

ISSN 0549-3994  
Nihon Mokuzai Gakkai Taikai  
Kenkyū Happyō Yōshishū

第49回  
**日本木材学会大会**  
研究発表要旨集

ABSTRACTS OF THE 49TH ANNUAL MEETING OF  
THE JAPAN WOOD RESEARCH SOCIETY

期日 1999年4月2日(金)～4日(日)

April 2 - 4, 1999

会場 東京農業大学

(〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

Tokyo University of Agriculture

(1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502 Japan)

主催 日本木材学会  
Japan Wood Research Society

(京大木研) ○永井裕子、時松敏明、Erman Munir、服部武文、島田幹夫

## 【緒言】

近年、木材腐朽菌の二次代謝物であるシュウ酸が木材腐朽過程のみならずバイオレメディエーション系においてプロトン源、電子供与体、およびキレート剤として機能することが示され、シュウ酸生合成酵素の酵素・遺伝子レベルでの解明が重要になってきた。当研究室では、時松らが褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) からグリオキシル酸デヒドロゲナーゼを単一標品にまで精製し、本酵素が cytochrome c 依存型の新規な酵素であることを明らかにした。また、本酵素は補欠分子族として FMN とヘムを持つフラボヘムタンパク質であることが判明した<sup>1)</sup>。引き続き本研究では、本酵素のタンパク分解酵素処理により FMN とヘム部分を分離し、酵素分子内における補欠分子族間の電子伝達機構を検討した。さらに、*T. palustris* の有機酸生成とグリオキシル酸デヒドロゲナーゼとの関連性について検討した。

## 【実験】

7 日間液体培地で静置培養した褐色腐朽菌 *T. palustris* の菌糸体を 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.6) で磨砕抽出して得た粗酵素液を硫酸分画 (20~70%)、TSKgel Phenyl TOYOPEARL650 カラム、Protein-Pak DEAE-8HR カラム (HPLC)、HiLord 16/60 Superdex 200pg (HPLC)、Bio-Scale CHT2-1 (HPLC) を用いて単一標品まで精製した。酵素活性は、グリオキシル酸基質の酸化と共役して生ずる cytochrome c の還元反応の速度を測定して求めた。また、*T. palustris* の培養濾液の有機酸を GC-MS により分析し、シュウ酸生成量を市販のシュウ酸定量キットを用いて、酵素的に定量した。さらに、本酵素をパepsin により消化し、ゲル濾過 (HiLord 16/60 Superdex 200pg) により精製した。得たフラクションについて活性測定、シュウ酸生成量の定量および紫外可視吸収スペクトル分析を行い電子伝達機構について検討した。

## 【結果および考察】

褐色腐朽菌 *T. palustris* の培養濾液中に蓄積された主要な有機酸は、シュウ酸であることが GC-MS 分析により明らかになった (最大 2.16 g/l)。また、シュウ酸量の増加に伴うグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ活性の増加が認められた。従って、本酵素が、グリオキシル酸よりも乳酸に対して高い基質特異性を持つが、同菌は、乳酸を生理的基質とするのではなく、グリオキシル酸を基質として利用してシュウ酸の生産を触媒することが示唆された。パepsin 処理された本酵素は、ゲル濾過で 2 本のピークを示し、低分子側のフラクションは 412 nm で強い吸収を持ちヘムが存在を示した。また、他方のフラクションの紫外可視吸収スペクトルは、FMN 標品のスペクトルとほぼ一致しており、FMN の存在が示唆された。FMN を含むフラクション (FMN フラグメント) は、電子受容体である cytochrome c の存在下で、グリオキシル酸からシュウ酸を生成したが、ヘムを含むフラクション (ヘムフラグメント) は、シュウ酸を生成しなかった。また、FMN フラグメントにグリオキシル酸を添加したところ、紫外可視吸収スペクトルは、還元型を示したが、ヘムフラグメントは変化しなかった。さらに、FMN フラグメントにグリオキシル酸とヘムフラグメントを加えたところ、FMN の還元を引き続いて起こるヘムの還元が認められた。よって、本酵素内で起こる補欠分子族間の電子の流れは、Fig.1. に示すようにグリオキシル酸から、FMN、ヘム、cytochrome c の順であることが示唆された。

## 【参考文献】

- 1) Tokimatsu, T., Nagai, Y., Hattori, T. and Shimada, M. (1998) *FEBS Letters*, **437**, 117-121

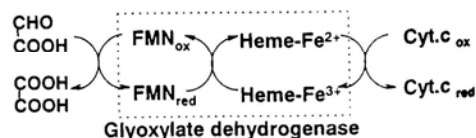


Fig.1. A proposed electron transfer pathway of glyoxylate dehydrogenase during the dehydrogenation of glyoxylate to oxalate in the presence of cytochrome c.