

## 牛脾臓グリコーゲン合成酵素の精製と動力学的性質

竹田靖史・檜作 進・小林行治

(農産化学工学研究室)

昭和53年8月31日 受理

### Purification and Kinetic Properties of Bovine Spleen Glycogen Synthase

Yasuhito TAKEDA, Susumu HIZUKURI and Yukuharu KOBAYASHI

(*Laboratory of Chemistry and Technology of Agricultural Products*)

#### 緒 言

グリコーゲン合成酵素 (UDP-glucose: glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase, EC 2.4.1.11) には、グルコース-6-リン酸がないと活性を発現しない D型 (glucose 6-P dependent form) とグルコース-6-リン酸がなくとも活性を発現する I型 (glucose 6-P independent form) とが存在し、これら D, I 型は可逆的に変換される<sup>1)</sup>。すなわち、I→D 変換は cAMP 依存性のプロテインキナーゼによるリン酸化で、D→I 変換はホスホプロテインホスファターゼによる脱リン酸で起ることが、動物組織<sup>11)</sup>や酵母<sup>8)</sup>で知られており、なかでも筋肉のものは分子レベルで変換の機構が調べられている<sup>12)</sup>。著者らは、すでに脾臓抽出液で活性化 (D→I 変換) の新しい活性促進因子、グルコース-6-リン酸を見い出し、脾臓の活性化酵素の若干の性質について報告した<sup>2)</sup>。ここでは、この活性化酵素の性質を更に詳しく調べるために、脾臓グリコーゲン合成酵素 I, D 型を精製し、精製標品について動力学的性質を検討した。

#### 材料および方法

##### 材料

牛脾臓は屠殺直後のものを氷冷し、表皮を取り除き、-20°C に凍結保存した。グルコース-6-リン酸、 UDP-グルコース (ウリジン-5-ジホスホグルコース) は Boehringer Mannheim 社、トリス [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] は Sigma Chemical Co., EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) は同仁化学研究所、グリコーゲンは片山化学、その他の試薬は和光純薬の最高級純度のものをそれぞれ使用した。UDP-(U-<sup>14</sup>C) グルコースは Amersham Seare 社のものを

用いた。

##### 方 法

**グリコーゲン合成酵素活性の測定** Villar-Palasi らの方法<sup>13)</sup>を若干変更した方法で行なった。すなわち、反応混液 [UDP-グルコース, 10mM, UDP-(U-<sup>14</sup>C) グルコース, 16mg/ml グリコーゲン, 20mM グルコース-6-リン酸, 50mM トリス-塩酸-5mM EDTA (pH 7.8)] 50μl に酵素液 [50mM トリス-塩酸-5mM EDTA (pH7.8) で希釈] 50 μl を加え、37°C で10分間保温し、6% トリクロル酢酸 (グリコーゲン 1 mg/ml, LiBr 2mg/ml を含む) 1ml を加えて反応を停止する。卓上型遠心機で 3000rpm, 10 分間遠心分離して、上澄 1ml を取り 99% アルコール 2ml を加えて、グリコーゲンを沈澱させる。冰箱中に 1 時間放置後、遠心分離 (3000rpm, 10 分間) でグリコーゲンを集め上澄を捨て、66% アルコール (2ml) で沈澱を激しく攪拌洗浄、遠心分離の操作を 3 回繰返し行ない未反応の UDP-グルコースを除く。洗浄したグリコーゲンを水に溶解しアルミ試料皿上で乾燥し、ガスフローカウンター (Aloka, Model PDC-307) でグリコーゲンに取り込まれた放射能を測定した。UDP-(U-<sup>14</sup>C) グルコースの比活性は、通常の活性測定には 7500cpm/μmole UDP-グルコースのものを、動力学の実験には 80100cpm/μmole のものを使用し、後者の場合はグリコーゲンの洗浄を 4 回繰返した。なお、グルコース-6-リン酸の存在下で測定した活性を全活性、グルコース-6-リン酸を除いた反応混液で測定した活性を I 活性とし、% I 活性は I 活性の全活性に対する割合として表わした。

**蛋白質の定量** Lowry らの方法<sup>5)</sup>を若干変更した檜作らの方法<sup>3)</sup>で牛血清アルブミンを標準とし測定した。

## 結 果

### グリコーゲン合成酵素 I 型の精製

以下の操作は 0~4°C で行ない、遠心分離は特に記さない限り 10000×g, 10 分間, 0°C で行なった。ここで使用したアルコール、アセトンは -20°C に冷却したもの用い、また、50mM Tris-Cl-5mM EDTA (pH7.8) の緩衝液（以下“緩衝液”と記す）は氷冷したものを使用した。

1. 抽出 凍結した牛脾臓 90g を、およそ 1cm 角に切り、360ml の緩衝液とともに、家庭用ミキサーを用いて 2.5 分間高速回転でホモジナイズし、ホモジネイトを遠心分離後、上澄をガラスウールで濾過し脂質を除き、粗酵素液を得た。

2. アルコール沈殿(1) 粗酵素液 300ml にグリコーゲン 1.2g を溶解し、アルコールを徐々に加えて 22% とし、30 分間放置後生じた沈殿を遠心分離で集め、100ml の緩衝液に溶解した。

3. 酸処理 アルコール沈殿(1) の酵素液に 1M 酢酸緩衝液 (pH4.8) を加えて pH5.8 とし、10 分間放置後遠心分離で沈殿を除いた。

4. アルコール沈殿(2) 酸処理で得られた上澄 110ml にアルコールを徐々に加え 15% 濃度とし、15 分間放置後生じた沈殿を 1250×g で遠心分離して集め、20ml の緩衝液に溶解した。この酵素液の % I 活性は約 16% で、I, D 型のはう中間の値である。また本酵素液には、ホスホプロテインホスファターゼや cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性を含むことが認められたので、次の過程で既報<sup>2)</sup> の方法に従い、I, D 型にそれぞれ

変換した。

### 5. I 型への変換とアセトン沈殿 アルコール沈殿

(2) の酵素液にグルコース-6-リン酸、MgCl<sub>2</sub>、メルカプトエタノールを最終濃度 5, 10, 50mM となるよう加え、緩衝液で 25ml として、30°C で 90 分間保温し I 型に変換した。保温終了後冷却し、アセトン 7ml を徐々に添加して、0°C で 10 分間放置後 1250×g で遠心分離し得られた沈殿を 10ml の緩衝液に溶解し不溶物は遠心分離で除いた。

6. アルコール沈殿(3) 上で得られた酵素液 11ml にアルコール 1.78ml を加え (14%)、10 分間放置後 1250×g で遠心分離し、沈殿を 10 倍に希釈した緩衝液 (5ml) に溶解した。

7. ベントナイト処理 アルコール沈殿(3) の酵素液 5.5ml にベントナイト 25mg を加えて、15 分間静かに攪拌した後、遠心分離して沈殿を除いた。

8. アルコール沈殿(4) ベントナイト処理した上澄液 5ml にアルコールを加え 14% とし、10 分間放置後、1250×g で遠心分離し沈殿を約 2ml の緩衝液に溶解し、最終の酵素標品とし以後の実験に供した。I 型酵素の精製過程を Table 1 に示した。

### グリコーゲン合成酵素 D 型の精製

既に述べたように、アルコール沈殿(2) の酵素液に存在する cAMP 依存性のプロテインキナーゼで cAMP, ATP, Mg<sup>2+</sup> と保温し D 型に変換した。精製過程 1~4 は I 型酵素の場合と同じである。

5. D 型への変換とアセトン沈殿 アルコール沈殿(2) の酵素液に、ATP, cAMP, MgCl<sub>2</sub>, NaF を加え最終濃度をそれぞれ 2.5mM, 16.7μM, 10mM, 25mM

Table 1. Purification of glycogen synthase I form.

Steps	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	% I activity	Recovery (%)
1. Crude extract	300	31.3	9484	0.0033	—	100
2. 1st Alcohol ppt.	116	29.7	1563	0.019	—	95
3. Acid treatment, sup.	110	21.9	380	0.056	—	70
4. 2nd Alcohol ppt.	21	22.5	98.7	0.228	—	72
5. Conversion to I form, acetone ppt.	11	20.7	37.7	0.548	—	66.1
6. 3rd Alcohol ppt.	5.5	17.8	6.82	2.61	32.4	56.9
7. Bentonite sup.	5.0	15.3	4.35	3.52	34.4	48.9
8. 4th Alcohol ppt.	2.5	11.5	2.95	3.90	33.0	36.7

Glycogen synthase activity was assayed by a method slightly modified from that of Villar-Palasi *et al.*<sup>18)</sup> as indicated in Text. The standard assay mixture contained 5mM UDP-glucose, UDP-(U-<sup>14</sup>C) glucose, 8mg/ml glycogen, 50mM Tris-Cl-5mM EDTA (pH 7.8) and 10mM glucose 6-phosphate (when added). One unit of activity is defined as the amount of enzyme which catalyzes the transfer of 1μmole glucose from UDP-glucose to glycogen per min at 37°C.

Table 2. Purification of glycogen synthase D form

Steps	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	% I activity	Recovery (%)
1. Crude extract	320	39.1	9728	0.004	—	100
2. 1st Alcohol ppt.	116	42.4	1631	0.026	—	108
3. Acid treatment, sup.	108	28.6	386	0.074	—	73
4. 2nd Alcohol ppt.	26	28.9	117	0.247	—	73
5. Conversion to D form, acetone ppt.	11.2	15.6	17.9	0.873	—	40.0
6. 3rd Alcohol ppt.	5.8	12.6	6.89	1.83	2.4	32.2
7. Bentonite sup.	6.5	12.5	3.67	3.40	2.4	32.0
8. 4th Alcohol ppt.	2.5	9.59	2.52	3.81	1.8	24.5

とし、緩衝液を加えて 30ml とした後 30°C 10 分間保温して D 型に変換した。保温終了後、アセトン 8.2 ml を加え、10分間放置後生じた沈澱を 1250×g の遠心分離で集め、10ml の緩衝液に溶解し、不溶物を遠心分離で除いた。

6. アルコール沈澱(3) 上で得られた酵素液 11.2 ml にアルコール 1.77ml を加え、10分間放置後 1250×g で遠心分離し、沈澱を 5ml の 10倍に希釈した緩衝液に溶解した。

7. ベントナイト処理 アルコール沈澱(3) の酵素液 5.8ml に 0.5M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を 1.5ml 加え 40°C 20分間保温した後、氷冷しベントナイト 25mg を加え 15分間静かに攪拌し、遠心分離で上澄を得た。

8. アルコール沈澱 (4) ベントナイト処理で得た

上澄 6.5ml にアルコール 1.15ml を加え 10分間放置後 1250×g で遠心分離し、得られた沈澱を 2ml の緩衝液に溶解し、最終酵素標品とし以後の実験に供した。D 型酵素の精製過程を Table 2 に示した。

このようにして得られた精製酵素標品は、0°C で保存すると約 3 週間安定に保たれる。I 型酵素標品では保存中に全活性に変化はないが、% I 活性が徐々に減少することがある。これは筋肉の酵素標品で認められているように、標品中のプロテアーゼによるグルコース-6-リン酸依存型への不可逆的変換によるものと思われる<sup>14)</sup>。本酵素標品には、動力学に影響を与える酵素活性、ホスホプロテインホスファターゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホグルコムターゼの活性は認められなかったが、ディスクゲル電気泳動 (7.5%, pH8.3 用ゲル)<sup>1,6)</sup> では、鋭いバンドは認めら

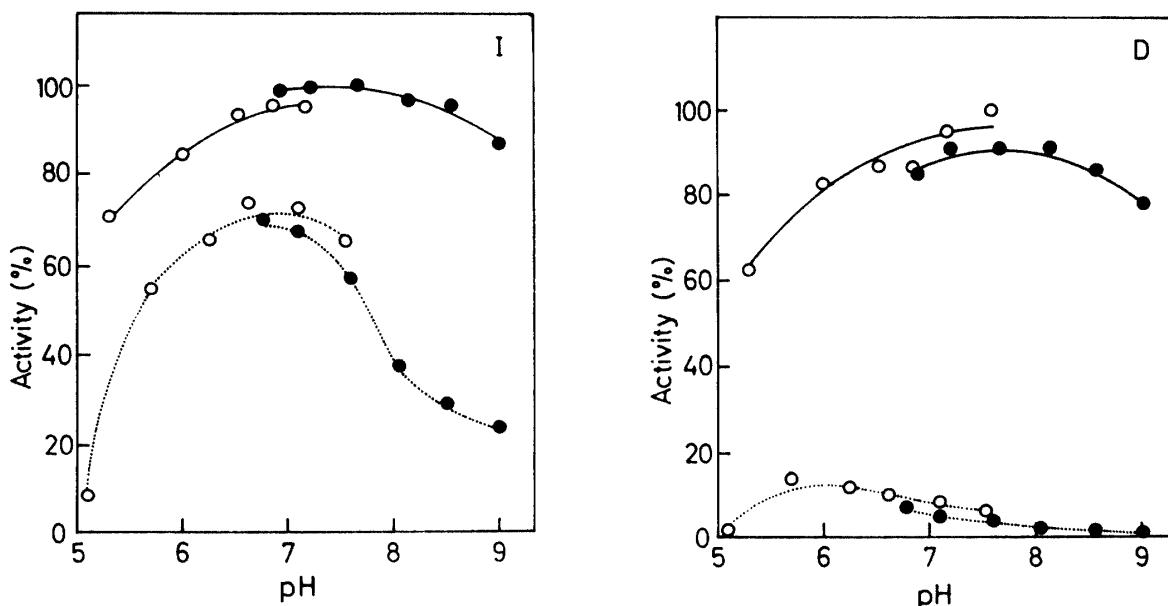


Fig. 1. Effect of pH on the activity of I and D forms.

Assays were made in 0.1M Tris-acetate (○) or Tris-Cl (●) with (solid line) and without (dotted line) glucose 6-phosphate. Other assay conditions: see Table 1.

れず、濃縮用ゲルと分離用ゲル上部に広く蛋白被染色域が認められた。

#### pH活性曲線

Fig. 1. に I, D 型酵素のグルコース-6-リン酸の存在下と、非存在下での pH と活性との関係を示した。グルコース-6-リン酸が存在しないときは、I 型はおよそ pH 7 に活性の極大があり、D 型ではアルカリ側で活性は認められないが、酸性側にわずかな活性が検出された。グルコース-6-リン酸の存在下では I, D 型ともに、pH6.5 から 8.5 まで広く活性極大がみられた。このように I 型酵素では、グルコース-6-リン酸の添加によって、その活性極大がアルカリ側に移行した。

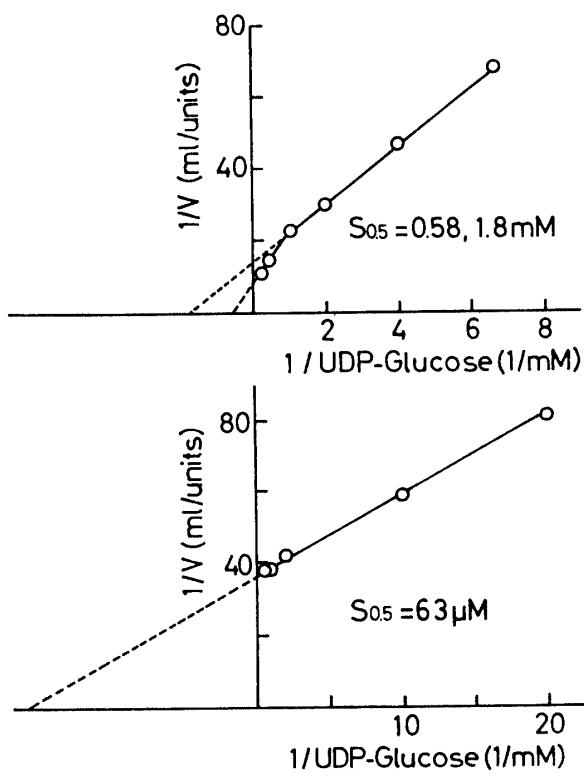


Fig. 2. Double reciprocal plots of I form activity with respect to UDP-glucose in the absence (top) and presence (bottom) of glucose 6-phosphate.

Assays were made at pH 7.5. Other assay conditions: see Table 1.

#### UDP-グルコース濃度の活性への影響

Fig. 2 に UDP-グルコース濃度と酵素活性との関係を示した。I 型酵素の Lineweaver-Burk プロットは図に示されるように 2 つの折れ曲った直線となり、 $S_{0.5}$  (標準活性測定条件下で、1/2 の最大反応速度を与える基質濃度) は UDP-グルコースの低濃度域 (0.1

mM 以下) と高濃度 (0.1mM 以上) でそれぞれ 0.58 mM, 1.8mM で、 $V_{max}$  の比率は 1:1.7 であった。ところが、グルコース-6-リン酸の存在下では折れ曲りのない一本の直線となり、 $S_{0.5}$  の値は 63 $\mu\text{M}$  であった。このように I 型酵素は、グルコース-6-リン酸により活性化され  $V_{max}$  は 1.2 倍に増加し、 $S_{0.5}$  は 1/10 以下に減少した。

D 型酵素の場合は (Fig. 3), グルコース-6-リン酸が存在しないと活性は極くわずかであるため  $S_{0.5}$  の測定は不可能であるが、グルコース-6-リン酸の存在下では、Lineweaver-Burk プロットは折れ曲りのない直線となり  $S_{0.5}$  は 0.19mM の値が得られた。

以上の結果は、pH7.5 で行なったものであるが、I 型酵素の活性極大である pH7.0 での結果もほぼ同じであった。すなわち、I 型酵素で、 $S_{0.5}$  は 0.39mM と 2.2mM (グルコース-6-リン酸のないとき)、グルコース-6-リン酸の存在下では 68 $\mu\text{M}$ , D 型酵素では、0.24mM の値が得られた。

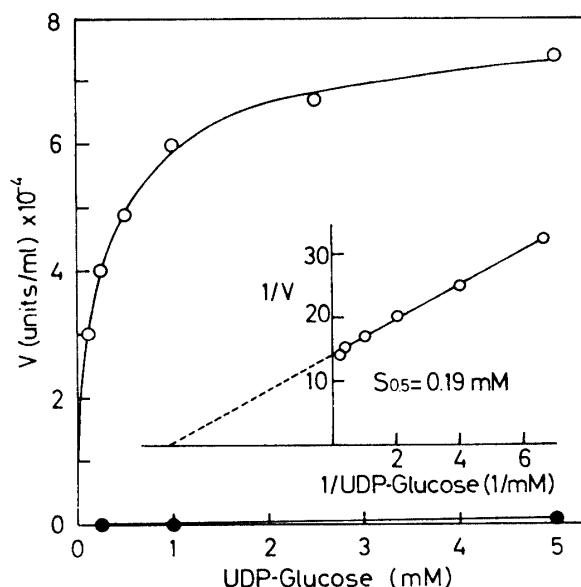


Fig. 3. Effect of UDP-glucose concentration on the activity of D form in the absence and presence of glucose 6-phosphate.

Assays were made at pH 7.5 in the absence (●—●) and presence (○—○) of glucose 6-phosphate. Other assay conditions: see Table 1.

#### グルコース-6-リン酸濃度と活性との関係

I, D 型酵素活性におよぼすグルコース-6-リン酸の影響を Fig. 4 に示した。D 型酵素の Lineweaver-Burk プロットは二つの折れ曲った直線となり、 $M_{0.5}$  (標準活性測定条件下での、1/2 の最大反応速度を与える基質濃度) は UDP-グルコースの低濃度域 (0.1

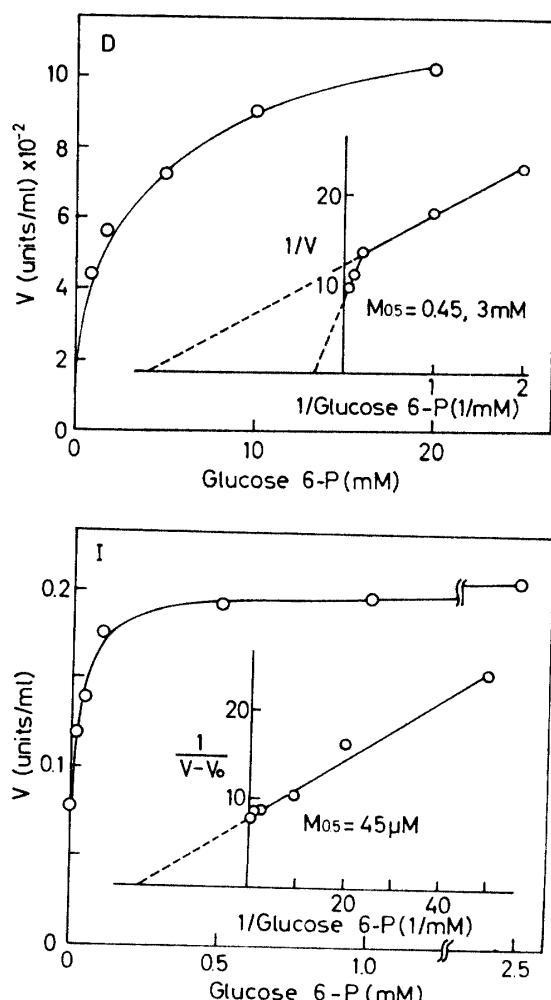


Fig. 4. Effect of glucose 6-phosphate concentration on the activity of D (top) and I (bottom) forms.

Assays were made at pH 7.5. Other assay conditions: see Table 1.  $V_0$  is the rate measured in the absence of glucose 6-phosphate.

る活性化剤の濃度)は5mM以上と以下のグルコース-6-リン酸濃度では、それぞれ3.0mM, 0.45mMの値であった。他方、I型酵素では折れ曲りのない直線となり、 $M_{0.5}$ は45μMと、D→I型の相互変換に10倍以上の $M_{0.5}$ の変化を伴なっていることがわかった。

### 考 察

グリコーゲン合成酵素がグリコーゲンと複合体をつくることを利用して、脾臓抽出液から、その複合体をアルコールで沈澱させることを主体とした精製方法で約1000倍に、I, D型酵素をそれぞれ精製した。精製標品には、ホスホプロテインホスファターゼ、プロテイ

ンキナーゼは含まれないが、グリコーゲンに親和力のあるホスホリラーゼ活性が認められた。アルコール沈澱(3)の標品をDEAE-セルロースに吸着させ、筋肉酵素の場合と同じようにホスホリラーゼの分離と精製を試みたが<sup>10)</sup>、活性の回収が悪く成功しなかった。また、α-アミラーゼでグリコーゲンを消化すると失活し易いことを合せて考えると、脾臓の合成酵素は、グリコーゲンから遊離することによって非常に不安定となるものと思われる。本精製法で採用したペントナイト処理は、ホスホリラーゼの方が合成酵素よりもペントナイトに吸着され易いことを見い出し行なったもので、この処理でホスホリラーゼ活性を約1/10に減少することができた。

IおよびD型への変換は、前報<sup>2)</sup>で使用した標品より約10倍比活性の高い標品を用い、同一条件で行なったところ、前回と同じ変換が認められた。既に報告したように<sup>2)</sup>、I型酵素の極限の%I活性は33%と、筋肉の80~85%<sup>17)</sup>や肝<sup>9)</sup>、心臓<sup>16)</sup>のものよりかなり低く、グルコース-6-リン酸によって著しく活性化されることを示している。I型酵素標品のpH活性曲線は、pH7.0に活性の極大があり、またグルコース-6-リン酸の添加によって活性極大がアルカリ側に移行するのは、筋肉や心臓<sup>17)</sup>のものと類似している。UDP-グルコースに対する $S_{0.5}$ の値も、完全にI型に変換した筋肉のものと<sup>2)</sup>ほど一致する。以上のこととは、脾臓のI型酵素標品の%I活性は低いがI型への変換は充分なものと思われ、この点が特徴と言えよう。

I型酵素のUDP-グルコースに対する動力学は、2種の $S_{0.5}$ を与えた。グルコース-6-リン酸の存在下では1つの $S_{0.5}$ を与えた。これは酵母<sup>8)</sup>のI型酵素にも認められており、また筋肉<sup>17)</sup>や心臓<sup>16,17)</sup>のI型酵素にもUDP-グルコースに対する親和力の異なった酵素の存在が示唆されている。さらに、脾臓のD型酵素にも、グルコース-6-リン酸に対して2種の $M_{0.5}$ を与えた。これらの事実は、I, D型ともに、それぞれ少くとも2種のアイソザイムか、重合度の異なった会合体の存在が示唆されよう。Takedaらは<sup>13)</sup>、筋肉酵素を高度に精製し、本酵素が单一のポリペプタイド鎖からなることを示し、重合度の異なる会合体の存在を明らかにした。また、ゲル電気泳動で会合体を分離し、ゲル上で定量的な活性染色を行ない、会合体の間でUDP-グルコースや、グルコース-6-リン酸に対する親和力の相違を認めた<sup>15)</sup>、これらの結果は、脾臓酵素にも異なった重合度の会合体の在存が示唆される。

## 要 約

牛脾臓のグリコーゲン合成酵素 I, D 型をそれぞれ粗酵素液から約1000倍に精製した。pH 活性曲線は、I 型では pH7.0 に活性極大が認められたが、グルコース-6-リン酸の添加によって、その極大はアルカリ側に移行し、D型酵素のグルコース-6-リン酸存在下と同じ pH6.5 から 8.5 まで広い活性極大を示した。I 型酵素は、グルコース-6-リン酸によってさらに活性化され、UDP-グルコースに対する  $S_{0.5}$  は、その存在下で 1/10 に減少した。Dから I 型に変換すると、UDP-グルコースに対する  $S_{0.5}$  (グルコース-6-リン酸の存在下)や、グルコース-6-リン酸に対する  $M_{0.5}$  はそれぞれ 1/3, 1/10 に減少することがわかった。また、D, I 型ともに、2種の動力学的性質の異なる酵素の存在が示唆された。

## 文 献

- 1) Davis, B.J.: Disc electrophoresis-II Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964)
- 2) Hizukuri, S. and Takeda, Y.: Activation of the D to I form conversion of glycogen synthetase by glucose 6-phosphate in bovine spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 179-181 (1970)
- 3) 榎作 進・中村信之: 植物の澱粉粒分解酵素に関する研究 1. 小豆種子の酵素の無機リン酸による活性化. 鹿大農學報告, **28**, 131-137 (1978)
- 4) Larner, J. and Villar-Palasi, C.: Glycogen synthase and its control. *Current Topics in Cellular Regulation*, **3**, 195-236 (1971)
- 5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 6) Ornstein, L.: Disc electrophoresis-I Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 321-349 (1964)
- 7) Roach, P.J., Takeda, Y. and Larner, J.: Rabbit skeletal muscle glycogen synthase 1. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1913-1919 (1976)
- 8) Rothman-Denes, L.B. and Cabib, E.: Glucose 6-phosphate dependent and independent forms of yeast glycogen synthetase. Their properties and interconversions. *Biochem.*, **10**, 1236-1242 (1971)
- 9) Sato, K., Abe, N. and Tsuiki, S.: Glycogen synthetase D and I of rat liver and their interconversion *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 638-645 (1972)
- 10) Smith, C.H., Villar-Palasi, C., Brown, N.E., Schlender, K. K., Rosenkrans, A.M. and Larner, J.: Glycogen synthetase (synthase) from skeletal muscle: D and I forms. *Methods in Enzymology*, **28**, 530-539 (1972)
- 11) Stalmans, W. and Hers, H.G.: Glycogen synthesis from UDPG. *The Enzymes*, **9**, 306-361 (1973)
- 12) 竹田靖史: 筋グリコーゲン合成酵素, 蛋白質 核酸 酵素. **22**, 1464-1468 (1977)
- 13) Takeda, Y., Brewer, H.B. and Larner, J.: Structural studies on rabbit muscle glycogen synthase I. Subunit composition *J. Biol. Chem.*, **250**, 8943-8950 (1975)
- 14) Takeda, Y. and Larner, J.: Structural studies on rabbit muscle glycogen synthase II. Limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8951-8956 (1975)
- 15) 竹田靖史・Larner, J.: 楠作 進: 投稿準備中
- 16) Thomas, J.A. and Larner, J.: Purification and properties of glycogen synthase I form bovine heart: Two kinetic forms. *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 62-72 (1973)
- 17) Thomas, J.A., Schlender, K.K. and Larner, J.: Specificity of activation of glycogen synthase I from skeletal muscle and heart. *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 84-93 (1973)
- 18) Villar-Palasi, C., Rosell-Perez, M., Hizukuri, S., Huijing, F. and Larner, J.: Muscle and liver UDP-glucose:  $\alpha$ -1, 4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyltransferase (glycogen synthetase) *Methods in Enzymology*, **8**, 374-384 (1966)

## Summary

The glucose 6-phosphate independent (I) and dependent (D) forms of glycogen synthase (UDP-glucose: glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase EC 2.4.1.11) were purified approximately 1000-fold from the extract of bovine spleen by a procedure involving repeated precipitations of the glycogen-enzyme complex with alcohol. The specific activities of I and D forms were 3.9 and 3.8 units per mg protein, respectively. I form had a pH optimum of the activity at pH 7 in the absence of glucose 6-phosphate, but had a broad pH optimum in the range from pH 6.5 to 8.5, which was similar to that of D form, in the presence of glucose 6-phosphate. D and I forms were kinetically characterized. D form had  $S_{0.5}$  of 0.19mM for UDP-glucose in the presence of glucose 6-phosphate and two  $M_{0.5}$ , 0.45 and 3mM, for glucose 6-phosphate. I form had two  $S_{0.5}$ , 0.58 and 1.8mM, for UDP-glucose in the absence of glucose 6-phosphate compared to one  $S_{0.5}$  of 63 $\mu$ M in the presence of glucose 6-phosphate, and  $M_{0.5}$  of 45 $\mu$ M for glucose 6-phosphate. Thus, that two  $M_{0.5}$  and  $S_{0.5}$  were obtained, suggests the presence of two kinetically distinguishable forms in each I and D form.