〔原 著〕

ディスク泳動法による魚類および海生動物の アルドラーゼの分析*

竹 尾 和 典**

Summary

Using the method of staining aldolase activity in disc electrophoresis gels,⁵⁾ it was demonstrated that the muscle and liver extracts of various fishes and other marine animals contained isozymes of aldolase.

Young yellowtail *Seriola quinqueradiata* TEMMINCK et SCHLEGEL, flatfish *Microstoma kitaharai* JORDAN et STARKS, swellfish *Fugu pardale* TEMMINCK et SCHLEGEL, and sea bream *Sebastes matsubarae* HILGENDORF, contained in their muscle and liver extracts 2, 3, 5, and 5 aldolase isozymes, respectively.

In muscle extracts of prawn *Penaeus japonicus* BATE, 3 aldolase isozymes were separated. In muscle extracts of *Squilla oratoria* de HAAN and of sphincter muscle extract of *Atrina pectinata* LINNÉ, aldolase activity was contained in a single fraction. In the mantle extracts of cuttlefish *Sthenoteuthis bartrami* LESCUEUR and *Octopus vulgaris* CUVIER, 3 aldolase isozymes were separated.

魚類のアルドラーゼについては現在まで主として筋肉アルドラーゼ¹⁻⁴⁾に関する研究が行なわれている。しかしこの酵素は不安定であるといわれ^{1,2)}、結晶化には成功していない³⁾。

われわれは前報⁵⁾においてディスク泳動法を用いたアルドラーゼ染色法を考案したが、本実験はこの方法を用いて種々の魚類および数種の海生動物の組織抽出液中のアルドラーゼの分布をしらべたものである。多くの魚類においても、哺乳動物^{6,7)}あるいは鳥類⁸⁾と同様にアルドラーゼのアイソザイムが存在することを証明しえた。

実験材料および実験方法

ディスク泳動法⁹⁾、アルドラーゼ活性測定法¹⁰⁾、蛋白濃度測定法¹¹⁾、およびアルドラーゼ染色法⁵⁾は前報⁵⁾のとおりである。

組織抽出液

魚類は生きた材料を直ちに解体して骨格筋および肝臓を摘出し、pH 7.4に調整した1mMのEDTA液を組織量の2倍量加えてホモジェナイズし、3,000回転60分、次いで12,000回転40分遠沈して得た上澄を試料とした。

くるまえば、しゃこは軀幹部の筋肉、たいらぎは閉殻筋、いか、および、たこ、は外套膜を上と同様に処置し

表1 各種魚類および海生動物の組織抽出液のアルドラーゼ活性

抽 出 液	A蛋白量 mg/ml	B 活 性 $\Delta E_{2525}/\text{ml}$	C比活性 B/A
ぶ り 白色筋	16.0	250	15.8
〃 〃	27	230	8.4
〃 〃	36	240	6.6
〃 血合筋	7.6	0.42	0.056
〃 肝 臓	15.0	2.0	0.14
ひがんふぐ 骨格筋	24	188	7.9
やなぎむしが れ い 〃	14.6	108	7.4
〃 肝 臓	48	9.9	0.19
あこうだい 骨格筋	18.0	52	2.9
〃 肝 臓	43	12.7	0.30
こ い 骨格筋	14.2	73	5.2
くるまえば 筋 肉	10.4	42	4.0
しゃこ 〃	2.7	32	11.7
たいらぎ 閉殻筋	4.2	4.8	1.15
ば かい か 外套膜	10.0	25	2.5
ま だ こ 〃	3.9	15.7	4.0

て得た1mM EDTA抽出液である。これらの試料液は凍結して貯えたと約1週間は泳動像にほとんど変化をきたすことなく保存することができる。

*Studies on aldolases of fishes and other marine animals by disc electrophoresis.

**Kazusuke Takeo, 山口大学医学部生化学教室

表1に各種魚類および海生動物の組織抽出液中のアルドラーゼ活性と蛋白濃度を示した

実験結果

1: ぶり, (*Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel)

ぶり, の骨格筋には白色の骨格筋とミオシン様の色素蛋白に富むといわれる赤色の血合筋とが存在する。白色筋の抽出液の活性は表1に示したように抽出蛋白濃度の高低にかかわらずほぼ同じ値を示している。これはアルドラーゼが抽出されやすい蛋白であるためと考えられる。そのうち最も高い比活性を示した抽出液はうさぎ骨格筋抽出液のアルドラーゼの比活性⁵⁾の約3倍の値を示す1例であったが、抽出液の単位容積あたりの活性はかえって低く約2/3であった。

図1 ぶりの筋肉および肝臓抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; 白色筋抽出液の蛋白分画像と
B; そのアルドラーゼ活性染色像。
C; 血合筋抽出液の蛋白分画像と、
D; そのアルドラーゼ活性染色像。
E; 肝臓抽出液の蛋白分画像と、
F; そのアルドラーゼ活性染色像。
泳動条件: アクリルアミド, 7.5%, 200
Volt, 1.5時間。
活性染色時間: B; 30°C, 20分,
D; 30°C, 2時間, F; 30°C, 50分。

図1-A, Bはぶり白色筋抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性染色像(B)とを示したものである。蛋白成分は泳動速度の遅い分画から数えて第3および第4分画に2個の濃度の高い分画と第1, 第2, 第5, 第6分画の4個の濃度の低い分画とに分れているが、アルドラーゼ活性は第3分画に一致して1個だけ証明される。Kwon, Olcott³⁾は硫酸分画法を用いてまぐろの筋アルドラーゼを精製し、比活性がうさぎ骨格筋の結

晶アルドラーゼの60%に達した標品を得たと報告している。われわれの用いたぶり白色筋の抽出液は精製処理を行なう前に比活性がすでにうさぎ筋結晶アルドラーゼの約30%に達している(表1)。一方その泳動像のデジトメトリーによりアルドラーゼ分画の相対濃度は約30%であるから、もし魚類一般の筋肉アルドラーゼがうさぎ筋アルドラーゼよりも比活性が低い³⁾とすれば、ぶりのアルドラーゼ分画はアルドラーゼ以外の蛋白を含む余地は少なくなる。しかしこの活性分画は高い乳酸脱水素酵素作用を有しており単一のアルドラーゼ分画とは考えられない。

ぶりの血合筋抽出液は表1に示したように、アルドラーゼ活性が弱く、白色筋の約300分の1にすぎない。その蛋白泳動像は図1-Cに示したように、白色筋とはかなり異なった像を呈している。すなわち、1つの主成分を含めて境界のあまり鮮明でない6個の分画に分かれているが、アルドラーゼ活性(図1-D)は泳動速度の1番遅い分画にだけ認められる。この活性分画の泳動速度は白色筋のアルドラーゼ分画の泳動速度と等しく、両筋のアルドラーゼは同一の酵素蛋白であろうと考えられる。

ぶりの肝臓抽出液中の蛋白質のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像を図1-EとFに示した。蛋白成分は17個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は泳動速度の遅い分画から数えて第7分画に一致して見られるが、第9分画にも弱い活性が認められる。この2つの活性分

図2 やなぎむしがれいの筋肉および肝臓抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; 骨格筋抽出液の蛋白分画像と、
B; そのアルドラーゼ活性染色像。
C; 肝臓抽出液の蛋白分画像と、
D; そのアルドラーゼ活性染色像。
泳動条件: 図1に同じ。
活性染色時間: B; 30°C, 40分,
D; 30°C, 1時間。

画のうち第7分画に認められるアルドラーゼは筋肉抽出液中のアルドラーゼと泳動速度が等しく、同じ酵素蛋白であろうと考えられる。

2: やなぎむしがれい (*Microstoma kitaharae* Jordan et Starks)

図2-A, Bにかれいの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性染色像(B)とを示した。蛋白成分は12分画に分かれ、アルドラーゼ活性は泳動速度の遅い分画から数えて第1, 第2, 第9分画に一致して3カ所に認められる。図2-C, Dは同じかれいの肝臓抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(C)とアルドラーゼ活性の染色像(D)とを示したものである。蛋白成分は17個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は第3, 第5, 第10分画に証明されるが、第10分画の活性が最も高い。肝臓抽出液中に現われるこれら3つの活性分画は泳動的には筋肉抽出液中に存在する3つの活性分画とそれぞれ等しいものと考えられる。

3: ひがんふぐ (*Spheroides pardale* Temminck et Schlegel)

図3-A, Bはひがんふぐの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性の染色像(B)を示したものである。蛋白成分は約10個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は泳動速度の遅い分画から数えて第4分画に一致して強く出現しているが、第2, 第10分画にも弱い活性を示す。

図3 ひがんふぐの骨格筋および肝臓抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; 骨格筋抽出液の蛋白分画像と,
B; そのアルドラーゼ活性染色像。
C; 肝臓抽出液の蛋白分画像と,
D; そのアルドラーゼ活性染色像。
泳動条件: 図1に同じ。
活性染色時間: B; 30°C, 40分,
D; 30°C, 1時間。

一方、同じふぐの肝臓抽出液中の蛋白質のディスク泳動像は図3-C, Dに示したように、約20個の分画に分かれ(C), アルドラーゼ活性(D)は泳動速度の遅い分画から数えて第4, 第5, 第8と第17の4分画に証明される。この4つの活性分画の中で活性の最も高い第4分画の泳動速度は、筋肉抽出液の活性分画の中で最も活性の高い分画の泳動速度と等しく、両者は同じ酵素蛋白であろうと考えられる。他方、肝臓抽出液中の第17分画に対応する活性分画は筋肉抽出液の第10分画のアルドラーゼと同一酵素蛋白であろうと考えられる。

4: あこうだい (*Sebastes matsubara* Hilgendorf)

図4-A, Bはあこうだいの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性の染色像(B)を示したものである。蛋白成分は約9個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は第4, 第6, 第8の3分画に出現するが、第6分画の活性が最も高い。

図4 あこうだいの骨格筋および肝臓抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; 骨格筋抽出液の蛋白分画像と,
B; そのアルドラーゼ活性染色像。
C; 肝臓抽出液の蛋白分画像と,
D; そのアルドラーゼ活性染色像。
泳動条件: 図1に同じ。
活性染色時間: 30°C, 30分。

図4-C, Dは同じあこうだいの肝臓抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(C)とアルドラーゼ活性染色像(D)とを示したものである。蛋白成分は約16個の分画に分かれている。肝臓抽出液の最も強いアルドラーゼ活性帯は筋肉抽出液中の主活性分画と泳動速度がほぼ等しい。しかしそれよりも泳動速度の小さい2個の活性分画(第4, 第5分画)と、それより泳動速度の大きい2個の弱い活性分画(第10, 第12分画)が見られる。そのうち泳動速度の小さい第4分画と泳動速度の大きい第12分画を除いて、他の3個の活性分画は筋肉抽出液中に見ら

れる3個のアルドラーゼ分画とそれぞれ対応する位置にある。

5: こい (*Cyprinus carpio* Linné)

図5はこいの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性の染色像(B)を示したものである。蛋白成分は約10個の分画に分かれ、アルドラーゼ

図5 こい骨格筋抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像。

A; 骨格筋抽出液の蛋白分画像,

B; アルドラーゼ活性染色像。

泳動条件: 図1に同じ。

活性染色時間: 30°C, 40分。

活性は第2, 第3, 第6, 第8分画に一致して4個の分画が見られる。

6: くるまえば (*Penaeus japonicus* Bate)

図6-A, Bはくるまえばの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性の染色像(B)を示したものである。蛋白成分は約12個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は泳動速度の遅い分画から数えて第2, 第4, 第5分画に一致して認められる。

7: しゃこ (*Squilla oratoria* de Haan)

図6-C, Dはしゃこの筋肉抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(C)とアルドラーゼの活性染色像(D)を示したものである。蛋白成分は約10個の分画に分かれる。アルドラーゼ活性は第3分画に一致して1個だけ証明される。

8: たいらぎ (*Atrina pectinata* Linné)

図6-E, Fはたいらぎの閉殻筋抽出液中の蛋白質のディスク泳動像(E)とアルドラーゼ活性染色像(F)を示したものである。蛋白成分は約15個の分画に分かれ、アルドラーゼ活性は第5分画に一致する1分画だけに証明される。

9: ばかい (*Sthenoteuthis bartrami* Lesueur)

図7-A, Bはばかいの外套膜抽出液中の蛋白質のデ

図6 くるまえば・しゃこおよびたいらぎの筋肉抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; くるまえば軀幹筋抽出液の蛋白分画像,

B; そのアルドラーゼ活性染色像。

C; しゃこの軀幹筋抽出液の蛋白分画像と,

D; そのアルドラーゼ活性染色像。

E; たいらぎの括約筋抽出液の蛋白分画像と,

F; そのアルドラーゼ活性染色像。

泳動条件: 図1に同じ。

活性染色時間: B; 30°C, 30分,

D; 30°C, 30分, F; 30°C, 20分。

ィスク泳動像(A)とアルドラーゼ活性の染色像(B)とを示したものである。蛋白成分は約22個の分画に分かれているが、アルドラーゼ活性は第12分画に一致して一つの主活性分画が現われているほかに、泳動ゲルの原点に近く蛋白分画像の不鮮明な場所と第10分画の計3分画に

図7 いかおよびたこの外套膜抽出液のディスク泳動像とアルドラーゼ活性染色像

A; いか外套膜抽出液の蛋白分画像と,

B; そのアルドラーゼ活性染色像。

C; たこ外套膜抽出液の蛋白分画像と,

D; そのアルドラーゼ活性染色像。

泳動条件: 図1に同じ。

活性染色時間: B; 30°C, 40分,

D; 30°C, 1時間。

認められる。

10: まだこ (*Octopus vulgaris* Cuvier)

図 7-C, D はまだこの外套膜抽出液のディスク泳動像 (c) とアルドラーゼ活性の染色像 (D) とを示したものである。蛋白成分は約 12 個の分画に分かれているが第 4 および第 9 分画は蛋白濃度が高い。アルドラーゼ活性は第 3, 第 4, 第 6 分画に一致して 3 個認められる。そのいずれも泳動的にはたこの外套膜抽出液中のアルドラーゼとは異なった酵素であろうと考えられる。

考 按

Rutter ら⁶⁾, Leuthardt ら⁷⁾ あるいは Kaplan ら⁸⁾ によって報告されているように、哺乳動物および鳥類においてはアルドラーゼには電気泳動的、免疫学的に区別される臓器特異的な 3 つの型の酵素——筋肉型、肝臓型、脳型——があると考えられている。しかもこれらのアルドラーゼはそれぞれ 4 個の subunits (副量体) からなる tetramer (4 量体) でそれぞれ 2 種類の臓器特異性アルドラーゼの間の hybridization (混成) によって更に 3 個ずつの hybrids (混成体) の形成されることが知られている。他の部門に属する動植物のアルドラーゼについてはアイソザイムの存在に関する報告はない。

まぐろ筋アルドラーゼ⁸⁾, ボア蛇の筋肉アルドラーゼ¹²⁾, ほうれん草アルドラーゼ^{13, 14)}, の分子量はうなぎ筋アルドラーゼの分子量に近く、更にボア蛇筋アルドラーゼ¹²⁾, およびほうれん草アルドラーゼ¹⁴⁾ は 3 つの活性中心を有していると報告されている。

ぶりにおいては白色筋、血合筋ともにその抽出液中にいわゆる筋肉型アルドラーゼと考えられる活性分画のみを認める。しかし肝臓抽出液中には、筋肉型アルドラーゼと泳動速度のほぼ等しい主活性分画のほかにそれよりやや泳動速度の大きい活性分画が認められる。

かれいの筋肉抽出液中には 3 つのアルドラーゼ分画が存在し、そのうち泳動速度の最も遅い活性分画が主成分をなしている。一方、かれいの肝臓抽出液においても泳動的には全く同じ位置に 3 個の活性分画が認められるが、泳動速度の最も大きい分画が主活性分画をなしている。したがって、筋肉および肝臓抽出液中に見られる 3 つのアルドラーゼ分画の中で泳動速度の最も小さいものを筋肉型、最も大きい分画を肝臓型と考えることができよう。しかし、ぶり肝臓抽出液中に見られる 2 個の活性分画のうち、泳動速度の小さい分画は泳動速度の点ではかれいの筋肉型アルドラーゼに対応するものであるが、泳動速度の大きい分画はかれいの肝臓型アルドラーゼと考えられる分画に比してはるかに泳動速度が小さい。

ふぐにおいては筋肉抽出液中に、ぶり、かれいの筋肉型アルドラーゼと考えられる酵素分画に一致して 1 つの主活性分画を見るが、それよりも更に泳動速度の小さい活性分画が 1 個存在する。更にふぐ肝臓抽出液中には 4 個の活性分画を見るが、そのうち泳動速度の最も小さい分画が主活性分画であり、しかも筋肉抽出液中の主活性分画と同一のアルドラーゼであると考えられる。したがってふぐの肝臓抽出液中のアルドラーゼは筋肉型アルドラーゼと区別できない。

他方、あこうだいにおいては筋肉抽出液中の主活性分画はかれい、ぶり、あるいはふぐの筋肉アルドラーゼと考えられる分画よりも速く泳動しており、肝臓抽出液の主活性分画も筋肉抽出液の主活性分画と泳動的に同一である。

以上のように、魚類のアルドラーゼについては哺乳動物の場合と異なって筋肉抽出液中にもいわゆる筋肉型アルドラーゼ以外に数種のアルドラーゼ分画が認められ、肝臓抽出液においても、かれいの場合を除き、いわゆる肝臓型アルドラーゼというより筋肉型アルドラーゼと電気泳動的に区別できないアルドラーゼが主成分をなしている。

松島ら¹⁵⁾ はねずみの肝臓癌においては肝臓抽出液中に肝臓型アルドラーゼが顕著に減少し、かえって泳動的、免疫学的に筋肉型アルドラーゼと考えられるアルドラーゼが多量に出現して来ると報告している。これに対し本実験に用いた魚類においては肉眼的には異状を認めない正常肝抽出液中にいわゆる肝臓型というより筋肉型と考えられるアルドラーゼがより高濃度に含まれているという結果を示している。

この事実は魚類においては、哺乳動物あるいは鳥類について見られる臓器特異性によるアルドラーゼ・アイソザイムの区別を困難にするというほかはない。

要 約

ポリアクリルアミド・ゲルを支持体とするディスク泳動法を利用したアルドラーゼ活性の染色同定法を用いて各種海生動物の組織抽出液中のアルドラーゼの分析を行ない、ほとんどすべての海生動物にアルドラーゼのアイソザイムが存在することを明らかにした。

ぶり、やなぎむしかれい、ふぐ、あこうだいにおいては筋肉および肝臓抽出液中にそれぞれ 2, 3, 5, 5 種のアルドラーゼ・アイソザイムが含まれていた。こいの筋肉には 4 個、くるまび、しゃこ、たいらぎの筋肉抽出液にはそれぞれ 3, 1, 1 個のアルドラーゼが含まれていた。たこ、いかの外套膜抽出液にはそれぞれ 3 個のアル

ドラーゼ・アイソザイムが含まれていた。

魚類の筋肉および肝臓抽出液中に見られる2～5種のアルドラーゼは哺乳動物のアルドラーゼと異なり，臓器特異性に乏しく，筋肉型と肝臓型アルドラーゼとに区別することは困難であった。

文 献

- 1) Connell, J. J.: J. Food Science **31**, 313 (1966)
- 2) Shibata, T.: Bull. Fac. Fish. Univ. Hokkaido **9**, 218 (1958)
- 3) Kwon, T. W. & Olcott, H. S.: Comp. Biochem. Physiol. **15**, 7 (1965)
- 4) Roberts, E. & Tsuyuki, H.: Biochim. Biophys. Acta **73**, 673 (1963)
- 5) 竹尾和典: 生物物理化学 **14**, 15 (1969)
- 6) Penhoet E., Rajakumar, T. V. & Rutter, W. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. **56**, 1275 (1966)
Penhoet, E., Kochman, M., Valentine, R. & Rutter, W. J.: Biochemistry **6**, 294 (1967)
- 7) Rensing, U., Schmid, A. & Leuthardt, F.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 921 (1967)
- 8) Herskovitz, J. J., Masters, C. J., Wasserman, P. M. & Kaplan, N. O.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **26**, 24 (1967)
- 9) Ornstein, L. & Davis, B. J.: Preprint by Distillation Product (1962)
- 10) Swenson, A. D. & Boyer, P. D.: J. Am. Chem. Soc. **79**, 2174 (1957)
- 11) Gornall, A. G., Bardawill, C. S. & David, M. M.: J. Biol. Chem. **177**, 751 (1949)
Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
- 12) Schwartz, E. & Horecker, B. L.: Arch. Biochem. Biophys. **115**, 407 (1966)
- 13) Brooks, K. & Criddle, R. C.: ibid **117**, 650 (1966)
- 14) Fluri, R., Ramasarana, T. & Horecker, B. L.: Europ. J. Biochem. **1**, 117 (1967)
- 15) 松島泰次郎, 川辺澄江, 杉村 隆: 第39回日本生化学会総会 堺市 1967年11月6日; 抄録, 生化学 **39**, p. 527.
Matsushima, T., Kawabe, S., Shibuya, M. & Sugiyura, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 565 (1968)