安定性

酵素液をそれぞれの温度で 60 分間 expose し直ちに氷水で冷却し生じた沈澱を遠心分離で取り除き活性の測定を行なった。その結果は Fig. 9 に示される。DEAE-セルロースカラムで精製した酵素でも常に malic enzyme と malic dehydrogenase の活性が共存している。malic enzyme と malic dehydrogenase が同じ酵素であるかどうかを調べる一つの手段として上に述べたような実験を行なった。両酵素とも 30°C 付近までは熱に対して安定であるが、malic dehydrogenase は 35°C になると急激に不安定となり 40°C 以上では、ほとんど酵素活性を失う。一方 malic enzyme は 35°C では 84%、40°C でも約 50% の活性が残っており、malic dehydrogenase にくらべて熱に対して比較的安定である。

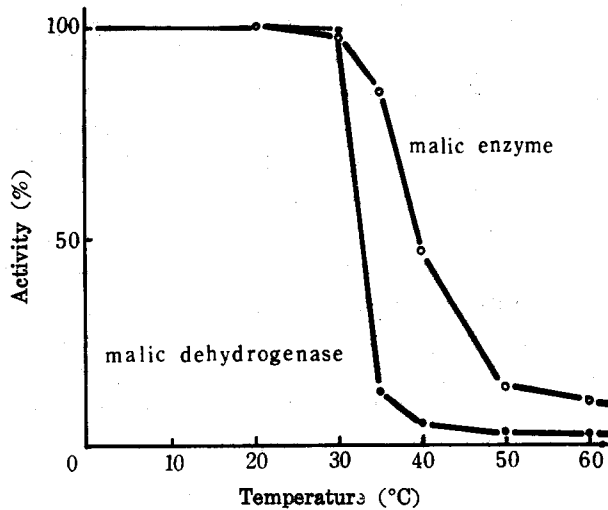


Fig. 9. Heat stability of squid malic enzyme

The enzyme was exposed for an hour to the temperatures given at pH 7.0 and then cooled to 0°C. Other experimental condition was the same as in the text

5. ミハエリス恒数

Malic enzyme の基質として L-リンゴ酸と NADP を、また malic dehydrogenase の基質として オキサール酢酸と NADH をそれぞれ用いてそれぞれの濃度を変えて、反応速度に及ぼす基質濃度の効果を調べた。その結果は Table 7 に示される。malic enzyme の L-リンゴ酸と NADP に対する K_m はそれぞれ $1.33 \times 10^{-3} M$ と $0.66 \times 10^{-3} M$ で malic dehydrogenase のオキサール酢酸と NADH に対する K_m は $0.64 \times 10^{-3} M$ と $0.93 \times 10^{-3} M$ であった。

Table 7. Michaelis constant of squid malic enzyme and malic dehydrogenase at pH 7.0

	K _m
Malic enzyme	
l-malate	1.33 × 10 ⁻³ M
NADP	0.66 × 10 ⁻³ M
Malic dehydrogenase	
oxaloacetate	0.64 × 10 ⁻³ M
NADH	0.93 × 10 ⁻³ M

考 察

この酵素系には, malic dehydrogenase が混在しており, これが malic enzyme よりはるかに強力である。(malic enzyme より約 280 倍の活性)。オキザル酢酸は自然に分解するのでこの見掛け上の反応は malic enzyme によってではなく, malic dehydrogenase によって生じたオキザル酢酸が自然に焦性ブドウ酸と炭酸ガスに分解したとも考えられるがこの推定は, 次報²⁴⁾ で報告する阻害実験によって malic enzyme と malic dehydrogenase が区別されること, またこの malic enzyme は cofactor として NAD より NADP に高い特異性をもつこと, malic dehydrogenase の NADH に対する親和力より考えて否定される。すなわち, NADP を助酵素系とする malic dehydrogenase の存在が考えられない。なぜなら Fig. 1 の NAD の還元速度と K_m から考えると, NADP に対する malic dehydrogenase の親和力が異常に高いものとなるからである。用いられた精製酵素に malic dehydrogenase が共存していても malic enzyme の作用が認められる。oxaloacetate decarboxylase の存在が認められない限り malic enzyme は二元性の作用をもつと考えられる。

Ochoa⁴⁾ によると筋肉には含まれておらずとされているが, しかしある種の回虫 (*Ascaris*) の筋肉は, malic enzyme を含んでいる。イカ筋肉にも malic enzyme が含まれているが, *Ascaris* の場合とは異なりオキザル酢酸を脱炭酸する能力を持っている。この malic enzyme がイカ筋肉 (軟体類) に特異的なものかどうかをホタテ貝柱とコイの筋肉を用いて比較してみた。その結果を Table 8 に示す。むしろ軟体類 (イカ) に特異的なものではないだろうか。

Table 8. Distribution of malic enzyme in the muscle of fish and mollusca

Squid units/g. tissue	Scallop units/g. tissue	Carp units/g. tissue
2520	990	450

Ascaris, frat worm²⁵⁾ の例からみても下等動物ほど malic enzyme の存在がみられる。Malic enzyme の生理的作用は, TCA サイクルの速度を調節するものと考えられるが, イカ筋肉の解糖系における焦性ブドウ酸の蓄積との関連性は炭酸固定の条件が確立されない限りは想像の域を出ない。Hiatt ら¹⁶⁾ のごとく, malic enzyme が glycogenesis に関与するよりは, 燐焦性ブドウ酸カルボキシラーゼの方がずっと有利である。それは pyruvate kinase の径路をとらなくてもよいからである。

Shrago et al.²⁶⁾²⁷⁾ は malic enzyme が gluconeogenesis には関与しないと報告しているが、この関係を物語っていると思う。カルボキシラーゼがまだ確められていないので、この問題は不明のまま残っている。

肝臓や adipose tissue では、malic enzyme が脂肪合成のための NADP の給源であると Lardy²⁸⁾ によって暗示された。彼らはまた malic enzyme と cytoplasmic malic dehydrogenase との共転によって、NADH より NADP に水素移動ができることを認め、かくして malic enzyme は直接に NADPH を形成したり、間接的に NADH を NADPH に変えて、lipogenesis に役目をもつと推定した²⁷⁾。イカ内臓の脂肪含量の多いことから、筋肉にもその影響を与えているのかも知れない。

要 約

軟体類筋肉抽出液を用いて malic enzyme の存在を確認し、この酵素を精製し L-リンゴ酸を基質として酵素化学的性質を研究した。0.15 M KCl で抽出後 30~60% 硫酸塩析、磷酸カルシウムゲル吸着、DEAE-セルロース精製を行なった。精製された酵素は比活性が 10~11 倍に増加した。イカ筋肉の malic enzyme の至適 pH は 7.1~7.2 で pH 6.5~7.5 付近がもっとも安定であり、熱に対しては 35°C 付近まで安定である。Mg²⁺、Mn²⁺、Co²⁺ などの金属を必要とした。L-リンゴ酸に対する K_m は 1.33×10⁻³ M で NADP に対しては 0.66×10⁻³ M であった。ホタテ貝柱中の malic enzyme (活性が少ないが) にも存在するので、この malic enzyme は軟体類において特別の役目を持つ酵素であると推定された。

文 献

- 1) 柴田 猛・吉村克二 (1960). 日水誌 **26**, 294.
- 2) 吉村克二・柴田 猛 (1962). 昭和 37 年度秋季大会講演発表.
- 3) Florkin, M. (1949). *Biochemical Evolution*. 54 p., New York; Academic Press.
- 4) Ochoa, S. et al. (1947). *J. Biol. Chem.* **167**, 871.
- 5) Kraemer, L. M. et al. (1951). *ibid.* **188**, 583.
- 6) Faulkner, P. (1951). *Biochem. J.* **64**, 430.
- 7) Ochoa, S. and Korkes, S. (1948). *J. Biol. Chem.* **174**, 979.
- 8) ——— et al. (1948). *ibid.* **176**, 463.
- 9) ——— et al. (1950). *ibid.* **186**, 863.
- 10) ——— et al. (1950). *ibid.* **186**, 891.
- 11) ——— and Kaufmann, S. (1950). *ibid.* **192**, 313.
- 12) ——— (1952). in Sumner, J. B. and Myrback, K. (Editors), *The Enzymes* **2**, 929 p. New York; Academic Press.
- 13) Kun, E. (1963). in Boyer, P. D. et al. (Editors), *The Enzymes*. **7**, 157 p. New York; Academic Press.
- 14) Saz, H. J. and Hillary, E. P. (1956). *Biochem. J.* **62**, 563.
- 15) ——— and Hubbard, J. A. (1957). *J. Biol. Chem.* **225**, 921.
- 16) Hiatt, H. H. et al. (1958). *ibid.* **231**, 303.
- 17) Rutter, W. J. and Lardy, H. A. (1958). *ibid.* **233**, 374.
- 18) Delbrück, A. et al. (1959). *Biochem. Z.* **331**, 273.
- 19) Beisenherz, G. et al. (1953). *Z. Naturforschung*. **8b**, 555.

- 20) Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. (1943). *J. Biol. Chem.* **147**, 415.
- 21) Bücher, T. *et al.* (1963). in Bergmeyer, H. U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*. 253 p. New York; Academic Press.
- 22) Friedemann, T. E. (1957). in Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (Editors). *Method in Enzymology*. **3**, 414 p. New York; Academic Press.
- 23) 香月裕彦・金行広雄 (1958). 化学の領域, 増刊 33, “生化学に於ける光電比色法” 各論 I, 95~104 p, 東京, 南江堂
- 24) 柴田 猛外. 北大水産業報に投稿予定.
- 25) Prescott, L. M. and Campbell, J. W. (1965). *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 491.
- 26) Shrago, E. *et al.* (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 3188.
- 27) Young, J. W. *et al.* (1964). *Biochemistry*. **3**, 1687.
- 28) Lardy, H. A. *et al.* (1964). in Weber G. (Editor). *Advances in Enzyme Regulation*. **2**, 39 p. Oxford; Pergamon Press.