HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉の酵素化学的研究：6. イカ筋肉のリンゴ酸酵素(malic enzyme)に及ぼす各種カルボン酸および阻害剤の効果
Author(s)	柴田, 猛; 北原, 直; 吉村, 克二
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 17(1), 64-69
Issue Date	1966-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23272
Type	departmental bulletin paper
File Information	17(1)_P64-69.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物筋肉の酵素化学的研究

6. イカ筋肉のリンゴ酸酵素 (malic enzyme) に及ぼす各種カルボン酸および阻害剤の効果

柴田　猛*・北原　直*・吉村克二*

Enzymatic Studies on the Muscle of Aquatic Animals

6. Effect of various carboxylic acids and inhitors on squid malic enzyme

Takeshi SHIBATA*, Tadashi KITAHARA* and Katsuji YOSHIMURA*

Abstract

A study was made of the effect of various carboxylic acids and inhibitors on partially purified malic enzyme (*l*-malate: NADP oxidoreductase, EC 1.1.1.40) of squid muscle (*Ommastrephes sloani pacificus*).

1. Of the intermediates of the citric acid cycle tested, oxaloacetate, citrate strongly inhibit the enzyme and pyruvate is less effective. However, by succinate, fumarate and α-ketoglutarate, including acetate also, the enzyme is inhibited only at much higher concentrations than that of the substrate.
2. The homologs of carboxylic acid, tartronate, malonate and oxalate effectively inhibit the enzyme, but oxamate is less effective.
3. Arsenate, azide and fluoride are not appreciably inhibitory, whereas arsenite markedly inhibits the enzyme at the same point of concentration.
4. p-Chloromercuribenzoate is the most effective inhibitor. Pb^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} inactivate the enzyme.
5. Some possible metabolic interrelations were discussed.

緒　　言

前報[1]に於て軟体類（イカおよびホタテ）筋肉中に malic enzyme (*l*-malate: NADP oxidoreductase EC. 1.1.1.40) の存在を認め，その精製法と二三の性質を述べ，酵素の生理的意義を論議した。この酵素は炭酸固定および解糖系とクエン酸回路との連結に重要な意義をもつ。malic enzyme がクエン酸回路の速度を調節するのか又はその逆になるのか興味ある問題である。ここではクエン酸回路の中間物が malic enzyme 作用に如何なる変化を与えるかを調べた。オキザル酢酸とクエン酸が酵素作用の阻害をおこした。併せて中間物のカルボン酸類似体と各種の阻害剤についても検討した。又精製した酵素でもリンゴ酸脱水素酵素が混在しているが，阻害テストから二つの酵素を区別出来ることが認められた。

* 北海道大学水産学部生物化学教室

実　　験

実験は前報[1]と全く同様に行った。活性の測定は Faulkner 法[2] の変法を用い，*l*-malate の基質濃度はすべて 3.3×10^{-3}M である。精製酵素は塩析，燐酸カルシウムゲル吸着後，DEAE-セルローズ分別（pH 7.0）を行い凍結乾燥した製品を用いた。

結　　果

1. クエン酸回路中の中間物の効果

malic enzyme の存在位置から考えてクエン酸回路との関係が想像される。クエン酸回路の中間物がmalic enzyme の活性にどの様な影響を与えるかを示したのが第1表である。オキザル酢酸およびクエン酸が最も著しい阻害効果を示した。特にオキザル酢酸は反応基質のリンゴ酸の濃度以下で50%以上の阻害を示す。クエン酸は基質と同じ濃度では 45% の阻害を示す。Heyningen and Pierie[3] はフマール酸の阻害を，Stickland[4] はアスパラギン酸とコハク酸の阻害を報告しているが，著者らのテストでは効果が少なかった。しかし彼らは，クエン酸の阻害を報告している。オキザル酢酸の強い阻害的効果は Kun[5] によっても報告されている。しかし α-ケトグルタール酸は効果がない。モノカルボン酸のピルビン酸，酢酸，乳酸は中間的な阻害度を示しているが，三者の一連の関係から恐らく反応生成物による阻害であろう。この用いた精製酵素中に混在するリンゴ酸脱水素酵素の活性は，malic enzyme と異なり，*l*-リンゴ酸によって阻害され，50% 阻害には 1.6×10^{-2}M のリンゴ酸を必要とし，

Table 1. Effect of various carboxylic acids on decarboxylation of *l*-malate by squid malic enzyme

Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)	Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)
Citrate		α-Ketoglutarate	
1.0	5	1.6	3
2.3	23	3.3	16
3.3	45	10.0	25
6.6	65	16.6	31
10.0	79	24.0	37
14.0	86	Pyruvate	
Succinate		3.3	2
6.6	0	6.6	5
14.0	5	13.3	33
24.0	19	24.0	53
33.3	42	36.6	71
40.0	51	50.0	82
Fumarate		DL-Lactate	
14.0	0	1.3	11
24.0	5	3.3	32
28.3	17	14.3	44
33.3	29	23.3	52
50.0	39	33.3	56
Oxaloacetate		66.6	84
0.3	14	Acetate	
1.0	23	3.3	0
1.6	44	10.0	0
3.3	64	16.6	5
6.6	78	24.0	19
		33.3	51
		50.0	70

オキザル酢酸による基質阻害は認められない。

2. カルボン酸同族体の阻害

この中間物類似体による阻害効果を第2表に示した。これらのカルボン酸は対応する中間物質よりも大きい阻害度を示す。即ち修酸とオキザル酢酸，タルトロン酸，マロン酸とコハク酸，オキザミン酸とピルビン酸と対応させると約2倍近くの大きい阻害を示した。修酸が最も顕著な阻害効果を示す。混在するリンゴ酸脱水素酵素はマロン酸の 3.3×10^{-3}M の濃度で 2% しか阻害されない。

3. 各種阻害剤の効果

普通阻害剤と考えられている試薬についての効果を第3表に示した。アザイド，弗化物は効果がない。恐らく金属酵素ではないと思われる。酸化還元に関係するヒ酸と亜ヒ酸には対照的な効果が表わ

Table 2. Effect of carboxylic acid homologs on decarboxylation of *l*-malate by squid malic enzyme

Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)	Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)
Tartronate		Oxalate	
0.3	7	0.03	7
1.0	31	0.3	11
1.6	43	1.0	45
2.3	54	1.6	57
3.3	60	2.3	66
6.6	75	3.3	71
Malonate		6.6	82
0.3	7	Oxamate	
1.3	17	3.3	24
2.3	34	6.6	42
3.3	49	13.3	53
6.6	69	23.3	65
16.3	85	36.3	75
		50.0	89

Table 3. Effect of various inhibitors on decarboxylation of *l*-malate by squid malic enzyme

Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)	Final concentration (M^{-3})	Inhibition (%)
p-Chloro-mercuri-benzoate		6.6	43
0.13	23	13.3	64
0.23	53	23.3	78
0.30	77		
1.60	84	Sodium azide	
3.30	95	0.3	3
		3.3	14
Sodium arsenate		13.3	29
6.6	3	23.3	31
13.3	12	33.3	46
23.3	19	50.0	50
33.3	28		
53.3	45	Sodium fluoride	
93.3	76	1.3	3
		3.3	7
Arsenic trioxide		13.3	18
0.3	14	23.3	20
1.3	22	33.3	23
3.3	36	50.0	31

れているので恐らく活性に酸化還元作用が関与している。特に著しいのは p-クロロマーキュリ安息香酸の阻害である。これはチオール群の特異的な阻害剤でこの酵素には SH 基が含まれていると考えられる。しかもこのチオール試薬の阻害は還元型のグルタチオンの添加によって活性を回復する。即ち 0.3×10^{-3}M の阻害剤濃度で 4×10^{-3}M の還元型グルタチオンの添加で完全に回復する。しかしこれ以上の濃度になるとやや活性を減少させる。混在するリンゴ酸脱水素酵素ではこのチオール試薬には全く阻害されない。

4. 金属の効果

前報[1]に於て Mg^{2+} および Mn^{2+} によって活性が促進されることを報告したが，他の二価陽イオンが阻害的に作用する。その結果を第4表に示した。これらのイオンの阻害の程度は，カルボン酸や他の阻害物より大きい。これらの金属の阻害は酵素へ直接作用し酵素蛋白の変性をおこすのであろう。

Table 4. Effect of metal ions on decarboxylation of *l*-malate by squid malic enzyme

Metal ion (10^{-3}M)	Inhibition (%)	Metal ion (10^{-3}M)	Inhibition (%)
Zn^{2+}		Pb^{2+}	
0.03	22	0.03	26
0.10	40	0.16	29
0.26	68	0.23	32
0.33	78	0.33	45
0.66	92	0.66	47
Cu^{2+}		Ni^{2+}	
0.03	22	0.03	2
0.10	43	0.15	8
0.26	51	0.30	28
0.33	58	1.70	48
0.66	86	2.30	54
		3.30	62

論　　議

malic enzyme による *l*-リンゴ酸の脱炭酸作用を 50% 阻害する各種有機酸及び阻害剤の濃度を第5表に示した。ディカルボン酸やリンゴ酸と関連する α-ヒドロオキシディカルボン酸が強く阻害して

Table 5. Inhibitor concentrations corresponding to 50 per cent inhibition of malate decarboxylation

Oxalate	1.3 (M^{-3})	p-Chloro-mercuri-benzoate	0.23 (M^{-3})
Oxaloacetate	2.0	Arsenic trioxide	10
Tartronate	2.3	Sodium azide	50
Malonate	3.3	Sodium arsenate	56
Citrate	4.3	Sodium fluoride	>66
Oxamate	13		
Lactate	23		
Pyruvate	23		
Acetate	33		
α-Ketoglutarate	>33		
Succinate	>43		
Fumarate	>66		

いる。この他に，メゾオキザル酸，酒石酸，アスパラギン酸の阻害も報告されている[3,4]。これらの阻害は一部は拮抗的，一部は非拮抗的である[5]とされている。同じディカルボン酸でも，α-ケトグルタール酸，コハク酸，フマール酸が阻害程度が少ない。恐らくカルボキシル基の離れ具合に依存しているのかも知れない。カルボン酸同族体が強く阻害するのは，対応する中間体よりも更に強い親和基を持っているためである。

この内に，特に興味を引く事は，オキザル酢酸とクエン酸の阻害である。イカの malic enzyme も，オキザル酢酸の脱炭酸作用を持っている。酸化と脱炭酸作用が，酵素の同じ部位で行なわれるかどうかは，不明であるが，Boyer[6] や Kun[5] が，金属キレートの電子引力効果を期待しており，脱水素作用と脱炭酸作用とが，同時に起り，遊離のオキザル酢酸が蓄積することなしに行なわれることに特徴がある。その詳細については，不明である。又 Rutter and Lardy[7] が，可能な反応式として，次の式を提出している。

$$\text{Enzyme}+l\text{-malate}+\text{NADP}\rightleftarrows\text{oxaloacetate-Enzyme}+\text{NADPH}+\text{H}^{+}$$

$$\text{oxaloacetate-Enzyme}\xrightarrow[\text{Me}^{++}]{}\text{pyruvate}+\text{CO}_2+\text{Enzyme}$$

このオキザル酢酸と酵素の複合体の形成が，行なわれると考えられる。オキザル酢酸の添加は，この複合体の形成を妨げるために，見掛け上阻害される結果となる。

クエン酸が，解糖作用を阻害する[8~11]。これは特に，*in vivo* でも *in vitro* でも，ホスフォフラクトキナーゼで，阻害されている。これは，呼吸系と解糖系の連けいを暗示し，解糖作用の促進によって，クエン酸が蓄積して，解糖作用の速度を調節するものと推定されている。クエン酸の蓄積が，クエン酸回路の第一の制限因子であると想像される。malic enzyme の場合も，今の例が，適合出来るかどうかは，*in vivo* の実験の結果を，待たねばならないが，Lardy ら[12] は，malic enzyme が，クエン酸形成のために役立つディカルボン酸のレベルを調節すると推定しているが，クエン酸の阻害は，この仮定を説明出来よう。malic enzyme の by-path 的な役割も存在すると考えられるが，クエン酸回路と関連づけて説明するのが困難である。それは，malic enzyme の localization や，ピルビン酸がクエン酸回路に入る主経路の，アセチル Co-A の形成反応とも比較せねばならない。

前報[1]に於いて，malic enzyme の役割についていくらか論議したが，ピルビン酸が glucogenesis に関与するためには，燐エノールピルビン酸に変化せねばならないが，直接に，ピルビン酸キナーゼの経路をとらず，malic enzyme，リンゴ酸脱水素酵素，phosphoenolpyruvate carboxykinase の過程を経て行なわれる。軟体類のグリコーゲン含量は多いが，その源は知られていない。脊椎動物では，malic enzyme が glucogenesis から除かれているが，多くの軟体類の malic enzyme の活性の高いことや Simpson and Awapara[13] は，phosphoenolpyruvate carboxykinase の高いレベルをもっている軟体類には malic enzyme が存在しないと言う。このことより，軟体類の glucogenesis に malic enzyme が関与しているのではないだろうか。又比較発生生化学的面からも貝殻形成の炭酸固定の問題がイカには存在する。

要　　約

イカ筋肉の DEAE-セルローズ分別した精製酵素を用いて，クエン酸回路の中間物の効果，同類似体の効果，阻害剤の影響について研究した。

クエン酸回路の中間物中，オキザル酢酸，クエン酸が著しい阻害をみせ，α-ケト酸，コハク酸，フマール酸では効果がなかった。中間物の類似体は，対応するカルボン酸よりも強い阻害をみせた。亜ヒ酸は強い阻害をみせたが，ヒ酸，アザイドおよび弗化物は効果がなかった。p-クロロマーキュリ安

息香酸は，強い阻害作用をみせ，SH 型酵素なることを暗示した。Pb^{2+}，Cu^{2+}，Zn^{2+}，の二価イオンも，酵素を強く不活性化した。malic enzyme に対しての阻害剤の役割や，その生理的意義などを論議した。

文　　献

1) 柴田　猛外 (1965). 北大水産彙報 **16**, 171.
2) Faulkner, P. (1951). *Biochem. J.* **64**, 430.
3) Van Heyningen, R. and Pierie, A. (1953). *Biochem. J.* **53**, 436.
4) Stickland, R. G. (1959). *Biochem. J.* **73**, 646.
5) Kun, E. (1963). in Boyer, P. D. *et al.* (Editors), *The Enzymes.* **7**, 157 p. New York; Academic Press.
6) Boyer, P. D. (1960). *Ann. Rev. Biochem.*, **29**, 17.
7) Rutter, W. J. and Lardy, H. A. (1958). *J. Biol. Chem.* **233**, 374.
8) Williamson, J. R. and Jones, E. A. (1964). *Nature*, **203**, 1171.
9) ——— (1965). *ibid.* **206**, 473.
10) ——— (1965). *J. Biol. Chem.* **240**, 2308.
11) Underwood, A. H. and Newsholme, E. A. (1965). *Biochem. J.* **95**, 868.
12) Lardy, H. A. *et al.* (1964). in Weber, G. (Editor), *Advances in Enzyme Regulation*, **2**, 39 p. Oxford; Pergamon Press.
13) Simpson, J. W. and Awapara, J. (1964). *Comp. Biochem. Physiol.* **12**, 457.