HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	コイ筋肉の5'-ADENYLATE DEAMINASEに関する研究：第1報 5'-Adenylate deaminaseの作用力測定法について
Author(s)	奈良, 盛; 斎藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 10(1), 68-71
Issue Date	1959-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23060
Type	bulletin (article)
File Information	10(1)_P68-71.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

コイ筋肉の 5′-ADENYLATE DEAMINASE に関する研究

第1報 5′-Adenylate deaminase の作用力測定法について

奈 良 盛 ・ 斎 藤 恒 行
(北海道学芸大学函館分校化学教室) (北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on the 5′-Adenylate deaminase of Carp Muscle

I. On the determination of 5′-Adenylate deaminase activity

Sakari NARA and Tsuneyuki SAITO

Abstract

(1) The method presented by G. Schmidt (1928) was modified for the determination of 5′-Adenylate deaminase.
(2) This method was characterized by determing NH_3-nitrogen liberated in low concentration of substrate (2.88×10^{-3} M muscle adenylic acid) and short reaction interval (for 10 minutes).
(3) NH_3-and protein-nitrogen were measured colorimetrically and the specific activity (S.A.) was expressed as NH_3-nitrogen (γ) per protein-nitrogen (mg.).
(4) Thus it was ascertained that about ten units secured by the modified method correspond to one unit obtained by H. M. Kalckar's in the specific acitivity.

新鮮な脊椎動物筋肉に於ては，その中に含有される adenine nucleotide は，自己消化の進むに従つて，脱アミノ作用を受けて hypoxanthine nucleotide に変化する。この事実は，G. Schmidt[1] をはじめ，H. M. Kalckar[2], G. Nikiforuk & S. P. Colowick[3] 等によつて報告されている。更に Lee は最近家兎筋肉から，5′-adenylate deaminase の結晶化に成功し，その物理化学的性質を報告している[4]。又 Lyubimova 等は myosine から，高度に活性のある deaminase を得て，これが Cytosine 並びに未知の螢光物質を含むことを述べている[5]。著者の一人[6]はさきに，コイ筋肉の緩慢凍結の際に，adenosine triphosphate (ATP) が急激に減少する一方，inosinic acid (IMP) が蓄積することを確認し，この現象は筋肉中に生じた adenylic acid (AMP) が急速に脱アミノ作用を受けて，IMP を生じたものと推定した。著者等はこの事実に基いてコイ筋肉中の 5′-adenylate deaminase 作用を追求し，その作用の顕著なことを確認し，分離精製を試みている。今回は deaminase の測定法として，古く G. Schmidt が提案した方法を改良し，若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

試料は市販の養殖コイ（体重 300〜400g, 体長20〜30cm）を用い，基質として使用した 5′-adenylic acid は和光純薬株式会社より購入した。

測定法の骨子は AMP→IMP+NH_3 の酵素反応により生じる NH_3の定量を試み，酵素作用力を決定した。NH_3の定量は Nessler 試薬[7] を用い，比色定量法に従つた。同時に Biuret 試薬により，たん白濃度を測定し[8]，酵素のたん白態窒素 1 mg当りのNH_3態窒素量をもつて比活性度とした。即ち NH_3-N(γ)/Pro-N (mg) (以後略して S.A. とする) として示した。尚比色は ITO の spectrophotometer を用いた。

実 験 結 果

(1) NH_3態窒素の定量

硫酸アンモニヤの標準溶液（10mg N/100ml）を調製し，斎藤の方法[9]により，Nessler 試薬で発色させ450mμに於ける吸収を測定する。窒素濃度と吸光度との関係は第1図に示す通りで，NH_3-N として約50γ（OD≒0.425）まではほぼ直線的な関係が得られるが，それ以上の範囲では上向きの曲線となる傾向が示される。

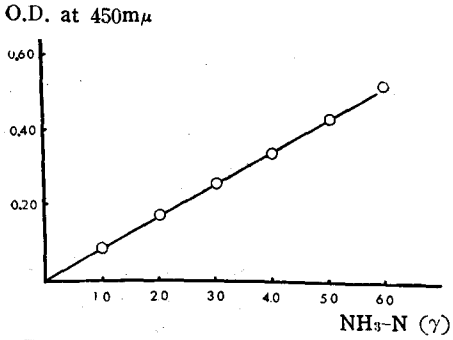

Fig. 1. Relationship between the concentration of NH_3-nitrogen and extinction.

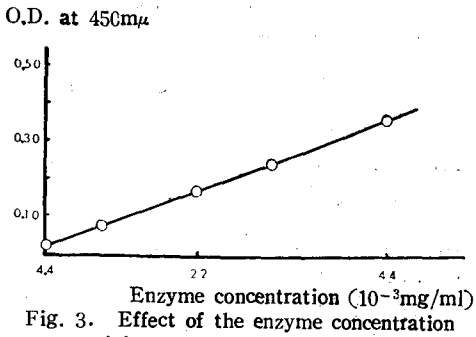

Fig. 3. Effect of the enzyme concentration on activity.

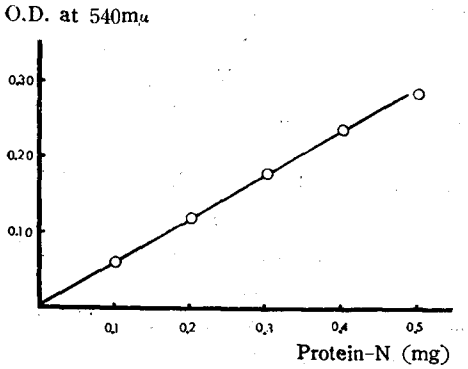

Fig. 2. Relationship between the concentration of protein-nitrogen and extinction.

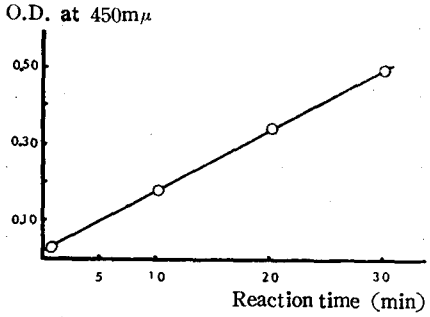

Fig. 4. Effect of reaction time on enzyme activity.

(2) たん白態窒素の定量

精製カゼインの標準溶液（0.5414mg/ml）を調製し江上等の方法[8]により，Biuret 反応による呈色を540mμに於ける吸収で測定する。たん白濃度と吸光度との関係は第2図に示す通りで，たん白態窒素として約0.375mg（OD≒0.225）までは Lambert-Beer の法則に一致するが，それ以上では下向きの傾向（実際よりは少なくなる）を示した。

(3) 酵素活性の測定法

（i） 基質の調製：AMP の濃度は 0.1M Succinate buffer (pH6.4) をもつて0.1%とする。これはAMPの濃度として2.88×10^{-3}Mとなる。

（ii） 酵素液の調製：コイ筋肉を4～5倍量のM/2 KClで抽出した溶液，又は Straub の溶液(0.3M KCl, 0.09M KH_2PO_4, 0.06M K_2HPO_4, pH6.6)による抽出液を適宜希釈して使用した。

(iii) 測定法の実際：基質2 mlを試験管にとり，30°Cの恒温槽に2～3分間放置し，酵素液1 mlを速やかに基質溶液と混合する。正確に10分間を経過した後，60%の過塩素酸溶液 0.1 ml を加え反応を停止せしめる。次に直ちに水15 mlを加え，Nessler 試薬1 mlを加えて発色せしめる。発光後10～15分間放置し，基質の代りに M/2 KCl 2 mlを加えたものをブランクとして比色定量を行なう。別に同じ酵素液1 ml に Biuret 試薬1ml を加え，たん白態の窒素を測定する。之等両者の値から，前述の約束に従つてS.A.値を求める。実測値は次表に示す通りである。

Table 1. Specific activity of enzyme solution extracted from carp muscle.

	Co	B_1	B_2	Sample
E-soln (ml)	-	1	-	1
5′-AMP (ml)	-	-	2	2
M/2-KCl (ml)	3	2	1	1
60% $HClO_4$(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
H_2O (ml)	15	15	15	15
Nessler's Reagent (ml)	1	1	1	1
O.D. at 450 mμ		0.042	0.002	0.281
Corrected O.D.				0.237
NH_3-N (γ)*1				33
O.D. at 540 mμ				0.190
Pro-N(mg)*2				0.330
Specific activity (γ/mg)				100

Co., control; B_1, without substrate; B_2, without enzyme; *1, value by Fig. 1; *2, value by Fig. 2.

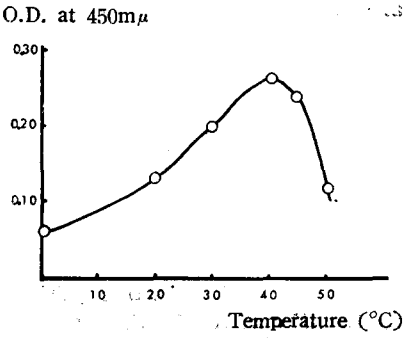

Fig. 5. Effect of temperature on enzyme activity.

(4) 測定法の検討

(i) 酵素濃度と作用力との関係；粗酵素溶液(0.220mg/ml)を M/2 KCl で5～50倍に希釈し，上記の方法で作用力を測定した結果，第3図に示す通りの直線的関係が得られた。

(ii) 反応時間と作用力との関係：反応開始直後から30分までの作用力は第4図に示す通りで，全く直線的関係が得られたこの程度の基質濃度では零次反応と判談される。

(iii) 反応温度と作用力との関係：反応温度を0±1°Cから50°C まで上げて，その作用力を比較した結果を第5図に示す。その結果によれば40°C 附近に於いて最高を示すことを知つた。

(iv) その他考慮すべき点：基質の blank (第1表参照) は極めて小さいので，毎日測定する必要はなく，第1表のB_1を標準として，直接吸光度 (補正値) が求められる。また過塩素酸溶液を加えると，白色の沈澱を生じるが，これは主として高濃度の無機塩の影響によるもので，沈澱はそのままにして発色させてよい。沈澱を除去するためにこし紙を使用することは，こし紙中のアンモニア量の影響を受けることが大きいので望ましくない。

考　　察

本酵素の作用力測定の鍵は，既述の通り生成するアンモニヤの定量にかかつている。アンモニヤの定量法としては Kjeldahl法，Conway の微量拡散吸収法及び比色法がある。多くの試料を同時に，しかも速かに測定する必要のあるときは後者の比色法が一般に便利とされている。Nessler 試薬によるアンモニヤの比色定量法は広く利用されているが，発色の不安定性，混濁の生成等の欠点は免れなく，実験条件により誤差が大きいとされている。最近横井[10]は Micro-Kjeldahl-Nessler 法の改良法を提案し，2枚のフィルターを使い分けて，好結果を得ているが，著者等はほぼ50γ以内では，上記の条件で満足すべき結果を得ている。

次にたん白態窒素の定量は松本，金光[11]等の魚肉たん白質の定量法に関する研究で，詳細に報告しているが，著者等もほぼ同様な方法によつて，Kjeldahl 法と比較して，0.375mgN/ml までは好結果を得ている。

一方 deaminase の作用力は，今日 Kalckar の方法或はその改良法，即ち基質 AMP の減量を265mμの吸収で測定する方法が専ら用いられている。Schmidt の方法は基質濃度が高い（1%）ことと，反応時間が長い（45分間）ことが難点であると考えられるが，著者等は，主として之等欠点を改良する実験条件を検討し，基質は $^1/_{10}$ の濃度で，また反応時間は10分間で，充分目的を達する方法を見出した。実験結果によれば，至適温度は40°Cであるが，基質濃度と，アンモニヤ態窒素の測定限界を考慮して，反応温度は 30°C とした。S.A.＝NH_3-N（γ）/Pro-N（mg）と規定したが，紫外部吸収による Kalckar の方法の単位と比較すると，1 Unit（by Kalckar）≒10 S. A. の関係にある。反応温度は原報では30°C であるが，この場合は室温（22±1°C）で実施した。その他の実験条件は原報の通りで，吸光度は島津製分光光電光度計を用いて測定した。

要　　約

5′-adenylate deaminase の作用力の測定法として G. Schmidt の方法の改良法を提案した。即ち基質は 2.88×10^{-3}M AMP 2ml；酵素液 1 ml を加え，30°C で10分間反応させ，発生するアンモニヤ量並びに酵素たん白量を測定し，Specific activity として NH_3-N(γ)/Pro-N(mg) を規定した。これによると，Kalckar による 1 単位は大体10（S.A.）に相当している。

文　　献

1) Schmidt, G. (1928). *Z. Physiol. Chem.* 179, 243.
2) Kalckar, H. M. (1947). *J. Biol. Chem.* 167, 461.
3) Nikiforuk, G. & Colowick, S.P. (1956). *Ibid.* 219, 119.
4) Lee, Y. P. (1957). *Ibid.* 227, 987, 993, 999.
5) Lyubimova, M. N. & Fain, F. S. (1958). *Biokhimiya* 23, 318.
6) 斎藤恒行・新井健一 (1957, 1958). 日水誌 22, 569; *Arch. Biochem. Biophys.* 73, 315.
7) Feigl, F. (1954). *Spot test* vol. II, 310p.
8) 江上不二夫外 (1953). 標準生化学実験. 106p. 東京；文光堂.
9) 斎藤正行 (1953). 光電比色計による臨床化学検査. 95p. 東京；南山堂.
10) 横井花子 (1956). 生化学 28, 126.
11) 松本重一郎・金光庸俊 (1955). 日水誌 21, 284.