



Title	水産動物筋肉の酵素化学的研究：第1報 鯉筋肉アルドラーゼの性質について
Author(s)	柴田, 猛
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 9(3), 218-226
Issue Date	1958-11
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/23045">http://hdl.handle.net/2115/23045</a>
Type	bulletin (article)
File Information	9(3)_P218-226.pdf



[Instructions for use](#)

# 水産動物筋肉の酵素化学的研究

## 第1報 鯉筋肉アルドラーゼの性質について

柴 田 猛

(北海道大学水産学部水産生物化学教室)

### Enzymatic Studies on the Muscle of Aquatic Animals

#### 1. On the properties of carp muscle aldolase

Takeshi SHIBATA

#### Abstract

An aldolase has been isolated from carp muscle and partially purified. Its properties and kinetics have been studied. The results may be summarized as follows:

(1) The enzyme preparation was either fractionated with ammonium sulfate between the concentrations of 1.75 M and 2.4 M, or precipitated with acetone between 40 and 45 per cent from muscle extract; both were lyophilized.

(2) The optimum pH was approximately between 8.2 and 8.5 in 0.05 M Tris buffer, 9.4 in 0.05 M glycine buffer, and 8.4-8.6 in 0.05 M borate buffer.

(3) The optimum temperature was found to be 45°C. for a period of incubation of 15 min.

(4) No bivalent metal ion effects have been detected, but some heavy metals, especially Ag, Hg and Cu salts, inhibited strongly the enzyme in final concentrations of  $10^{-4}$  M.

(5) Michaelis constant for fructose diphosphate has been determined as about  $0.45 \times 10^{-3}$  mole per liter at 30°C. in Tris buffer of pH 8.3.

(6) Arrhenius activation energy was about -11,000 calories per mole in Tris buffer at pH 8.3.

(7) From the above-mentioned, it was concluded that the properties of the carp muscle aldolase, except the unstability of its activity, would be similar to those of rabbit muscle aldolase.

#### 結 言

アルドラーゼは Merhof and Lohmann<sup>1)</sup> によつてはじめてチモヘキサゼ (Zymohexase) と名づけられたが、彼等の詳細な研究の結果三炭糖磷酸イソメラーゼを含むこと<sup>2)</sup>、デオキシアセトン磷酸と色々のアルデヒドとのアルドール縮合を触媒することより更にアルドラーゼと稱した<sup>3)</sup>。その後 Herbert *et al.*<sup>4)</sup> によつてイソメラーゼが除かれ、Warburg and Christian<sup>5)</sup> によつて鼠筋肉より最初の結晶化に成功し続いて Taylor *et al.*<sup>6)</sup> は兔筋肉から簡単な方法で、又 Beisenherz *et al.*<sup>7)</sup> は巧妙な方法で結晶化した。Wolf and Leuthardt<sup>8)</sup> によつてもアルドラーゼの結晶形の生成条件について論議された。

Engelhardt<sup>9)</sup> が Baranowski のミオゲン A<sup>10)</sup> の結晶にアルドラーゼ活性が含まれること報告してから、ミオゲン A とアルドラーゼの一致が論議されたが、Baranowski<sup>11)</sup> 自身もこの問題に触れ、ミオゲン A のアルドラーゼ活性が Warburg and Christian<sup>5)</sup> の活性より劣ることからミオゲン A の不均一性及アルドラーゼと一致しないことを認めたが、蛋白酵素の二元性の性質が、他の蛋白の混在によるものか否かに興味ある問題を提出している。

その他に筋肉腫瘍<sup>12)</sup> 肝臓、酵母、微生物<sup>13)</sup> 等にも含まれ、特に酵母より水銀塩<sup>14)</sup> として結晶化され、詳細は不明だが肝臓よりも結晶化されている<sup>15)</sup>。肝臓アルドラーゼは筋肉アルドラーゼと基質の特異性につい

て異なっている<sup>16)</sup>。血液にも存在し<sup>17)</sup>炭水化物の代謝の側枝路として解糖作用以外に五炭糖の代謝、 $C_2$ 化合物の縮合にも重要な役目をもっていると思はれる。水産動物筋肉のアルドラーゼについては未だ記載されていない。こゝで比較生化学的な立場から、アルドラーゼの性質について研究した。

### 実 験

試料は市販の養殖鯉(体長20~30cm.)を用いた。基質のフラクトーズ二リン酸(FDP)はビール酵母を醗酵させてバリウム塩として調製した<sup>18)</sup>。尙醗酵に無機リン酸許りでなく少量のFDPを添加することにより無添加の4~5倍の収量を得ることが出来る。純度は0.2Nアルカリ分解リンを基準<sup>19)</sup>として70%となる。本実験はそのまゝ使用した。酵素活性はTaylor *et al.*<sup>6)</sup>法に従い靑酸加里をtrapping agentに用い、リン酸はFiske and Subbarow法<sup>20)</sup>にて測定する。硫安濃度はNesslerの試薬を用いて測定し、加えるべき硫安の量をBeisenherz *et al.*<sup>7)</sup>の式を用いて計算する。蛋白濃度はKjeldahl法を用ふ。酵素単位は30°Cで1分間当りに1mgのアルカリ分解リン(トリオースリン酸に相当する)をturnoverする酵素量を1単位とする。Meyerhof and Beck<sup>21)</sup>は38°での単位を提出しているが、こゝでは30°の値で補正していない。比活性度は蛋白1mg当りの単位を示す。

### 結 果

硫安分別——Beisenherz *et al.*<sup>7)</sup>法に従つて分別を行つた。即ち養殖生鯉を断頭採肉し氷冷した肉挽機で細碎し1.5倍量の氷水を加え2~3°Cにて30分攪拌抽出する。布で濾過し残渣を同容の氷水を加え再び30分攪拌再抽出する。両抽出液を合しこれに直ちに硫安を添加し1.75モルの濃度にする。この際低温下でゆつくり時間をかけて少しづつ加えて攪拌する。これを8,100×gで遠心するか、又は一夜氷室に放置し翌朝セライトの濾過助剤を加えて吸引濾過すると透明な上澄液が得られる。表層に浮んでいる脂肪層を予め取除いておく。抽出にはblenderで5分以上抽出するとよいと報告されているが<sup>22)</sup>、鯉の場合2分以上かけると脂肪のために布濾過が困難になり遠心しても透明にならず、濾過速度を遅くする。むしろblenderを用いるより攪拌再抽出の方が収量よく活性が得られる。この上澄液(pH6.8)を更に0°C附近に冷却し、乳鉢でよく砕いた硫安を2.4モルになるまで少量ずつゆつくり攪拌しながら添加する。硫安は溶液100cc当り10.7gを必要とする。添加後30分攪拌を続ける。この沈澱を遠心するか、濾過によつて集め少量の水にとかし、硫安濃度を測定しながら硫安を加えて1.85モルにする。生じた沈澱を遠心して棄て、上澄液に再び2.4モルになる様に硫安を加えて再沈澱の操作を行う。このときの活性度と蛋白の分布の状態の一例が第一表に示めされる。

鯉の場合結晶化に成功しなかつたが、硫安区分の再沈澱によつて急激の比活性度の増加はみられない。三回の再沈澱で比活性度は0.52にしかならない。著者の行つた兎の場合では、この比活性度で容易に結晶化する。鯉の場合、この蛋白濃度で硫安を徐々に氷冷した酵素溶液に添加していくと1.9モル附近から美しい絹糸状の光沢がみられる。しかし顕微鏡下ではその形を観察出来なかつた。硫安濃度を増加しても、兎アルドラーゼの結晶を接種したりpHを6.1より7.5にしても結晶形の生長はみられなかつた。而も氷室に於ても一週間以上になると、変性した茶褐色のにごりを増し活性も失はれるが、絹糸状の光沢は消えない。恐らく硫安濃度から考えてHenrotteのミオゲン<sup>23)</sup>ではないかと思う。

硫安区分の活性保持のために一夜靑酸加里を含んだ蒸留水(pH7.0に中和)に透析して凍結乾燥物とした。凍結によつて活性は減少しないが、蛋白含量は80%で4週間後には室温で31%の活性の減少がみられ、3月後では45%となり、水の不溶解物が増加してくる。又水に溶解した液は室温で2~3時間で白濁し、氷室では一夜放置しても白濁せず、又EDTA溶液では白濁しない。しかし活性は白濁するまでは失なわれない。1%ゼラチン溶液ではやゝ活性を安定化させる。水に対する透析によつても活性を失ひ、三日目で57.5%、五日目では殆んど失活する。

Table 1. Partial purification of carp muscle aldolase

Step	Amount	Enzyme activity		Protein content		Specific activity	Yield	
		per cc	total	per cc	total		activity	protein
Crude extract	cc 950	unit 0.58	unit 551	mg 10.9	mg 10355	unit/mg 0.053	% —	% —
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction, 1.75 M supernatant	1036	0.48	496	6.7	6941	0.071	90	67
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction, 1.75-2.4 M	18	18.4	330	79.1	1424	0.233	60	13.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction, 2.4 M supernatant	1065	0.03	30	5.1	5432	0.005	5.5	53
Umprecipitation, 1.75-2.4 M	11.4	26.3	303	68.9	785	0.386	55	7.6

Extracted from 350 g carp muscle (1.6 unit/g wet weight of tissue)

Enzyme activity was estimated by Taylor *et al.*<sup>6)</sup>

Unit : 1 mg triose-phosphate-P/ cc/min at 30°

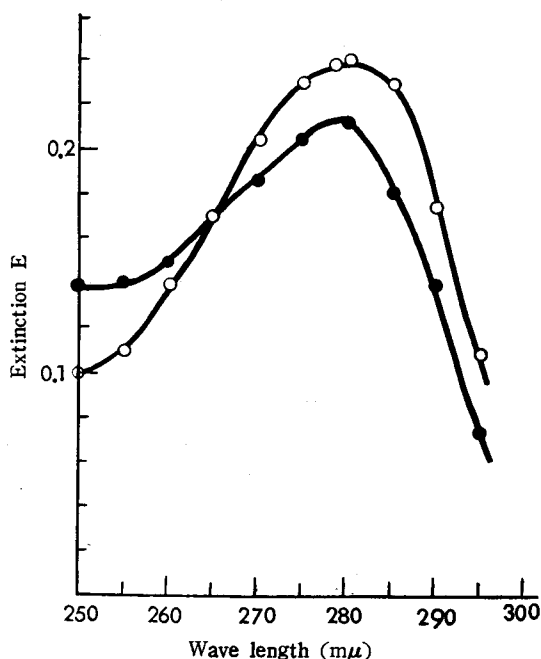


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of the enzyme preparation

Each 0.18 mg protein (based on the determination of Kjeldahl-N.) per cc of redistilled water; cell path, 1 cm  
—●— lyophilized acetone fraction; —○— lyophilized ammonium sulfate fraction.

アセトン分別——脂質物を除去する目的でアセトン分別を Warburg and Christian 法<sup>5)</sup> によつて行つた。硫酸分別法と同様にして得た水抽出液を0°Cに氷冷し、これにドライアイスと氷で -10°Cに冷却した精製アセトンを容量パーセントとして40%になる様に少量ずつ添加する。溶液の温度を0°C以上にならない様にする。これを 625 × g にて素早く遠心し、上澄液をもう一度0°C附近に冷却し、更に冷精製アセトンを加えて45%にする。遠心によつて沈澱を集め、少量の水に溶解し、不溶物の存在するまま少量のクロロホルムを加えて低温にて2時間振盪する。不溶物及沈澱を遠心によつて除去し、黄色の透明液を直ちに凍結乾燥する。アセトンと長く接触させてはいけない。

この凍結乾燥物の比活性度は硫酸凍結物に比較して $\frac{1}{2}$ に低下しているが、水に溶解すれば不溶物がなく殆どが蛋白で、30°Cの incubation にても白濁せず、活性も安定である。これらの二つの凍結乾燥物の比較のために紫外部の吸収スペクトルが第1図に示めされる。

図にみる如く 280mμの吸収はアセトン区分の方が低い、250mμ附近は逆に高くなつて

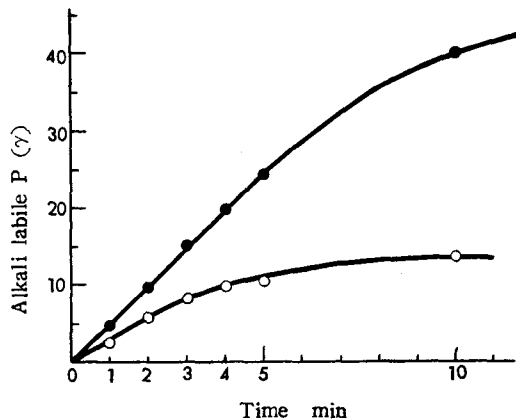


Fig. 2. Time course of carp muscle aldolase activity in assay

The reaction mixture contained, in moles per 0.2 cc, fructose diphosphate  $5 \times 10^{-3}$  M, Tris buffer  $5 \times 10^{-2}$  M, pH 7.2, KCN  $5 \times 10^{-2}$  M or in the place of KCN, monoiodoacetic acid  $1.8 \times 10^{-3}$  M, 32% of enzyme preparation (specific activity: 0.263). Temp. 30°C. —●— KCN; —○— monoiodoacetic acid

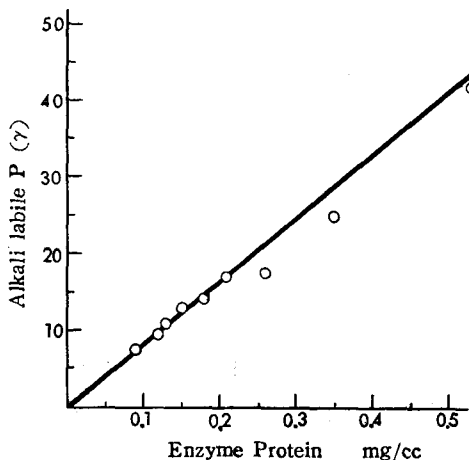


Fig. 3. Linearity of response with enzyme concentration

All reaction mixture contained 1 cc 0.1 M fructose diphosphate, 1 cc 0.2 M borate buffer pH 7.3, 1 cc 0.25 M KCN, and varying amounts of enzyme solution (specific activity: 0.18), in a final volume 5 cc. After 3 min reaction at 38°, aliquots were estimated for alkali labile p.

いる。吸光度よりみると兎の蛋白と吸光度の関係 1:0.91<sup>19)</sup> に比較して硫安区分は 1:0.75, アセトン区は 1:0.85 となり, 未だ不純蛋白を含んでいるか, 又は 280m $\mu$  の吸収を示すアミノ酸の含量が低いことを示す。又アセトン区分が硫安区分よりも 280m $\mu$  の吸収を示す不純物が少ないといはれるかも知れない。しかし, 核物質様の不純物が含まれているかも知れない。

時間による反応速度——至適な反応時間を見出す意味で試みた。青酸カリを含んだ硫安凍結乾燥品を酵素として基質と 10 分間 preincubation して, 反応を行はしめたのが第 2 図に示めされる。

青酸カリを trapping agent とした時は, 活性と時間との関係は 5 分間は直線的となり, イソメラーゼ阻害を目的としたモノ沃度酢酸は 3 分まで直線となるがすぐに平衡に達し, 活性度も低いので, 青酸カリと 5 分反応を用いることにした。

酵素濃度による反応速度——酵素活性を比較するとき稀積度が影響するのでそれを確かめるために行つた。結果は第三図に示めされる。25% の磷が遊離するまでは活性と酵素濃度は比例する。活性度が 10~25% の磷が遊離される様になるまで酵素液を稀積して, それに稀積倍数を乗じて活性度を比較した。

温度による反応速度——硫安凍結乾燥物を用いて温度に対する影響をみたのが第 4 図である。所謂至適温度は図より 45°C 附近にみられる。Herbert *et al.*<sup>21)</sup> による兎アルドラーゼの場合は 10% 硫安濃度で 60° 以上でも活性を有し Sibley *et al.*<sup>24)</sup> も彼自身の測定法で 60° 以上に至適温度があると報告している。しかし Dounce *et al.*<sup>25)</sup> は測定法が異なるが pH 7.2 で 30~35°C の間にあると報告している。又緩衝液の種類によつても異なり, 兎でも コリジン緩衝液では pH 7.2 で 30°C と報告されている<sup>26)</sup>。incubation が 30 分以上になるときは酵素の安定性のために 25°C で測定することが望ましいという事も述べられている。鯉について緩衝液の種類, pH との関係

については確めていない。

著者の測定温度は Taylor *et al.*<sup>6)</sup> に従つて 30° を採用しているので、他の文献と比較するためには補正しなければならない。第4図より1.4倍すればよい。Herbert *et al.*<sup>4)</sup> によると  $Q_{10}$  は 30~50° の間で 2, Dounce *et al.*<sup>25)</sup> による  $Q_{10}$  は 2.8 (20~38°) である。著者の場合は 18° より 38° で  $Q_{10} = 2.2$  になる。兎にくらべてやや小さい温度係数をもっている。しかし 30° 以下では  $Q_{10} = 3$  近くにある。Herbert *et al.* の結果からみて 30° より 40° の  $Q_{10}$  が 1.2 であること、最大の活性を示めた 45° でも白濁を生じたことより考え、鯉アルドラーゼは熱に対する抵抗は兎の場合よりも少し劣る様である。

pH による反応速度——硫酸分別凍結乾燥製品を用いた結果が第5図a) b) c) に示めされる。緩衝液によつて至適 pH が異なりトリス緩衝液では 8.3~8.5 に、グリシン及硼砂—苛性ソーダ緩衝液では 9.4 に存在する。クエ

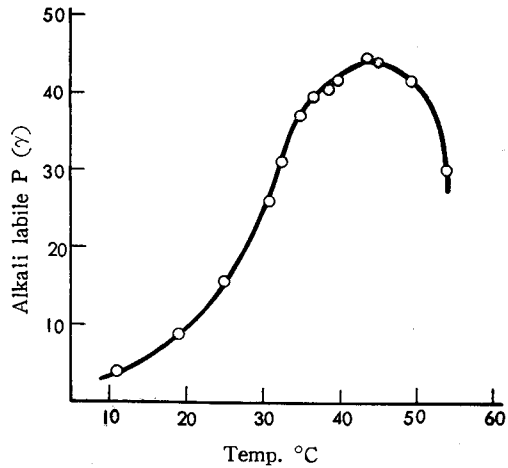


Fig. 4. Effect of temperature on the reaction velocity. The final concentrations of reagents employed were: fructose diphosphate  $5 \times 10^{-3}$  M; Tris buffer  $5 \times 10^{-2}$  M, pH 7.3; KCN  $5 \times 10^{-2}$  M; 50  $\gamma$  of enzyme preparation (specific activity: 0.165). The total volume was 0.2 cc, incubation time 5 min.

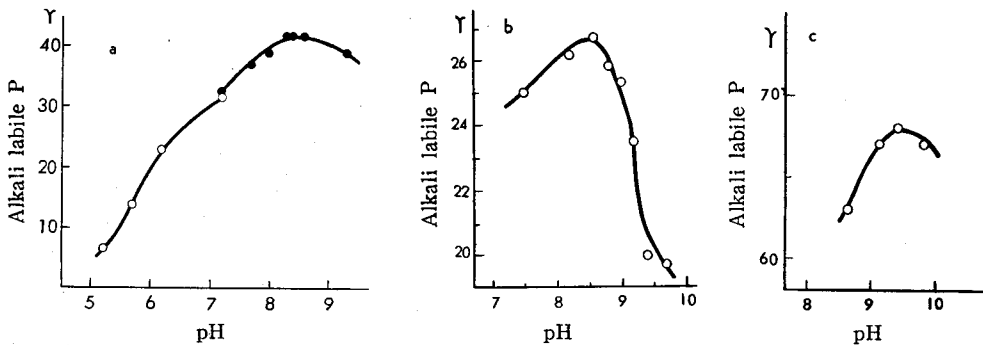


Fig. 5. Effect of pH on the reaction velocity. The final concentrations of reagents employed were: fructose diphosphate  $5 \times 10^{-3}$  M, KCN neutralized to each pH,  $5 \times 10^{-2}$  M; 42  $\gamma$  of enzyme preparation (specific activity: 0.165) the total volume 0.2 cc. Temp. 30°, incubation 5 min. a) -○- citrate buffer  $5 \times 10^{-2}$  M. -●- Tris buffer  $5 \times 10^{-2}$  M. b) boric acid -KCl -NaOH buffer,  $5 \times 10^{-2}$  M. c) glycine buffer  $5 \times 10^{-2}$  M.

ン酸緩衝液では至適 pH はなかつた。同じ硼酸緩衝液で硼酸・塩化カリ・苛性ソーダ系では pH 8.4~8.6 に存在する。pH 5.2 以下では完全に失活し白濁を生ずる。モノ沃度酢酸だけであると pH 8.0 以上で活性を低下し至適は 7.2~3 の附近にみられる。Bruns<sup>17)</sup> と Amano<sup>27)</sup> は硼酸塩の活性の阻害を報じ、硼素と基質の OH 群との complex を想像している。測定法が異なり、trapping にヒドラジンをを用いているので、青酸とヒドラジンの違いによるかも知れない。Dounce *et al.*<sup>25)</sup> は同じトリス緩衝液でも 7.2 に至適 pH があることを

報している。コリジン緩衝液でも pH 7.2 で、磷酸緩衝液中で光学的測定に於ても 7.5 附近にあるので、測定法緩衝液によつて差が出ると思われる。

活性剤及阻害剤——兎アルドラーゼは二価の金属イオンを活性化に必要としないが、酵母アルドラーゼは  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  等の二価の金属イオンを活性化に必要とする。鯉アルドラーゼについてはどうかみたのが第 2 表である。試料は硫安凍結乾燥製品を用いた。 $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  は  $10^{-3}M$  まで効果がないが、

Table 2. Effect of metal ions on carp muscle aldolase

Metal ion	Final concentration M	Inhibition	
		without KCN	with KCN
$Hg^{++}$	$10^{-4}$	54%	32%
	$10^{-3}$	100	42
$Ag^{++}$	$0.7 \times 10^{-4}$	5	1
	$0.7 \times 10^{-3}$	85	9
$Cu^{++}$	$0.5 \times 10^{-4}$	0	0
	$0.5 \times 10^{-3}$	0	0
	$0.5 \times 10^{-2}$	80	37
$Mg^{++}$	$10^{-3}$	—	0
	$10^{-2}$	—	14
$Zn^{++}$	$10^{-3}$	—	0
	$10^{-2}$	—	30

The reaction mixture contained: fructose diphosphate  $5 \times 10^{-3} M$ ; Tris buffer pH 7.2,  $5 \times 10^{-2} M$ ; 31% of enzyme preparation (specific activity: 0.263); each concentrations of the inhibitors described above were added, in a final volume 0.2 cc, Temp.  $30^{\circ}C$ , incubation time 5 min. The inhibitors were mercury acetate, silver nitrate, copper sulfate, zinc and magnesium sulfate. In all the experiments enzyme solution was preincubated with the various substances for 10 min at  $30^{\circ}C$ .

*al.*<sup>28)</sup> は兎アルドラーゼに 29 個含まれると報告されているが、システインの阻害及 Swenson *et al.*<sup>29)</sup> の尿素変性の報告より SH 群は活性には二次的な条件と考えられる。

Michaelis 恒数——適当な基質濃度と酵素の単一性を知るための基礎としてこの実験を行った。試料は硫安分別凍結乾燥製品を用いた。Lineweaver-Burk の式を用いて図示すれば第 6 図の如くなる。両端を除いて略々直線となる。pH によつて  $K_m$  が変動し、pH 7.5~8.6 までは  $0.45 \times 10^{-3}M$  となり pH 9.0 以上では  $1.0 \sim 1.45 \times 10^{-3}M$  となる。アルカリ性になるに従つて高くなつてくる。即ちアルカリ性になる程、活性に多く基質を必要とする。又アルドラーゼは塩基性のグループが多いと言はれているが<sup>30)</sup> 解離基がアルカリ性ではおさえられて、基質との結合を困難にするためと考えられる。兎でも測定法によつて  $K_m$  の値は変動するが<sup>31)</sup> order は一致する。光学的に測定した場合の  $K_m$  は  $10^{-5}M$  の order で、生体内では可成りの速度で反応しているものと考えられる。

活性化熱—純度の検定的手段として Arrhenius の式を用いて活性化熱を測定した。試料はアセトン凍結乾燥製品を用いた。結果は第 7 図に示めされる。酵素濃度を変えても勾配は同じになる。20~30° ではよく直線にのるが 30° 以上では折れ曲がりを見せる。pH によつて活性化熱も異なり、pH 8.3 で  $E = -10,850 \pm 387$  カロリー pH 9.0 では  $-15,140 \pm 340$  カロリーとなり、pH 9.0 では活性化するためには更に大きなエネルギー

$10^{-2}M$  ではむしろ阻害作用をもつ。EDTA 溶液は長時間に亘つて活性の変化がなく、当量の  $Mg^{++}$   $Zn^{++}$  を添加しても活性に効果がないので、鯉アルドラーゼは恐らく金属酵素ではないのだらう。EDTA 溶液が水溶液よりも活性が保持されるのは重金属の汚染を防いでいるかも知れない。 $Hg^{++}$   $Ag^{++}$   $Cu^{++}$  の重金属は何れも阻害作用をもち  $Hg^{++}$  が効果が大きい。青酸カリが存在すると阻害度が弱められる。阻害の程度は兎の場合と同程度である。又鯉肉アルドラーゼはシステインによつても阻害され  $5 \times 10^{-3}M$  pH 8.6 で 8.5% の阻害される。活性に重金属と結合する基が必要であり、*p*-CMBa によつても阻害されるので鯉の場合にも SH 基が存在すると考えられる。Benesch *et*

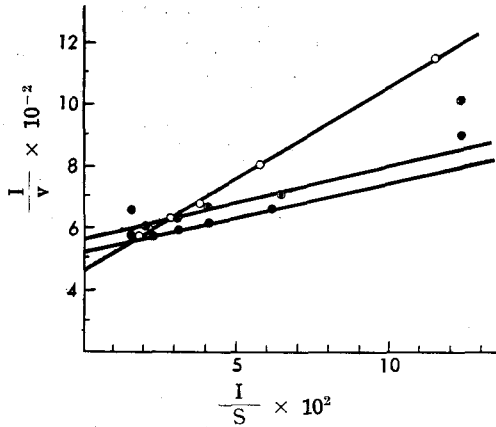


Fig. 6. Effect of varying substrate concentration on the reaction velocity

The final concentrations of reagents employed were: boric acid-KCl-NaOH buffer,  $5 \times 10^{-2}$  M; KCN neutralized to each pH,  $5 \times 10^{-2}$  M, and varying amounts of fructose diphosphate: 42% of enzyme preparation (specific activity :0.165); total volume 0.2 cc. Temp.  $30^\circ$ , incubation 5 min.

-○- pH 7.5; -●- pH 8.6; -○- pH 9.2,  
 $K_m = 0.45 \times 10^{-3}$  M/L. (pH 7.5, pH 8.6);  
 $K_m = 1.36 \times 10^{-3}$  M/L. (pH 9.2).

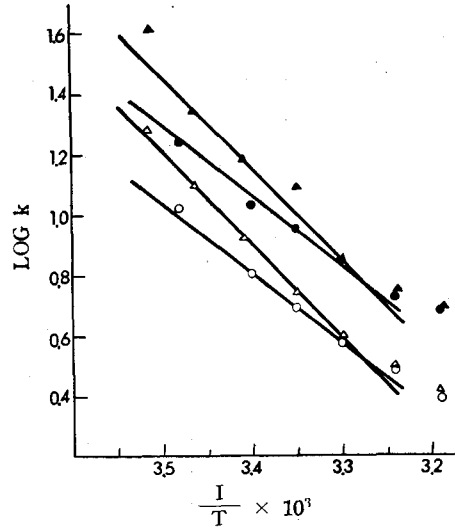


Fig. 7. Effect of varying enzyme concentration and pH on the initial velocity against the inverse of the absolute temperature.

The final concentrations of reagents employed were: fructose diphosphate  $5 \times 10^{-3}$  M; Tris buffer  $5 \times 10^{-2}$  M, pH 8.3, or glycine buffer, pH 9.0,  $5 \times 10^{-2}$  M; KCN neutralized to each pH,  $5 \times 10^{-2}$  M; 41 or 77% of enzyme preparation (specific activity 0,100); a final volume 0.2 cc. Temp.  $30^\circ$ , incubation time 5 min.

-○- pH 8.3, 77% enzyme preparation; -●- pH 8.3, 41% enzyme preparation; -△- pH 9.0, 77% enzyme; -▲- pH 9.0, 41% enzyme.

$E = -10,850 \pm 387$  cal./mole at pH 8.3,  
 $E = -15,140 \pm 340$  cal./mole at pH 9.0,

ギーを必要とすることになる。しかし  $30^\circ$  以上では pH に無関係な様で、pH 8.3 では  $-7,900 \pm 430$  カロリー、pH 9.0 では  $-7,830 \pm 849$  カロリーで殆ど一致した値になる。基質濃度によつても活性化熱が変化するが、Herbert らの値は約 13,000 カロリーになつてゐる。この温度による異常性は酵素製品の不純によるものか否かは尙研究中である。イソメラーゼの存在は E の値に関係がないと Herbert が言つてゐる。

### 考 察

水産動物、特に魚類の酵素活性は哺乳類に比較して何れも低い。アルドラーゼ活性についてもこの例に洩れない。著者によつて調製された兎結晶アルドラーゼの場合筋肉 1 g 当り 3.9 単位で鯉の場合は 0.6~2.1 単位である。Meyerhof の表<sup>30)</sup>との比較のために  $38^\circ$  に補正すると、兎は 5.5、鯉では平均 2.1 単位になり、活性度は半分である。これらの酵素活性が低いのは、酵素濃度が低いか、又は、ある程度精製された酵素製品が結晶アルドラーゼと諸性質が類似することから、精製するまでの過程に於いて活性を妨害や阻害する不純物のためと考えられる。分子量やアミノ酸分析を測定していないが、アミノ酸の数、配列や立体構造が酵素の活性や安定化に影響するならば、生体内では、兎の場合といくらか異なつた機構で作用すると考えられ



る。この低い活性が鯉本来のものならば、turnover が低く、分子量アミノ酸の含量順序にも影響してくると思はれる。

硫安区分とアセトン区分とは諸性質は略々一致するが、酵素の持続性については性質が異なり、アセトン区分は比活性度は低いが、透析、incubation に対して安定性がある。この原因は混在する不純蛋白によるものと思はれる。電気泳動法ではアセトン区分は pH8.2 のペロナル、及び pH7.2 の磷酸緩衝液では2つのピークにわかれる。硫安区分はなだらかなピークが続き成分が判然としない泳動図が得られる。又吸収スペクトルからも硫安区分には不純蛋白が混在していると思はれる。アセトンによつて可溶性蛋白類がとり除かれたためと考えられる。アルドラーゼはこのアセトン可溶物質と結合した状態で存在するのではないかと想像され、incubation 中にこの変質し易い物質が沈澱するときにアルドラーゼも一緒に共沈する。しかしアセトンはアルドラーゼに対して変性をおこさせ、アセトンとの接触が長ければ、変性が大きく、水中一夜で完全に失活する。硫安の存在がアセトンの変性を促進する。

Michaelis 恒数、活性化熱の pH による変化が観察されたが、酵素活性がアミノ酸の遊離基によるものと考えられると、その遊離基の解離の条件によつて活性が変化するため、当然 pH との相関関係があつてもよいわけである。勿論緩衝液の濃度、種類によつて変るが、Dixon<sup>31)</sup> の解離基の状態と pH との理論があてはめ得るかも知れない。pH が中性付近で反応し易いと言ふことは酵素蛋白の両性電解質の特性をもつともよくあらわしている。光学的活性と化学的活性の相違はこゝに原因があるかも知れない。化学的測定法が条件の悪い所で測定しているのは trapping agent の青酸カリやヒドラジンの影響もつとも強く表はれているためと思はれる。

## 要 約

鯉筋肉のアルドラーゼを硫安分別、アセトン分別にて調製し、これらの凍結乾燥品について二三の性質について調べた。即ちアルドラーゼは兎と同一濃度の硫安区分とアセトン区分に存在し、至適温度は 45°C で、至適 pH は緩衝液によつて異なり、トリス緩衝液では pH8.3~8.5 グリシン緩衝液では 9.4、磷酸・塩化カリ・苛性ソーダ緩衝液では 8.4~8.6 に存在する。二価の金属には影響されず、却つて重金属によつて強く阻害され Hg<sup>++</sup> が最も効果があつた。Michaelis 恒数は pH によつて変化し pH8.6 までは  $K_m = 0.45 \times 10^{-3}$  M/L. pH9.2 では  $1.36 \times 10^{-3}$  M/L. となる。活性化熱は pH 8.3 で  $-10,850 \pm 387$  cal./mole, pH9.0 では  $-15,140 \pm 340$  cal./mole である。何れもの諸性質は兎の結晶アルドラーゼと類似する。

この研究にあたり、種々の御指導と酵母の入手に御尽力を下された本学部吉村克二教授に深く感謝いたします。又研究に要した経費の一部は文部省科学研究費より支出した。附記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) Meyerhof, O. & Lohmann, L. (1934). *Biochem. Z.* 271, 89.
- 2) ————— & Kiessling, W. (1935). *Ibid.* 279, 40.
- 3) —————, Lohmann, K. & Schuster (1936). *Ibid.* 285, 301-319.
- 4) Herbert, D., Gordon, H., Subramanyan, V. & Green, D. E. (1940). *Biochem. J.* 34, 1108.
- 5) Warburg, O. & Christian, W. (1943). *Biochem. Z.* 314, 149.
- 6) Taylor, J.F., Green, A. A. & Cori, G. T. (1948). *J. Biol. Chem.* 173, 591.
- 7) Beisenhetz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade K. H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G. (1953). *Z. Naturforsch.* 8b, 555.
- 8) Wolf, H. P. & Leuthardt (1957). *Helv. Chim. Acta.* 40, 237.
- 9) Engelhardt, W. A. (1943), Taylor *et al.* (1948). *J. Biol. Chem.* 173, 591.

- 10) Baranowski, T. (1939). *Z. physiol. Chem.* 260, 43.
- 11) ————— & Niederland, T. R. (1949). *J. Biol. Chem.* 180, 543.
- 12) Meyenhof, O. & Wilson, T. R. (1949). *Arch. Biochem.* 21, 1, 22.
- 13) Jagannathan, V., Singh, K. & Damodavan, M. (1956). *Biochem. J.* 63, 94.
- 14) Warburg, O. & Karfied, G. (1954). *Z. Naturforsch.* 9b, 206.
- 15) Peanasky, R. J. (1957). *Chem. Abst.* 51, 13974b.
- 16) Leuthardt, F., Testa, E., & Wolf, H. P. (1953). *Helv. Chim. Acta.* 36, 227.
- 17) Bruns, F. (1954). *Biochem. Z.* 325, 156, 429.
- 18) 大村京生 (1953). 標準生化学実験. 573p. 東京; 文光堂.
- 19) Kiessling, W. (1938). *Biochem. Z.* 298, 421.
- 20) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925). *J. Biol. Chem.* 66, 375.
- 21) Meyenhof, O. & Beck, L. V. (1944). *Ibid.* 156, 109.
- 22) Andrews, M. M., Barbara, Tait Guthneck, Mc Bride B. H. & Schweigert, B. S. (1952). *Ibid.* 194, 715.
- 23) Henrotte, J. G. (1952). *Nature.* 169, 968.
- 24) Sibley, J. A. & Lehninger, A. L. (1949). *J. Biol. Chem.* 177, 859.
- 25) Dounce, A. L. & Beyer, G. T. (1948). *Ibid.* 173, 159.
- 26) —————, Barnett, S. R. & Beyer G. T. (1950). *Ibid.* 185, 769.
- 27) Amano, H. (1955). *Chem. Abst.* 50, 10838C.
- 28) Benesch, R. E., Lardy H. A., & Benesch, R. (1955). *J. Biol. Chem.* 215, 663.
- 29) Swenson, A. D. & Boyer, P. D. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2174.
- 30) Stumpf, P. K. (1954). *Chemical Pathways of Metabolism.* vol. 1. 82p. New York; Academic Press, Inc.
- 31) Meyerhof, O. (1951). *The Enzymes: chemistry and mechanism of action.* vol. 2. 195p. New York; Academic Press, Inc.
- 32) Dixon, M. (1953). *Biochem. J.* 55, 170.