

## 魚類の糖代謝酵素系に関する研究II

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	氷山, 文男 大島, 寛史 竹内, 俊郎
巻/号	41巻10号
掲載ページ	p. 1063-1067
発行年月	1975年10月

## 魚類の糖代謝酵素系に関する研究—II

肝臓のグルコース-6-りん酸脱水素酵素と  
グルコース脱水素酵素の精製

永山文男・大島寛史・竹内俊郎

(1975年6月26日受理)

Studies on the Enzyme System of Carbohydrate Metabolism in Fish—II  
Purification of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase  
and Glucose Dehydrogenase

Fumio NAGAYAMA,\* Hiroshi OHSHIMA,\* and Toshio TAKEUCHI\*

Attempts were made to isolate glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49, G6PD) and glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.47, GD) from the liver of carp, grass carp, eel, rainbow trout, and yellowtail by DEAE-cellulose column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration.

Both G6PD and GD were isolated from each of grass carp, rainbow trout and yellowtail, while only G6PD having GD activity was obtained from carp and eel.

The molecular weight of G6PD from both fish groups was estimated by Sephadex G-200 gel filtration to be about 260,000 and that of GD in the former fish group, about 180,000.

前報<sup>1)</sup>でヘキソキナーゼの構成と特性を明らかにし、数種の魚類における代謝系へのグルコースの取り込みとヘキソキナーゼとの関連性について考察した。

ヘキソキナーゼの作用で生じたグルコース-6-りん酸 (G6P) は、解糖反応系に入るだけでなく、酸化的に代謝されることは、各種の酵素の活性分布からも明らかである。<sup>2)</sup> さらに魚類ではりん酸の付加しない遊離グルコースの酸化も代謝系のなかで重要な意味をもつものと考えられる。<sup>3)</sup>

G6P の酸化代謝経路は G6P 脱水素酵素 (EC 1.1.1.49, G6PD) の反応を起点とするが、魚類の G6PD の特性に関する観察例は乏しく、わずかにアカカマス<sup>4)</sup>の酵素についての報告<sup>4)</sup>がみられるに過ぎない。また、遊離グルコースを酸化するグルコース脱水素酵素 (EC 1.1.1.47, GD) についてみると、サケ科の魚類についていくつかの観察例<sup>5,6)</sup>がみられるが、G6PD との関連性についての検討や他魚種との比較がなされていない。

そこで、魚類の G6PD と GD の構成と特性を明らかにするために、数種の魚類の肝臓からこれらの酵素の分離精製を試みた。

## 実 験

試料 コイ、ソウギョ、ウナギ、ニジマス、およびブリの活魚から肝(臍)臓を採取した。

分離精製 1. 抽出. 肝臓 10g を等容の 10mM りん酸緩衝液 (pH 7.0) と共にホモジナイズし、105,000×g で 60 分遠心分離、その上澄液を同じ緩衝液で平衡させた Sephadex G-25 のカラム (3×30 cm) を通し、活性区分を集めた。

\* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato-ku, Tokyo)

2. DEAE-セルロースによるクロマトグラフィー. 酵素を上記と同じりん酸緩衝液で平衡させた DEAE-セルロースのカラム (1×34 cm) に吸着させ、りん酸緩衝液 250 ml と 0.6 M KCl を含む同じ緩衝液 250 ml により KCl の直線濃度勾配 (0-0.3 M) を与えて溶出し 4 ml ずつ分取した。

3. Sephadex G-200 によるゲルろ過. DEAE-セルロースカラムから溶出した活性画分をコロジオン膜で濃縮した後、Sephadex G-200 のカラム (2.5×34 cm) で上昇法によりゲルろ過し 3 ml ずつ分取した。

**可溶区分と顆粒区分の調製** SHATTON らの方法<sup>5)</sup>に準じた。すなわち肝臓 4~5 g を、5 mm EDTA と 4 mm N-アセチルシスチンを含む pH 7.5 の 0.15 M KCl と共にホモジナイズし、約 5 倍容に希釈する。これを 800×g で 10 分間遠心分離して沈でんを除き、さらに 105,000×g で 60 分遠心分離して得られる上澄を可溶区分とした。沈でんをよく洗浄してから 0.5% Triton X-100, 5 mm EDTA および 4 mm N-アセチルシスチンを含む pH 7.0 の 0.9 M NaCl でホモジナイズし、さきに低速遠心分離で得た溶液と同じ容量にして 105,000×g 60 分遠心分離する。ここに得られる上澄液を顆粒区分とした。

**活性の測定** 1. G6PD. pH 8.0 の 30 mm トリス緩衝液 0.2 ml, 3 mm G6P 0.2 ml, 0.24 M MgCl<sub>2</sub> 0.05 ml, 0.75 mm NADP 0.1 ml に酵素液 0.05 ml を加え 23° で 340 nm の吸光度の変化を記録して 1 分当りの NADP 還元量を求めた。

2. GD. pH 7.5 の 0.3 M トリス・マレイン酸緩衝液 0.2 ml, 1.5 M グルコース 0.2 ml, 0.75 mm NAD 0.1 ml, 蒸留水 0.05 ml に酵素液 0.05 ml を加え、G6PD の場合と同様に 340 nm の吸光度の変化から NAD の還元速度を求めた。

**でんぶんゲル電気泳動** SHATTON ら<sup>5)</sup>の方法に準じて pH 8.4 の 20 mm バルビタール緩衝液, 6V/cm で 16 時間泳動させ、基質, 補酵素, PMS (phenazine methosulfate), 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) を加えて染色した。

#### 結果および考察

**細胞内分布** Table 1 に示すように、肝臓の G6PD はいずれの魚種でも活性の 90% 以上が可溶区分にあり、ラット<sup>7)</sup>やブリ<sup>8)</sup>について報告されている傾向と一致する。一方 GD の活性の 50% 程度あるいはそれ以上が顆粒区分に認められ、サケ科の魚類の GD についての報告<sup>5)</sup>と類似する。肝臓 GD の 90% が顆粒区分にあるとする報告<sup>6,7)</sup>があるが、SHATTON ら<sup>5)</sup>は、顆粒区分と可溶区分の GD が電気泳動的なら

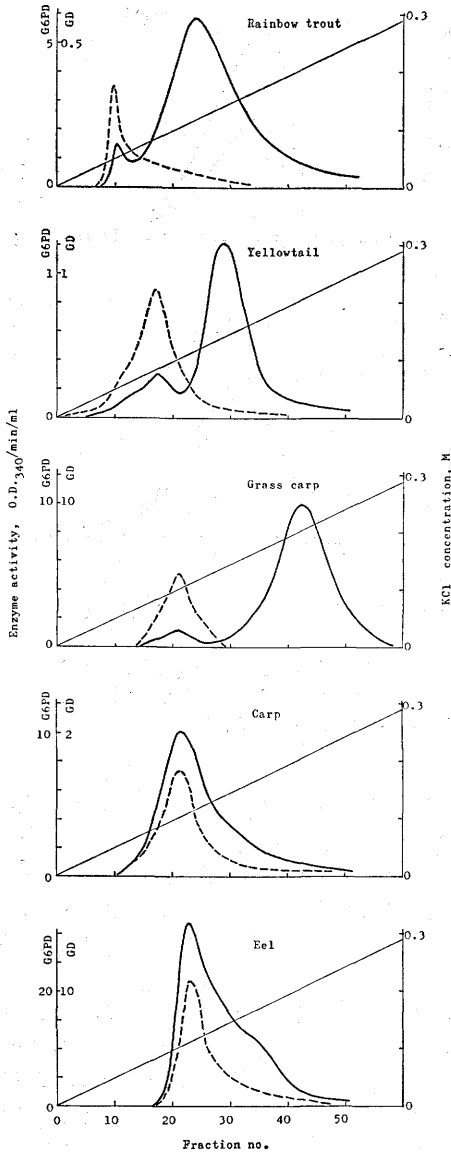
**Table 1.** Intracellular distribution of G6P dehydrogenase and glucose dehydrogenase in fish liver.

The activities were determined at 23° and pH 8.0 for G6P dehydrogenase in the presence of 1 mm G6P and 0.125 mm NADP, and at pH 7.5 for glucose dehydrogenase in the presence of 500 mm glucose and 0.125 mm NAD.

Fish	G6P dehydrogenase		Glucose dehydrogenase	
	Soluble* <sup>1</sup>	Bound* <sup>2</sup>	Soluble* <sup>1</sup>	Bound* <sup>2</sup>
	Unit/g tissue (%)	Unit/g tissue (%)	Unit/g tissue (%)	Unit/g tissue (%)
Carp	14.3 (89)	1.01 (11)	0.576 (33)	1.16 (67)
Grass carp	12.6 (92)	1.09 (8)	0.203 (23)	0.676 (77)
Eel	29.2 (96)	0.848 (4)	0.114 (45)	0.140 (54)
Rainbow trout	9.66 (91)	0.905 (9)	0.562 (48)	0.621 (52)
Yellowtail	14.6 (92)	1.27 (8)	0.424 (52)	0.392 (48)

\*<sup>1</sup> Supernatant after centrifugation at 105,000×g.

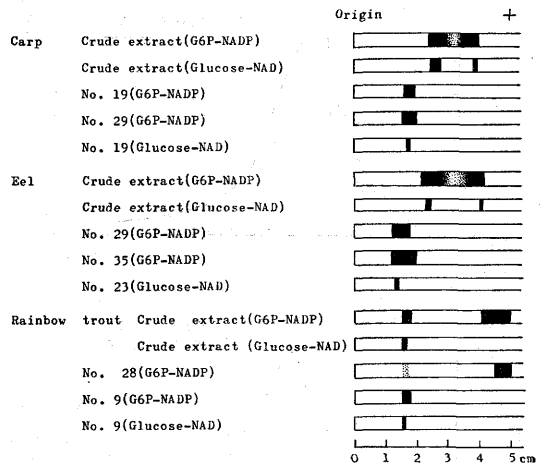
\*<sup>2</sup> 0.5% Triton X-100 extract of particles sedimented at 105,000×g.



**Fig. 1.** Isolation of G6P dehydrogenase and glucose dehydrogenase from the liver of fishes by DEAE-cellulose column chromatography.

The enzymes were eluted from the column (1×34 cm) by a linear gradient of KCl (0–0.3 M) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at a flow rate of 90 ml/hr, and 4-ml fractions were collected.

—, G6P-NADP; ---- glucose-NAD.



**Fig. 2.** Starch gel electrophoresis of the enzymes.

Gel was prepared with 20 mM barbiturate buffer, pH 8.4, and electrophoresis was carried out with constant voltage (6V/cm) for 16 hr. The enzyme was visualized by incubation with substrates, coenzymes, phenazine methosulfate, and MTT. Sample number corresponds to the fraction number in DEAE-cellulose column chromatography shown in Fig. 1.

びに動力学的に同じ性質を示すことから、顆粒とGD間の結合が弱く、抽出時に容易に可溶化されるものと考えている。本実験でも顆粒区分と可溶区分のGDはでんぶんゲル電気泳動で移動度に差を示さなかつたので、後述する酵素の分離の実験においては、抽出時に特に Triton などによる可溶化の操作を行なわなかつた。

**DEAE-セルロースによる分離** ニジマス、ブリ、およびソウギョでは G6PD 活性の溶出曲線に2つのピークが認められた (Fig. 1)。そのうちの1つは高濃度の KCl で溶出され、G6P に対してのみ作用する酵素であるが、低濃度の KCl で溶出されるものは G6PD 活性のほか GD 活性も有し、でんぶんゲル泳動においても2種の酵素活性をもつ単一のバンドを与えた (Fig. 2)。

一方、コイとウナギの場合は、G6PD と GD の活性が同じ部分に重なつて溶出された (Fig. 1)。これらの魚種の粗抽出液でのんぶんゲル泳動では、酵素活性をもつ2つのバンドが認められ (Fig. 2)、またウナギの G6PD 活性の溶出曲線の後半部に小さ

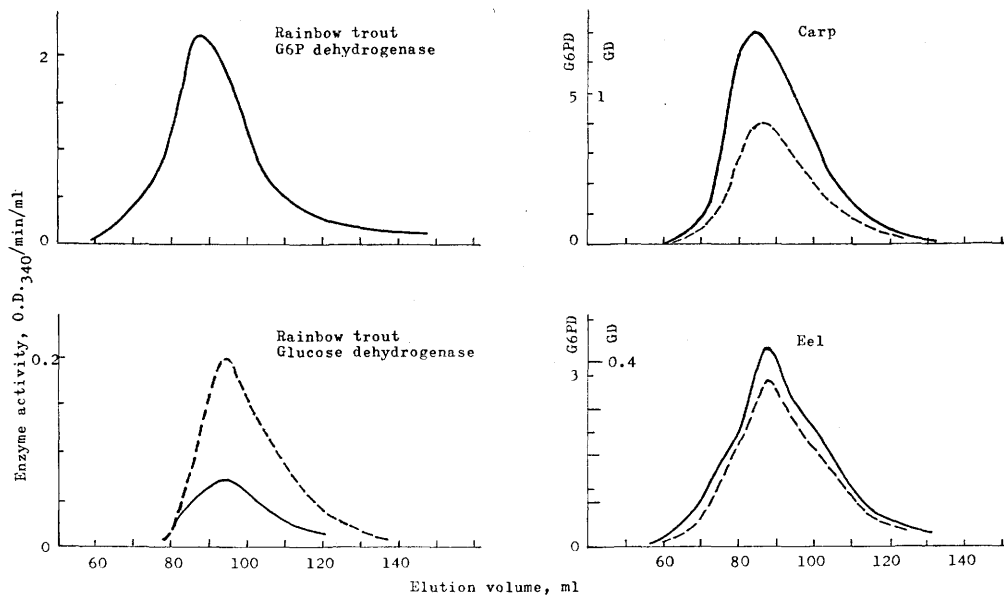


Fig. 3. Sephadex G-200 gel filtration of the enzymes fractionated by DEAE-cellulose column.

The enzymes were eluted from a column of Sephadex G-200 (2.5×34 cm) with 10mM phosphate buffer, pH 7.0, at a flow rate of 12 ml/hr, and 3-ml fractions were collected. — G6P-NADP; ---- glucose-NAD.

い“肩”がみられたが、DEAE-セルロースのカラムから溶出分取したいずれのフラクションについても、でんぷんゲル泳動では単一のバンドしか検出されなかつた。

G6PD は条件により多量体の形をとることが知られており,<sup>9)</sup> ウナギとコイの粗抽出液にみられる泳動度の大きい酵素が、精製操作中に、泳動度の小さい酵素に変換されることが考えられる。しかしニジマスやブリなどではそのような傾向が認められない。従つて、これら2つの魚種の群の酵素構成は明らかに異なるものと思われる。

**Sephadex G-200 によるゲルろ過** DEAE-セルロースカラムから溶出したニジマス、コイ、およびウナギのそれぞれの酵素活性のある区分を Sephadex G-200 のカラムでゲルろ過し、Fig. 3 のように、いずれからも単一の活性ピークを得た。標準たんぱく質の溶出曲結から算定される分子量は、ニジマスの G6PD と、コイおよびウナギの GD 活性と G6PD 活性をもつ酵素でいずれも約 260,000 であつた。ここに得られたコイとウナギの酵素はラット<sup>10)</sup> や酵母<sup>11)</sup> で見出されている GD 作用を伴う G6PD に相当するものと考えられる。

一方、ニジマスのもう1つの酵素は、上記の G6PD とは異なる溶出曲線を示し、主にグルコースを酸化する GD と思われる。その分子量は約 180,000 と算定され、SHATTON ら<sup>9)</sup> の報告と一致する。ブリとソウギョの酵素については DEAE-セルロースからの溶出曲線がニジマスの酵素と全く同様の傾向を示したので、ゲルろ過は行なわなかつた。

分離したそれぞれの酵素の特性は次報で報告する。

## 文 献

- 1) 永山文男・大島寛史: 本誌, 40, 285-290 (1974).
- 2) 永山文男・大島寛史・梅沢一民: 同誌, 38, 589-593 (1972).

- 3) 永山文男・大島寛史・竹内俊郎: 同誌, **39**, 1349 (1973).
- 4) 示野貞夫・竹田正彦: 同誌, **38**, 645-650 (1972).
- 5) J. B. SHATTON, J. E. HALVER, and S. WEINHOUSE: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4878-4885 (1971).
- 6) J. J. STEGEMAN and E. GOLDBERG: *Biochem. Genet.*, **5**, 579-598 (1971); *Comp. Biochem. Physiol.*, **43B**, 241-256 (1972).
- 7) R. P. METZGER, S. S. WILCOX, and A. N. WICK: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2767-2771 (1965).
- 8) 示野貞夫: 高知大水実研報, No. 2, 1-107 (1974).
- 9) A. WATANABE and K. TAKETA: *J. Biochem. (Tokyo)*, **72**, 1277-1280 (1972).
- 10) R. P. METZGER, S. A. METZGER, and R. L. PARSONS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 102-109 (1972).
- 11) W. B. ANDERSON, R. N. HORNE, and R. C. NORDLIE: *Biochem.*, **7**, 3997-4004 (1968).