HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類筋肉のホスホリラーゼに関する研究：1. ヒメマス筋肉ホスホリラーゼbの精製とその性質について
Author(s)	伊藤, 文能; 柴田, 猛
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 35(2), 83-96
Issue Date	1984-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23851
Type	bulletin (article)
File Information	35(2)_P83-96.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
35(2), 83-96. 1984.

魚類筋肉のホスホリラーゼに関する研究

1. ヒメマス筋肉ホスホリラーゼ b の精製とその性質について

伊藤文能*・柴田　猛**

Studies on Glycogen Phosphorylase from Fish Muscle

1. Preparation and properties of phosphorylase b from skeletal muscle of kokanee salmon

Fumiyoshi ITO and Takeshi SHIBATA

Abstract

Glycogen phosphorylase b (EC. 2.4.1.1.) was isolated from skeletal muscle of kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*, by ammonium sulfate fractionation and DEAE-cellulose chromatography. The crystalline enzyme was shown to be homogeneous by ultracentrifugation and polyacrylamide gel electrophoresis.

The Michaelis constants for glucose-1-phosphate, glycogen and AMP were 12.8 mM, 0.05% and 0.13 mM, respectively. Kinetic studies on the direction of glycogen synthesis showed that at low concentrations of AMP (less than 1 mM), reciprocal plots of the activity of the enzyme for glucose-1-phosphate were clearly sigmoidal, indicating heterotropic cooperation between the binding sites of sugar phosphate and of the activator AMP. Hill coefficients were calculated values of 1.27-1.56.

The enzyme was most stable in the range between pH 6.1 and 7.1 for the incubation time of 15 min at 25°C. The temperature for half inactivation was 45°C when the enzyme was heated in a solution of pH 6.1 buffer for 15 min at various temperatures.

Studies on the effects of cold temperatures on the activity of the enzyme were also undertaken. The results showed the enzyme to be more sensitive to storage at 0° than at 20° C in 0.2 M NaCl containing glycerophosphate-cysteine buffer at pH 6.0, and 90% of its activity lost within 90 min. Upon rewarming it, however, reversal of the inactivated activity was not observed in the kokanee salmon enzyme.

It was shown that the catalytic properties of the salmon enzyme are similar to those of rabbit muscle, but that the enzymes differ with respect to the stability of the enzyme protein. The possible role of phosphorylase in post mortem degradation of glycogen in fish muscle was also discussed.

筋肉の解糖作用はグリコーゲンの分解にはじまり，乳酸の生成につながる。glycogen phosphorylase (EC : 2.4.1.1.) はグリコーゲン分解の最初の反応を触媒する酵素である。筋肉の phosphorylase には，a 型と b 型の二つのタイプがあり，a 型は活性型と呼ばれ，AMP の存在の有無に拘らず

* 厚岸水産高等学校 (*Akkeshi High School of Fisheries*)
** 北海道大学水産学部生物化学講座 (*Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

活性を示し，b 型は不活性型と呼ばれ，AMP が存在しないと活性を示さない。a 型は収縮筋に，b 型は休止筋に存在し，筋肉が運動するときに，b 型が ATP と Mg^{2+} と phosphorylase kinase によって a 型に転換活性化されて，グリコーゲンを分解して解糖作用を促進する。そして酵素の a 型と b 型との存在比が活性の調節を行い代謝調節の役目をする。

魚の死後の変化において，phosphorylase は必ずしもすべてのグリコーゲンの分解に関与していない。すなわち，グリコーゲンの半分は phosphorylase による解糖作用をへて分解されるが，他の半分は amylase の作用によるとされている[1]。しかし，生きているときの筋肉の収縮においてはグリコーゲンは完全に phosphorylase によって分解される[2]。従って，魚の死後における変化と生存時の変化との間には何らかの酵素作用に影響する因子が存在するのでないかと考えられる。死後，生体は恒常性を失い調節能が変化し代謝物質量が生きている元の状態とは違ってくる。漁獲時の苦もん死等の生理条件や生育した環境条件の違いにより，代謝物とその量は相当に影響をうける。生育環境が飼料，水温，生理条件などで変化するときに，生体内には，恒常性の維持に多様な代謝調節機能をもっており，この調節機構を酵素レベルの面から追跡するには，この phosphorylase が調節酵素である点最も適当な酵素の一つであると考えられる。その環境条件の変化に対応してホルモン調節，自律神経調節や代謝物により酵素活性を増減させる酵素だからである。この酵素の諸性質を究明することは，筋肉の解糖系にも依存する死後の肉質変化に対して有効な知見が得られよう。

筋肉の glycogen phosphorylase はウサギから Cori ら[3] により始めて分離され，種々の諸性質が報告されている[4]。さらにヒト[5]，ラット[6] から，変温動物としてロブスター[7]，ツノザメ[8]，メジロサメ[9] から分離されている。硬骨魚類ではスズキ[10]，ニジマス[11] からの酵素について報告されている。しかしながら，その精製について必ずしも純品でなく性質について十分に研究し尽くされていない。

本研究室において，ヒメマス筋肉の phosphorylase の季節的変動を知る目的で酵素活性を測定したところ，total phosphorylase 活性（a+b）は殆ど一定で，しかもほとんど不活性の b 型で存在すること，また活性レベルが解糖系の他の酵素レベルと比較出来るほど高いことを知った。しかし a 型と b 型の活性比による調節能に目立った変化がなかった。生体内において a 型と b 型との間の転換が重要な調節の役目をしているので，魚類においてこの調節能と生理的関係を知るためには，b 型より a 型の転換またはその逆反応の機構を研究する必要があり，それらの反応を触媒する phosphorylase kinase や phosphatase の関与するグリコーゲン分解代謝の詳細を知らねばならない。この目的のために，これらの反応の基本の基質となる phosphorylase b をヒメマス筋肉から精製したので，精製法とその二三の酵素学的性質についてここに報告する。

実 験 方 法

試料　養殖ヒメマス（kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*）を使用した。北海道さけ・ます孵化場森支場で配合飼料（日本配合飼料 K.K. マス用ペレット）により飼育された三年魚である。

即殺後，頭部，内臓を除去し，アルミホイルで包みドライアイスで急速凍結させて −20℃ で凍結保存し適時使用のとき解凍して筋肉を採取した。

試薬　グリコーゲンは半井化学薬品 K.K. 製のカキグリコーゲンを Dowex-1（Cl^-）カラムを通して，核酸類を除去し，Somogyi 法[12] に従って精製した。グルコース 1-リン酸二カリウム塩(G1P)とアデノシン 5′-モノホスフェート二ナトリウム塩(AMP)はベーリンガーマンハイム社製を用いた。なお G1P の純度は酵素法[13] で調整した。その外の試薬は市販品の特級品を用いた。

活性測定法　酵素活性の測定はグリコーゲン合成方向に Shimazu and Amakawa 法[14] を用い

AMP の添加で phosphorylase b 活性とした。phosphorylase a は魚の抽出液には全く含まれていない。活性組成液は, 0.05 M クエン酸緩衝液(pH 6.1), 1% グリコーゲン, 0.05 M G1P, 2.5 mM EDTA, 0.025 M 弗化ソーダと 1 mM AMP と酵素液を加えて全容を 1 ml とした。希釈緩衝液として 2 mM トリス-1 mM EDTA-1 mM β-メルカプトエタノール (pH 7.0) を使用し, 酵素液を 3～5 分間 preincubation した後, 50 μl を活性組成液に添加し反応を 25°C で 5 分間行った。次いで予め冷却した 16% トリクロル酢酸 1 ml を吹き込んで反応を停止させ氷中におき, 15 分以内 (この時間を過ぎると酸により G1P が分解する)に 1 ml をとり, 遊離した無機リンを高橋法[15] で測定した。酵素活性の 1 単位を 25°C, pH 6.1 で 1 分間当りに基質 G1P から 1 μmole の無機リンを遊離する酵素量とした。

蛋白質量の測定法 蛋白量は Biuret 法[16] を用いた。標準蛋白として牛血清アルブミン(Pentex, Miles 製)を用いた。カラムクロマトグラフによる溶出蛋白質量は 280 nm の吸収をモニターした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 デスク電気泳動は 7.5% 標準ゲルで Ornsteine and Davis 法に基づいた永井法[17,18] に従って行った。蛋白染色はアミドブラックを用いた。活性染色には Davis らの硫化鉛法[19] によった。SDS 電気泳動は Weber and Osborn 法[20] に従った。ゲル濃度は 5% を用いた。染色には, コマジー・ブリリアントブルーを用いた。

超遠心法 超遠心沈降パターンは Beckman Model L2-65B 超遠心機とそれに附属した Schlieren optics accessory を用い 52,000 rpm で 20°C の条件[6] で得た。

カラムクロマトグラフ法 DEAE-セルローズは Whatman DE-32 を用い 2 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化しておく。このセルローズを 3.5×30.5 cm のカラムに充填し, さらに冷室で十分に平衡化した。溶出を 2 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) を initial buffer, 40 mM トリス緩衝液 (pH 7.5)を final buffer として各々500 ml で直線勾配法によって行った。すべての操作は 4°C の冷室にて行った。

実 験 結 果

精製法 凍結ヒメマス試料を室温で半分解凍して魚皮, 血合肉, 骨を取除いた筋肉をミートチョッパーに 3 回かけて細砕し 2 倍量 (v/w) の予め冷却した蒸溜水で冷室で 30 分間攪拌抽出した。3,800×G 30 分間遠心分離し, 上清液をセライト濾過して透明な濾液を得た。これに 0.2 M EDTA (pH 7.0) と 10 mM ディチオスライトール (pH 7.0) を攪拌しながら終濃度をそれぞれ 10 mM と 1 mM になるように加えてさらに 30 分間攪拌して抽出液とした。次に固形硫安を加えて

Table 1. Purification profile of phosphorylase b from muscle of kokanee salmon*.

Fraction	Volume ml	Protein mg/ml	Activity unit/ml	Total		Specific Activity unit/mg	Yield %
				Protein mg	Activity unit		
Crude extract	495	19	60	9,405	29,700	3.2	100
Ammonium sulfate fraction, 50% saturation	35	24	408	840	14,280	17	48
DEAE-cellulose column Chromatography	10.5	13	316	137	3,326	24	11

* For the preparation 210 g of salmon muscle were used

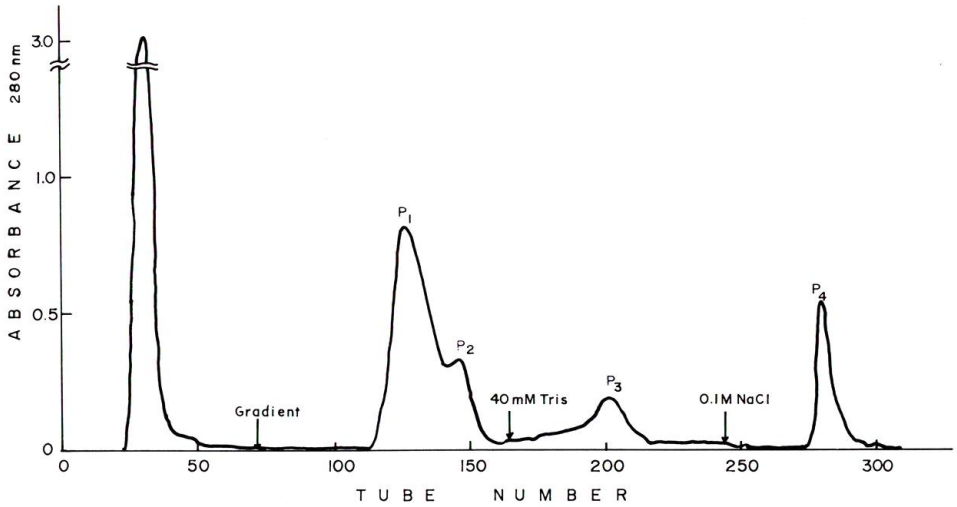

Fig. 1. Elution pattern of kokanee salmon muscle phosphorylase b from a DEAE-cellulose column (3.5×30.5 cm) equilibrated with 2 mM Tris-1 mM EDTA-1 mM β-mercaptoethanol buffer (pH 7.5).
The 50% ammonium sulfate fraction dialyzed against the above same buffer was applied to the column. Initial buffer of the above same buffer and gradient buffer of 40 mM Tris-5 mM β-mercaptoethanol (pH 7.5) were used. One fraction: 12 ml. Flow rate: 36 ml/hr.

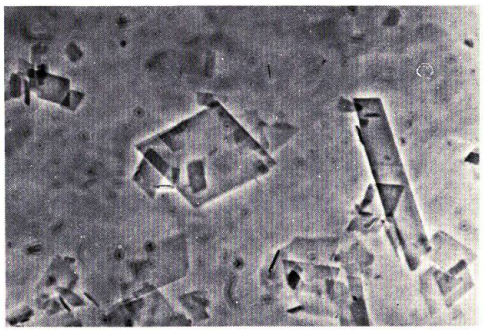

Fig. 2. Crystalline phosphorylase b from muscle of kokanee salmon.

50% 飽和にして一夜放置する。沈殿を 3,800×G, 30 分間の遠心分離で集め，2 mM トリス-1 mM EDTA-1 mM β-メルカプトエタノール（pH 7.5）溶液の少量に溶解し，同緩衝液で 2 日間透析した。不溶性の沈殿を 2,800×G, 30 分間と 87,000×G 30 分間遠心分離して除く。この上清液を 2 mM トリス緩衝液 pH 7.5 で予め平衡化してある DEAE-セルローズカラムに添加した。同緩衝液で非吸着の不用蛋白を十分に流し出し，0～40 mM トリス緩衝液（pH 7.5）の直線勾配法を用いて酵素を溶出させる。第 1 図に典型的な溶出パターンを示した。溶出される蛋白区分と活性区分が一致した。まず活性ピーク P_1 と P_2 が勾配法で溶出される。さらに 40 mM トリス緩衝液 pH 7.5 を流すと活性ピーク P_3 が溶出され，P_1, P_2, P_3 はそれぞれ同じ程度の比活性度を示した。この後，0.1 M の NaCl を含む 40 mM トリス緩衝液（pH 7.5）でイオン強度を上げると比活性度の低い P_4 が溶出

される。P_1 から P_3 の各区分を集め，硫安濃度を 50% 飽和に添加して沈殿を集め，出来るだけ少量の 0.3 M マンニット溶液 pH 7.5（10 mM トリエタノールアミン，3 mM EDTA, 5 mM β-メルカプトエタノール，10 mM 酢酸マグネシウムと 1 mM AMP を含む)に，溶解し，硫安を少量ずつ添加すると結晶化がおこる。第 2 図にはその結晶形を示したが，薄い菱形の板状結晶となった。ま

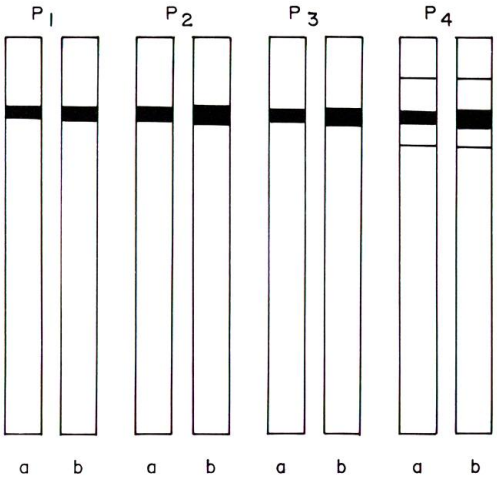

Fig. 3. Disc gel electrophoresis of kokanee salmon phosphorylase b eluted from DEAE-cellulose column.
Gels were stained for protein. Protein of each fraction (see in Fig. 1) was applied. a) : 25 μg : b) : 50 μg.

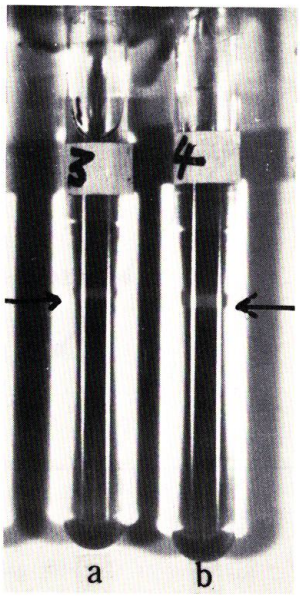

Fig. 4. Disc gel electrophoresis of kokanee salmon phosphorylase b for activity staining.
Protein from P_1 (see in Fig. 1) was applied. a) : 25 μg : b) : 50 μg.

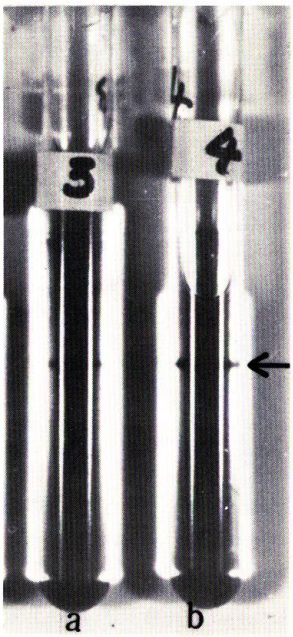

Fig. 5. SDS gel electrophoresis of kokanee salmon phosphorylae b. Protein from P_1 (see in Fig. 1) was applied. a) : 5 μg ; b) : 10 μg.

た精製法の要約を第1表に示した。50% 硫安飽和沈殿区分に最初の抽出液に存在した全活性の48% が回収され，比活性度の比較で 5.3 倍に精製された。最終的にカラムクロマトグラフィーで11% の回収，7.6 倍に精製された。結局，ヒメマス筋肉 210 g から比活性度 24 unit/mg の精製酵素 140 mg を得ることが出来た。ヒメマス酵素の比活性度を他の起源のものと比較するために30℃ で測定したときの値に換算すると 27 unit/mg となる。ロブスター 62[7]，ツノザメ 60[8]，メジロザメ 70[9]，ウサギは 60 unit/mg 前後と報告されている。これらの値と比較するとヒメマスの値はかなり低かった。結晶酵素を硫安懸濁液のまま冷蔵庫に保存した。使用するときは適当な緩衝液に溶解し，硫安や AMP の除去を必要とするときは，透析，セフアデックスカラムか活性炭処理を行った。

均一性の検討　得られた酵素標品が均一な成分からなるかどうかをデスク電気泳動法により検討した。pH 8.3 の 7.5% 分離ゲルを用い，DEAE-セルローズカラムから溶出した P_1—P_4 区分(第1図を参照）の試料を泳動させた結果を第3図に示した。同じ比活性度を示した P_1, P_2, と P_3 の各区分の蛋白は単一成分で同じ泳動パターンを示したが，比活性度の小さかった P_4 区分は，P_1—P_3 区分のバンドに相当する主成分の外に，その上下の位置に薄いバンドが一本ずつ認められ合計三種類の蛋白を含んでいた。また活性染色法による酵素の位置は P_1—P_3 区分の蛋白バンドと一致した。第4図にその結果を示した。P_4 区分の主成分のバンドが活性バンドと一致した。

本酵素のサブユニット成分が均一かどうかを SDS 電気泳動法で検討した。すなわち，酵素を β-メルカプトエタノールの存在下で SDS により変性させてサブユニットに分離した。その結果は，第5図に示したように，P_4 区分を除いた各区分はともに単一のバンドとなり，SDS 電気泳動法によっても本酵素は単一の成分であることが示された。

さらに，本酵素が分子量的に均一な成分からなるかどうか超遠心法により検討した。酵素濃度を 0.7% にしたときの泳動図を第6図に示した。図から明らかのように，単一の対称的なピークを

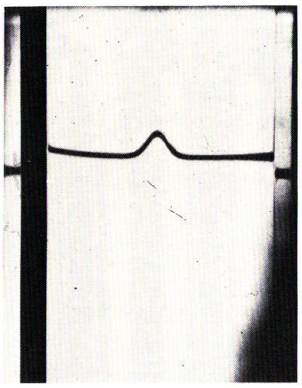

Fig. 6. Sedimentation pattern of phosphorylase b from muscle of kokanee salmon in 0.15 M NaCl containing 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM EDTA and 50 mM β-mercaptoethanol (pH 7.0).
The picture was taken after 60 min at 52,000 rpm. Migration is from right to left. Temperature was 20℃. Protein concentration: 7 mg/ml.

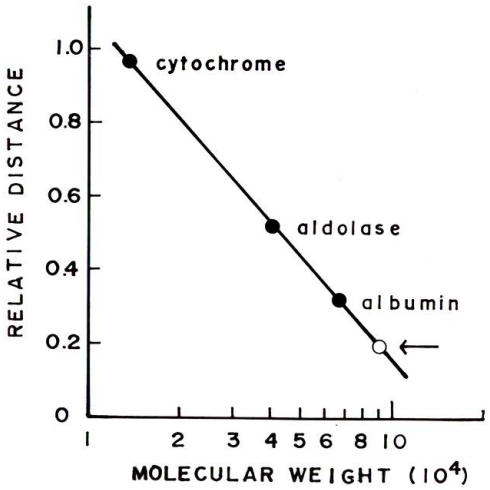

Fig. 7. Calibration of the SDS gels with marker proteins. The arrow denotes the position at which kokanee salmon phosphorylase b was located. The marker proteins used were cytochrome (13,500), aldolase (39,500) and serum albumin (67,000).

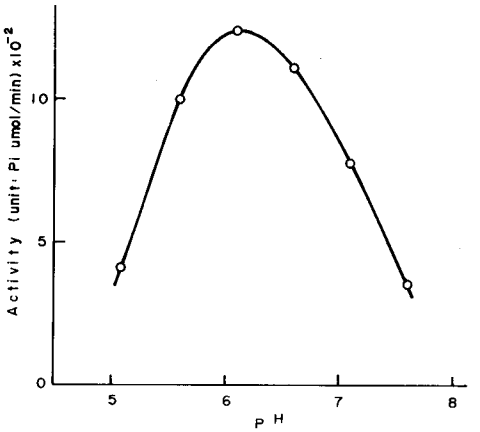

Fig. 8. Optimal pH of phosphorylase b from kokanee salmon muscle.

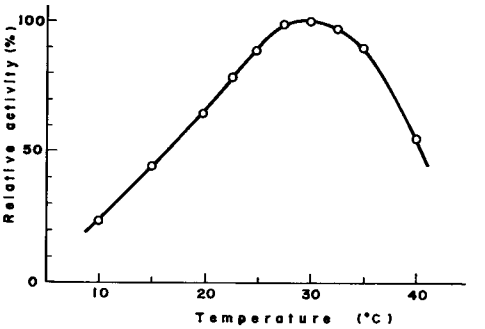

Fig. 9. Optimal temperature of phosphorylase b from kokanee salmon muscle.

示していることから超遠心的にも精製された標品であると確認された。

サブユニットの分子量の測定 単一の成分なることが判明したので，SDS 電気泳動法によりサブユニット成分の分子量を測定した。標準蛋白の分子量とその移動度からの検量曲線を用い，その結果を第 7 図に示した。ヒメマス酵素のサブユニット成分の分子量はその移動度から 92,000 と測定された。この値は，ウサギで報告された値(91,000)[21] と略々一致し，ウサギのそれと類似していることが示唆された。

吸収スペクトル 本酵素のリン酸緩衝液(pH 7.4)中の紫外線の吸収スペクトルを測定したところ，288 nm に肩をもち，280 nm に極大の示す吸収曲線が得られた。また蛋白濃度を増加(10 mg/ml) することにより，333 nm に極大のピークがみられ，ピリドキサールリン酸を含む典型的な phosphorylase の吸収スペクトルを示した。280/260 nm の吸光度比は，1.51～1.78 で，活性炭処理により，この比は 2.10 に近づく。

触媒的性質 1. 至適 pH 酵素の硫安懸濁液の一部を 5 mM EDTA-1 mM β-メルカプトエタノール (pH 7.0) に溶解し供試酵素液とした。活性組成液の pH を 0.1 M クエン酸緩衝液で 5.1-6.6 の範囲に，0.1 M トリエタノールアミン緩衝液で pH 7.1-7.6 の間に調節し 25℃ で活性を測定した。結果を第 8 図に示した。典型的なベル型の曲線が得られ，至適 pH は 6.1 であった。ウサギ[5]，ヒト[5] では至適 pH は 6.35-6.75 であり，ヒメマスの場合やや低い pH であるが，類似した値であった。

2. 至適温度 pH 6.1 の活性組成液を用い，5 分反応後の最大活性を示す温度を求めた。第 9 図に示したように，至適温度は 30℃ であった。反応温度が 25℃ のときは，最大活性の 90% の値を示した。温度係数 Q_{10} を求めると，10°-20°C の間では 2.9, 15°-25°C では 2.0, 20°-30°C の間では 1.6 であった。温度係数が低温になる程大きくなり，比較的低温に生息する魚類酵素の特徴を示している。

3. Michaelis 恒数 (Km) phosphorylase b 活性に及ぼす因子として G1P とグリコーゲンの二つの基質と活性剤として AMP が挙げられる。この三者の Km を測定し，相互関係を検討した。

AMP とグリコーゲン濃度をそれぞれ 1 mM と 1% にして，G1P の濃度を 5-100 mM の間で反応

速度を測定し，これを Lineweaver-Burk の式に従ってプロットした。その結果を第 10 図に示した。プロットが直線になったことから，Michaelis-Menten の飽和曲線に従うことを示した。グラフ上から Km を求めると，12.8 mM となった。この値は他の生物種の値と似ており，ウサギ 15 mM[8]，ツノザメ 24 mM[8]，メジロサメ 10 mM[9] と報告されている。

つぎに，G1P と AMP 濃度をそれぞれ 50 mM と 1 mM と一定にして，グリコーゲン濃度を 0.025-2.0% の範囲で測定した。その結果を第 11 図に示した。典型的な Michaelis-Menten の飽和曲線を示す直線が得られた。1% の濃度で最大速度に達する。グラフ上から Km を求めると 0.05% となり，ウサギ 0.02%[8]，ツノザメ 0.12%[8]，メジロザメ 0.02% (0°C) 0.05% (30°C)[9] と他動物種の値と類似していた。

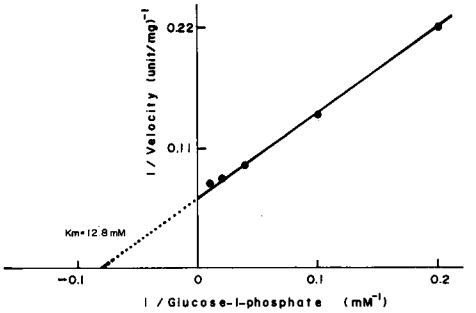

Fig. 10. Double reciprocal plot of the velocity of phosphorylase b from kokanee salmon muscle for glucose-1-phosphate concentrations.

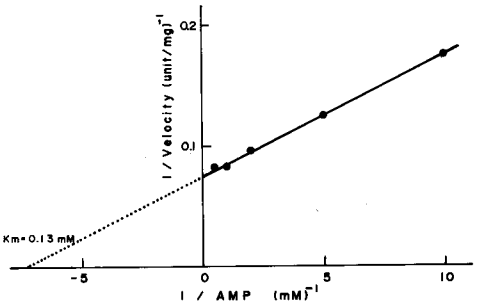

Fig. 11. Double reciprocal plot of the velocity of phosphorylase b from kokanee salmon muscle for glycogen concentrations.

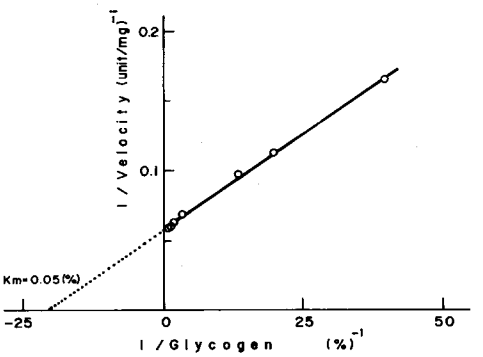

Fig. 12. Double reciprocal plot of the velocity of phosphorylase b from kokanee salmon muscle for AMP concentrations.

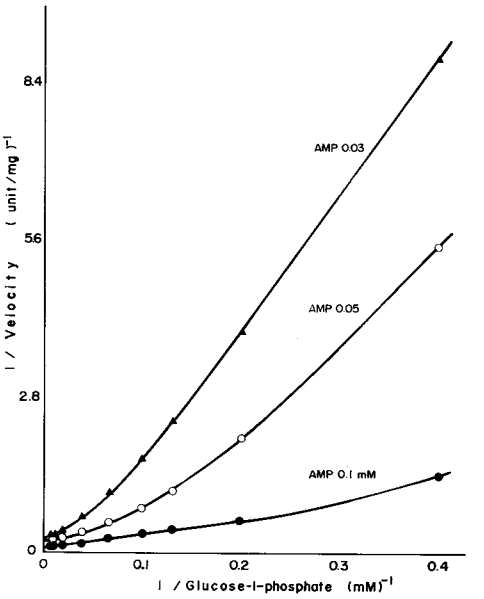

Fig. 13. Influence of AMP on the kinetics of glucose-1-phosphate for phosphorylase b from kokanee salmon muscle.

AMP は phosphorylase b の活性発現に必須のものである。グリコーゲンと G1P を 1% と 50 mM とそれぞれ一定の濃度にとり，AMP 濃度を 0.1-2.0 mM の範囲で測定した。前と同様に両逆数プロットから求めた結果を第 12 図に示した。プロットはほとんど直線になり Michaelis-Menten 型の飽和曲線を示した。このグラフから求めた Km は 0.13 mM であった。この値は他の起源のものと比較し得るもので，ウサギ 0.14 mM[8]，ツノザメも 0.14 mM[8] と報告されている。

phosphorylase はアロステリック酵素で，基質や代謝物または影響因子の結合により酵素を構成しているサブユニットの間に相互作用を生じ，基質飽和曲線が S 字型になり，協同性の特徴を示すと報告されている[22]。しかし，ここで述べた結果はすべて直線的関係になり協同的な作用の証拠がみられなかった。これはその条件において，他の基質がすべて飽和されている状態にあったためと考えられる。また生体内でもおそらく十分な基質濃度が存在することが少ないことから，G1P と AMP の相互の濃度を変化させてその関連性を検討した。酵素液をセファデックス G-25 カラムで処理して AMP を除去した試料を用いた。AMP 濃度を 0.03, 0.05 と 0.1 mM として G1P 濃度を変えて測定した。その結果を第 13 図に示した。0.1 mM AMP で得られた直線に近い関係から，AMP 濃度が小さくなるに従い曲線がジグモイド型になった。AMP と G1P との関係が heterotropic であることを示している。グラフから得られた最大速度値を用いて Hill 式から求めた n の次数を第 14 図に示した。図には 1 mM の AMP のときの値も加えてある。AMP 濃度が 0.03, 0.05, 0.1 および 1 mM のときの n の値は 1.56, 1.33, 1.28 と 1.27 となった。AMP の濃度の低いときに G1P との相互作用が強く，G1P の酵素に対する親和力が小さくなる。AMP の増加につれて相互作用も弱くなり G1P の親和力も増加し，反応は Michaelis-Menten 型に近づいた。また最大速度も AMP 濃度の増加により大きくなった。これらの n 値もウサギに報告されている n=1.6-1.2[22] の値とよく一致していた。

これまで述べた本酵素の触媒的な諸性質は他の起源のそれとよく類似すると推定された。

酵素の安定性 酵素の安定性は生理的には，たとえば魚の変温動物として環境温度への対応性に関して重要な因子となる。また魚の保存貯蔵の実際的な面では，安定性の高い酵素程残存する率も高く，魚肉の品質に影響する機会が多くなる。phosphorylase が解糖系の最初の酵素として作用し乳酸の蓄積に影響を与える因子となる。このようなことから，本酵素の pH と温度に対する安定性を検討した。

まず，硫安懸濁液の一部を 5 mM EDTA-1 mM β-メルカプトエタノール（pH 7.0）に溶解した酵素液を試料として pH に対する安定性を検討した。pH の異なる各種類の 0.05 M 緩衝液に対して 1/10 容の酵素液を加え，25℃ で 15 分間 preincubation した後に，氷中で低濃度の塩酸または水酸化ナトリウムで中和して活性を測定した。preincubation 用の緩衝液にはクエン酸(pH 4.1-6.6)，トリエタノールアミン（pH 7.1-9.1）を使用した。その結果を第 15 図に示した。図にみられるように安定な pH 域は 6.1-7.1 の狭い範囲にあった。解糖作用が進行して筋肉の pH 5.4 以下になると解糖系の酵素作用が停止すると報告されているが[23]，この説明に phosphorylase の pH に対する不安定性がその一因に挙げられるかも知れない。

つぎに温度安定性を検討するために，前項のように調製した酵素液を 0.05 M クエン酸緩衝液 pH 6.1 に加え，各温度で 15 分間 preincubation した後，氷冷し，沈殿が生成した 45°-50°C の試料を遠心分離して沈殿を除きそれぞれの残存活性を 25°C で測定した。その結果を第 16 図に示した。沈殿を生成しはじめた 45°C で活性が 1/2 に低下し，50°C では完全に失活した。他の起源の phophorylase の熱安定性の報告は見当らないが，本研究室で，同じヒメマスから精製した他の解糖系酵素の aldolase と glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase の熱安定性とほとんど一致した。

一般に酵素は 0°C に近い低温においては安定であるが，phophorylase は 0°C で不活性化することが，ウサギ[24] とロブスター[7] において報告されている。比較的低温に生息する魚類にもこの特

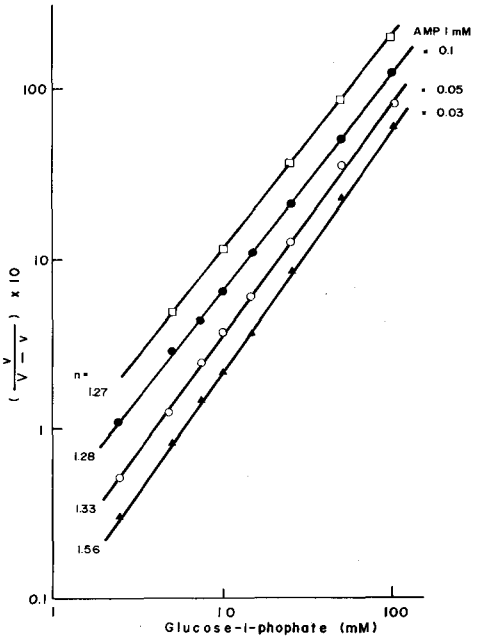

Fig. 14. Hill plot of the binding of glucose-1-phosphate to phosphorylase b in the presence of AMP.

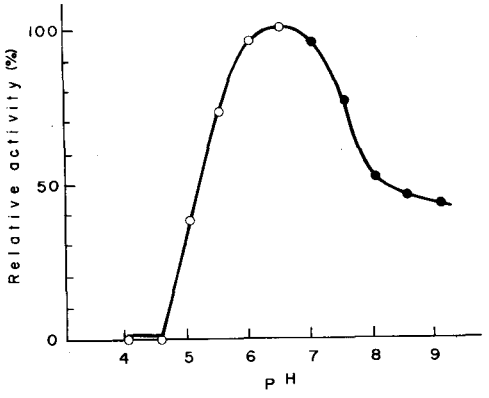

Fig. 15. pH stability of phosphorylase b from kokanee salmon muscle. (○) : 0.05 M citrate buffer ; (●) : 0.05 M triethanolamine buffer. Incubation was carried out at 25℃ for 15 min at the pH values indicated. Protein concentration : 2.8 mg/ml of the incubation solution.

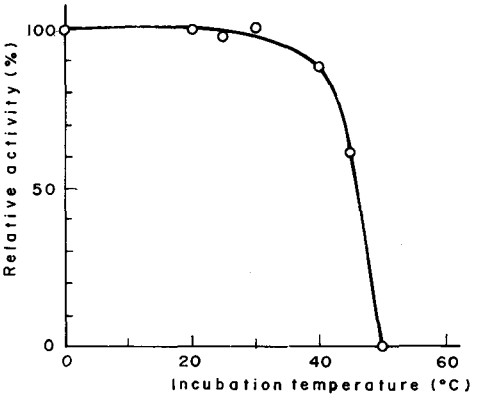

Fig. 16. Thermostability of phosphrylase b from kokanee salmon muscle. Incubation was carried out for 15 min in the solution of citrate buffer pH 6.1. Protein concentration was 2.7 mg/ml of the incubation solution.

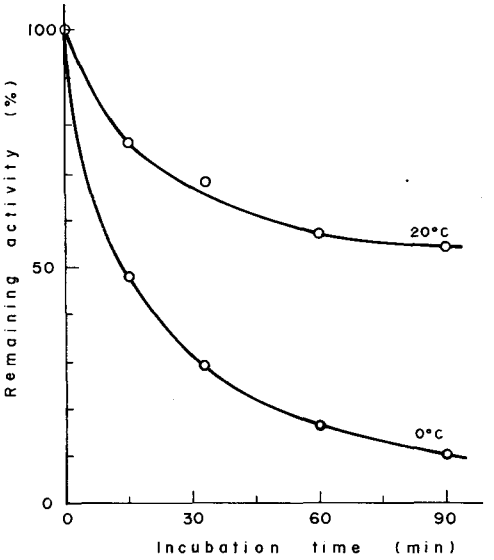

Fig. 17. Effect of preincubation at cold temperature on the activity of phosphorylase b from kokanee salmon muscle at 30℃. Phosphorylase (5.3 mg/ml) was incubated in 0.2 M NaCl containing 0.04 M glycerophosphate and 0.03 M cysteine pH 6.0 for various intervals. Aliquots were removed and diluted with 0.15 M glycerophosphate-0.05 M β-mercaptoethanol buffer (pH 6.8). Assay of the activity was carried out at 30℃.

色をもつかどうかを検討した。本酵素の硫安懸濁液を 0.04 M β-グリセロリン酸—0.03 M システイン-0.2 M NaCl 緩衝液(pH 7.0)で 5 mg/ml の濃度に溶解した。この溶液を 0°C と 20°C に preincubation し，一定時間後に一部を取出して 0.15 M β-グリセロリン酸緩衝液（pH 6.8）で希釈し，30℃ で活性の測定を行った。その結果を第 17 図に示した。0° で不活性化が進行し，残存活性は 15 分後では 50% となり 90 分後で 10% になった。しかし対照の 20° のときは 90 分後でも 60% の活性が残っていた。他の起源のものと比較すると低下の度合などロブスター[7] の結果と類似していた。ウサギにおいては 0° で 2 時間後でも 40% の残存活性があり，14% になるまで 4 時間を要している。この 14% まで低下したウサギ酵素を 20° にもどし 2 時間そのままに保持すると残存活性が 76% まで回復する。ヒメマス酵素についても同一条件で回復の有無を検討した。0° で残存活性を 10% まで低下させた酵素を 20° に 2 時間保持しても回復は 5% しかみられなかった。この点もロブスターの場合[7] と同様であった。ヒメマス酵素の低温に対する抵抗性はウサギより小さく，酵素蛋白レベルでの相違がみられた。ただヒメマスとウサギ酵素の共通点は 0°C, pH 6.0 という条件で不活性化されることである。ヒメマスでも pH 6.8 にすると 0°C でも不活性化されず，残存活性は 15 分で 90%, 90 分後でも 60% 以上の残存活性を示した。このとき対照の 20° では 90 分後でも不活性化が全く起らなかった。pH の違いが酵素の安定性の相違をもたらし，活性に影響を与えることから，pH による調節能の違いが示唆される。しかも至適の pH 附近で不安定であることは，この至適 pH における蛋白構造が低温において敏感な形になっていると推定される。なお本研究室でヒメマスから精製した他の解糖酵素の aldolase と glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase はともに低温では不活性化されない。

考　　察

glycogen phosphorylase の精製法について生物種の異なる試料でいくつか検討されているが，ヒメマスから本酵素の精製の場合には，他の操作法とつぎの二点が異なっている。その一つは結晶化の操作である。哺乳類の場合には，システインを含んでいる酵素濃縮液に Mg^{2+} と AMP を添加して冷室に放置すると結晶化が行われるが，ヒメマスの場合に，さらに硫安を約 30% 飽和まで加えないと結晶が生成されない。ヒメマス酵素と他の起源の酵素との溶解度の違いが観察された。他の点は，塩析前の酸沈殿操作を除いたことである。抽出液を pH 6.1-5.8 の酸性にすると，活性をもつ透明な上清液が得られるが，中和することにより，沈殿が生じ，とくに pH 6.2-6.3 の間で著しかった。このさい，活性が，沈殿区分にも上清区分にみられなくなったからである。この原因について現在は不明のままであるが，ロブスター[7] とサメ[9] 酵素の精製に酸処理が行われていない。この点，下等動物もしくは海産動物の共通の特徴になるかも知れない。哺乳類において，グリコーゲン代謝に関与する酵素群が集中してグリコーゲン粒子と複合体をつくり，これが一つの機能単位として作用をもち，またこの複合体を酸処理により分離出来ると報告されている[25]。このグリコーゲン複合体はグリコーゲンの分解に関与する phosphorylase を中心として kinase や phosphatase による活性型から不活性型への転換の相互作用の追究，死後変化との関連性やグリコーゲン分解における amylase の役割について知見を得るのに好都合な材料となると考えられるが，しかしながら，ヒメマスを含めてこれまで手掛けてきた魚類について，この複合体の存在の証拠が未だ得られていない。

phosphorylase にもアイソザイムの存在が報告されている[17)26)27]。ウサギとブタの心筋の phosphorylase は DEAE-セルローズカラムで 3 つの区分に分れ，その一つは骨格筋型の phosphorylase と報告された。アイソザイムは臓器特異性や生物進化の系統樹などの理解の一助となる。ヒメマスは脊椎動物でも比較的下等な硬骨魚類に分類され，しかもサケ科魚類は四倍体といわれてい

るので筋肉にもアイソザイムの存在の可能性が推測された。ヒメマス酵素はDEAE-セルローズカラム精製により4つの区分に分離されたので，アイソザイムの検討を行ったが，比活性度と電気泳動による移動度も各区分ともにほとんど一致し，同一成分なることが確認された。イオン交換セルローズで何故に同じ成分が多型となってあらわれたのだろうか。リガンドのAMPやピリドキサールリン酸の結合数の違いにより生じたのか検討すべきで問題である。

ヒメマスの本酵素の触媒的性質を調べた結果，G1PとAMPの間にジグモイド型の曲線を示す関係が得られ，互いに協同作用をもつアロステリック酵素であることが認められた。基質濃度が飽和されている状態ではMichaelis-Menten型の曲線を示すことから，生体内の低い基質濃度で，本酵素は調節酵素として作用すると推定される。

また，酵素の安定性を検討した結果から，ヒメマスもウサギの場合と同様に，低温による酵素の不活性化の現象がおこることを確認した。しかしヒメマスの場合に，その不活性化は再加温によっても回復せず，この点ウサギ酵素と違っていた。ウサギ-phosphorylaseは超遠心パターンから，低温において酵素分子が重合体を生成することが知られている[24]。この酵素の構造変化が不活性化の原因になっている。ヒメマスとウサギのこの性質の違いは，酵素間またはサブユニット間の会合や解離の強さの相違によると推定された。さらにpHの安定性から，魚の死後，乳酸の蓄積により筋肉のpHが酸性になるのでphosphorylaseが不安定となり，解糖作用が停止し，残存したグリコーゲンがamylaseによって分解されることも暗示され，今後，低温，pH 6.0における酵素蛋白構造の変化の詳細の研究が必要である。

phophorylaseの詳細な研究を進めるために，さらに，活性型タイプへの変換またはその逆作用などのいくつかの調節的性質の探究が残されており，死後の魚肉の解糖作用がphosphorylaseの作用に依存するので[28]，その活性の発現・消失の機構を知る事が必要である。

要　　約

水産動物筋肉の死後の肉質変化と解糖系の関連を考慮してヒメマス筋肉phophorylase bの精製と酵素学的性質を検討し，つぎの結果を得た。

1. 酵素の精製は50%飽和硫安塩析とDEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーにより，電気泳動的および超遠心的に均一な結晶標品を得た。

2. 酵素の触媒的性質は，至適pH 6.1，至適温度30°C，温度係数Q_{10}は2.9-1.6 (10°-30°C)の値を示し低温になるほど大きい値を示した。

3. Michaelis恒数（Km）はG1Pに対しては12.8 mM，グリコーゲン0.05%，AMP 0.13 mMであった。AMPとG1Pはheterotropicの関係がみられ，低いAMP濃度で明らかなジグモイド曲線を示した。Hill係数は1.27-1.56の間の値を示した。

4. 酵素の安定性は，pHに対してpH 6.1-7.1の間で安定であり，温度に対して45°Cで半分の活性が低下し，50°Cで完全に失活した。低温に対する抵抗性が小さく，0°C pH 6.0で90分後の残存活性は10%であった。20°Cの再加温での回復は5%であった。しかし，0°C, pH 6.8では90分後でも60%以上の残存活性がありpH依存性がみられた。

以上のことから，ヒメマスphosphorylaseはウサギのそれと触媒的性質が基本的に類似していたが，低温での不活性化が不可逆的であったことから，ウサギ酵素と違った蛋白構造をもつことが推定された。さらに，筋肉の死後変化におけるphophorylaseの機能について一部論議を行った。

終りに臨み，試料の採取に御協力を頂きました北海道大学水産学部高野和則助教授と北海道さけます孵化場森支場の方々に厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) Tarr, H.L.A. (1968). Post-mortem degradation of glycogen and starch in fish muscle. *J. Fish Res. Bd. Canada*, **25**, 1539-1554.
2) Cori, C.F. (1956). Regulation of enzyme activity in muscle during work. p 573-583. In Gaebler, O.H. (ed), *Enzymes, Units of Biological Structure and Function*. 624 p. Academic Press, New York.
3) Green, A.A. and Cori, G.T. (1943). Crystalline muscle phosphorylase 1. Preparation, properties and molecular weight. *J. Biol. Chem.*, **151**, 21-29.
4) Fischer, E.H., Pocker, A. and Saari, J.C. (1970). The structure, function and control of glycogen phophorylase. In Campbell, P.N. and Dickens, F. (ed.), *Essays in Biochemistry* **6**, 23-68.
5) Yunis, A.A., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1960). Crystallization and properties of human muscle phosphorylase a and b. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3163-3168.
6) Sevilla, C.L. and Fischer, E.H. (1969). The purification and properties of rat muscle glycogen phosphorylase. *Biochemistry*, **8**, 2161-2170.
7) Assaf, S.A. and Graves, D.J. (1969). Structural and catalytic properties of lobster muscle glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5544-5555.
8) Cohen, P., Duewer, T. and Fischer, E.H. (1971). Phosphorylase from dogfish skeletal muscle. Purification and a comparison of its physical properties to those of rabbit muscle phosphorylase. *Biochemistry*, **10**, 2683-2694.
9) Assaf, S.A. and Yunis, A.A. (1973). Structural and kinetic properties of crystalline shark muscle glycogen phosphorylase. *Biochemistry*, **12**, 1423-1433.
10) 永山文男(1961). 魚類筋肉の解糖作用に関する酵素学的研究-IV. 筋肉フォスフォリラーゼの特性. 日水誌 **27**, 1018-1021.
11) Yamamoto, M. (1968). Fish muscle glycogen phosphorylase. *Can J. Biochem.*, **46**, 423-431.
12) Somogyi, M. (1957). Preparation of glycogen, nitrogen-and phosphorus-free, from liver. In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (ed.), *Methods in Enzymol.*, **3**, 3-4.
13) Bergmeyer, H.V. and Klotzsch, H. (1963). D-glucose-1-phosphate. p 131-133. In Bergmeyer, H.V. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. 1064 p. Academic Press, New York.
14) Shimazu, T. and Amakawa, A. (1968). Regulation fo glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **165**, 335-348.
15) 高橋泰常 (1955). 組織中無キ燐真値と creatine 燐酸の定量法及豚精子の phosphoamidase, creatine phosphokinase 作用について. 生化学 **26**, 690-698.
16) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biok. Chem.*, **177**, 751-766.
17) 永井　裕(1966). 生化学領域の物理化学的実験法-55. ディスク電気泳動法. 蛋白質核酸酵素 **11**, 744-749.
18) 永井　裕(1966). 生化学領域の物理化学的実験法-56. ディスク電気泳動法. 蛋白質核酸酵素 **11**, 818-822.
19) Davis, C.H., Schliselfeld, L.H., Wolf, D.P., Learitt, C.A. and Krebs, E.G. (1967). Interrelationships among glycogen phosphorylase isozymes. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4824-4833.
20) Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-44.
21) Seery, V.L., Fischer, E.H. and Teller, D.C. (1970). Subunit structure of glycogen phosphorylase. *Biochemistry*, **9**, 3541-3598.
22) Black, W.J. and Wang, J.H. (1968). Studies on the allosteric activation of glycogen phosphorylase b by nucleotides. 1. Activation of phosphorylase b by inosine monophosphate. *J. Biol. Chem.*, **243**, 5892-5898.
23) Newbold, R.P. and Lee, C.A. (1965). Post-mortem glycolysis in skeletal muscle. The extent of glycolysis in diluted preparation of mammalian muscle. *Biochem. J.*, **97**, 1-6.
24) Graves, D.J., Sealock, R.W. and Wang, J.H. (1965). Cold inactivation of glycogen phospho-

rylase: *Biochemistry*, **4**, 290-296.

25) Meyer, F., Heilmeyer, L.M.G., Hschke, R.H. and Fischer, E.H. (1970). Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particles. 1. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6642-6648.

26) Yunis, A.A., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1962). Comparative studies on glycogen phosphorylase IV. Purification and properties of rabbit heart phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2809-2815.

27) Hanabusa, K. and Kohno, H. (1969). Isolation and comparison of phosphorylase b isozymes in pig heart. *J. Biochem.*, **66**, 69-76.

28) Shibata, T. (1977). Enzymological studies on the glycolytic system in the muscles of aquatic animals. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **24**, 1-80.