HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究：第13報 魚類筋肉中の尿酸及びNicotinamide-adenine dinucleotideについて
Author(s)	新井, 健一; 斉藤, 恒行
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 13(4), 193-199
Issue Date	1963-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23167
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(4)_P193-199.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産動物筋肉中の有機燐酸化合物に関する研究

第13報　魚類筋肉中の尿酸及び Nicotinamide-adenine dinucleotide について

新井健一・斉藤恒行
(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

XIII. Muscle levels of uric acid and nicotinamide-adenine dinucleotide in fresh and frozen stored fish

Ken-ichi ARAI and Tsuneyuki SAITO

Abstract

In earlier papers the authors have reported studies on the changes in contents of acid-soluble nucleotides, especially adenine nucleotides, of the muscle of some marine animals. As it may be considered that the occurrence of nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) and uric acid in fish muscle will be closely related to freshness, in this report NAD and uric acid of fresh and frozen stored muscles were estimated. Use was made of ion exchange chromatography for the mackerel, *Scomber sponicus* HOUTTUYN, and for the mackerel pike, *Cololabis saira* (BREVOORT). In red lateral muscle fairly large amounts of uric acid were found as compared with that of the dorsal one; the amounts were considered to increase with length of cold frozen storage by observation of its richness in frozen stored muscle, while NAD was found to be more abundant in fresh dorsal muscle than in red lateral one. But no NAD was found in those two muscles of the examined frozen stored fish.

著者らは先に，サバ・ニジマスの脊筋及び血合筋中の ATP (アデノシン三燐酸) を中心とする酸可溶核酸成分の分析並びに変化について報じた。[1,2] 即ち，1.1×13cm の Amberlite IRA-400 に依る分析では，酸可溶核酸成分として ATP の他に ADP (アデノシン二燐酸)，AMP (アデノシン一燐酸)，IMP (イノシン一燐酸)，イノシン，ヒポキサンチンの計6成分の分離定量が可能であった。又その結果，血合筋では一般に酸可溶核酸成分の総量が少ないこと，及び ATP と IMP の分解が早い事がわかった。

最近 N. R. Jones らは Codling 筋肉 50g 相当抽出液の分析を行い，いくつかの微量成分の存在を報じている[3]。著者らも N. R. Jones らの使用した 1.8×17.5cm の Dowex 1 (義酸型) カラムにより，サバ及びサンマの脊筋及び血合筋中の同成分を分析した。その結果，既報の6成分以外に尿酸及び NAD (nicotinamide-adenine dinucleotide) が新しく認められ，両筋肉についてかなり異る分布を示したので，ここに報告する。

本研究費の一部は，昭和35年度文部省科学研究費 (各個研究) により実施した。ここに謝意を表わす

実 験 方 法

筋肉試料は市販の生鮮サバ (*Scomber sponicus* HOUTTUYN) 及び冷凍サンマ (*Cololabis saira*) を使用した。いづれも脊筋及び血合筋を 50～70 g づつ採取し，以下 N. R. Jones らの報ずる常法どおり，過塩素酸により抽出し，中和後，Dowex 1×2, 1.8×17.5 cm (義酸型) に吸着させた。溶出は N. R. Jones らの報じている gradient elution system によると，義酸及び義酸アンモニウムの濃度が高いことによる溶媒自身の紫外吸収が分析をかなり邪魔するので不便である。そこで，著者らは stepwise elution system によることとし，溶媒は濃度の低い義酸ソーダを使用した。この程度の濃度では溶媒自身の紫外吸収はそれほど大きくなく，又分離も満足すべき状態が得られた。

溶出区分の確認は，主として paper chromatography により，先ず溶出区分を charcoal で処理した後，iso-propanol-sat.$(NH_4)_2SO_4$-H_2O, iso-amylalcohol-5% Na_2HPO_4, H_2O(pH 10)[4] の三溶媒により上昇法で展開し，標準物質と比較対照した。

NAD の確認は Ciotti ら[5] の報じた様に，KCN-complex 生成による 325 mμ における吸収極大の出現を利用した。

尿酸の臭素化による吸収スペクトルの変化を，伊藤ら[5] の方法によって検討した。

実 験 結 果

先ず最初に，市販冷凍サンマ脊筋 (Fig. 1) 及び血合筋 (Fig. 2) 各 50 g 中の酸可溶核酸成分の分析結果を示した。Fig. 1 に示される様に，この ion exchange chromatography の条件下では，脊

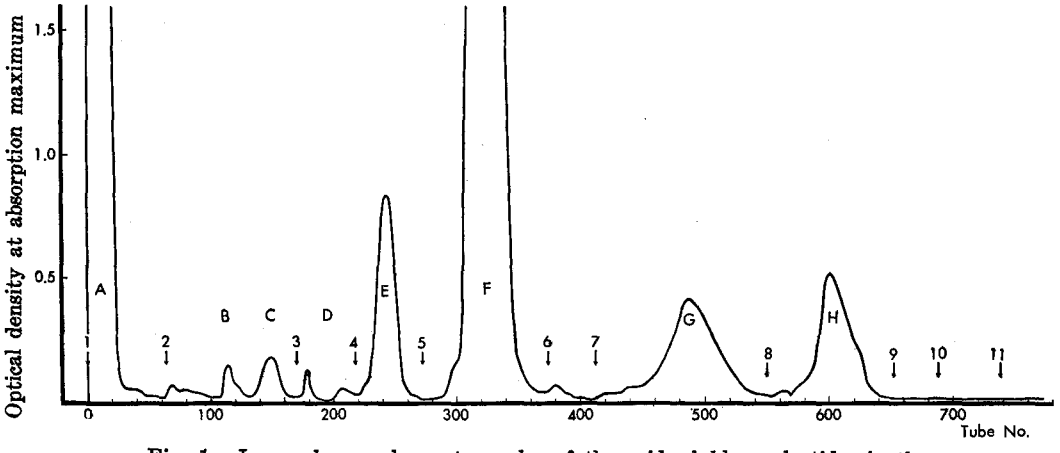

Fig. 1. Ion exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the frozen dorsal muscle of mackerel pike

Exchanger: Dowex 1×2-formate, 100–200 mesh, 1.8×17.5 cm.
Eluting solution: (1) Adsorption & water, (2) 0.005 M Formic, (3) 0.02 M Formic, (4) 0.05 M Formic, (5) 0.1 M Formic, 0.05 M Formate, (6) 0.1 M Formic, 0.1 M Formate, (7) 0.1 M Formic, 0.2 M Formate, (8) 0.1 M Formic, 0.3 M Formate, (9) 0.1 M Formic, 0.4 M Formate, (10) 0.1 M Formic, 0.5 M Formate, (11) 0.1 M Formic, 1.0 M Formate.
Flow rate: 1.0 ml./min.
Each 10 ml. fraction was collected by automatic fraction collector
Sorbed material: Extracts, equivalent to 50 g of muscle

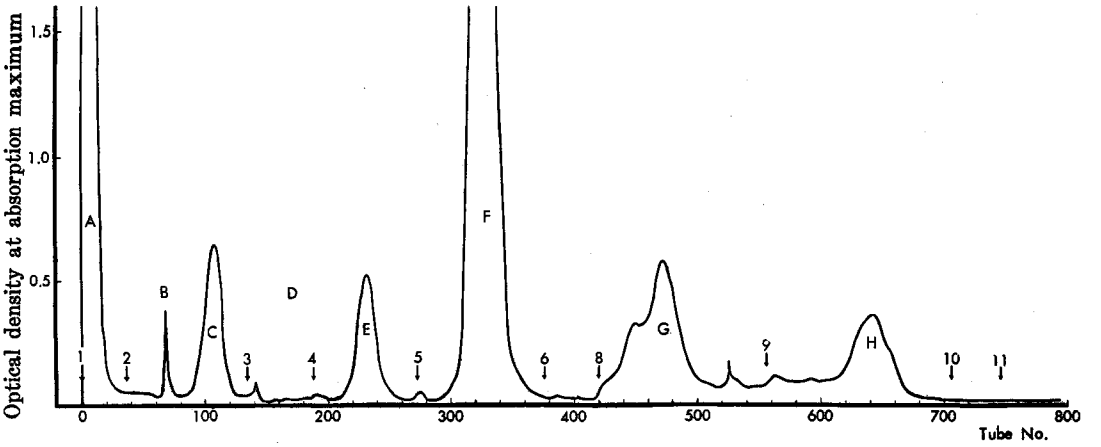

Fig. 2. Ion exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the frozen red lateral muscle of mackerel pike
Experimental conditions are same as Fig. 1

Table 1. R_f values of purines, their derivatives, and effluent fractions from ion exchange resin

Solvent / Substance	iso-propyl alc. sat.-$(NH_4)_2SO_4$-H_2O	iso-amyl alc. 5% Na_2HPO_4	H_2O (pH 10)
Peak A	0.32 0.45	0.58 0.73	0.55 0.70
Hypoxanthine	0.33	0.59	0.55
Inosine	0.46	0.75	0.71
Peak C		0.43	
Uric acid		0.44	
Peak D	0.38	0.77	
NAD	0.39	0.79	
Peak E	0.33	0.74	
AMP	0.33	0.76	
Peak F	0.53	0.87	
IMP	0.55	0.86	
Decomposed Peak G	0.15	0.42	0.37 0.50
Decomposed Peak H	0.18	0.41	0.37
Adenine	0.18	0.42	0.38

筋から A~H で示される 7 種の明確な溶出ピークが得られた。その他，不明確ながら存在が予想出来るピークも見られるが，これらのピークについては現在検討を続けている。血合筋については Fig. 2 に示した様に，同じく A~H で示した 7 種のピークが得られ，paper chromatography 及び吸収スペクトル等の性質から，脊筋から得られたピークと同一の成分である事を認めた。これら 7 種の成分と標準物質について行った paper chromatography による R_f 値を Table 1 に示した。ピーク A, E 及び F は量的に非常に多い成分であって，著者らの既報に述べている様に，各々 Inosine, Hypoxanthine, AMP 及び IMP であり，又 G 及び H は ADP, ATP に相当する区分であろうと考えている。Table 1 の結果は以上の予想を支持するものであり，A, E 及び F については確定的である。ただし，ピーク A については，Inosine と Hypoxanthine の他に一又は二の未知成分が混在しており，又ピーク G 及び H は，特に血合筋におけるピーク G の様に，必らずしも単一成分とは考えられない溶出曲線を示しているので，更に詳細な検討を続けている。

ピーク C 成分の吸収スペクトルを Fig. 3 に示した。即ち，ピーク C 成分は 0.01 N HCl 溶出では吸収極大 285 mμ，0.01 N NaOH 溶液では吸収極大 295 mμ を示し，この波長は標準の尿酸 (E. Merak Darmstadt) について得られた波長と全く同一であった。この酸性溶液について臭素化を行うと，285 mμ における極大吸収の減少が起る。これは標準尿酸溶液においても同じく起るが，ピーク C 成分の場合に，短波長域の非特異的吸収がかなり残存することは微量の不純物の混在のためと考えられる。またこの成分の paper chromatography は iso-amyl alcohol-Na_2HPO_4 溶媒では良いが，その他の試みた溶媒では明確なスポットを示さないので，うまくゆかなかった。しかしながら，尿酸を標準品について，筋肉抽出液と同条件で ion exchange chromatography を行うと，ピーク C と

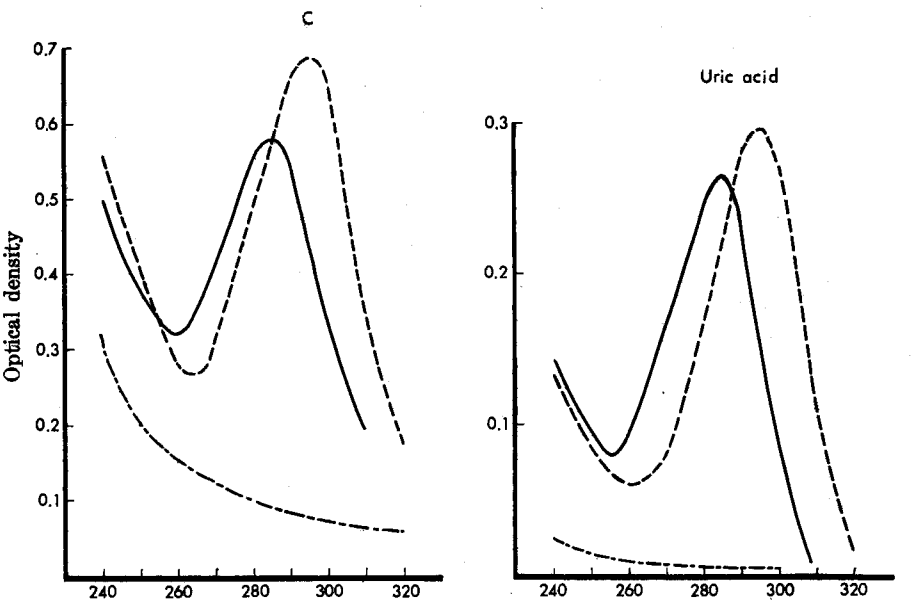

Fig. 3. Absorption spectrum of effluent C fraction and authentic uric acid

——— : in 0.01 N NaOH solution

———— : in 0.01 N HCl solution

- — - — - — - : after bromination

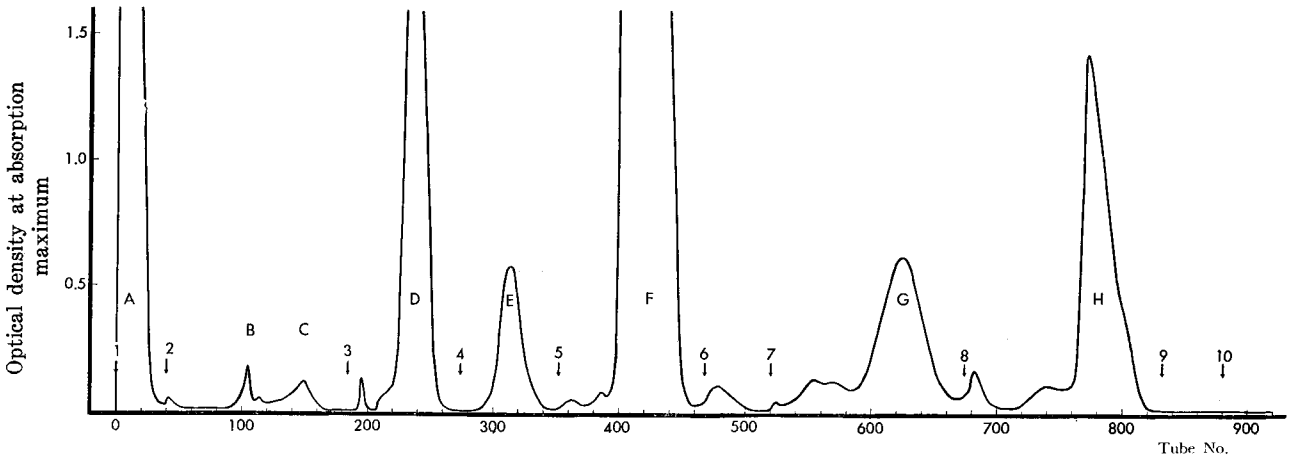

Fig. 4. Ion exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the fresh dorsal muscle of mackerel
Sorbed material: Extracts, equivalent to 64 g. of muscle
Other experimental conditions are same as Fig. 1.

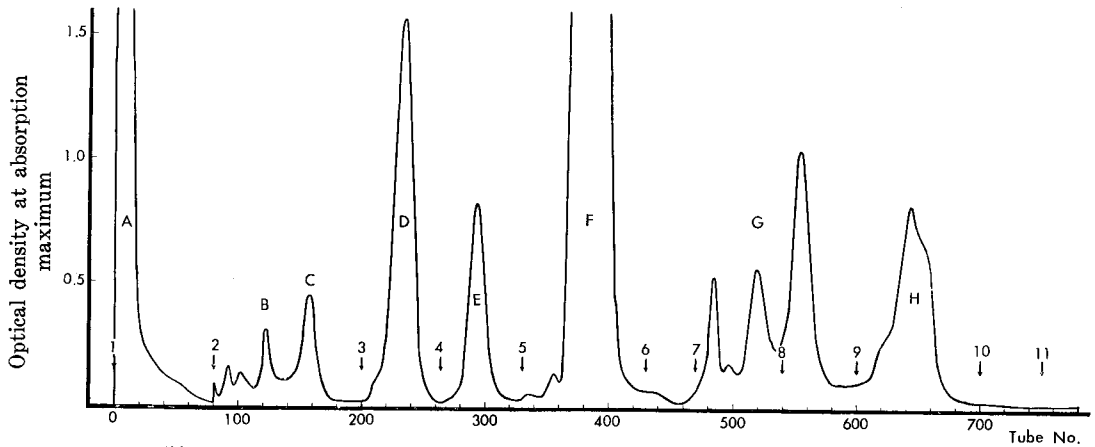

Fig. 5. Ion exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the fresh red lateral muscle of mackerel
Experimental conditions are same as Fig. 4

同じ溶出位置に同一吸収スペクトルを示すピークが回収されることがわかったから，この成分が尿酸である事は確実である。

次に，市販の生鮮サバ脊筋 (Fig. 4) 及び血合筋 (Fig. 5) 各 64g 中の酸可溶核酸成分の分析結果を示す。Fig. 4 及び 5 によると，Fig. 1 及び 2 では溶出されなかった新しいピーク D が見つかった他は，A～H に示される各区分は paper chromatography 及び吸収スペクトル素による諸性質から考えて，冷凍サンマ肉において認めた Hypoxanthine, inosine, 尿酸, AMP, IMP と同一成分である。

ピーク D 成分については Table 1 に示される様に NAD である可能性が強いので，更に KCN-complex 生成による新しい吸収極大の出現の有無を検討した。この結果を Fig. 6 に示した。即ち，ピーク D 成分は顕著な KCN-complex の生成を示した。又標準の NAD (Sigma Chem. Co.) の ion exchange chromatography の結果もこの成分が NAD である事を支持している。

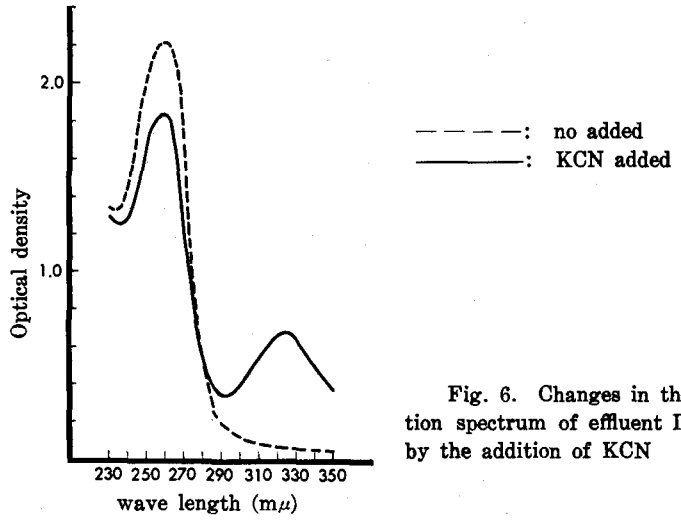

Fig. 6. Changes in the absorption spectrum of effluent D fraction by the addition of KCN

ピーク G 及び H は，サンマ筋肉の場合と同様に，酸分解によって主にアデニンが見出されること及びその溶出位置等から考えて，ADP, ATP に相当する成分と考えられる。しかし，血合筋について得られる三つのピーク等については，更に検討を続けている。又，溶出曲線で示されている様に，その他いくつかの微量成分の存在も考えられるが，これらの成分についても検討を加えている。

以上の結果によると，著者らが先に報じた Hypoxanthine, inosine, AMP, IMP, ADP, ATP 以外に，今回の分析では新しく尿酸及び NAD の存在を認める事が出来た。しかも，4 種の筋肉試料におけるこの 2 成分の量を比較してみると，冷凍サンマ及び生鮮サバのいずれにおいても，脊筋よりも血合筋中に多量の尿酸が見出され，その量は冷凍サンマ血合肉に最も多かった (29 mg/kg)。脊筋中の存在量は非常に少ない。NAD の量については，更に顕著な差が見られるのであって，冷凍サンマでは脊筋及び血合筋共に全く見出す事が出来ず，生鮮サバの脊筋中には AMP 量より多い量が見出された (334 mg/kg)。血合筋にはその $^2/_3$ が見出されるだけであった。この 2 成分の分布の差は，両筋肉の生理機能と貯蔵条件を考えあわせると非常に興味深い。

考　　察

著者らは，従来 1.1×13cm のカラムを使用して，ATP の分解産物の検討を続けてきたが，分解終産物として Hypoxanthine が検出されたのみであった。しかし，本実験では hypoxanthine の酸化生成物である尿酸が見出され，特に肝臓様機能を併せもつと云われている血合筋肉中に多量に存在する事は興味深い事である。従来，魚類血合筋には脊筋に比べて，約 1.2～5.6 倍の尿酸が存在すると報じられている[7]が，著者等の結果と一致するものである。

NAD の存在については，すでに N. R. Jones らの報告がある。[8] それによると，この NAD 量は魚類筋肉の漁穫時季，貯蔵日数等によって変化するものである。著者らの結果においても同じ傾向が認められるのであって，冷凍貯蔵したサンマでは，脊筋及び血合筋共いづれにおいても全く存在せず，生鮮サバの両筋中にはかなりの量が見出されるのである。この事は NAD の冷凍貯蔵中における分解消失を意味するものと考えている。

これらの結果が，大多数の魚類の筋肉において，一般的に見られる事実であるかどうかは，なお多くの分析の結果を待たねばならない。しかしこの 2 成分の分布の差は，以上述べた様に，非常に顕著なものであった。

なお，本文中に述べた様に，この他の微量成分については，現在検討を続けている。特にピーク G の区分にいつては血合筋において複雑であるから，この成分に関して明確な差異があるかも知れない。

要　　約

著者らは先に，ニジマス，サバ及びマスの脊筋及び血合筋中の酸可溶核酸成分の変化について，研究し報告した。本実験では，1.8×17.5cm の Dowex 1×2 (義酸) カラムにより，微量成分の検討を行い，新しく尿酸及び NAD の分離に成功した。

冷凍サンマ及び生鮮サバの脊筋と血合筋中における分布は，次の様であった。

1)　尿酸は脊筋よりも血合筋に多く存在し，特に冷凍サンマ血合筋中に多量存在していた。

2)　NAD は冷凍サンマの脊筋及び血合筋のいづれにも全く存在せず，生鮮サバの両筋中にのみかなり見出された。又血合筋に比べれば脊筋において多量存在していた。

その他の微量成分については現在検討中である。

文　　献

1)　斉藤恒行・新井健一・矢島敏克 (1959).　日水誌 25, 573.

2)　Saito, T., Arai, K. & Yajima, T. (1959).　*Nature* 184, 1415.

3)　Jones, N. R. & Murry, J. (1960).　*Biochem. J.* 77, 567.

4)　佐藤清夫 (1957).　蛋白質・核酸・酵素 2, 57.

5)　Ciotti, M. M. & Kaplan, N. O. (1957).　In Methods in Enzymology, Vol. 3, 890 Ed. by Colowick, S. P. & Kaplan., N. O. New York: Academic Press Inc.

6)　Suzuki, T. & Ito, E. (1958).　*J. Biochem.* (Japan) 45, 403.

7)　堀田一雄・梅村清彦 (1954).　生化学 26, 423.

8)　Jones, N. R. & Murry, J. (1961).　*Biochem. J.* 80, 26p.