三重大生物資源紀要
第7号：77～82
平成4年1月31日

アオウキクサ（*Lemna pausicostata* 151）のニコチンアミダーゼの性質ならびに花芽誘導との関連性の考察

田口　寛・西谷　弘*・森村　直人
奥村　克純・嶋林　幸英
三重大学生物資源学部，テルモ株式会社研究開発センター*

Properties of Nicotinamidase in the Duckweed (*Lemna pausicostata* 151) and Considerations in Relation to Flowering-Induction of the Plant

Hiroshi Taguchi, Hiroshi Nishitani*, Naoto Morimura,
Katsuzumi Okumura and Yoshihide Shimabayashi
Faculty of Bioresources, Mie University, *R & D Center, Terumo Corporation, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-01, JAPAN

Abstract

Biochemical properties of nicotinamidase (EC 3.5.1.19) in a cell-free extract from duckweed (*Lemna paucicostata* 151) were investigated and considered in relation to the flowering-induction of a plant. As a result, the following properties were confirmed: optimum pH for the reaction: 8.5; maximum reaction velocity was obtained at: 60°C; *Km* value for nicotinamide: 10.1 μM; inhibitors showing more than 50% inhibition at 1 mM: Cu^{2+}, Hg^{2+}, PCMB, nicotinic acid hydrazide, 3-cyanopyridine, benzamide, pyrazinamide, NAD, NADH, NADP, NADPH. It is interesting that the enzyme activity was inhibited by flowering inducers, pyrazinamide and benzamide. No product inhibition by nicotinic acid or ammonium ion was detectable with this enzyme preparation. The reverse reaction, i.e., the conversion of nicotinic acid into nicotinamide in the presence of ammonium ion, glutamine, ATP and magnesium ion, did not occur.

From these results, nicotinamidase in the duckweed is thought to play an important role in the formation of trigonelline and NAD. Nicotinamide formed from NAD is accumulated at a certain level in the plant body and flowering may be induced.

Key words: nicotinamidase, duckweed, *Lemna paucicostata*, flowering-induction, nicotinamide

緒　　言

ナイアシン関連化合物のなかには，各種生物に対して種々の生理作用や薬理作用を示すものが知られている。そのうちで，植物に対する作用の例としては，次のようである。すなわちトリゴネリン (TRG) には，細胞周期の G2 期で細胞停止を促進するという植物ホルモン的な作用がある[1]。ニコチン酸 (NiA) は，エノキタケの子実

平成3年7月26日

体形成に関与しているという報告がある[2]。ニコチンアミド (NAm) は，イネの籾中に含まれる成長促進物質として単離され[3]，野菜類（レタス，ハツカダイコン，ピーマン，ナス，キュウリ，トマト），豆類（ダイズ，アズキ）の初期生育を促進することが報告されている[4]。

当研究室では，『ナイアシン関連化合物の生理作用と薬理作用に関する研究』の一環として，無菌的に培養したアオウキクサ (*Lemna pausicostata* 151) を用いてナイアシン関連化合物の作用を検討した結果，NiA, NAm, ピラジンカルボン酸，ピラジンアミドなどには花芽誘導作用があり，シンコメロン酸と TRG は顕著に生育を促進することなどを見い出した[5]。さらに，各種植物の生育に及ぼす影響を検討し，ダイコン幼植物においては，シンコメロン酸が最もその生育を促進することなどを明らかにした[6]。

アオウキクサにおける NAD の生合成・代謝系の酵素活性の概略については，既に報告した[7]。その中で，NAm を NiA に変換する反応を触媒するニコチンアミダーゼ (EC 3.5.1.19) の活性は非常に高いことを見い出したが，詳細な検討は行っていない。また，これまでにニコチンアミダーゼに関する報告は，いくつか出ているものの，植物における本酵素の性質を報告したものは非常に少なく，ましてや花芽誘導との関連を検討した研究報告はない。

そこで今回は，NAD の生合成と代謝の経路における調節機構とアオウキクサの開花との関連性についての基礎的な知見などを得るために，アオウキクサから無細胞抽出液を調製し，その中のニコチンアミダーゼの酵素化学的諸性質について検討し，考察を加えた。

実 験 方 法

1. 材　　料

アオウキクサ (*Lemna paucicosatata* 151) は，前報[5]に記載した方法に従い，Hutner 培地で無菌的に培養した。

2. 試 薬 類

[Carboxyl-^{14}C] NiA 及び [Carbonyl-^{14}C] NAm (両者とも 2.07 GBq/mmol) は Amersham 社から購入し，0.463 MBq/ml の水溶液を調製して基質液とした。不溶性ポリビニルピロリドン，TRG, シンコメロン酸，N^1-メチルニコチンアミド，イソシンコメロン酸，3-シアノピリジン，ニコチン酸ヒドラジド，イソニコチンアミドは東京化成工業（株）から，ATP, cAMP, NAD, NADH, NADP, NADPH は（株）興人から，それぞれ購入した。その他の試薬類は，ナカライテスク（株）から購入した。

3. 無細胞抽出液の調製

無菌的に培養したアオウキクサ 10 g を，酵素の安定化剤を各種含む緩衝液，すなわち 100 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.0, 30 mM L-アスコルビン酸，10 mM メルカプトエタノール，1 mM EDTA, 10 mg/ml 牛血清アルブミンを含む溶液を 20 ml，不溶性ポリビニルピロリドン 5 g，海砂 10 g とともに，氷冷しながら乳鉢でよくすりつぶした。得られたホモジネートは，4°C 前後に冷却しながら 12,000×*g* で10分間遠心分離し，その上清を無細胞抽出液とした。無細胞抽出液中の本酵素の比活性は非常に高いために，実際の酵素反応においては，無細胞抽出液を緩衝液でさらに100倍希釈して用いた。

4. ニコチンアミダーゼの活性測定

上記の無細胞抽出液を用いて，前報[8]と同様のラジオアッセイ，または新たに東ソー（株）のラジオ HPLC を用いた方法[9]でニコチンアミダーゼの活性を測定した。すなわち，100 mM HEPES (pH 8.5) 20 μl, [Carbonyl-^{14}C] NAm 10 μl, 水 50 μl, 希釈した無細胞抽出液 20 μl の反応液をエッペンドルフ型遠沈管に入れて 30°C でインキュベートした後，沸騰水中で 2 分間加熱して反応を止め，氷冷してから 4°C において 9,000×*g* で10分間遠心分離した。こうして除タンパクした上清 20 μl をラジオ HPLC 分析した。

実験結果と考察

1. ニコチンアミダーゼの性質

(1) 反応の最適 pH

pH-活性曲線はブロードとなり，最大活性を示す pH は8.5付近であった。ラット肝[10]，トラマキタケ[8]，サザエ[8]，エノキタケ[11]などの本酵素の反応の最適 pH は，9 前後のアルカリ側にあり，今回のアオウキクサのと類似している。しかし，ブタ肝[12]，ウサギ肝[13]，酵母[14]，

Flavobacterium peregrinum[15], *Aspergillus niger*[16], カキ(果実)[8], *Lactobacillus plantarum*[8], ハマグリ[8] などのそれは6～8の範囲の中性付近にある。

(2) 反応温度の影響

インキュベーション温度が 0～80°C の範囲で酵素活性を測定した結果，最大活性を示す温度は 60°C であった。しかし，それ以上の温度での活性の低下はわずかであった。

(3) ニコチンアミドに対する *Km* 値

NAm 濃度—活性曲線は，典型的な放物線状となり，さらに Lineweaver-Burk プロットを行って NAm に対する *Km* 値を算出したところ，10.1 μM となった。

一般に哺乳類の本酵素の *Km* 値は 0.1 M のオーダーで非常に高いのに対して，下等動物，植物，微生物のそれは μM のオーダーである。

(4) 金属イオンの影響

種々の金属イオンを終濃度が 1 mM になるように反応液に添加し，pH 8.5 で酵素活性を測定したところ，Table 1 のような結果となった。銅イオンと水銀イオンによって，その活性がほとんど完全に阻害された。また，PCMB によっても強く阻害された。以上のことから，本酵素は SH 酵素であると思われる。しかし，阻害される金属イオンが，トラマキタケ[8], エノキタケ[11], 酵母[14] の酵素とは若干異なっていた。

Table 1. Effect of metal ions on the nicotinamidase activity in the cell-free extract from *Lemna paucicostata* 151

Metal ion (1 mM)	Relative activity
None	100
Mg^{2+}	112
Mn^{2+}	106
K^{+}	102
Mo^{2+}	101
Ca^{2+}	101
Zn^{2+}	99
Pb^{2+}	97
Na^{+}	97
Ni^{2+}	94
Cd^{2+}	92
Co^{2+}	89
Fe^{2+}	71
Fe^{3+}	53
Cu^{2+}	18
Hg^{2+}	0
PCMB	15

(5) ニコチンアミド関連化合物の影響

種々の NAm 関連化合物を終濃度が 1 mM となるように反応液に添加してその活性を測定したところ，Table

Table 2. Effect of nicotinamide related compounds on the nicotinamidase activity in the cell-free extract from *Lemna paucicostata* 151

Compound (1 mM)	Relative activity
None	100
Pyrazine	104
Nicotinic acid	103
Pyrazine-2,3-dicarboxylic acid	103
N^1-Methylnicotinamide	100
N'-Methylnicotinamide	97
Quinolinic acid	97
Citrazinic acid	96
Isonicotinic acid	96
Benzoic acid	95
Salicylic acid	95
Methyl nicotinate	95
Isonicotinamide	94
N',*N'*-Dimethylnicotinamide	94
6-Hydroxynicotinic acid	93
Phthalic acid	93
Picolinic acid	92
Nicotinic acid *N*-oxide	92
Lutidinic acid	91
Pyridine-3,5-dicarboxylic acid	90
Cinchomeronic acid	90
Pyridoxal	90
Isocinchomeronic acid	90
Trigonelline	89
3-Aminopyridine	88
3-Pyridine sulfonic acid	87
Pyridoxamine	86
Pyradine 2-carboxylic acid	86
Pyridoxine	83
Salicylamide	83
Picolinamide	79
Benzamide	57
Pyrazinamide	47
Nicotinic acid hydrazide	22
3-Cyanopyridine	0

2のような結果となった。その中で，ベンズアミド，ピラジンアミド，ニコチン酸ヒドラジド，3-シアノピリジンによって40%以上阻害された。特に，3-シアノピリジンは強力な阻害剤となり，本酵素活性を完全に阻害した。これらの結果については，エノキタケの本酵素と類似のものであったが，トラマキタケの酵素がキノリン酸やピラジン-2, 3-ジカルボン酸によって強力に阻害されたのとは対照的であった。

(6)　NAD 関連化合物の影響

NAD 関連化合物を終濃度が 1 mM となるように反応液に添加してその活性を測定したところ，Table 3 のような結果となった。NADP, NADPH, NADH, NAD によって50%以上の阻害を受けた。NAD 関連化合物によるこれらの阻害は，フィードバック阻害とも考えられ，代謝調節上重要であるので，その詳細については，今後さらに検討したい。

Table 3. Effect of NAD related compounds on the nicotinamidase activity in the cell-free extract from *Lemna paucicostata* 151

Compound (1 mM)	Relative activity
None	100
AMP	102
ADP	101
NaAD	101
PRPP	97
cAMP	94
ATP	92
NaMN	89
NMN	55
NADP	43
NADPH	27
NADH	27
NAD	26

Abbreviations:
NaAD = Nicotinic acid adenine dinucleotide
NaMN = Nicotinic acid mononucleotide
NMN = Nicotinamide mononucleotide

(7)　生成物阻害の検討

本酵素反応の生成物である NiA と NH_4^+ を種々の濃度で反応液に添加し，酵素反応が阻害されるかどうかを検討したが，Table 4 にその結果を示すように NiA は

Table 4. Effect of the reaction products, nicotinic acid and ammonium ion, on the nicotinamidase activity in the cell-free extract from *Lemna paucicostata* 151

Compound	Concentration (mM)	Relative activity
None		100
Nicotinic acid	1	103
	5	91
	10	108
	20	102
	50	111
NH_4^+	1	96
	10	116
Nicotinic acid + NH_4^+	1 (each)	93
	10 (each)	97

50 mM まで，NH_4^+ は 10 mM まで添加してもほとんど影響がなかった。また両者を同時にそれぞれ 10 mM の濃度に添加しても同様であった。この性質はトラマキタケ[8]やエノキタケ[11]の場合とは異なるものである。

(8)　逆反応の検討

(1)NH_4^+，(2)グルタミン，(3)NH_4^+ + ATP + Mg^{2+}，(4)グルタミン + ATP + Mg^{2+}（いずれも反応液中での終濃度は 1 mM）の 4 種類の添加系の全てにおいて，[Carboxyl-^{14}C] NiA（終濃度：2.2×10^{-4}M）及び酵素液と共に，ニコチンアミダーゼ活性測定のときと同様にしてインキュベートしたが，NAm 相当部分に放射能は全く検出されず，今回もニコチンアミダーゼの逆反応は起こらないことが確認された。従って NiA から NAm への変換は，従来から一般に言われているように，遊離の形ではなく NAD^+ synthase (EC 6.3.1.5) によって，ヌクレオチドのレベルでのみ起こっているものと思われる。

2.　総合考察

本酵素の *Km* 値は，10 μM 程度であることから，アオウキクサ体内で機能していると考えられる。本酵素反応の阻害剤の中で，ベンズアミド[17]とピラジンアミド[5]はアオウキクサに投与すると，その花芽を誘導する。従って，これらの化合物によって NAm から生成する NiA 量が調節されると考えられる。これらの化合物がアオウキクサ体内に実際に存在しているかどうかについて

は，今後検討する必要がある。

当研究室での研究結果から，アオウキクサにおける主なNADの生合成経路は，NAD生合成系に関与する酵素活性の強さから，『NiA→ニコチン酸モノヌクレオチド→ニコチン酸アデニンジヌクレオチド→NAD』のニコチン酸経路と推定される。また，NiAはニコチン酸メチルトランスフェラーゼ（EC 2.1.1.7）によってTRGに変換されることも見い出している。ニコチンアミダーゼは，NADの代謝（分解）によって生じたNAmを脱アミド化してNiAに変換する酵素である。生じたNiAは，ニコチン酸経路を経て再びNADの生合成に利用されるか，あるいはニコチン酸メチルトランスフェラーゼによってメチル化されてTRGとなり，さらにTRGの一部は脱メチル化されて再びNiAとなるサイクルも考えられる[18]。このような点から，アオウキクサのニコチンアミダーゼは，NADの分解によって生じたNAmを再びNADとして利用するための，またはTRGを生合成するための前駆体としてのNiAを生成する重要な酵素と考えられる。

[^{14}C]で標識したNiA及びNAmを，花芽誘導を起こさない濃度（1 μM）でアオウキクサに投与して7日間培養したトレーサー実験の結果[7]から，NAD，ニコチン酸モノヌクレオチド，ニコチンアミドモノヌクレオチド，TRGに相当する画分に多くの放射能が検出されたが，NiAの位置にはほとんど検出されなかった。花芽誘導を起こす濃度（100 μM）でアオウキクサに投与して7日間培養した場合には，NAmに相当する画分に最も多くの放射能が検出された。これらのことから，花芽誘導しない濃度で投与されたNiA及びNAmは，まずNAD及びTRGに変換されると考えられる。TRGがある程度の濃度になるとTRGによる生成物阻害によってニコチン酸メチルトランスフェラーゼによるTRGの生成が止まり，NiAはNADの生合成のみに利用されるのであろう。花芽誘導する濃度では，これによって生じたNADから遊離したNAmの蓄積が，なんらかのメカニズムで花芽誘導に関与していることが考えられる。

アオウキクサの花芽を誘導するベンズアミドとピラジンアミドによってニコチンアミダーゼが阻害されるということは，NAmがアオウキクサ体内に蓄積することにつながる。一方，両化合物は，NiAからTRGを生合成するニコチン酸メチルトランスフェラーゼも阻害するので，NiAはニコチン酸経路を経由してNADとなり，さらに分解を受けてNAmとなって，アオウキクサの体内に蓄積すると考えられる。花芽誘導の起こる濃度で，NiAあるいはNAmを投与した場合，NAmがアオウキクサ体内にかなりの量で蓄積する。以上のことから，ベンズアミドとピラジンアミドは，ニコチンアミダーゼとニコチン酸メチルトランスフェラーゼの両酵素を阻害することでNAmを蓄積し，花芽誘導に至るものと推定される。

開花を誘導する濃度でNiAを投与した場合に，アオウキクサ体内に蓄積するNAmは，ニコチンアミダーゼの逆反応で生じたものではなく，NiA経路を経て，いったんNADが生合成され，そこから遊離して生成したものであると考えられる。

反応生成物であるNiAを反応液中に50 mMの濃度まで添加して酵素反応を行わせたが，トラマキタケやエノキタケの本酵素のように生成物阻害を受けなかった。標識したNiA及びNAmを用いたトレーサー実験では，花芽誘導しない濃度で投与した場合には，NiAはほとんど検出されないことやNiAによる生成物阻害を受けないことから，ニコチンアミダーゼによって生じたNiAは遊離の形で残り，一定の濃度に保たれることなく，ニコチン酸メチルトランスフェラーゼによって速やかにTRGとなるか，またはニコチン酸経路を経て再びNADとなると考えられる。花芽を誘導する濃度で投与した場合にNAmが大量に検出されるのは，ニコチンアミダーゼが生成物阻害以外の機構，たとえばNAD関連化合物による阻害によって，NAmと反応できないためと考えられる。この点については，今後さらに詳細に検討する必要があろう。

引用文献

1) Lynn, D. G., K. Nakanishi, S. L. Patt, J. L. Occolowitz, S. Almeida and L. S. Evans. Isolation and characterization of first mitotic cycle hormone that regulates cell proliferation, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**: 7759–7760 (1978).
2) 村尾澤夫：キノコ子実体形成の促進物質と引金物質—プロテアーゼインヒビターによる食用キノコの増収—. 発酵と工業, **43**: 43–49 (1985).
3) Takeuchi, S., Y. Kono, A. Kawarada, Y. Ota and

M. NAKAYAMA. Nicotinamide as a plant regulator isolated from rice hulls, *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 859–861 (1975).

4) 讃井　蕃：ニコチン酸アミドの植物に対する生育調節作用について．植物の化学調節，**12**: 59–69 (1977).

5) TAGUCHI, H., A. KASHIMOTO, H. NISHITANI, Y. SHIMABAYASHI and K. IWAI. The effect of pyridine and pyrazine carboxylic acids derivatives on the growth of *Lemna paucicostata* 151, *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 85–89 (1988).

6) 田口　寛，浜野雪美，前田真希，西谷　弘，奥村克純，嶋林幸英，岩井和夫：ダイコン幼植物に対するシンコメロン酸の生長促進作用．ビタミン，**65**: 63–70 (1991).

7) TAGUCHI, H., H. NISHITANI, K. OKUMURA, Y. SHIMABAYASHI and K. IWAI. Biosynthesis and metabolism of NAD in *Lemna paucicostata* 151, *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 1543–1549 (1989).

8) 田口　寛，稲森国勝，武藤秀弥，奥村克純，嶋林幸英：ニコチンアミダーゼの分布と基本的性質．ビタミン，**62**: 399–406 (1988).

9) 田口　寛：ニコチン酸関連化合物の HPLC による分離・定量とその応用．ビタミン．**64**: 19–25 (1990).

10) PETRACK, B., P. GREENGARD, A. CRESTON and F. SHEPPY. Nicotinamide deamidase from mammalian liver, *J. Biol. Chem.*, **240**: 1725–1730 (1965).

11) 田口　寛，小村大輔，西谷　弘，奥村克純，嶋林幸英：エノキタケのニコチンアミダーゼの性質．ビタミン，**63**: 491–496 (1989).

12) 田口　寛，近藤久二夫，嶋林幸英，岩井和夫：ブタ肝臓ニコチンアミダーゼの精製と性質．ビタミン，**56**: 659–664 (1982).

13) SU, S., L. ALBIZATI and S. CHAYKIN. Nicotinamide deamidase from rat liver II. Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, **244**: 2956–2965 (1969).

14) CALBREATH, D. F. and J. G. JOSHI, Inhibition of nicotinamidase by nicotinamide adenine dinucleotide, *J. Biol. Chem.*, **246**: 4334–4339 (1971).

15) TANIGAWA, Y., M. SHIMOYAMA, K. DOHI, I. UEDA. Purification and properties of nicotinamide deamidase from *Flavobacterium peregrinum*, *J. Biol. Chem.*, **247**: 8036–8042 (1972).

16) SARMA, D. S. R., S. RAJALAKSHMI and P. S. SARMA. The enzymes involved in nicotinamide-adenine dinucleotide metabolism in *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta*, **81**: 311–322 (1964).

17) FUJIOKA, S., A. SAKURAI, I. YAMAGUCHI, N. MUROFUSHI, N. TAKAHASHI, S. KAIHARA and A. TAKIMOTO. Isolation and identification of L-pipecolic acid and nicotinamide as flowering-inducing substances in *Lemna*, *Plant Cell Physiol.*, **28**: 995–1003 (1987).

18) TAGUCHI, H., H. NISHITANI, K. OKUMURA, Y. SHIMABAYASHI and K. IWAI. Biosynthesis and metabolism of trigonelline in *Lemna paucicostata* 151, *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 2867–2871 (1989).