

## 水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究VII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	374
掲載ページ	p. 317-321
発行年月	1971年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所  
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



## 水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究—Ⅶ.

## ニジマス肝臓中のヌクレオチドの死後変化\*

関 伸 夫

(1970年10月3日受理)

## Studies on the Organic Phosphates in the Viscera of Aquatic Animals—VII.

## Post-mortem Degradation of Nucleotides in the Liver of Rainbow Trout

Nobuo SEKI\*\*

Living rainbow trouts, *Salmo gairdnerii irideus*, were decapitated and stored at an ambient temperature of 0°C. After various lengths of time the livers were homogenized in cold 0.6 N perchloric acid, and nucleotides, nucleosides and bases extracted were determined by anion-exchange chromatography. The details of the analytical procedures have been described previously.

Results obtained are summarized in Table 1 and Figs. 1~4. ATP and ADP decreased rapidly with the accumulation of AMP and IMP. Since the dephosphorylation of nucleotide monophosphates is slower than deamination, AMP and IMP levels were high at the beginning, but after 6 hours both nucleotides and inosine decreased with the accumulation of hypoxanthine and xanthine. These changes are characteristic in comparison with those in the doasal and red lateral muscles which show the accumulation of IMP and inosine for a long time. The level of adenosine was low throughout the experimental period. From these results, it may be postulated that the main pathway of the breakdown of purine nucleotides in the liver proceeds via AMP, IMP (adenosine), inosine, hypoxanthine to xanthine.

Nicotinamide-adenine dinucleotide was broken down to ADP-ribose and nicotinamide. The UDP-sugars, which predominate among uracil nucleotides, disappeared rapidly.

数種の水産動物肝(睪)臓中のヌクレオチド、ヌクレオシドおよび塩基の分布<sup>1-5)</sup>について検討してきたが、これらの分布は動物の種によつてかなりの差が認められる。この種による特異性はヌクレオチド代謝のその反映とみられるが、水産動物肝(睪)臓組織におけるヌクレオチド代謝に関する報告は少ない。

周知のごとく、動物の死後の代謝物質の濃度は細胞中の酵素活性、とりわけ分解酵素の活性と密接な関連を持つている。したがつて、死後の代謝物質の濃度を測定することによつて分解経路の推定および反応の律速段階の推定が可能である。そこで臓器組織のヌクレオチド代謝の研究の一段階として、ニジマス肝臓におけるヌクレオチドの死後変化を調べ、ヌクレオチド分解の経路などについての推定を行なつた。

## 実験方法

ニジマスは体長 22~24 cm, 体重 200~220 g のものを養魚場から入手した。魚は水揚げ後刺殺し、4尾1

\* 本報告に使用した略号は前報<sup>5,6)</sup>のとおりである。

\*\* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

組にしてポリエチレン製の袋に入れ、0°C で保管した。水揚げ時の池の水温は 9°C であった。一定時間おきに肝臓を摘出し、冷 0.6 N HClO<sub>4</sub> を加えてホモジナイズし、ヌクレオチド類を抽出した。抽出液は 6,000 r. p. m., 10 分間遠心分離し、得られた上清を既報の方法<sup>1)</sup> で中和、活性炭吸着、脱着を行なった後、100 ml まで 25°C で減圧濃縮し (pH 7.2), カラムクロマトグラフィーに供するまで -20°C に保管した。0 時間のグループは魚を水揚げしてから酸抽出までに要した時間は約 40 秒である。以上の操作はできるかぎり低温下に行なった。一定時間おきに得た肝臓 11 g 相当の抽出液を Dowex 1-X 8 (ギ酸型, 100-200 メッシュ, 1×11 cm) カラムに添加し、既報の方法<sup>1)</sup> で分画定量した。ヌクレオシド・塩基の画分<sup>6)</sup> は Dowex 1-X 2 (塩酸型, 200-400 メッシュ) カラムを使用した。この場合はカラムの径 1 cm で樹脂高はヌクレオシド・塩基の量により加減したが、4~7 cm である。

ペーパークロマトグラフィーは東洋汙紙 No. 3 を用いた。展開剤はヌクレオチドには、M-酢酸アンモニウム緩衝液, pH 7.5 (または pH 3.8)-95% エタノール (30:75 v/v) を、ヌクレオシド・塩基には水 (pH 10), 水飽和ブタノール-15 N アンモニア水 (100:1 v/v), イソプロピルアルコール-飽和硫酸アンモニウム-水 (2:79:19 v/v/v) を使用した。紫外線吸収スペクトルは島津自記紫外分光光度計を用いて測定した。

UDP-糖誘導体は 0.01 N HCl 中で 100°C, 15 分間加熱し、糖部分を遊離させ、少量の活性炭でヌクレオチド部分を吸着除去したのち、糖部分を東洋汙紙 No. 50 に標準品とともにスポットし、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3 v/v/v) で展開した。糖は汙紙にアニリン水素フタレートに噴霧して検出した。また N-アセチルグルコサミンと N-アセチルガラクトサミンはホウ酸処理<sup>7)</sup> を行なった汙紙で展開、分離したのちそれぞれ汙紙から溶出し、REISSIG らの方法<sup>8)</sup> により比色定量した。ウロン酸はナフトレゾルシン反応により検出した。

ピリジンヌクレオチドは汙紙をメチルエチルケトン処理<sup>9)</sup> をしたのち、紫外線ランプ上でスポットを検出した。総リン酸量は FISKE and SUBBAROW 法<sup>10)</sup>, リボースはオルシノール反応<sup>11)</sup> により定量した。

核酸は SCHMIDT, THANNHAUSER, SCHNEIDER の方法<sup>12)</sup> により DNA と RNA を分画し、DNA をインドルール反応<sup>13)</sup> で、RNA をオルシノール反応<sup>11)</sup> で定量した。核酸含量は、DNA は標準に Sigma Chem. Co. 製の DNA (Type III, from salmon) を、RNA は本教室で酵母より抽出したものを使用し、これら標準品に対する相対量で示した。

### 実験結果および考察

時間経過に伴うヌクレオチド、ヌクレオシドおよび塩基のクロマトパターンの変化を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。また各成分の定量値を Table 1 に示した。

即殺直後 (Table 1 の 0 時間) では、AMP は 0.49  $\mu$ moles/g 存在しているが生存状態では、著者は BUCHER and SWAFFIELD<sup>14)</sup> がラット肝臓で行なった実験から推定して AMP の含量はずつと少なく、アデニンヌクレオチドは ATP, ADP として存在すると考えている。ヌクレオシド・塩基は検出されなかつた。グアニンヌクレオチドでは GTP と GMP が検出された。シトシンヌクレオチドは CDP 誘導体が見いだされたのみである。ウラシルヌクレオチドは UDP 糖誘導体で占められているが、UDP-N-アセチルヘキソサミン, UDP-ヘキソース, UDP-ウロン酸はいずれもおよそ 0.3  $\mu$ moles/g 程度が存在している。UDP-N-アセチルヘキソサミンは UDP-N-アセチルグルコサミンと UDP-N-アセチルガラクトサミンからなっており両者の比は 2:1 である。UDP-ヘキソースは UDP-グルコースと UDP-ガラクトースから成る。ピリジンヌクレオチドでは、NAD と ATPR が主である。このことは、還元型の NAD と NADP は酸抽出の際に分解<sup>15,16)</sup> され、それぞれ ADPR と ATPR になることを考えると、ニジマス肝臓では NAD は主として酸化型として、NADP は還元型として存在していることになる。ここで述べたニジマス肝臓のヌクレオチドパターンは先に報告したコイ<sup>2)</sup> およびヒメマス<sup>4)</sup> 肝臓のヌクレオチドパターンと類似している。

肝臓中のヌクレオチドの死後変化を検討する上で、核酸が時間経過とともに分解し、酸可溶画分に入る恐

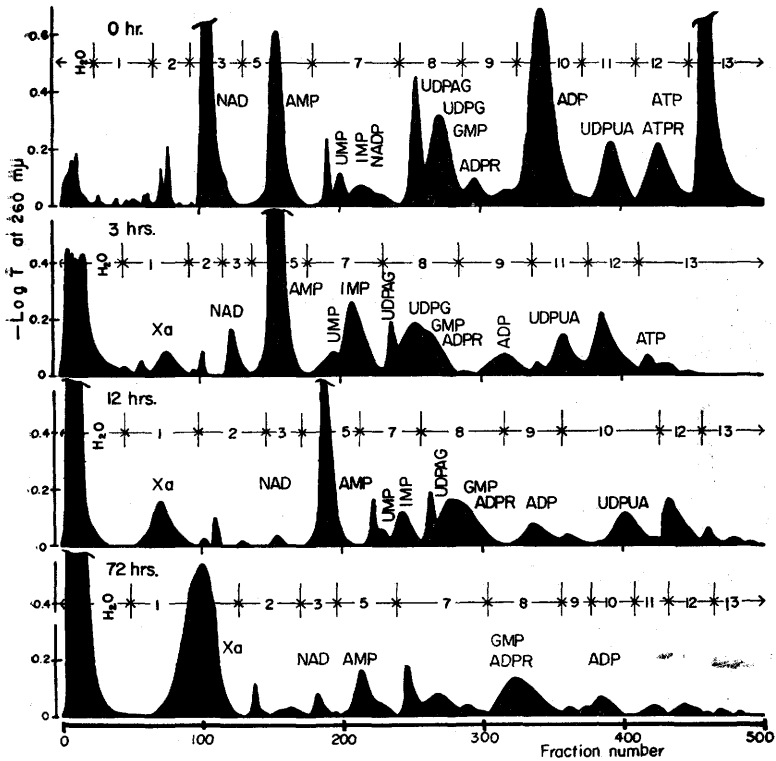


Fig. 1. Elution patterns of acid-soluble nucleotides and related compounds in the liver of rainbow trout stored at 0°C for various lengths of time. Extract from each 11 g of the liver was separated on a Dowex 1-X 8 formate column (1×11 cm) by stepwise elution. Each 10 ml fraction was collected and absorbance at 260 m $\mu$  was measured. Eluting solutions were: H<sub>2</sub>O, ① 0.005 N formic acid (FA), ② 0.01 N FA, ③ 0.02 N FA, ⑤ 0.1 N FA, ⑦ 0.1 N FA+0.1 N sodium formate (SF), ⑧ 0.1 N FA+0.2 N SF, ⑨ 0.1 N FA+0.3 N SF, ⑩ 0.1 N FA+0.4 N SF, ⑪ 0.1 N FA+0.5 N SF, ⑫ 0.1 N FA+0.7 N SF, ⑬ 0.1 N FA+1.0 N SF.

れがあるが、Fig. 3 に示したように、本実験の条件下では核酸の分解は無視できる。

アデニンヌクレオチドの変化は Fig. 4 から明らかなように、ATP と ADP は急速に減少する。これとは逆に AMP, IMP は一時増大するが IMP の増加は少なく、ヌクレオチドはすべて 6 時間以内に減少の傾向を示す。ヌクレオチドの減少に伴って、HxR が増加してくるが、これも 6 時間をピークに以後減少を示し、Hx と Xa が蓄積してくる。AdR は終始低含量である。Ad はやや増加する。ここに示した肝臓でのアデニンヌクレオチドの変化は斎藤ら<sup>17)</sup>の報告しているニジマス筋肉や血合筋での変化の傾向とは異なる。即ち、筋肉では IMP の、血合筋では HxR の蓄積が長時間にわたって続き AMP は終始低含量のままであるが、肝臓では AMP が一時的に増加し、次いで Hx、さらに酸化された Xa が蓄積される。血合筋は筋肉と肝臓の中間的位置を示している。サケ肝臓<sup>3)</sup>でも死後 Xa が蓄積されるが、BUSCH ら<sup>18)</sup>はウサギ肝臓でのプリンヌクレオチドの死後変化を研究しており、その結果とここで得られた分解のパターンを比較すると、ウサギで AdR が増加する点を除けば、良く似ており、いずれも Xa が蓄積される。AMP の分解に関しては、ウサギでは AdR が増加するなどの理由から AMP は主として AdR 経路で分解されるとしている。ニジマス肝臓では AdR の増加は見られないが IMP が増加するので、ヌクレオチドレベルで脱アミノが起っていることは明らかである。しかし IMP の増加はニジマス筋肉<sup>17)</sup>に較べると著しく少なく AMP

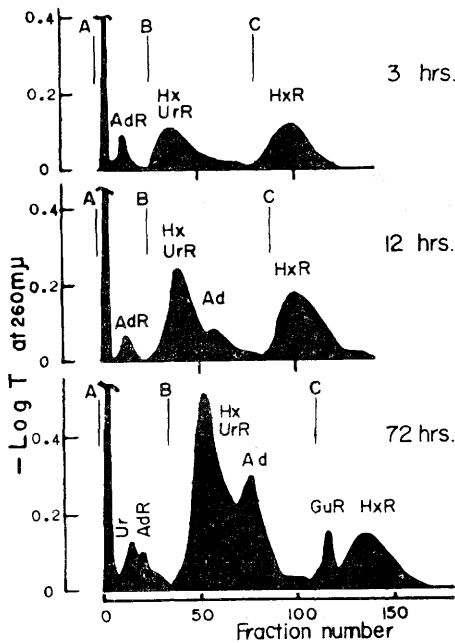


Fig. 2. Elution patterns of nucleosides and bases. Each eluate with  $H_2O$  in Fig. 1 was concentrated and rechromatographed on a Dowex 1-X2 resin<sup>6)</sup>. Eluting solutions used were: A, 0.2 N  $NH_4OH$ -0.02 N  $HCl$ -0.01 N  $Na_2B_4O_7$ ; B, 0.15 N  $NH_4OH$ -0.03 N  $HCl$ -0.01 N  $Na_2B_4O_7$ ; C, 0.05 N  $NH_4OH$ -0.05 N  $HCl$ -0.01 N  $Na_2B_4O_7$ . Fraction size was 10 ml.

Table 1. Changes of nucleotides, nucleosides and bases in the liver of rainbow trout during storage at  $0^\circ C$ .\*

Compound	Hours					
	0	3	6	12	24	72
ATP	0.84	0.09	0.07	0.04	0.02	0.04
ADP	0.88	0.13	0.13	0.13	0.10	0.07
AMP	0.49	0.79	0.66	0.35	0.20	0.14
IMP	0.04	0.20	0.17	0.08	0.07	0.06
Adenosine	0	0.03	0.04	0.03	0.02	0.03
Adenine	0	0.07	0.08	0.09	0.23	0.23
Inosine	0	0.27	0.65	0.45	0.40	0.45
Hypoxanthine	0	0.08	0.13	0.24	0.47	0.65
Xanthine	0.02	0.11	0.13	0.29	0.64	1.27
GTP	0.03	0				
GMP	0.09	0.14				
Guanosine	0	0.01				
NAD	0.44	0.03	0.02			0.01
NADP	0.04	0.07	0.07			0.04
ADPR	0.07	0.17	0.16			0.16
ATPR	0.32	0.23	0.14			0.07
Nicotinamide		0.54	0.42			0.59
UDP-AG**	0.22	0.06				
UDP-AGal	0.10					
UDP-hexoses	0.38	0				
UDP-uronic acids	0.27	0.17				
UDP	0.05	0				
UMP	0.08	0.04				
Uridine	0	0.05				

\* Values are expressed as  $\mu moles/g$  wet weight.

\*\* UDP-AG: UDP-N-acetylglucosamine, UDP-AGal: UDP-N-acetylgalactosamine.

デアミナーゼの活性は筋肉に較べて弱いのであろう。AMP と IMP はいずれも 5' スクレオチダーゼ,あるいはフォスファターゼにより脱リン酸を受けるが,この段階はあまり活性は強くないようである。魚類肝臓<sup>19)</sup>には AdR デアミナーゼが存在することが知られているので AdR 経路の分解もおこっているものと推定される。恐らく AdR が死後増加しないのは次の理由によるのであろう。AMP, IMP, GMP が蓄積する事実から 5' スクレオチダーゼが律速段階になっており,AMP が脱リン酸して生成した AdR は強い AdR デアミナーゼによつて直ちに HxR に脱アミノされるためであると推定される。HxR から先は Hx, Xa, 尿酸の順に分解されると考えられるが,尿酸は本実験では少量が検出されたのみである。AMP の分解については次報でさらに検討する。

グアニンスクレオチドについては, GTP から GMP を経て Gu に分解されるものと考えられるが,本実験からはグアニンスクレオチドの分解経路については明らかにできなかつた。またウラシルスクレオチドではその主成分たる UDP-糖誘導体はすみやかに消失する。

NAD も急速に分解を受けるようであるが, ADPR とニコチンアミドの増加が見られることからこの両者に分解されるのであろう。この点はニジマス肝臓のホモジネートを用いた実験<sup>20)</sup>からも支持される。

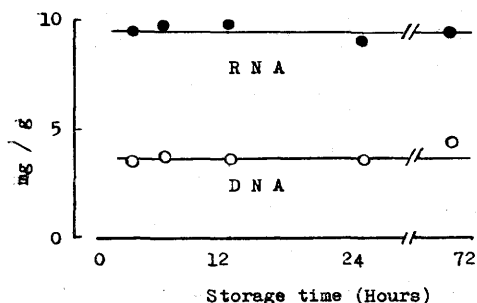


Fig. 3. Changes of RNA and DNA in the liver of rainbow trout during storage at 0°C.

### 要 約

ニジマスを 0°C に保管して死後の肝臓中のヌクレオチド変化を調べた。即殺直後には、ヌクレオチドと塩基成分はほとんど存在していないが、死後高エネルギー成分の急速な分解とともに増大する。アデニンヌクレオチドの分解は肝臓では筋肉や血合筋とは異なるパターンを示し、筋肉に見られるような IMP の長時間にわたる著しい蓄積はなく、急速に Xa にまで分解される。NAD は ADPR とニコチンアミドに分解され、UDP-糖誘導体も急速に消失する。

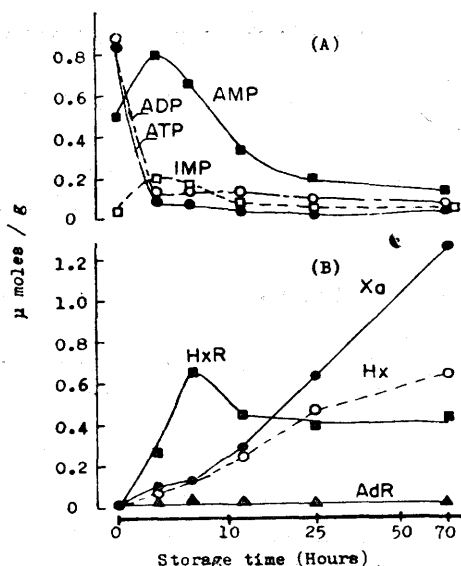


Fig. 4. Changes of purine nucleotides (A) and nucleosides and bases (B) in the liver of rainbow trout during storage at 0°C.

本研究の遂行にあたり終始御懇切な御指導を賜わつた斎藤恒行教授に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 関 伸夫・新井健一・斎藤恒行: 北大水産彙報, **17**, 184~192 (1967).
- 2) 関 伸夫・斎藤恒行: 同誌, **18**, 231~239 (1967).
- 3) 関 伸夫・同誌, **19**, 46~51 (1968).
- 4) 関 伸夫・金谷俊夫・斎藤恒行: 同誌, **20**, 211~216 (1969).
- 5) 関 伸夫: 本誌, **36**, 241~245 (1970).
- 6) 関 伸夫・金谷俊夫・斎藤恒行: 本誌, **35**, 690~694 (1969).
- 7) E. CABIB, L. F. LELOIR, and C. E. CARDINI: *J. Biol. Chem.*, **203**, 1055~1070 (1953).
- 8) J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER, and L. F. LELOIR: *ibid.*, **217**, 959~966 (1955).
- 9) E. KODICEK and K. K. REDDI: *Nature*, **168**, 475~477 (1951).
- 10) C. E. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375~400 (1925).
- 11) G. ASHWELL: in "Methods in Enzymology" (S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, ed.), Vol. 3, 73~105, Academic Press, New York (1957).
- 12) 渡辺 格・三浦謹一郎: 実験化学講座, **23**, 283~284, 丸善, 東京 (1965).
- 13) G. CERIOTTI: *J. Biol. Chem.*, **198**, 297~303 (1952).
- 14) N. L. R. BUCHER and M. N. SWAFFIELD: *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 445~459 (1966).
- 15) O. H. LOWRY, J. V. PASSONNEAU, and M. K. ROCK: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2756~2759 (1961).
- 16) H. W. HELDT, M. KLINGENBERG, and K. PAPANBERG: *Biochem. Z.*, **342**, 508~517 (1965).
- 17) T. SAITO, K. ARAI, and T. YAJIMA: *Nature*, **184**, 1415~1416 (1959).
- 18) E. W. BUSCH, I. M. VON BORCKE, and B. MARTINEZ: *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 547~556 (1968).
- 19) P. F. MA and J. R. FISHER: *Comp. Biochem. Physiol.*, **19**, 799~807 (1966).
- 20) 関 伸夫・佐野憲子・斎藤恒行: 日本水産学会年会発表 (1970).