魚類肝臓のセリンハイドロキシメチルトランスフェラーゼ

永山文男・山本 進

(1973 年 1 月 31 日受理)

Serine Hydroxymethyltransferase of Fish Liver

Fumio NAGAYAMA* and Susumu YAMAMOTO*

The enzyme activity which produces formaldehyde from L-serine was found in the liver of several fish species. The enzyme was recognized as serine hydroxymethyltransferase (E.C. 2.1.2.1) which catalyzes the reaction, L-serine + tetrahydrofolate $\rightleftharpoons$ glycine + methylenetetrahydrofolate + H₂O; (methylenetetrahydrofolate then liberates formaldehyde non-enzymatically). The enzyme requires pyridoxal phosphate as an activator. The optimum pH of the mackerel liver enzyme was about 7, and the *K_m* values for L-serine and glycine were estimated to be 5.6 and 3.7 mM, respectively.

タラをはじめとする魚類の組織中にホルムアルデヒドが存在することはすでにいくつかの研究例に明らかとなっており¹⁻⁴⁾, その前駆物質をトリメチルアミノオキシドと想定した一連の報告がみられる^{2,5-11)}。しかし生物界には, 他にもホルムアルデヒドの生成反応を触媒するいくつかの酵素が存在する。その1つに, セリンハイドロキシメチルトランスフェラーゼ (E.C. 2.1.2.1) があり, 動物の肝臓や細菌に見いだされ, セリン-グリシンの代謝に関与するものと考えられている¹²⁾。魚類の本酵素についての検索例はないが, われわれは, 魚類の肝臓にこの酵素の活性があることを確認したので, 2, 3 の酵素的性質を吟味した。

実 験

酵 素 液

1. 組織の活性測定用。組織を pH 7.1 の 0.05 M リン酸塩緩衝液とホモジナイズし, 一定容とした後 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した上澄液を酵素液とした。

2. 酵素の性質観察用。組織を -20° に冷却した 4 倍容のアセトンとホモジナイズし冷室に 1 夜放置, 残渣を再び 3 倍容のアセトンで 1 夜抽出, 残渣を集めて乾燥する。得た乾燥粉末 2.5 g (生鮮組織 9 g 相当) を 0.05 M リン酸塩緩衝液 15 ml で 1 時間抽出, 8,000 rpm で 10 分間遠心分離した上澄液を酵素液とした。

活性の測定 L-セリン $\rightleftharpoons$ グリシン + ホルムアルデヒド (1) は, 実際にはセリンハイドロキシメチルトランスフェラーゼの触媒作用による L-セリン + テトラヒドロ葉酸 $\rightleftharpoons$ N⁵, N¹⁰-メチレンテトラヒドロ葉酸 + グリシン + 水 (2) と, 非酵素的な N⁵, N¹⁰-メチレンテトラヒドロ葉酸 + 水 $\rightleftharpoons$ ホルムアルデヒド + テトラヒドロ葉酸 (3) の合計であつて, NASH の試薬¹³⁾を用いれば, 遊離型と, テトラヒドロ葉酸に結合した型のホルムアルデヒドの合計が定量される¹⁴⁾。本実験においてセリンの分解 (すなわちホルムアルデヒド生成) を測定するときは, 1 M L-セリン 0.05 ml, 0.3 % dl-テトラヒドロ葉酸 0.1 ml, 0.3 mM ビリドキサル-リン酸 0.1 ml, pH 7.1 の 0.05 M リン酸塩緩衝液 0.15 ml, 水 0.3 ml, 酵素液 0.5 ml の反応混液を 37° で一定時間 (通常 1 時間) インキュベートし, 15% トリクロル酢酸 0.3 ml で反応を止め, 遠心分離した上澄液 0.5 ml に NASH 試薬 2 ml を加え, 37° で 45 分放置後水で 10 ml にし 420 nm の吸光度から

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo)

ホルムアルデヒドの量を求めた。逆反応を測定するときは、L-セリンの代りにグリシンを加え、また水を0.2 ml にして 0.025 M ホルムアルデヒド 0.1 ml を加えた。

結果および考察

魚類組織の酵素活性 マサバ、スケトウ、マダラ、マイワシおよびマアジの肝臓、腎臓、心臓、胃、幽門垂、普通肉、血合肉の抽出液について、L-セリンからのホルムアルデヒド生成能をみると、いずれの魚種でも肝臓以外の組織には活性が検出されなかった。肝臓の単位重量当りの酵素活性は、Table 1 に示したように、スケトウやマダラに低い値がみられ、マアジやマサバに高い値が得られた。ただし、体重に対する肝

Table 1. Production of formaldehyde from L-serine by the fish liver extract at pH 7.1 and 37°. Fresh tissue was extracted with 0.05 M phosphate buffer, and 0.5 ml of the extract was incubated with 0.05 ml of 1 M L-serine, 0.1 ml of 0.3% *dl*-tetrahydrofolate, 0.1 ml of 0.3 mM pyridoxal phosphate, 0.15 ml of phosphate buffer (pH 7.1), and 0.3 ml of water for 1 hr at 37°. After protein was removed by adding trichloroacetic acid, formaldehyde was assayed by the method of NASH⁽¹³⁾. No activity was found in the kidney, heart, stomach, pyloric coeca, and muscle.

Species	Formaldehyde, μmole/min/g tissue
Mackerel	0.108
Alaska pollack	0.022
Cod	0.067
Sardine	0.055
Horse mackerel	0.120

臓の重量比は魚種により著しく異なるのでこの値から直接酵素量を比較することはできない。タラ類では幽門垂²⁾や心臓(著者らの分析結果、未発表)に肝臓より多量のホルムアルデヒドが検出されるにもかかわらず、セリンからのホルムアルデヒドの生成がみられない。このことから、肝臓以外の組織に存在するホルムアルデヒドは、肝臓で生成した後で移行したものととも考えられるし、また、それぞれの組織中でセリン以外の物質から生成したものととも考え得る。このような点についてはあらためて検討する必要がある。

マサバ肝臓酵素の性質

1. 基質、補酵素、および生成物。肝臓のアセトン乾燥粉末の抽出液に、L-セリン、テトラヒドロ葉酸、ピリドキサルリン酸、ピリドキサミンリン酸を、単独あるいはいくつか組み合わせて加え、ホルムアルデヒドの生成度を比較し Table 2 の結果を得た。すなわち、この酵素は、L-セリンを基質、テトラヒドロ葉酸を補素酵、ピリドキサルリン酸を活性化剤とする L-セリンハイドロキシメチルトランスフェラーゼで

Table 2. Effect of cofactor on the production of formaldehyde by the extract of the acetone dried powder of mackerel liver.

Composition of the reaction mixture	Activity, %
L-Serine	0
L-Serine + tetrahydrofolate	78
L-Serine + tetrahydrofolate + pyridoxal phosphate	100
L-Serine + tetrahydrofolate + pyridoxamine phosphate	61
L-Serine + pyridoxal phosphate	0
Tetrahydrofolate + pyridoxal phosphate	0

あることが明らかである。また、24 時間反応させた後、水蒸気蒸溜しジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集したものの薄層クロマトグラムからホルムアルデヒドの生成が確認された。なお、同じ酵素液および生鮮組織の抽出液にサルコシンあるいはリボース・5・りん酸を加えてインキュベートしたものではホルムアルデヒドの生成が、みられず、サルコシンオキシダーゼ (E.C. 1.5.3.1) およびペントースアルドラーゼ (E.C. 4.1.23) の存在は確認できなかった。

2. pH の影響。L-セリンからホルムアルデヒドを生成する反応は、Fig. 2 にみられるように、pH 7 付近で最も大きかった。この pH 値は、ラットのセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ¹⁵⁾について報告されている至適 pH と一致するものである。

3. 基質濃度の影響。ホルムアルデヒド生成反応に対する L-セリンの濃度およびホルムアルデヒド消費反応に対するグリシンの濃度の影響を観察して、Fig. 3 のよう

Fig. 2. Effect of pH on the enzyme activity of mackerel liver. Assay condition was the same as described in the legend of Table 1 except pH values.

Fig. 1. Thin layer chromatogram of 2,4-dinitrophenylhydrazones of volatile carbonyls in the reaction mixture. The extract of the acetone dried powder of mackerel liver was incubated with or without the substrate and the coenzyme for 24 hr at 37°. Carbonyls in the reaction mixture were steam-distilled into a flask containing 2,4-dinitrophenylhydrazine solution, and hydrazones obtained were chromatographed on the thin layer of silica gel G with phenoxyethanol-saturated *n*-hexane.

* Residual acetone in the dried powder.

Fig. 3. Effect of substrate concentration on the enzyme activity of mackerel liver. Assay condition for serine degradation (formaldehyde production) was the same as described in the legend of Table 1, except serine concentration (○). In the test for serine formation (formaldehyde consumption), glycine replaced serine and 0.1 ml of 0.025 M formaldehyde replaced an equal volume of water in the reaction mixture (●). *K_m* values for L-serine and glycine were estimated to be 5.6 and 3.7 mM, respectively.

な結果を得た。L-セリンおよびグリシンに対する K_m はそれぞれ 5.6 および 3.7 mM であつた。L-セリンの K_m については比較できる報告例がないが、グリシンの K_m は他の動物の酵素についての既往の報告^{14,16-18)}にみられる値と同等かそれらよりやや小さいものであつた。なお、最大速度 V はグリシンを基質とした場合の方がセリンを基質とした場合より大きかつた (約 2 倍)。

以上の結果から、魚の肝臓には、鳥や哺乳類の肝臓と同じくセリン-グリシンの代謝に関与する酵素が存在し、その性質も他の動物のセリンハイドロキシメチルトランスフェラーゼと一致することが確認できた。また、他の組織については不明の点があるが、少なくとも肝臓中に含まれるホルムアルデヒドの生因は本酵素であろうと推定される。

文 献

- 1) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通: 本誌, **29**, 695-701 (1963).
- 2) K. AMANO and K. YAMADA: in "The Technology of Fish Utilization" (ed. by R. KREUZER.), Fishing News (Books) Ltd., London, 1965, pp. 73-78.
- 3) 松任茂樹・永山文男・小野豊樹: 本誌, **33**, 586-590 (1967).
- 4) K. MOHLER und G. DENBSKY: *Zeits. Lebensm.-Untersuch. u.-Forsch.*, **142**, 109-120 (1970).
- 5) 徳永俊夫: 北海水研報, **29**, 108-122 (1964).
- 6) K. AMANO and K. YAMADA: *This Bull.*, **30**, 639-645 (1964).
- 7) K. YAMADA and K. AMANO: *ibid.*, **31**, 1030-1037 (1965).
- 8) 山田金次郎: 本誌, **34**, 541-550 (1968).
- 9) K. YAMADA, K. HARADA, and K. AMANO: *This Bull.*, **35**, 227-231 (1969).
- 10) 徳永俊夫: 本誌, **36**, 502-509, 510-515 (1970).
- 11) 原田勝彦・山田金次郎: 水産大校報, **18**, 296-302 (1970); **19**, 91-94, 95-103 (1971); **20**, 35-40 (1971); **21**, 229-237, 239-248 (1972).
- 12) D. M. GREENBERG: in "Metabolic Pathways" (ed. by D. M. GREENBERG), Vol. 2, Academic Press, 1961, pp. 177-181.
- 13) T. NASH: *Biochem. J.*, **55**, 416-421 (1953).
- 14) K. G. SCRIMGEOUR and F. M. HUENNEKENS: in "Methods in Enzymology" (ed. by S. COLOWICK and N. O. KAPLAN), Vol. 5, Academic Press, 1962, pp. 838-843.
- 15) N. ALEXANDER and D. M. GREENBERG: *J. Biol. Chem.*, **214**, 821-835 (1955).
- 16) N. ALEXANDER and D. M. GREENBERG: *ibid.*, **220**, 775-785 (1956).
- 17) R. L. BLAKLEY: *Biochem. J.*, **65**, 342-348 (1957).
- 18) L. V. SCHIRCH and M. ROPP: *Biochem.*, **6**, 253-257 (1967).