

乳酸菌の生産する新規な 2-ケト酸リダクターゼ — 精製と性質 —

中島 伸佳・赤木 玲子・須見 洋行

要 約 :

2-ケト-4-フェニル酪酸を立体特異的に還元し、(R)-2-ケト-4-フェニル酪酸を生成する新規なリダクターゼを、*Leuconostoc dextranicum* ATCC 27310 の無細胞抽出液より電気泳動的に均一な状態に精製した。本酵素の還元反応における至適 pH は 6.0 付近であり、NADPH を補酵素として要求した。

(R)-及び(S)-2-ヒドロキシ酪酸の酸化(脱水素)反応は、本酵素により触媒作用を受けなかったが、2-ケトヘキサノイック酸や2-ケトオクタノイック酸も基質となりえた。(還元された。)

本酵素蛋白質の SDS-電気泳動法及びゲル濾過法により求めた分子量は、共に 46,000 と算出された。従って本酵素は、モノマー蛋白質であると考えられる。

はじめに :

光学活性 2-ヒドロキシ酸は、各種の抗生物質や薬理作用を有する生理活性物質の構成成分として、またそれらの合成基剤などとして重要な化合物である。

乳酸などの 2-ヒドロキシ酸の合成法は、光学分割法や発酵生産法をはじめとして、多くの研究結果が報告されている¹⁾。また、関与する酵素においても各種の 2-ヒドロキシ酸脱水素酵素や(R)-マンデル酸脱水素酵素などの単離精製がなされているが、これらは、すべて NAD^+ 依存性脱水素酵素である^{2)~6)}。

今回、我々は、2-ケト酸を基質として、NADPH 存在下、(R)-2-ヒドロキシ酸を立体特異的に生成するリダクターゼを乳酸菌に発見したので、その精製と酵素化学的性質について報告する。

実験材料と方法 :

NAD^+ 、 NADP^+ 、NADH 及び NADPH は Kojin 製を、各種の 2-ケト酸及び 2-ヒドロキシ酸は Sigma 製を用いた。

酵素活性の測定方法は以下の通りである。基質の還元反応においては、反応液 1 ml 中に 10 μmol の 2-ケト-4-フェニル酪酸、0.1 μmol の NADPH、100 μmol の potassium phosphate buffer (pH 6.0) 及び、適量の酵素液を含み、ブランクには、酵素液の代わりに純水を添加した。

基質の脱水素反応は、10 μmol の 2-ヒドロキシ酸、2.5 μmol の NADP^+ 、100 μmol の Tris-HCl buffer (pH 10.0) 及び、適量の酵素液を添加した反応液 (1 ml) を用いて行った。

酵素活性は 37 $^{\circ}\text{C}$ において、340 nm における NADPH の吸収の変化を分光光学的に測定して算出した。酵素活性 1 unit は、1 分間あたり 1 μmol の基質を生成物に変換しうる酵素量とした。比活性は、酵素蛋白質 1 mg あたりの unit 数で表示した。

蛋白質は、Lowry et al⁷⁾ の方法により、牛血清アルブミン (Sigma) を標準物として算出した。酵素蛋白質の純度は Davis-電気泳動法⁸⁾ により検定した。

分子量は、Laemmli による SDS-電気泳動法⁹⁾ により、標準蛋白質との移動度の比較に基づいて算出し、さらに、HPLC によるゲル濾過法により測定した。

実験材料である乳酸菌体は、ペプトン、酵母エキスを主成分とした完全培地で、18 hr、嫌氣的に培養し、集菌、洗菌した休止菌体を用いた。

本酵素の精製は、0.02% 2-メルカプトエタノール存在下、10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) 中で 0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ の条件下において各種のクロマトグラフィーにより実施した。

酵素反応生成物 (2-ヒドロキシ酸) の同定は、光学分割カラム (Dical Chiralpak WH column) を用いて HPLC により検討した。

Table I Purification steps of the enzyme

Step	Total protein(mg)	Specific activity (units/mg)	Total units	Yield (%)
Crude extract	847.8	0.08	69.5	100
DEAE - Cellulose (10 × 20 cm)	148.3	0.16	23.5	35
DEAE - Toyopearl 650 M (4.0 × 30 cm)	7.28	1.29	9.4	14
Cellulofine GCL - 2000 sf (2.0 × 100 cm)	1.45	3.45	5.0	7

実験結果と考察：

(精製)

200g (wet) の *Leuconostoc dextranicum* ATCC 27310 の休止菌体を原料として、超音波破碎後、遠心上清を、各種のクロマトグラフィーにより、本酵素蛋白質を電気泳動的に均一に精製した。精製手順は Table- I に示す通りである。得られた精製酵素は約 1.5 mg であり、精製倍率は約 45 倍であった。精製酵素の Davis - 電気泳動法によるゲル写真を Fig.1 に示す。

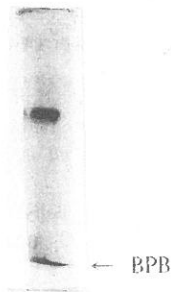


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

Electrophoresis was done on 7.5% polyacrylamide gel by the procedure of Davis⁸⁾ with 20μg of the purified enzyme. The direction of migration is from cathode (top) to anode. The gel was stained for protein with Coomassie brilliant blue G-250.

(基礎的性質)

本酵素の各種の2-ケト酸の還元反応に対する至適 pH は 6.0 付近であり、至適温度は 40℃ であった。また本酵素は、pH 7.2, 40℃, 20 min の熱処理において安定であった。

(分子量)

SDS - 電気泳動法 (Fig. 2, A) 及びゲル濾過法 (Fig. 2, B) による分子量は、共に 46,000 と算出された。ゆえに本酵素蛋白質は、モノマー蛋白であ

ると考えられる。

(基質特異性)

本酵素の各種の2-ケト酸の還元反応に対する特異性は、Table-II に示す通りである。本酵素は、NADPH 存在下において、2-ケト-4-フェニル酪酸をはじめとして、2-ケトヘキサノイック酸や2-ケトオクタノイック酸などの還元反応を触媒した。本反応は NADH 存在下においては進行しなかった。

一方、Table-III に示すように、各種の2-ヒドロキシ酸の酸化(脱水素)反応は、本酵素により触媒されなかった。

なお、精製酵素の2-ケト-4-フェニル酪酸に対する km 値は 0.29 mM, V max 値は 6.8 μmol / mg · min であった。

また、本酵素は、3-ケト酸や3-ヒドロキシ酸にも作用しなかった。

(生成物の同定)

本酵素に触媒される2-ケト-4-フェニル酪酸の還元反応により生成する2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の光学分割を行い、本酵素反応の立体特異性を検討した結果、(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の生成が確認された。(S)-体の生成はみられなかった。

また、2-ケトヘキサノイック酸をはじめとする他の基質においても、本酵素反応により対応する(R)-2-ヒドロキシ酸のみが生成することが確認された。

(阻害剤の影響)

2-ケト-4-フェニル酪酸の還元反応に対する各種の阻害剤の影響を検討した結果、Table-IV に示すように、SH-酵素に対する阻害剤による顕著な阻害作用が確認された。

(考察)

乳酸菌 (*Leuconostoc dextranicum* ATCC 27310) の無細胞抽出液より単離精製された本酵素は、2-ケト-4-フェニル酪酸を、NADPH 存在下において、

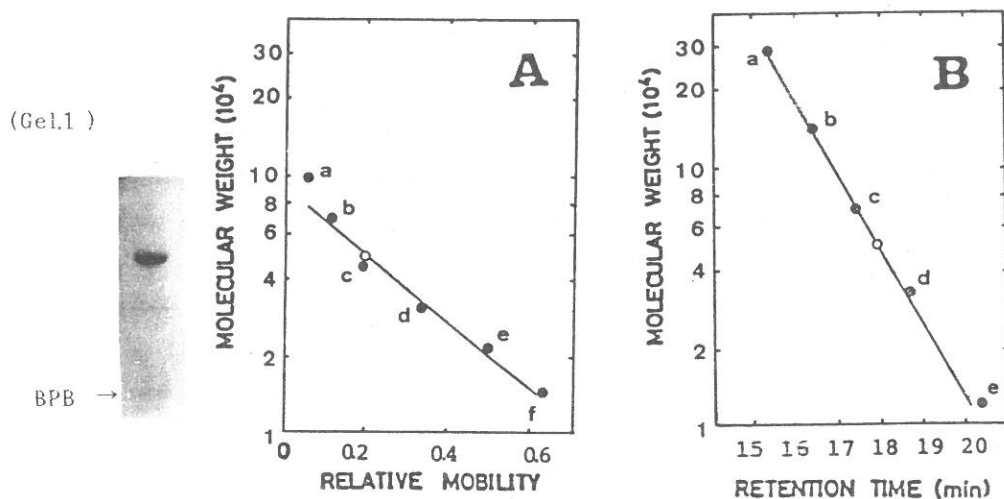


Fig. 2 Molecular weight measurement of the purified enzyme.

A : The molecular weight of the subunit was estimated by SDS-gel electrophoresis (Gel. 1) in the presence of 0.1% SDS by the method of Laemmli⁹⁾ with 20 μ g of the purified enzyme. Relative mobility was plotted against subunit molecular weight in a semilogarithmic scale. The position of the purified enzyme is shown by an open circle. The standard proteins (Pharmacia) used were : a, phosphorylase b (M.W. 94, 000) ; b, bovine serum albumin (M. W. 68, 000) ; c, ovalbumin (M. W. 43, 000) ; d, carbonic anhydrase (M. W. 30, 000) ; e, soybean trypsin inhibitor (M. W. 20, 000) ; and f, α -lactoalbumin (M. W. 14, 000).

B : The molecular weight of the enzyme was measured by high performance liquid chromatography with an Asahipak GS-520 column (0.75 \times 60 cm) (Asahi Kasei Co.,). Retention time was plotted against molecular weight in semilogarithmic scale. The position of the purified enzyme is shown by an open circle.

The standard proteins (Oriental Yeast Co.,) used were : a, glutamate dehydrogenase (M. W. 290, 000) ; b, lactate dehydrogenase (M. W. 142, 000) ; c, enolase (M. W. 70, 000) ; d, adenylate kinase (M. W. 32, 000) ; and e, cytochrome c (M. W. 12, 400).

Table II Substrate specificity for various 2-keto acids

Substrate (10 mM)	Relative activity
2-keto-4-phenyl butyric acid	100
2-ketooctanoic acid	80
2-ketohexanoic acid	52
2-ketoisocaproic acid	18
2-ketobutyric acid	15
2-ketopropionic acid	8
phenylpyruvic acid	4
benzoylformic acid	4
2-ketoisovaleric acid	3

Various 2-keto acids (10 μ mol/ml) were incubated with the enzyme in the standard reaction conditions.

Table III Substrate specificity for various 2-hydroxy acids

Substrate (10 mM)	Relative activity
(S)-2-hydroxyl-4-phenyl butyric acid	0
(R)-2-hydroxyl-4-phenyl butyric acid	0
(RS)-2-hydroxylisocaproic acid	0
(RS)-2-hydroxylisovaleric acid	0
(RS)-2-hydroxylbutyric acid	0
(RS)-2-hydroxylpropionic acid	0

Various 2-hydroxy acids (10 μ mol/ml) were incubated with the enzyme in the standard reaction conditions.

Table IV Effect of inhibitors on the purified enzyme

Inhibitors	Concentration(mM)	Relative activity
None		100
pCMB	0.01	10
HgCl ₂	0.01	5
EDTA	1	100
NaN ₂	1	98
CuSO ₄	1	70
MgCl ₄	1	90

a, pCMB ; p-chloromercuribenzoic acid

The enzyme activity was assayed after the incubation with various inhibitors for 20min, at 25 °C in 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.2)

立体特異的に還元し、(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を生成する新規なリダクターゼであると考えられる。

さらに、本酵素は2-ケトヘキサノイック酸や2-ケトオクタノイック酸などの長鎖のアルキル基を有す

る2-ケト酸の還元反応にも作用する。

また、本菌体抽出液である粗酵素は、数々の2-ヒドロキシ酸の脱水素反応を触媒するが、本精製酵素は(R)-及び(S)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸をはじめとした2-ヒドロキシ酸の脱水素反応には作用しない。

本酵素は、分子量46,000のモノマー蛋白質であると考えられる。

なお、本酵素反応は、SH-試薬による阻害が見られることから、本反応にSH基が関与していることが示唆される。

従って、本酵素は、2-ケト酸に対し比較的広い特異性を示す新規なリダクターゼである。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり数々の御援助と御指導を賜りました京都大学化学研究所、教授、左右田健次博士に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) W. Hummel and M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.*, 184, 1 (1989)
- 2) H. Schutte, W. Hummel and M.-R. Kula, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 19, 167 (1984)
- 3) W. Hummel, H. Schutte and M.-R. Kula, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 21, 7 (1985)
- 4) Y. Yamazaki and H. Maeda, *Agric. Biol. Chem.*, 50(10), 2621 (1986)
- 5) W. Hummel, H. Schutte and M.-R. Kula, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 28, 433 (1988)
- 6) H.-P. Lerch, H. Blocker, H. Kallwass, J. Hoppe, H. Tsai and J. Collins, *Gene.*, 78, 47 (1989)
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 8) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
- 9) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970)

平成3年3月9日受付

平成3年5月16日受理