

## 水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究VIII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	関, 伸夫
巻/号	37巻4号
掲載ページ	p. 322-325
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産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 水産動物臓器の有機リン酸化合物に関する研究—Ⅷ.

## ニジマス肝臓における AMP の分解について\*

関 伸 夫

(1970 年 10 月 3 日受理)

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

## Degradation of Adenosine 5'-monophosphate in the Liver of Rainbow Trout

Nobuo SEKI\*\*

It was shown that the 7,000×g supernatant fraction of 0.13 M KCl homogenates of the fish liver contained both AMP deaminase and adenosine deaminase activities.

Both of these activities were separated from each other by Sephadex G-200 gel filtration. These results clearly indicate that there are two degradation pathways for AMP in the liver of rainbow trout: (1) AMP is first deaminated to IMP which is subsequently dephosphorylated to inosine, and (2) it is first dephosphorylated to adenosine which is subsequently deaminated to inosine.

The activity of the AMP deaminase increased with the addition of ATP.

先報<sup>1)</sup>でニジマス肝臓中のヌクレオチドの死後変化について検討した。肝臓を 0°C で保管すると、ATP および ADP は急速に分解され、これに伴って AMP, IMP 次いで HxR が増加してくるが、これらの化合物も 6 時間をピークに減少し、代つて Hx と Xa が蓄積してくる。これらの結果から肝臓でのアデニンヌクレオチドは ATP・ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xa の経路で分解されることを推定した。また AMP は AdR 経路でも分解される可能性があることを指摘した。しかしながら、AMP のこれら両分解経路の存否について、あるいは主としてどちらの経路によって分解されるかなどについては十分な結論は得られていない。ここではニジマス肝臓には AMP 分解に関与する AdR デアミナーゼと AMP デアミナーゼの両活性ともに存在していることを確認したので報告する。

## 実 験 方 法

**試料** ニジマスは体長 22~24 cm, 体重 200~220 g のものを養魚場より入手して用いた。

**試薬** AMP, ATP および AdR は Boehringer 製のものを水に溶かし NaOH で pH 7.0 に中和して -20°C に凍結保管した。2-メルカプトエタノール, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> は和光純薬工業株式会社製, Sephadex G-200 および blue dextran 2000 は Pharmacia 製を使用した。

**粗酵素液の調製** ニジマスを刺殺後直ちに肝臓を摘出し、25 倍量の 0.13 M KCl を加えてホモジナイズした。ホモジネートを 7,000×g, 15 分間遠心分離し、得られた上清をガーゼで濾過したものを粗酵素液とした。

\* 本報告に使用した略号は前報<sup>2,4)</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)

**酵素活性の測定** AMP デアミナーゼの活性は次の反応系により測定した。AMP 2.5 mM, ATP 1.25 mM, Tris (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 100 mM,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  75 mM, 粗酵素液 (蛋白量 3~4 mg/ml) 0.5 ml, 全量 2 ml。AdR デアミナーゼ活性は、上記反応系から AMP と ATP を除き、かわりに AdR 1.25 mM を加えて測定した。反応温度はいずれも 30°C で行ない、5%  $\text{HClO}_4$  2 ml を加えて反応を停止させた。除蛋白後、次の方法により生成したアンモニアまたは IMP あるいは HxR 量を定量して酵素活性を求めた。

**反応生成物の定量** アンモニアは除蛋白液の一部をとつて CONWAY の微量拡散装置の副室に入れ 50% KOH を等量加えてアルカリ性にし 37°C, 90 分間アンモニアを拡散させ N/50  $\text{H}_2\text{SO}_4$  に吸収させた。これをネスラー反応により 425  $\mu\text{m}$  で比色定量した。ネスラー試薬は THOMPSON らの方法<sup>3)</sup> により調製した。

スクレオチドは除蛋白液 2 ml をとつて、KOH で中和 (pH 6.5) し、氷冷して生成した  $\text{KClO}_4$  を沈澱させ上清をイオン交換クロマトグラフィーに供した。イオン交換樹脂は Dowex 1-X 2 ( $\text{Cl}^-$ ,  $\phi$  1×6 cm) を使用し、次の 1)~4) の塩酸系溶出剤により各成分を分離溶出した。10 ml ずつを分取し、260  $\mu\text{m}$  での吸光値を測定した。1)  $\text{H}_2\text{O}$  (スクレオチド), 2) 0.025 N HCl (AMP および IMP), 3) 0.01 N HCl+0.02 N NaCl (ADP), 4) 0.01 N HCl+0.2 N NaCl (ATP)。

スクレオチドは Dowex 1-X 2 ( $\text{Cl}^-$ ,  $\phi$  1×3 cm) カラムを用い、 $\text{NH}_4\text{OH} \sim \text{HCl} \sim \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  系溶出剤<sup>4)</sup> により分離溶出を行なつた。

無機リン酸は高橋法<sup>5)</sup> により定量した。蛋白量はビュレット法により求めた。

**ゲル濾過** LOWENSTEIN らの方法<sup>6)</sup> に準じて次のとおり行なつた。Sephadex G-200 を 0.1% の 2-メルカプトエタノールを含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 中で加温膨潤させ、冷却後径 2.2 cm のカラムに 28 cm 高になるようにゲルを充填した。ニジマス肝臓の 0.13 M KCl ホモジネートを 105,000×g で 30 分間遠心分離して得た上清 4 ml (蛋白量 70.8 mg) をゲルベットに添加したのち、上述の緩衝液で溶出し 3 ml ずつを分取した。ブルーデキストランは 630  $\mu\text{m}$  で、蛋白量は 280  $\mu\text{m}$  での吸光値で表わした。酵素反応は各画分から 0.5 ml をとり、30°C で 30 分間行なつた。

### 実験結果および考察

AMP から HxR への分解は 2 つの経路が考えられる。まずスクレオチドレベルで脱アミノを受け IMP が生成されそれが脱リン酸されて HxR になる場合と、先に脱リン酸され AdR を生じそれが脱アミノを受けて HxR を生成する場合である。AMP も IMP もともに 5' スクレオチダーゼあるいは組織中に広く分布するフォスファターゼにより脱リン酸されるので、組織中の AMP の分解は AMP デアミナーゼと AdR デアミナーゼの存否や活性の強さにより左右される。ところで魚類筋肉には強い AMP デアミナーゼ活性が知られているが<sup>7-9)</sup>、魚類肝臓での存否は明らかにされていない。

まず AMP あるいは AdR を基質として 30°C でニジマス肝臓の粗酵素液と反応させた時の生成物をイオン交換クロマトグラフィーにより分析してみると Fig. 1 および Fig. 2 に示すような結果をうる。Fig. 1 は AMP を基質にした場合で、この場合は IMP が、また Fig. 2 からは AdR を基質にした時には HxR が生成することを示しており、その生成量はいずれも AMP あるいは AdR の減少量とよく一致している。したがってニジマス肝臓には AMP デアミナーゼと AdR デアミナーゼの両酵素活性が存在することが暗示される。また AMP を基質にした場合、AMP の脱リン酸によるスクレオチドの生成は極めて少量であり、ここで用いた粗酵素液中の脱リン酸酵素の活性は微弱であることがわかる。これは脱リン酸酵素<sup>10)</sup> が果粒成分と密接な関係にあり、0.13 M KCl によつては抽出され難いためと思われる。なお、脱アミノ活性は 0.13 M KCl ホモジネートを遠心分離した時には、その上清部にほとんどの活性が回収される。また本実験では反応を pH 7.2 で行なつたが、これはニジマス肝臓ホモジネートによる AMP デアミナーゼ活性の至適 pH がほぼ中性付近にあり、粗 AdR デアミナーゼ活性の至適も pH 6.5~8.0 にあるためである。

Fig. 1 の結果から AMP が脱アミノを受けて IMP を生成する速度は 0.012  $\mu\text{moles/min}$  である。この

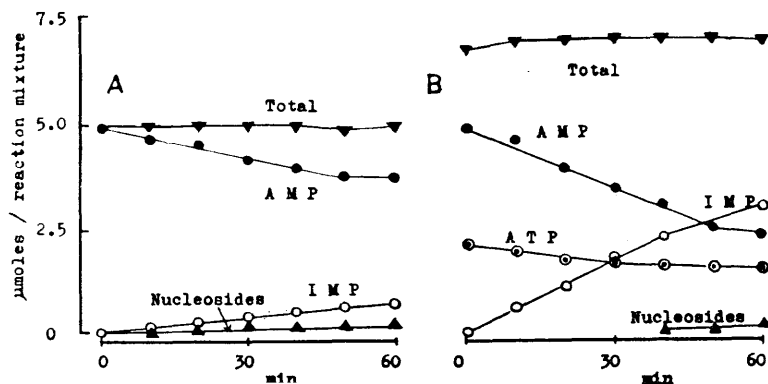


Fig. 1. Degradation of AMP by 0.13 M KCl extract of the liver in the absence (A) or presence (B) of ATP. The reaction was carried out at 30°C and was stopped by addition of perchloric acid at various intervals. The reaction mixtures were analyzed by anion-exchange chromatography.

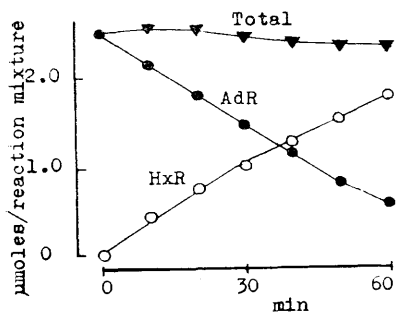


Fig. 2. Conversion of adenosine to inosine by 0.13 M KCl extract of the liver at 30°C.

反応は AMP の 1/2 量の ATP を添加するとおおよそ 4.8 倍に増大する。この場合添加した ATP は反応中にほとんど変化なく IMP の生成量は AMP の減少量とよく一致している (Fig. 1-B)。哺乳動物肝臓の AMP デアミナーゼは ATP により活性化されるものが知られているが<sup>11-13</sup>、ニジマス肝臓でも基質 AMP に ATP を添加した場合には明らかに IMP の生成量は増大する。

ニジマス肝臓に AdR デアミナーゼが存在することは Fig. 2 から暗示されるが、AMP デアミナーゼ活性測定と同条件での AdR から HxR の生成量は 0.031  $\mu\text{moles}/\text{min}$  である。

この値は AMP を基質にした場合の IMP の生成量より大きい、ATP 添加の場合に比較すれば小さい。ニジマスの死後肝臓中に AdR が全く蓄積されない<sup>14</sup> ことから、AMP の脱リン酸の速度は AdR の脱アミ

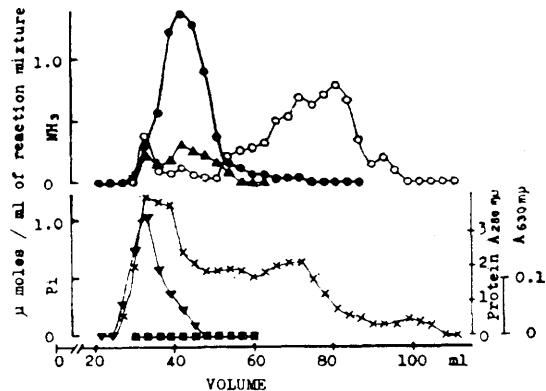


Fig. 3. Gel filtration of crude extract of the liver of rainbow trout on Sephadex G-200. Four ml of 105,000 $\times$ g supernatant of 0.13 M KCl homogenate (70.8 mg protein) was applied to a column (2.2 $\times$ 28 cm) and eluted with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0.1% 2-mercaptoethanol. Each 3 ml fraction was collected and analyzed for activities of adenosine and AMP deaminases and adenylate phosphatase.  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ , ammonia released from AMP;  $\bullet$ - $\bullet$ , ammonia released from AMP in the presence of ATP;  $\circ$ - $\circ$ , ammonia released from adenosine;  $\blacksquare$ - $\blacksquare$ , orthophosphate;  $\times$ - $\times$ , protein ( $A_{280m\mu}$ );  $\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$ , blue dextran 2000 ( $A_{630m\mu}$ ).

ノの速度よりはるかに遅いものと考えられる。ATP量は死後急速に減少するので、これに伴つてAMPデアミナーゼの活性は低下してくる。したがつて死後のAMPの分解はATP含量や脱リン酸酵素の活性の程度などによつても変化をきたすと考えられる。

以上の結果から、ニジマス肝臓ではAMPの脱アミノもAdRの脱アミノも起ることが示されたが、この事実はさらにゲル濾過によつてこの2つの酵素活性が互に分離されることから確認された(Fig. 3)。この結果からもAdRデアミナーゼとそれよりはるかに分子量の大きいAMPデアミナーゼが存在することがわかる。AMPデアミナーゼの画分にはAMPあるいはATPを脱リン酸する酵素活性は検出されない。またAMPの脱アミノはATPを加えることにより活性は増大する。AMPデアミナーゼの精製と性質については次報にゆずる。

## 要 約

ニジマス肝臓では、AMPからHxRへの分解経路はAMPがヌクレオチドレベルで脱アミノされIMPを生じ、それが脱リン酸を受けてHxRになる経路と、AMPが先に脱リン酸を受けてAdRを生じこれが脱アミノを受けてHxRになる経路ともに存在している。ニジマス肝臓のAMPデアミナーゼはATPによつて活性化される。

本研究の遂行にあたり終始御懇切な御指導を賜つた斎藤恒行教授に深謝いたします。なお、本研究経費の一部は昭和45年度文部省科学研究費によつた。

## 文 献

- 1) 関 伸夫: 本誌, **37**, 317~321 (1971).
- 2) 関 伸夫: 本誌, **36**, 241~245 (1970).
- 3) J. F. THOMPSON and G. R. MARRISON: *Anal. Chem.*, **23**, 1153~1157 (1951).
- 4) 関 伸夫・金谷俊夫・斎藤恒行: 本誌, **35**, 690~694 (1969).
- 5) 高橋泰常: 生化学, **26**, 690~698 (1955).
- 6) R. BURGER and J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.*, **242**, 5281~5288 (1967).
- 7) 奈良 盛: 生化学, **32**, 204~210 (1960).
- 8) J. R. DINGLE and J. A. HINES: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**, 1717~1730 (1967).
- 9) J. PURZYCKA-PREIS and M. ZYDOWO: *Acta. Biochim. Pol.*, **16**, 235~242 (1969).
- 10) M. DIXON and E. C. WEBB: *Enzymes*, p. 626~631, Longmans, Green and Co., London (1958).
- 11) B. SETLOW, R. BURGER, and J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1244~1245 (1966).
- 12) Y. P. LEE and M. H. WANG: *ibid.*, **243**, 2260~2265 (1968).
- 13) L. D. SMITH and D. E. KIZER: *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 415~424 (1969).