



| | |
|------------------|---|
| Title | 水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分 : ホタテガイおよびエゾアワビ筋肉中のAMPの分解について |
| Author(s) | 新井, 健一 |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 17(2), 91-98 |
| Issue Date | 1966-08 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/23275 |
| Type | bulletin (article) |
| File Information | 17(2)_P91-98.pdf |



[Instructions for use](#)

水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分 V

ホタテガイおよびエゾアワビ筋肉中の AMP の分解について

新井 健一

V. Acid-soluble Nucleotides in Muscle of Marine Invertebrates Degradation of adenylic acid in the muscles of scallop and abalone

Ken-ichi ARAI*

Abstract

The rates of degradation of AMP, IMP, AdR and HxR added in crude enzyme of the muscle extract of scallop and abalone were studied by ion-exchange chromatographic analysis.

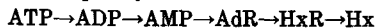
1) On incubating at 37°C, above described substrates were converted as follows: In scallop; 4.50 μ mole of AdR was converted to HxR by 3 minutes at pH 9.7, 3.03 μ mole of HxR to Hx by 5 hours at pH 7.4, no changes of AMP was observed under these conditions. The activity of adenosine deaminase could be strongly observed.

In abalone; 1.86 μ mole of AdR was converted to Ad by 3 hours, 1.91 μ mole of HxR to Hx by 3 hours, no changes of AMP and IMP were observed under these conditions. The enzymatic activity which accelerates the splitting of ribose from nucleoside was barely recognized. No activity of adenosine deaminase was observed.

2) Upon the addition of 5'-nucleotidase in crude enzyme, the rate of degradation of AMP was accelerated. In scallop muscle, the conversion of AMP to HxR was considerably accelerated. In abalone muscle, the conversion of AMP to AdR was remarkable. As a result, it was recognized that the dephosphorylation of AMP was the limiting step in the decomposing pathway of AMP.

3) Effects of Cu^{++} , Hg^{++} and F^- on the rate of degradation of AMP, IMP, AdR and HxR were studied. A comparison was made with the results of squid muscle.

4) From the results described above, the pathway of degradation of ATP in the muscle of scallop may be considered as follows,



and in the muscle of abalone,



著者は前報において、スルメイカ (*Ommastrephes sloani pacificus*) 筋肉についてそのホモジェネートを複合酵素系とみなし基質として AMP, IMP, AdR を反応させた酵素実験の結果から、AMP の分解機構について検討し報告した¹⁾。この実験によって、著者らが以前から提唱していたように水

* 北海道大学水産学部水産化学教室

本報告において使用する略語は前報にならった。

本報告を水産動物筋肉中の有機磷酸化合物に関する研究—第 XVI 報とする。

産無脊椎動物筋肉のうち、従来研究を行ってきた数種の軟体動物、節足動物における AdR を經由する AMP の特異的な分解経路についての推定が正しいことを一層確かめることが出来た。

一般に各種の条件下にある筋肉中の酸可溶核酸成分の動的変化について非常に類似性を示す動物では、ATP の分解経路もまた同じであろうと考えられる²⁾。そこでスルメイカと同じ軟体動物門に属する貝類の中から代表的なものとして、ホタテガイとエゾアワビ筋肉について、スルメイカ筋肉の場合と同様に、筋肉ホモジェネートを調製し、AMP の分解機構を明らかにしようとした。

実 験 方 法

1. 動物試料 実験に供したホタテガイ (*Pecten yessoensis*) およびエゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) はいづれも函館市近海で捕獲されたものであって、生きているものを選んで使用した。

Table 1. The rate of degradation of AMP, AdR and HxR added in crude enzyme of scallop muscle at pH 5.4, 7.4 and 9.7 (μ mole/reaction mixture)

| Substrate | | AMP | | | |
|------------------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Incubation time | | 0 | 6 hr. | | |
| pH | | | 9.7 | 7.4 | 5.4 |
| Reaction product | AMP | 13.10 | 12.44 | 12.96 | 13.00 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HxR | 2.26 | 0.19 | 0.10 | 0.50 |
| | Hx | 2.29 | 4.75 | 4.10 | 3.65 |
| | Total | 17.65 | 17.38 | 17.16 | 17.15 |
| Substrate | | AdR | | | |
| Incubation time | | 0 | 3 min. | | |
| pH | | | 9.7 | 7.4 | 5.4 |
| Reaction product | AMP | 2.49 | 2.45 | 2.30 | 2.40 |
| | AdR | 5.66 | 1.16 | 2.02 | 3.58 |
| | HxR | 1.13 | 6.32 | 5.42 | 3.36 |
| | Hx | 0.68 | 0.65 | 0.62 | 0.68 |
| | Total | 9.96 | 10.58 | 10.36 | 10.02 |
| Substrate | | HxR | | | |
| Incubation time | | 0 | 5 hr. | | |
| pH | | | 9.7 | 7.4 | 5.4 |
| Reaction product | AMP | 2.96 | 3.09 | 2.83 | 2.76 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HxR | 8.90 | 6.60 | 5.87 | 8.36 |
| | Hx | 1.69 | 4.26 | 4.73 | 2.82 |
| | Total | 13.55 | 13.95 | 13.43 | 13.94 |

1. 粗酵素液 ホタテガイ貝柱筋肉およびエゾアワビ斧足筋は出来るだけ迅速に貝殻から筋肉を採取し、スルメイカ筋肉の場合と同様に、等張の 0.55 M KCl の 2 倍量 (V/W) でホモジナイズし、圧濾して粗酵素液とした。

3. 酵素反応 酵素反応については前報に準じたり。すなわちエゾアワビ筋肉ホモジェネートの場合は粗酵素液 5 ml に基質として AMP, AdR, HxR のうち 1 成分 (1.0~2.0 mg/ml) を添加し反応させたが、ホタテガイ筋肉ホモジェネートの場合は粗酵素液 2 ml に基質 1 ml と緩衝液 2 ml を加えた反応混液とした。緩衝液は Borax-NaOH (pH 9.7), Tris-NaOH (pH 7.4), Acetate (pH 5.4) である⁹⁾。また Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, F⁻ の影響を検討する実験では、ホタテガイ、エゾアワビの場合ともに、粗酵素液 5 ml に基質 1 ml と各イオン溶液 1 ml を加えた反応混液とした。反応はいずれも 37°C で行ない 60% HCl, 0.5 ml を添加して中止させた。

4. イオン交換クロマトグラフィー 反応中止後の活性炭処理、試料液の調製、イオン交換樹脂による反応生成物の分析など前報において述べた⁹⁾。

使用した試薬についても前報と全く同じものである。

実験結果

I. ホタテガイ

ホタテガイ貝柱筋肉粗酵素液による AMP, AdR, HxR の分解を検討するにあたり、pH 9.7, 7.4 および 5.4 の緩衝液を使用して実験を行ない、その結果を第 1 表に示した。

この結果によると、AdR の HxR への変化は pH 9.7 では 4.50 μ mole/3 min. で速く、pH 5.4 では 2.08 μ mole/3 min. で遅いが、pH 7.4 ではこの中間値である。HxR の Hx への変化は pH 7.4 では 3.03 μ mole/5 hr. で速く、pH 5.4 では 0.54 μ mole/5 hr. と遅い傾向があるが、pH 9.7 と 7.4 の場合の差はほとんどなかった。なお AMP はこの実験条件下では、どの pH においても分解が見られず、pH 9.7 でわずかに反応が進むように見える程度である。また反応液を使用しない反応は pH 5.4 における反応とほとんど同じ結果を示している。以上述べた 4 種の反応条件における結果には明らかに差異が見られるけれども、AMP, AdR, HxR の各基質の変化速度の相対的な比を考えようとするとときは、AdR が圧倒的に速く、HxR はかなり遅く変化し、また AMP はこの実験条件で

Table 2. Accelerated degradation of AMP in crude enzyme of scallop by the addition of 5'-nucleotidase (μ mole/reaction mixture)

| Substrate | | AMP | | |
|------------------|-------|-----------------|-------|------------------|
| | | Incubation time | 4 hr. | |
| Additions | | | 0 | H ₂ O |
| Reaction product | AMP | 7.35 | 7.37 | 0.25 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 |
| | HxR | 1.04 | 0.20 | 4.54 |
| | Hx | 0.56 | 1.38 | 3.72 |
| | Total | 8.95 | 8.95 | 8.51 |

Reaction mixture: 2 ml, crude extract+2 ml, Tris buffer (pH 8.5)+0.2 ml, additions+1 ml. AMP (7.15 μ mole)

はほとんど変化しないということであってこの結果からホタテガイ貝柱筋肉における AMP の分解経路すなわち AMP→AdR→HxR→Hx を考えだすためには、なんらの疑問をも残さないのである。AMP の分解については、さらに酵素量を倍にしても脱磷酸を行なわせることが出来なかった。しかし、生筋中の AMP は生筋の貯蔵中に分解することが観察されるのであるから⁵⁾、分解に関与する酵素活性は弱くとも存在しているはずであって、この反応が生筋中の AMP の分解経路の律速段階になっていると考えられる。

そこで次に粗酵素液中に 5'-nucleotidase を加えて AMP の分解を速める実験を行ない、第 2 表に結果を示した。

この結果によると、反応液中に含まれる 8.35 μ mole の AMP は 5'-nucleotidase を加えなければ

Table 3. Effects of Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ and F⁻ on the degradation of AMP, AdR and HxR in crude enzyme of scallop (μ mole/reaction mixture)

| Substrate | | AMP | | | | |
|------------------|-------|-------|------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|
| Incubation time | | 0 | 6 hr. | | | |
| Additions | | — | H ₂ O | 0.1 M CuCl ₂ | 0.1 M HgCl ₂ | 1.1 M NaF |
| Reaction product | AMP | 13.40 | 13.02 | 13.18 | 13.38 | 13.20 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HxR | 2.82 | 1.75 | 3.23 | 2.80 | 1.65 |
| | Hx | 0.46 | 1.60 | 0.51 | 0.50 | 1.38 |
| | Total | 16.68 | 16.37 | 16.92 | 16.68 | 16.23 |
| Substrate | | AdR | | | | |
| Incubation time | | 0 | 4 hr. | | | |
| Additions | | — | H ₂ O | 0.1 M CuCl ₂ | 0.1 M HgCl ₂ | 1.1 M NaF |
| Reaction product | AMP | 7.90 | 8.20 | 7.70 | 7.90 | 7.74 |
| | AdR | 8.75 | 0 | 0.52 | 4.60 | 0 |
| | HxR | 2.75 | 7.08 | 11.00 | 6.31 | 6.90 |
| | Hx | 0.50 | 4.45 | 0.60 | 0.50 | 4.14 |
| | Total | 19.90 | 19.73 | 19.82 | 19.31 | 18.78 |
| Substrate | | HxR | | | | |
| Incubation time | | 0 | 6 hr. | | | |
| Additions | | — | H ₂ O | 0.1 M CuCl ₂ | 0.1 M HgCl ₂ | 1.1 M NaF |
| Reaction product | AMP | 7.83 | 7.82 | 7.95 | 7.95 | 7.50 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HxR | 13.35 | 9.20 | 13.18 | 12.69 | 9.68 |
| | Hx | 0.52 | 4.02 | 0.65 | 0.52 | 3.52 |
| | Total | 21.72 | 21.04 | 21.78 | 21.16 | 20.70 |

4時間の反応によって全く変化しないが、5'-nucleotidaseを加えると速やかに分解して HxR へ変化することがわかる。ホタテガイ貝柱筋肉中の AdR-deaminase はかなり強い活性を示しているから、AMP が脱リン酸をうけて生成する AdR はただちに脱アミノをうけて HxR に変化していると考えられる。また HxR から Hx を生成する反応はスルメイカの場合と異なってホタテガイではかなり遅いから、Hx の生成は顕著でないであろう。とにかく、AMP から Hx を生成する反応段階の中で AMP の脱リン酸反応が律速段階になっていることが確かめられた。

次に AMP, AdR, HxR の分解に対する Cu^{++} , Hg^{++} , F^- の影響を検討し第3表に結果を示した。

この実験条件では AMP は分解をうけなかったので、AMP の分解に関しては議論の余地はないが、AdR が HxR に変化する反応においては Cu^{++} が弱い、 Hg^{++} が強い阻害作用を示し、 F^- は無影響であること、および HxR が Hx に変化する反応においては Cu^{++} , Hg^{++} が強い阻害を示し、 F^- が無影響である事実などは、先にスルメイカ筋肉の場合において見られた結果と全く同じ傾向であった。

ホタテガイ貝柱筋肉について行なった以上の実験結果を総合すると、ホタテガイ貝柱筋肉中の ATP は、スルメイカ筋肉における ATP の場合同様に、次の分解経路によって変化すると考えられる。



これらの反応の中で AMP の脱リン酸による AdR の生成が非常に遅いのに対して、AdR の脱アミノによる HxR の生成がきわめて速い事実は、スルメイカ筋肉と共通の現象であった。また各基質の変化に対する Cu^{++} , Hg^{++} , F^- の影響が全く同一傾向であることは、関連酵素系がある程度同じであることを意味しているのではなかろうか。

II. エゾアワビ

エゾアワビ斧足筋肉粗酵素液による AMP, IMP, AdR, HxR の分解について検討し、その結果を第4表に示した。

エゾアワビ粗酵素液は筋肉に本来存在している核酸関連化合物を含んでいる。その含量は AMP, 3.20 μ mole 位であって他の成分は存在しなかった。そこで基質として AMP を少量添加して補充し、IMP, AdR, HxR は本来筋肉中には存在しないためあらたに添加して反応させた。この条件では AMP および IMP は6時間の反応を行なってもほとんど分解されないが、その各々から僅少の Ad および Hx と推定される成分が認められる程度であった。また AdR は3時間に 1.86 μ mole が分

Table 4. Degradation of AMP, IMP, AdR and HxR added in crude enzyme of abalone muscle

(μ mole/reaction mixture)

| Substrate | | AMP | | IMP | | AdR | | HxR | |
|------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | 0 | 6 hr. | 0 | 6 hr. | 0 | 3 hr. | 0 | 3 hr. |
| Reaction product | AMP | 8.73 | 8.50 | 3.30 | 3.18 | 3.29 | 3.28 | 3.19 | 3.15 |
| | IMP | 0 | 0 | 7.58 | 7.40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | AdR | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.26 | 5.40 | 0 | 0 |
| | HxR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.81 | 3.90 |
| | Hx | 0 | 0 | 0 | 0.11 | 0 | 0 | 0 | 1.73 |
| | Ad | 0 | 0.20 | 0 | 0 | 0 | 2.15 | 0 | 0 |
| | Total | 8.73 | 8.70 | 10.88 | 10.69 | 10.55 | 10.83 | 9.00 | 8.78 |

Table 5. Accelerated degradation of AMP in crude enzyme of abalone muscle by the addition of 5'-nucleotidase (μ mole/reaction mixture)

| Substrate | | AMP | | |
|------------------|-------|-------|------------------|-----------------|
| Incubation time | | 0 | 2 hr. | |
| Additions | | — | H ₂ O | 5'-nucleotidase |
| Reaction product | AMP | 11.82 | 11.25 | 1.06 |
| | AdR | 0 | 0 | 7.80 |
| | HxR | 0 | 0 | 0 |
| | Hx | 0 | 0.25 | 2.30 |
| | Total | 11.82 | 11.50 | 11.16 |

Reaction mixture: 5 ml, crude extract+1 ml, AMP (7.00 μ mole)+0.5 ml, additions

解して Ad を生成し, HxR は同じ 3 時間に 1.91 μ mole が分解して Hx を生成することがわかった。すなわち, エゾアワビ筋肉中には nucleotide を脱リン酸する酵素は存在せず, また AdR-deaminase も存在していないことになる。わづかに nucleotide の脱リボースを行なう酵素活性が認められたただけであった。そこで次に反応液中に 5'-nucleotidase を添加して AMP の脱リン酸を促進させてみた。その結果を第 5 表に示した。

すなわち, 5'-nucleotidase が反応液中に加えられないときは, 4 時間の反応によって 11.82 μ mole の AMP のうちわづか 0.25 μ mole が Ad に変化するだけであるが, 5'-nucleotidase が加えられると AMP の大部分は AdR となる。このエゾアワビ筋肉には AdR-deaminase が存在しないため, 生成した AdR はそのまま蓄積しその一部が Ad に変化していた。なお, 添加した基質の分解がきわめて少ないため, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, F⁻ の影響については検討しなかった。

エゾアワビ斧足筋肉について行なった以上の実験結果を総合すると, エゾアワビ筋肉中の ATP は次の分解経路による変化をすると考えられる。

ATP→ADP→AMP

AMP の脱リン酸を行なう酵素および AdR の脱アミノを行なう酵素は存在しないか, または非常に活性が弱いので AMP がさらに分解する傾向はない。ただ, Ad がわづかに生成することが認められ, AMP を基質とするよりも AdR を基質とする場合に多量の Ad が生成することから, おそらく AMP→AdR→Ad の反応が働き, 関連酵素系が残存していることが想像される。

考 察

一般に各種の条件(筋肉の貯蔵または凍結乾燥など)における筋肉中の酸可溶核酸成分の動的変化について, 非常に類似性のある動物では筋肉内の ATP の分解経路もまた同じであろうと考えられる。事実, 前報において述べたスルメイカ (*Ommastrephes sloani pacificus*) 筋肉で認められる分解経路は, 本報告におけるホタテガイ (*Pecten yessoensis*) においても認められることがわかったが, これらと同じであろうと考えられる動物としては, 著者らの経験したものとして, ヤリイカ (*Dory teuthis bleekeri*), ミズダコ (*Polypus dofleini*), アカザラガイ (*Chlamys nipponensis akazara*), ウバガイ (*Spisula sachalinensis*) などがあげられる²⁾。このうち, ウバガイについては筋肉ホモジ

ェネートを使用した予備的実験で、各基質の変化の様子はホタテガイの場合と全く同一傾向の結果を示すことを認めた。これらの動物筋肉では ATP の分解生成物として ADP, AMP, HxR, Hx が量的な差異があるにしても、この順序にしたがって生成する共通の現象が見られるものである。

一方、エゾアワビ筋肉では ATP の分解生成物として ADP, AMP が見出されるだけであって、同じ貝類の中でも独特のものであった⁹⁾。その現象を裏づけるように筋肉中の ATP の分解経路もきわめて特徴的であった。これと同じであろうと考えられるものとしてはアカガイ (*Anadara brough-tonii*) があり、事実筋肉ホモジェネートを使用した予備的実験から同一の結果がえられることを認めた。

このエゾアワビ、アカガイ筋肉の特徴は 5'-nucleotidase または non specific phosphatase および AdR-deaminase の劣化または欠損という事実によって説明づけられるのであるが、この現象は比較生化学的見地からきわめて興味深い問題である。

要 約

ホタテガイ及びエゾアワビ筋肉の粗酵素液による AMP, IMP, AdR, HxR などの基質の変化を、イオン交換クロマトグラフィーによって分析し、検討した。

1) 37°C で反応させると各基質は次のように変化する。

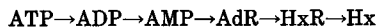
ホタテガイでは AdR→HxR, 4.50 μ mole/3 min. (pH 9.7), HxR→Hx, 3.03 μ mole/5 hrs., この条件では AMP の分解は起らなかった。したがって Adenosine deaminase の強い活性が予想される。

エゾアワビでは AdR→Ad, 1.86 μ mole/3 hrs., HxR→Hx, 1.91 μ mole/3 hrs., この条件では AMP 及び IMP の分解は見られなかった。したがって nucleoside の脱リボースを行なう酵素活性のみが見出され Adenosine deaminase は見出されなかった。

2) 5'-nucleotidase を粗酵素液に添加し、AMP の脱リン酸を促進させる実験を行なった。ホタテガイの場合には AMP から HxR の生成が促進され、エゾアワビでは AMP から AdR の生成が顕著であった。したがって、一連の分解経路のうち AMP の脱リン酸が律速段階になっていることがわかる。

3) 粗酵素液に添加した AMP, IMP, AdR, HxR の変化に対する Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, F⁻ の影響を検討した。この結果をスルメイカの場合と比較した。

4) 以上の結果から、ホタテガイ筋肉中の ATP の分解経路は次のようになると考えられる。



エゾアワビ筋肉では次のようになる。



AMP はこれ以上分解する傾向はほとんどなかった。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始御懇切な御指導を賜わった齋藤恒行教授、および、実験にあたって技術的な御援助をいただいた函館栄養短大田中ツネ講師に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 新井健一 (1966). 北大水産集報 17, 83.
- 2) ——— (1966). 昭和 41 年学位論文 (北海道大学水産学部).

- 3) Gomori, G. (1955). "*Methods in Enzymology*" Vol. 1, p. 138, Academic Press.
- 4) 新井健一・斎藤恒行 (1963). 日水誌 **29**, 168.
- 5) ——— (1960). 北大水産集報 **11**, 67.
- 6) ——— (1961). 同誌 **11**, 225.