HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類組織構成分の代謝活性の時期的変化－II：ヒメマス肝臓中のヌクレオチドおよび関連化合物について
Author(s)	関, 伸夫; 金谷, 俊夫; 斎藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(3), 211-216
Issue Date	1969-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23395
Type	bulletin (article)
File Information	20(3)_P211-216.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚類組織構成分の代謝活性の時期的変化—II
ヒメマス肝臓中のヌクレオチドおよび関連化合物について*

関　伸夫**・金谷俊夫**・斎藤恒行**

Seasonal Variations in the Metabolic Activities of Tissue Constituents of Some Fishes-II.
Acid-soluble nucleotides and related compounds in the liver of kokanee salmon

Nobuo Seki, Toshio Kanaya, and Tsuneyuki Saito**

Abstract

Free nucleotides and related compounds in the liver of kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka* f. *kenerlyi*) at different periods were determined by anion exchange chromatography. The following compounds were detected: adenine, adenosine, guanosine, hypoxanthine, inosine, nicotinamide, AMP***, ADP, ATP, IMP, UMP, UDP, UDPAH, UDPH, UDPUA, NAD, NADP, ADPR, ATPR and GMP. These nucleotide patterns at different periods not only resembled one another but also resembled those obtained from the liver of other fishes. The contents of total adenine nucleotides based on DNA content increased gradually untill spawning, whereas UDP-sugars predominate in the uracil nucleotides that decreased prior to spawning. It seems that this decrease associates with the deterioration of the synthesis of polysaccharides.

緒　言

肝臓中のヌクレオチド類は核酸構成分，エネルギー代謝，物質代謝の中間体として，また代謝調節のにない手としての機能を有する。したがって生理条件の変化は，ある程度ヌクレオチドプールの変動として反映されるものと推測される。本報告では，組織の代謝活性の変動の一指標として，ヌクレオチドを選んで検討した。また我々は従来より，水産動物肝臓中のヌクレオチド類について分析を続けているが[1-4]，この変動がどの程度あるのかは重大な問題であるので，この立場からも考察を行なった。

---

* 水産動物臓器の有機燐酸化合物に関する研究-V とする。

** 北海道大学水産学部生物化学講座
(*Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

*** Abbreviations: AMP, UMP, etc., 5′-phosphate of the nucleosides; ADP (ATP), etc., 5′-di (tri) phosphates of the nucleosides; UDPAH, UDP-N-acetylhexosamine; UDPH, UDP-hexose; UDPUA, UDP-uronic acid; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ADPR, adenosine diphosphate ribose; ATPR, adenosine triphosphpte ribose.

実 験 方 法

試 料： 水産庁サケマス孵化場千歳支場の養魚池で飼育したヒメマス2年魚を使用した。11月の試料は産卵直前のものである[5]。

抽 出： ヒメマス雌雄それぞれ3～5尾より水揚げ後直ちに摘出した肝臓 (4～8 g) を，肝臓重量の10倍量の冷 0.6 N $HClO_4$ 中でホモゲナイズし抽出を行なった。抽出液を濾過後，KOH で中和し，ドライアイス凍結して研究室に持ち帰った。

活性炭処理： 凍結中和液を融解後，冷凍遠心分離機で 6,000 rpm，5分間遠心分離し，$KClO_4$ を除去した。上清液を活性炭に吸着せしめた。活性炭を 0.01 N EDTA (pH 7.0) 30 ml，水 100 ml で洗浄したのち，アンモニア性エタノール (95 % エタノール：濃アンモニア水：水=50:2:48) 300 ml で溶出した。

カラムクロマトグラフィー： 溶出液を 50 ml に濃縮し，これを Dowex 1-X8 カラム (100-200 メッシュ，ギ酸型，φ1×12 cm) に供した。塩基，ヌクレオシド画分は Dowex 1X2 カラムで再クロマトグラフィーを行なった[6]。

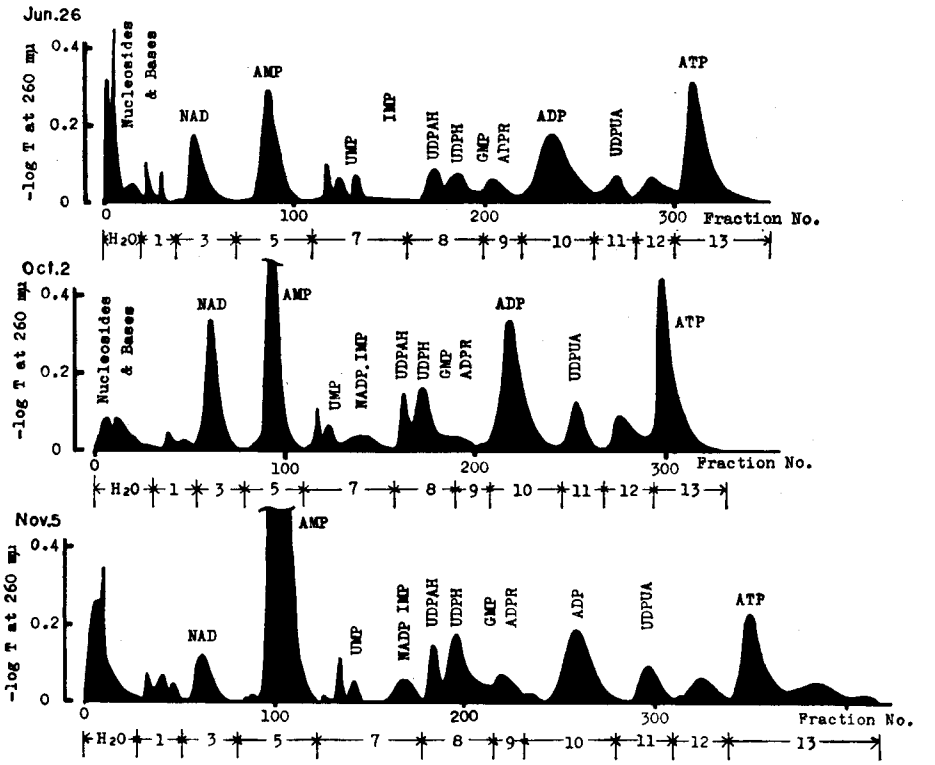

Fig. 1. Anion-exchange chromatography of the acid soluble substances of the liver of kokanee salmon (Male)

The extract was separated on a Dowex 1-X8 fomate column by stepwise elution. Fraction size was 10 ml. Eluting solvents: 1, 0.005 N formic acid (FA); 3, 0.02 N FA; 5, 0.1 N FA; 7, 0.1 N FA+0.1 N sodium fomate (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.

同　定： 各画分の同定はペーパークロマトグラフィー，紫外線吸収スペクトル，全リン酸，易水性リン酸，リボースの測定などの方法によった。これらの方法については既に述べた[1-3]。

実　験　結　果

ヒメマス肝臓中のヌクレオチドパターンを Fig. 1. に，塩基・ヌクレオシド画分の再クロマトグラフィーを Fig. 2. に示した。ここには雄の肝臓の溶出図のみを載せたが，雌の場合も全く同様のパターンが得られた。図の様に，AMP, ADP, ATP, IMP, UMP, UDP, UDPAH, UDPH, UDPUA, NAD, NADP, ADPR, ATPR, GMP の各ヌクレオチドが検出された。塩基・ヌクレオシド画分からは，ニコチンアミド，アデニン，アデノシン，ヒポキサンチン，イノシン，キサンチン，グアノシンが見出された。11 月の試料からは，ATP の後ろに 267 mμ に吸収のピークを持つ物質が溶出される。このものは溶出位置と紫外線吸収スペクトルから，アデニロサクシネートと推定される。

UDPAH の画分は UDP-N-acetylglucosamine と UDP-N-acetylgalactosamine が重なって溶出されるが，この両者の分離は行なわなかった。UDPH の画分も同様に UDP-glucose と UDP-galactose

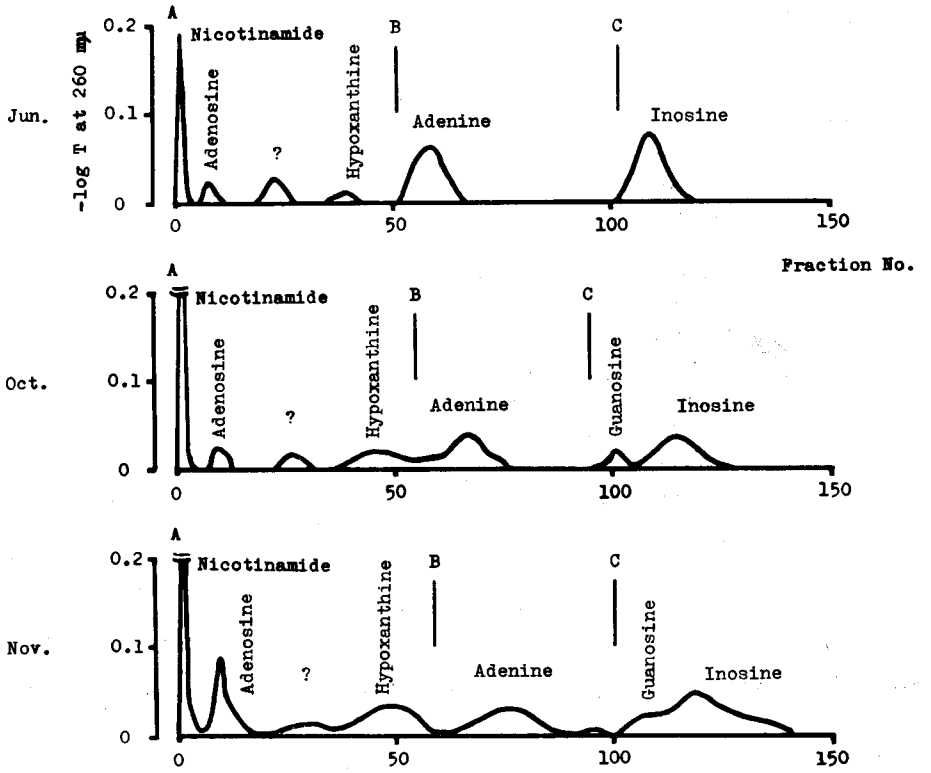

Fig. 2. Chromatograms of the nucleoside and base fraction extracted from the liver of kokanee salmon (Male)

Exchanger used is Dowex 1-X2 (200–400 mesh, ø 1×4 cm). The eluting solvents were as follows: 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-0.04 N HCl-0.01 N $Na_2B_4O_7$. Fractions of 10 ml were collected and absorbance at 260 mμ was measured.

は同一ピークとなるが，これらのものについても分離は行なわず，UDPH として表示した。また UDPUA の画分はナフトレゾルシン反応により検出した。

塩基・ヌクレオシド画分は Dowex 1-X2 カラムを用い，NH_4OH-HCl-$Na_2B_4O_7$ 系溶離剤により，再クロマトグラフィーを行なった。A 溶媒では溶出順に，ニコチンアミド，アデノシン，未同定物質，ヒポキサンチンが検出された。未同定物質はシチジンに似たスペクトルを示すが，シチジンとは溶出位置が異なり[6]，このものについては本体は不明である。B, C の溶媒ではアデニン，グアノシン，イノシンが同定された。ヌクレオチドおよび塩基・ヌクレオシドの含量はそれぞれ，Table 1 および Table 2 に示した。

Table 1. Changes in nucleotide contents of the liver of kokanee salmon

Month	Jun.		Oct.		Nov.	
Sex*	M	F	M	F	M	F
Nucleotide	μmoles/g wet weight					
AMP	0.47	0.52	0.61	0.74	1.00	0.78
ADP	0.57	0.47	0.64	0.43	0.28	0.28
ATP	0.60	0.54	0.64	0.52	0.26	0.24
IMP	0.16	0.10	0.26	0.23	0.11	0.12
Adenine nucleotides	1.80	1.63	2.18	1.92	1.65	1.42
UMP	0.14	0.14	0.09	0.10	0.03	0.05
UDP			0.05	0.03		
UDPAH	0.13	0.19	0.14	0.19	0.11	0.14
UDPH	0.20	0.25	0.29	0.22	0.23	0.07
UDPUA	0.18	0.25	0.24	0.40	0.13	0.24
Uracil nucleotides	0.65	0.83	0.81	0.94	0.50	0.50
NAD	0.20	0.19	0.31	0.16	0.08	0.07
NADP			0.06	0.02		
ADPR				0.06		
ATPR	0.14	0.16	0.14	0.12	0.09	0.13
GMP				0.01	0.13	0.09
TOTAL	2.79	2.81	3.47	3.23	2.45	2.16

* M: Male, F: Female

Table 2. Nucleosides and bases of the liver of kokanee salmon

μmoles/100g wet weight

Date	Sex	Adenosine	Hypoxanthine	Adenine	Guanosine	Inosine
Jun.	M*	1.1	1.3	11.2	—	13.4
26	F	1.0	1.8	11.4	—	15.0
Oct.	M	1.3	4.8	6.8	1.5	6.1
2	F	1.6	3.5	5.1	0.5	2.9
Nov.	M	3.0	5.7	4.9	2.2	9.3
5	F	2.9	7.4	5.7	1.2	6.6

* M: Male, F: Female

考　　察

Fig. 1, Fig. 2 に示したように，ヌクレオチドおよび塩基・ヌクレオシドのパターンは，11 月にアデニロサクシネートと推定される物質が検出され，6 月にグアノシンが見出されない点を除けば，時期的にも，雌雄の間にも大きな差は認められない。ヌクレオチド量は Table 1 に示した通りである。この量は先に報告したコイ[2]，ニジマス[4] 肝臓のヌクレオチドと同程度の含量である。本報告は 3 時期についての分析結果であり，周年にわたるデーターではないから時期的変動については明らかな結論は導けないが，Table 1 に示したごとく，ヌクレオチド量は 10 月に高い値を示している。11 月にはヌクレオチド量は激減しているように見える。この減少は恐らく 11 月が産卵時であるためと推定される。

雌雄差についてはアデニンヌクレオチドは雄に高く，ウリジンヌクレオチドはこの逆の傾向にあるようであるが，アデニンヌクレオチドでは，DNA 当りの含量で表わすと差は明らかでない (Fig. 3)。むしろ，この程度の差が雌雄の差として認められるかどうかは現段階では断言出来ない。

アデニンヌクレオチドについてみると，6 月から 10 月まで，その含量はやや増加の傾向にあるように見える。6 月から 10 月までの間は測定していないが，我々は先にイカ肝臓のヌクレオチドプールが，個体や時期が異なっても，同程度の大きさの魚体ではそのレベルはほぼ等しいという結果を得ている[7]。またラッテ成体肝臓中のヌクレオチド含量は測定者が異なってもほぼ 3～4 μmoles/g と一定である[8]。生体の内部環境はよく知られているごとく，ある幅をもって一定に保たれており[9]，上の事実からすれば，アデニンヌクレオチドプールのレベルは，この変動の幅がかなり小さいのではないかと考えられる。したがって，ヒメマス肝臓のアデニンヌクレオチドプールのレベルは春から秋にかけて，徐々に増大して行き，この間に急激な変動はないものと推定される。このことは，前報[5] においてRNA 量がこの期間に増大していることを考えると，この間の生理活性は増大しているのであろう。

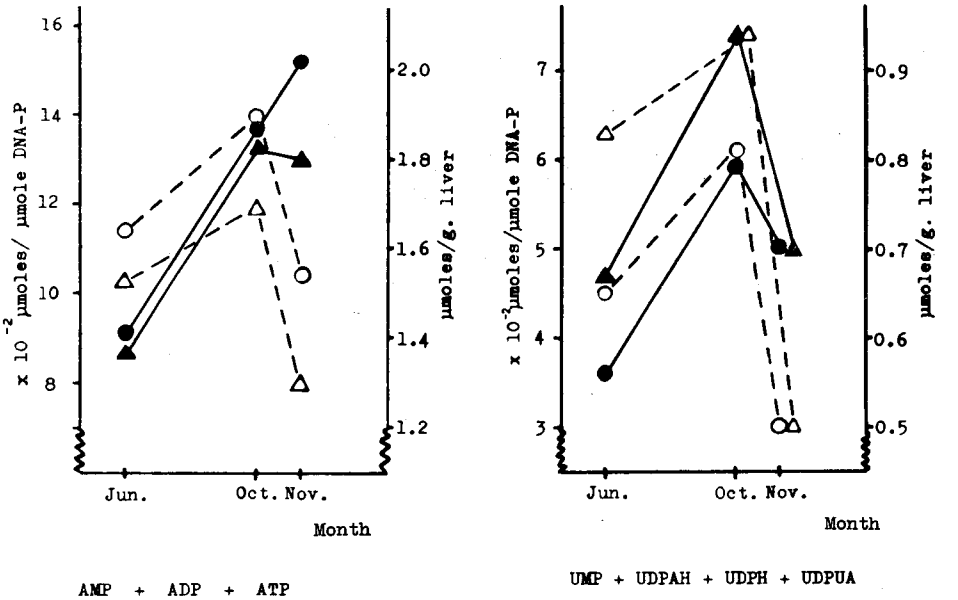

Fig. 3. Changes in the amounts of adenine nucleotides (left) and uracil nucleotides •——• Male, ▲——▲ Female: μmoles/μmole DNA-P; ○----○ Male, △----△ Female: μmoles/g wet weight.

肝臓重量は11月に高くなっており，単位重量当りのヌクレオチド量は減少しているが，DNA当りでは，Fig. 3に示したように，アデニンヌクレオチドプールの量は10月とそれ程大きな差は認められない。このことは，肝臓のアデニンヌクレオチドの絶対量には変化がないことを示している。11月にはAMPのアデニンヌクレオチドに占める割合が増大しているが，この点はATP，ADP，AMP間相互の変化は試料採取時の状況の違いで大きな変動が出る[8]ので，はっきりしたことはわからない。この点については検討中である。

ウラシルヌクレオチドはその80％以上がUDP-糖化合物で占められている。これらの化合物の量は10月に高くなっている。肝臓の単位重量当り，およびDNA当りの含量ともに減少していることから，糖代謝の中間体は産卵直前に減少し，多糖合成機能の低下を表わしているようである。

ヌクレオシド・塩基については含量が少なく，ヌクレオチドプールとの相互関連の面からの検討が必要である。前報までの結果[1-4, 7]と今回の結果から，アデニンヌクレオチドプールのレベルは動物が特別な生理状況にない限り，個体や雌雄，時期による変動よりは，動物の種による違いの方がはるかに大きく，同一動物ではむしろ，ほぼ一定のレベルを示すものと考えられる。

ヒメマスの飼育，採取にあたっては北海道立水産孵化場の中山忠衛氏，寺尾俊郎氏の御協力を得たことを感謝いたします。なお本研究経費の一部は昭和43年度文部省科学研究費によった。

要　　約

ヒメマス肝臓中のヌクレオチドパターン並びに含量はコイ，ニジマスなどの魚で得られた結果と類似している。時期的にはある程度変動が見られる。雌雄差は明らかでない。産卵直前ではウリジン糖化合物は減少の傾向にあるが，アデニンヌクレオチドのレベルは保持されている。

文　　献

1) 関　伸夫・新井健一・斎藤恒行 (1967). 北大水産彙報 **17**, 184.
2) ――――・斎藤恒行 (1967). 同誌 **18**, 231.
3) ――――― (1968). 同誌 **19**, 46.
4) ――――・斎藤恒行 (1967). 日本農芸化学会東北・北海道支部会発表.
5) 井村孝嗣・――――― (1969). 北大水産彙報投稿中.
6) 関　伸夫・金谷俊夫・斎藤恒行 (1969). 日水誌 **35**, 690.
7) ――――・斎藤恒行 (1968). 日本水産学会発表.
8) Bucher, N. L. R. & Swaffield, M. N. (1966). *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 445.
9) 緒方維弘 (1967). 生命と環境 p 35. 東京；共立出版.