

9329 脱水素酵素の構造と機能に対する塩の作用機構

助成研究者:大島 敏久(京都教育大学 教育学部)

近年、通常の生物が生育できないような特殊な環境でも生育する特殊環境微生物が多数分離されてきている。われわれは高温環境の特殊環境に生育する海洋性の細菌の酵素、特に脱水素酵素を対象にして、その構造と機能面の特徴を明らかにするとともに、酵素に対する塩の作用機構の解明を進めている。特に本研究では、海岸砂から新規な好熱好塩性菌を分離し、そのロイシン脱水素酵素(LeuDh)を対象として塩の作用機構を明らかにした。また、海底の熱水噴出孔から分離され、100℃でも生育する超好熱始原菌のNADPH脱水素酵素(NADPHDH)の特徴を解明した。

まず、耐熱性と安定性が高く、塩の影響を解析するために好都合と予想される脱水素酵素を得る目的で、日本海の海岸から採取した砂から数株の好熱好塩性菌を分離した。そのなかで、15%NaClを含む培地で50℃の温度条件で生育できる好熱好塩性菌1株(TDSN 9株)について、その同定を行った。本菌が好氣的に生育し、グラム染色陽性、孢子形成能を示すことなどと、他の種々の生化学的な検査の結果から、*Bacillus licheniformis*に近縁の細菌であることが判明した。しかし、65℃でも生育できる(*B. licheniformis*の生育最高温度:55℃)こと、GC含量が48.4 moles % (*B. licheniformis*:43-47 moles %)であることなどの点で既知の*B. licheniformis*とは異なることから、新しい*Bacillus*属細菌(*Bacillus* sp. TSN 9)であることが分かった。この好熱好塩性*Bacillus* sp. TSN 9のLeuDhの生産性を増強するために、また酵素の構造と機能、塩の作用機構などを分子レベルで明らかにするために、その構造遺伝子を大腸菌(*E. coli* JM 109)でクローン化した。高いLeuDh生産能を持つクローン株*E. coli* pKULD 66-51を得ることに成功し、それからLeuDhを簡便、迅速に均一に精製した。本酵素は分子質量360 kDaの同一なサブユニット(分子質量:43 kDa)からなる8量体構造を有した。本酵素は高濃度のNaClの添加で耐熱性、保存性、活性が大幅に増強される特徴を示した。また、NaClの添加により酵素と基質の親和性の増強が認められ、他の微生物由来の本酵素とは異なるNaClの作用が認められた。現在、ハイブリッドプラスミドpKU-LD 66-51(4.7 kb)の本酵素遺伝子の塩基配列の分析から、酵素の全一次構造の解明を進めている。

次に、海洋性の超好熱始原菌*P. furiosus* DSM 3638に高い活性が存在するNADPHDHをほぼ均一に精製し、酵素化学的特徴を明らかにした。本酵素の分子質量は300 kDaで、6量体構造(サブユニットの分子質量:約50 kDa)を有していた。本酵素の特徴として、80℃でも熱変性せず、極めて高い耐熱性を示すことと、NaClの添加により耐熱性が顕著に増強されることが分かった。また、本酵素の蛍光スペクトルの分析から本酵素がPQQ、またはその類縁の誘導体を補酵素として含む新規なキノプロテインであることが推定された。現在、この酵素についても、構造と機能の相関について解明をさらに進めている。

9329 脱水素酵素の構造と機能に対する塩の作用機構

助成研究者:大島 敏久(京都教育大学 教育学部)

1 研究目的

われわれは特殊環境下に生育する好熱菌と好塩菌のアミノ酸脱水素酵素など、脱水素酵素を対象にして構造と機能の相関の解明と、バイオセンサーやバイオリクターへの応用研究などを行っている^{1,2)}。好熱菌由来の酵素は安定性が高く、生化学、分子生物学、生物工学などにおける基礎及び応用研究において高い有用性が期待できる。高度好塩菌の酵素は、高濃度の塩の存在下で高い安定性が期待でき、酵素の基礎及び応用研究で注目されているが、低イオン強度下では不安定で精製が容易でない場合が多く、研究の進展は相対的に遅れている。本研究では、耐熱性で安定性が高く、かつ好塩性を示す酵素を得る目的で、これまで報告のされていない好熱好塩菌の海岸砂からの分離を試みた。得られた好熱好塩菌の酵素、特にロイシン脱水素酵素(LeuDII, EC 1.4.1.9)を対象にして、その構造と機能面の特徴を明らかにするとともに、それらに対する塩の作用機構などの解明を進めた。われわれは既に、常温菌や好熱菌由来のLeuDIIの生化学的、遺伝子工学的手法による構造と機能の解明や応用面の開発を行って多くの知見を得ているので、本酵素を対象とした¹⁾。

2 研究方法

2.1 好熱好塩菌の分離法

耐熱性で安定性が高く、かつ好塩性を示す脱水素酵素を得る目的で、日本海の海岸(京都府熊野郡久美浜町箱石)の砂を採取し、培地組成1 (Table 1)の平板培地を用いて50°Cで好熱好塩菌の分離を行った。得られた数個のコロニーのうち、15%(W/V)食塩存在下でも生育する中等度好熱好塩菌1株(TSN9)について同定を行った。同定のための生理学、生化学的試験は理化学研究所(埼玉県和光市)に依頼した。また、菌のDNAのGC含量はDNAを消化後、高速液体クロマトグラフィーによる分析法^{3,4)}によって決定した。このGC含量の決定と分離菌の電子顕微鏡写真はDSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany)に依頼した。

2.2 LeuDII活性の測定とタンパク質の定量法

LeuDIIの活性測定は、脱アミノ反応では10 mM L-ロイシン、5 mM NAD, 100 mMグリシン-NaOH緩衝液(pH 10.5), 1.0 M NaCl, 及び酵素を含む反応組成液(1.0 ml)を用いてNADHの生成速度を、また逆反応のアミノ化反応では、0.2 mM NADH, 1.0 M NH₄OH-NH₄Cl緩衝液(pH 9.6), 1.0 M NaCl及び酵素を含む反応組成液(1.0 ml)を用いてNADHの減少速度を50°C

で分光学的に340nmの吸光度を追跡して行った⁵⁾。タンパク質の定量はKalb and Bernlohrの方法⁶⁾が用いられた。

2. 3 細菌の培養

海砂から分離した菌 (*Bacillus* sp. TSN9)は10%NaClを含む培地 (Table 1, Medium 1)を用いて50℃で好氣的に振とう培養された。*Escherichia coli* JM109の形質転換株はLB培地 (Medium 2)を用いて37℃で培養された。必要に応じて2%寒天、25mg/ml ampicillin, 120 mg/ml isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 100 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactoside (X-Gal)がMedium 2に添加された。

2. 4 DNAのクローニングとLeuDH遺伝子の塩基配列の決定

Bacillus sp. TSN9の染色体DNAはSaito and Miuraの方法⁷⁾により調製した⁷⁾。*Hind*Ⅲで部分消化した染色体DNA(10 μ g)の断片がプラスミドpUC18 (2 μ g)の*Hind*Ⅲ切断部位へ挿入された。組換え体*E. coli* libraryはampicillin, IPTG, X-Galを含むLB寒天培地において選択された。LeuDH活性をもつ組換え体*E. coli*は活性染色法⁸⁾で選択された。組換えプラスミド (recombinant plasmid pkuldh66-51)はLeuDH活性をもつ組換え体から得られた。サブクローニングが酵素活性を増大させるために、また挿入されたDNA断片を短くするために行われた。LeuDH活性をもつ形質転換株が選択され、その酵素活性が測定された。また。組換えプラスミドDNAが高い活性を示す形質転換株から単離され、DNAの塩基配列を決定する (sequencing)のために使用された。塩基配列はAB 370A DNA sequencerを用いて両方向からジデオキシ法で決定された。

2. 5 LeuDHの精製

精製の操作は全て低温(0~6℃)で行われた。また標準緩衝液として0.01% 2-メルカプトエタノール (MET)と1 mM EDTAを添加した10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)が使用された。

2. 5. 1 熱処理

培養で得られた組換え体*E. coli*の菌体 (湿重量: 50g)に0.85%NaCl溶液を加え、遠心分離 (10,000 g, 10分間)を2度行って洗菌した後、40 mlの緩衝液で懸濁する。その懸濁液を超音波処理 (30分間)によって細胞破碎した後、1.0 M NaClを添加する。その粗酵素液を65℃で25分間熱処理し、沈殿を除去する。上清の酵素液を緩衝液を用いて透析する。

2. 5. 2 硫酸アンモニウム分画

透析後の酵素液に最終濃度50%飽和の硫酸アンモニウムを加え、生成する沈殿を遠心分離で除去する。さらに、上清液に最終濃度70%飽和の硫酸アンモニウムを加え、遠心分離を行う。得られた沈殿物を少量の緩衝液で溶解させた後、同緩衝液で透析する。

2. 5. 3 DEAE-Toyopearl イオン交換クロマトグラフィー

透析後の酵素液をDEAE-Toyopearl 650Mのカラム(3.0 X 20 cm)に流し込む。0.15 M KClを含む緩衝液でカラムを洗浄後、0.16 M KClを含む緩衝液で酵素を溶出する。活性画分を集めて得た酵素液を限外ろ過 (Amicon PM10 membrane)によって濃縮する。

2. 6 定常状態の反応速度論的解析 (steady state kinetic analyses)

反応速度論的解析はClelandの方法⁹⁾に従って行われた。Michaelis constant (Km)は基質濃度と反応速度のダブル逆数プロットから得られる縦軸切片ともう1つの基質の濃度の逆数プロットから計算された。

3. 結果

3. 1 分離菌の同定

日本海の海岸から採取した砂から分離した好熱好塩菌TSN9株を同定するために生理・生化学的試験を行った(Table 2)。本菌の生育温度は30~65℃であり、最適な生育温度は45~50℃であるので、本菌は中等度好熱菌である。本菌の生育できる培養液中のNaCl濃度は50℃では2~15%(W/V)で、55℃では10%以下であった。50℃での最適生育NaCl濃度は3%であった。本菌は周鞭毛を持つ約1.5x4μmの大きさの桿菌(Fig. 1)で、好氣的に生育することと、孢子形成能をもつことなどから*Bacillus*属細菌である。さらに、種々の生理・生化学的テストから、*Bacillus licheniformis*に最も近縁の細菌であることが明らかになった。しかし、既知の*B. licheniformis*では生育できない65℃でも生育できることと、DNAのGC含量が高いことから、新しい好熱好塩性*Bacillus*属細菌であると考えられ、*Bacillus* sp. TSN9と命名した。

3. 2 LeuD_H geneのクローニング

Bacillus sp. TSN9の粗酵素液は高いLeuD_H活性(比活性: 0.44 unit/mg)を有していたが、さらに活性を増強すること、より簡便な精製法を達成すること、遺伝子の塩基配列の決定から一次構造の解明を行うために、LeuD_Hの遺伝子の*E. coli*でのクローニングを行った。約4000の薬剤耐性が変化した形質転換株(transformant)から活性染色法によってLeuD_Hの生産株を検索した結果、LeuD_Hを生産する1つのコロニーを得た。この組換え体*E. coli*から8.0 kbサイズの組換えプラスミドpKULD66(recombinant plasmid, pKULD66)を得た。また、サブクローニングによって4.7 kbサイズの欠失プラスミドpKULD66-51(deletion plasmid pKULD66-51)を有する高いLeuD_Hを生産する形質転換株を得た(Fig. 2)。その粗酵素のLeuD_Hの比活性は*Bacillus* sp. TSN9の粗酵素液の比活性よりも約4倍高かった。

3. 3 *Bacillus* sp. TSN9のLeuD_Hの構造遺伝子leudh geneの塩基配列の決定

プラスミドpKULD66-51のLeuD_Hをコードする1.7 kb DNAの塩基配列がジデオキシ法で決定

された。その決定されたleudh geneのORFは364アミノ酸残基をコードする1092 bpから成る。この酵素の一次構造(Fig. 3)において、Asp157からGlu93までの基質結合部位とLys74からGlu207までの補酵素結合部位が同定できる。本酵素と他の生物由来のLeuDhの一次構造(アミノ酸配列)を比較すると高い相同性(80%以上)が認められた。また、アミノ酸配列を他の酵素と比較するとグルタミン酸脱水素酵素やフェニルアラニン脱水素酵素などのNAD(P)依存性のアミノ酸脱水素酵素とも相同性が高い。Edman法により決定された精製酵素のN-末端アミノ酸領域のアミノ酸配列はDNAの塩基配列から演繹された配列と全く一致していた。

3. 4 LeuDhの精製

LeuDhは熱処理、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィーの3種類の操作で収率31%で約13倍に簡便に精製できた(Table 3)。この精製された酵素はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で単一のバンドとして泳動したので、本酵素標品は高純度で精製された。

3. 5 分子量とサブユニット構造

ゲルろ過法(HPLC:TSK gel G3000SW)によって酵素の分子質量は360 kDa(キロダルトン)と決定された。また、SDS-PAGEによって求めた分子質量は43 kDaであったことから、本酵素は分子質量が同一のサブユニットからなる8量体構造をとることが明らかになった。

3. 6 安定性と塩の影響

本酵素は耐熱性のために高濃度のNaClを要求した。すなわち3 M以下のNaClを酵素溶液へ添加することによって酵素の安定化が見られた。しかし、3 M以上の濃度では酵素活性の低下が認められた(Fig. 4)。また、KClも同様な傾向で酵素の安定化をもたらした。本酵素は2.5 M NaClの添加によって最も高い安定化が得られ、65°C、10分間の処理では全く失活しない。2.5 M NaCl存在下での65°C、10分間の処理では、pH 6.5~8.5で最も安定であった。さらに、酵素は1.0 M NaCl、0.01% MET、1 mM EDTAを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)中で、30°Cで少なくとも6ヶ月間は失活せず、安定に保存できた。しかし、0.125 M NaClの存在下では、20日以内では酵素活性の低下は認められないが、25日後には約50%に低下し、40日後では完全に失活した。これらのことも高濃度のNaClが酵素を安定化することを示している。

3. 7 酵素活性に及ぼすpHの影響

LeuDhのL-ロイシン(L-Leu)の酸化的脱アミノ反応(1 M NaClを含む0.2M glycine-NaOH緩衝液)の最適pHは10.3付近に見られた。一方、 α -ケトイソカプロン酸、 α -ケトイソ吉草酸、 α -ケト吉草酸のアミノ化反応(1 M NaClを含む1.0 M $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液)の最適pHは、それぞれ9.28, 8.76, 8.75であった。

3. 8 基質特異性と反応速度論的解析

本酵素の脱アミノ及びアミノ化反応における基質特異性 (Table 4) は *B. sphaericus*⁹⁾ や *Thermoactinomyces intermedius*¹¹⁾ の LeuDII とほぼ類似し、L-分岐鎖アミノ酸とそれらのケトアナログが良好な基質となった。本酵素は *B. sphaericus* の酵素とは異なり L-アラニンに、反応性を示す特徴が認められる。

本酵素の脱アミノ反応の初速度解析から、初速度の逆数 ($1/v$) と $1/[NAD]$ のダブル逆数プロットは典型的な交差線群を与えた。次に、脱アミノ化反応においては、NADH、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC)、 NH_3 の 3 基質のうち、1 基質を一定濃度の高濃度存在する条件下で他の 2 基質の濃度を変え、ダブル逆数プロットとる初速度解析を行った。その結果、NADH または NH_3 が一定で高濃度存在し、他の 2 基質濃度が可変のときの 2 つのダブル逆数プロットはいずれも交差線群を、KIC が高濃度存在下で NADH と NH_3 濃度が可変の条件下でのダブル逆数プロットは平行線群を与えた。この結果は、本酵素の脱アミノ反応では 2 基質が順番に酵素に結合し、3 反応産物が順番に酵素から遊離する Sequential Ordered Bi-Ter 機構で進行することを示している。また、高濃度存在下でダブル逆数プロットが平行線群を与えた KIC が酵素から二番目に遊離する反応産物である。初速度解析から NAD、L-Leu、NADH、KIC、 NH_3 の K_m 値は 2.1、0.31、0.25、1.0、330 mM と算出された。また、他の主な基質の L-Ile、L-Val、 α -ケトイソ吉草酸、 α -ケト吉草酸の K_m 値は、それぞれ 3.3、12.5、3.8、2.4 mM と決定された。NADH と NH_3 の K_m 値が他の細菌由来の酵素に比較して、大きい特徴が認められる。次に、アミノ化反応における NAD と L-Leu の反応産物阻害の様式を調べた。その結果、NAD は NADH、KIC、 NH_3 に対して、それぞれ Competitive Inhibition (Com) と Uncompetitive Inhibition (Un)、Un の様式を示した。一方、L-Leu は NADH、KIC、 NH_3 に対して、それぞれ Un、Noncompetitive Inhibition (Non)、Non の様式を示した。これらの阻害様式から、本酵素の脱アミノ化反応は NAD と L-Leu がこの順序で酵素に結合した後、加水分解反応後、 NH_3 、KIC、NADH の順序で反応産物が酵素から遊離する Sequential Ordered Bi-Ter 機構で進行することが明らかになった。この反応機構は *B. sphaericus*¹⁰⁾ や *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*¹²⁾ の LeuDII の場合と全く同じである。

3. 9 酵素活性に対する塩の影響

本酵素の脱アミノ反応及びアミノ化反応において、NaCl、LiCl、KCl などの塩の添加効果を調べた。両酵素反応ともに、NaCl と KCl で活性化を受けた。しかし、RbCl、CsCl では正逆反応で影響が異なっていた。また、LiCl、 NH_4Cl では著しく酵素活性が阻害された (Fig. 5)。また、1 M 以上の濃度の NaCl 存在下で、基質 L-Leu と補酵素 NAD の K_m が著しく減少し、酵素と基質の親和性が NaCl によって増強されることが明らかになった (Fig. 6)。さらに、NaCl 添加による酵素の α -ヘリックス構造の変化を CD (円二色性) スペクトルの変化によって分

析したところ、1~3 M NaClの添加で α -ヘリックス構造の増強が観察された。一方、B. sphaericus及びB. stearothermophilusのLeuDH^{5,6)}では、NaCl, KCl, HCOONa, CH₃COONaの添加濃度の増加とともに酵素の活性化は見られず、逆に減少が認められた。この結果、NaCl, KClによるBacillus sp. TSN9の酵素の活性化は特徴的である。

4. 考察と今後の課題

本研究により、NaCl濃度が15%まで、培養温度が65℃まで生育できる好熱好塩菌を日本海の海岸砂から分離し、これがB. lichaeiformisに近縁の新種であることを明らかにし、Bacillus sp. TSN9と命名した。Bacillus sp. TSN9のLeuDHの遺伝子をE. coliでクローニングすることに成功し、酵素活性を増強するとともに、E. coliの粗酵素から簡便にLeuDH精製できる方法を確立した。精製酵素の酵素化学的性質を明らかにし、他の細菌由来のLeuDHと比較すると (Table 5)。本酵素の分子質量360 KDaおよび8量体構造をとること、塩による耐熱性の増強が認められることなどの点で、好熱性放線菌T. intermedius¹¹⁾の酵素と類似している。Bacillus sp. TSN9のLeuDHとT. intermedius及び、B. stearothermophilusの一次構造の相同性は、それぞれ78.1、86.8%と非常に高く、補酵素結合サイトと基質結合サイトには特に高い一次構造上の保存性が認められる。また、グルタミン酸脱水素酵素やフェニルアラニン脱水素酵素など他のNAD(P)依存性脱水素酵素とも一次構造上に高い相同性が認められ、酵素の分子進化を考える上でも興味もたれる。本研究によって好熱好塩菌のLeuDHの塩による安定化と活性化などの酵素機能に対する作用機構に関する特徴が見いだされたが、これらの特徴が一次構造のアミノ酸配列の特徴として特定するには、現時点では至っていない。塩の本酵素に対する作用機構をさらに詳細に分子レベルで明らかにするためには、種々の酵素化学的特徴をもつ他のLeuDHの一次構造上の情報を蓄積し、比較検討するとともに、タンパク質工学的な機能変化などによる解析とX線構造解析による構造と機能の相関の解明などをさらに進める必要があると考えられる¹³⁾。

参考文献

- 1) 大島敏久 (1992) 化学と生物 30, 656-665.
- 2) Ohshima, T. and Soda, K. (1989) Trend Biotechnol. 7, 210-214.
- 3) Mesbah, M., Premachadran, U. and Whiteman, W. (1989) Int. J. Syst. Bact. 39, 159-167.
- 4) Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984) FEMS Microbiol. Lett. 25, 125-128.
- 5) Ohshima, T., Nagata, S. and Soda, K. (1985) Arch. Microbiol. 141, 407-411.
- 6) Kalb, V. F. J. and Bernlohr, R. W. (1977) Anal. Biochem. 82, 362-371.
- 7) Saito, H. and Miura, K. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72, 619-629.

- 8) Nagata, S., Tanizawa, K., Esaki, N., Ohshima, T. Tanaka, H. and Soda, K.
(1988) *Biochemistry* 27, 9056-9062.
- 9) Cleland, W. W., in *The Enzymes* (Boyer, P.D. ed.), 3rd Edn. Vol.2, pp.1-43,
Academic Press.
- 10) Ohshima, T., Misono, H. and Soda, K. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5719-5725.
- 11) Ohshima, T., Nishida, N., Bakthavatsalam, S., Kataoka, K., Takada, H.,
Yoshimura, T., Esaki N. and Soda, K. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222, 305-312.
- 12) Misono, H., Sugihara, K., Kuwamoto, Y., Nagata, S. and Nagasaki, S. (1990)
Agric. Biol. Chem. 54, 1491-1498.
- 13) Turnbull, A. P., Ashford, S. R., Baker, P. J., Rice, D. W., Rodgers, F. H.,
and Stillman, T. J. (1994) 236, 663-665.

Table 1. Basic media for microorganisms.

Medium 1	Medium 2 (LB medium)
0.5% Peptone	1.0% Peptone
0.2% Glycerol	0.5% Yeast extract
0.2% Yeast extract	0.5% NaCl
0.2% Ehrlich meat extract	
0.2% $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	pH 7.0 was adjusted with
0.1% KH_2PO_4	3N NaOH
0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
0.005% $CaCl_2$	
2-15% NaCl	

pH 7.2 was adjusted with 3N NaOH

Table 2. Biochemical and physiological tests.

Test	TSN9	<u>B. licheniformis</u> JCM 2505	Bergey's manual <u>B. licheniformis</u>
Gram reaction	+	+	
Shape	Rod	Rod	
Spore formation	+	+	
Anaerobic growth	+	+	+
Aerobic growth	+	+	
Motility	+	+	
Glucose gas	-	-	-
Catalase	+	+	+
OF	F	F	F
Glucose	+	+	+
L-Alabinose	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
VP	+	+	+
VP (pH)	6.4	6.1	< 6
Shimon's citric acid	+	+	+
Propionic acid	+	+	+
Casein	+	+	+
Starch	+	+	+
Gelatin	+	+	+
Phenylalanine	-	-	-
Sodium nitrate	+	+	+
Indol	-	-	-
Urea	+	d	
Growth at pH 6.8	+	+	+
pH 5.7	+	+	+
Growth at 2% NaCl	+	+	+
5% NaCl	+	+	+
7% NaCl	+	+	+
10% NaCl	+	+	ND
15% NaCl	+	ND	ND
Growth at 5°C	-	-	-
10°C	-	-	-
30°C	+	+	+
40°C	+	+	+
50°C	+	+	+
55°C	+	+	+
65°C	+	-	-
GC content	48.36 moles %	ND	43-47moles %

Table 3. Purification of LeuDH from E. coli pKULD66-51 cells.

Steps ^a	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
1. Heat treatment	5,610	61,300	10.9	100
2. Ammonium sulfate fractionation	1,400	36,000	25.7	59
3. DEAE-Toyopearl	136	18,800	138	31

a) Wet weight of E. coli pKULD66-51 used was 50 g

Table 4. Substrate specificity of LeuDH.

Substrate (10mM) (deamination)	Relative activity	Substrate (10mM) (amination)	Relative activity
L-Leucine	100	α -Ketoisocaproate	100
L-Isoleucine	72	α -Ketoisovalerate	140
L-Valine	59	α -Ketovalerate	96
L- β -Aminobutyrate	32	α -Ketobutyrate	70
S-Methyl-L-cystein	19	α -Ketocaproate	69
L-Alanine	10	Pyruvate	2
L-Norleucine	7	α -Ketoglutarate	0
D-Leucine	0	Phenylpyruvate	0
L-Phenylalanine	0	Oxaloacetate	0
L-Glutamate	0		
L-Threnine	0		

Table 5. Comparison of properties of Bacillus sp. TSN9 LeuDH with those of other bacterial LeuDHs.

Properties	<u>Bacillus</u> sp. TSN 9	<u>B. sphaericus</u>	<u>B. stearo-</u> <u>thermophilus</u>	<u>T. intermedius</u>
Molecular mass(KDa)	360	245	300	340
Subunit (KDa)	8(43)	6(41)	6(49)	8(42)
Number of Amino acids	364	---	429	366
Optimum pH (deamination)	10.3	10.7	11.0	10.5
(amination)	9-9.5	9.0	9-9.5	9-9.5
Thermostability	>65°C	>60°C	>70°C	>65°C
Stabilization with salts	+	-	-	+
Coenzyme specificity (Km : mM)				
NAD	0.31	0.39	0.49	0.36
NADH	0.25	0.35	---	0.042
Substrate specificity (Km : mM)				
L-Leu	100 (2.1)	100 (1.0)	100 (4.4)	100(2.0)
L-Val	59 (---)	74 (1.7)	98 (3.9)	87(2.4)
L-Ile	70 (3.3)	58 (1.8)	73 (1.4)	89(0.4)
Reaction mechanism	Sequential Bi-Ter	Sequential Bi-Ter	----	Partially random Bi-Ter

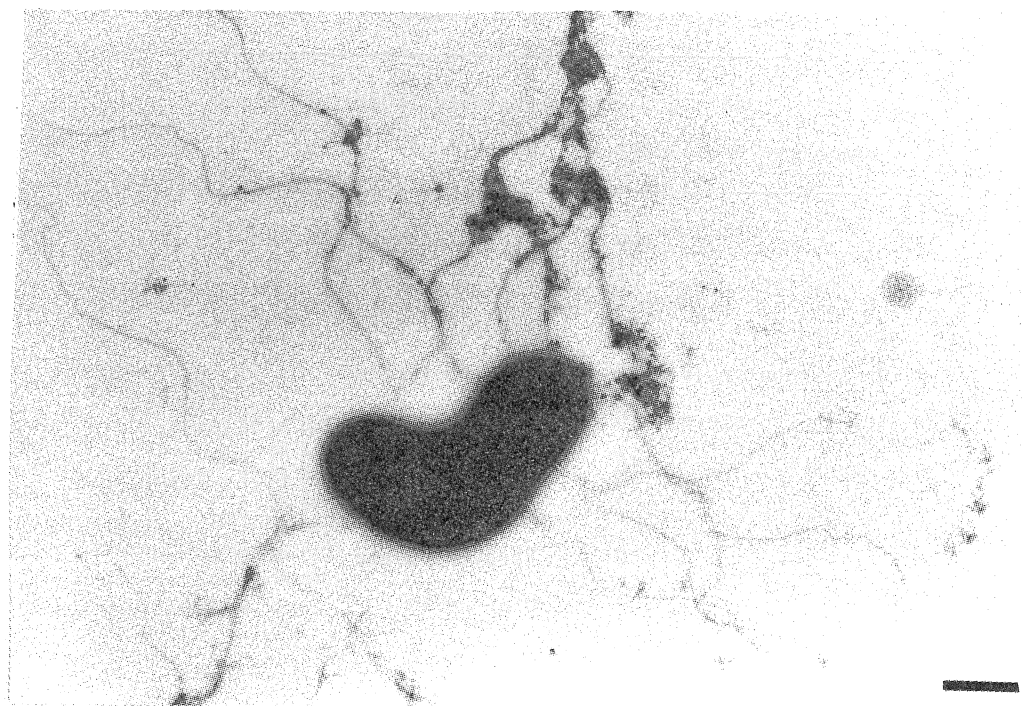


Fig. 1. Electron microscopic image of Bacillus sp. TSN9.
Bar indicates 1 μ m-length.

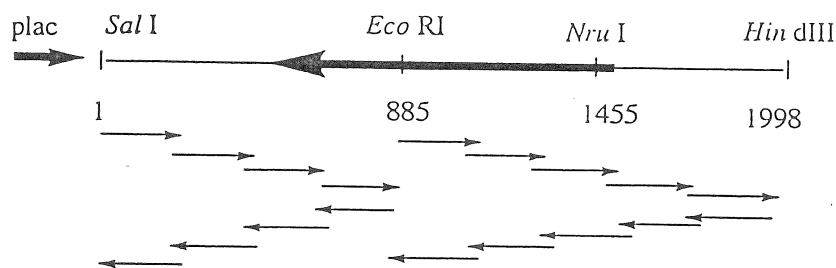


Fig. 2. Restriction map and pKULD66-51 and DNA sequencing strategy. The single line represents the non-essential region of the insert and the dark line represents the essential region for LeuDH activity.

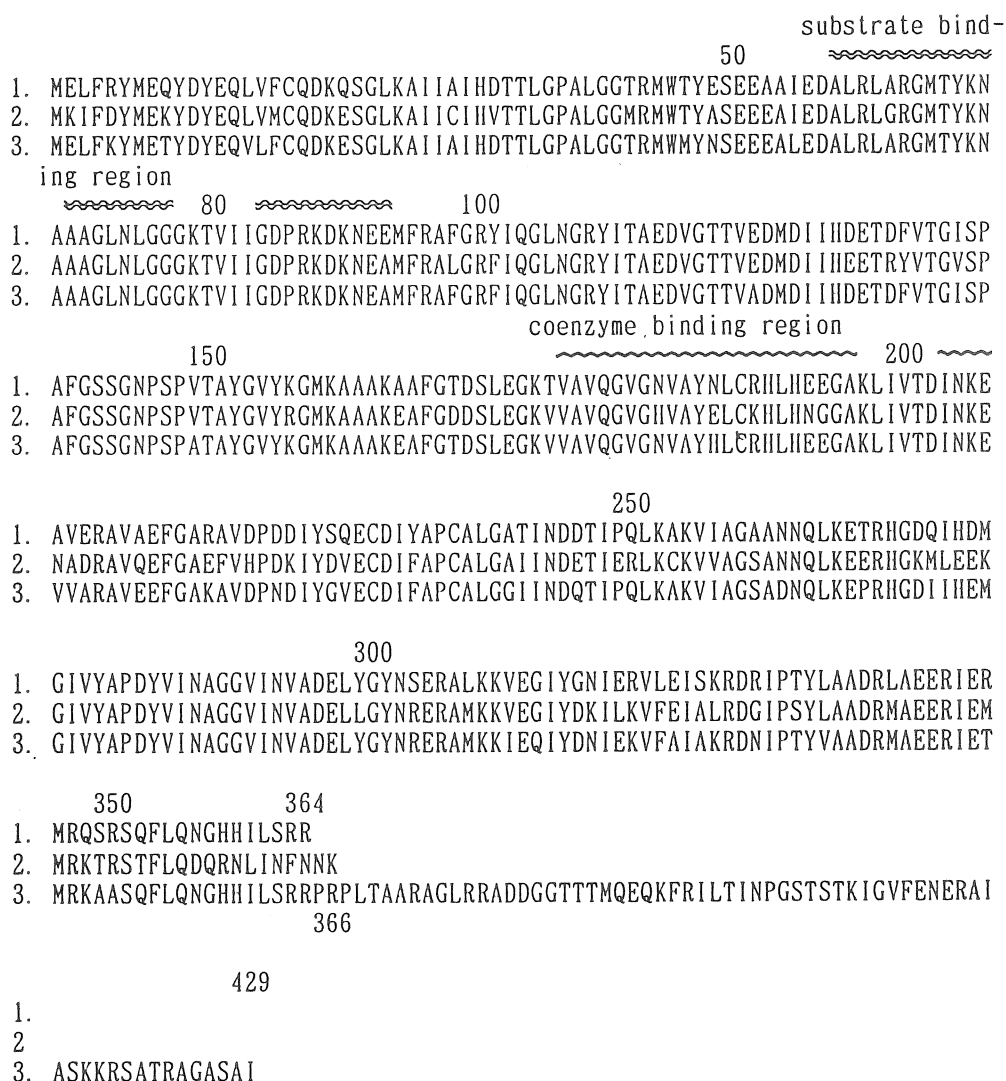


Fig. 3. Amino acid sequences of *Bacillus* sp. TSN9 (1), *T. intermedius* (2)¹¹⁾ and *B. stearothermophilus* (3)⁹⁾ LeuDHs.

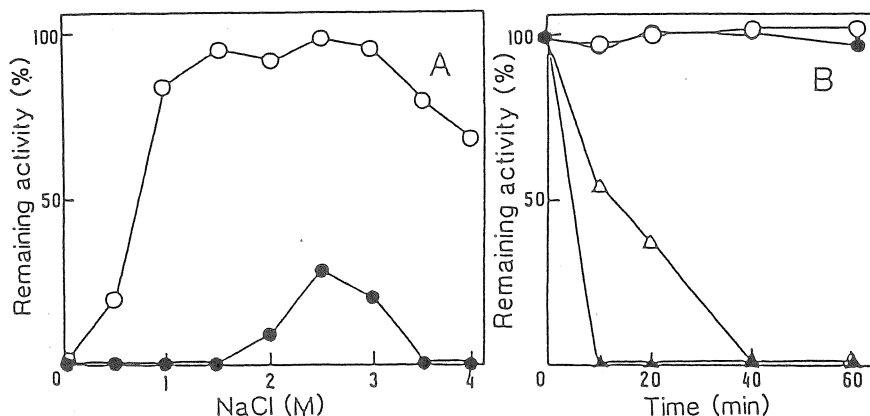


Fig. 4. Effects of NaCl and temperature on the heat stability of the enzyme. (A) The enzyme was subjected to heat treatment in 10 mM K-phosphate buffer (pH 7.4) containing 2-mercaptoethanol and various concentrations of NaCl at 65°C (○) and 70°C (●) for 15 min. (B) The enzyme in the above buffer containing 2.5 M NaCl was incubated at 60 (○), 65 (●), 70 (△) and 75 (▲)°C.

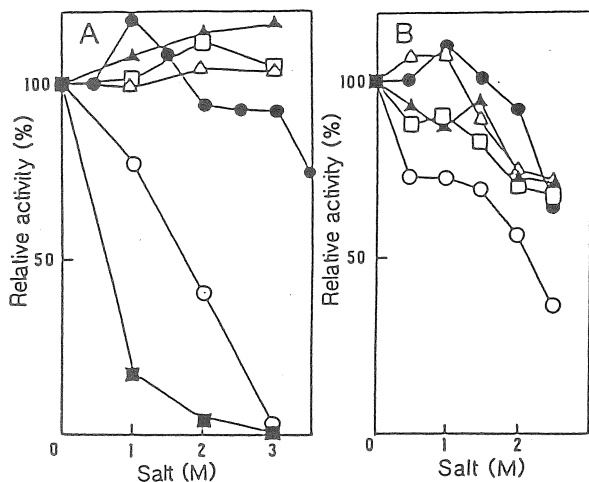


Fig. 5. Effect of salts on the LeuDH activities. The enzyme was assayed for the L-leucine deamination (A) and α -ketoisocaproate (B) under the standard conditions containing various concentrations of LiCl (○), NaCl (●), KCl (△), RbCl (▲), CsCl (□) or NH_4Cl (■).

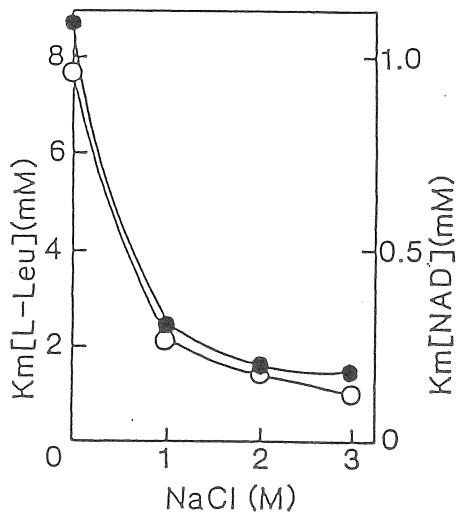


Fig. 6. Effects of NaCl on the K_m values for L-Leu and NAD. K_m values for L-Leu (○) and NAD (●).

Effect of Salts on the Structure and Function of Dehydrogenase

Toshihisa OHSHIMA

Department of Science, Kyoto University of Education

Summary

We have screened thermophilic and halophilic microorganisms for stable and halotolerant NAD dependent dehydrogenases, and isolated a bacterial strain from the sands in Kumihama coast, Kyoto prefecture. This bacterium was able to grow at 65°C and in the presence of 15% NaCl, and identified as a new strain of Bacillus species. The new strain was named as Bacillus sp. TSN9. This strain exhibited high activity of NAD-dependent leucine dehydrogenase (L-Leucine: NAD oxidoreductase, EC 1.4.1.9). Leucine dehydrogenase gene from the Bacillus sp. TSN9 was cloned into E. coli JM 109 with a vector plasmid, pUC18 and sequenced. The enzyme from E. coli cells carrying the recombinant plasmid pKULD66-51 (4.7 kb) was easily purified to homogeneity by heat treatment, ammonium sulfate fractionation and DEAE-Toyopearl column chromatography with a yield of 31%. The molecular mass of the native enzyme was estimated to be 360 kDa. The enzyme consists of eight subunits identical in a molecular mass (43 kDa). The enzyme showed higher thermal stability at high concentrations (1 to 3 M) of NaCl and retained its full activity on heating at 65°C for 1 hour in the presence of 2.5 M NaCl. The enzyme could be stored for more than 6 months in the standard buffer containing 1.0 M at 30°C. The enzyme activity was stimulated by the addition of 1 M NaCl and inactivated with LiCl and NH₄Cl. The enzyme of Bacillus sp. TSN9 is very similar in many aspects to that of Thermoactinomyces intermedius.