報 文

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.63, No. 12, pp. 1873~1877, 1989]

ユーグレナ (*Euglena gracilis* z) のセリンヒドロキシメチル 転移酵素, L-スレオニアルドラーゼの存否について

阪本正子, 増田 勉, 中野長久*, 北岡正三郎*

(四天王寺国際仏教大学, *大阪府立大学農学部)

平成元年6月8日受理

Presence of Serine Hydroxymethyltransferase and L-Threonine Aldolase in *Euglena gracilis* z

Masako SAKAMOTO, Tutomu MASUDA, Yoshihisa NAKANO* and
Shōzaburo KITAOKA*

Shitennōji International Buddhist University, Habikino, Osaka 583

*Department of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591

The activities of serine hydroxymethyltransferase, L-allothreonine aldolase and L-threonine aldolase were determined in organelles isolated from *Euglena gracilis* z cells. These enzyme activities were detected in the cytosol, mitochondrial and chloroplast fractions, but not in the microsomal fraction. The detection of L-threonine aldolase activity in *Euglena* is noteworthy because there are no reports describing this enzyme activity in higher eukaryotes, such as mammals, birds and in fish livers and higher plant seedlings. Our result shows that the metabolic pathway of the reversible interconversion of L-threonine to glycine and acetaldehyde occurs in cytosol, mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis* z. Serine hydroxymethyltransferase and both of the aldolase activities could not be separated from one another by DEAE-cellulose column chromatography, suggesting that one enzyme protein contains the three enzyme activities.

(Received June 8, 1989)

緒 言

セリンヒドロキシメチル転移酵素 [L-serine : tetrahydrofolate 5,10-hydroxymethyltransferase, EC 2.1.2.1] (SHMT) は L-セリンーグリシンおよび L-スレオニンーグリシンの相互変換を触媒する酵素であるとする説^(1~3)と, この酵素には L-スレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに分解するいわゆるアルドラーゼ活性はなく, 別個に L-スレオニアルドラーゼ活性を持つ酵素の存在を指摘する説⁽⁴⁾とがある。著者ら⁽⁵⁾はラット, ウサギ等の高等動物の肝臓および高等植物であるトウモロコシ, 緑豆の発芽体を用いてアルドラーゼ活性を検討したところ, L-アロスレオニンに対するアルドラーゼ活性

は認められ, L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性は見出すことができなかったことを報告した。また, この結果から高等動物の肝臓および高等植物の発芽体には L-スレオニン $\rightleftharpoons$ グリシン+アセトアルデヒド変換の代謝経路が存在しないことがわかった。また, ラット肝臓⁽⁶⁾およびトウモロコシ発芽体^(7,8)の SHMT は L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性を持たないことも明らかにした。しかし, 微生物⁽⁹⁾には L-スレオニアルドラーゼの存在と, L-スレオニン $\rightleftharpoons$ グリシン+アセトアルデヒド変換の代謝経路の存在が十分考えられることから, 単細胞真核生物で原生動物と緑藻両者に分類され, 葉緑体を持つユーグレナ (*Euglena gracilis* z) を用い, L-スレオニアルドラーゼの有無, L-スレオニン $\rightleftharpoons$

グリシン+アセトアルデヒド変換の代謝経路の存否および SHMT が L-スレオニナルドラーゼ活性を持つかどうか、およびその細胞内局在性について検討を加えた。

実験材料および方法

1. ユーグレナの培養 ユーグレナ (*Euglena gracilis* z) の培養は、炭素源としてグルコース、窒素源としてグルタミン酸を主体とする Koren-Hutner の培地⁽¹⁰⁾を用い、150 ml の培地に 1.5 ml の種細胞 (2×10^7 cells/ml) を植え継ぎ、pH 3.5、27°C で約 2000 ルクスの光照射のもとで振盪培養を行った。

2. 粗酵素液の調製 培養液を $250 \times g$ 、5 分間遠心分離してユーグレナ細胞 (湿重量約 320 g) を集め、水 1500 ml を加え攪拌後、遠心分離により細胞を洗浄した。この操作を 3 回繰り返したのち、20 μ M ビリドキサールリン酸、10 μ M ジイソプロピルフルオロリン酸 (DIFP)、1 mM メルカプトエタノールおよび 1 mM EDTA を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) ([B-1]) 300 ml を加えて超音波処理 (10 kHz, 15 min) を行い細胞を破碎した。次に、これを $12,000 \times g$ 、30 分間遠心分離し、上清を粗酵素液とした。

3. オルガネラの分画 オルガネラの分画は Tokunaga ら⁽¹¹⁾の方法に従って行った。Koren-Hutner の培地⁽¹⁰⁾からビタミン B₁₂ を省いた培地で培養したユーグレナ細胞 (湿重量約 24 g) を $250 \times g$ 、5 分間遠心分離して集め、水洗後 10 μ M DIFP および 0.38 M マンニトールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に懸濁した。次にトリブシン 150 mg を加え、0°C で 90 分間静かに攪拌し、部分消化を行い、5 分間遠心分離して、部分消化細胞を集め、同じ緩衝液 50 ml で洗浄した後、10 μ M DIFP および 0.33 M マンニトールを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) ([B-2]) 20 ml に懸濁し、トリブシンインヒビター 20 mg を加えて、0°C、5 分間緩やかに攪拌して細胞を破壊した。この懸濁液を $1000 \times g$ 、5 分間遠心分離し、さらに残渣を同一緩衝液に懸濁、攪拌、遠心分離を 3 回繰り返して上清を集め、細胞抽出液とした。細胞抽出液を $3000 \times g$ 、10 分間遠心分離を行い、沈渣 (P₁) と上清 (S₁) に分離した。P₁ に [B-2] 5 ml を加え懸濁し、遠心分離を行い、洗浄した。洗浄した P₁ は [B-2] 5 ml に懸濁し、葉緑体画分とした。次に、S₁ を $12,000 \times g$ 、10 分間遠心して、沈渣 (P₂) と上

清 (S₂) に分離した。P₂ に [B-2] 5 ml を加え懸濁し、遠心分離により洗浄した。これに [B-2] 5 ml を加え懸濁し、ミトコンドリア画分とした。S₂ を $100,000 \times g$ 、60 分間遠心して、沈渣 (P₃) と上清 (S₃) に分離した。P₃ に [B-2] 5 ml を加え懸濁し、遠心分離により洗浄した。洗浄した P₃ を [B-2] 5 ml に懸濁し、ミクロソーム画分とし、S₃ を細胞可溶画分とした。

単離したオルガネラの純度は、各オルガネラに局在する特定の酵素を標識酵素としてその酵素活性を調べることにより求めた。ミトコンドリアの純度は標識酵素としてグリオキシル酸脱水素酵素⁽¹²⁾、ミクロソームではグルコース-6-ホスファターゼ⁽¹³⁾、細胞可溶画分ではグルタミン酸脱水素酵素⁽¹⁴⁾を用い、それぞれの活性を測定した。一方葉緑体の純度は葉緑素⁽¹⁵⁾を定量して調べた。

4. 酵素活性の測定 酵素活性は L-スレオニンおよび L-アロスレオニンを基質とした場合には既報⁽⁷⁾の拡散法に従って測定した。反応液 1 ml 中に 20 mM の基質、20 μ M ビリドキサールリン酸、0.2 mM メルカプトエタノール、6 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と適量の酵素タンパク質を含み、密閉した丸底フラスコ中で、37°C、30 分間反応した後、-70°C に冷却した。次に枝付試験管に 10 mM セミカルバジド 0.2 ml を取り -70°C に冷却し、このフラスコを連結し、真空にした。次にフラスコのみを 30°C の恒温槽に移し、酵素反応により生成したアセトアルデヒドを試験管内に拡散させ、室温で 10 分間セミカルバジドと反応させセミカルバゾンとした。6 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて 5 ml に調整し、222 nm の吸光度を測定した。

L-セリンを基質とした場合には Ogawa ら⁽¹⁶⁾によって報告されているテトラヒドロ葉酸存在下で酵素反応により生成する 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を定量する方法に従った。反応液 1 ml 中に 20 mM の基質、0.2 mM L-テトラヒドロ葉酸、0.1 mM メルカプトエタノール、1.4 mM NADP⁺、0.5 IU の 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸脱水素酵素、20 μ M ビリドキサールリン酸、6 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) および適量の酵素タンパク質を含み、37°C、30 分間反応し、NADPH の生成による 340 nm の吸光度の増加を測定した。酵素活性は 37°C、1 分間に基質 1 μ mol を分解する酵素量を 1 単位とし、タンパク質 1 mg 中に含まれる単位数を比活性とした。

5. タンパク質の定量 タンパク質量の定量は 280 nm の吸光度の測定とウシ血清アルブミンを標準タンパ

ク質とし、Lowry 法⁽¹⁷⁾により行った。なお基質としての L-アロスレオニン、L-スレオニン、L-セリンは大阪大学蛋白質研究所有機化学部門の御好意により提供していただいた純品を使用した。

実験結果および考察

1. ユーグレナの培養日数とタンパク質量および酵素活性との関係

培養日数ごとにユーグレナ細胞をそれぞれ 250×g, 5 分間遠心分離を行い細胞を集めた。ユーグレナ細胞から夾雑物を取り除くために水 30 ml で攪拌洗浄し、遠心分離を行った。この操作を3回繰り返した。洗浄した培養日数ごとのユーグレナ細胞に [B-1] を加え、超音波処理し、12,000×g, 30 分間遠心分離を行い、各上清液を 25 ml に調整し、タンパク質量、SHMT 活性および比活性を求めた。その結果を Fig. 1 に示した。タンパク質量は5日目まで上昇を続けた。一方、酵素活性は3日目に最大となり、以後急激な減少はみられなかった。酵素の比活性も3日目に最大値を示した。そこで今後の実験には、3日目のユーグレナ細胞を用いた。なお、培養1日目のユーグレナ細胞はほとんど生育せず、細胞がわずかなため酵素活性の測定はできなかった。

2. 酵素の細胞内局在性

培養3日目のユーグレナ細胞を Tokunaga ら⁽¹¹⁾のトリプシン消化法で葉緑体、ミトコンドリア、ミクロソームおよび細胞可溶画分に分画し、各オルガネラの酵素活性を調べ、その結果を Table I に示した。細胞可溶画分、ミトコンドリア、葉緑体の各画分には SHMT 活

Fig. 1. Changes in SHMT Activity and Total Protein of *Euglena gracilis* z during Growth. ■, Total protein; ▨, specific enzyme activity (units/mg protein); □, total enzyme activity (units).

Table II. Distribution Ratio of SHMT, L-Allothreonine Aldolase and L-Threonine Aldolase Activities in Each Organelle

	L-Serine	L-Allo-threonine	L-Threonine
Organelles(total)	100%	100%	100%
Chloroplasts	6.2	5.4	5.7
Mitochondria	21.1	20.7	20.9
Microsomes	0	0	0
Cytosol	72.8	73.8	73.3

性、L-アロスレオニンに対するアルドラーゼ活性のみならず L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性も認めら

Table I. Distribution of SHMT, L-Allothreonine Aldolase and L-Threonine Aldolase Activities in Subcellular Fractions of *Euglena gracilis* z Cells

	Total protein (mg)	Total units			Specific activities(units/mg protein)		
		L-Serine	L-Allo-threonine	L-Threonine	L-Serine	L-Allo-threonine	L-Threonine
Homogenate	475.0	7.2675 (100)	6.2415 (100)	0.2993 (100)	0.0153	0.01314	0.00063
Chloroplasts	52.05	0.3487 (4.8)	0.2811 (4.5)	0.0140 (4.7)	0.0067	0.00540	0.00027
Mitochondria	90.7	1.1882 (16.3)	1.0666 (17.1)	0.0508 (17.0)	0.0131	0.01176	0.00056
Microsomes	45.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0	0
Cytosol	184.0	4.1032 (56.5)	3.7941 (60.9)	0.1785 (59.6)	0.0223	0.02062	0.00097

Figures in parentheses are yields (%) of each enzyme activity in organelles to the total enzyme activity in the cell homogenate.

れた。一方、ミクロソーム画分には SHMT 活性, L-アロスレオニンおよび L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性は認められなかった。また, 酵素の回収率は SHMT 77.6%, L-アロスレオニンアルドラーゼ 82.5%, L-スレオニンアルドラーゼ 81.3% であった。SHMT 活性, L-アロスレオニンアルドラーゼ活性, L-スレオニンアルドラーゼ活性は細胞可溶画分に約 73% と最も多く局在し, ミトコンドリア画分に約 21%, 葉緑体画分には 5~6% であった (Table II)。

これらの結果から, ユーグレナの細胞には L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性が認められ, 高等動物の肝臓⁽⁵⁾および高等植物の発芽体⁽⁵⁾とは異なり, L-スレオニン $\rightleftharpoons$ グリシン+アセトアルデヒド相互変換の代謝経路の存在が予想される。そこでユーグレナ細胞の上清液にピリドキサルリン酸存在下, グリシン, アセトアルデヒドを加え酵素反応を行い, L-スレオニンの生成をペーパークロマトグラフィー法で検討した。また, SHMT が L-スレオニンアルドラーゼ活性を持つか否かについて, 併せてユーグレナの SHMT には細胞可溶画分由来, 葉緑体由来およびミトコンドリア由来の 3 種類のアイソザイムが存在することが考えられることからそれぞれの酵素の分離について, さらに SHMT, L-スレオニンアルドラーゼ両酵素が同一タンパク質であるか否かについて DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィーで検討を行った。

3. ユーグレナ細胞の上清液の L-スレオニンおよび L-アロスレオニン合成に関与するアルドラーゼ活性の検出

反応液 1 ml にグリシン (0.2 M), アセトアルデヒド (0.2 M), ピリドキサルリン酸 (0.2 M), ユーグレナ細胞の粗酵素タンパク質 5 mg, 1 mM メルカプトエタノールおよび 6 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を含み, 37°C, 60 分間反応させた。反応液から 50 μ l をとり, 東洋濾紙 No. 50 を用い, *n*-ブタノール-メチルエチルケトン-15% NH₄OH-水 (5:3:1:1) の展開溶媒でペーパークロマトグラフィー (*R_f* 値は L-スレオニン: 0.18, L-アロスレオニン: 0.12, グリシン: 0.04) を行った。併せて Kieselgel 60 F 245 (E. Merck 社製) を用い, *t*-ブタノール-メチルエチルケトン-水-NH₄OH (40:30:20:10) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィー (*R_f* 値は L-スレオニン: 0.63, L-アロスレオニン: 0.49, グリシン: 0.30) を行った⁽¹⁸⁾。スポットの検出にはニンヒド

リン発色法 (0.2% ニンヒドリン-*n*-ブタノール溶液) を用いた。酵素反応液から L-アロスレオニン, L-スレオニンおよびグリシンを検出し, L-スレオニン, L-アロスレオニンが反応生成物として検出された。すなわち, ユーグレナ細胞の上清液には, L-アロスレオニンに対するアルドラーゼ活性のみならず, L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性が認められ, グリシン+アセトアルデヒド $\rightleftharpoons$ L-スレオニンの相互変換の代謝経路の存在が確認できた。

4. DEAE-セルロースによる酵素の分離

超音波処理して得た上清液を 0.3~0.6 飽和の硫酸アンモニウム塩析を行い, 10,000 $\times$ g, 15 分の遠心分離で沈殿部分を集め, 少量の [B-1] に溶かした。同じ緩衝液 10 l で 4°C, 一昼夜透析し, 10,000 $\times$ g, 15 分間の遠心分離で沈殿を除いた。[B-1] で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.5 $\times$ 30 cm) にのせ, [B-1] で非吸着物質を洗い流した。溶出は [B-1] 500 ml と 20 μ M ピリドキサルリン酸, 10 μ M DIFP, 1 mM メルカプトエタノールおよび 1 mM EDTA を含む 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 500 ml による KH₂PO₄ 濃度勾配により行い,

Fig. 2. Separation of SHMT and Threonine Aldolase Isozymes from *Euglena gracilis* z by DEAE-Cellulose Column Chromatography. The flow rate was 50 ml/hr. —, A_{280} ; ●, SHMT activity (units/ml); ○, L-threonine aldolase activity (units/ml); ----, gradient of potassium phosphate (pH 7.0).

10 ml ずつ分取し、それぞれにつき SHMT および L-スレオニナルドラーゼ活性と 280 nm におけるタンパク質濃度を求めた。その結果を Fig. 2 に示した。SHMT, L-スレオニナルドラーゼ活性は KH_2PO_4 濃度 0.2 M (画分 I) と 0.35 M (画分 II) の 2 つの画分に分かれた。また、SHMT, L-スレオニナルドラーゼは同一部位に溶出され、分離しなかった。これら 2 つの画分がいずれのオルガネラ由来の酵素活性であるかを確かめるためにユーグレナ細胞 160 g を用い、各オルガネラを調製し、それぞれにつき同じように硫酸アンモニウム塩析、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ったところ、細胞可溶画分由来の SHMT, L-スレオニナルドラーゼはいずれも KH_2PO_4 濃度 0.2 M で溶出され、一方、ミトコンドリア由来の SHMT, L-スレオニナルドラーゼはいずれも 0.35 M で溶出された。これらの結果、画分 I は細胞可溶画分由来の SHMT (s-SHMT) および L-スレオニナルドラーゼ、画分 II はミトコンドリア由来の SHMT (m-SHMT) および L-スレオニナルドラーゼであることが明らかとなった。すなわち、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで s-SHMT と m-SHMT を分離することが可能であった。

なお、葉緑体画分の DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィーでは SHMT, L-スレオニナルドラーゼ両酵素活性は溶出されなかった。葉緑体画分の SHMT 含量は全オルガネラの約 5% 前後と非常に少なく、酵素タンパク質が希薄となり変性したのか、また非常に不安定であるためかは今のところ不明である。

今後、s-SHMT, m-SHMT および大量の葉緑体画分を確保し、葉緑体由来の SHMT (c-SHMT) の精製とこれら酵素のユーグレナにおける生理的役割について検討する必要がある。

要 約

(1) 原生動物で光合成能を持つユーグレナ (*Euglena gracilis* z) にセリンヒドロキシメチル転移酵素 (SHMT) および L-スレオニン (および L-アロスレオニン) をアセトアルデヒドとグリシンに分解するアルドラーゼ活性を見出した。

(2) 酵素の細胞内局在性を調べたところ、細胞可溶画分、ミトコンドリア、葉緑体には SHMT 活性、L-アロスレオニンに対するアルドラーゼ活性のみならず L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性も認められた。一

方、ミクロソームには先述の酵素活性は認められなかった。また、m-SHMT と s-SHMT は DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィーで分離可能であることがわかった。

(3) ユーグレナにはグリシン+アセトアルデヒド $\rightleftharpoons$ L-スレオニンの相互変換の代謝経路が存在した。

(4) SHMT は L-アロスレオニンおよび L-スレオニンに対するアルドラーゼ活性を持ち合わせ、SHMT, L-スレオニナルドラーゼおよび L-アロスレオニナルドラーゼは同一酵素タンパク質であることがわかった。

- (1) L. Schirch and T. Gross: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5651 (1968).
- (2) L. Malkin and D. M. Greenberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 117 (1964).
- (3) M. Akhtar and H. A. El-Obeid: *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 791 (1972).
- (4) A. G. Palekar, S. S. Tate and A. Meister: *J. Biol. Chem.*, **248**, 1158 (1973).
- (5) 増田 勉, 尾崎 宏, 田井 晰: 農化, **56**, 549 (1982).
- (6) T. Masuda, M. Sakamoto, I. Nishizaki, H. Hayasi, M. Yamamoto and H. Wada: *J. Biochem.*, **101**, 643 (1987).
- (7) T. Masuda, M. Yoshino, I. Nishizaki, A. Tai and H. Ozaki: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2199 (1980).
- (8) T. Masuda, H. Ozaki and A. Tai: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2763 (1986).
- (9) H. Kumagai, T. Nagata, H. Yoshida and H. Yamada: *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 779 (1972).
- (10) L. E. Koren and S. H. Hutner: *J. Protozool.*, **14**, Supplement 17 (1967).
- (11) M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1439 (1976).
- (12) A. Yokota, S. Haga and S. Kitaoka: *Biochem. J.*, **227**, 211 (1985).
- (13) C. de Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmanns: *Biochem. J.*, **60**, 604 (1955).
- (14) M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka: *J. Protozool.*, **26**, 471 (1979).
- (15) D. I. Arnon: *Plant Physiol.*, **24**, 1 (1949).
- (16) H. Ogawa and M. Fujioka: *J. Biochem.*, **90**, 381 (1981).
- (17) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).