

家兎卵巣の glucose-6-phosphate dehydrogenase

東邦大学医学部産婦人科学教室

石 川 孝

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Rabbit Ovary

Takashi ISHIKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, Tokyo

概要 家兎卵巣より, Pentose phosphate cycle の鍵酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase を 2',5'-ADP-Sepharose 4B による Affinity chromatography を用いて, 分離・精製を試み, 次の成績を得た.

1. 家兎卵巣の G6P-DH 酵素活性は, 非妊娠時 $38.1 \pm 5.4 \text{ mU/mg. protein}$, 妊娠 20 日目で $128.7 \pm 29.0 \text{ mU/mg. protein}$ と妊娠 20 日目は非妊娠時に比べて約 3.5 倍の高い酵素活性を示した.
2. 卵巣の粗抽出液を 2',5'-ADP-Sepharose 4B による Affinity chromatography で精製すると, 回収されたうちの最も酵素活性の高かつた分画では, 蛋白当りの酵素活性で, G6P-DH は 600 倍, 6PG-DH は 200 倍に精製され, 単一操作でありながら, これらの酵素の精製には有効な手段と考えられる.
3. 精製された G6P-DH の Michaelis 定数は, 5.8×10^{-5} , 6PG-DH は $2.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ であつた.
4. 至適 pH は G6P-DH が pH 7.8, 6PG-DH が pH 7.2 を示した.
5. 精製された G6P-DH を Polyacryl amid gel disc 電気泳動を行うと, 卵巣は 4 本の帯に分離した. 同様の方法で行つた肝臓は 3 本の帯, 赤血球は 2 本の帯に分離し, 各々の臓器特異性があることが示唆された.

Synopsis Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase (6PG-DH) are key enzymes of pentose phosphate cycle, by which NADP is reduced into NADPH₂ necessary for synthesis of steroid hormone. We have found that G6P-DH activity of ovary in pregnant rabbit was about 3.5 times higher than that in non-pregnant rabbits. And then we carried out isolation of the NADP dependent enzymes by using affinity chromatography. The crude extract (500 mg of ovary in post coitum 20 days rabbit) was diluted with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 contained 5 mM EDTA and 1 mM mercaptoethanol, and applied to a column (0.8 × 30 cm) containing 2',5'-ADP-Sepharose 4B. Elution of bound enzymes was achieved by addition of NADP, 0.1 mM and 5 mM, respectively. Bound enzymes were found to consist of only two NADP dependent enzymes; G6P-DH was eluted by application of 0.1 mM NADP and 6PG-DH by application of 5 mM NADP. The Km value was $5.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ for G6P-DH and $2.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ for 6PG-DH. Optimum pH was 7.8 for G6P-DH and 7.2 for 6PG-DH. By disc electrophoresis the isozyme of G6P-DH was separated into 4 bands in the ovary, 3 bands in liver and 2 bands in the red blood cells, which were treated with same affinity chromatography. There was no difference in ovary between pregnant and non-pregnant rabbits. Thus, G6P-DH seems to have organspecificity.

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase • 6-phosphogluconate dehydrogenase • Ovary • Affinity chromatography • Isoenzyme

緒 言

糖質代謝には嫌氣的解糖反応, 好氣的の五炭糖リン酸回路などの代謝経路が認められている. このうちの五炭糖リン酸回路の生物学的意義は, ステロイドの生成・長鎖脂肪酸の合成など, 生体内における多くの生合成反応に関与する NADPH の産生と, 核酸合成に関与するペントースの産生で

ある. この代謝経路の最初のステップを触媒する鍵酵素として重要な役割を演じているのが, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH と略す) である. 従来卵巣における本酵素の分離・精製および物理化学的性質については十分な知見が得られていない. 著者は卵巣におけるステロイド合成と密接な関連を有する本酵素¹⁶⁾の生理学的変動に

ついて検討したところ、妊娠家兎卵巣の G6P-DH 酵素活性は、非妊娠時に比較し、約3.5倍の酵素活性を認めたことから、本酵素の性質および質的变化を把えんとし、その第一段階として妊娠家兎卵巣を用い、2', 5'-ADP-Sepharose 4B による Affinity chromatography⁵⁾ により、G6P-DH と五炭糖リン酸回路において次の反応を触媒する酵素である 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PG-DH と略す) の分離・精製を試みた。

実験方法

1) 材料

3週間以上雄家兎と隔離した3kg前後の日本産白色成熟雌家兎の卵巣と自然交配後20日目の同種家兎卵巣を使用した。

2) 組織抽出液の作製

自然交配20日目の妊娠家兎に thiopental 麻酔後、開腹して卵巣を摘出した。卵巣に附着している血液、脂肪などを除去するため 1mM mercaptoethanol, 5mM EDTA を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 中で十分に洗浄した。その後図1の如く100mgの卵巣湿重量に対して、1mlの割合で上記緩衝液を加え、氷冷しつつ、テフロン・ガラス製 potter 型ホモジナイザーで1,200回転で2分間ホモジナイズし、その後0°C, 12,000rpm, 20分間冷却遠心した。得られた上清を東洋濾紙 No. 7 で濾過し、この濾液を卵巣粗抽出液とし、その一部を蛋白量、酵素活性の測定に使用した。

3) 2', 5'-ADP-Sepharose 4B による精製

粗抽出液 4ml を上記緩衝液で4倍に希釈したのち、2.5gの2', 5'-ADP-Sepharose 4B をつめたカラム (0.8×30cm) に流し込み、粗抽出液中の蛋白、乳酸脱水素酵素 (LDH と略す) などを流出させるため、上記緩衝液を1時間18mlの流速で流し、2mlずつ分画採取した。この得られた各試験管ごとに蛋白量と LDH 酵素活性を測定し、LDH 酵素活性の消失を確認した後、そのカラムに吸着されている NADP 依存の酵素を溶出させるため0.1mM NADP を含む上記緩衝液 30ml を流して、G6P-DH を、次に段階的に5mM NADP を含む緩衝液を同量流して 6PG-DH をそれぞれ

図1 Experimental procedures

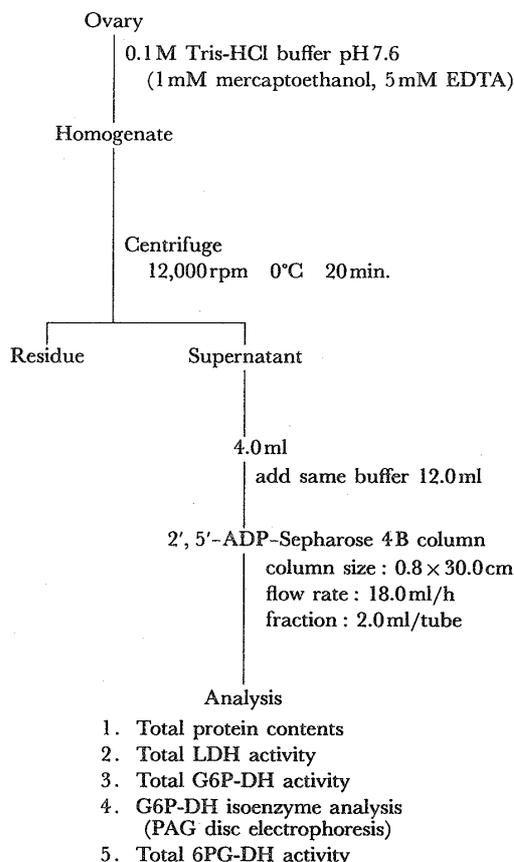
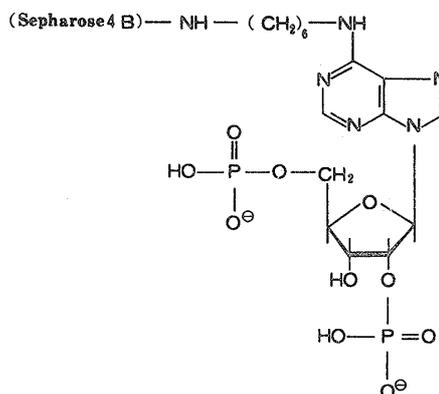


図 2



溶出させ、2mlずつ分画採取した。尚これらの実験操作は4°Cの低温下で行った。採取した各溶液に対して G6P-DH, 6PG-DH および LDH 酵素活性と蛋白量を測定した。最も酵素活性の高かった分画より得られた G6P-DH, 6PG-DH について至適 pH と Michaelis 定数の測定を行ない、G6P-DH については isoenzyme を調べるために

Polyacryl amid gel (PAG と略す) disc 電気泳動を行った。

4) 酵素活性の測定

G6P-DH 酵素活性は Löhl-Waller の方法⁹⁾にもとづき測定した。試料0.1ml に、0.5mM トリエタノールアミン緩衝液 2.8ml (pH 7.5), 0.04M G6P 0.05ml, 0.03M NADP 0.05ml を加えた混合液と、NADP の代わりにトリエタノールアミン緩衝液を入れた反応液を対照として、25°C, 340nm における吸光度を測定し酵素活性量を求めた。

6PG-DH 酵素活性は Wolfson et al. の方法¹⁷⁾に準拠し、試料0.1ml, Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 0.5ml, 1M MgSO₄ 0.05ml, 0.003M NADP が入った 0.15M NaCl 0.1ml, 0.1M Cystein-HCl 0.1ml, 0.15M NaCl 0.6ml, 0.01M 6PG 0.1ml を加え、6PG の代わりに0.15M NaCl を入れた混合液を対照として25°C, 340nm における吸光度を測定し活性量を求めた。

LDH は Hill 変法³⁾⁷⁾により測定した。

酵素活性量は国際単位を用い、蛋白当りで表わした。

蛋白量は Lowry et al. 法¹⁰⁾を用いて測定した。

5) PAG disc 電気泳動による isoenzyme の分離

Affinity chromatography より得られた G6P-DH の分画を Ornstein-Davis の polyacryl amid gel を支持体とした disc 電気泳動法を用いて、G6P-DH isoenzyme を分離した。試料は50~100 μ l を使用し、ゲル (0.5 \times 8cm) 1本当たり4mA の定電流で泳動し、標識の牛アルブミンにつけた Brom Phenol Blue が細孔ゲルの陽極端まで移動した時をもつて泳動完了とした。酵素染色にはゲル1本当たり、1M Tris 緩衝液15ml, NADP 5 μ M, G6P 0.01 mM, Nitro blue tetrazolium 8.5 μ M, Phenazine methosulfate 1.5 μ M, 0.25M MgCl₂ 1 ml を使用し、恒温槽内で37°C, 15分から30分間酵素染色を行った。脱色は7%酢酸中で30分間行ない、その後水洗して水中に保存した。disc 電気泳動については卵巣の isoenzyme と対比させるため、従来より知られている赤血球および肝臓¹⁴⁾の isoenzy-

me についても分離を試みた。妊娠家兎肝臓を卵巣と同様の操作で粗抽出液を作成し、2', 5'-ADP-Sepharose 4B による精製を行ない、disc 電気泳動を行った。また開腹時股静脈より採血した血液より、赤血球浮遊液を作成し、蒸留水で溶血させた後、同様の方法で2', 5'-ADP-Sepharose 4B により精製して PAG disc 電気泳動を行った。

試薬は2', 5'-ADP-Sepharose 4B はファルマンージャパン社, G6P disodium salt, Nicotin amid-dinucleotid phospho disodium salt はベーリンガー・マンハイム社, 6-phospho gluconic Acid trisodium salt は和光純薬社, Hydroxy methyl Amino methan は Sigma 社のものを使用した。

実験結果

1) 卵巣粗抽出液における G6P-DH 酵素活性は表1の如く、妊娠20日目では128.7 \pm 29.0mU/mg.p. で非妊娠時 38.1 \pm 5.4mU/mg.p. に比べて3.4倍と高い酵素活性を示した。

表1 G6P-DH activity extracts from ovary in rabbits

Group	No. of rabbits	Ovary
Non-pregnant group	8	38.1 \pm 5.4
20 day post coitum group	9	128.7 \pm 29.0
Mean \pm S.D.		mU/mg. protein

2) 粗抽出液を2', 5'-ADP-Sepharose 4B による Affinity chromatography で精製すると図3の如く蛋白, LDH などがそのまま流出し、カラムに吸着されている NADP 依存の酵素をそれぞれ段階的に溶出させると、G6P-DH はカラム No. 83 から No. 96の間に、6PG-DH はカラム No. 114 から No. 132の間に分画採集された。活性の回収率は G6P-DH が80~96%, 6PG-DH は81~92%であった。

3) 精製の度合は表2に示す如く、G6P-DH はカラム No. 87で粗抽出液に対して、蛋白当りで600倍、6PG-DH はカラム No. 120で200倍に精製された。

4) 精製された G6P-DH の Michaelis 定数は、5.8 \times 10⁻⁵M, 6PG-DH は2.8 \times 10⁻⁴M であった。

至適 pH は G6P-DH が pH 7.8, 6PG-DH は

図3 Affinity chromatography of Rabbit ovarium extract on 2',5'-ADP-Sepharase 4B

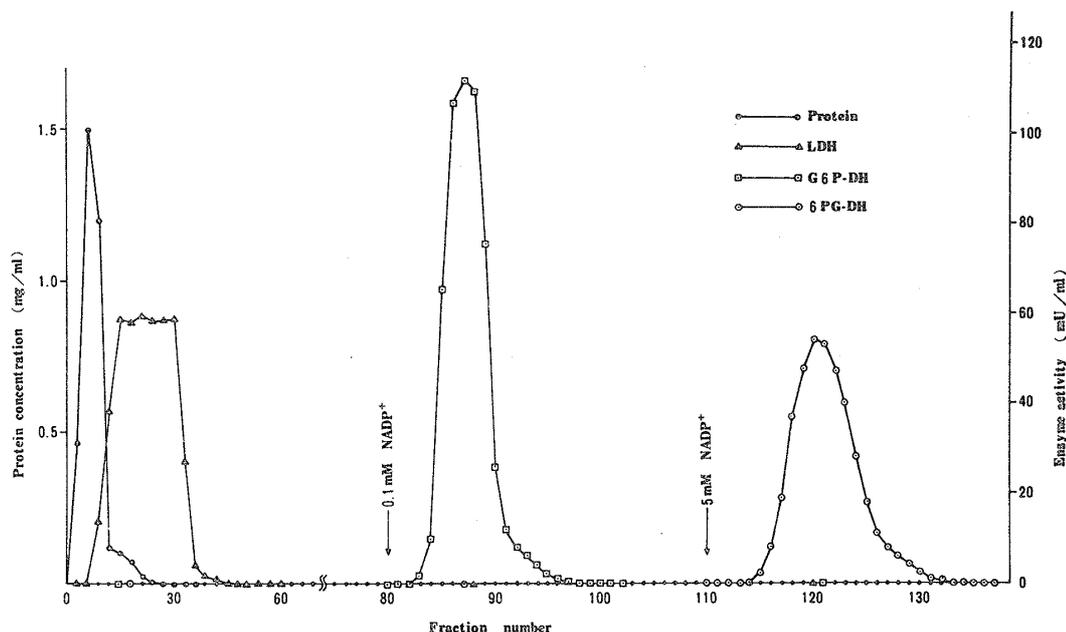


表2

Enzyme	Specific activity		Purification
	crude extract	peak fraction	
G6P-DH	0.12	73	608
6PG-DH	0.11	22	200

表3

Enzyme	Km M	Optimum pH
G6P-DH	5.8×10^{-5}	7.8
6PG-DH	2.8×10^{-4}	7.2

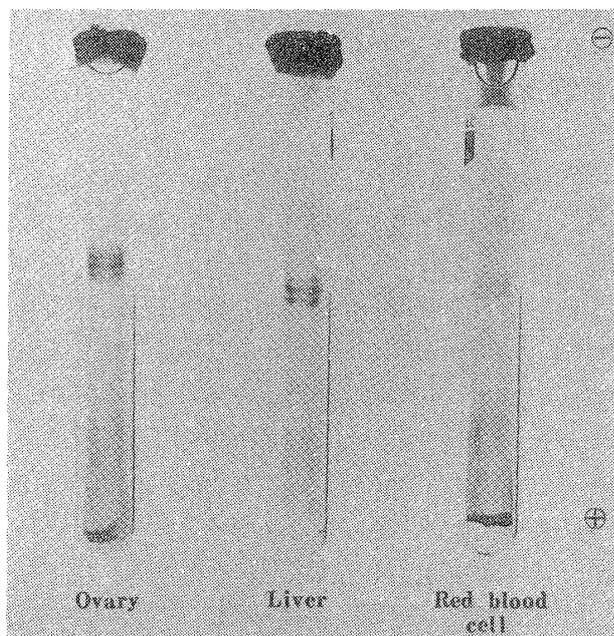
pH 7.2であつた。

5) Affinity chromatography より得られた卵巣の G6P-DH を Ornstein-Davis 法で PAG disc 電気泳動すると図4の如く、4本の帯に分離した。同様の操作で精製した妊娠家兎肝臓の G6P-DH isoenzyme は3本の帯に分離し、赤血球は2本の帯に分離した。

考案

G6P-DH は1931年 Warburg と Christian¹⁵⁾ によつて初めて赤血球中に見出され “Zwischenferment” と名づけられた酵素であり、現在では牛の乳腺組織⁹⁾、ラットの肝臓¹¹⁾ などから結晶として

図4



抽出、精製されている。本酵素はステロイド生成に NADPH の供給と、核酸合成に関与するペントースの産生経路である五炭糖リン酸回路の鍵酵素として重要な役割を演じている。産婦人科領域における G6P-DH の研究は子宮頸癌¹⁾、胎盤²⁾、妊娠中の血清²⁾ および子宮内膜³⁾ の本酵素の活性と isoenzyme についての報告が見受けられる

が、近年ステロイド合成に関連する酵素として注目されてきた。しかしながら本酵素の生殖組織における分布は、酵素活性が低いため、精製された組織抽出液を作ることが難しく、種々の生体物質を含んだ粗抽出液についての報告に止まっている。著者は本酵素の活性値の変動だけにとどまらず、酵素の性質および質的变化をも把握することが、今後ステロイド合成および核酸合成の研究に役立つものと考え、これらを満足する方法として、NADP に特異的な親和力をもつ 2', 5'-ADP-Sepharose 4B を用いた Affinity chromatography を使用し G6P-DH および 6PG-DH の分離・精製を試みた。2', 5'-ADP-Sepharose 4B の構造は図 2 に示す如く、リガンドの部分が ADP、すなわち NADP の一部に類似している。従つてこの部分に NADP 依存の G6P-DH, 6PG-DH などが特異的に吸着され、NAD 依存の酵素や蛋白などを吸着しないため、NADP 依存の酵素を一度に分離するのに適している。本研究では雌家兎の生殖組織のうち酵素活性の高かつた妊娠家兎卵巣を用いた。妊娠20日目の卵巣のG6P-DH 酵素活性は非妊娠時に較べ約3.5倍であつた。このことは家兎において妊娠7日目から20日目迄に多量に分泌されている Progesterone の産生⁴⁾に關与する NADPH₂ が消費されるため、NADPH₂ による G6P-DH 活性の抑制がとれ、五炭糖リン酸回路の代謝が亢進したためと推定される。また卵巣におけるステロイド合成と五炭糖リン酸回路の關連に対する探究には、本酵素の精製および物理化学的性質を把握する必要があり、図 1 に示した方法で卵巣組織抽出液を Affinity chromatography で精製した。本法によれば家兎卵巣の G6P-DH は蛋白あたりの比活性で600倍、6PG-DH は200倍に精製され、回収率も G6P-DH は80~96%、6PG-DH は81~91%とかなり高い精製度を得ることが出来た。卵巣の組織抽出液には多くの酵素や蛋白が混在しており、従来の方法では、これらの蛋白および他酵素が混在された状態で報告がなされてきた。本法ではフラクションの前半に流出してきた高い酵素活性をもつ乳酸脱水素酵素をはじめとするいくつ

かの酵素及び蛋白を約100ml の緩衝液で除去し、NADP 依存の酵素のみを溶出させることが可能であり、上述の条件を十分満足しうる方法と考えられる。蛋白の測定に用いた Lowry 法は現在優れた定量法であるが、Tris 緩衝液、EDTA などに妨害されることが指摘されている¹²⁾。本実験では実験に使用した緩衝液に含まれている Tris、および EDTA の濃度と同じ溶液について標準曲線を作製し、蛋白量を測定した。精製された家兎卵巣の G6P-DH の K_m は $5.8 \times 10^{-5} M$ 、6PG-DH は $2.8 \times 10^{-4} M$ であつた。これらの結果から本法は単一操作にもかかわらず高度に精製することが出来、その上回収率も良好で、本酵素の精製には有効な手段と考えられる。

精製された家兎卵巣の G6P-DH の臓器特異性を知るために、赤血球、肝臓を同様の Affinity chromatography を用いて精製し PAG disc 電気泳動を行ない本酵素の isoenzyme を比較検討した。図 4 の如く、卵巣は 4 本、赤血球は 2 本、肝臓は 3 本の帯に分離され、それぞれ臓器特異性を有することが示唆された。この他組織と異なつた卵巣における isoenzyme pattern がステロイド合成と密接な關連を有しているかどうかは今後検討する必要がある。卵巣の G6P-DH isoenzyme において、非妊娠時と妊娠20日目を比較したが現在のところ特に変化は認められない。また 6PG-DH についても PAG disc 電気泳動を行ない基質を変えて同様の酵素染色を試みたが、帯は染色されなかつた。

今回ステロイド合成に關与すると云われている五炭糖リン酸回路の鍵酵素である G6P-DH および 6PG-DH の精製および物理化学的性質について若干の知見を得た。卵巣その他の生殖組織におけるこれらの酵素の量的、質的变化を把握し、ステロイド動態と比較することはステロイド合成を研究するうえで重要なことと思われ、今後の課題としたい。

稿を終るに臨み、本研究に際し御指導ならびに御鞭撻下さつた故林 基之教授に感謝致します。尚本研究は生化学教室天野久夫助教授との共同研究の一部であり、共

同研究途上の御指導および御尽力に心から感謝致します。また御援助いただいた伊藤元博博士に謝意を表します。

本論文の要旨は第50回生化学会総会(1977. 10. 東京), 第30回日本産科婦人科学会学術講演会(1978. 4. 福岡)に於て発表した。

文 献

1. 秋谷 清, 浦崎彦志, 古谷 達, 蔡 明宗, 梅林栄一, 中村文武: 子宮頸癌治療に伴うグルコース6 磷酸脱水素酵素並びにアインザイムの動態に関する研究. 日癌治誌, 7: 21, 1972.
2. 蔡 明宗: 産婦人科領域における glucose-6-phosphate dehydrogenase の研究. 東医大誌, 34: 247, 1976.
3. 吉田光孝, 飯島直子: 乳酸脱水素酵素. 臨検, 15: 1221, 1971.
4. Baldwin, D.M. and Stapenfeldt, G.H.: Plasma levels of progesterone, cortisol, and corticosterone in the pregnant rabbit. Biol. Reprod., 10: 495, 1974.
5. Brodelius, P., Larsson, P. and Mosbach, K.: The Synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. Eur. J. Biochem., 47: 81, 1974.
6. Davis, B.J.: Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 404, 1964.
7. Hill, B.R. and Levi, C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease. Cancer. Res., 14: 513, 1954.
8. Julian, G.R., Wolfe, R.G. and Reithel, F.J.: The enzymes of mammary gland II. The preparation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 236: 754, 1961.
9. Löhr, G.W. and Waller, H.D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Bergmeyer, H.U. ed., 636, Academic Press, New York, 1974.
10. Lowry, O.H., Rosenbrogh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein mesurment with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
11. Matsuda, T. and Yugari, Y.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver. J. Biochem., 61: 535, 1967.
12. Rej, R. and Richards, A.H.: Interference by Tris buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure. Anal. Biochem., 62: 240, 1974.
13. Spellman, C.M., Fotterell, S., O'Dwyer, E.M. and Clinch, J.D.: A study of some enzymes and isoenzymes of charbohysrate metabolism in human endometrium during the menstrual cycle. Clin. Chim. Acta., 48: 259, 1973.
14. Taketa, K. and Watanabe, A.: Interconvertible microheterogenity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver. Biochem. Biophys. Acta., 235: 19, 1971.
15. Warburg, O. und Christian, W.: Aklivierung von Kohlehydrat in roten Bultzellen. Biochem. Z., 238: 131, 1931.
16. Wiest, W.G. and Kidwel, W.: The regulation of progesterone secretion by ovarian dehydrogenase. The Gonads, (Biochemical Endocrinology II) 295, McKerns. Appleton, New York, 1969.
17. Wolfson, Jr. S.K. and Ashman, H.G.W.: Isocitric and 6-phosphogluconic dehydrogenases in human blood serum. Proc. Soc. Exper. Bio. Med., 96: 231, 1957.

(特別掲載 No. 4464 昭54・1・12受付)