ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 61, No. 12, pp. 1589~1591, 1987]

グルタミン酸生産菌 *Klebsiella aerogenes*
19-35 における 2-オキソグルタル酸による
グルタミン酸脱水素酵素の阻害

浅田芳宏, 金原康久, 田村恭子
(茨城大学農学部農芸化学科)
昭和 62 年 6 月 8 日 受理

Inhibition of Glutamate Dehydrogenase
by 2-Oxoglutarate (OGA) in
Klebsiella aerogenes 19-35,
a Glutamate-Producing Bacterium

Yoshihiro ASADA, Yasuhisa KINBARA
and Yasuko TAMURA
Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Ibaraki University,
3998, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03

The enzymatic properties of partially purified glutamate dehydrogenase (GDH) from *K. aerogenes* 19-35 were investigated. It was found that GDH, responsible for reductive amination, was subject to substrate inhibition and product inhibition. The substrate inhibition was specific for OGA. In oxidative deamination, no substrate inhibition was observed, although product inhibition occurred. The enzyme was inhibited by malate, fumarate and succinate in biosynthetic reaction, although these organic acids stimulated the activity of GDH in degradative reaction.

(Received June 8, 1987)

グルタミン酸生産菌は生育にビオチンを要求し、グルタミン酸生産もまた培地中のビオチン量で調節される^(1,2)。グルタミン酸生産菌のグルタミン酸生合成の最終段階では、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) による還元のアミノ化反応で 2-オキソグルタル酸 (OGA) ヘアンモニアが取り込まれる。これらビオチン要求菌株の GDH の性質について詳細な研究が行われている⁽¹⁻⁵⁾。一方、生育にビオチンを要求しない *Klebsiella aero-*

genes 19-35 がグルタミン酸を生産することを見出した⁽⁶⁾。ビオチン非要求性グルタミン酸生産菌の GDH の性質は不明である。著者らは供試菌の GDH の性質について部分精製酵素で検討した結果、2-オキソグルタル酸による GDH 活性阻害を見出した。

0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で調製した細胞抽出液を 30~50% 飽和硫酸で分画し、続いて 55°C, 5 分間加熱処理後、その遠心上澄液を 50% 飽和硫酸で再分画した。その後、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Bio-Gel A-0.5 m カラム (24×800 mm) を用いて分画し、活性区分を同じ緩衝液で平衡化した DEAE セルローズカラム (22×200 mm) に吸着させ、終濃度 1 M の NaCl を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で濃度勾配法で分画した。その結果、約 5% の収率で約 200 倍に精製した酵素標品を得た。GDH 活性測定は椎尾らの用いた方法に準じて行った⁽⁴⁾。蛋白の測定は Lowry らの方法で測定した⁽⁷⁾。

供試菌の GDH によるグルタミン酸の合成反応は補酵素として NADPH を要求した。また、至適 pH は 7.5 であった。本酵素の OGA に対する基質飽和曲線を Fig. 1 に示した。OGA 2.5 mM で GDH は最大活性を示したが、OGA 濃度が増大するにつれ活性は減少した。一方の基質であるアンモニアではこのような基質増大に伴う活性の減少は認められなかった (Fig. 2)。これらの結果は *K. aerogenes* 19-35 の GDH が OGA によって特異的に阻害を受ける、いわゆる基質阻害現象を明らかにした。OGA による GDH の基質阻害現象は茶の根から分離した GDH で見出されているだけで⁽⁸⁾、グルタミン酸生産菌はもちろん、非生産菌、とくに *Klebsiella* 属でも見出されていない⁽⁹⁾。

本酵素の NH_4Cl , NADPH に対するみかけの K_m は 2.9×10^{-3} M, 4.4×10^{-5} M で、OGA へのみかけ上の K_m は 4×10^{-3} M であった。また、反応生成物である NADP, グルタミン酸による GDH 活性阻害 (生成物阻害) も認められた。この場合、GDH 活性の 50% 阻害は NADP が 0.4 mM で、グルタミン酸が 100 mM で得られた。阻害形式は OGA に対して NADP で混合型、グルタミン酸で拮抗型であった。

他方、本酵素のグルタミン酸分解反応は至適 pH を 9.0 に有し、その活性は合成反応の約 1/5 と弱い活性である。グルタミン酸に対する飽和曲線は双曲線型を示し、みかけの K_m 値は 4.2×10^{-3} M であった。NADP

Fig. 1. Saturation Curve for the Biosynthetic Reaction of Glutamate Dehydrogenase from *Klebsiella aerogenes* 19-35. Assay system consisted of; 80 mM phosphate buffer (pH 7.5), 20 mM NH_4Cl , 0.15 mM NADPH, 2-oxoglutarate varied, 10 μg enzyme protein.

Fig. 2. Double Reciprocal Plots of the Reaction Velocity against Ammonium Chloride Concentration at the OGA Concentration of 2.5 mM (○) and 25 mM (●).

に対するみかけの K_m 値は $5.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ であった。また、反応生成物、NADPH, OGA, NH_4Cl による阻害はすべてにおいて認められ、その 50% 阻害はおのの、0.08 mM, 3 mM, 2 mM で得られた。

OGA の代謝に関連する物質として、TCA サイクルの有機酸等の本酵素活性に及ぼす影響を検討した結果を Table I に示した。合成反応では L-リンゴ酸が 50% 阻害と最大値を示し、以下、フマル酸、コハク酸、オギザロ酢酸と続き、オギザロ酢酸で約 20% の阻害であった (Table I)。L-リンゴ酸は OGA に対して拮抗的に阻害し、 K_i は $6.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった (Fig. 3)。フマル酸

Fig. 3. Inhibition of Glutamate Dehydrogenase by Malate. 2-Oxoglutarate; 1 mM (●), 2.5 mM (○).

Table I. Effects of Various Compounds on the Activity of Glutamate Dehydrogenase. Assay system (biosynthetic reaction) consisted of; 80 mM phosphate buffer (pH 7.5), 20 mM NH_4Cl , 0.15 mM NADPH, 3 mM 2-oxoglutarate, 10 μg protein.

Assay system (degradative reaction) consisted of; 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), 20 mM glutamate, 0.1 mM NADP, 10 μg protein.

Addition ^a	Relative activity	
	Biosynthetic reaction	Degradative reaction
None	100	100
Citrate	107	22
cis-Aconitate	95	128
DL-Isocitrate	100	—
Succinate	75	141
Fumarate	65	140
L-Malate	50	134
Oxalacetate	80	—
Glyoxylate	92	67
Pyruvate	110	123
Acetyl CoA	100	84
Phosphoenolpyruvate	100	10
NADP	50	—
NADPH	—	40
2-Oxoglutarate	—	17
L-Glutamate	90	—
Ammonium chloride	—	20

^a 10 mM, NADP; 0.5 mM, NADPH; 0.1 mM, acetyl CoA.

酸、コハク酸でもほぼ同様の結果を得た。他方、分解反応に対し、クエン酸、ホスホエノールピルビン酸は阻害的に、コハク酸、フマル酸、L-リンゴ酸は促進的に作

用した (Table I). *B. flavum* の GDH の合成反応はクエン酸, シスアコニット酸, DL-イソクエン酸で 20% 活性促進を受け, さらに分解反応はフマル酸で 25% 活性促進を受け, 全体として TCA サイクルの有機酸による活性の阻害は認められていない⁽⁹⁾. したがって, 供試菌の GDH は OGA を初めとして, TCA サイクルの酸による活性の阻害的調節を受ける点で他の菌に比べ異なっていることが明らかになった. GDH の OGA による負の制御は供試菌における L-グルタミン酸生産に矛盾することで, 今後, L-グルタミン酸生成機構と本酵素の役割が問題となる.

- (1) 飯塚 広, 阿部重雄, 高山健一郎:「アミノ酸発酵」上巻, 木下祝郎ら編, 共立出版, 1972, p.3.
- (2) 木下祝郎, 田中勝宣:「アミノ酸発酵」下巻,

山田浩一ら編, 共立出版, 1972, p.1.

- (3) K. Oshima, K. Tunoda and S. Kinoshita: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 714 (1964).
- (4) I. Shiio and K. Ujigawa: *J. Biochem.*, **84**, 647 (1978).
- (5) I. Shiio and H. Ozaki: *J. Biochem.*, **68**, 633 (1970).
- (6) 高村義親, 藤井義昭, 植村定治郎: *Amino Acids*, **7**, 35 (1963).
- (7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (8) T. Takeo: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2257 (1979).
- (9) E. L. Smith, B. M. Austen, K. M. Blumenthal and J. F. Nyc: "Glutamate Dehydrogenase," In *The Enzymes*, Vol. XI, ed. by P. D. Boyer, 1975, Academic Press, New York, p. 293.