

Properties of NAD-Malate Dehydrogenase Isozymes from Leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* L. Exhibiting Crassulacean Acid Metabolism

齋藤, 和幸
九州大学大学院農学研究院

縣, 和一
九州大学大学院農学研究院

窪田, 文武
九州大学大学院農学研究院

武藤, 麻里
九州大学農学部生物資源環境学科

<https://doi.org/10.15017/4346>

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 60 (1), pp.1-8, 2005-02-01. Faculty of
Agriculture, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



CAM型アイスプラントの葉身のNAD-リンゴ酸 脱水素酵素アイソザイムの性質

齋藤 和幸*・縣 和一
窪田 文武・武藤 麻里¹

九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座植物生産生理学研究室
(2004年11月5日受付, 2004年11月11日受理)

Properties of NAD-Malate Dehydrogenase Isozymes from Leaves of
Mesembryanthemum crystallinum L. Exhibiting Crassulacean Acid Metabolism

Kazuyuki SAITOU*, Waichi AGATA, Fumitake KUBOTA
and Mari MUTO¹

Laboratory of Plant Production Physiology,
Division of Soil Science and Plant Production, Department of Plant Resources,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

はじめに

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) はツルナ科に属する多肉植物で、水ストレスによって光合成型がC₃型からベンケイソウ型酸代謝 (CAM) 型へ変換する (Winter and von Willert, 1972). CAM型光合成では、夜間、大気中から葉内に取り込まれたCO₂はホスホエノールピルビン酸 (PEP) カルボキシラーゼ (EC 4.1.1.31) の作用によってオキザロ酢酸中に固定され、さらに、オキザロ酢酸はNAD-リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の作用によってリンゴ酸に変換され、液胞中に蓄積される (Ting, 1985). 昼間になるとリンゴ酸は脱炭酸され、放出されたCO₂はカルビン-ベンソン回路に取り込まれる. PEPカルボキシラーゼはリンゴ酸による活性阻害をうけるため、昼間はPEPカルボキシラーゼを介したリンゴ酸の合成反応が抑制されると考えられている (Kluge and Osmond, 1972; Winter, 1984). また、von Willert (1975) はリンゴ酸によるPEPカルボキシラーゼの活性阻害が無機リン酸によって解除されることを見出し、CAM型光合成の調節に無機

リン酸が関与することを示唆した. このようなPEPカルボキシラーゼの研究に比較して、CAM植物のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の研究はほとんど進んでいない.

高等植物のNAD-リンゴ酸脱水素酵素には、細胞質ゾル型、ミトコンドリア型およびマイクロボディ型の少なくとも3種類のアイソザイムが存在し、それらは電気泳動における移動度、クロマトグラフィーにおける挙動およびキネティック特性が異なっている (Longo and Scandalios, 1969; Rocha and Ting, 1970; Rocha and Ting, 1971; Ting *et al.*, 1966; Yamazaki and Tolbert, 1968). CAM植物では細胞質ゾルに局在するNAD-リンゴ酸脱水素酵素が夜間のCO₂固定に直接関与すると考えられている (Kluge and Ting, 1978). 著者らは、CAM型アイスプラントより精製したNAD-リンゴ酸脱水素酵素はクエン酸によって活性が阻害され、その阻害は無機リン酸により解除されることを報告している (Saitou *et al.*, 1995). CAM型アイスプラントの葉肉細胞には多量のクエン酸およびイソクエン酸が存在している (Winter *et al.*, 1981) ことから、NAD-リンゴ酸脱

¹九州大学農学部生物資源環境学科生物資源生産科学コース農学分野

¹Program of Agronomy, Course of Bioresource Production, Department of Bioresource and Bioenvironment, School of Agriculture, Kyushu University

*Corresponding author (E-mail: ksaitou@agr.kyushu-u.ac.jp)

水素酵素の活性も無機リン酸によって調節されていることが考えられる。しかし、精製したNAD-リンゴ酸脱水素酵素の細胞内での局在場所は特定されておらず、無機リン酸によるNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性調節が直接CAM型光合成の調節に関わるのか明らかにされていない。

本研究では、CAM型アイズプラントの葉身より細胞質ゾルとミトコンドリアに局在するNAD-リンゴ酸脱水素酵素を抽出し、その性質を比較検討した。

材 料 と 方 法

1. 植物材料

アイズプラントは12時間日長、光強度 $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (400-700nm)、室温 25°C および相対湿度70%に設定したグロースキャビネット内で水耕栽培した(Saitou *et al.*, 1995)。6週齢になった時、水耕液に400mM NaClを加えることによって塩処理を開始し、14日間栽培してCAM型光合成へ変換させた(Saitou *et al.*, 1991)。

2. 粗酵素抽出液の調整

CAM型アイズプラントの完全に展開した上から2番目の葉身を酵素の抽出に用いた。葉身に250mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)-*N*-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタン スルホン酸(Tris) (TES) (pH 8.0)、4 mM システイン、5 mM エチレンジグリコールビス(β-アミノエチルエーテル)-*N*, *N*, *N*', *N*'-四酢酸、2% (w/v) ポリビニルポリピロリドンおよび0.2% (w/v) 牛血清アルブミンを含む抽出用緩衝液を生体重の5倍量加え、乳鉢と乳棒を用いて軽く磨砕した後、4層ガーゼでろ過した。ろ液を $1,400 \times g$ で4分間遠心分離し、上清を全酵素活性の測定に用いた。上清の一部をさらに $10,000 \times g$ で30分間遠心分離し、上清を細胞質ゾル画分とした(Winter *et al.*, 1986)。ミトコンドリア画分の調整およびミトコンドリア画分からの酵素の抽出はWinter *et al.* (1986)の方法に従った。粗酵素抽出液は、あらかじめ2.5mM MgCl_2 、5 mM ジチオスレイトールおよび0.2% (w/v) 牛血清アルブミンを含む25mM {2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタン スルホン酸}-Tris (pH 7.5)で平衡化しておいたセファデックス G-25ゲル(ファルマシアバイオテック製)のカラム(直径0.9cm, 高さ3.2cm)に通して脱塩し、酵素活性の測定に用いた。なお、以上の手順は $0-4^\circ\text{C}$ で行った。

3. 酵素活性の測定

PEPカルボキシラーゼの活性はSaitou *et al.* (1991)の方法、フマラーゼ(EC 4.2.1.2)の活性はWinter *et al.* (1982)の方法、カタラーゼ(EC 1.11.1.6)の活性はAebi (1974)の方法に従って測定した。

NAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性は340nmでのオキザロ酢酸に依存したNADHの酸化を追跡することによって測定した(Saitou *et al.*, 1995)。特に記述しない限り、標準的な反応混合液(1ml)の組成は0.12 mM NADHおよび0.5mM オキザロ酢酸を含む100 mM TES-Tris (pH 7.5)とした。酵素反応はオキザロ酢酸を添加することによって開始し、 30°C で酵素活性を測定した。

結 果

1. 細胞質ゾル画分とミトコンドリア画分の純度

細胞質ゾル画分およびミトコンドリア画分の純度を検討するため、各画分におけるPEPカルボキシラーゼ、フマラーゼおよびカタラーゼの活性を測定した。PEPカルボキシラーゼは細胞質ゾル(Winter *et al.*, 1982)、フマラーゼはミトコンドリア(Winter *et al.*, 1982)、カタラーゼはマイクロボディ(西村, 1987)に局在する酵素である。細胞質ゾル画分には全PEPカルボキシラーゼ活性の85.0%、全フマラーゼ活性の16.1%、全カタラーゼ活性の47.2%が存在した。ミトコンドリア画分には全PEPカルボキシラーゼ活性の11.0%、全フマラーゼ活性の74.4%、全カタラーゼ活性の50.4%が存在した(Table 1)。以下の実験では細胞質ゾル画分に存在するNAD-リンゴ酸脱水素酵素を細胞質ゾル型、ミトコンドリア画分に存在する

Table 1. Distribution of PEP carboxylase, fumarase and catalase activities to cytosolic and mitochondrial fractions.

Fraction	Enzyme	Distribution of activity (% of total)
Cytosol	PEP carboxylase	85.0
	Fumarase	16.1
	Catalase	47.2
Mitochondria	PEP carboxylase	11.0
	Fumarase	74.7
	Catalase	50.4

NAD-リンゴ酸脱水素酵素をミトコンドリア型と記述する。

2. NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす中間代謝物の効果

CAM型アイスプラントより精製したNAD-リンゴ酸脱水素酵素は、クエン酸、2-ケトグルタル酸およびピルビン酸によって酵素活性が阻害された (Saitou *et al.*, 1995). そこで、細胞質ゾル型およびミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性に及ぼすクエン酸、2-ケトグルタル酸およびピルビン酸の効果を検討した。細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素はクエン酸によって酵素活性が大きく阻害され、10mMクエン酸では約70%酵素活性が阻害された (Fig. 1 A)。一方、ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼすクエン酸の効果は小さく、10mMクエン酸によって約20%の酵素活性が阻害されたに過ぎなかった。

細胞質ゾル型およびミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素はいずれも2-ケトグルタル酸によって酵素活性が阻害され、2-ケトグルタル酸の濃度が高まるにつれて酵素活性の阻害の程度が大きくなった (Fig. 1 B)。しかし、2-ケトグルタル酸による酵素活性の阻害程度は細胞質ゾル型とミトコンドリア型で異なり、細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素で大きかった。

細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性はピルビン酸によって阻害されたが、ピルビン酸の濃度が高まっても活性阻害の程度はあまり変化しなかった (Fig. 1 C)。また、ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性に及ぼすピルビン酸の効果は小さかった。

クエン酸によるNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害の様式を検討するため、オキザロ酢酸濃度と酵素活性との関係に対してLineweaver-Burkの逆数プロットを行った。細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素ではクエン酸はオキザロ酢酸に対して競争阻害剤であり (Fig. 2 A)、ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素ではオキザロ酢酸に対して非競争阻害剤であった (Fig. 2 B)。また、2-ケトグルタル酸はオキザロ酢酸に対して競争阻害剤であった (データは示していない)。

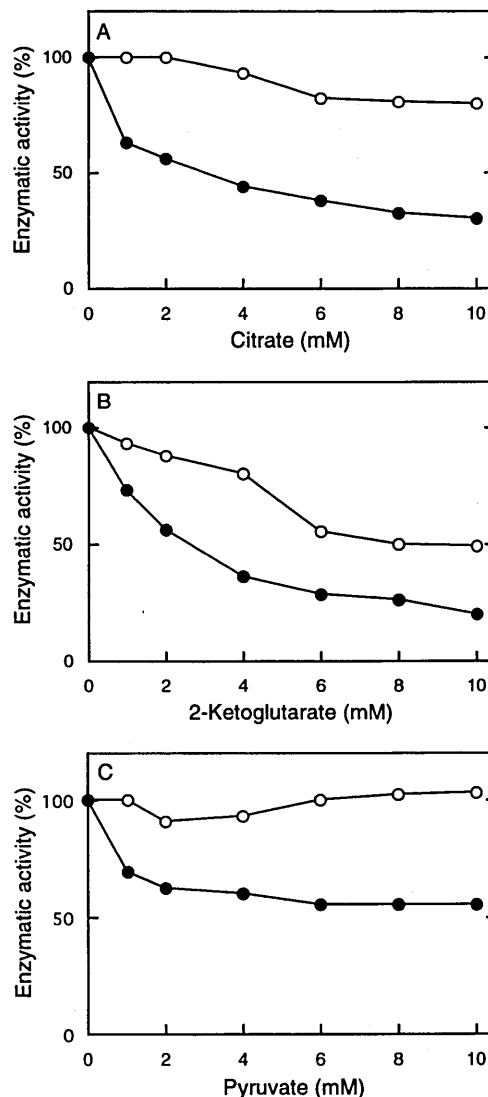


Fig. 1. Effect of the concentration of citrate (A), 2-ketoglutarate (B) and pyruvate (C) on the activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (●) and mitochondria (○) of *M. crystallinum* in the CAM mode.

3. NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす ATP, ADP および AMP の効果

CAM 型アイスプラントより精製した NAD-リンゴ酸脱水素酵素は ATP によって酵素活性が阻害された (Saitou *et al.*, 1995). そこで, 細胞質ゾル型およびミトコンドリア型の NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす ATP, ADP および AMP の効果を検討した. ATP, ADP および AMP の効果は細胞質ゾル型とミトコンドリア型で違いが認められなかった (Fig. 3).

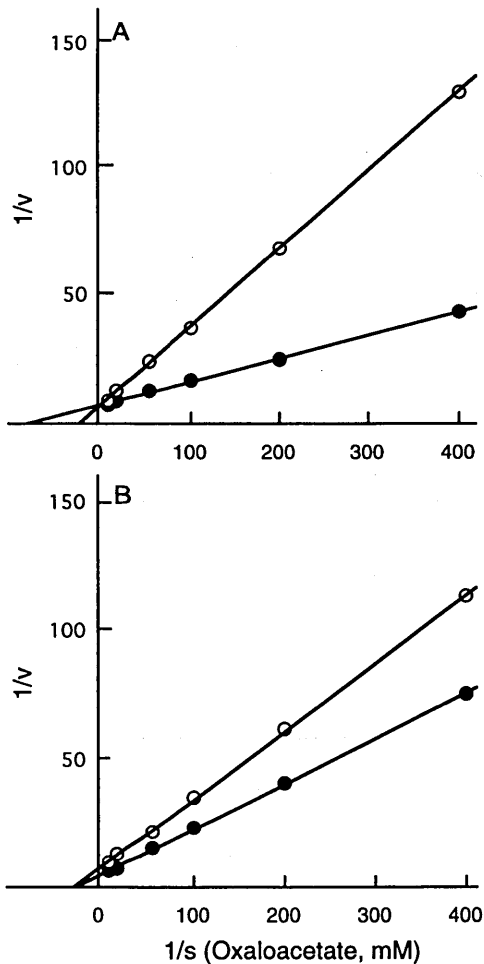


Fig. 2. Double reciprocal plots of activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (A) and mitochondria (B) as a function of the concentration of oxaloacetate in the presence of 5 mM (O) or in the absence (●) of citrate.

ATP は NAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害し, ATP の濃度が高まるにつれて酵素活性の阻害程度が大きくなった (Fig. 3 A). ADP も ATP と類似したパターンで NAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害したが, ATP に比較して活性阻害の程度がやや小さかった (Fig. 3 B). AMP による酵素活性の阻害は AMP の濃度が高まっても小さかった (Fig. 3 C).

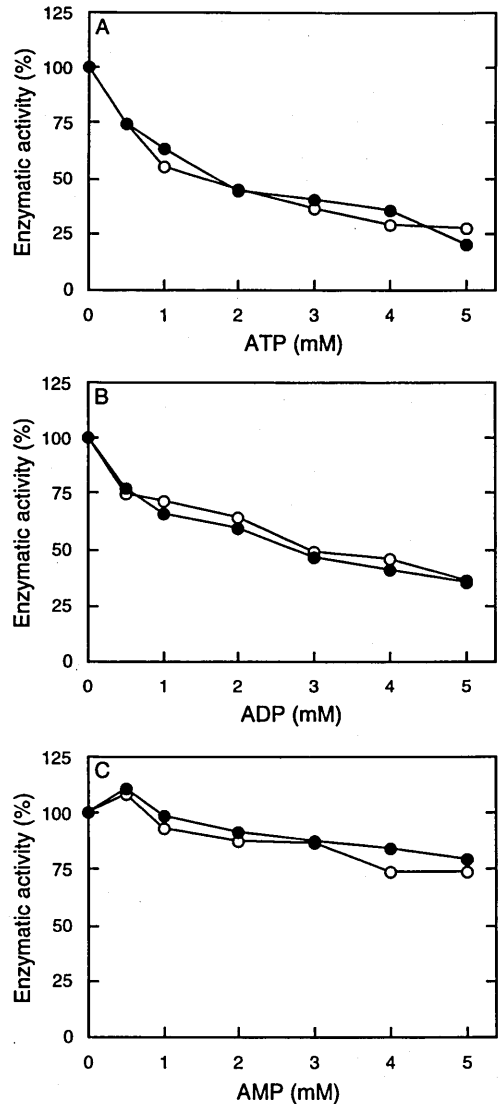


Fig. 3. Effect of the concentration of ATP (A), ADP (B) and AMP (C) on the activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (●) and mitochondria (○).

4. NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす pH の効果

細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性の最適pHは7.0から8.5の広い範囲にあった (Fig. 4 A). ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性の最適pHは8.5付近にあり, 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素に比較して最適pHの範囲が狭かった (Fig. 4 B).

3 mM クエン酸はすべてのpHにわたって細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害し, 特にpH 7.0での酵素活性の阻害程度が大きかった (Fig. 4 A). また, アルカリ側に比較して酸性側での酵素活性の阻害程度が大きく, 酵素活性が最大となるpHがクエン酸によってアルカリ側にシフトする傾向

が認められた.

ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素に関しても, すべてのpHにわたって3 mM クエン酸によって酵素活性が阻害された (Fig. 4 B). しかし, 酸性側に比較してアルカリ側で酵素活性の阻害の程度が大きく, 酵素活性が最大となるpHがクエン酸によって酸性側にシフトする傾向が認められた. また, ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素は, pH 8.5より低いpHでは細胞質ゾル型のものに比較してクエン酸による酵素活性の阻害程度が小さかった.

5. NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす無機リン酸の効果

CAM型アイズプラントより精製したNAD-リンゴ酸脱水素酵素では, クエン酸による酵素活性の阻害は無機リン酸によって解除された (Saitou *et al.*, 1995). そこで, 3 mM クエン酸, 3 mM ATP, 3 mM ADP および 3 mM 2-ケトグルタル酸存在下でのNAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす無機リン酸の効果を検討した. 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では, 添加した無機リン酸の濃度が高まるにつれてクエン酸による酵素活性の阻害が解除され, 100 mM 無機リン酸によって約89%にまで酵素活性が回復した (Fig. 5 A). ATP および ADP による細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害も無機リン酸によって解除されたが, 解除の程度は小さかった. 2-ケトグルタル酸による細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害は無機リン酸によって解除されなかった.

クエン酸存在下でのミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性は無機リン酸を添加することによって上昇し, クエン酸が存在しない時の酵素活性を上回った (Fig. 5 B). ATP および ADP によるミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害は無機リン酸の濃度が高まるにつれて解除され, 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素に比較して解除の程度が大きかった. 2-ケトグルタル酸によるミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害は無機リン酸によって解除されたが, 解除の程度が最大となる無機リン酸濃度が存在した.

無機リン酸は単独では細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害した (Fig. 6). ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では無機リン酸によって酵素活性が上昇した.

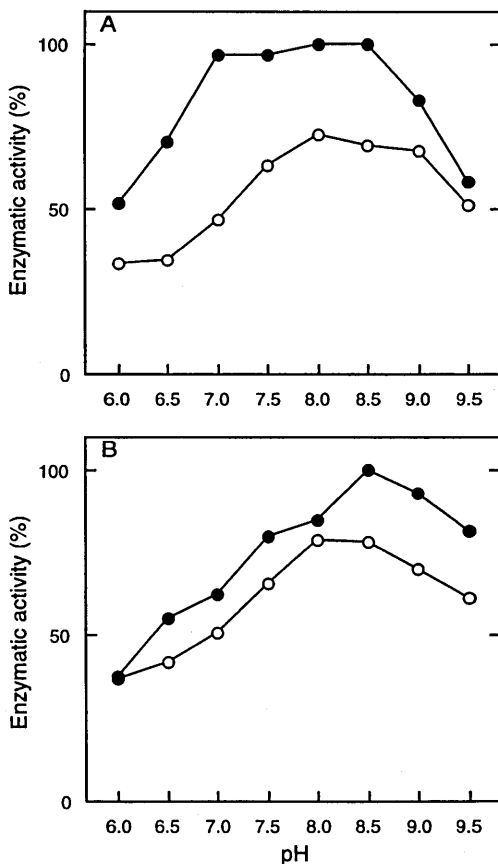


Fig. 4. Effect of pH on the activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (A) and mitochondria (B) in the presence of 3 mM (○) or in the absence (●) of citrate.

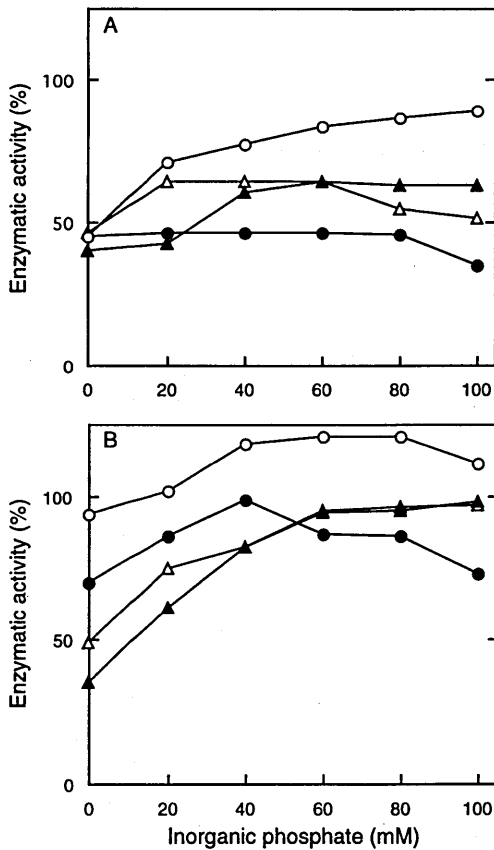


Fig. 5. Effect of the concentration of inorganic phosphate on the activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (A) and mitochondria (B) in the presence of 3 mM citrate (○), 3 mM ATP (▲), 3 mM ADP (△) and 3 mM 2-ketoglutarate (●). The activity in the absence of various solutes is taken as 100%.

考 察

CAM型アイスプラントの葉身には少なくとも3種類のNAD-リンゴ酸脱水素酵素が存在する (Saitou *et al.*, 1995) が、細胞質ゾルに局在するNAD-リンゴ酸脱水素酵素がCAM型光合成に直接関与すると考えられる (Kluge and Ting, 1978). 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性はクエン酸によって大きく阻害され、その活性阻害は無機リン酸によって解除された。CAM型アイスプラントの葉肉細胞には相当量のクエン酸およびイソクエン酸が存在してい

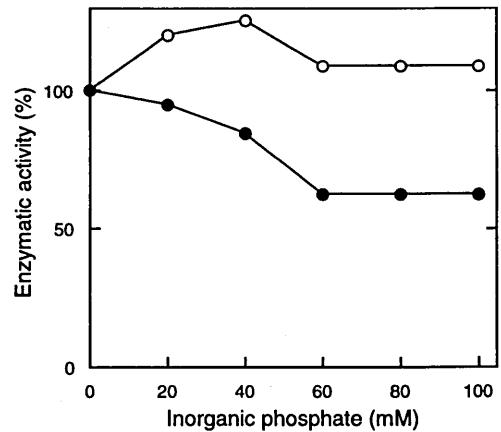


Fig. 6. Effect of the concentration of inorganic phosphate on the activity of NAD-malate dehydrogenase from cytosol (●) and mitochondria (○).

る (Winter *et al.*, 1981) ことから、葉肉細胞では無機リン酸によって細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性が調節されていることが考えられる。また、アイスプラントより抽出したPEPカルボキシラーゼの活性はリンゴ酸によって阻害されるが、その活性阻害は無機リン酸によって解除されることから、von Willert (1975)は無機リン酸がPEPカルボキシラーゼ活性の調節を介してリンゴ酸の蓄積を制御している可能性を報告している。したがって、無機リン酸はPEPカルボキシラーゼの活性に加えて細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を調節することによりリンゴ酸の蓄積過程を制御していることが考えられる。

ブタの心臓のNAD-リンゴ酸脱水素酵素は、ミトコンドリア型のものではクエン酸によって酵素活性が阻害されたが、細胞質ゾル型のものではクエン酸による酵素活性の阻害が認められなかった (Cennamo *et al.*, 1967). 一方、*Opuntia ficus-indica*の茎のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では、細胞質ゾル型とミトコンドリア型のアイソザイムでクエン酸による酵素活性の阻害パターンに大きな違いは認められなかった (Mukerji and Ting, 1969). CAM型アイスプラントの葉身のNAD-リンゴ酸脱水素酵素は、細胞質ゾル型のものではクエン酸によって酵素活性が大きく阻害されたが、ミトコンドリア型のものではクエン酸による酵素活性の阻害程度が小さかった。これらのことから、NAD-リンゴ酸脱水素酵素の代謝上の役割の違い

によってNAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼすクエン酸の効果は大きく異なると考えられる。

NAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼすATP, ADPおよびAMPの効果は細胞質ゾル型とミトコンドリア型のものでほぼ一致した。しかし, NAD-リンゴ酸脱水素酵素に及ぼす無機リン酸の効果は細胞質ゾル型とミトコンドリア型のもので大きく異なり, 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では無機リン酸によって酵素活性が阻害されたが, ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では無機リン酸によって酵素活性が上昇した。また, ATPおよびADPによるNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害は無機リン酸によって解除されたが, 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素に比較してミトコンドリア型のものでは活性阻害の解除の程度が大きかった。ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素はトリカルボン酸サイクルを構成する酵素であり, ミトコンドリア内のATP, ADPおよび無機リン酸の比率によってNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性が調節されていることが考えられる。

また, リョクトウ子葉のミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性はATPによって大きく阻害されたが, ADPおよびAMPによる活性阻害は小さかった(Asahi and Nishimura, 1973)。CAM型アイズプラントの葉身のミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素では, AMPによる酵素活性の阻害は小さかったが, ADPはATPと同様に酵素活性を大きく阻害した。この違いがトリカルボン酸サイクルを調節する上で生理的意味があるのか, 今後さらに詳細な検討が必要である。

要 約

CAM型アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) の葉身より細胞質ゾルおよびミトコンドリアに局在するNAD-リンゴ酸脱水素酵素(EC 1.1.1.37)を抽出し, 性質を比較検討した。クエン酸は細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を大きく阻害したが, ミトコンドリア型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素活性に及ぼす阻害効果は小さかった。また, 細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素はミトコンドリア型のものに比較して2-ケトグルタル酸およびピルビン酸による活性阻害の程度が大きかった。ATPおよびADPはNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害したが, 細胞質ゾル型とミトコンドリア型で違いは認められなかった。細胞質ゾル型のNAD-リン

ゴ酸脱水素酵素活性の最適pHは7.0から8.5の広い範囲にあったが, ミトコンドリア型ではpH8.5付近にあった。無機リン酸は細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素のクエン酸による活性阻害を部分的に解除したが, 2-ケトグルタル酸による活性阻害は解除しなかった。さらに, 無機リン酸はATPおよびADPによるNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害を解除したが, 解除の程度は細胞質ゾル型に比較してミトコンドリア型で大きかった。また, 無機リン酸は細胞質ゾル型のNAD-リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害したが, ミトコンドリア型のものでは活性を阻害しなかった。

文 献

- Aebi, H. 1974 Catalase. In "Methods of Enzymatic Analysis", ed. by H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York, pp.673-684
- Asahi, T. and M. Nishimura 1973 Regulatory function of malate dehydrogenase isoenzymes in the cotyledons of mung bean. *J. Biochem.*, 73: 217-225
- Cennamo, C., G. Montecuccoli and G. König 1967 Inhibition of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate. *Biochim. Biophys. Acta*, 139: 514-516
- Kluge, M. and C.B. Osmond 1972 Studies on phosphoenolpyruvate carboxylase and other enzymes of crassulacean acid metabolism of *Bryophyllum tubiflorum* and *Sedum praealtum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 66: 97-105
- Kluge, M. and I.P. Ting 1978 Control and modification of CAM. In "Crassulacean Acid Metabolism, Analysis of an Ecological Adaptation", ed. by M. Kluge and I.P. Ting, Springer-Verlag, Berlin. pp.73-106
- Longo, G. and J. Scandalios 1969 Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 62: 104-111
- Mukerji, S.K. and I.P. Ting 1969 Malic dehydrogenase isoenzymes in green stem tissue of *Opuntia*: isolation and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 131: 336-351
- 西村幹夫 1987 マイクロボディ。赤沢 堯・杉浦昌弘・西村幹夫編, 植物の細胞生物学的研究法。共立出版株式会社, 東京。pp.37-42
- Rocha, V. and I.P. Ting 1970 Tissue distribution of microbody, mitochondrial, and soluble malate dehydrogenase isoenzymes. *Plant Physiol.*, 46: 754-756
- Rocha, V. and I.P. Ting 1971 Malate dehydrogenase of leaf tissue from *Spinacia oleracea*: properties of three isoenzymes. *Arch.*

- Biochem. Biophys.*, **147**: 114-122
- Saitou, K., Y. Nakamura, Y. Kawamitsu, M. Matsuoka, M. Samejima and W. Agata 1991 Changes in activities and levels of pyruvate, orthophosphate dikinase with induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Jpn. J. Crop Sci.*, **60**: 146-152
- Saitou, K., W. Agata, T. Kawarabata, Y. Yamamoto and F. Kubota 1995 Purification and properties of NAD-dependent malate dehydrogenase from *Mesembryanthemum crystallinum* L. exhibiting crassulacean acid metabolism. *Jpn. J. Crop Sci.*, **64**: 760-766
- Ting, I. P., I. W. Sherman and W. M. Dugger 1966 Intracellular location and possible function of malic dehydrogenase isozymes from young maize root tissue. *Plant Physiol.*, **41**: 1083-1084
- Ting, I. P. 1985 Crassulacean acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**: 595-622
- von Willert, D. J. 1975 Stomatal control, osmotic potential and the role of inorganic phosphate in the regulation of the crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Sci. Lett.*, **4**: 225-229
- Winter, K. and D. J. von Willert 1972 NaCl-induzierter Crassulaceen-Saurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**: 166-170
- Winter, K., G. E. Edwards and J. A. M. Holtum 1981 Nocturnal accumulation of malic acid occurs in mesophyll tissue without proton transport to epidermal tissue in the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **68**: 355-357
- Winter, K. 1982 Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared, de-salted leaf extracts of the crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, **154**: 298-308
- Winter, K., J. G. Foster, G. E. Edwards and J. A. M. Holtum 1982 Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C₃ photosynthetic characteristics or performing crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.*, **69**: 300-307
- Winter, K., G. P. Arron and G. E. Edwards 1986 Malate decarboxylation by mitochondria of the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Physiol.*, **27**: 1533-1539
- Yamazaki, R. K. and N. E. Tolbert 1968 Malate dehydrogenase in leaf peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **178**: 11-20

Summary

The cytosolic and mitochondrial forms of NAD-malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37), which were extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in the CAM mode, were compared with respect to their enzymatic properties. Citrate was a strong inhibitor for the activity of the cytosolic enzyme but a weak one for the activity of the mitochondrial enzyme. The cytosolic enzyme was inhibited by 2-ketoglutarate and pyruvate more than the mitochondrial enzyme. There were no differences in inhibitions by ATP and ADP between the isozymes. The optimal pH for the activity of the cytosolic enzyme was over a wide range from 7.0 to 8.5, whereas that for the activity of the mitochondrial enzyme was around 8.5. Inorganic phosphate reversed the inhibition of the cytosolic enzyme by citrate partially but not the inhibition by 2-ketoglutarate. Inorganic phosphate reversed the inhibitions of the mitochondrial enzyme by ATP and ADP more than that of the cytosolic enzyme. Inorganic phosphate inhibited the cytosolic enzyme but not the mitochondrial enzyme.