



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－II：酵素作用におよぼすpHの影響
Author(s)	宮本, 芳則; MIYAMOTO, Yoshinori; 柴田, 猛 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 29(2), 148-154
Issue Date	1978-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23640
Type	departmental bulletin paper
File Information	29(2)_P148-154.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-II
酵素作用におよぼす pH の影響

宮本 芳則・柴田 猛*

Studies on D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
from Kokanee Muscle-II:

The effect of pH on the enzyme activity

Yoshinori MIYAMOTO and Takeshi SHIBATA

Abstract

The effect of pH on the activity of the D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) from kokanee muscle was studied. The results are summarized as follows:

1. The optimum pH of the kokanee muscle GPDH was in the range of 8.0 to 8.5 and was identical with that of the rabbit muscle GPDH. The two activities of the kokanee muscle GPDH and rabbit muscle GPDH decreased similarly, when pH became acidic.
2. The kokanee muscle GPDH and the rabbit muscle GPDH were stable in the pH range of 6-10 and 6-9, respectively.
3. At the optimum pH, the Michaelis constants for 3-phosphoglycerate of the kokanee muscle GPDH was 1.1 mM and was higher than that of the rabbit muscle one.
4. At lower pH, the affinities for substrate of the kokanee and rabbit muscle GPDH diminished similarly. Decreases in their activities at lower pH were not due to the pH instability of the enzymes. This suggests that the active site of the kokanee muscle GPDH was different than that of the rabbit enzyme.

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、エネルギー代謝の基本である解糖作用において、唯一の酸化的リン酸化を行なう重要な酵素である。本酵素の作用によって生じた高エネルギー物質が次の段階で ADP に移されて ATP を形成する。しかし、本酵素は産卵を含む周年変化において、大きく活性レベルが変動し、特にエネルギーを非常に消費すると思われる産卵期に最も活性が低下することが報告されている¹⁾。このことは魚類の生理変動にともなって、なんらかの要因により本酵素の作用が調節されているのではないかと考えられる。酵素作用におよぼす要因として、pH、温度、補酵素の量、エフェクターの存在などが考えられる。このような生理変化にともなう代謝調節を明らかにするため、本酵素におよぼす基本的な pH の影響を明らかにしたので報告する。

* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Fisheries, Hokkaido University.)

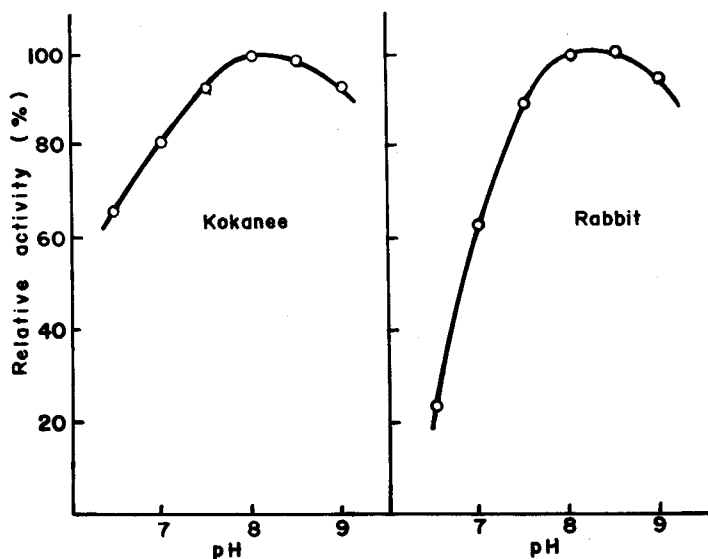


Fig. 1. Optimum pH of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of kokanee and rabbit muscle.

The buffer was 50 mM triethanolamine-HCl containing 5 mM EDTA and 3.3 mM 2-mercaptoethanol. Incubation was carried out at 25°C for 10 min.

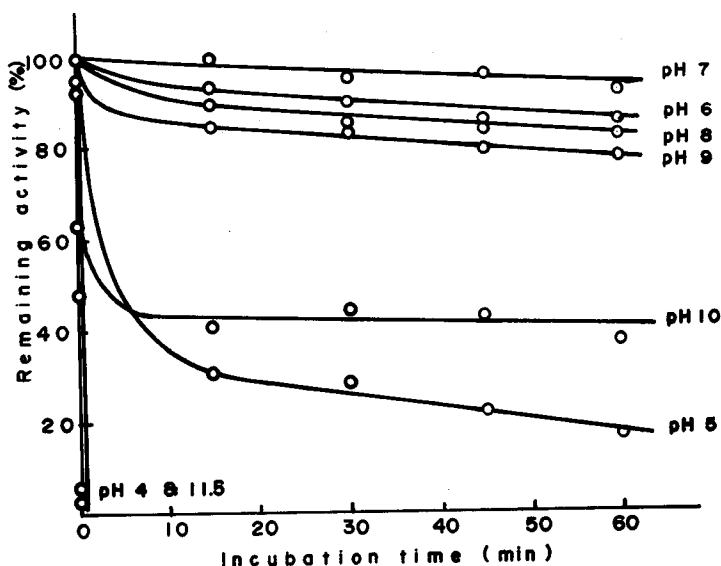


Fig. 2. The pH stability of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The protein concentration was 36.8 $\mu\text{g/ml}$ of incubation solution. Each incubation buffer contained 1 mM EDTA and 1 mM 2-mercaptoethanol. The buffers were: pH 4.0, lactate buffer; pH 5.0, acetate buffer; pH 6.0, citrate buffer; pH 7.0, phosphate buffer; pH 8.0, triethanolamine buffer; pH 9.0, aminoethylpropanediol buffer; pH 10, glycine buffer; pH 11.5, phosphate buffer. Incubation and assay of activity were carried out at 25°C.

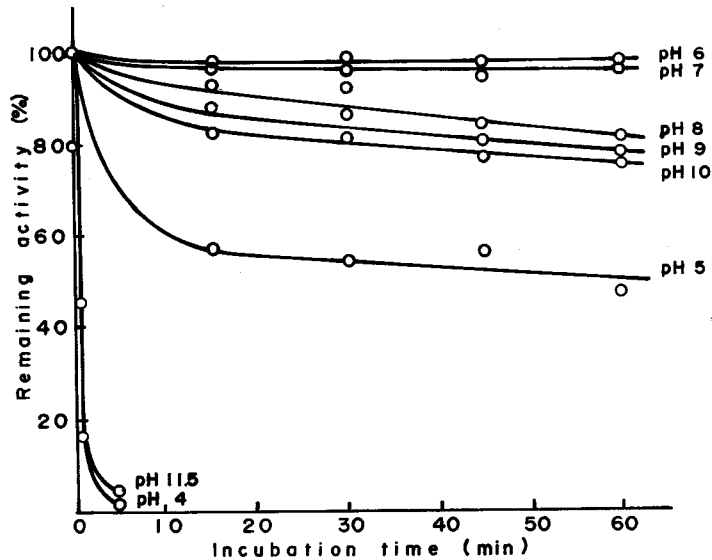


Fig. 3. The pH stability of kokanee muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The protein concentration was 37.6 $\mu\text{g/ml}$ of incubation solution. Other conditions were the same as in Fig. 2.

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採集後、即殺し、すみやかに -20°C で凍結保存し、これより筋肉を採取し供試した。酵素の精製法は前報²⁾にしたがった。対照として用いたウサギ GPDH は Cori の方法³⁾ によって精製した。

たんぱく質の定量: たんぱく濃度は 280 nm の吸光度によって求め、1% の吸光度を 10.58 として計算した。この値は充分蒸留水に透析した酵素を凍結乾燥し、得られた粉末から灰分および水分を補正して求めた実験値である。吸光度は島津 kk 製の光電分光光度計 QV-50 によって測定した。

酵素活性の測定: 酵素活性は Adam 法⁴⁾ によって測定した。

試薬: 基質である 3-ホスホグリセリン酸バリウム塩はシグマ製、補酵素の NADH はオリエンタル酵母製、ATP および補助酵素である酵母ホスホグリセリン酸キナーゼはベーリンガー製を使用した。

実験結果および考察

至適 pH: 結晶酵素の硫酸懸濁液を遠心分離し、あつめた沈殿を 15 mM EDTA および 10 mM 2-MSH* を含む 0.15 M トリエタノールアミン緩衝液に溶解した。この酵素液を同緩衝液で希釈し活性を測定した。3.3 mM EDTA と 3.3 mM 2-MSH を含む 50 mM トリエタノールアミン緩衝液を基本とした各 pH の活性測定液で、 25°C で 6 分間反応させた。その結果を図 1 に示した。図 1 の結果によると、至適 pH はヒメマスおよびウサギともに pH 8.0~8.5 にあり、両酵素間の差異は認められなかった。しかし、ウサギ GPDH では pH 7.5 以下の酸性側で著しく活性が低下するのに対し、ヒメマス GPDH では pH 6.5 でも 60% 以上の活性を有し、大きな活性低下が認められなかった。ウサギ GPDH におけるこのような酸性側での活性低下は、グリセルアルデヒド-3-リン酸と NAD を使用した反応組成液

* 2-MSH: 2-mercaptoethanol

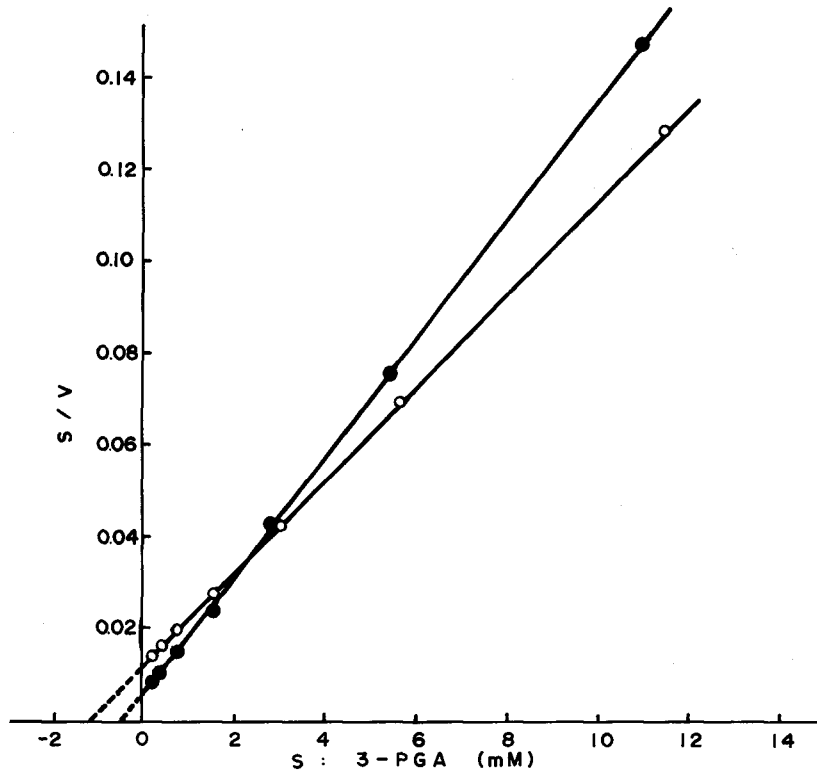


Fig. 4. S-S/V plot of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of kokanee and rabbit muscle at pH 8.0.

The activity was assayed in 50 mM triethanolamine buffer containing 5 mM EDTA and 3.3 mM 2-mercaptoethanol at 25°C. (○) kokanee, (●) rabbit.

の場合でも報告されている⁵⁾。酸性側での活性低下の原因として、酵素の安定性の減少および活性部位の状態変化が考えられる。これらを区別するため、両 GPDH の pH 安定性を検討した。

pH 安定性：結晶酵素懸濁液を遠心分離後、沈殿を 1 mM EDTA-1 mM 2-MSH 溶液 (pH 7.0) に溶解し、各種類の pH 緩衝液 (いずれも 0.15 M) で 1:1 に希釈して、最終酵素濃度を 37~38 μg/ml にした。これらの酵素液を 25°C にインキュベートし、一定時間毎に酵素液をとりだし、氷水で 12 分間冷却してから、5 mM EDTA および 3.3 mM 2-MSH をふくむ pH 7.6 の活性組成液で残存活性を測定し、図 2 および図 3 を得た。図 2 はウサギ GPDH の pH 安定性で、これによると pH 6~9 の範囲で比較的安定であり、pH 4.0 および pH 11.5 では 5 分以内にほとんど失活した。pH 5 および pH 10 では、5 分以内に各 48%、63% まで失活し、60 分後には 16% および 38% まで失活した。一方図 3 のヒメマス GPDH では pH 6~10 の範囲で安定であり、pH 4 および pH 11.5 で速やかに失活した。pH 5 では 15 分間で 60% まで失活するが 60 分後でも 50% しか失活しなかった。このことから、両酵素の安定性に対する pH の効果は基本的には同様であるが、ヒメマス GPDH の安定 pH 域がウサギ GPDH よりやや広い点異なる。

至適 pH の実験は、pH 安定性の実験から見てすべて安定な pH 範囲であるので、至適 pH の結果におけるウサギ GPDH の酸性側による著しい活性低下は酵素の安定性に起因するものではなく、活性

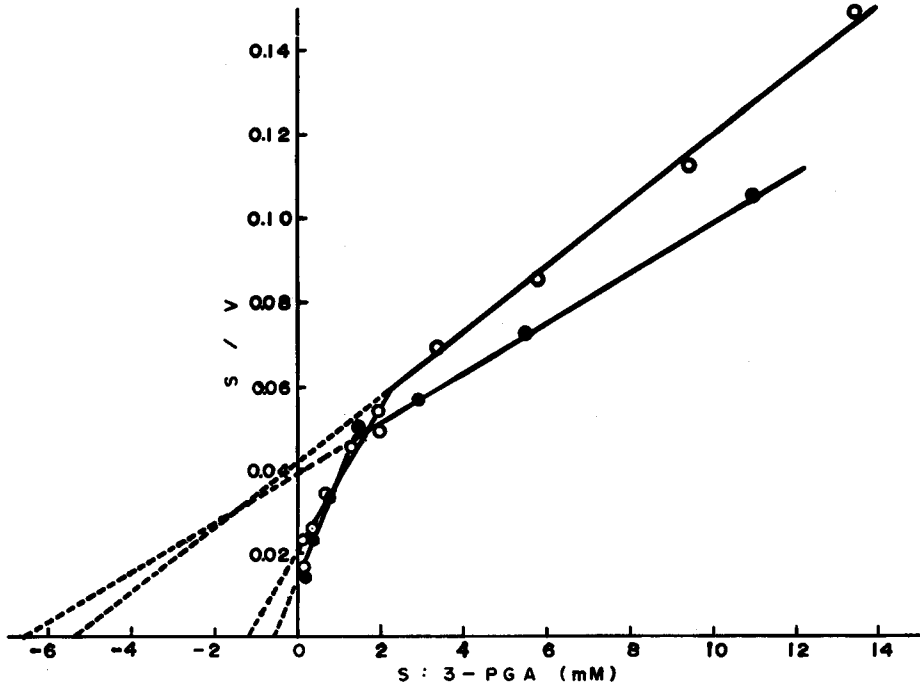


Fig. 5. S-S/V plot of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of kokanee and rabbit muscle at pH 6.5. The activity was assayed in 50 mM triethanolamine-acetate buffer containing 5 mM EDTA and 3.3 mM 2-mercaptoethanol at 25°C. (○) kokanee, (●) rabbit.

部位の状態に起因するものであろうと推定される。そこで次に活性部位の状態を検討するため、基質親和力におよぼす pH の影響を検討した。

基質親和力におよぼす pH の影響：5 mM EDTA および 3.3 mM 2-MSH を含む 50 mM トリエタノールアミン緩衝液を用い、基質 (3-ホスホグリセリン酸) 濃度を変えて反応速度を測定した。図 4 は pH 8.0 におけるヒメマス GPDH とウサギ GPDH の Woolf プロットである。両酵素とも至適 pH 付近 (pH 7.0-8.5) では典型的なミハエリス式に従い、pH 8 での K_m はヒメマスでは 1.1 mM, ウサギでは 0.4 mM であり、ヒメマス GPDH の K_m はウサギ GPDH の 2.5 倍であった。トリエタノールアミン酢酸で調整した pH 6.5 系では Woolf プロットはミハエリス式に従わず、基質濃度が低いときに直線からはずれる傾向があった。その結果を図 5 に示した。両酵素とも pH 6.5 ではあまり失活しないことを考えるとこの現象は酸性による酵素たんぱくの変性というよりは、酵素-基質複合体の解離状態が変化したためだと考えられる。各 pH における K_m の対数と pH との関係をもとめると図 6 のようになった。ウサギ、ヒメマスともに K_m は pH に依存し、至適 pH より酸性側では K_m が大きくなり基質親和力の低下が認められる。得られた曲線から折点を求めると、 $pK=7.2$ が得られ、Dixon らによれば⁶⁾ これは酵素あるいは基質の解離恒数と考えられ、酵素と基質が活性複合体を形成する際、 $pK=7.2$ の残基の関与が示唆される。このような残基は基質中のリン酸基、酵素中では、システインの SH 基、およびヒスチジンのイミダゾール基などがあげられる⁷⁾。ウサギを始めとする多くの起源からの GPDH が活性部位にシステインをふくんでいることは良く知られているが⁸⁻¹⁰⁾、本

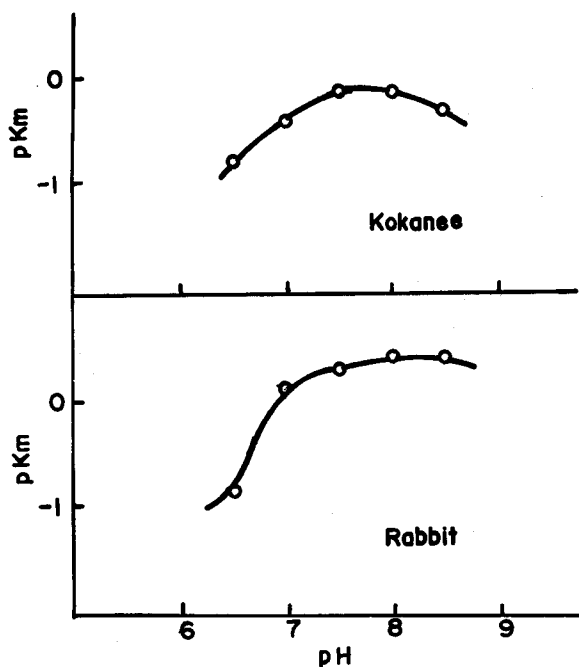


Fig. 6. The effect of pH on Michaelis constants for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of kokanee and rabbit muscle. pH 6.5, triethanolamine-acetate buffer; pH 7.0-8.5, triethanolamine-HCl buffer.

実験がこのシステインの挙動を示しているかどうかは明らかでない。しかしヒメマスでは pH 6.5~7.5 において傾きが +1 であるのに対し、ウサギでは +2 であり、両者の活性部位の解離状態には明らかな相違が認められる。これはヒメマス GPDH がウサギ GPDH とは異った活性部位の状態を示すことによるものであろう。

要 約

- 1) ヒメマス GPDH の至適 pH は 8.0~8.5 であり、ウサギ GPDH と同じであるが、pH の低下による活性の減少はウサギ GPDH より小さかった。
- 2) ヒメマス GPDH は pH 6~9 で安定であり、ウサギ GPDH より安定な pH 域が広がった。また酸性側での活性の低下は酵素の安定性に由来するものとは考えられなかった。
- 3) ヒメマス GPDH の K_m は至適条件下では 1.1 mM でウサギより大きかった。
- 4) ヒメマス、ウサギともに酸性側で基質親和力が減少し、酸性側での活性低下は活性部位の解離状態によるものであろうと推定された。このことによりヒメマス GPDH はウサギ GPDH と異った活性部位の状態をしているものと推定した。

謝 辞

本実験を遂行するにあたって、試料の提供を受けた北海道 さけます 孵化場 森支場の方々、並びに北海道大学水産学部高野和則助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 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周期的変化-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.
- 2) 中井俊雄・宮本芳則・柴田 猛 (1975) 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. 酵素の抽出法の検討およびその精製法, 同誌 26. 201-206.
- 3) 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.
- 4) Adam, H. (1961). Nucleotidspezifität glykolytischer Kinasen; enzymatische Bestimmung des Adenylsauresystem. *Biochem. Z.* 335, 25-36.
- 5) Bondi, E., Watkins, J., and Kirtley, M.E. (1969). Comparison of the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rabbit tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 185, 305-309.
- 6) Dixon, M., and Webb, E.C. (1970). 酵素 (和訳) 595p. 白水社, 東京.
- 7) 西沢一俊・志村憲助 (1967). 入門酵素化学 275p. 南江堂, 東京.
- 8) Perpham, R.N. (1969). The comparative structure of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 111, 17-21.
- 9) Allison, M.S., and Kaplan, N.O. (1964). The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 239, 2140-2151.
- 10) Trentham, D.R. (1971). Rate-determination processes and the number of simultaneously active site of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 122, 71-77.