



Title	水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究：第2報 鯉肉中のCreatine phosphateの定量に就て
Author(s)	斎藤, 恒行; SAITŌ, Tsuneyuki; 新井, 健一 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 7(3), 243-246
Issue Date	1956-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22972
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(3)_P243-246.pdf



水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究

第2報 鯉肉中の Creatine phosphate の定量に就て

斎藤恒行・新井健一

(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on the Organic Phosphates in Muscle of Aquatic Animals

II. On the determination of creatine phosphate in muscle of carp

Tsuneyuki SAITÔ and Ken-ichi ARAI

Abstract

(1) The method, presented by Miyazaki et al. (1954), was used quantitatively in the study of creatine phosphate in muscle of carp.

(2) From the present experiments that method was recognized to be reliable for quantitative determination.

(3) The determination was continued for two years. It was observed that the contents of creatine phosphate in muscle of carp varied considerably with some physiological conditions and that the values were low as compared with mammalian muscles.

既に第1報に於て著者等は鯉筋肉中の adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP) の含量を測定するに当り、その定量法の検討とその測定結果とを報告した。¹⁾

動物組織中の creatine phosphate (CP) の定量に就ては、Fiske & Subbarowの方法²⁾や Voges-Proskauer 反応を応用した Ennor & Rosenberg の方法³⁾があり、又 Alkseeva は Jaffé 反応を利用する秀れた方法を提唱し更に宮崎、内田等⁴⁾は哺乳類の生筋に対する応用に就て詳細な報告を行つている。又最近ではイオン交換樹脂に依る Abood の方法⁵⁾等も紹介されている。

著者等は鯉筋肉に就て宮崎、内田等⁴⁾の方法を応用し、二、三の知見を得たのでここに報告する。

実験方法

(1) 試料

- i) Dehydrated creatinine: 小宗薬品K. K.
- ii) 合成 creatine phosphate (Na塩): Ennor & Stocken 法に依る⁶⁾
- iii) 養殖鯉: 体長20~30cm, 体重 300~400g

(2) 試薬

- i) 7.7% ammonium molybdate (10N H₂SO₄ 溶液)
- ii) 飽和 picric acid
- iii) 10% NaOH
- iv) 指示薬: methyl red

(3) 測定

- i) 標準 creatinine 溶液: 0.1N HCl 溶液に 0.1mg/100cc 濃度に溶解, 発色した。
- ii) 合成 CP は水に溶解し直ちに NaOH でアルカリ性とし, Ca(OH)₂で飽和した10%CaCl₂を添加, 混在する無機磷を沈澱除去して, その上澄液に就て発色した。

iii) すでに報告した adenosine polyphosphate の場合と同じく¹⁾, 養殖鯉は可及的低温に於て筋肉をメスで切りとり, 10倍容の 4% HClO₄ 及び少量の海砂と共に冷却してある乳鉢中で攪潰, 濾過して抽出液となしその 1~2 cc に就て発色した。

発色の方法は宮崎, 内田等⁴⁾の方法に依り, 先ず上記試料液に $\frac{1}{10}$ 容の 7.7% ammonium molybdate 溶液を加え室温にて 30分もしくは 50°C で 5分間分解を行う。分解終了後 methyl red 一滴を指示薬として中和し次いで 10% NaOH 0.4 cc, 飽和 picric acid 4 cc を加え 25°C で 20分呈色させる。呈色後水で全容を 20cc に稀釈し直ちに島津光電光度計 (510m μ) 又は島津分光光度計 (520m μ) で比色定量する。

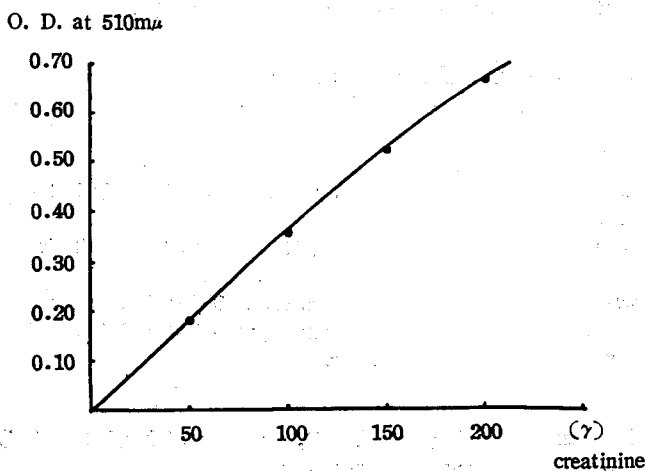


Fig. 1. Relationship between the concentration of creatinine and extinction (Photoelectric colorimeter)

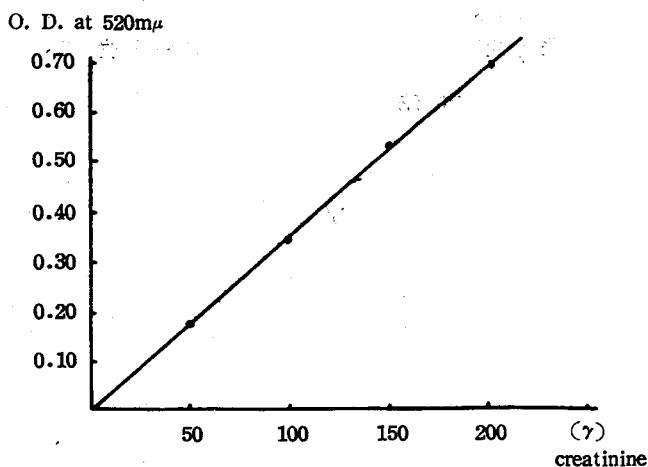


Fig. 2. Relationship between the concentration of creatinine and extinction (Spectrophotometer)

実験結果

Harvey⁷⁾がすでに報告した様に, 比色定量を光電光度計によつて行う場合は creatinine 濃度と呈色(吸光係数)の相関関係は Lambert-Beer の法則に従わない。これは特に creatinine の高濃度に於て著るしい。即ち Fig. 1 に示す様に creatinine 100 γ 以上の濃度に於ては直線的関係が認められない。他方分光光度計によるときは Fig. 2 に示す如く全く直線的関係が認められた。

感度は光電光度計を使用した場合は 0.5~5 γ /cc. (終末溶液), 分光光度計を使用した場合は 0.2~10 γ /cc (終末溶液) である。いずれも creatinine についてであり CP としては 1.866 倍となる。

宮崎, 内田等の場合と同じく誤差は 1% 内外, 操作は極めて簡便であつた。

従来広く利用されている Fiske & Subbarow 法²⁾ 及び Ennor & Rosenberg 法³⁾ と本方法との比較を, 合成 CP 及び鯉筋肉抽出液に就て行つた結果は第 1 表及び第 2

表に示す如くである。

Table 1. Comparison between Fiske & Subbarow's and Miyazaki & Uchida's methods
(Synthesized CP, mg/cc; muscle ext., mg/g wet wt. muscle)

Sample	Fiske & Subbarow's method	Miyazaki & Uchida's method
Synthesized CP	I	0.138
	II	0.140
Muscle extract	I	2.54
	II	1.72
	III	2.84
	IV	1.85

Table 2. Comparison between Ennor & Rosenberg's and Miyazaki & Uchida's methods
(mg/g wet wt. muscle)

Muscle extract	Ennor & Rosenberg's method *	Miyazaki & Uchida's method
I	0.93	1.00
II	2.03	2.11
III	1.09	1.12
IV	1.39	1.29
V	0.62	0.57

* Analytical data by Yoshimura & Shibata⁹⁾

Table 3. Contents of creatine phosphate in carp muscle
(mg/g wet wt. muscle)

Month	1954	1955
Feb.	1.00 3.05 2.44 1.97 0.74 0.55	2.93 2.54 2.20 0.95 1.13
Mar.	1.06 0.27 0.51 1.19 1.23 0.43	
June	2.35 1.95 0.37 0.57 2.32 1.64	
July	2.60 2.29	
Aug.	0.37	
Sept.	0.57 1.14 0.90 1.09	0.90
Oct.	1.95 2.52 1.64	0.97 1.64 1.13 1.29
Nov.		0.98 0.93
Dec.	2.34 1.76 1.56 2.01 2.35	0.94

* fatigue

動をともなつて得られた。これは明らかに不安定なCPに対して、各個体の生理条件が複雑に影響しているためと考えられる。特に疲労状態にある個体では、著しいCPの減少が観察された。又著者等の得た結果に依れば、死後鯉筋肉に於てはATP・ADPの減少に遙かに先立つCPの減少が観察され¹³⁾、従来の定説¹¹⁾¹²⁾

即ちこれらの方法はいずれも良く一致した値を示した。尚筋肉抽出液に対する合成CPの添加試験の結果は、本方法では回収率98~100%、Fiske & Subbarow法では98%を示した。従つて宮崎、内田等の主張する様に、本方法は操作が簡便である上に迅速測定を可能とする利点をもつており、又鯉筋肉抽出液に就て充分応用出来る事を認められた。

以上の結果から著者等は宮崎内田等の方法に依つて、2年間にわたり鯉筋肉中のCPの含量を測定した。その結果を第3表に示す

考 察

本反応に於て反応陽性の物質は $-CO \cdot CH_2-$ 結合を有する化合物であるとされている。その中特にglucoseに依る影響が懸念されるけれども、分解過程終了後充分冷却し且抽出液を対照とする事に依つて防止出来るといわれている⁹⁾。又この呈色が発色温度に依つてかなり影響されるから¹⁰⁾、著者等は $25 \pm 1^\circ C$ を保つて一定時間発色せしめ、非常に再現性ある値を得る事が出来た。

高エネルギー磷酸化合物の中特にCPは不安定であつて、動物筋肉中で死後急速に分解するという事実はBendall¹¹⁾や佐々木藤巻等¹²⁾の報告で述べられている。著者等の2年間にわたる鯉筋肉中のCP保有量も、大きな変

に合致している。

尙第3表の値を総合すれば鯉筋肉中のCP保有量は、大体1.00~2.50 mg/g 筋肉湿重量であるといえる。

佐々木、藤巻等は鯉筋肉に就て0.50 mg/gの値を報告しているが、著者等の分析結果はより高い値を一般に示している。しかしいずれにしても家兔、モルモット等の哺乳動物と比較するときは、鯉筋肉は低いエネルギーレベルにあるといわねばならない。

要 約

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究の一環として creatine phosphate の定量を行うために、定量法として宮崎・内田等の方法を鯉筋肉に応用した結果、適当な方法である事を認め、更に2年間にわたつてその定量を続け、鯉筋肉中のCP保有量はかなりの変動をともなつており、一般に哺乳動物のそれより低い値を示す事を知つた。

尙本研究を行うに当り、定量法その他に就て御懇切な御指導を賜つた札幌医大生理学教室永井寅夫教授、宮崎英策助教授、内田倅喜氏に深謝する。

文 献

- 1) 斎藤恒行・新井健一(1955). 北大水産彙報 6, 228.
- 2) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. C. (1929). *J. Biol. Chem.* 81, 629.
- 3) Ennor, A. H. & Rosenberg, H. (1952). *Biochem. J.* 51, 607.
- 4) 宮崎英策・内田倅喜・佐藤寛(1954). 札医誌 5, 300.
- 5) Abood, L. G. (1956). *Science* 123, 545.
- 6) Ennor, A. H. & Stocken, L. A. (1948). *Biochem. J.* 43, 190.
- 7) Harvey, G. R. (1953). *Nature* 171, 1125.
- 8) 吉村克二・柴田猛 (未発表)
- 9) 萩原武美雄(1954). 薬学誌 74, 488.
- 10) 岡田裕彦(1953). 医学と生物 28, 264.
- 11) Bendall, J. R. (1951). *J. Physiol.* 114, 71.
- 12) 佐々木林次郎・藤巻正生・古城健二・田中敏夫(1953). 農化 27, 725.
- 13) 斎藤恒行・新井健一(未発表)