



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉の酵素化学的研究 : 7. イカ筋肉のリンゴ酸酵素(malic enzyme)の再精製
Author(s)	北原, 直; KITAHARA, Tadashi; 柴田, 猛 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(2), 95-101
Issue Date	1967-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23308
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(2)_P95-101.pdf



水産動物筋肉の酵素化学的研究

7. イカ筋肉のリンゴ酸酵素 (malic enzyme) の再精製

北原 直*・柴田 猛*

Enzymatic Studies on the Muscle of Aquatic Animals

7. Further purification of malic enzyme from squid muscle

Tadashi KITAHARA and Takeshi SHIBATA

Abstract

Further purification by column chromatography on DEAE-Sephadex (A-50) of malic enzyme (EC 1.1.1.40 *l*-malate : NADP oxidoreductase) from squid muscle (*Ommastrephes sloani pacificus*) was carried out. The resulting enzyme is free of malic dehydrogenase activity and homogeneous electrophoretically on cellulose acetate membrane. Some properties of the enzyme are similar to those of the previously obtained partially purified enzyme. No important differences were observed except the affinity for NADP. The distribution of the enzyme was studied in several aquatic species.

緒 言

前報^{1),2)}においてイカ筋肉の malic enzyme (*l*-malate : NADP oxidoreductase EC 1.1.1.40) の精製法とクエン酸回路中間物およびその類似体の効果, 阻害剤の影響を述べその生理学的意義などを論議した。以前の酵素製品には malic dehydrogenase が混在しており DEAE-cellulose では分別できなかったが, DEAE-Sephadex カラムを使用することによって malic enzyme と malic dehydrogenase との分別に成功したのでその精製法と二, 三の性質を以前の製品と比較して報告する。併せて二, 三の海産動物の活性分布を調べた。

実 験

活性の測定および精製法には Sephadex カラムを用いた以外は前報と全く同様に行なった。DEAE-Sephadex (A-50) の調製は蒸留水で充分膨潤させてから酸アルカリで洗い 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化させてカラム (2.5×45cm) に充填した。セルロースアセテート膜による電気泳動は市販品の SEPARAX 膜を用い pH 8.6 の磷酸緩衝液 ($\mu=0.06$) で 1mA/cm, 3時間泳動させポンソー 3R で染色した。活性分布の酵素液の調製は 0.15M KCl で抽出し 6,000r.p.m. 10分間遠心分離し更に 50,000r.p.m. 20分間遠心分離した上澄液を酵素液として用いた。なお精製操作はすべて 4°C の低温で行った。

* 北海道大学水産学部生物化学教室

結 果

Malic enzyme の精製

—DEAE-Sephadex 分別—

試料筋肉を9倍容の0.15M KCl (10^{-3} M EDTA を含む)で抽出し抽出液を30°Cで10分間放置し6000r.p.m. 10分間遠心分離後30~60% 飽和硫酸で塩析される区分を集め50mlの0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し5lの0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で一夜透析して硫酸を除き25,000r.p.m. 10分間遠心分離した上澄液を、あらかじめ0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化しておいた DEAE-Sephadex (A-50) カラムに通して磷酸緩衝液 (pH 7.0) の0.01~0.3M までの濃度の gradient 法で溶出した。この結果は Fig 1 に示される。A. B. C. 三つの蛋白のピークが認められ A. B のピークはいずれも malic dehydrogenase の活性を有し C の部分に malic enzyme の活性があり、malic dehydrogenase の活性はなくまた A. B の部分には malic enzyme の活性はなかった。malic enzyme は約 0.25M の磷酸緩衝液で溶出されこの部分の比活性は用いた試料の約 96 倍になった。

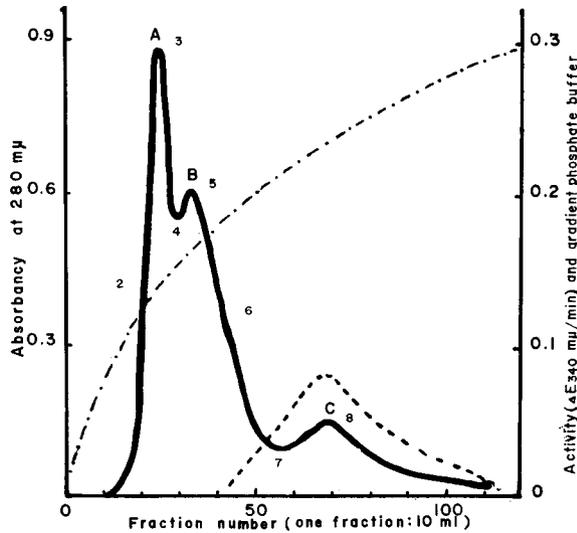


Fig. 1. Chromatography of squid malic enzyme on DEAE-Sephadex (A-50) column at 4°C. Experiment was carried out with gradient elution (0.01-0.3M) of phosphate buffer (pH 7.0). Continuous line represents 280m μ absorbancy; broken line activity; dotted line gradient elution curve.

—Cellulose acetate electrophoresis—

DEAE-Sephadex によって分別された malic enzyme と malic dehydrogenase を更にセルロースアセテート膜による電気泳動法で確かめてみた。その結果は Fig 2 に示される。カラムに通す前の酵素製品を比較対照とし、Fig 1 に示した A. B. C. 三つのピークを用いて電気泳動を行なった。カラムに通す前は4つのバンドが見られ4種類の蛋白が含まれていたと思われる。ピーク A では3つのバンドが見られ再クロマトグラフによって2つのピークに分れ第二のピーク附近に malic dehydrogenase の活性が見られたが活性ピークと蛋白ピークは一致しない。A は2つの未知蛋白と malic dehydrogenase の混合物と推定される。ピーク B では1つのはっきりしたバンドがみられ malic dehydrogenase 活性が主にこの区分に存在し再クロマトグラフによっても単一のピークを示し、このものは活

性ピークと一致する。またピーク C も 1 つのバンドで malic enzyme のみと思われる。ピーク C の malic enzyme はカラムクロマトグラフ的にも、酵素活性的にも、また電気泳動的にも malic dehydrogenase と分離でき単一だと思われる。

全精製法の一例を示すと Table 1 の様になる。前報の malic enzyme の比活性が約 19 倍であったのに今回は 96 倍となり前報より 5 倍強程精製された。

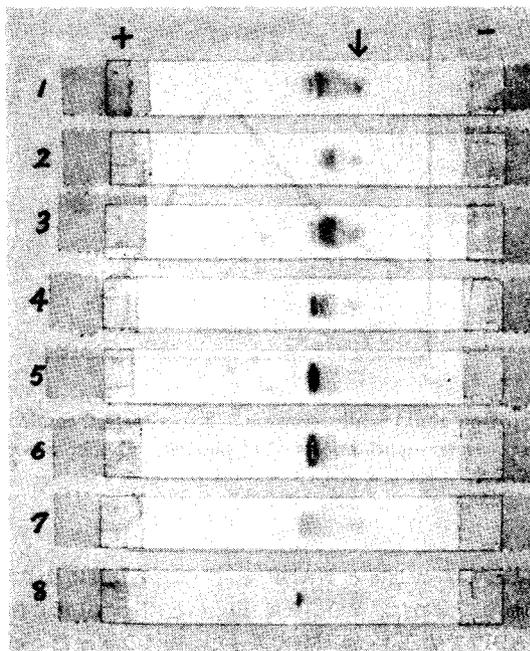


Fig. 2. The pattern of malic enzyme and malic dehydrogenase on cellulose acetate membrane electrophoresis. Electrophoresis was carried out at pH 8.6 phosphate buffer ($\mu=0.06$), 1mA/cm, 90V for 3 hours. (See in Fig. 1.)

Table 1. Purification of malic enzyme from squid muscle.

Procedure	Volume (ml)	Activity		Protein		Specific activity	Yield (%)	
		Units /ml	Total units	mg/ml	Total mg		Protein	Activity
Initial extract	2470	60	148200	6.57	16230	9.1	100	100
Incubation at 30°C for 10 min	2320	69	160080	5.40	12530	12.8	77	108
30~60% ammonium sulphate ppt	84	2394	201100	37.70	3167	63.5	20	136
DEAE-Sephadex (A-50)	10	378	3780	0.43	4.3	875.0	0.03	2.6

Malic enzyme の二, 三の性質

この酵素製品を用いて二, 三の性質を調べ以前の結果と比較検討してみた。

—pH の効果—

pH 5.4~8.5 の間のいろいろな pH で活性を測定したのが Fig 3 に示される。pH 7.2 附近に至適 pH を持ち比較的酸性側では活性が安定であるのに反し、アルカリ側では急速に不活性化して行く。また以前に報告した酵素製品の至適 pH も 7.2 附近で相異は認められなかった。

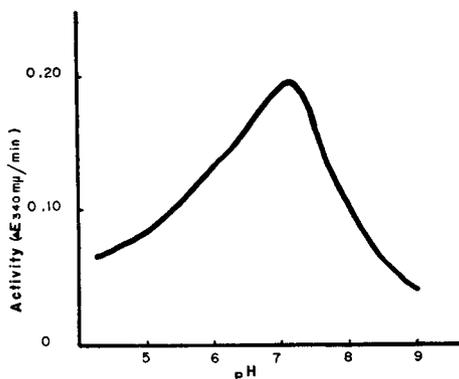


Fig. 3. Effect of pH on squid malic enzyme. Experimental condition was the same as in the previous report except that phosphate buffer was used in the range of pH 5.7-7.2.

—ミハエリス定数—

malic enzyme の基質として *l*-malate と NADP を用いて反応速度に及ぼす基質濃度の効果を調べ、 K_m は Lineweaver-Burk 法で求めた。その結果は Fig 4 と Fig 5 に示される。*l*-malate に対する K_m は $1.1 \times 10^{-3}M$, NADP では $1.3 \times 10^{-5}M$ であった。前報の K_m は *l*-malate では $1.3 \times 10^{-3}M$, NADP では $6.6 \times 10^{-4}M$ であったので基質に対する親和力には差はないが、NADP に対する親和力が約 5 倍増加している。恐らく混在していた malic dehydrogenase の NADP に対する親和力があるためと思われる。

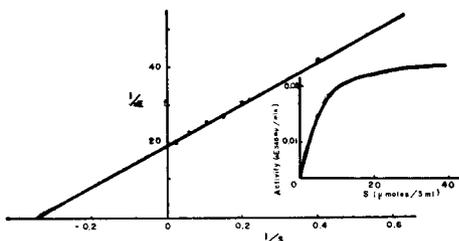


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of squid malic enzyme activity for *l*-malate. Experimental condition was the same as in the previous report except that *l*-malate was used in the range (0-40 μ moles).

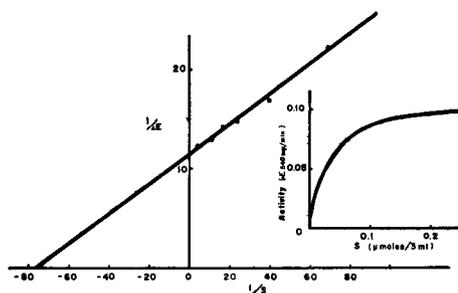


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of squid malic enzyme activity for NADP. Experimental condition was the same as in the previous report except that NADP was used in the range (0-0.2 μ mole).

—d-malate の効果—

malic enzyme は *l*-malate に特異的に作用し pyruvate と CO_2 に酸化脱炭酸するが d-malate では反応しない。基質の *l*-malate 濃度を 1, 5, 10, 20 μmoles とした時のそれぞれの d-malate の効果を調べたのが Fig 6 である。*l*-malate に対する K_m が $1.4 \times 10^{-4} \text{M}$ であり d-malate による K_i は $1.9 \times 10^{-3} \text{M}$ であった。d-malate は malic enzyme を拮抗的に阻害しているが、阻害の程度は少ない。

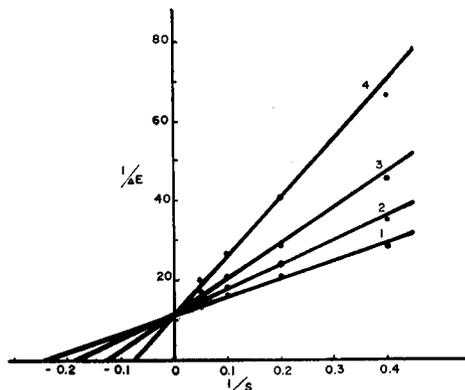


Fig. 6. Effect of d-malate on squid malic enzyme. Experimental condition was the same as in the previous report except that *l*-malate was used in the range (1-20 μmoles) and d-malate was added in the reaction mixture; 1-0, 2-10, 3-20, 4-40 μmoles .

Malic enzyme の分布

前報でスルメイカ、ホタテ貝、コイの各筋肉で活性を比較した所、スルメイカ筋肉に特異的であることがわかったので、更に哺乳類、魚類、軟体類の14種類を用いて malic enzyme の分布を調べた。その結果は Table 2 に示される。筋肉ではスルメイカに最も多く以下ホタテ貝、ツブ(アツエゾボラ)

Table 2. Distribution of malic enzyme in the muscle and liver of Mollusca and Vertebrata.

			Muscle	Liver
			(units/g tissue)	
Mollusca	Gastropoda	Haliotis	169	—
		Neptunea	724	848
	Pelecypoda	Viviparus	230	346
		Spisula	225	117
		Anadara	270	108
		Patinopecten	918	112
		Mytilus	230	271
		Crassostrea	216	251
	Cephalopoda	Ommastrephes	1519	432
		Doryteuthis	621	1070
Vertebrata	Pisces	Pleurogrammos	162	1661
		Statmogairdnerii	664	1514
		Carassius	162	289
	Mamalia	Mus muscutus	315	477

ニジマスという順になっている。肝臓では魚類に多く含まれる。背推動物では筋肉よりも肝臓に多く含まれている。軟体類では一定の関連性がなく、ヤリイカのように肝臓の方に多いもの、スルメイカの場合では逆になっている。筋肉の活性を 100 とした時の各臓器間の活性の割合をスルメイカとハツカネズミを用いて調べたのが Table 3 に示される。スルメイカでは筋肉に最も多く含まれており腎臓がそれに続き肝臓にはあまり含まれておらず筋肉の 1/4 以下であった。一方ハツカネズミでは腎臓に最も多く肝臓は腎臓の約 1/4 で筋肉は 1/5 以下であった。

Table 3. Comparison of malic enzyme activity in various organs as percentage of muscle enzyme activity.

	Mouse	Spuid
Muscle	100	100
Liver	151	22
Kidney	571	74
Pancreas	97	47

考 察

malic enzyme は *L*-malatae を pyuvate と CO₂ に酸化的に脱炭酸する活性と同時に oxaloacetate (OAA) を pyruvate と CO₂ に脱炭酸する decarboxylase 活性を有している。Lardy³⁾ らは鳩肝臓の malic enzyme を結晶化しているが、結晶化した酵素製品でもこの両方の活性を有している。イカ筋肉の malic enzyme でも homogenate ではたしかに OAA decarboxylase 活性を有しているが、96 倍に精製した酵素では homogenate 程高い活性を持たず精製の過程で OAA decarboxylase 活性が取り除かれたと思われる。(Table 4) イカ筋肉の homogenate の至適 pH が 6.8 附近にあり、Ochoa⁴⁾ らによって報告された decarboxylase の至適 pH が 4.5 附近とかなり異っており肝臓の malic enzyme と筋肉の malic enzyme では相異があるようである。Schmitt⁵⁾ らはタラ筋肉で OAA decarboxylase

Table 4. Oxaloacetate (OAA) decarboxylase activity of squid muscle homogenate and purified malic enzyme.

Incubation time (min)	Crude extract		Purified enzyme	
	Autolysis	Enzymatic	Autolysis	Enzymatic
5	33.7	36.2	26.1	25.7
10	47.2	60.2	42.0	46.8
20	55.1	70.1	45.2	55.4
30	60.2	87.8	56.0	69.8
40	67.4	97.1	79.0	87.0

Reaction mixture contained phosphate buffer (pH 6.8) 100 μ moles, MnCl₂ 1 μ moles, OAA 100 μ moles and enzyme. Total volume 3.0 ml. Incubation temperature at 30°C for 30 min. The values represent μ moles per ml of reaction mixture.

を分離精製しており、この decarboxylase は malic enzyme を含まず至適 pH が 6.5~7.0 にあり、NADP を必要とせず、イカ筋肉の homogenate の OAA decarboxylase とよく一致している。

malic enzyme は *l*-malate に特異的で *d*-malate では反応しない。前報¹⁾の malic enzyme では基質の *l*-malate の濃度が 10 μ moles の時 *d*-malate では阻害されずむしろ活性化されていた。精製した酵素では、*d*-malate によって拮抗的に阻害されたが阻害の程度は少なく $K_m=1.4 \times 10^{-3}M$ に対して $K_i=1.9 \times 10^{-3}M$ であった。*d*-malate の濃度を 1 μ mole 以下にすると阻害は起らず活性化されるが *d*-malate では *l*-malate の代りをすることはできなかった。Stern⁶⁾らは *d*-malate を含む培地で培養した *E. coli* の malic enzyme には NAD を cofactor として、*d*-malate に特異的な *d*-malic enzyme が存在することを報告している。*d*-malate が malic enzyme を拮抗的に阻害するのであるから(たとえ阻害の程度は少なくとも) *d*-malate は *l*-malate と malic enzyme との活性化の site に関係性を持っていることが推定される。

malic enzyme は Ochoa らによると筋肉には含まれていないとされているが、軟体類のイカ筋肉には特異的に多い。背推動物ではたしかに筋肉にはほとんど含まれていないが、無背推動物では筋肉にも含まれている。ただ無背推動物では筋肉だけと言った一定の関連性がなくスルメイカ、ホタテ貝では筋肉に含まれており、ヤリイカでは筋肉よりもむしろ肝臓に多く含まれている。無背推動物では運動性とか、glycogen および脂肪含量とかに malic enzyme の分布が関係しているのかも知れない。それは malic enzyme が、脂肪形成にその意義が認められている⁷⁻⁹⁾からである。

要 約

DEAE-Sephadex (A-50) カラムクロマトグラフにより更に malic enzyme を精製した。精製した malic enzyme は、malic dehydrogenase 活性を含まずセルロースアセテート膜による電気泳動でも単一であった。この酵素と以前の malic dehydrogenase が混在している malic enzyme とで二、三の性質を比較したが NADP に対する親和力が増加した以外には相異が認められなかった。また哺乳類、魚類、軟体類の 14 種類で malic enzyme の分布を調べた。

終りに本実験を行うに当り御指導していただいた北海道大学吉村克二名誉教授および斎藤恒行教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 柴田 猛外 (1965). 北大水産彙報 16, 171
- 2) ——— (1966). 北大水産彙報 17, 64
- 3) Lardy, H. A. *et al.* (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 520
- 4) Ochoa, S. (1952). in Sumner, J. B. and Myrbäck, K. (Editors), *The Enzymes* 2, 929p. New York; Academic Press
- 5) Schmitt, A. *et al.* (1966). *Biochem. Z.* 347, 18
- 6) Stern, J. R. and Hegre, C. S. (1966). *Nature*, 212, 1611
- 7) Shrago, E. *et al.* (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 3188
- 8) Young, J. W. *et al.* (1964). *Biochemistry*, 3, 1687
- 9) Shrago, E. and Lardy, H. A. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 663