



Title	ヒメマス筋肉グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素に関する研究 - I : 酵素の抽出性の検討およびその精製
Author(s)	中井, 俊雄; NAKAI, Toshio; 宮本, 芳則 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 26(2), 201-206
Issue Date	1975-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23559
Type	departmental bulletin paper
File Information	26(2)_P201-206.pdf



ヒメマス筋肉グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素に関する研究 -I
酵素の抽出性の検討およびその精製

中井俊雄*・宮本芳則*・柴田猛*

Studies on Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from Kokanee
Muscle-I. Extraction Studies and Purification of the Enzyme

Toshio NAKAI*, Yoshinori MIYAMOTO* and Takeshi SHIBATA*

Abstract

The extraction properties of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) from the kokanee muscle were studied and its purification was carried out. The results are summarized as follows:

1. When the muscle GPDH was extracted with distilled water as an extraction medium, the total extractable activities varied with the volume of that extraction medium. When the extraction volume increased, the extractable activities decreased. Such an effect was more remarkable in the case of GPDH extraction than in that of aldolase.

2. When the muscle GPDH was extracted with a KCl solution of various concentration, the higher that KCl concentration was, the more extractable the activities were. The extractable activities became constant at above 0.15 M KCl concentration.

3. According to the above results, the purification methods of the muscle GPDH were proposed. In one such method, the muscle was washed with a sevenfold volume of distilled water and the residues were extracted with 0.15 M KCl solution. The protein precipitated between 75 and 90% saturated ammonium sulfate was collected and was solved in 5 mM Tris-HCl containing 1 mM EDTA and 1 mM 2-MSH. Crystallizations were repeated at pH 8.0.

4. The muscle GPDH was not extracted in the distilled-water washing fraction but extracted in the salt extract fraction and purified easily with ammonium sulfate fractionation only. The crystalline enzyme is homogeneous with disc electrophoresis.

緒 言

グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 [D-glyceraldehyde-3-phosphate: NAD⁺ oxidoreductase (phosphorylating): 1, 2, 1, 12.] (以下 GPDH と略す) は解糖系で重要な役割を演じているため、ウサギ¹⁾、酵母²⁾ などで古くから研究がおこなわれてきた。しかし、魚類においてはヒラメ³⁾、チョウザメ⁴⁾、ニジマス⁵⁾、タラ⁶⁾ に関する研究が報告されているが、本酵素に対する性質を十分に明らか

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

にしておらず、特に動力学的性質はほとんど研究されていない。中井らはヒメマス⁹⁾の年周期と解糖系を中心としたエネルギー代謝に関する酵素の活性レベルの変動に関する研究をおこない、産卵しない一年魚では筋肉 GPDH の活性レベルがあまり変動しないのに対し、産卵する二、三年魚では産卵期の 10 月に著しく活性レベルが減少することを報告している⁷⁾。この挙動の原因として、酵素たんぱく量の増減、酵素や基質の局在性、阻害剤、活性化剤およびその他の影響因子の存在が考えられる。著者らは各種環境条件に対応する魚類の生理機構を、主として生化学的立場で検討することを目的として、本酵素の性質を詳細に研究し、新知見を得ようと試みた。

以上の目的のため、その第一歩として本酵素の精製法を検討した。ウサギ筋肉 GPDH の一部は、筋肉構造たんぱくに結合して、その抽出はイオン強度に強く依存することが報告されている⁸⁾。柴田らは各種魚類の解糖系の活性の測定の際、GPDH 活性が 0.3 M マンニットと 0.15 MKCl 抽出液で著しく相違するが、他の解糖系酵素にはその差がないことを報告している⁹⁾。ヒメマス筋肉 GPDH においても同様な挙動が推定されるので、本酵素を筋肉構造たんぱくに結合しているものと、結合していない遊離のものを区別なく収率よく抽出するため、まずその抽出性を検討し、ついで精製をおこなった。その結果、ディスク電気泳動法で単一の GPDH が高収量で得られたのでここに報告する。

実験方法

試料: ヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) は北海道さけます孵化場森支場の養殖魚を使用し、採集後、即殺して速やかに -20°C で保存した凍結筋肉を使用した。

たんぱくの定量: たんぱくは抽出液について 10% トリクロル酢酸で沈澱させ、遠心分離後、再蒸留水にけんたくし、ビュレット法により測定した。標準たんぱくとして牛血清アルブミン (Miles 製) を用いた。

活性の測定: GPDH は Adam 法¹⁰⁾、アルドラーゼ [fructose-1, 6-diphosphate: D-glyceraldehyde-3-phosphate lyase, 4, 1, 2, 13] (以下 ALD と略す) は Racker 法¹¹⁾ を変えた Deldrück 法¹²⁾ によって測定した。GPDH の酵素活性単位は国際標準法に従った。

結果および考察

抽出液量比の検討 GPDH と他の解糖系酵素との抽出性が相違することが以前に報告されているので⁸⁾、他の解糖系酵素の代表として ALD を用いて抽出性の検討をおこなった。凍結筋肉を肉挽器で細碎し、冷却した 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH* (pH 7.0) を抽出液として、容量をかえて、2 時間攪拌抽出した。残渣をセライトで濾過し、上澄液の総たんぱく量、総 GPDH 活性、総 ALD 活性を測定した。その結果を図 1 に示した。図 1 によると、試料重量に対して抽出液の比率を大きくすると、総たんぱく量、総 ALD 活性、総 GPDH 活性はいずれも減少する。これは魚体筋肉中の塩濃度が稀釈されるため塩溶効果が小さくなるためであろうと考えられる。さらに、総たんぱく量と総 ALD 活性は比較的並行した挙動を示し、筋肉重量に対して 2~3 倍量の抽出液で極大となり、以下徐々に減少するのに対し、総 GPDH 活性は極大が存在せず、容量比が大きいほど抽出されず、ALD よりも塩依存性が高いと思われる。特に抽出液量比が 7 倍以上では、抽出される GPDH が総 GPDH 量の 5% 以下で、ほとんど抽出されないことが明らかになった。

KCl 濃度の検討 つぎに、1 mM EDTA-1 mM 2-MSH を含む KCl 溶液を用い、KCl 濃度だけを変えて抽出される総たんぱく量、総 GPDH 活性および総 ALD 活性を測定した。抽出液量比は全て 10 倍とし 2 時間攪拌抽出しその結果を図 2 に示した。総たんぱく量、総 GPDH 活性および

* 2-MSH: β -Mercaptoethanol

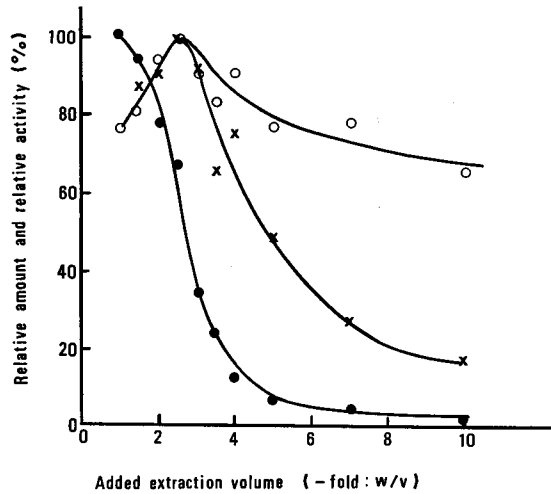


Fig. 1. Effect of amount of medium on extraction of kokanee muscle.
 (○-○) protein content; (●-●) D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity;
 (x-x) aldolase activity;

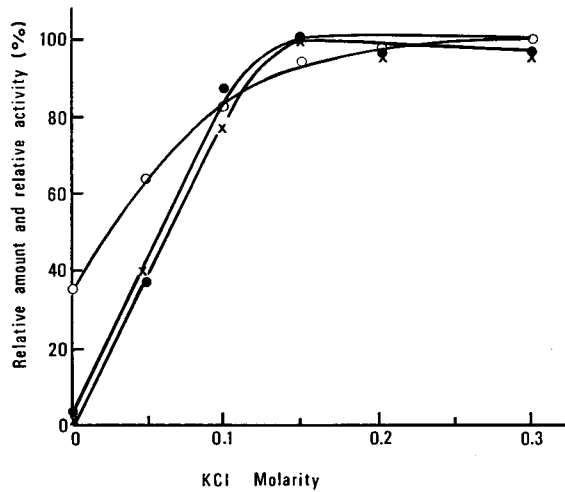


Fig. 2. Effect of KCl molarity on extraction of kokanee muscle.
 (○-○) protein content; (●-●) D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity;
 (x-x) aldolase activity;

総ALD活性はともに類似した曲線を示し、KCl濃度が高くなると抽出量が増大した。これはたんぱく質の塩溶効果と考えられる。KClを含まないときはGPDH活性とALD活性はほとんど認められず、0.15Mまで増加させると両活性もほぼ直線的に増加した。0.15Mから0.3Mまではたんぱく量、総GPDH活性および総ALD活性はほぼ一定であり、0.15M KCl濃度で筋肉中の抽出しうるGPDH

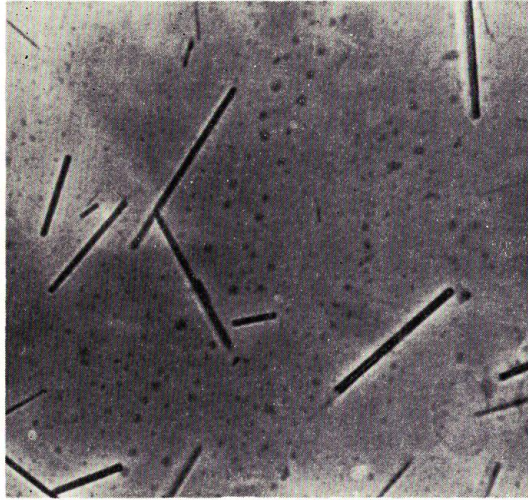


Fig. 3. Photograph of the crystalline kokanee muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. ($\times 600$)

は全て抽出されることが明らかになった。0.3N 以上では筋肉構造たんぱくが抽出されるので、これ以上は実験しなかった。

筋肉 GPDH の精製 以上の結果から、目的としない他のたんぱくを混入させずに、筋肉中の抽出される全 GPDH を抽出するため、次の方法で抽出をおこなった。筋肉細碎物 (500 g) を 7 倍量の 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH (pH 7.0) で 5 分間攪拌し、布濾過した。得られた残渣を 3 倍の 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH を含む 0.15 M KCl (pH 7.0) で 1 時間攪拌抽出し、布濾過した。上澄液を Osborne 法により硫安 70% 飽和にし 2 時間放置したのちセライトで吸引濾過した。得られた濾液にさらに固型硫安を加えて、95% 飽和とし、一晚放置した。これを 20000 \times g で 30 分間遠心分離してやや紅色の沈澱を得た。この沈澱を 100 ml の EDTA と 2-MSH を各 1 mM ふくむ 5 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解し、同量の飽和硫安溶液を加えた。生じた沈澱を 20000 \times g で 30 分間遠心分離し、1 M トリエタノールアミンで pH 8.0 に調整した。さらに少しづつ硫安を加えて結晶化した。一日後、針状の結晶が生じた。さらに毎日徐々に硫安を加えて、十分に結晶化させた。一週間後、20000 \times g で 60 分間遠心分離し、同様に再結晶化を 4 回くりかえした。結晶の写真を図 3 に示した。哺乳類の GPDH の結晶化には 2-MSH は必須ではないが、ヒメマスの場合は 2-MSH を加えなければ結晶化しなかった。これらの精製過程の一例を表 1 にまとめた。総 GPDH 活性は塩抽出画分に 90~95%、水洗浄画分に 5~10% 抽出された。比活性は塩抽出画分の方が 10~15 倍高かった。比活性は最大で 80~90 unit/mg であった。再結晶を 4 回くりかえすことによりディスク電気泳動的に単一になった (図 4A 参照)。酵素の収率は筋肉重量に対して 0.2% であった。

ディスク電気泳動 本精製法をさらに検討するために、ディスク電気泳動によりたんぱく質を検出した。水洗浄画分、塩抽出画分、70~95% 硫安飽和沈澱画分および 2 倍量の水抽出画分を 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH (pH 7.0) に透析し、6% の分離用ゲルを用いてディスク電気泳動を行った。その結果を図 4 に示した。水洗浄画分、倍量の水抽出画分には多くのたんぱくバンドが検出されたのに対し、塩抽出画分のたんぱくバンドの数は少かった。GPDH に相当するバンドは活性染色によって同定した。さらに硫安分画により GPDH 以外のバンドは消失し、容易に精製されることが明らかにな

Table 1. Summary of procedure for isolation of the kokanee muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Procedure	Total protein		Total activity* (unit)	Yield (%)	Specific activity (unit/mg)
	(g)	(%)			
Distilled water-washing	10.7	51.0	22000	9.0	2.0
KCl solution extract	10.3	49.0	226000	91.0	22.0
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ sup.	3.22	15.3	195000	79.2	60.0
70-95% (NH ₄) ₂ SO ₄ ppt.	2.45	11.7	195000	79.2	80.0
Crystallization	2.02	9.1	194000	79.0	91.0

* Total activity was the sum of activities in distilled water washing and KCl extract-fraction.

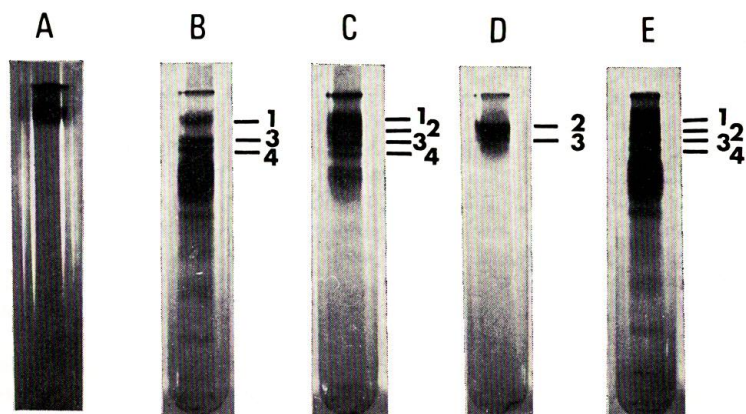


Fig. 4. Disce electrophoresis of the kokanee muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

A) purified D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Gel concentration was 7.5%.

B) distilled water-washing; C) KCl solution extract; D) 70-95% (NH₄)₂SO₄ ppt.; E) distilled water extract. In B)-E) Gel concentration was 6.0%. Protein was stained by amidoblack. The second band (No. 2) corresponded to that of the D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

った。また水洗浄画分には GPDH に相当するたんぱくバンドは検出されなかった。

以上の結果より、本抽出法はウサギなどに利用されている従来の抽出法にくらべると、いくつかの利点があると思われる。すなわち本抽出法は筋肉構造たんぱくに結合している GPDH を抽出することができ、抽出可能な全ての GPDH を抽出することができる。同時に収率も上昇した。また、水洗浄を

することにより不要なたんばくの混入をふせぐことができ、硫酸分画で容易に精製することができる。なお生体における本酵素と筋原繊維たんばくの結合性に関するさらに詳しい検討が必要であろう。

要 約

筋肉グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の抽出を検討し、その精製をおこなった。

1. 筋肉グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素および筋肉アルドラーゼを水抽出する際、抽出液量によって総活性が変動した。すなわち、抽出液量を大きくすると抽出される両活性は減少し、特に前者が著しく減少した。

2. 抽出液を KCl 溶液として種々の濃度で抽出すると、KCl 濃度が増加するにしたがって、抽出される両活性は増加し、0.15M 以上では一定になった。

3. 以上の結果から筋肉よりの本酵素の精製法を考案した。すなわち、筋肉を7倍量の水で洗浄し、その残渣から 0.15 MKCl 溶液で抽出し、70~9.5% 飽和硫酸で沈澱するたんばくを集め、沈澱を 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH をふくむ 5mM トリス-塩酸緩衝液に溶解し、pH8.0 で結晶化をくりかえすことによって精製した。

4. ディスク電気泳動法により、本酵素は水洗浄画分に溶出せず、塩抽出液に選択的に抽出され、硫酸分画によって容易に精製されることが明らかになった。

文 献

- 1) Cori, G.T., Slein, M.W. and Cori, C.F. (1948). Crystalline D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *J. Biol. Chem.* **173**, 605-617.
- 2) Krebs, E.G., Rafter, G.W. and Junge, J.M. (1953). Yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Ibid.* **200**, 479-492.
- 3) Marangos, P.J. and Constantinides, S.M. (1973). Multiple forms of flounder glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Ibid.* **249**, 951-958.
- 4) Seydoux, F., Bernhard, S., Pfenninger, O., Payne, M., and Malhotra, O.P. (1973). Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **12**, 4290-4300.
- 5) Lehherz, H.G., Savage, B. and Abacherli, E. (1973). Adenosine nucleotide-mediated subunit exchange between isoenzyme of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Nature*, **245**, 269-271.
- 6) Cowey, C.B. (1967). Comparative studies on the activity of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from cold and warmed animals with reference to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* **23**, 969-976.
- 7) 中井俊雄・柴田猛・斎藤恒行 (1970). 魚類組織構成成分の代謝活性の時期的変化-IV ヒメマス筋肉中の解糖系酵素活性の産卵による変化. 北大水産彙報. **21**, 240-245.
- 8) Arnold, H. and Pette, D. (1970). Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase. *European J. Biochem.* **6**, 163-171.
- 9) 柴田猛・中井俊雄・斎藤恒行 (1969). 水産動物筋肉の酵素化学的研究-VIII. エネルギー代謝酵素の貯蔵中の活性変化について. 北大水産彙報. **20**, 17-226.
- 10) Adam, H. (1961). Nucleotidspezifität glykolytischer Kinasen; enzymatische Bestimmung des Adenylsauresystems. *Biochem. Z.* **335**, 25-36.
- 11) Racker, E. (1947). Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity. *J. Biol. Chem.* **167**, 843-854.
- 12) Delbrück, A., Zebe, E., und Bücher, Th. (1959). Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernder in Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von *Locusta migratoria* und ihre cytologische Zuordnung. *Biochem. Z.* **331**, 277-296.