HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉の酵素化学的研究－Ⅷ：エネルギー代謝酵素の貯蔵中の活性変化について
Author(s)	柴田, 猛; 中井, 俊雄; 斎藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(3), 217-226
Issue Date	1969-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23396
Type	bulletin (article)
File Information	20(3)_P217-226.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物筋肉の酵素化学的研究—VIII
エネルギー代謝酵素の貯蔵中の活性変化について

柴田　猛・中井　俊雄・斎藤　恒行*

Enzymatic Studies on the Muscles of Aquatic Animals-VIII
Changes in the activities of glycolytic and some energy-metabolizing enzymes during chill and frozen storage

Takeshi SHIBATA, Toshio NAKAI and Tsuneyuki SAITO

Abstract

The present work was undertaken in order to obtain precise information on the behavior of glycolytic and some energy-metabolizing enzymes in marine animal muscles (two kinds of squids: *Doryteuthis bleekeri* and *Ommastrephes sloani pacificus* and rainbow trout: *Salmo gairdneri f. irideus*) under varying conditions of storage method.

1) These enzymes extracted with mannit solution are more stable than that with potassium chloride solution. However, GPDH** and LDH are labile in both cases.

2) During storage of the minced muscle in ice, the activities of glycolytic enzymes decreased gradually as storage periods proceeded on. In the case of storage of fish carcass, no clear trend in the changes of enzymes was observed. GPDH, LDH and the enzymes related to citric acid cycle unexpectedly increased during iced storage.

3) In storage of fish frozen at 20°C, these enzymes were separated into two groups according to the changes of activities compared with those of the first day of storage: one group with an activity change and the other without any change. The activities of glycolytic enzymes decreased and those of citric acid cycle enzymes inversely increased by 20% respectively. PFK is the most labile enzyme for frozen storage, and GPDH and LDH are less.

4) The storage of muscle extract of mannit solution can be stored preferentially for the protection of enzyme activity.

5) The relations between these changes and the observed biochemical changes *post mortem* are still being discussed.

緒　　言

畜肉魚介類の死後について行なわれた研究にはpH変化，解糖中間代謝物，特に乳酸の蓄積や核酸の分解から追跡されている[1)-9)]。この複雑な生化学的変化は当然品質に大きな影響を与えると考えられる。死後においても酵素が作用し，凍結された状態においても酵素作用が認められる[2)]。この酵素

* 北海道大学水産学部生物化学講座
(*Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University.*)

作用が代謝中間物の量を調節するので，死後の酵素活性変化が何か漁獲物の死後の経過に影響を与えると想像される。

従来，魚肉の酵素活性の死後変化を直接測定した例がすくない。また死後変化のうち解糖作用がその多くを占めていることから，解糖系の酵素を含んだエネルギー代謝に関係する酵素の活性変化に興味をもった。

また，われわれは種々の条件下におかれた魚類のエネルギー代謝酵素の活性の変動を研究するために，関連酵素の安定性を知る必要があった。すなわち，試料採取時の生体活性をそのまま維持する保存条件の確立が求められた。

ここでは，抽出液の保存，魚体の氷蔵，および凍結貯蔵における酵素活性の変化を測定し，ある酵素には著しい活性の損失がみられるが，いくつかの解糖酵素とクエン酸回路に関連する酵素は比較的安定であることを報告する。

実 験 方 法

1) **試料** 養殖ニジマス (*Salmo gairdneri f. irideus*) と市販の生きたヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) とスルメイカ (*Ommastrephes sloani pacificus*) を用いた。

2) **酵素液の調製** ニジマスは筋肉部位により活性が異なり，尾部が高いので，新鮮時と保存後の比較は，部位差の少ない背肉を使用した。すなわち，予め冷却した乳鉢で海砂を用いて磨砕する。さらに，9倍量の 0.3 M mannit 溶液 (10 mM triethanolamine+3 mM EDTA pH 7.2) または 0.15 M KCl 溶液 (1 mM EDTA pH 7.2) を加えて充分抽出する。6,000 回 10 分遠心後，上清液をさらに 40,000 回 (105,000×g) で 30 分間超遠心分離する。この上清液を酵素液とする。イカの場合も同様に操作する。抽出はすべて 4°C の冷蔵室内で行なった。なお，超遠心機は日立製の 55 P 型を用いた。

3) **酵素活性の測定** 活性の測定には fumarase と phosphorylase を除いてすべて還元型助酵素の吸収変化に基ずく。PGI**, ALD, TIM, GDH, LDH, MDH, iso-CDH は Delbrueck らの方法[10], GPDH と PGK は Adam 法[11] PFK は Vogell 法[12] HK と GK は DiPitro and Weinhouse 法[13] FDPase は Taketa and Pogell 法[14] ME は Faulkner 法[15] CP は Tanzer and Gilvarg 法[16] を用いた。GPM, EN, PK, MK は Boehringer 社の資料 (Jan. 1961) に従った。緩衝液はすべて triethanolamine 緩衝液 (pH 7.6) を用い，最終濃度を 50 mM にした。活性測定の全容積は 3.0 ml である。なお，GPM は助酵素として，glucose-1.6-diphosphate を Suthaland の報告[17] に基き 10^{-5} M の濃度で加えた。反応温度は 25°C，3分反応を用いた。そのほかに phosphorylase は Sumner and Somers 法[18] で AMP (1×10^{-3} M) の存在で 30°C で測定した。fumarase は Racker 法[19] で室温で測定した。

活性の表示は一時間当りの還元助酵素の変化量から比活性度を求め，即殺直後に抽出された活性の百分率として計算した。340 mμ の吸収は富士工業製 ADS-Fuji-UV メーターを，紫外線の吸収は島津製の光電分光光度計 QV-50 を使用した。

4) **蛋白の測定** 蛋白量は 5% 過塩素酸の沈澱物を 0.2 N NaOH に溶解し 280 mμ の吸光度を求め

** 省略記号：ALD: aldolase, ATPase: adenosine triphosphatase, CP: creatine kinase, EN: enolase, FDPase: fructose diphosphatase, GDH: alfa-glycerophosphate dehydrogenase, GK: glucokinase, GPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GPM: phosphoglycerate mutase, HK : hexokinase, iso-CDH : isocitrate dehydrogenase, LDH : lactate dehydrogenase, MDH : malate dehydrogenase, ME : malic enzyme, MK : myokinase, PFK : phosphofructokinase, PGI : phosphoglucose isomerase, PGK : phosphoglycerate kinase, PGM : phosphoglucose mutase, PK : pyruvate kinase, TIM : triosephosphate isomerase.

係数を乗じて Kjeldahl 法による N-含量に換算した。

5) **試薬**　基質の glucose-1-phosphate[20], glucose-1.6-diphosphate[21], 2-phosphoglycerate[22], phospho-enol-pyruvate[23], ピルビン酸[24] はそれぞれの方法にて調製した。fructose-6-phosphate と fructose-diphosphate の Na 塩，2,3-diphosphoglycerate の Ba 塩，glyceraldehyde-3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate は Sigma 製を用い，NADH, NADP, ATP, ADP, AMP は Boehringer 製，3-phosphoglycerate の Ba 塩は和光純薬製を使用した。活性測定の補助酵素はすべて Boehringer 製を用いた。

試料数は各シリーズとも 3～5 尾をとり，その平均値を比較した。

結　　果

1 抽出液の保存における変化

ヤリイカ筋肉の抽出上清液を 4°C に保存し，その解糖酵素の安定性を示した結果が第1図である。実線は mannit，点線は KCl 抽出を表わし即殺直後の活性を 100% とした。mannit と KCl とは違った性質を示し，一般に mannit が酵素の安定化に効果がある。酵素の種類によって安定度を異にするが，PGI, ALD, GDH にその効果が著しい。これらの酵素のなかで GPDH, LDH は安定性が少く，mannit 溶液でも 50% 程度まで減少する。TIM, PGK, GPM は全く安定である。PFK では貯蔵中に活性の増加がみられるが，この原因は探究中である。KCl 抽出は後に述べるように，PFK 活性が mannit の場合よりも低く，ヤリイカのときには殆ど活性がみられず，貯蔵日数の増加でやっと認められる。

ニジマス筋肉を磨砕抽出したまま，第一回の遠心分離をしない mannit の懸濁液を冷蔵保存（氷中）と凍結保存（−20°）を 24 時間行ない，超遠心分離した上清液について酵素活性を測定した結果が第2図である。酵素の安定性は氷蔵や凍結の保存様式にかかわりなく同じ傾向をもち，PGI, ALD, GPPH に活性低下がみられるが，他の酵素はほとんど安定である。これは後に述べる魚体そのままを保存するよりも抽出懸濁液で保存した方が酵素活性に影響が少ない。特に凍結の場合がそうである。解糖系の key emzyme の変化が抽出液保存で少なくてすむ。抽出上清液の凍結保存では，ALD を除いて，少なくとも一週間保存が出来る。

2 氷蔵保存における変化

第3図はスルメイカ筋肉を肉挽機を通して均一に混合し，4°C の冷室に一週間保存して mannit 抽出を行なった結果である。一般に貯蔵時間の経過とともに活性の減少を示す。GDH, TIM, PGK, EN は減少の度合が小さい。著しい変化は PGM, PFK, ALD, GPM にみられる。異常な変化が GPDH と LDH にみられ，貯蔵期間の増加につれて活性が増加する。この関係は程度こそ小さいがニジマスの場合にもみられる。この原因はわからないが，GPDH が特に構造蛋白に吸着性を示す[25] ことから，構造蛋白の変性によって吸着がとかれたか，あるいは，マスクが除かれたためと考えられる。LDH ではピークがみられたが，GPDH よりはこの効果が少ないためと推定される。

3 Mannit と KCl の抽出効果

第1図に mannit と KCl の抽出の保存効果を示したが，表示がパーセントであるため各酵素の抽出程度が不明であるので，両抽出液の抽出効果をスルメイカについて示したのが第4図である。図には mannit 抽出を 100 として KCl と sucrose の場合を示した。滲透圧的には同じ濃度であるが，特異的な抽出効果がみられるのは GPDH と PFK である。抽出蛋白は mannit と KCl で，88：100 で KCl の方が抽出量が多い。それで見掛上の活性は GPDH と PFK を除いては余り違っていない。sucrose と sorbit の場合は mannit と全く同じである。

GPDH は KCl 抽出で著しく大きい活性を示す。魚種および個体によっても異なり，3～5 倍，と

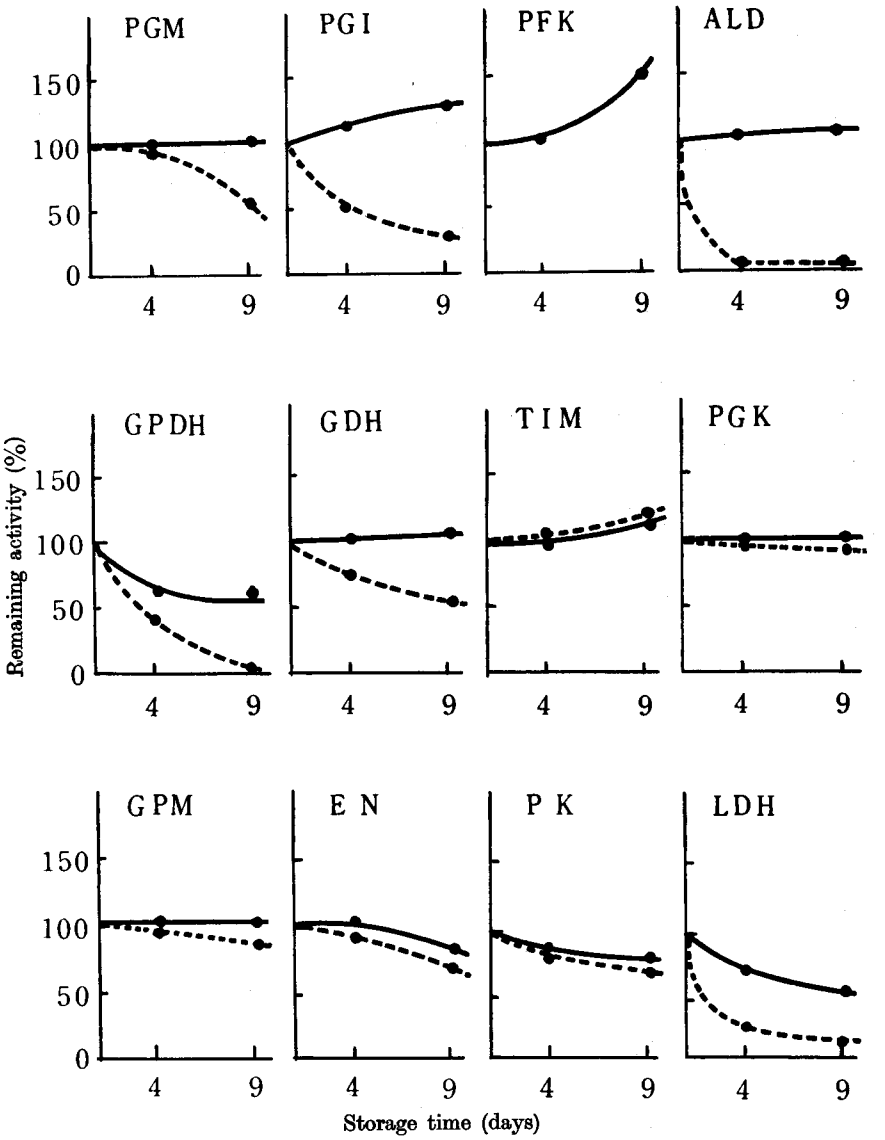

Fig. 1 Changes in the activities of glycolytic enzymes in the squid muscle extract (*Doryteuthis bleekeri*) during stroage at 4°C; expressed as percentage of the activity extracted on the first day; continuous line, 0.3 M mannit solution; broken line, 0.15 M KCl.

きには10倍以上の大きな活性を示す。勿論 KCl だけでは GPDH の活性を促進しない。逆の効果が PFK にみられ，PFK は mannit 抽出の方が，大きな活性を示す。ヤリイカや普通の脊椎魚類では KCl 抽出液に，この活性が認められない。魚では PFK 活性は mannit 抽出でも一般に小さい[26] ので，KCl ではなおさら出にくいと思われる。

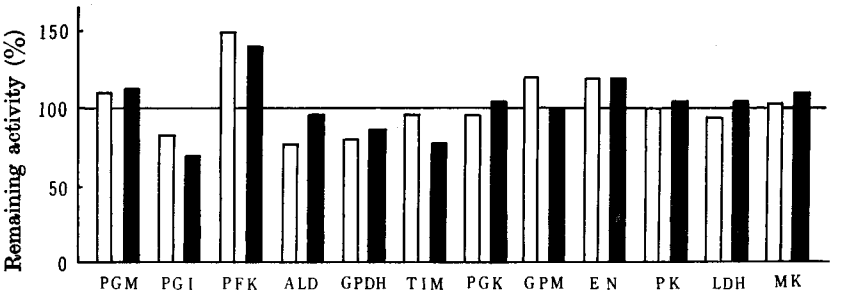

Fig. 2 Effects of chilling and freezing on the activity levels of glycolytic enzymes extracted from the muscle of rainbow trout; extraction medium, 0.3 M mannit; open bar, chill-stroage at 0°C for 24 hr; shaded bar, frozen-stroage at −20°C for 24 hr

4 氷蔵中の抽出効果の変化

前述の抽出効果が保存中にどのように変化するか，肉質の変化が酵素の抽出にどのような影響を与えるかをみるために，ニジマスについて mannit と KCl の抽出変化と酵素の安定性を示したのが第5図である。魚体そのままを貯蔵したものである。mannit 抽出についてイカと同じ傾向を示す酵素は GPDH と LDH で，活性の増加がみられ，PGM，PGK，PK は減少を示す。PGI，PFK および ALD は違った様相をみせる。KCl 抽出は測定点が多いせいか，ややまとまった傾向を示し，PFK，ALD を除いていちように安定性を示している。mannit と並行する酵素として PGM，PFK，PGK，EN があげられるが，PGI と ALD では全く相違する。表面上，KCl 抽出酵素が mannit 抽出より安定な酵素もあり，抽出効果に対して複雑なパターンをみせる。われわれの実験では抽出蛋白量に変化がなかった。いまのところ，イカとニジマスの違い，各酵素の違いか，または保存条件の違いによるものか，その理由は明らかでない。

そのほかにクエン酸回路，糖新生に関するものでは FDPase を除いて mannit と KCl とは並行し，その活性はやや増加気味である。CP も増加の傾向にある。ただ phosphorylase は明らかに減少の傾向にある。これは永山の報告[27] にもみられる現象である。mannit と KCl の抽出効果を明らかにすることが出来なかったが，クエン酸回路に関係する酵素の活性の増加は，酵素の細胞内の局在性を示すと推定される。

5 凍結保存における変化

ニジマスの内臓をとり，そのまま −20°C で保存したときの酵素の安定性を第6図に示した。凍結に対して PGI，GPM，EN，LDH，FDPase が安定性を示した。凍結の特徴として，変化を示す酵素は，凍結直後に約 20% 前後の活性変化をみせ，その後はそのままのレベルを維持する。この活性変化が増加する場合と減少する場合がある。減少する側には解糖系，増加するものにはクエン酸回路，そのほかの酵素が入る。最も不安定なものは PFK で，凍結によって 70% 以上の活性を失う。続いて ALD および GPDH となる。MDH を除いて iso-CDH と ME は活性を増加する。これらの酵素は可溶性酵素に属するものであるが，一部はミトコンドリヤの如き粒子にも存在する。一般に，凍結に対して，酵素は安定性を維持しているようである。

考　　察

死後，筋肉に物理的変化すなわち強直と解硬の現象がみられるが，これに関連して筋肉の溶出変化が調べられている[1)28)-32)]。長期間の凍結貯蔵では蛋白の不溶化が認められるが，短期間の氷蔵中の変

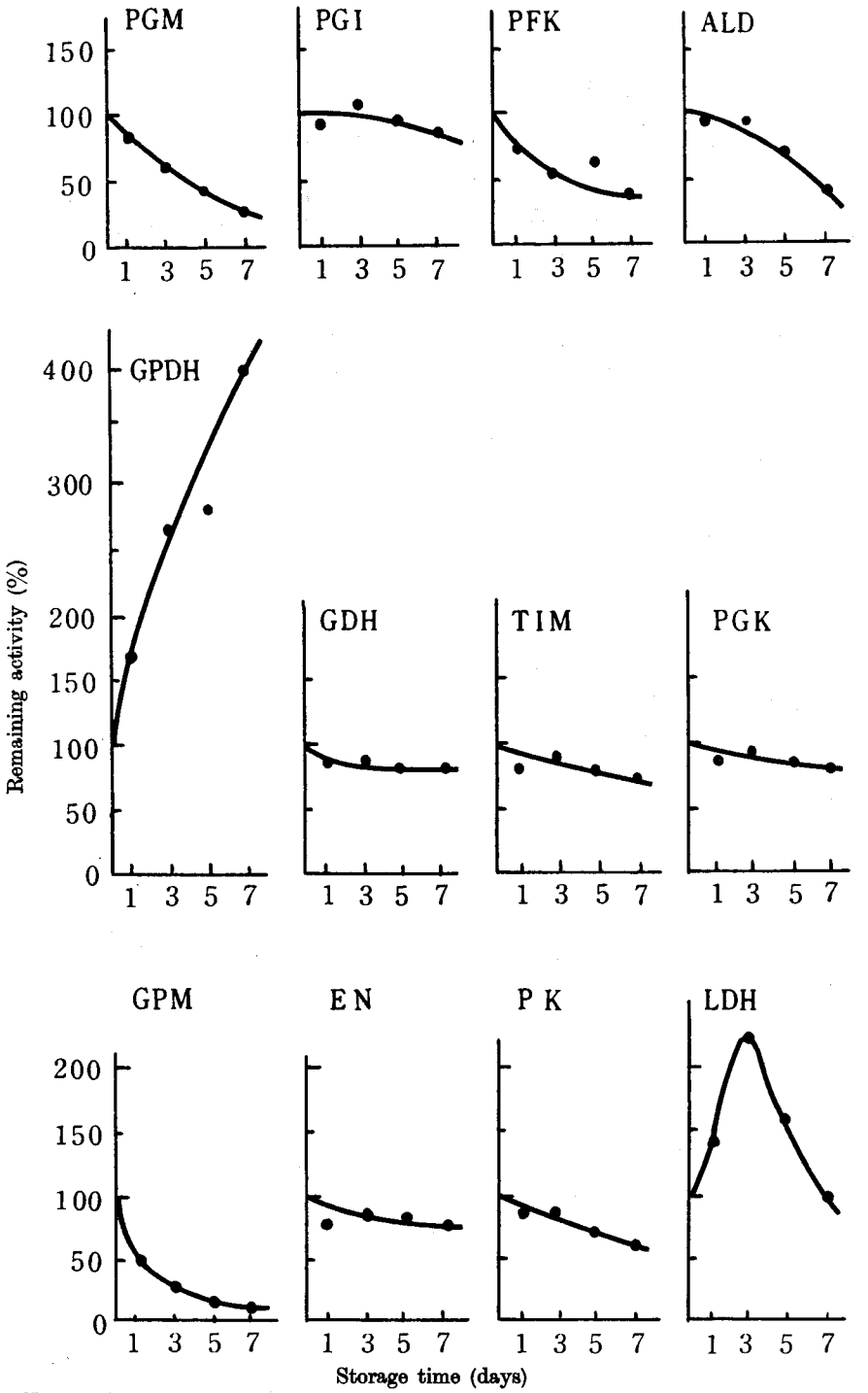

Fig. 3 Changes in the activities of glycolytic enzymes of minced squid muscle (*Ommastrephes sloani pacificus*); extraction medium, 0.3 M mannit

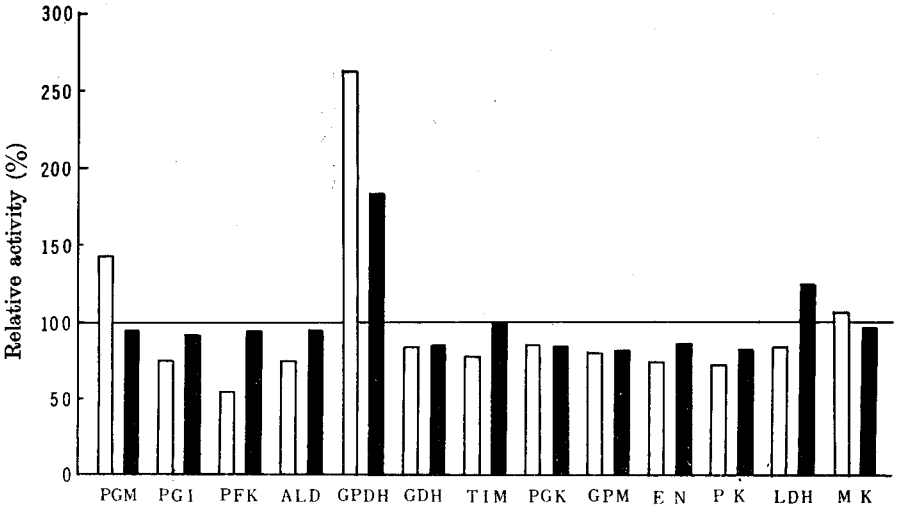

Fig. 4 Influence of the extraction media on the levels of glycolytic enzymes of squid muscle (*Ommastrephes sloani pacificus*); expressed as percentage of the activities extracted with mannit solution; open bar, 0.15 M KCl extraction; shaded bar, 0.3 M surocse extraction

化では筋繊維蛋白や筋漿蛋白の抽出性についていずれも一致した結果が得られていない。同一魚種でも違った結果がみられる。これらの抽出性と解糖作用の関連性を筋繊維の ATPase から論ぜられている[6)7)8)]。Connell[33)] は凍結貯蔵であるが，筋繊維 ATPase の活性損失と蛋白不溶化性とは並行せず，酵素活性の損失速度は蛋白の不溶化速度よりも遅いことを報告している。われわれの氷蔵実験で蛋白抽出量に変化なかったが，活性レベルは酵素により異なり一定の傾向を示さなかったが，二三を除いてほぼ安定ではないかとみられる。第3図と第4図の比較で，イカが一般に活性の低下を示しているが，これは細砕肉と魚体のままの保存の差によるものと思われる。細胞の破壊が原因になり，酵素の安定性に影響する。凍結では，恐らく凍結の直後に蛋白変性によって活性を失うが，その後は一定に維持される。これは凍結中の解糖作用の進行の理由を表明している。貯蔵温度，凍結温度により解糖作用の速度が違い[2)6)33)]，かえって低い温度で解糖作用の速度が大きい例もみられるが，これは酵素の安定性や温度効果よりも基質と酵素との接触に関するいろいろの因子がおもな原因になると推定される。その基質と酵素の接触の速さによって解糖作用の速度が影響される。

死後や凍結によって活性の増加する酵素は，性質としてどこかに結合した，または吸着している結合型と考えられ，おもにクエン酸回路に関係する酵素にみられる。

抽出液保存では mannit が安定化させるが，その理由は明らかでない。しかし mannit の非電解性が水の解離を抑え，酵素蛋白の解離とか，会合を防ぐためと考えられる。また蛋白抽出量の小さいことや，保存状態よりみて変性し易い蛋白の溶出を少なくしている。両抽出液の GPDH の活性の相違も電解質の存在で，構造蛋白への吸着から解放されるという Arnold and Pette[26)] や Starlinger[34)] の説から説明されるかも知れない。

死後における酵素活性や速度の変化は何に帰因するかは，簡単に解決がつかない。酵素の安定性とともに，複雑な関係，すなわち酵素や基質の局在性，構造蛋白や粒子への吸着，阻害剤活性剤または effector の存在，アイソザイムの変化，酵素蛋白構造の変化，自家消化の程度，細胞破壊の度合，生前の生理条件の違い，部位差，個体差などがあり，この問題を一つずつ各酵素について解明されねば

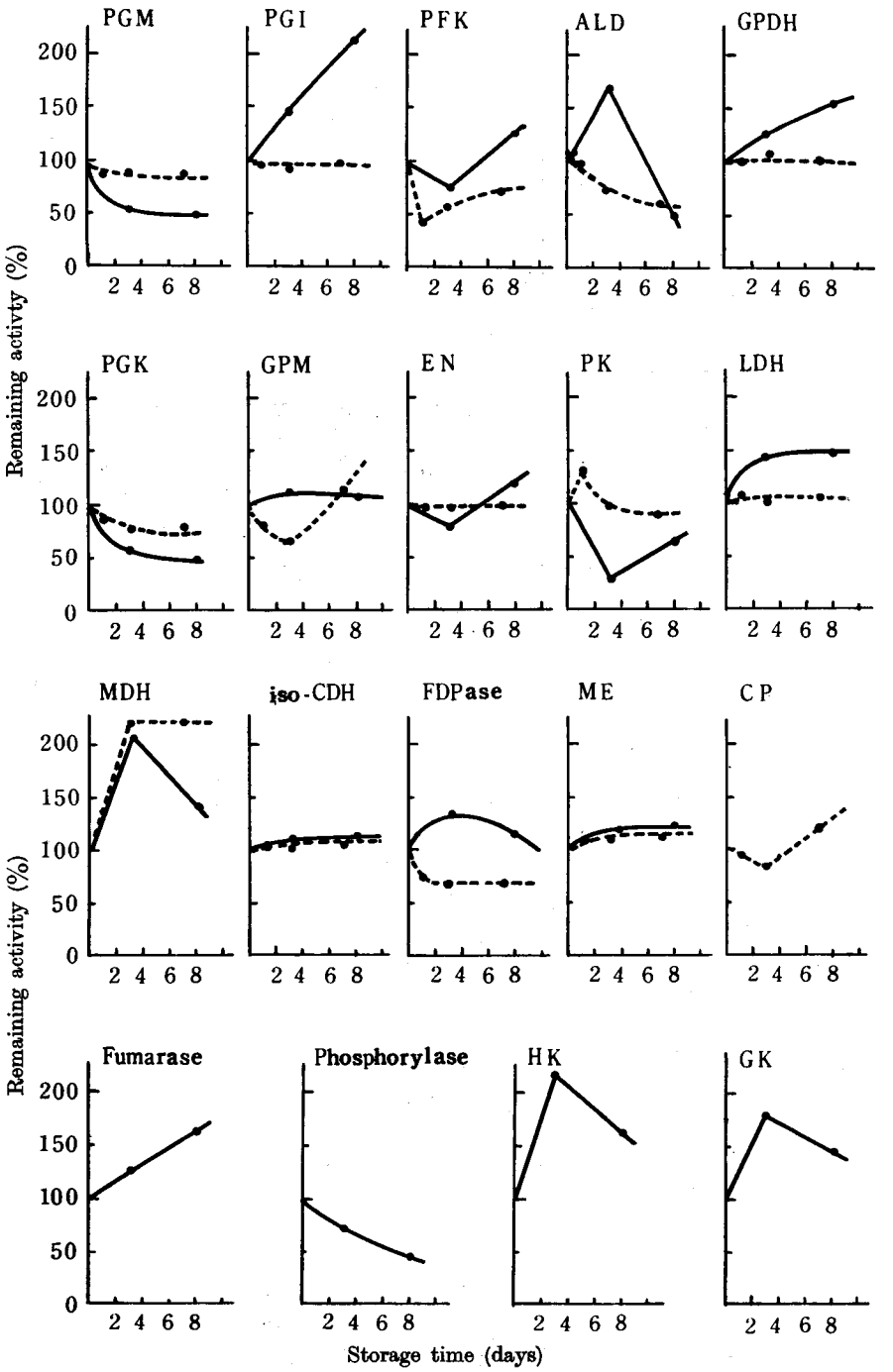

Fig. 5 Changes in the activities of glycolytic and other energy-metabolizing enzymes of rainbow trout muscle during iced stroage; continuous line, mannit extraction; borken line, KCl extraction

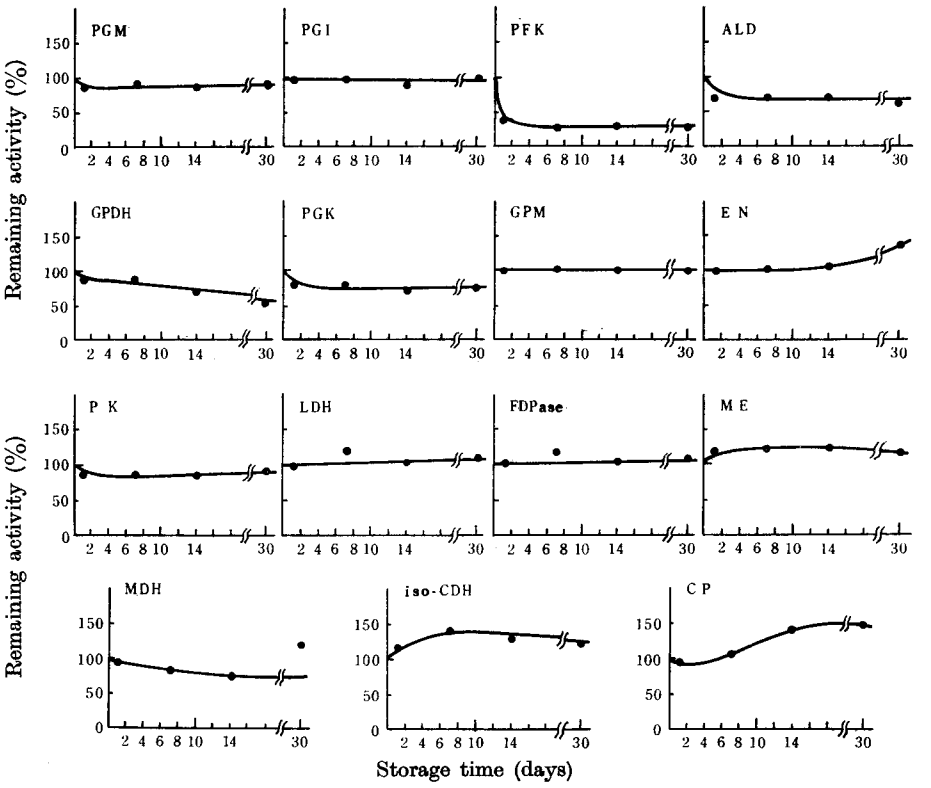

Fig. 6 Changes in the activities of glycolytic and other energy-metabolizing enzymes of rainbow trout muscle during frozen stroage; extraction medium, mannit solution

ならない。

要　　約

解糖酵素を主としてそのほかに二三のエネルギー代謝酵素の貯蔵中の安定性と魚獲物の品質との関連性の追求のためにこの研究を行なった。

1) 抽出液の保存では KCl よりも mannit 溶液が有効である。GPDH, LDH は抽出液の保存で安定性が少ない。

2) 筋肉の氷蔵中の保存では，細砕肉と魚体そのままの状態では異なり，前者では一般に貯蔵期間の増加に比例して減少する。後者の場合は複雑な様相を示し一定の傾向がみられない。GPDH, LDH は増加を，クエン酸回路関係酵素も増加の傾向を示す。

3) 凍結保存では安定な酵素と，凍結直後に活性変化を示し，その後そのままのレベルを維持する酵素群に分類される。後者はさらに活性変化 (20%) が増加するものと減少するものがある。解糖系酵素は減少し，クエン酸回路関連のものは増加を示す。凍結に対して PFK が最も不安定で，ALD, GPDH と続く。

4) 酵素の保存では，組織内にあるよりも，mannit で抽出された形で保存した方が安定性がよい。

5) 死後の生化学的変化と活性変化との関係が考察された。

(本研究の一部は昭和43年度文部省科学研究費によって行なわれた。)

文　　献

1) 右田正男 (1961～2). 日水誌 **27**, 934; **28**, 456.
2) Tomlinson, N., *et al.* (1963). *J. Fish. Res. Bd. Ccnada*, **20**, 1145.
3) Briskey, E. J. (1964). *Advances in Food Research*, **13**, 89.
4) Fraser, D.I., *et al.* (1965). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **22**, 83.
5) Newbold, R.P. & Lee, C.A. (1965). *Biochem. J.*, **97**, 1.
6) Disney, J.G., *et al.* (1967). *J. Sci. Fd. Agric.*, **18**, 314.
7) Newbold, R.P. & Scopes, R.K. (1967). *Biochem. J.*, **105**, 127.
8) Scopes, R.K. & Newbold, R.P. (1968). *Biochem. J.*, **109**, 197.
9) Tarr, H.L.A. (1968). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 1539.
10) Delbrueck, A., *et al.* (1959). *Biochem.* Z., **331**, 273.
11) Adam, H. (1961). *Biochem.* Z., **335**, 25.
12) Vegell, W., *et al.* (1959). *Biochem.* Z., **332**, 81.
13) DiPitro, D.L. & Weinhouse, S. (1960). *J. Biol. Chem.*, **235**, 2542.
14) Taketa, K. & Pogell, B.M. (1965). *J. Biol. Chem.*, **240**, 651.
15) Faulkner, P. (1951). *Biochem. J.*, **64**, 430.
16) Tanzer, M.L. & Gilvarg, C. (1959). *J. Biol. Chem.*, **234**, 3201.
17) Suthaland, E.W., *et al.* (1949). *J. Biol. Chem.*, **180**, 1285.
18) Summer, T.B. & Somers, G.F. (1951). in Sumner, J.B. and Myrbaeck, K. (Editors), *The Enzymes*, **1**, 1030p. New York; Academic Press.
19) Racker, E. (1950). *Biochim. Biophys. Acta.*, **4**, 211.
20) McCready, R.M. & Hassid, W.Z. (1957). in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Editors), *Methods in Enzymology*, **3**, 137p. New York; Academic Press.
21) Leloir, L.F. & Paladini, A.C. (1957). in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Editors), *Methods in Enzymology*, **3**, 143p. New York; Academic Press.
22) Warburg, O. & Christian, W. (1941). *Biochem. Z.*, **310**, 389.
23) Clark, V.M. & Kirby, A.J. (1963). *Biochem. Biophys. Acta*, **78**, 732.
24) 細谷憲政 (1953). 標準生化学実験 565p. 東京. 文光堂
25) Arnold, H. & Pette, D. (1968). *European J. Biochem.*, **6**, 1i3.
26) 斎藤恒行・柴田 猛 (1968). 日本水産学会年会講演 (於日大農獣医学部)
27) 永山文男 (1961). 日水誌. **27**, 1022.
28) Love, R.M. (1958). *J. Sci. Fd. Agric.*, **9**, 609.
29) Connell, J.J. (1962). *J. Sci. Fd. Agric.*, **13**, 607.
30) Scopes, R.K. (1964). *Biochem. J.*, **91**, 201.
31) 鈴木たね子 (1968). *New Food Industry*, **9**, 9.
32) 松本重一郎 (1968). *New Food Industry*, **9**, 11.
33) Connell, J.J. (1960). *J. Sci. Fd. Agric.*, **11**, 245.
34) Starlinger, H (1967). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 864.