



Short-chain acyl-CoA-dependent production of oxalate from oxaloacetate by *Burkholderia glumae*

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 惠芹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1137

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 284号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	李 惠 芹		
論文題目	Short-chain acyl-CoA-dependent production of oxalate from oxaloacetate by <i>Burkholderia glumae</i> (イネもみ枯細菌病菌における短鎖アシル CoA 依存性蓚酸生成機構)		

博士(医学) 李 惠 芹

論文題目

Short-chain acyl-CoA-dependent production of oxalate from oxaloacetate by *Burkholderia glumae*
(イネもみ枯細菌病菌における短鎖アシルCoA依存性蓚酸生成機構)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

蓚酸は、動物では尿路結石の主要な構成成分であり、主として肝臓において水和型グリオキシル酸から lactate dehydrogenase の作用により生産されると理解されている。蓚酸は植物や或る種の微生物にも高濃度に含まれており、イネもみ枯細菌病（イネの出芽期の腐敗症および出穂開花期のもみ枯症）の病原菌である *B. glumae* のように多量の蓚酸を生産し、これを介して宿主に害作用を及ぼす菌も知られている。自然界における蓚酸生成機構はオキザロ酢酸（OAA）から作られる機構とグリオキシル酸の酸化により作られる機構に大別される。グリオキシル酸からの生成機構は比較的詳しく調べられ、種々のタイプの glyoxylate dehydrogenase および oxidase が報告されている。一方、OAA からの生成機構としては蓚酸と酢酸への加水分解が現在知られている唯一の機構であり、この反応を触媒する oxaloacetase も *Aspergillus niger* から部分精製されているに過ぎない。蓚酸生成の全体像の把握を第一義的目的とし、且つイネもみ枯細菌病への対策の一助になればより幸いと考え、本研究を開始した。

〔材料ならびに方法〕

B. glumae の野性株 1 A と病原性および蓚酸生成能を欠く変異株 1 C は農林水産省農業環境技術研究所松田泉博士から分与していただき、ジャガイモ抽出液を含む半合成培地を用いて振盪培養した。菌体懸濁液を用いた蓚酸の前駆体の検索では、個々の候補化合物を唯一の炭素源とした培養において蓄積する蓚酸を測定した。無細胞抽出液は French pressure cell press による細胞破砕液の 100,000xg 遠心上清として調整した。蓚酸は既報の oxalate oxidase 法 (*J. Biochem.* 98: 1375-1385, 1985) および必要に応じて oxalate decarboxylase / formate dehydrogenase 法により、CoA とアセチル CoA はそれぞれ DTNB 法、DTNB と citrate synthase を組み合わせた方法により、OAA とアセト酢酸は酵素法により 340nm の吸光度変化として、¹⁴C-蓚酸は oxalate oxidase との反応により生じる ¹⁴CO₂ により測定し、¹⁴C-アセト酢酸は ¹⁴C-β-ヒドロキシ酪酸への酵素的変換の後、シリカゲル分配クロマトグラフィーで分離、測定した。

〔結果〕

ジャガイモ半合成培地中で培養すると野性株 *B. glumae*-1 A は多量の蓚酸を生産したが、変異株 1 C ではほとんど蓚酸生成が観察されなかった。1 A の菌体懸濁液を用いた前駆体の検索において TCA サイクル中間体のいずれかから蓚酸が生産されることが示唆され、無細胞抽出液を用いた実験において OAA からの蓚酸生成が観察された。しかし、この抽出液の蓚酸生成活性は透析、ゲルろ過等により完全に消失したので、限外ろ過液中の活性化因子を検索し、アセチル CoA あるいはプロピオニル CoA が反応に必要であることを見出した。更に、OAA からのアセチル CoA 依存性蓚酸生成を指標にして酵素の精製を試みたところ、DE52 クロマトグラフィーで分離される 2 つの酵素（仮に酵素 II、酵素 III と命名）が反応に関与することが明らかになった。酵素 II と酵素 III の混和液あるいは DE52 による分離前の標品 (Toyopearl HW-55 からの溶出液) を用いた実験において、①本酵素は OAA に特異的で、② Co²⁺、Mn²⁺、

Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 等の2価金属を必要とする (Co^{2+} が最も有効、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 等は無効) ことが明かになり、③反応の至適pHは6.8-7.7、④OAA、アセチルCoA、プロピオニルCoA、 Co^{2+} に対する見かけの K_m はそれぞれ約 $180\mu\text{M}$ 、 $65\mu\text{M}$ 、 $95\mu\text{M}$ 、 $17\mu\text{M}$ 、⑤酵素の分子量は約40万と測定された。Stoichiometryの実験において、酵素IIと酵素IIIの存在下では1分子のOAAの消費に伴ない、1分子のアセチルCoAが消費され、各1分子の蔞酸、アセト酢酸、CoAが生成した。酵素IIだけではOAAとアセチルCoAの消費は起るが蔞酸、アセト酢酸、CoAは生産されず、酵素IIによる反応を malate dehydrogenase によるOAAの枯渇により一旦停止させた後酵素IIIを働かせると蔞酸が生成された。放射能実験において $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ OAA由来の ^{14}C は蔞酸とアセト酢酸の両方に1:1の割合で、 $[\text{1}-^{14}\text{C}]$ アセチルCoA由来の ^{14}C はアセト酢酸のみに取り込まれ、 $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ OAAと $[\text{1}-^{14}\text{C}]$ アセチルCoAからの ^{14}C -アセト酢酸の生成量の間にも1:1のstoichiometryが成立した。病原性を欠く変異株1Cでは酵素IIの活性も酵素IIIの活性も検出されなかった。

[討論および結語]

以上の結果に基づいて、*B.glumae*におけるOAAとアセチルCoAからの蔞酸生成機構として、まず酵素IIの作用で両者が連なった6炭素中間体が生じ、次いで酵素IIIによる加水分解で蔞酸とアセト酢酸が生成すると同時にCoAが遊離されるという2段階の反応を提唱した。短鎖アシルCoA基質としてプロピオニルCoAを用いると7炭素中間体を介して蔞酸とプロピオニル酢酸が生じると予想される。最近、反応の過程でカルボン酸の α -プロトンの引き抜きを行う一群の酵素を enolase superfamily と総称することが提唱されている。おそらく enolase superfamily の一員である酵素IIがOAAのメチレン炭素からプロトンを引き抜き、生じたカルブアニオンが短鎖アシルCoA基質のカルボニル炭素を攻撃して中間体が生じると推定される。今回私達が見出した蔞酸生成機構は今まで想像もしなかった新しい機構である。この新しく見いだされた蔞酸生成機構が *B.glumae* だけで働いている特殊な機構なのか、あるいは他のいくつかの生物種でも用いられている普遍的な機構なのかを明かにすることが当面の次の課題である。

論文審査の結果の要旨

蔞酸は、ヒトでは尿路結石の一つの主要な構成成分であり、主として肝臓において水和型グリオキシル酸から乳酸脱水素酵素の作用により生成される。ヒトの高蔞酸血症I型は全身に蔞酸カルシウムの蓄積を来す重篤な疾患であり、グリオキシル酸をグリシンへ変換するセリンピルビン酸トランスアミナーゼ (SPT/AGT) が欠損するため、グリオキシル酸からの蔞酸生成が増加して生ずるものである。現時点で動物では、このグリオキシル酸経路の経路以外に、アスコルビン酸からの非酵素的生成が蔞酸生成の経路として知られている。自然界における蔞酸生成機構はオキザロ酢酸 (OAA) から作られる機構とグリオキシル酸の酸化により作られる機構に大別される。このうち、後者のグリオキシル酸からの生成機構は比較的詳しく調べられ、種々のタイプの glyoxylate 脱水素酵素および酸化酵素が報告されている。一方、OAAからの生成機構としては蔞酸と酢酸への加水分解が現在知られている唯一の機構であり、この反応を触媒する酵素である acetoacetase が真菌類から部分精製されているに過ぎない。

自然界では、蔞酸は植物や或る種の微生物に高濃度に含まれており、食事からの蔞酸摂取も二次性の蔞酸カルシウム結石の成因となっている。本研究はイネもみ枯細菌病 (イネの出芽期の腐敗症および出穂開花期のもみ枯症を起こす) の病原菌である *Burkholderia glumae* (*B.glumae*) のように多量の蔞酸を生産し、これを介して宿主に害作用を及ぼす菌を取り上げ、自然界での蔞酸生成機構の全体像を把握す

ることを目的としたものである。

方法としては、*B.glumae*の野性株1 Aと病原性および蔞酸生成能を欠く変異株1 Cをジャガイモ抽出液を含む半合成培地を用いて振盪培養して用いている。

結果は、ジャガイモ半合成培地中で培養すると野性株*B.glumae*-1 Aは多量の蔞酸を生成したが、変異株の1 Cでは蔞酸生成が観察されなかった。菌懸濁液を用いて、蔞酸生成の前駆体を検索した実験でTCA サイクル中間体のいずれかから蔞酸が生成されることが示唆され、無細胞抽出液の系でOAA から蔞酸が生成すること、およびこの蔞酸生成には抽出液に含まれる低分子物質の共存が必要であることが観察された。この活性化因子を検索し、アセチルCoAあるいはプロピオニルCoAが反応に必要な因子であることを見出した。そこで、OAA からのアセチル CoA 依存性蔞酸生成を指標にして酵素の精製を試みたところ、DE52クロマトグラフィーで分離される2つの酵素（仮に酵素Ⅱ、酵素Ⅲと命名）が反応に関与することが明らかになった。酵素Ⅱと酵素Ⅲを用い、本酵素系の性質を検索し、これまでに知られていない新しい酵素による反応であることを明らかとした。アイソトープ実験において反応機構を解析し、まず酵素Ⅱの作用で両者が連なった6炭素中間体が生じ、次いで酵素Ⅲによる加水分解で蔞酸とアセト酢酸が生成すると同時にCoAが遊離されるという2段階の反応が推定された。この蔞酸生成機構はまったく新しく発見された機構である。この新しく見いだされた蔞酸生成機構が*B.glumae* だけで働いている特殊な生成機構なのか、あるいは他のいくつかの生物種でも用いられている普遍的な生成機構なのかは今後の課題である。

以上の報告に引き続き、委員会では関連する問題として、

- 1) 二つの蔞酸生成経路の自然界での分布状況
- 2) 培養の培地組成と生育との関連
- 3) 酵素Ⅱ、酵素Ⅲの精製過程の問題点
- 4) 用いた蔞酸定量法と反応機序の解析との関係
- 5) 蔞酸定量法の詳細な条件
- 6) 酵素Ⅱと酵素Ⅲの反応上の関連性と複合酵素としての可能性
- 7) 変異株1 Cは二つの酵素を欠くことになるが、二つの酵素の関係について

などの問題について質問を行ったが、申請者の解答は実験に基づいて適切であり、問題点も十分把握していることが理解された。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 菅野 剛史
副査 教授 右藤 文彦 副査 助教授 上里 忠良