

ブリ肝臓における解糖中間体およびヌクレオチド含量の動態 ならびにphosphofructokinase活性への関与

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	示野, 貞夫 四方, 崇文 岩永, 俊介
巻/号	41巻4号
掲載ページ	p. 535-539
発行年月	1993年12月

ブリ肝臓における解糖中間体およびヌクレオチド含量の 動態ならびに phosphofructokinase 活性への関与

示野貞夫・四方崇文・岩永俊介
(高知大学農学部)

Changes in the Concentrations of Glycolytic Intermediates and Nucleotides and
Their Relation to Phosphofructokinase Activity in the Liver of Yellowtail*

Sadao SHIMENO, Takafumi SHIKATA, and Shunsuke IWANAGA

Abstract

Concentrations of glycolytic intermediates and nucleotides were determined in young yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed with diets high in protein, lipid and carbohydrate, followed by 7 days starvation. Effects of physiological concentrations of ATP and F6P on the activity of hepatic phosphofructokinase (PFK) was also investigated. The concentration of ATP, ADP and AMP in the liver of the fish under feeding condition was around 1 mM each and that of G1P, G6P, F6P and FDP ranged from 0.1 to 0.5 mM, corresponding to the Km values for some glycolytic enzymes such as PFK. Dietary composition did not much affect the concentrations of glycolytic intermediates and nucleotides in the liver, while starvation decreased markedly the intermediates and slightly ATP. *In vitro* PFK activity was influenced markedly by the physiological concentration range of ATP and F6P. The results suggest that *in vivo* glycolytic activity was regulated effectively and reasonably by not only the enzyme levels but also by the concentrations of glycolytic intermediates and nucleotides as its substrate and effector.

われわれは魚類糖代謝の調節に関する一連の研究を進めており、これまでは飼料組成、給餌量、水温などに対する代謝応答を中心に酵素レベルで解析してきた¹⁻⁵⁾。酵素活性の測定時には、G6P、ATPなどの基質となる解糖中間体やエフェクターは至適濃度に添加しているが、生体内ではそのような濃度で存在するとは限らないし、飼料条件により変動するとも考えられる。

魚類の筋肉におけるヌクレオチド含量に関する報告は多いが、肝臓における解糖中間体およびヌクレオチドの含量や動態に関する研究は少ない^{6,7)}。そこで、本研究ではまず解糖中間体およびヌクレオチドの定量法を検討した。ついで、ブリ肝臓におけるそれらの含量と動態を調べた。さらに、phosphofructokinase (PFK) 活性に及ぼす解糖中間体およびヌクレオチドの影響について検討し、糖代謝との関連性を推察した。

受領日：1993(H5)年7月2日

索引語：ブリ/解糖中間体/ヌクレオチド/糖代謝

連絡先：〒783 南国市物部乙200 高知大学農学部水族栄養学研究室 示野貞夫

Address: S. SHIMENO, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan

* 魚類糖代謝の調節-XVIII (Regulation of Carbohydrate Metabolism in Fish-XVIII)

実験材料および方法

供試魚 肝臓および筋肉における解糖中間体およびヌクレオチド含量の測定には、12月まで生餌で飼育していた体重1,180gのブリ, *Seriola quinqueradiata* を使用した。飼料条件の影響を調べた試験には、北洋魚粉, スケトウダラ肝油およびデキストリンを主成分とする高タンパク質 (HP), 高脂質 (HL) および高糖質 (HC) のモイストペレット飼料で約1月間生簀飼育した170-200gのブリ⁸⁾, ならびにそれぞれ7日間絶食した160-190gのブリを, いずれも8月に供試した。サンプリング時には, 生簀上で肝臓を採取し, ただちにアセトン・ドライアイスで凍結し, 研究室に持ち帰り, 凍結貯蔵した。

分析法 ヌクレオチドおよび解糖中間体の抽出と分離定量は Khym ら⁹⁾の方法によって行った。すなわち, 凍結肝臓を氷冷下で0.6N 過塩素酸とともに摩細し, そのろ液を5N KOHで中和し, アンモニア水でpH 8.5に調整して検液とした。検液をCl型Dowex 1 X4のカラム(0.86 cm²×12 cm)に吸着させ, Fig. 1に示した8種類の脱着液を毎分1.0 mlの流速で流し, 溶出液を15 mlずつ分取した。溶出したヌクレオチドおよび解糖中間体の測定は, それぞれ紫外線吸収法およびアンスロン法¹⁰⁾によって行った。また, 各化合物の同定は溶出位置, 吸収曲線, リン含量などによって行った。

PFKの精製はMassey and Dealの方法¹¹⁾に準じ, エタノールとマグネシウムで処理後ゲルろ過し, 211倍の比活性をもつ画分をえた。また, 同活性の測定はMoon and Johnstonの方法¹²⁾によって行った。

結果

定量法の検討 8種類のヌクレオチドと解糖中間体の混合液を定量した結果, Fig. 1の溶出曲線がえられ, glucose, G1P, G6P, F6P, AMP, ADP, FDP, ATPの順で完全に分離溶出した。また, ADP, G1PおよびF6Pの回収率は100±5%と良好であり(Table 1), ATP, G6Pおよびglucoseのそれも100±10%の範囲にあったが, AMPのそれは114%であった。これらの回収率は必ずしも良好ではなかったが, 標品の純度と安定性を考えると, ほぼ満足できよう。ただし, この方法では1検体の分析に30時間以上を要し, 解糖中間体の比色定量も容易でないで, 多検体の定量に最適な方法とはいえない。現在, 酵素法による測定を検討しているが, 本研究ではこの方法を使

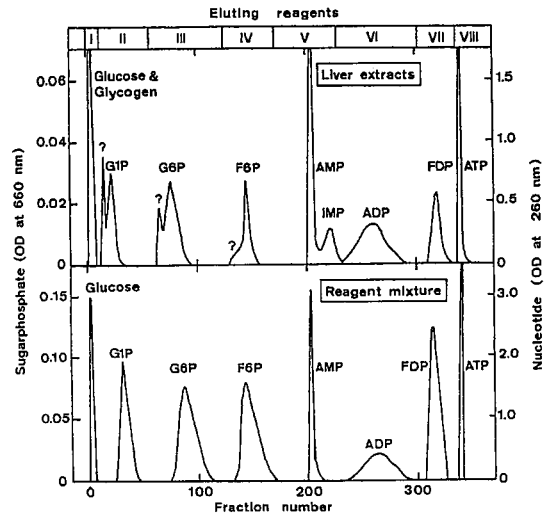


Fig. 1. Ion-exchange chromatographic separation of glycolytic intermediates and nucleotides of the standard reagents and liver extracts⁹⁾: exchanger, Dowex 1 X4 (chloride form), 0.86 cm² × 12 cm; flow rate, 1 ml/min; fraction, 15 ml/tube; eluting reagents I, 0.001M NH₄OH; II, 0.025M NH₄Cl + 0.01 M K₂B₄O₇; III, 0.025M NH₄Cl + 0.0025M NH₄OH + 0.001M K₂B₄O₇; IV, 0.025M NH₄Cl + 0.0025M NH₄OH + 0.00001M K₂B₄O₇; V, 0.005M HCl; VI, 0.01M HCl; VII, 0.02M HCl + 0.02M KCl; VIII, 0.02M HCl + 0.2M KCl.

Table 1. Recovery test of nucleotides and glycolytic intermediates

Compound*	Amount added (mg)	Amount recovered (mg)	Recovery (%)
ATP	3.94	3.70	94.0
ADP	3.46	3.48	101
AMP	3.91	4.46	114
G1P	3.54	3.52	99.4
G6P	3.90	3.62	92.8
F6P	4.12	4.28	104
FDP	3.70	4.01	108
Glucose	3.86	3.53	91.5
Total NT	11.31	11.64	103
Total GI	15.26	15.43	101

* Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FDP, fructose-1, 6-diphosphate; NT, nucleotide; GI, glycolytic intermediate.

用することとした。

肝臓および筋肉中の含量 ブリの肝臓と筋肉におけるヌクレオチドおよび解糖中間体を定量した結果、標品と同様な溶出曲線がえられた (Fig. 1)。しかし、グリコーゲンとグルコースとは同一画分に溶出し、また G1P, G6P および F6P の前に未知のピークや“カタ”がみられたが、それらの成分は少なく同定できなかった。

肝臓の ATP, ADP および AMP 含量はいずれも 0.5 $\mu\text{mol/g}$ 前後であり (Table 2), IMP 含量は低かった。肝臓と対照的に筋肉では、ATP 含量が 4.7 μmol と著しく高く、IMP 含量もかなり高かった。肝臓の解糖中間体では、G6P が 0.18 μmol と最も多く、ついで F6P と FDP が多く、G1P は 0.03 μmol と最も少なかった。

Table 2. Contents of nucleotides and glycolytic intermediates in the liver and muscle of yellowtail fed with raw fish

Compound	$\mu\text{mol/g tissue}$		mM	
	Liver	Muscle	Liver	Muscle
ATP	0.350	4.740	0.886	7.11
ADP	0.439	0.821	1.11	1.23
AMP	0.599	0.145	1.52	0.22
IMP	0.132	0.789	0.334	1.18
G1P	0.034	0.175	0.086	0.263
G6P	0.184	1.24	0.466	1.86
F6P	0.076	0.232	0.192	0.348
FDP	0.099	0.702	0.250	1.05
Glucose*	98.9	14.2	250	21.3
Total NT	1.52	6.49	3.85	9.74
Total GI	0.393	2.35	0.994	3.51

* Containing glycogen.

肝臓に比べて筋肉では、各ヌクレオチド含量は約 5 倍であった。この結果は、スズキ, *Lateolabrax japonicus* 筋肉に関する永山⁶⁾および関⁷⁾の報告とほぼ一致した。両組織の水分量から各成分のモル濃度を計算し、右のカラムに示した。肝臓では、ATP, ADP および AMP の濃度はいずれも 1 mM 前後にあり、解糖中間体濃度は 0.1-0.5 mM の範囲にあった。

飼料条件の影響 三大栄養素の含量が異なる HP, HL および HC の 3 飼料で 30 日間飼育したブリ⁸⁾、ならびにその後 7 日間絶食飼育したブリの肝臓について、ヌクレオチドおよび解糖中間体の含量を測定した。Table 3 の摂餌魚と Table 2 の生餌摂取魚との解糖中間体の含量は類似していたが、7 日間絶食すると、多

くの解糖中間体量は減少し、とくに F6P 量の減少が顕著であった。絶食時には、ATP 量も約 1/2 に低下したが、IMP は増し AMP は低下した。しかし、試料の貯蔵時や抽出時に AMP は IMP に変化するので⁷⁾、Table 4 の結果と併せて考えると、ADP とともに AMP の含量は絶食時にも摂餌時と同程度かむしろ高いと解釈される。

Table 3. Effect of starvation on the contents of nucleotides and glycolytic intermediates in the liver of yellowtail*¹

Compound	$\mu\text{mol/g liver}$		mM	
	Fed	Starved	Fed	Starved
ATP	0.760	0.376	1.01	0.501
ADP	0.500	0.563	0.667	0.751
AMP	1.08	0.792	1.44	1.06
IMP	0.053	0.357	0.071	0.476
G1P	0.064	0.095	0.085	0.127
G6P	0.132	0.083	0.176	0.111
F6P	0.074	0.020	0.101	0.027
FDP	0.128	0.079	0.171	0.105
Glucose* ²	273	93.6	364	125
Total NT	2.39	2.09	3.19	2.79
Total GI	0.453	0.227	0.606	0.370

*¹ The fish were fed with a high carbohydrate diet for 30 days, and then starved for 7 days⁸⁾.

*² Containing glycogen.

つぎに、飼料組成の影響については (Table 4), HP, HL および HC 区の ATP, ADP および AMP の含量はそれぞれ 1, 0.6 および 1 mM 前後と類似しており、ヌクレオチド合計量と各含有比も類似していた。したがって、肝臓のヌクレオチド含量は飼料組成と無関係にほぼ一定であることが明らかである。

全区の ADP 量は絶食時にもさほど減少しなかったし、HP 区の ATP と AMP 量もあまり変動しなかったが、HL および HC 区では、ヌクレオチド合計量とともに ATP と AMP 含量が減少した。水分含量から算出した各ヌクレオチド濃度 (mM) にも、同様な区間差がみられた。しかし、ヌクレオチド合計量に区間差があったので、全ヌクレオチドに占める各ヌクレオチドの含有率では、絶食により ATP が減少し AMP がやや増大した。

PFK 活性に及ぼす ATP および F6P の影響 解糖経路の律速酵素の一つである PFK の活性に及ぼす ATP および F6P 濃度の影響を調べ、Fig. 2 に示した。本酵素はアロステリック酵素であり、基質飽和曲線か

Table 4. Effects of dietary composition and starvation on nucleotide contents in the liver of yellowtail*

	$\mu\text{mol/g liver}$					mM					%				
	ATP	ADP	AMP	IMP	Total	ATP	ADP	AMP	IMP	Total	ATP	ADP	AMP	IMP	Total
Feeding															
HP	0.86	0.54	0.91	0.14	2.46	1.15	0.73	1.21	0.19	3.28	35	22	37	6	100
HL	1.03	0.65	1.13	0.15	2.96	1.37	0.86	1.50	0.20	3.94	35	22	38	5	100
HC	0.76	0.50	1.08	0.05	2.39	1.01	0.67	1.44	0.07	3.19	32	21	45	2	100
Starving															
HP	0.87	0.51	1.31	0.25	2.94	1.16	0.68	1.75	0.33	3.92	30	17	45	8	100
HL	0.65	0.45	0.98	0.14	2.21	0.86	0.59	1.31	0.18	2.94	29	20	45	6	100
HC	0.38	0.56	0.79	0.36	2.09	0.50	0.75	1.06	0.48	2.79	18	27	38	17	100

* The fish were fed with diets high in protein (HP), lipid (HL), and carbohydrate (HC) for 30 days, and then starved for 7 days⁸⁾.

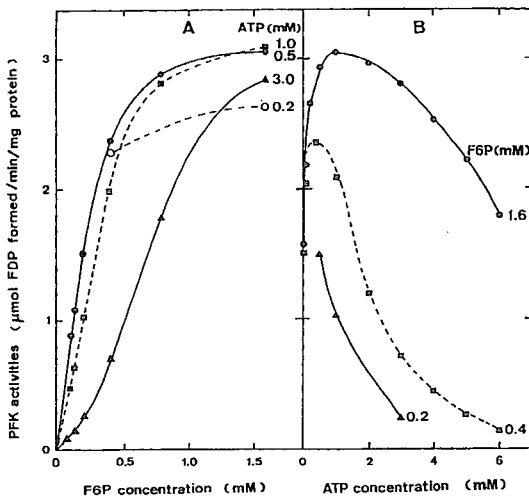


Fig. 2. Effect of concentrations of F6P (A) and ATP (B) on the activity of phosphofructokinase in the liver of yellowtail.

ら明らかのように (A), 1 mM 以下の ATP 存在下では Michaelis 型曲線を示すのに対して, 3 mM ATP 存在下では Sigmoid 型曲線を示し, とくに F6P 濃度が低いときに, 本活性は低かった。また, 本酵素活性は高濃度の ATP により阻害されたが, その阻害程度は F6P の低濃度ほど著しかった (B)。とくに, プリの生理的濃度域である 0.2 mM F6P では (Tables 2 and 3), わずかな ATP 濃度の変化が PFK 活性に大きな影響を及ぼし, 注目された。

考 察

ハマチ肝臓のヌクレオチドおよび解糖中間体を定量した結果, 摂餌時にはそれぞれ 1 mM 前後および 0.1-0.5 mM の範囲にあったが, 絶食時には F6P など

解糖中間体は著しく低下した。多くの解糖酵素の基質に対する K_m 値も大略 0.01-1 mM のオーダーにある。また, 解糖経路の律速酵素の一つである PFK はアロステリック酵素であり, 上述の濃度範囲でも ATP の増加や F6P の減少によって本酵素の活性は低下し, ATP の減少や AMP の増加により上昇するとされている¹³⁾。とくに, プリの生理的濃度である 0.2 mM 前後の F6P および 1 mM 前後の ATP の濃度域においては (Tables 2 and 3), ATP や F6P のわずかな濃度変化が PFK 活性に顕著な影響を与えた。したがって, 生体内の解糖活性は, PFK 活性を介して解糖中間体やヌクレオチドの濃度によって調節される可能性が高いと考えられる。

給餌時の肝臓では, F6P は 0.1-0.2 mM と K_m 値付近にあるが, ATP が 1 mM と PFK の好適濃度にあり, AMP も多いので, 試験管内ほどではないが, 生体内でも PFK 活性はかなり高く, 解糖活性もかなり強いと考えられる。いっぽう, 絶食時には F6P が激減したし, PFK 量も有意に低下するので^{1,4)}, 生体内の PFK 活性は試験管内以上に低下し, その解糖活性は微弱であろうと推察される。しかし, そのような絶食時にさえもアデニンヌクレオチドの含有比が一定に保たれており, 興味深い。

摂餌量の少ない極低温時には, 絶食時とともに多くの糖代謝酵素の活性は低下した^{2,3)}。本実験では水温と解糖中間体含量との関係を調べられなかったが, 摂餌量の激減する極低温時には絶食時と同様に, 同含量は低下すると考えられ, 生体内では試験管内以上に解糖活性は低下していたと推察される。

解糖中間体およびヌクレオチド含量は飼料組成と無関係にはほぼ一定であった。したがって, いずれの組成の飼料を摂取しても, 多くの中間代謝物の恒常性が維持されていたと考えられる。しかし, 解糖酵素の活性

は糖質添加飼料摂取時に高く、脂質添加飼料摂取時に低かったので⁵⁾、酵素量による解糖活性の調節が期待できる。また、摂取糖質が吸収されて解糖中間体が増大した場合には、基質上昇による解糖活性の増強も期待できる。

結局、糖代謝の基質やエフェクターである解糖中間体とヌクレオチドの濃度は、試験管内の至適な酵素反応条件と違って、糖代謝酵素のKm値付近にあり、また飼料条件により変動することが明らかになった。このような濃度変化に対して肝臓のPFK活性は合目的性応答を示したことから、生体内の解糖活性は酵素量ばかりでなく、解糖中間体やヌクレオチドの濃度によっても調節されると推察された。

要 約

ブリの肝臓のATP、ADPおよびAMPの含量は飼料組成と無関係に1 mM前後にあり、絶食時にもATPはやや減少したが、ADPおよびAMPの含量はほぼ一定であった。摂餌魚肝臓のG1P、G6P、F6PおよびFDPの含量は0.1-0.5 mMの範囲にあり、そのうちではG6P含量が最も高かった。生餌摂餌魚および高炭水化物飼料摂餌魚の各含量は類似していたが、いずれの解糖中間体も絶食時に低下し、F6Pの低下が最も著しかった。これらの各含量は糖代謝酵素のKm値付近にあり、またこのような生理的濃度域の変化に対しても、肝PFK活性は合目的性応答を示した。したがって、生体内の解糖活性は酵素量ばかりでなく、その基質やエフェクターとなるヌクレオチドや解糖中間体の含量によっても調節されていると推察された。

文 献

- 1) Shimeno, S., D. Kheyyali, and M. Takeda (1990): Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(1), 35-41.
- 2) 示野貞夫・四方崇文 (1993): 屋外飼育コイの糖代謝酵素活性および脂質含量の季節変化. 日水誌, 59(4), 653-659.
- 3) 示野貞夫・四方崇文 (1993): コイの糖代謝酵素活性および脂質含量に及ぼす飼育水温および給餌率の影響. 日水誌, 59(4), 661-666.
- 4) Shikata, T., D. Kheyyali, and S. Shimeno (1993): Effect of feeding rates on hepatopancreatic enzymes and body composition in common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(5), 835-839.
- 5) Shimeno, S., C. M. Duan, and M. Takeda (1993): Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(5), 827-833.
- 6) 永山文男 (1961): 魚類筋肉の解糖作用に関する酵素学的研究-III, 解糖中間体の含有量. 日水誌, 27(11), 1014-1017.
- 7) 関 伸夫 (1971): 水産物のヌクレオチド. 日水誌, 37(8), 777-783.
- 8) Shimeno, S., H. Hosokawa, and M. Takeda (1979): The importance of carbohydrate in the diet of a carnivorous fish. *Proc. World Symp. Finfish Nutr. Fishfeed Technol.*, Vol. 1, 127-143.
- 9) Khym, J. X. and W. E. Cohn (1953): The separation of sugarphosphates by ion exchange with the use of the borate complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 75(5), 1153-1156.
- 10) Carroll, N. V., R. W. Longley, and J. H. Roe (1956): The Determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 220(2), 583-593.
- 11) Massey, T. H. and W. C. Deal, Jr. (1973): Unusual, metabolite-dependent solubility properties of phosphofructokinase. The basis for a new and rapid purification from liver, kidney, and other tissues. *J. Biol. Chem.*, 248(1), 56-62.
- 12) Moon, T. W. and I. A. Johnston (1980): Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol.*, 136(1), 31-38.
- 13) Nagashima, K., T. Nakagawa, and F. Nagayama (1989): Properties of phosphofructokinase from carp, eel and rainbow trout liver. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(5), 897-903.