HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究：第1報 鯉筋肉中のAdenosinepolyphosphateの定量に就て
Author(s)	斎藤, 恒行; 新井, 健一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 6(3), 228-233
Issue Date	1955-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22931
Type	bulletin (article)
File Information	6(3)_P228-233.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究

第1報　鯉筋肉中のAdenosinepolyphosphateの定量に就て*

斎　藤　恒　行・新　井　健　一
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on the Organic Phosphates in Muscle of the Aquatic Animals

I. On the determination of adencsinepolyphosphates in muscle of carp

Tsuneyuki SAITO and Ken-ichi ARAI

Abstract

(1) The method of Cohn & Carter (1950) for separating adenosinepolyphosphates by ion exchange resin was used quantitatively in the study of ADP and ATP in prepared ATP sample or in muscle of carp.

(2) From the present experiments it was recognized to be a reliable method of quantitative determination.

(3) The determination was continued for a year and it was observed that the amounts of ADP and ATP in muscle of carp varied considerably with the time of the year. Especially a marked tendency of increase in the amounts of ADP was observed in winter.

筋収縮活動に特に重大な関係を有している Creatinephosphate (CP), Adenosinediphosphate (ADP), Adenosinetriphosphate (ATP) の動物の死後に於ける筋肉中の消長は，硬直・自己分解・腐敗等一連の過程に新しい知見を与える可能性がある。

水産動物筋肉に就て行われたこれら高エネルギー燐酸化合物の定量は，二三の報告[1)2)3)]を除いては余り多く見当らない。その上従来広く利用されてきたこれら物質の定量法では，その絶対値に於て可成の疑問が残されているものと考えられる。

最近 Cohn & Carter 等[4)]はイオン交換反応を利用して，ADP 並びに ATP 等の分析法を考案して ATP 製品の分析を行い，更に宮崎・内田・佐藤等[5)]は生筋に対する応用を報告している。

著者等は水産動物筋肉に於ける CP，ADP，ATP の定量を行うに当つて，以上の分析法の検討とこれが応用に関して実験を行い二三の知見をえたのでこゝに報告する。

実　験　方　法

(1) **試　料**

(i) 家兎筋肉より分離した ATP $Ba_2 \cdot 4H_2O$**

(ii) 養殖鯉：体長20～30cm，体重300～450g

(2) **試　薬**

(i) 樹脂：Amberlite IRA-400，Dowex-1 を使用し，前処理は宮崎・内田・佐藤等の方法[5)]に依つた。

---

*昭和29年10月日本水産学会北海道支部大会に於て発表

**北海道大学理学部山下生化学研究室より分与された。

(ii) 展開液：0.01N NH_4Cl…A液，0.003N HCl ‥B液，0.02N NaCl in 0.01N HCl…C液，
0.2N NaCl in 0.01 NHCl…D液

(3) 測　定

家兎筋肉から抽出した ATP $Ba_2 \cdot 4H_2O$ 100mg を一定量の 0.1N HCl で溶解し，僅かに過量の Na_2SO_4 を加えて Ba を除去し，NaOH で中和後25cc定容とする。但しこの操作は ATP の不安定を考慮して，絶えず冷却しつゝ行う。この ATP Na_2 溶液 1〜2ccをとり濃 NH_4OH で pH8〜10 とし全量 30〜50cc に稀釈して，クロマトグラムに供する。

養殖鯉は直接採肉（ATP の変化が相対的に最少であつた）即ち可及的低温に保ちつゝ魚体を押えつけ，部位に依る含量の差をさけるため脊筋の一定部分をメスで切りとり，予め冷却してある乳鉢中で10倍量の2％$HClO_4$と少量の海砂と共に擂磨，濾過し濾液4〜5ccを濃 NH_4OH で pH8—10 とし全量 30〜50ccに稀釈してクロマトグラムに供する。

上述の如くして，えられた試料液を Cohn & Carter 法に依つて分析，島津分光光度計に依り 260mμ の吸光度から定量値を算出した。

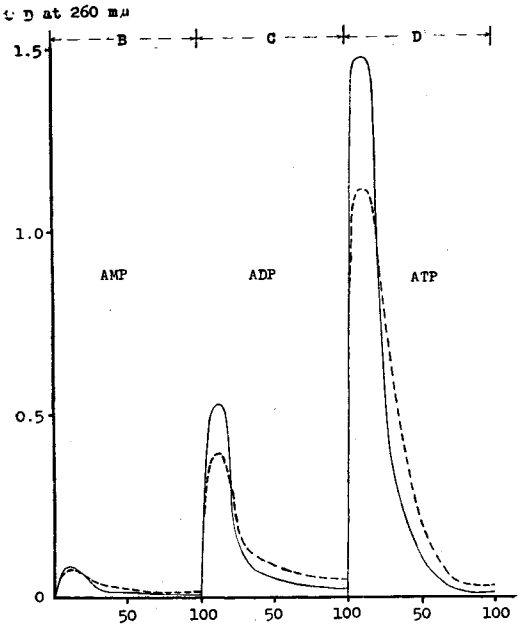

Fig. 1. Separation curve of adenosine-polyphosphate by ion exchanger
exchanger : amberlite IRA—400
test material : ATP $Ba_2 4H_2O$
flow speed : 1cc/min.
—— : fine particle
…… : coarse particle
abscissa : ml of reagent through column

実　験　結　果

(1) **イオン交換反応条件の検討**

(i) **粒度**：樹脂の粒度がこのイオン交換反応に可成大きな影響力を示している。例えば市販 Amberlite IRA-400そのまゝの粒度では乳鉢で良く磨砕したものに比べて，ADP,ATP の溶出が遅く各区分の分離も悪いが溶出全量には大差がなかつた。第1図に結果を示す。

(ii) **樹脂の種類**：化学組成の同一である Amberlite IRA-400 と Dowex-1 では稍後者に良い分離の程度を示したけれども，これは著者等のえた Dowex-1 が極度の微粉（200〜400mesh）であつた（微粉のため吸着管がつまり操作に困難を感じた）ための結果と思われる。但し溶出全量には差がない。これは筋肉抽出液でも同じ結果が見られた。分析結果を第1表に示す。

Table 1. Analysis of ATP
Per cent recovery from two kinds of ion exchanger

Exp.	Resin	Adenine Adenosine	AMP	ADP	ATP	Total
1	Amberlite	0	4.9	26.0	66.4	97.3
	Dowex	0	4.8	25.7	67.3	97.8
2	Amberlite	0	4.7	26.6	66.0	97.3
	Dowex	0	4.7	26.0	66.9	97.6

(iii) **展開液の流速**：展開液の流速は溶出量に多少の影響をもつている様に思われるが，±0.5 cc/min. の範囲では溶出量1～2%の差にすぎず特に重視する必要はないと思われる。これは第2表に示す。

Table 2. Analysis of ATP
Per cent recovery from ion exchanger by different flow speeds

Flow speed cc/min.	Adenine Adenosine	AMP	ADP	ATP	Total
1.5	0	3.3	25.1	68.3	96.7
1.5	0	3.8	24.5	67.9	96.2
1	0	4.4	25.6	67.4	97.4
1	0	4.7	25.1	67.5	97.3
1	0	4.9	22.7	67.4	95.0
1	0	4.3	23.3	66.9	94.5
0.7	0	5.4	24.4	66.7	96.5
0.7	0	4.9	24.8	67.3	97.0

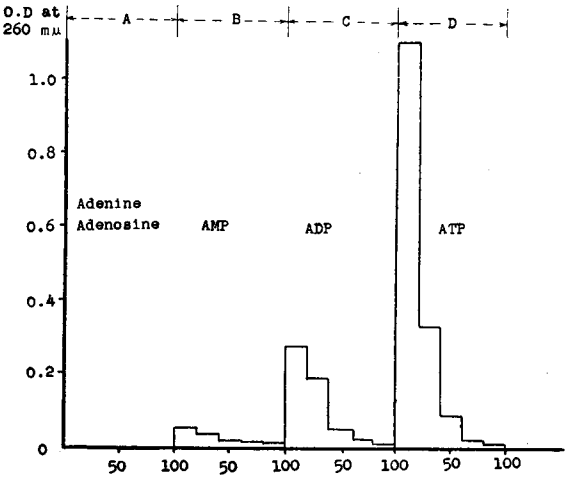

Fig. 2. Ion exchange separation of adenosinepolyphosphate
exchanger : amberlite IRA—400
test material : ATP $Ba_2 \cdot 4H_2O$
flow speed : 1cc/min.
abscissa : ml of reagent through column

(2) **ATP製品の分析**

家兎筋肉から抽出した ATP 製品の分析を行い，260mμの吸光度から第2図の溶出ヒストグラフをえた。A区分に流出されるのは，Adenine, Adenosine及びその他の不純物であろうと思われる。B区分は AMP，C 区分は ADP，D区分は ATP である。尙樹脂の容量はすべての分析に於て 1 cm^2× 1 cm である。

又この分析に関する回収率の検討の結果は第3表に示す如くである。

即ち著者等の研究に於ても Cohn & Carter の報告（90～97%）と同一の回収率が得られた。又同一の試料液に就て1～2%の誤差範囲で分析値を再現できる事も明らかである。尙得られたC，D区分の吸光度から算出した ADP，ATP 量を活弧で表した。単位は mg/10mg ATP $Ba_2 \cdot 4H_2O$である。

Table 3. Per cent recovery from ion exchanger based on 260 mμ absorption of starting material

Exp.	Adenine Adenosine	AMP	ADP		ATP		Total
1	0	4.3	25.1	(1.06)	68.3	(3.54)	97.7
	0	3.8	24.5	(1.04)	67.9	(3.48)	96.2
2	0	2.0	14.5	(0.59)	80.0	(3.88)	96.5
*	0	2.3	14.9	——	76.5	——	93.7

* Analytical data by Cohn & Carter[4)]

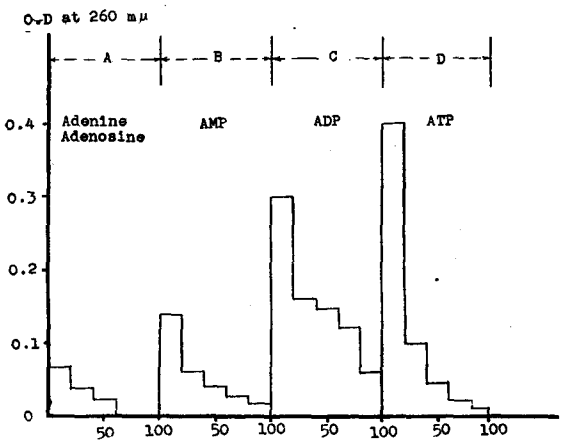

Fig. 3. Separation of adenosinepolyphosphate in carp muscle by ion exchanger
exchanger : amberlite IRA—400
test material : muscle extract
flow speed : 1cc/min.

かくして著者等は Cohn & Carter の方法を適用して，彼等が得た結果を殆んど再現する事ができた。

(3) 生筋の分析

次いで著者等は ATP 製品の場合と全く同様にして筋肉抽出液の分析を行つた。溶出ヒストグラフは第3図の様にえられた。

著者等は鯉筋肉に就て幾度となく ADP，ATP区分の分離の悪い事実，あるいはATPに対する ADP の相対的な大きい値を経験しているが，これらは生筋の分析に就て課せられた重大な問題であろうと思われる。尚分析に関する回収率の検討の結果を第4表に示す。

Table 4. Per cent recovery from ion exchanger based on 260 mμ absorption of starting material

Exp.	Adenine Adenosine	AMP	ADP	ATP	Total
1	6.7	7.3	33.6	45.7	93.3
	6.7	7.4	33.0	46.6	93.7
2	9.6	12.1	33.9	37.6	93.2
	9.0	12.6	33.3	36.8	91.7
3	4.8	8.7	48.6	32.1	94.2
	4.7	8.5	46.4	33.4	93.0

ATP製品の場合に比べて全回収率が減少している傾向が明らかであり，こゝでも生筋に於ける不純物の問題が換起される。但し同一の試料液に就て1～2%の誤差範囲で充分再現できる。

尚 Adenosinepolyphosphate の定量のために，従来広く用いられてきた方法である Fiske & Subbarow 法[6]によるATP製品と筋肉抽出液に関する定量値を，Cohn & Carter 法のそれと比較して結果を第5表に示す。

Table 5. Comparison of Fiske & Subbarow's and Cohn & Carter's methods

Method / Exp.	Fiske & Subbarow's method	Cohn & Carter's method		
	ATP based on △7P	ATP+ADP	ATP	ADP
Muscle extract	2.40	1.87	0.85	1.02
	1.73	1.44	0.79	0.65
	1.65	1.24	0.47	0.77
	1.83	1.52	0.78	0.74
	1.70	1.35	0.46	0.89
ATP prepared	46.85	43.57	35.94	7.63
	48.90	45.25	36.58	8.67

Unit : Muscle extract (mg/g wet wt.), ATP prepared (mg% ATP $Ba_2 \cdot 4H_2O$)

イオン交換反応に依つて定量したADP+ATP量は，本質的に七分燐(△7p)に基づくATP量と比較しうべき値ではないが便宜上対照した。Fiske & Subbarow 法の添加試験の結果は著者等が検討した所94～96%であるがそれにも拘らず Cohn & Carter 法に依る定量値より常に高い値を示している。一方 Cohn & Carter 法の添加試験の結果は97～98%の回収率を示すから，この値の変差は明らかに方法それ自身の本質的差異に基くものと解釈すべきである。又 Uridine, Cytidine polyphosphates の存在が明らかになつている折から，これら物質から遊離される燐酸量も無視できないと考えられる。

結局生筋中の Adenosinepolyphosphate の分析のためには，Fiske & Subbarow 法その他の従来法はいわば間接法である上に混在する種々の不安定な有機燐酸化合物の影響をうけ易い事実を考えると，Cohn & Carter 法は高い回収率と再現性で水産動物筋肉中の ADP，ATP の評価をなしうる事が明らかである。

従つてこの分析法に依つて著者等が 1954～1955年にわたつて，鯉筋肉中の Adenosinepolyphosphateの分布を測定した結果を第6表に示す。同時に著者等が測定した CP 含量をも対照のためかゝげた。

Table 6. Amounts of adenosinepolyphosphates in carp muscle (mg/g wet wt.)

Month	ADP	ATP	CP *	Note
Mar.	0.64	0.50	0.51	fatigue
	0.64	0.50	1.23	
June	0.41	1.50	2.35	
	0.63	1.18	0.87	fatigue
July	0.50	1.23	2.60	
	0.60	1.80	2.29	
Aug.	0.80	0.76	——	
Sept.	1.04	1.57	1.14	
	1.08	1.38	0.90	fatigue
Oct.	1.26	0.78	1.95	
	1.08	0.91	2.52	
Dec.	1.21	1.04	1.76	
	1.12	0.79	2.35	
Feb.	1.10	1.28	2.93	
	0.74	0.78	2.54	
	0.89	2.08	3.69	Guinea pig

* Saito & Arai (unpublished)

考　　察

Cohn & Carter 法に依る Adenosinepolyphosphate の分析では，何よりも各成分の分離が良く行われなければならない。著者等の研究に於ても樹脂の粒度・容量・展開液の流速・種類等に依つて多少影響された。その他展開試薬の濃度，pH，容量に依つて適当に加減されるものである。[8]

鯉筋肉中の ADP，ATP 保存量は恐らく筋肉の生理条件の差異に起因する事大である。従つて鯉筋肉中のこれら物質の保存を ADP：0.6～1.2，ATP；0.5～1.5mg/g wet wt. として，哺乳類その他の動物の保存量と比較して第7表に示した。

Table 7. Comparison of adenosinepolyphosphate contents in muscle of various animals (mg/g wet wt.)

Animal	ADP	ATP	CP	Note
Rabbit*	0.38	2.36	4.38	Gastro cnemius muscle
Frog*	0.53	1.06	2.14	〃
Guinea pig	0.89	2.08	3.69	〃
Carp	0.60～1.20	0.50～1.50	1.00～2.50	Dorsal muscle

* Analytical Data by Miyasaki *et al.*[5]

即ち鯉筋肉の保有するエネルギー準位は高くはない事が確められる。

尚著者等の得た結果に於ては，あたかも冬眠中の蟇の筋肉で観察される様に，10月をすぎた鯉の非活動期に於てADPの保存量がATPのそれよりも高くなる傾向が見られる事は非常に興味ある事実である。この現象は特に下等動物に多く見られるといわれるが，著者等の得た結果は果してこの事実にそつたものかどうかは，更に今後の研究に待たなければならない。

近来 Uridine, Cytidine polyphosphate 及びその誘導体の動物組織（肝臓・筋肉[7,8]）に於ける分布並びに生理的活性に関する研究が非常に進んでいるが，Sacks[9]の報告でもこれら物質の混入が本方法に障害を生ずるとしている。著者等は生筋の分析に当つて前述の如く，ADP と ATP の分離が異常に悪い事実並びに全回収率の悪い事実をしばしば経験しているが，之はあるいは以上の障害に依るのであるかも知れない。この点に関しては更に今後の研究に解明を期しているが，いづれにしてもこれら混入物質の筋肉中の絶対量はかなり少い値であるから，本方法に対して大きな影響は加わつていないと考えている。

要　　約

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究の一環として，高エネルギー燐酸化合物特にADP，ATPの定量を行うため，Cohn & Carter の報ずるイオン交換反応に依る方法をATP製品を用いて種々検討した。次いでこの方法を鯉生筋に応用した結果適当な方法である事を認め，更に一年間定量を続行してその変遷をしらべた結果，非活動期と考えられる冬期に於てADPの保有量が相対的に高くなる傾向にある事を知つた。

尚本研究の遂行に当り分析法その他に就て，多くの御便宜と御助言を賜つた札幌医大生理学教室永井寅夫教授，宮崎英策助教授，内田倖喜氏並びにATP Ba 塩の調整と分与に関して，御便宜と御助言を賜つた北大理学部山下生化学研究室高杉直幹教授，渡辺静夫助教授，佐々木昭雄氏に深謝する。

文　　献

1) Tarr, H. L. A. (1950). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **7**, 608.
2) 山田紀作・新間弥一郎・鈴木たね子 (1948). 日水誌 **4**, 41.
3) 佐々木林次郎・藤巻正生・古城健三・田中敏夫 (1953). 農化 **27**, 725.
4) Cohn, W. E. & Carter, C. E. (1950). *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4273.
5) 宮崎英策・内田倖喜・佐藤寛 (1954). 札医誌 **5**, 371.
6) Fiske, C. M. & Subbarow, Y. C. (1929). *J. Biol. Chem.* **81**, 629.
7) Schmitz, H., Husebert, P. B. & Potter, V. R. (1954). *Ibid.* **209**, 41.
8) Smith, E. E. B & Mills, G. T. (1954). *Biochim. et Biophys. Acta* **13**, 386.
9) Sacks, J., Littwak, L. & Hurley, P. D. (1954). *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 424.