

〔研究ノート〕

Bifidobacterium bifidum の乳酸脱水素酵素

露木あかね・飯野久和・松本 孝

Lactate Dehydrogenase of *Bifidobacterium bifidum*

Akane TSUYUKI, Hisakazu IINO and Takashi MATSUMOTO

Lactate dehydrogenases (LDHs) (EC 1.1.1.27) from some bacteria are allosteric enzymes with sigmoidal kinetics for pyruvate, unlike non-allosteric vertebrate LDHs^{1)~7)}. Bifidobacterial LDHs are also allosterically activated by pyruvate (homotropic activation) and by fructose 1,6-bisphosphate (FDP) (heterotropic activation)⁸⁾. These enzymes are virtually unidirectional, catalysing efficiency only the reduction of pyruvate and were extensively studied for their allosteric effectors. However, little is known about the oxidation reaction of lactate to pyruvate with NAD⁺ (reversible reaction).

In this work, we have demonstrated that FDP-activated NAD⁺-dependent LDH from *Bifidobacterium bifidum* DSM20456 was purified to homogeneity as judged by sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis. The purification consisted of ammonium sulfate precipitation of the cytoplasmic fraction, DE-32 chromatography, Sephacryl S-200 gel permeation, Affi-Gel Blue and Protein Pak G-DEAE chromatographies. Only when FDP existed, the oxidation reaction of the lactic acid with this purified enzyme took place as well as the case of the reduction reaction of the pyruvic acid. The pH optima of the activities and kinetic properties of the enzyme were studied.

From these results, we conclude that LDH of *Bifidobacterium bifidum* DSM20456 was dependent on FDP for the reversible reactions but that apparent *K_m* value of this enzyme for lactate was about 2,000 times as large as that for pyruvate.

Key words: *bifidobacteria* (ビフィドバクテリア), *lactate dehydrogenase* (乳酸脱水素酵素), *oxidation of lactate* (乳酸の酸化)

序

乳酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.27, LDH) は脊椎動物から微生物に至るまで、非常に広範な生物に分布する酵素であるが、脊椎動物など高等動物に存在する LDH はピルビン酸と NADH から L-乳酸と NAD⁺ への変換反応を可逆的に触媒する。一方、*Lactobacillus arabinosus* や他の微生物では NAD⁺ 依存性の D-および L-乳酸脱水素酵素の他、NAD⁺ 非依存性の D-および L-乳酸脱水素酵素の存在が報告されている¹⁾。また、*Bifidobacterium longum* を

はじめ多くの乳酸菌の LDH は、脊椎動物の LDH とは異なり、fructose 1,6-bisphosphate (FDP) により極度に活性化されるアロステリック酵素で、ピルビン酸の還元にのみ効果的に触媒作用を発揮する酵素であることが報告されている^{2)~8)}。これらの酵素については、基質であるピルビン酸濃度の homotropic activation や FDP による heterotropic activation に関して多くの研究がなされているが、逆反応である乳酸からピルビン酸の生成に関する研究は少ない。本報では、この種の酵素が逆反応を全く起こさないのか、あるいは起こしにくい

のかを明らかにする目的で、*Bifidobacterium bifidum* から LDH を精製し、その酵素活性に及ぼす諸性質を検討した。

実験方法

試薬

LDH の酵素活性測定に使用した試薬は、ピルビン酸ナトリウムと乳酸リチウムは Sigma 社製、フルクトース 1,6-二リン酸は Fluka 社製、NAD⁺、NADH はオリエンタル酵母社製を使用した。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

供試菌株と培養法

Bifidobacterium bifidum DSM20456 (以下 *B. bifidum* DSM20456 と略す) の菌株はカゴメ株式会社から提供を受けた。

供試菌株の前培養には馬無菌脱繊維血 (日本生物材料センター製) 添加 BL 寒天培地 (日水製薬株式会社製)、前培養および大量培養には GAM ブイヨン (日水製薬株式会社製) を使用した。

BL 寒天培地を蒸留水で規定通りに溶解し、オートクレーブで滅菌 (115°C, 20 分) した。BL 寒天培地が 55°C に下がったら、体積の 5% 分の馬無菌脱繊維血を加えよく混ぜ、*Bifidobacterium* 鑑別用培地を調製した。この培地に菌株の懸濁液を白金耳で画線塗末し、37°C, 48 時間、ガスパック法 (BBL 製ガスパック) にて嫌気培養を行った。

つぎに GAM ブイヨン液体培地を調製し直ちに前述の BL 寒天培地に生育した菌を接種し、同様にガスパック法で嫌気的条件下で培養した。培養で得られた菌懸濁液は、高速冷却遠心分離器 (HITACHI HIMAC CR 20B2) を用い、遠心分離 (4,200 g, 20 min, 4°C) した。得られた菌体は酵素精製開始時まで -20°C で凍結保存した。

酵素活性の測定方法

(1) ピルビン酸-NADH 系

酵素反応は反応混液の終濃度が 80 mM 酢酸緩衝液 pH 5.0, 0.17 mM NADH, 3 mM FDP, 1 mM MnCl₂, 0.7 mM ピルビン酸ナトリウム, 酵素液,

蒸留水を合わせて全量 1 ml とし、最後にピルビン酸ナトリウムを添加することで反応を開始させ、直ちに NADH の 340 nm の吸光度の減少を経時的に 25°C で測定した。

(2) 乳酸-NAD⁺系

酵素反応は反応混液の終濃度が 80 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.4, 2 mM NAD⁺, 3 mM FDP, 1 mM MnCl₂, 酵素液, 蒸留水, 乳酸リチウムを合わせて全量 1 ml とした。乳酸リチウムの濃度は随時調節した。基質である乳酸リチウムは最後に加えて反応を開始させ、直ちに 340 nm における 1 分間当たりの吸光度増加を 25°C で測定した。

酵素活性は NAD⁺あるいは NADH の 1 分間当たりの増加あるいは減少量が 1 μmol のときの酵素量を 1 unit (1 IU) として示した。また、酵素タンパク質量は牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法⁹⁾を用いて算出した。

電気泳動法

ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびドデシル硫酸ナトリウムを含まないポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE) は中村の方法¹⁰⁾に従って実施した。タンパク質の染色はクーマシーブルー R250 を、LDH 活性の染色は NADH-ピルビン酸-フェナジメトサルフェート-ニトロブルーテトラゾリウム系によるネガティブ染色を、定法に従い行った。

結果

酵素の精製

(1) 粗抽出液の調製

以下の操作は基本的に 4°C あるいは氷冷下で行った。自然解凍した *B. bifidum* DSM20456 の菌体 21.1 g (湿重量) を、湿菌体重量の 5 倍の 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 に懸濁し、ソニケータ超音波細胞破壊機 (Heat Systems-Ultrasonics 社製 W-385) で超音波細胞破碎 (出力 380 W, 15 min) した。破碎後、菌懸濁液は遠心分離 (4,200 g, 20 min, 4°C) し、上澄液を回収した。沈殿物はもう一度湿菌体重量の 5 倍の 10 mM イミダゾール-塩酸

緩衝液 pH 7.0 に懸濁して上記と同様の操作を行った後、遠心分離し再度上澄液を回収し先に回収したものと合わせ粗抽出液とした。

(2) 硫酸分画

粗抽出液に結晶硫酸アンモニウムを加え 30% 飽和から 70% 飽和で塩析される成分を遠心分離 (17,000 g, 20 min, 4°C) で回収した。回収された沈殿物を 1 mM FDP, 4 mM $MnCl_2$ を含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 に対し透析した。

(3) DE32-カラムクロマトグラフィー

10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 で緩衝化済みの DE32 カラム (3×29 cm) (Whatman 社製) に透析済み酵素液を吸着させ、10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 中で、塩化ナトリウム濃度が 0 から 0.4 M の直線的濃度勾配を作成し、吸着しているタンパク質を溶出した。LDH 活性 (Pyruvate-NADH 系) とタンパク量 (280 nm の吸収) を測定し、LDH 活性のあるフラクションを集め、硫酸アンモニウムを 90% 飽和になるように加えて塩析させ、得られた沈殿物を 1 mM FDP, 4 mM $MnCl_2$ を含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 で透析した。

(4) ゲル濾過

透析済み酵素液約 10 ml を、あらかじめ 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 で緩衝化した Sephacryl S-200 (2.5×64 cm) (Amersham 社製) のゲルに乗せ、10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 でゲル濾過した。分画液の LDH 活性があるフラクションを集めた。

(5) アフィニティクロマトグラフィー

1 mM FDP, 4 mM $MnCl_2$ を含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 で緩衝化した Affi-Gel Blue (BIO-RAD 社製) カラム (2×6.5 cm) にゲル濾過で得られた試料溶液を流し、10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 をカラムボリュームの 2 倍量流した。続いて 0.1 M から 0.6 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 を、塩化ナトリウム濃度が 0.1 M ずつ上昇するようステップワイズ法でカラムボリュームの約 2 倍量ずつ流した。LDH 活性が僅かに出始めた 0.6 M 塩化ナ

トリウムを含む緩衝液 20 ml で洗浄後、更に NADH を 3 mM の濃度になるように加えた同溶液を 40 ml 流し、吸着している LDH を溶出した。酵素活性の高い部分を回収し 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.0 で 6 倍に希釈した。

(6) Protein Pak G-DEAE 高速液体クロマトグラフィー

この希釈した活性あるフラクションを 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 で緩衝化した Protein Pak G-DEAE (0.82×7.5 cm) (Waters 社製) に吸着させ、同緩衝液中で塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.5 M まで直線的濃度勾配で上昇させ、酵素活性のある画分を溶出、回収した。

以上の精製操作の要約を Table 1 に、また最終酵素の SDS-PAGE および Native-PAGE を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。Fig. 1 に示す通り SDS-PAGE では、メジャーな 1 本の染色バンドの上部に、極薄く染色される 2 本のバンドが検出されたが、Native-PAGE ではタンパク染色バンドと活性染色バンドが一致していたことから、*B. bifidum* DSM20456 の LDH はほぼ均一に精製されたものと判断した。精製酵素の比活性は 318 IU/mg で、182 倍に精製された。

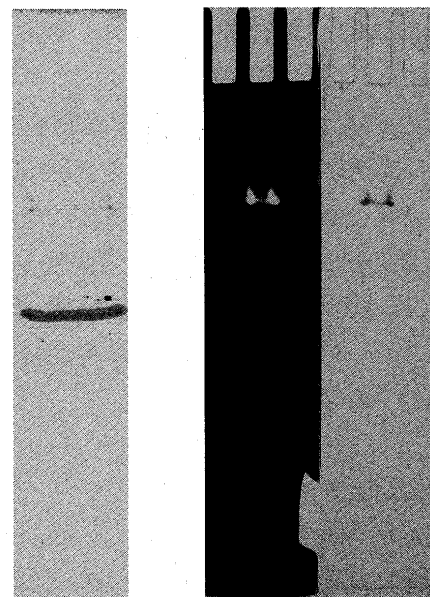


Fig. 1 SDS-PAGE

Fig. 2 Native-PAGE

Table 1 *B. bifidum* DSM20456 LDH の精製表

	全タンパク量(mg)	全活性 (IU)	比活性 (IU/mg)	回収率 (%)
粗抽出液	1450	2529	1.744	100
硫酸分画	1046	1083	1.035	42.8
DE32	279.1	1296	4.643	51.3
Sephacryl S-200	128	663	5.18	26.2
Affi-Gel Blue	4.59	355	77.2	14.0
Protein Pak G-DEAE	0.333	106	318	4.19

乳酸-NAD⁺系における活性測定

Bifidobacteria の LDH に関しては、ピルビン酸から乳酸への還元反応が認められ、その逆反応はほとんど起きないと言われている。そこで精製された *B. bifidum* DSM20456 の LDH を用いて乳酸からピルビン酸への酸化反応を測定した。乳酸-NAD⁺系において、エフェクターである FDP を加えなかった場合は LDH 活性は全く見られなかったが、ピルビン酸-NADH 系と同様にエフェクター (終濃度 FDP 3 mM, MnCl₂ 1 mM) を加えた場合、LDH 活性を検出することができた。この酵素の比活性は基質の乳酸濃度に依存し、Table 2 の通りであった。測定方法は実験方法に示した通りである。

よってピルビン酸-NADH 系だけでなく、乳酸-NAD⁺系の LDH 活性測定においても、FDP は活性化剤として働くと考えられる。しかし、Table 1 の LDH 精製表に示したピルビン酸-NADH 系の比活性に比較し、その比活性は極めて低く生理的には作用していないものと考えられる。また、ピルビン酸-NADH 系では FDP が allosteric activator である

Table 2 乳酸-NAD⁺系における LDH 活性

乳酸濃度 (M)	活性 (IU/ml)	比活性 (IU/mg)
0.05	0.13	0.83
0.1	0.28	1.78
0.2	0.40	2.51
0.3	0.54	3.42
0.4	0.68	4.28
1	0.69	4.32

のに対し、乳酸-NAD⁺系ではどのようなタンパク構造化学的メカニズムで活性発現に関与しているのかは興味ある課題である。

活性測定時における最適 pH

ピルビン酸-NADH 系と乳酸-NAD⁺系での LDH 活性測定時に用いる緩衝液の種類と pH の関係は Fig. 3 の通りであった。

Fig. 3 より、ピルビン酸-NADH 系では酢酸緩衝液 pH 5.0 が最も活性が高いことからやや酸性側に最適 pH があり、乳酸-NAD⁺系ではトリス-塩酸緩衝液 pH 7.4 が最も高いことから僅かにアルカリ性側に最適 pH があるものと考えられ、水素イオン濃度が化学平衡に影響する一般的な LDH の性質と同様、*B. bifidum* DSM20456 の LDH 活性は pH に対して類似した性質を示した。

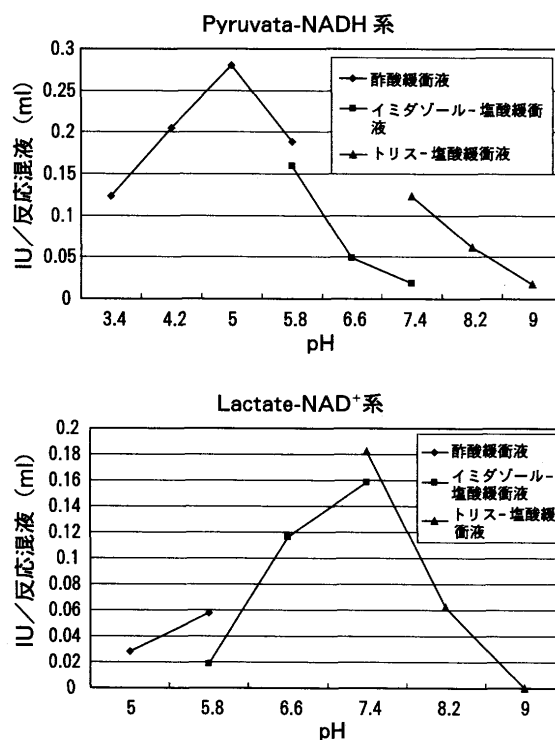


Fig. 3 活性測定時における pH の影響

K_m 値

ピルビン酸-NADH 系、乳酸-NAD⁺系の見かけ上の K_m 値測定結果は Fig. 4 の通りであった。

結果より、ピルビン酸-NADH 系におけるピルビン酸に対する K_m 値は、およそ 0.2 mM であり、

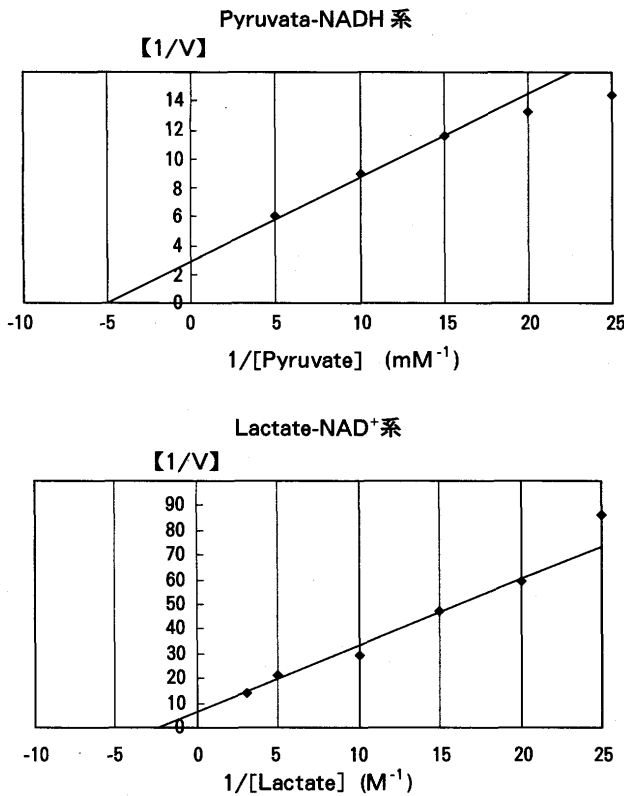


Fig. 4 K_m 値

一方、乳酸-NAD⁺における乳酸に対する K_m 値は、測定結果より 0.4 M であると考えられる。このことから *B. bifidum* DSM20456 の LDH の乳酸-NAD⁺系における活性測定が困難であること、また活性が極めて低いことの大きな原因の一つとして、乳酸の基質親和性がピルビン酸と比較して極めて低いということが挙げられると推察される。

考 察

微生物由来の LDH の中には、脊椎動物由来の LDH と異なり、乳酸の生成反応に FDP を活性化剤として必要とし、基質であるピルビン酸がアロステリック効果を発揮するものがある。FDP は糖代謝における解糖系の重要な中間体で、解糖系の最終段階であるピルビン酸を乳酸に変換する反応を促進することから、allosteric activator として機能していると考えられる。また、これらの酵素はその触媒反応がピルビン酸から乳酸への酸化反応に極端に偏っており、その逆反応は起きにくいとされている。そのため、これらの酵素については、基質であるピ

ルビン酸濃度の homotropic activation や FDP による heterotropic activation, 脊椎動物の酵素との比較に関して多くの研究がなされているが、逆反応である乳酸からピルビン酸の生成に関する研究は少ない。そこで我々は、この種の酵素が逆反応を全く起こさないのか、あるいは起こしにくいのかを明らかにすることに焦点を絞って実験をした結果、条件により逆反応も起こりうることを明らかにした。一方、*Lactobacillus casei* の LDH は FDP を絶対要求する allosteric 酵素だが *Lactobacillus pentosus* の LDH は non-allosteric 酵素で、その違いは、酵素への FDP 結合部位のアミノ酸配列が前者が His188 で後者が Asp188 であることに起因することが示唆されている¹¹⁾。従って今回の *B. bifidum* DSM20456 の LDH において、FDP を添加したときのみその逆反応が観測できたことは、FDP 結合部位への FDP の結合が酵素の高次構造の変化を誘起することにより、feed-forward activation 以外に、乳酸からピルビン酸への酸化反応を可能にした可能性が考えられる。しかし、本実験でえられた乳酸に対する見かけ上の K_m 値は生理的条件下では起きにくい濃度であるので、更なる反応条件の検討を要する。

要 旨

Bifidobacterium bifidum DSM20456 から NAD⁺ 依存性の乳酸脱水素酵素 (LDH) を電気泳動的にほぼ均一な状態に精製した。この酵素はピルビン酸からの乳酸生成のみならず、乳酸からピルビン酸への酸化反応においても、その活性発現にフルクトース 1,6-二リン酸を要求したが、それぞれの反応における酵素の基質に対する親和性は、ピルビン酸の方が乳酸よりも 2,000 倍近く高かった。

引用文献

- (1) Snoswell A. M. (1966) *Methods in Enzymol.* 9, 321-327, Edited by Willis A. Wood
- (2) Iwata, S., Kamata, K., Minowa, T., Ohta, T. (1994) *Nat. Struct. Biol.* 1, 176-185
- (3) Fushinobu, S., Kamata, K., Iwata, S., Sakai, H.,

- Ohta, T., Matsuzawa, H. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 25611-25616
- (4) Fushinobu, S., Ohta, T., Matsuzawa, H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2971-2976
- (5) Hesel, R., Mayr, U., Stetter K. O., Kandler, O. (1977) *Arch. Microbiol.* 112, 81-93
- (6) Holland, R., Ritchard, G. G. (1975) *J. Bacteriol.* 121, 777-784
- (7) Garvie, E. I. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 106-139
- (8) Iwata, S., Minowa, T., Sakai, H., Ohta, T. (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53, 3365-3366
- (9) Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- (10) 中村和行 (2001) 日本生化学会編: 基礎生化学実験法 3, 84-106
- (11) Taguchi H., Ohta T. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 451-458

(つゆき あかね 平成 17 年度生活科学科卒業生)
(いいの ひさかず 生活機構研究科)
(まつもと たかし 生活機構研究科)