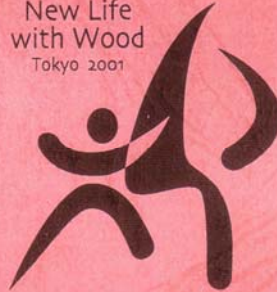


ISSN 0549-3994
Nihon Mokuzai Gakkai Taikai
Kenkyū Happyō Yōshishū

第51回
日本木材学会大会
研究発表要旨集

New Life
with Wood
Tokyo 2001



ABSTRACTS OF THE 51ST ANNUAL MEETING OF
THE JAPAN WOOD RESEARCH SOCIETY

期日

2001年4月2日(月)～4日(水)
April 2 - 4, 2001

会場

東京大学農学部
東京大学安田講堂
東京ドームホテル

Faculty of Agriculture, the University of Tokyo
Auditorium, the University of Tokyo
Tokyo Dome Hotel

主催

日本木材学会
Japan Wood Research Society

R40930

褐色腐朽菌オオウズラタケのイソクエン酸リアーゼの精製と性質

(京大木質研) Erman Munir、尹 最 俊、時松敏明、○服部武文、
島田幹夫

【はじめに】

グルコースを炭素源とする液体培地において、褐色腐朽菌オオウズラタケは、Krebs が提唱した TCA 回路ではなく、“short-cut TCA”回路とグリオキシル酸回路を用いてイソクエン酸を代謝する事が最近明らかになった。すなわち、イソクエン酸がまずイソクエン酸リアーゼ(ICL)によりコハク酸とグリオキシル酸に変換され、このグリオキシル酸はリンゴ酸合成酵素によりリンゴ酸に変換される。グルコースの代謝の最終段階で生ずるシュウ酸の生合成に、このような代謝回路を利用することは、大腸菌、酵母をはじめとするいくつかの微生物とは異なるオオウズラタケの特徴であることを、第 50 回木材学会大会等で提案した¹⁾。今回、オオウズラタケよりグリオキシル酸回路の鍵酵素である ICL を精製しキャラクターゼーションした。担子菌及び木材腐朽菌由来の ICL の精製は初めての報告である。

【実験方法】

培養及び酵素精製 褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) を 1L 容のフラスコ 200ml の培地 (グルコース 2%、ペプトン 0.8%、 K_2HPO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%、Thiamine-HCl 5ppm) 中、33°C、7 日間、静置培養した。菌糸体を DTT1mM、EDTA1mM を含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH7.2)と共にホモジェナイズし、遠心分離後の上清から 20-70%硫酸アンモニウム画分を得た。それを、TSK gel Phenyl-Toyopearl 650M, Protein-Pak DEAE 15HR, HiLoad Superdex 200, Cosmogel QA を用いた、各カラムクロマトグラフィーにより ICL を精製した。精製 ICL をキャラクターゼーションした。

酵素活性測定 酵素反応で生成したグリオキシル酸を、文献記載のフェニルヒドラゾン法により 324nm の吸光度増加から活性を算出した。

【結果及び考察】

各クロマトグラフィーにおける ICL の精製結果を Table1 に示す。最終収率 23%、76 倍の精製段階で、精製酵素は SDS-PAGE により単一のバンドを与えた。TSK-GEL G3000SWXL カラムによる分子量測定、また、SDS-PAGE の結果、精製 ICL の分子量は 186kDa、サブユニット分子量が 60kDa のホモトリマー酵素であると示唆された。イソクエン酸に対する K_m は 1.6mM であった。活性には Mg^{2+} を要求し (K_m 90 μ M)、*p*-メルクリ安息香酸 (1 μ M) により阻害を受けることから、チオール基が活性に重要であることが判明した。また、他の生物起源から精製された ICL との類似点と相違点についても報告する。

Table 1. Purification of isocitrate lyase from *Fomitopsis palustris*.

Steps	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude extract	481.0	197.0	100	0.41	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt. (20-70%)	320.1	184.0	93	0.57	1
TSK gel Phenyl-Toyopearl 650M	33.6	150.4	76	4.48	11
Protein-Pak DEAE 15HR	7.01	89.03	45	12.7	31
HiLoad Superdex 200	2.90	78.63	40	27.1	66
Cosmogel QA	1.46	45.36	23	31.1	76

Crude extract was prepared from one-week-old mycelia collected from 100 culture flasks.

1) Erman Munir et al., J. Wood Sci., 46 (2000 in press).

第51回 日本木材学会大会研究発表要旨集 (2001)