

偏性C1化合物資化性菌 *Methylomonas* sp. Jが生産する glutamine synthetaseの精製と性質

松本 孝

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF GLUTAMINE SYNTHETASE FROM *METHYLOMONAS* SP. J

Takashi Matsumoto

An obligate methylotrophic bacterium, *Methylomonas* sp. J is able to grow on only two C-1 compounds, methanol and methylamine. In our previous study (2), it was suggested that the glutamine synthetase was a preferred enzyme as the nitrogen assimilation in the cells, when nitrate and methanol were the respective nitrogen and carbon sources for this micro-organism. While, when methylamine was only nitrogen and carbon source, it was shown that two enzyme activities, glutamine synthetase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase activities were detected. From these observations, much interest has focused on the regulation of the glutamine synthetase activity in assimilation of nitrogen. The aim of this study was to characterize glutamine synthetase from *Methylomonas* sp. J in different nitrogen sources. So, at first, glutamine synthetase of this micro-organism was purified to homogeneity from the cells grown in synthetic medium of methanol and nitrate as carbon and nitrogen sources, respectively. The purified enzyme had a molecular weight of 580,000 and a subunit size of 55,000. The studies of the effect on the catalytic properties by snake venom phosphodiesterase treatment suggest this enzyme is regulated by adenylation/deadenylation. The release of AMP from the enzyme was also detected by the treatment. Some other properties of the enzyme, such as K_m for each substrate, inhibition by some metabolites and effect of metal-ions were determined and compared to those in the case of other bacterial enzymes.

glutamine synthetase (EC6. 3. 1. 2)は微生物から高等動物に至るまで広く生物に存在し、また非常に多くの調節機構を有し、窒素代謝に深く関わっていることが知られている。*Escherichia coli*からの酵素では酵素量の調節や、フィードバック阻害、アデニル化/脱アデニル化、二価金属イオンによる調節機構が複雑に関与して酵素活性を調節していることが知られている。一方、窒素代謝の最初の段階であるアンモニアからグルタミン酸を作る過程は、微生物ではほとんど二つの代謝経路、glutamine synthetase-glutamate synthase経路かglutamate dehydrogenaseを使う経

路のいずれかで進行するものと考えられる。偏性C-1化合物資化性細菌の *Methylomonas* sp. Jはメタノール及びメチルアミンを唯一の炭素源・エネルギー源として生育する微生物であるが(1)、メチルアミン資化において生成する多量の窒素の行方は非常に興味ある課題である。一部のC-1化合物資化性細菌にはNADP-依存性glutamate dehydrogenase (EC1.4.1.4)が見つからないことから、我々は生育にメチルアミンあるいはアンモニアを窒素源とした場合と硝酸塩のみを窒素源にした場合の *Methylomonas* sp. Jの菌体内に生産される窒素代謝に関係する酵素活性を調

べた。その結果、前者ではglutamine synthetase活性の他、NADP-依存性glutamate dehydrogenaseの活性が増大しているのに対し、後者ではglutamine synthetaseの活性が高いという結果を得た(2)。このことは、一般にglutamine synthetaseがglutamate dehydrogenaseよりも約10倍アンモニアに対する親和性が高く、培養液中にアンモニウムイオンが高濃度の時はglutamate dehydrogenaseによってグルタミン酸を生合成し、アンモニウムイオンが無い低濃度の時はglutamine synthetaseがグルタミン酸の生合成をするという予測を支持する。また検出されたglutamine synthetaseの生合成活性はメチルアミンで培養した場合よりもメタノールで培養した菌体内に強かった。これはメタノールで培養した菌体内に存在するglutamine synthetaseはより活性型であることを示唆している。そこで今回はこの細菌を硝酸塩のみを窒素源としてメタノールで生育したときに生産されるglutamine synthetaseを精製し、いくつかの調節機構を含めた諸性質について検討した。

実験材料と実験方法

Methylomonas sp. Jの培養・実験材料・試薬
Methylomonas sp. Jの培養は既報(1)の炭素源・窒素源をメチルアミン塩酸塩・硫酸アンモニウムからそれぞれ5g/lメタノール、1g/l硝酸ナトリウムとし、モリブデン酸アンモニウムを25.5mg/lモリブデン酸ナトリウム一水和物に変更した以外は、既報と同様の方法で72時間培養し、培養菌体は遠心分離により集菌後酵素の精製に供するまで-30°Cで冷凍保存した。

アデノシン一リン酸(AMP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)はオリエンタル酵母社製、蛇毒のphosphodiesteraseはペーリンガーマンハイム社製、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

グルタミン合成酵素活性の測定

glutamine synthetase[L-glutamate:ammonia ligase(ADP-forming);EC6.3.1.2]の酵素活性は γ -glutamyltransferase assayあるいはbiosynthetic assayのいずれの場合も、 γ -glutamylhydroxamateの生成を比色定量する方法(3)を用いて37°Cで測定し、酵素単位は1分間あたりに生成する生成物 γ -glutamylhydroxamateの μ mol数で表した。またこのbiosynthetic assayは酵素量を必要とするので、酵素のパラメーター測定時の生合成活性は遊離する無機リン酸を比色定量する方法で測定した(4)。酵素溶液のタンパク質濃度はbovine serum albuminを標準タンパク質としてLowry等の方法(5)に従い測定した。

電気泳動

未変性状態でのポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動(PAGE)は精製酵素の純度検定のために、DAVISの方法(6)に従い、室温、分離ゲル中のアクリルアミド濃度5%、ゲル当たり2mAの定電流で行った。また、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下でのポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動(SDS-PAGE)及び試料タンパク質の処理はWEBERとOSBORNの均一系のゲルでの方法(7)に従い、以下の分子量マーカーとともに酵素のサブユニットの分子量を求めるのに使用した。 β -lactoglobulin(14,400)、Trypsin Inhibitor(20,500)、Carbonic Anhydrase(30,000)、Ovalbumin(43,000)、Bovine Serum Albumin(67,000)、Phosphorylase b(95,000)

ゲル濾過法による分子量の推定

未変性状態での酵素の分子量はPharmacia社製ゲル濾過用既製充填カラムSephacryl S-300HR(長さ60cm)を用いてANDREWSの方法(8)で推定した。カラムはあらかじめ0.1M NaClを含む50mM Tris-HCl(pH7.8)で平衡化し、流速は0.5ml/min、

検出は280nm (thyroglobulinの場合は230nm)における各タンパク質の紫外部吸収で、分子量マーカーはthyroglobulin (669,000)、ferritin (dimer 880,000, monomer 440,000)、catalase (232,000)を用いた。

アミノ酸分析

酵素は6N無鉄塩酸に溶解し減圧したアンプル中に封管し、115°Cで21、42、63時間加水分解し、塩酸を除去後、適当な緩衝液に溶解して日立833型アミノ酸自動分析計で分析した。トリプトファンの分析はPeice社製のタンパク質加水分解用3Nメルカプトエタンスルホン酸で減圧下、121°C、21時間加水分解後、3N水酸化ナトリウムで中和し約10倍にミリQ水で希釈したものをアミノ酸分析用試料とした。

酵素のPHOSPHODIESTERASE処理

蛇毒phosphodiesterase処理のglutamine synthetase活性に対する影響を調べる実験では、酵素とそのタンパク質量の約1~3% (w/w)の蛇毒phosphodiesteraseを1mMの塩化マグネシウムを含む50mMトリス・塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中で作用させた。酵素からのAMPの遊離を調べる実験では、精製酵素2~4mgを1mlの1mMの塩化マグネシウムを含む50mMトリス・塩酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、そこに20~40 μ g (10~20 μ l : 0.03~0.06U)の蛇毒phosphodiesteraseを30°Cで3時間作用させた。反応終了後、その20 μ lをTSK-gel G3000SWにかけ分析を行った。

各パラメーターの測定

γ -glutamyltransferase活性あるいは生合成活性における各基質に対するK_m値の測定は、グルタミン、ヒドロキシルアミンに関しては γ -glutamyltransferase assayで、グルタミン酸、アンモニア、ATPに関しては無機リン酸の遊離を測定

するbiosynthetic assayを用い各図の下に記した実験条件で決定した。

結果及び考察

酵素の精製法

凍結保存していた菌体(湿重量約200g)を菌体重量の5倍量の10mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に懸濁後、約250mlづつ氷冷しながら200Wで15分間、超音波細胞破壊装置 (Astrason Model W-385) で細胞破壊し、4°C 14,000 \times gで遠心分離により上澄液と沈殿部分に分けた。沈殿部分は3倍量の10mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に再び懸濁、再度、同じ条件で超音波による細胞破壊を行った。遠心分離後、得られた上澄液は先に得られた上澄液と合わせ、粗抽出液とした。

粗抽出液に硫酸アンモニウムの細かな結晶を45%飽和になるまで溶解しながら徐々に加えた後、攪拌しながら約1時間、4°Cで放置、生じた沈殿を遠心分離で除いた上澄液に、飽和度が95%になるまで更に硫酸アンモニウムの結晶を添加した。この硫酸アンモニウム飽和度45~95%で生ずる沈殿を遠心分離により回収、透析膜を利用して、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に対し十分に透析を行った (AS45-95)。

あらかじめ10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化しておいたDEAE-セルロース (DE-32) カラム (2.0 \times 20.0cm) に透析した試料 (AS45-95) を掛け、続いて平衡化に用いたと同じ緩衝液1000mlで未吸着タンパク質をのぞいた後、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 1000ml中でNaCl濃度勾配を直線的に0~0.5Mまで変化させ、吸着タンパク質を溶出させた。

γ -glutamyltransferase assayで活性の認められる画分を回収し、コロジオンバッグを用いて濃縮、10mMイミダゾール・塩酸緩衝溶液 (pH 7.0) で緩衝化したSepharose CL-6Bカラム (2.5 \times 80cm) でゲル濾過クロマトグラフィーを

行った。γ-glutamyltransferase assayで活性の認められる画分を再度回収し、これに塩化マンガンを終濃度0.1mMになるように添加、別にあらかじめ0.1mMの塩化マンガンを含む10mMイミダゾール・塩酸緩衝液 (pH7.0) で緩衝化しておいたAffigel-blueカラム (1.5×5cm) にかけた。同じ組成の酸緩衝液 (pH7.0) の100mlで未吸着タンパク質をのぞいた後、5mM ATP、0.1mM 塩化マンガンを含む10mMイミダゾール・塩酸緩衝液 (pH7.0) で吸着タンパク質を溶出し、濃縮した後、10mMイミダゾール・塩酸緩衝液 (pH7.0) に対し透析を行った。ここで得られた試料をポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動にかけた結果、均一なタンパク質染色バンドを示した (Fig. 1)。以上の精製過程の典型的な一例をTable 1にまとめた。精製された酵素のγ-glutamyltransferase assayによる比活性は20~30U/mg位で回収率はほぼ16%であった。

精製酵素の分子量およびアミノ酸組成

この精製酵素は0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で緩衝化したSephacryl S-300HRカラムではferritinとthyroglobulin の間に溶出し、その分子量は580,000と推定された (Fig. 2)。また、SDS-PAGEでは、均一な一本のタンパク質染色バンドが検出され、その分子量は55,000~56,000と推定された (Fig. 3)。この結果からは本酵素は分子量的に同一な10~11個のポリペプチドが会合し

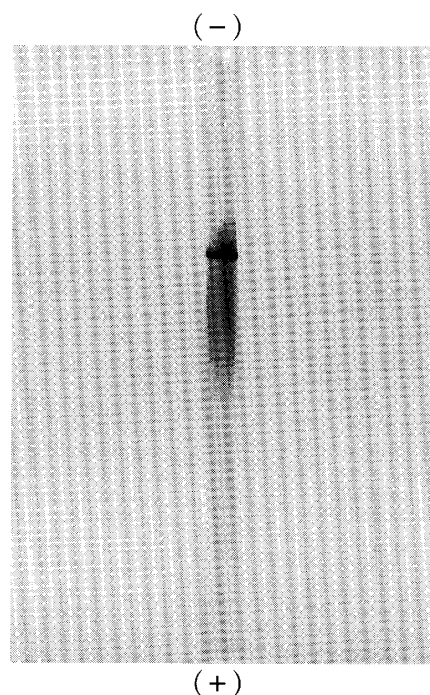


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

Protein sample (30μg) was electrophoresed as described in Methods. After electrophoresis, proteins in the gel was visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue.

ていることを示唆しているが、*Escherichia coli* (9)、*Bacillus cereus* (10)、*Methylococcus capsulatus* (11)、*Methanobacterium ivanovi* (12)、*Hyphomicrobium X* (13) などの微生物から精製されたグルタミン合成酵素の分子量がそれぞれ592,000、600,000、617,000、600,000、638,000でいずれも12量体構造を有することから、本酵素も12量体を形成しているものと思われる。精製酵素のアミノ酸組成はTable 2に示した。分子

Table 1 Purification of glutamine synthetase from methanol-nitrate grown *Methylomonas* sp. J
All purification steps were done as described in the text. Enzyme activity was determined using the γ-glutamyltransferase assay.

	Total protein (mg)	Sp. activity (U/mg)
crude extract	7140	0.37
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	2375	1.09
DE-32 column chromatography	718	1.56
Sepharose CL-6B column chromatography	120	8.17
Affigel blue column chromatography	16.5	25.7

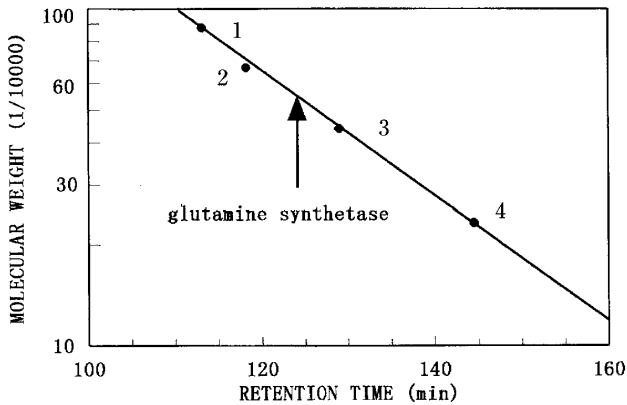


Fig. 2 Estimation of the molecular weight of the glutamine synthetase by Sephacryl S-300HR gel chromatography.

A column of Sephacryl S-300HR was equilibrated with 50mM Tris·HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1 M KCl. Flow rate of the column was 0.5 ml/min and elution volumes of proteins detected by absorbance at 280 nm are plotted against the logarithms of their molecular weights. 1; ferritin dimer, 2; thyroglobin, 3; ferritin monomer, 4; catalase

Table 2 Amino acid composition of glutamine synthetase from *Methylomonas* sp.J

Values of the nearest integer for serine and proline were determined by extrapolation to zero time

Amino acid	Residues per 56000g of GS subunit				
	21hr	42hr	63hr	trp	nearest integer
Asx	52.5	53.6	53.7	59.3	54
Thr	23.0	23.3	23.1	25.3	23
Ser	28.8	26.5	24.5	31.7	31
Glx	44.8	45.8	46.6	43.8	46
Pro	73.5	65.8	59.9	71.8	80
Gly	42.5	43.8	44.0	45.6	44
Ala	44.4	45.8	45.5	47.3	45
Cys	0.8	1.8	1.2	-	1
Val	31.7	34.4	34.8	24.9	34
Met	19.9	18.6	21.7	23.5	20
Ile	24.4	26.1	26.3	18.1	26
Leu	33.8	34.1	34.4	31.8	34
Tyr	13.8	13.9	14.0	14.5	14
Phe	27.8	27.1	27.8	24.8	28
Trp	-	-	-	2.5	3
Lys	30.3	31.1	31.1	27.5	31
His	16.2	16.8	16.9	13.3	17
Arg	17.5	17.5	17.8	15.86	18
				total	549

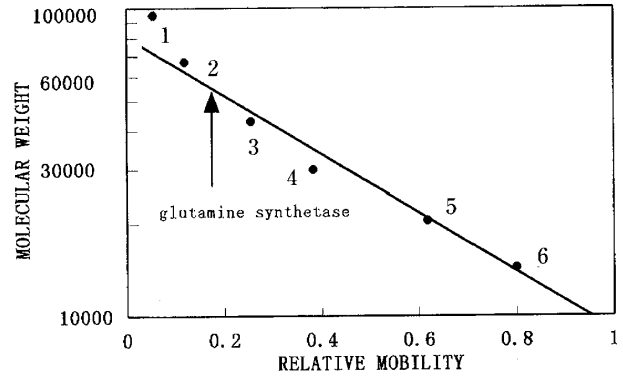


Fig. 3 Estimation of the subunit molecular weight of the glutamine synthetase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme and marker proteins were incubated with 1% SDS containing 1% 2-mercaptoethanol and 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 100 °C for 15min. Electrophoresis was performed at 8mA per gel for 4.5 h using 10 % polyacrylamide gel and 15μg of enzyme. Electrophoretic mobilities of polypeptide are plotted against the logarithms of their molecular weights. 1; phosphorylase b, 2; bovine serum albumin, 3; ovalbumin, 4; carbonic anhydrase, 5; trypsin inhibitor, 6; β-lactoglobulin

量55,000のサブユニット中にcysteineは1個、tryptophanは3個存在しproline含量が多い。酵素の可視紫外吸収スペクトルは紫外部の269nm付近に唯一の吸収極大を示し、280nm付近には極大よりわずかに下がった位置に吸収の肩が観測された。E₁%at 269nm=9.04であった。また、A^{260nm}/A^{290nm}は1.52で、*E. coli*のグルタミン合成酵素で提案されている酵素のアデニル化の程度の計算式(4)にこの値を代入し計算すると、1 molの精製酵素中に9.66 molのAMPが存在するということが示唆された。

酵素のphosphodiesterase処理

紫外領域の酵素の吸収スペクトルから精製酵素はかなりアデニル化がされていると推測されたので、まず、酵素をphosphodiesterase処理する前後のγ-glutamyltransferase assayとbiosynthetic assayでの各酵素活性の比較をした

Table 3 Effect of phosphodiesterase treatment on the rate of glutamine synthetase activity
Reactions were measured spectrophotometrically under assay conditions described in Methods.

treated time(h)	biosynthetic assay(U/mg)		γ -glutamyltransferase assay(U/mg)	
	Mn ²⁺ -dependent	Mg ²⁺ -dependent	Mn ²⁺ -dependent	Mg ²⁺ -dependent
0(untreated)	3.19	1.29	17.3	0.23
2	2.43	2.51	12.7	0.40
48	0.36	4.82	4.65	8.57

(Table 3)。phosphodiesterase処理された酵素は γ -glutamyltransferase assay と biosynthetic assay とともに Mg²⁺ で活性化、Mn²⁺ で阻害を受け、酵素の処理時間が短いと効果が逆転する傾向を示している。これらの結果は精製された glutamine synthetase がもともと アデニル化されており、蛇毒処理により脱アデニル化したという推定を支持している。そこで蛇毒処理前後での紫外部の吸収スペクトル変化を処理前の酵素のスペクトルと処理後のスペクトルの差スペクトルで測定した。蛇毒処理することにより 250nm の吸収が減少し、275nm の吸収がわずかに増加したが、顕著な AMP のスペクトルは検出できなかった。更に別に調製した蛇毒処理前後の酵素を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) であらかじめ平衡化しておいた TSK-gel G3000SW (7.5 × 600mm) にかけたところ、処理前の酵素は単一の溶出ピークを呈したが、処理後の酵素の場合は処理前の酵素の溶出位置以外に小さなピークが検出され、そのピークは AMP の溶出位置と一致した (Fig. 4)。この溶出ピークの面積から酵素 1 モル当たりの AMP のモル数を推定したところ、6.3モルとなり、先の計算で求められた値よりは小さいが、ほぼ精製酵素の 50% がアデニル化されていることが確認された。

基質に対する K_m

精製した酵素を用いた場合の γ -glutamyltrans-

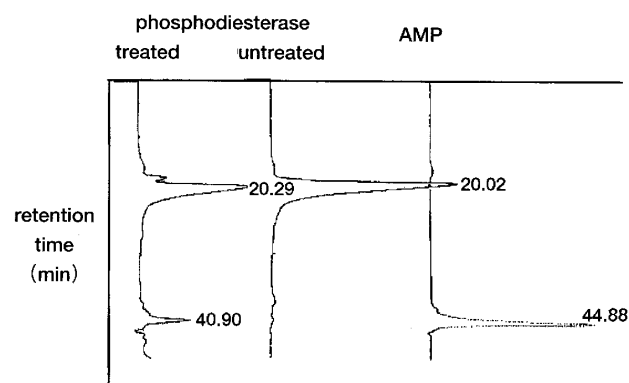


Fig. 4 Separation of low molecular compounds from phosphodiesterase-treated enzyme on TSK-G3000SW gel

The procedure is described under "MATERIALS and METHODS". Protein and nucleotide were measured in terms of absorbance at 260nm.

ferase assayでの基質と酵素活性のLineweaver-Burk plot (二重逆数プロット) は Michaelis-Menten型の反応機構を示し、グルタミンおよびヒドロキシルアミンに対する見かけ上の K_m値はそれぞれ 2.4mM および 1.43mM であった (Fig. 5 a, b)。一般に glutamine synthetase ではアデニル化されていない酵素とされている酵素の biosynthetic assay での見かけの K_m値は、アデニル化されていない酵素の方が小さな値を示し、基質に対する親和性を高めているものと思われる。これに対し、*Methylomonas* sp. J の glutamine synthetase では、蛇毒処理前の酵素はグルタミン酸に対しては 1.43mM であり、2.5mM グルタミン酸濃度を境にしてそれより高濃度では

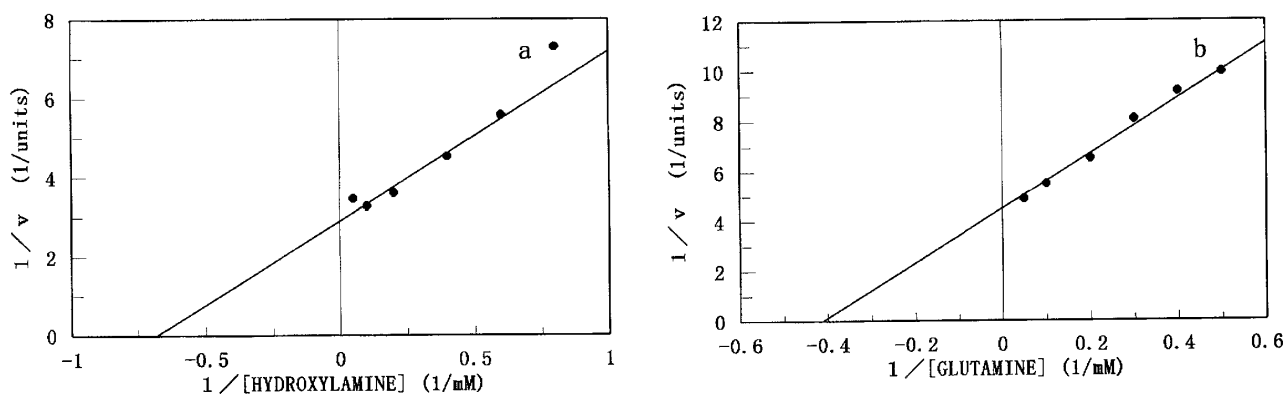


Fig. 5 Kinetics of the γ -glutamyltransferase reaction of glutamine synthetase.

- (a) Double reciprocal values of the velocity of the enzyme reaction plotted against the hydroxylamine concentration at fixed concentration of ADP. Solution of 0.95 ml containing 142 μ mol of imidazole-HCl, pH 7.15, 0.28 μ mol of $MnCl_2$, 26.3 μ mol of K-arsenate, 38 μ mol of ADP, hydroxylamine-HCl indicated in the figure and enzyme solution (10~25 μ g) were preincubated at 37°C for 5 min. After the preincubation, the enzyme reaction was started by the addition of 0.05 ml of 400 mM L-glutamine.
- (b) Double reciprocal values of the velocity of the enzyme reaction plotted against the glutamine concentration at fixed concentrations of ADP and hydroxylamine-HCl. Solution of 0.95ml containing 142 μ mol of imidazole-HCl, pH 7.15, 0.28 μ mol of $MnCl_2$, 26.3 μ mol of K-arsenate, 38 μ mol of ADP, 19 μ mol of hydroxylamine-HCl and enzyme solution (10~25 μ g) were preincubated at 37°C for 5 min. After the preincubation, the enzyme reaction was started by the addition of 0.05 ml of L-glutamine (40~400mM).

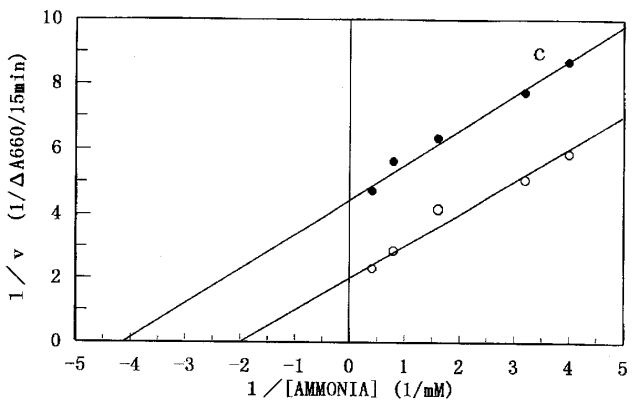
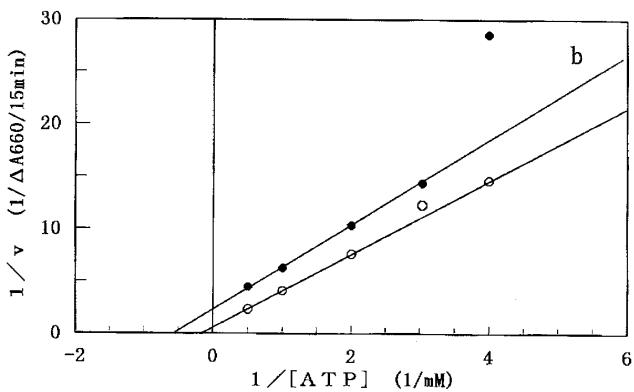
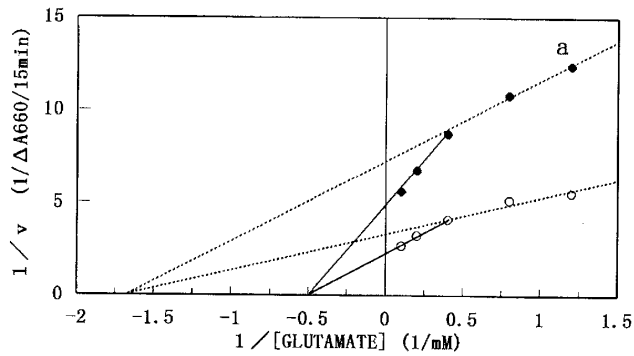
2.0mMに変化するが、蛇毒処理した後の酵素でもその挙動・値は変化なかった (Fig. 6a)。一方 ATP、アンモニアに対しては蛇毒処理前の酵素はそれぞれ1.82mM、0.24mMであったが、蛇毒処理後はATPに対しては5.0mM、アンモニアに対しては0.50mMと2~3倍増大した (Fig. 6b,c)。このことから、酵素の脱アデニル化はグルタ

ミン酸の基質結合部位にはあまり影響を与えず、他の基質の酵素に対する親和性を弱めるという予想外の結果となったが、いずれの基質に対しても最大速度は増大した。また、他の微生物で調べられた各基質に対する K_m 値と比較して、特に大きな差は認められなかった (Table 4)。

Table 4 Comparison of the properties of glutamine synthetase from different micro-organisms

Enzyme source(Ref.)	Apparent K_m values (mM)				
	Biosynthetic assay (Mg^{2+})		γ -Glutamyltransferase assay (Mn^{2+})		
	NH_4^+	Glutamate	ATP	NH_2OH	Glutamine
<i>Escherichia coli</i> (14)	1.8	2.40	0.68	4.0	3.6
<i>Bacillus subtilis</i> (15)	0.4	0.8	0.20	2.3	7.8
<i>Nitrobacter agilis</i> (16)	0.2	6.30	—	2.6	11.6
<i>Methylococcus capsulatus</i> (11)	0.72	2.25	0.60	7.0	5.0
<i>Hyphomicrobium X</i> (13)	0.032	3.10	0.37	7.0	5.0
<i>Methylomonas</i> sp. J*	0.24	1.43-2.0	1.82	1.43	2.4

* present study



(● snake venone phosphodiesterase untreated enzyme, ○snake venone phosphodiesterase treated enzyme)

(b) Double reciprocal values of the velocity of the enzyme reaction plotted against the ATP concentration at fixed concentrations of sodium glutamate and ammonium chloride. Reaction mixture (0.2 ml) contains as follows: imidazole-HCl, pH7.0; 10 μmol, MgCl₂; 10 μmol or MnCl₂; 1 μmol, NH₄Cl; 10 μmol, sodium ATP; (indicated in the figure), sodium L-glutamate; 20 μmol and enzyme solution; 250 pg. (● snake venone phosphodiesterase untreated enzyme, ○snake venone phosphodiesterase treated enzyme)

(c) Double reciprocal values of the velocity of the enzyme reaction plotted against the ammonium chloride concentration at fixed concentrations of ATP and glutamate. Reaction mixture (0.2 ml) contains as follows: imidazole-HCl, pH7.0; 10 μmol, MgCl₂; 10 μmol or MnCl₂; 1 μmol, NH₄Cl; (indicated in the figure), sodium ATP; 1.5 μmol, sodium L-glutamate; 20 μmol and enzyme solution; 250 pg. (● snake venone phosphodiesterase untreated enzyme, ○snake venone phosphodiesterase treated enzyme)

グルタミン代謝産物及び金属イオンの影響

一般にglutamine synthetaseはグルタミンの代謝産物や二価金属イオンの存在によっても酵素活性が調節されることが知られている。そこで蛇毒処理および未処理の酵素を用いてそれらの酵素活性に対する影響をbiosynthetic assayで検討した (Table 5)。代謝産物の反応混液中での終濃度はいずれも1mMの時の結果であるが、Mn²⁺存在下で蛇毒処理前の酵素は顕著に阻害されるのに対し蛇毒処理した酵素ではその効果がほとんど無くなり、一方、Mg²⁺存在下では、蛇毒処理前の酵素はほとんど影響ないか或いはむしろ活性化に作用しているのに対し、蛇毒処理した酵素では僅かに阻害傾向になることが示唆された。

蛇毒処理前後で酵素の比活性が変化することはTable 3でも示したが、今回使用した蛇毒未処理酵素のbiosynthetic assayによる比活性はMn²⁺存在下で5.82U/mg、Mg²⁺存在下で0.87U/mg、処理酵素での比活性は同様にMn²⁺存在下で

Fig. 6 Kinetics of the biosynthetic reaction of glutamine synthetase and effect of phosphodiesterase treatment.

(a) Double reciprocal values of the velocity of the enzyme reaction plotted against the glutamate concentration at fixed concentrations of ATP and ammonium chloride. Reaction mixture (0.2 ml) contains as follows: imidazole-HCl, pH7.0; 10 μmol, MgCl₂; 10 μmol or MnCl₂; 1 μmol, NH₄Cl; 10 μmol, sodium ATP; 1.5 μmol, sodium L-glutamate; (indicated in the figure) and enzyme solution; 250 pg.

Table 5 Effect of glutamine metabolite on the activity of glutamine synthetase

Reactions were measured spectrophotometrically under assay conditions described in Methods. The results are expressed in % of the activities in no metabolite.

	phosphodiesterase-untreated enzyme		phosphodiesterase-treated enzyme	
	Mn ²⁺ %	Mg ²⁺ %	Mn ²⁺ %	Mg ²⁺ %
none	100	100	100	100
glycine	17	103	108	96
tryptophan	53	139	100	82
alanine	44	112	78	84
histidine	56	93	94	90
glucosamine 6-phosphate	57	116	100	96
carbamoyl- phosphate	54	138	128	91

0.36U/mg、Mg²⁺存在下で5.36U/mgであった。このことはアデニル化された酵素はMn²⁺で活性化を受け、この場合は代謝の最終産物によりフィードバック阻害を受けるが、脱アデニル化を受けた酵素はMn²⁺ではほとんど活性が無くなり、Mg²⁺で活性化が起きることを示唆している。

以上の結果をまとめると *Methylomonas* sp. J の glutamine synthetase はアデニル化/脱アデニル化で調節される、一般に多くの原核生物で見られるタイプ I 型の glutamine synthetase を持ち、*Escherichia coli* と同様に複雑な調節機構を有することが明らかになった。しかしメタノール・硝酸塩を炭素源・窒素源として生育した *Methylomonas* sp. J の glutamine synthetase の約半分がアデニル化されている理由および脱アデニル化でアンモニアに対する親和性減少の理由を考察するには、高濃度のアンモニウムイオンあるいはメチルアミンが存在するときの同菌体からの酵素がどのような性質を有するかを更に検討する必要があるものと思われる。

参考文献

- (1) MATSUMOTO, T. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 522, 291-302
- (2) 都築、有井、松本 (1988) 昭和女子大学 生活科学紀要 No599, 109-111
- (3) BENDER, R. A., JANSSEN, K. A., RESNICK, A. D., BLUMENBERG, M., FOOR, F. & MAGASANIK, B. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 1001-1009
- (4) SHAPIRO B. M. and STADTMAN E. R. (1970) *Methods in Enzymol.* 18A 910-922
- (5) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- (6) DAVIS, B. J. (1964) *Annals N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- (7) WEBER, K. & OSBORN, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- (8) ANDREWS, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 222-233
- (9) SHAPIRO, B. M. & STADTMAN, E. R. (1970) in "Methods in Enzymology 17A" eds. by Tabor, H. and Tabor C. W. : Academic Press, 910-922
- (10) MATSUOKA, K., KUREBAYASHI, T. & KIMURA, K. (1985) *J. Biochem.* 98, 1211-1219

- (11) MURRELL, J. C. & DALTON, H. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129, 1187-1196
- (12) BHATNAGAR, L., ZEIKUS, J. G. & AUBERT, J.-P. (1986) *J. Bacteriol.* 165, 638-643
- (13) DUCHARS, M. G. & ATTWOOD, M. M. (1991) *J. Gen. Microbiol.* 137, 1345-1354
- (14) WOOLFOLK, C. A., SHAPIRO, B. M. & STADTMAN, E. R. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 177-192
- (15) DEUEL, T. F. & STADTMAN, E. R., (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5206-5213
- (16) KUMAR, S. & NICHOLAS, D. J. D. (1984) *J. Gen. Microbiol.*, 130, 959-966