水産動物の L-アスコルビン酸に関する 生化学的研究—V.

コイにおけるミオ・イノシトールから
L-アスコルビン酸への転化*

池田 静徳・佐藤 守

(1966 年 1 月 31 日受理)

BIOCHEMICAL STUDIES ON L-ASCORBIC ACID IN AQUATIC ANIMALS—V.

CONVERSION OF MYO-INOSITOL TO L-ASCORBIC ACID IN CARP

Shizunori IKEDA and Mamoru SATO**

In a previous paper¹⁾, it was reported that carps are able to synthesize L-ascorbic acid from D-glucose and D-glucuronolactone. In the present study, the conversion of myo-inositol to L-ascorbic acid by carps has been investigated by means of radioactive tracer techniques. The results obtained are as follows:

1) After injection of myo-inositol-U-¹⁴C into carps, the specific activities of the visceral ascorbic acid were determined. From the data in Table 1, it is evident that carps are able to convert myo-inositol to L-ascorbic acid.

2) The visceral ascorbic acid labeled with ¹⁴C was identified to be L-form by paper chromatography (Fig. 1).

3) The ascorbic acid recovered from the carps administrated with uniformly labeled myo-inositol-¹⁴C was degraded to determine the activities of the constituent carbon atoms. The results (Table 3) show that uniformly labeled myo-inositol-¹⁴C was converted to uniformly labeled L-ascorbic acid-¹⁴C.

著者らは前報において、コイは D-グルコースおよび D-グルクロノラクトンを前駆物質として陸上高等動物と同じ経路で AsA*** を生合成することを証明した。本報では、魚類がミオ・イノシトールを前駆物質として AsA を生合成しうるかどうかを知るため、コイにミオ・イノシトール-U-¹⁴C を注射し、一定時間後における内臓 AsA への ¹⁴C のとりこみおよびその ¹⁴C の分布を測定した。その結果、コイ体内ではミオ・イノシトールから AsA への転化が起こることを知りえたので報告する。

実験材料および方法

供試魚 舞鶴市近郊養魚場産のコイ *Cyprinus carpio* を用いた。その尾叉体長、体重および雌雄の別は Table 1 に示したとおりである。

¹⁴C-化合物 ミオ・イノシトール-U-¹⁴C (比放射能 200 μ C/mg) は The Radiochemical Centre (Amersham, Buckinghamshire, England) から、L-アスコルビン酸-1-¹⁴C (比放射能 9.34 μ C/mg) はカ

* 本研究の一部は昭和 40 年 10 月 8 日日本水産学会秋季大会において発表した。

** 京都大学農学部水産学教室 (Department of Fisheries, Kyoto University, Maizuru, Japan).

*** L-Ascorbic acid.

ナダ・メルク社から購入した。

生合成 AsA の単離 3~10 μC の ^{14}C でユニフォームラベルされたミオ・イノシトール 60 μmoles を水 0.5 ml にとかし、魚の背筋に注射した。20°C の循環水槽に 22 時間放置したのち、断頭即殺し、ただちに肝臓、腎臓、脾臓、心臓および筋肉をとり出し、各内臓別に 1% 塩化第一スズを含む 5% メタリン酸溶液一定量を加えて Potter-Elvehjem のグラスホモジナイザーですりつぶし、AsA を抽出した。抽出 AsA

Table 1. Conversion of myo-inositol- ^{14}C to L-ascorbic acid in carps.

Organ	Specific activity (cpm/ μmole) of L-ascorbic acid		
	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3
Hepatopancreas	3,766	1,134	9,099
Kidney	634	246	1,390
Spleen	405	299	1,531
Heart	317	158	810
Muscle	70	96	18
Fork length (cm)	29	27	26
Body weight (g)	520	460	380
Sex	Female	Male	Female
Dose (μC)	5	3	7

Fig. 1. Radiopaperchromatogram and paper chromatogram of biosynthesized ascorbic acid in carp hepatopancreas.

(L): authentic L-ascorbic acid- ^{14}C .

(S): biosynthesized ascorbic acid after administration of myo-inositol- ^{14}C .

(D): authentic D-araboascorbic acid.

は前報²⁾の方法で 2,4-ジニトロフェニールオサゾンとし、酸性アルミナカラム処理して不純物を除去した。AsA-オサゾンの一定量を径 2 cm のステンレス製計測皿にとつて乾燥後、2 π ガスフローカウンターで放射能を測定した。

ラベルされた生合成 AsA のペーパークロマトグラフィー コイ肝臓から抽出した生合成 AsA を C.G. KING らの方法³⁾にしたがつて結晶状に単離し、標準 L-アスコルビン酸- ^{14}C および D-アラボアスコルビン酸と並べてペーパークロマトグラフィー (東洋ろ紙 No. 51; 展開剤, アセトニトリル 80 : アセトン 5 : 水 15 : 酢酸 1; 噴霧剤, 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール)⁴⁾を行ない、スポットの Rf 値から L-形を同定した。ペーパークロマトグラムスキャナーは Aloka PCS-2 形を使用した。

ラベルされた生合成 AsA の分解試験 ラベルされた生合成 AsA をオサゾンとして再結精製したのち、前報¹⁾の方法にしたがつて分解し、1 位および 6 位の炭素にとりこまれた ^{14}C の分布パーセントを求めた。なお 2-3-4-5 位 ^{14}C の分布パーセントは次の方法で測定した。AsA-オサゾンを過ヨウ素酸処理して 6 位の炭素をホルムアルデヒドとして遊離させ、液を塩酸酸性にした際に生成する赤褐色沈澱をろ別精製したのち*、湿式分解し、えられた炭酸バリウムを径 2 cm の円形ろ紙に集めて乾燥後放射能を測定し、必要な補正を行なった。

実験結果および考察

ミオ・イノシトールから AsA への転化
コイにミオ・イノシトール- ^{14}C を注射

* この沈澱には AsA-1 位の炭素が含まれないことを AsA-1- ^{14}C -オサゾンを用いて確認した。

し、内臓 AsA への ^{14}C のとりこみを測定した。その結果は Table 1 に示したとおりである。

Table 1 の結果より、コイはミオ・イノシトールを前駆物質として AsA を生合成し得ることがわかった。内臓 AsA の比放射能値は、他の器管にくらべ肝臓においていちじるしく高かった。

ミオ・イノシトールはネズミの腎臓酵素によつて D-グルクロン酸になり、グルクロン酸回路にはいることが知られている⁵⁾⁶⁾。しかし、ネズミを用いた実験では、ミオ・イノシトールからの AsA 生成は認められていない⁷⁾。

ラベルされた生合成 AsA の同定 コイの体内でミオ・イノシトール- $\text{U-}^{14}\text{C}$ から生合成されたアスコルビン酸が L-形であることを、ペーパークロマトグラフィーによつて標準 L-アスコルビン酸の Rf 値 (0.39) と完全に一致することより確認した (Fig. 1)。

またラベルされた生合成アスコルビン酸のオサゾンにラベルしてない L-アスコルビン酸標品のオサゾン一定量をキャリアーとして加え、アセトン-エタノール (1:1) 溶液から再結晶をくり返して精製し、比放射能の変化を測定した。その結果は Table 2 に示したとおりで、比放射能の低下はほとんどみられなかった。

ラベルされた生合成 AsA 分子の C^{14} -分布 ラベルされた生合成 AsA を前記の方法で分解し ^{14}C -分布を求めた。

その結果は Table 3 に示したとおりで、AsA の 1 位、6 位および 2-3-4-5 位の炭素には、それぞれ 16.8 %, 11.9 % および 75.6 % の ^{14}C がとりこまれ、生合成 AsA はほぼユニフォームにラベルされていた。したがつてミオ・イノシトールの 6 つの炭素原子が生合成 AsA の炭素骨格を形成することがわかった。

Table 2. Purification of L-ascorbic acid isolated as 2,4-dinitrophenylosazone.

Procedure	Recovery (%)	Specific activity (cpm/ μmole)
Initial isolation	100	109,000
First crystallization	59.4	104,600
Second crystallization	44.3	102,000
Third crystallization	34.1	102,200

Table 3. Distribution of radioactivity in bio-synthesized L-ascorbic acid after administration of myo-inositol- $\text{U-}^{14}\text{C}$.

Total activity (cpm/ μmole)	Percentage of ^{14}C in each carbon		
	Carbon 1	Carbons 2+3+4+5	Carbon 6
21,667	16.8	75.6	11.9

要 約

魚類の体内でミオ・イノシトールから AsA への転化がおこなかどうかを知る目的で、コイにミオ・イノシトール- $\text{U-}^{14}\text{C}$ を注射し、一定時間後における内臓アスコルビン酸への ^{14}C のとりこみを測定した。その結果、コイは体内でミオ・イノシトールを前駆体として L-アスコルビン酸を生合成し得ることを証明した。ラベルされたミオ・イノシトールの注射によつて生合成されたアスコルビン酸が L-形であることは、ペーパークロマトグラフィーによつて確認した。なお、ラベルされた生合成アスコルビン酸分子の ^{14}C -分布を測定した結果より、ミオ・イノシトールの 6 つの炭素原子が生合成アスコルビン酸の炭素骨格を形成することがわかった。

文 献

- 1) 池田静徳・佐藤 守: 本誌, **30**, 365~369 (1964).
- 2) 池田静徳・佐藤 守・木村良太郎: 本誌, **29**, 757~764 (1963).
- 3) H. H. HOROWITZ, A. P. DOERSCHUK and C. G. KING: *J. Biol. Chem.*, **199**, 193~198 (1952).
- 4) 高橋 健・光本守孝・栢森 寿: 日農化誌, **34**, 788~791 (1960).
- 5) F. C. CHARALAMPOUS and C. LYRAS: *J. Biol. Chem.*, **228**, 1~13 (1957).
- 6) F. C. CHARALAMPOUS, S. BUMILLER and S. GRAHAM: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2022 (1958).
- 7) J. J. BURNS, N. TROUSOF, C. EVANS, N. PAPADOPOULOS and B. W. AGRANOFF: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 215~219 (1959).