



Title	水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分 IV : スルメイカ筋肉中のAMPの分解について
Author(s)	新井, 健一; ARAI, Ken-ichi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 17(2), 83-90
Issue Date	1966-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23274">https://hdl.handle.net/2115/23274</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	17(2)_P83-90.pdf



## 水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分 IV

### スルメイカ筋肉中の AMP の分解について

新井 健一

#### IV. Acid-soluble Nucleotides in Muscle of Marine Invertebrates Degradation of adenylic acid in the muscle of squid

Ken-ichi ARAI\*

##### Abstract

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

- 1) On incubating at 37°C, above described substrates were converted as follows: 7.60 $\mu$  mole of AMP was converted to Hx by 6 hours, 6.02 $\mu$  mole of AdR to Hx by one minute, 1.48 $\mu$  mole of HxR to Hx by 5 minutes. From these results, strong activity of adenosine deaminase could be assumed.
- 2) By the addition of 5'-nucleotidase in crude enzyme, rate of degradation of AMP and production of Hx were very accelerated. As a result, it was recognized that the dephosphorylation of AMP was the limiting step of decomposing pathway of AMP.
- 3) Effect of Cu<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> and F<sup>-</sup> on the rates of degradation of AMP, IMP AdR and HxR were studied. A comparison was made with the results which obtained from bovine muscle by Lee, C.A.
- 4) From the result observed on the degradation of HxR in the dialyzed crude enzyme, presence of nucleoside hydrolase could be supposed.
- 5) The pathway of degradation of ATP in the muscle of squid may be considered as follows: ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx

水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分の動的変化に関する報告はまだ少なく、著者らの研究以外にわずかに二・三を数えるのみである<sup>1-3)</sup>。著者らはすでに11種の水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分について、筋肉を室温(16~20°C)と低温(-5~-6°C)で貯蔵した場合の変化を検討し、その結果から筋肉中でおこると考えられるATPの分解経路について推定を行なった<sup>4-9)</sup>。

本研究では、以上のATPの分解経路に関する著者らの推定を確認するために、筋肉ホモジェネートを粗酵素液とみなし、これにATPの分解経路の中間産物と考えられるいくつかの化合物を基質として添加し、反応させ反応生成物の分析を行なうことによって検討を試みた。この方法によると、自然条件下の筋肉中にはその生成を確認されなかったAdRを経由するAMPの分解経路および同じくカニ・エビを除いては確認が困難であったIMPの示す分解態度についても検討することが出来るので非常に有利である。

\* 北海道大学水産学部水産化学教室

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XV報とする

## 実験方法

1. 動物試料 実験に供したスルメイカ (*Ommastrephes sloani pacificus*) は函館近海で捕獲されたもので、きわめて新鮮な市販品である。

・粗酵素液 新鮮なスルメイカの胴肉を迅速に切りとり、2倍量 (V/W) の 0.55 M KCl で氷冷しつつ、ユニバーサルホモジナイザー HDII 型 (20000 R.P.M., 日本精機製) によってホモジナイズし、次に2層のガーゼで圧搾濾過して粗酵素液とした。また、透析を行なう場合は粗酵素液を遠心分離し (10000 R.P.M., 30分) 沈澱を除き、冷蒸溜水に対して燐酸の検出が認められなくなるまで透析を続けた。これらの方法は Lee, C. A. らが採用した方法に準じたものである<sup>10)</sup>。

3. 酵素反応 粗酵素液 5 ml に基質として AMP, IMP, AdR, HxR, Ad のうち一成分 (1.0~2.0 mg/ml) を添加し、37°C でそれぞれ一定時間反応させる。反応は 60% HClO<sub>4</sub> 0.5 ml を加えることによって中止させ、凝固蛋白質を遠心分離後、0.5% HClO<sub>4</sub> 5 ml で2回再抽出を行ない抽出液を合わせて蒸溜水で 50 ml に希釈し、活性炭素 (クロマトグラフ用, 和光純薬工業株式会社) カラム, φ 1.0 cm × L. 6.0~7.0 cm に吸着させる。カラムを蒸溜水 20 ml づつ3回で洗滌した後、吸着した核酸関連化合物を C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: H<sub>2</sub>O: 28% NH<sub>4</sub>OH=48: 50: 2, (V/V/V), 60 ml で溶出し、40°C で減圧濃縮後蒸溜水で 50 ml 定容とする。この中から 15 ml をとり 5% HClO<sub>4</sub> 1滴を添加し pH 4.5~5.0 に合わせて蒸溜水で 20 ml まで希釈してイオン交換クロマトグラフィーに供した。

4. イオン交換クロマトグラフィー 筋肉抽出液中に AMP, IMP, AdR, HxR, Ad, Hx などが含まれている場合これらの成分を分析するためには、Jones, N. R. の報告した方法<sup>11)</sup>の改良法<sup>12)</sup>によった。なお、AMP と IMP の分析については、これらを吸着した Dowex 1, 酢酸型カラムから 0.003 N HCl で溶離させて行なうことが出来る<sup>13)</sup>。

5. 試薬 基質として使用した核酸系試薬は次のようなものである。

AMP, Sigma Chem. Co. および Zellstoff fabrik, Waldhof

IMP, 本教室にてイカ筋肉より単離精製したもの

AdR, Zellstoff fabrik, Waldhof

HxR, L. Light & Co., Ltd.

Ad, Hx, 和光純薬工業株式会社

また、5'-nucleotidase は武田薬品工業株式会社、食品事業開発部から分与していただいた。

## 実験結果

粗酵素液による AMP, IMP, AdR, HxR などの基質に対する反応の結果を第1表にあげる。

この粗酵素液には筋肉に本来存在している核酸関連化合物も含まれている。その量は第1表中に示されているように AMP (11.00), HxR (0.80), Hx (2.0) μ mole 位であってその他の成分は認められなかった。したがって、AMP を基質とする反応では新しく AMP は添加する必要はないのであるが、本実験では他の基質の場合と同様に、あらためて添加し反応させた。すなわち、AMP と

本報告においては次の略語を使用する

ATP, Adenosine 5'-triphosphate

ADP, Adenosine 5'-diphosphate

AMP, Adenosine 5'-monophosphate

IMP, Inosine 5'-monophosphate

AdR, Adenine riboside = Adenosine

HxR, Hypoxanthine riboside = Inosine

Ad, Adenine

Hx, Hypoxanthine

Table 1. Degradation of AMP, IMP, AdR and HxR added in crude enzyme of squid muscle ( $\mu$  mole/reaction mixture)

Substrate		AMP		IMP		AdR		HxR	
		0	6 hr.	0	6 hr.	0	1 min.	0	5 min.
Reaction product	AMP	18.00	11.10	12.22	7.77	10.97	11.10	11.10	11.20
	IMP	0	0	13.46	8.42	0	0	0	0
	AdR	0	0	0	0	7.85	1.83	0	0
	HxR	0.81	0.10	0.81	0.23	0.80	6.23	9.68	8.20
	Hx	2.00	7.73	2.00	10.34	2.06	1.97	2.10	3.76
	Total	20.81	18.93	28.49	26.76	21.68	21.13	22.88	23.16

HxR については筋肉に本来含まれていた量と新しく添加した量の加算量 (AMP は 18.00, HxR は 11.10  $\mu$  mole である) が, また, IMP と AdR は筋肉には本来含まれていないため, あらたに添加した量 (IMP は 13.46, AdR は 7.85  $\mu$  mole) が基質濃度になっているわけである。この条件における反応では, 粗酵素液は AMP を 6 時間に 7.60  $\mu$  mole 分解して Hx に, AdR をわずか 1 分間に 6.02  $\mu$  mole 分解して HxR に, HxR を 5 分間に 1.48  $\mu$  mole 分解して Hx に変化させた。また, AMP と IMP が共存するときは 6 時間の反応で IMP は 5.04, AMP は 4.45  $\mu$  mole が HxR に変化し, ほぼ等しい速度であった。なお, Ad は全く変化をうけなかった。

これらの結果で非常に顕著なことは AdR が非常に速い脱アミノ作用をうけることであって, 強い Adenosine deaminase 活性が予想される。AMP の変化はかなり遅いにもかかわらず Hx に変化していることは AMP  $\rightarrow$  AdR  $\rightarrow$  HxR  $\rightarrow$  Hx の 3 段階の反応のうち, AdR から先への 2 段階の反応が事実上速いことから考えると理解出来ることである。nucleotide の脱リン酸は相対的に遅いため, この反応液中に 5'-nucleotidase を投入してその反応を促進させる実験を行なった。その結果を第 2 表に示した。

この結果によると, 反応液中加入された 5'-nucleotidase は AMP の分解をかなり速めることがわかった。しかし, この場合でも反応生成物として予想される AdR は認めることは出来ず, さらに

Table 2. Accelerated degradation of AMP in crude enzyme of squid by the addition of 5'-nucleotidase ( $\mu$  mole/reaction mixture)

Substrate		AMP		
		0	2 hr.	
Additions		—	H <sub>2</sub> O	5'-nucleotidase
Reaction product	AMP	15.80	13.20	8.37
	AdR	0	0	0
	HxR	0	0	0
	Hx	2.80	4.68	8.88
	Total	18.60	17.88	17.25

Reaction mixture: 5 ml, crude enzyme+1 ml, AMP (4.70  $\mu$  mole)  
+0.5 ml, additions

HxR も見出すことが出来なくてほぼ化学量論的に Hx を生成していることがわかる。すなわち ATP の分解にあつては、一連の反応段階のうち AMP の脱磷酸反応が律速段階になっており、続いて行なわれる脱アミノおよび脱リボース反応はかなり速く行なわれるため、分解の中間産物と考えられる AdR, HxR の蓄積は確認出来ないのであるという考えは正しいものであろう。

先に Lee, C. A. らは子牛の筋肉ホモジェネートを粗酵素液とみなして筋肉中の IMP の分解に関する研究を行なっており、その脱磷酸反応は 0.11 M F<sup>-</sup> によって、また脱リボース反応は 0.01M Cu<sup>++</sup> と Hg<sup>++</sup> によって、選択的に阻害されるという興味深い事実を報告している。著者も本実験において以上の 3 種のイオンの変化におよぼす影響をしらべてみた。その結果を次の第 3 表に示す。

この結果によると、反応液に含まれている AMP, 14.70 $\mu$  mole は 4 時間の反応で主に Hx に変化するが、この反応は Cu<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup>, F<sup>-</sup> によって完全に阻害され、また AdR, 7.94 $\mu$  mole は 20 分の反応で完全に Hx に変化しているが、この反応は Hg<sup>++</sup> によって強く、Cu<sup>++</sup> によって弱く阻害さ

Table 3. Effects of Cu<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> and F<sup>-</sup> on the degradation of AMP, AdR, HxR in crude enzyme of squid ( $\mu$  mole/reaction mixture)

Substrate		AMP				
Incubation time		0	4 hr.			
Additions		—	H <sub>2</sub> O	0.1 M CuCl <sub>2</sub>	0.1 M HgCl <sub>2</sub>	1.1 M NaF
Reaction product	AMP	14.70	11.27	14.80	14.86	14.70
	AdR	0	0	0	0	0
	HxR	0.50	0	0.72	0.25	0
	Hx	2.60	6.26	1.95	2.66	3.19
	Total	17.80	17.53	17.47	17.77	17.89
Substrate		AdR				
Incubation time		0	20 min.			
Additions		—	H <sub>2</sub> O	0.1 M CuCl <sub>2</sub>	0.1 M HgCl <sub>2</sub>	1.1 M NaF
Reaction product	AMP	4.60	4.90	4.80	4.75	4.80
	AdR	7.94	0	2.68	7.00	0
	HxR	0.06	0	3.37	1.00	0.15
	Hx	4.07	12.70	6.15	4.10	12.05
	Total	16.67	17.60	17.00	16.85	17.00
Substrate		HxR				
Incubation time		0	20 min.			
Additions		—	H <sub>2</sub> O	0.1 M CuCl <sub>2</sub>	0.1 M HgCl <sub>2</sub>	1.1 M NaF
Reaction product	AMP	5.00	5.00	5.36	5.20	5.24
	AdR	0	0	0	0	0
	HxR	9.83	0	7.39	9.70	0.91
	Hx	4.20	13.50	6.00	4.25	12.10
	Total	19.03	18.50	18.75	19.15	18.25

Table 4. Effects of  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{F}^-$  and  $\text{PO}_4^{---}$  on the degradation of AdR and HxR added in dialyzed enzyme ( $\mu$  mole/reaction mixture)

Substrate		AdR					
Incubation time		0	60 min.				
Additions		—	$\text{H}_2\text{O}$	0.1 M $\text{CuCl}_2$	0.1 M $\text{HgCl}_2$	1.1 M $\text{NaF}$	20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Reaction product	AMP	0.23	0.26	0.19	0.16	0.16	0.15
	AdR	7.50	0	7.67	7.80	0	0
	HxR	0	0	0	0	0	0
	Hx	0.26	7.51	0	0	7.93	7.26
	Total	7.99	7.77	7.86	7.96	8.09	7.41
Substrate		HxR					
Incubation time		0	60 min.				
Additions		—	$\text{H}_2\text{O}$	0.1 M $\text{CuCl}_2$	0.1 M $\text{HgCl}_2$	1.1 M $\text{NaF}$	20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Reaction product	AMP	0.22	0.23	0.22	0.23	0.20	0.23
	AdR	0	0	0	0	0	0
	HxR	9.40	0	9.14	9.15	0	0
	Hx	0.14	9.75	0.17	0.15	9.50	9.51
	Total	9.76	9.98	9.53	9.53	9.70	9.74

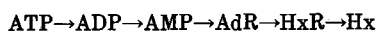
れ、 $\text{F}^-$ は無影響であることがわかる。さらに HxR, 9.83  $\mu$  mole は 20 分の反応で完全に Hx に変化しているが、この反応は  $\text{Hg}^{++}$  と  $\text{Cu}^{++}$  によって阻害され、 $\text{F}^-$ は無影響であった。Lee, C. A. らは AMP, AdR などを基質とした反応については実験していないので結果を比較するわけにはゆかないが、HxR の変化に対する各イオンの影響は全く同じ傾向であった。

次に透析によって磷酸イオンを除去した酵素液を使用して実験を行なった。この酵素液によって HxR との反応を検討し反応に対する磷酸イオンの影響を検討すれば、HxR の分解に関与する酵素が phosphorylase<sup>14)</sup> であるか hydrolase<sup>15)</sup> であるかの判断が出来るであろう。粗酵素液が磷酸イオンの存在を示さなくなるまで低温室 (5°C 前後) でマグネチックスタラーで攪拌しつつ、換水数回を行なって蒸留水で透析を行なうと大体 25~35 時間で目的が達せられる。この透析酵素液によって AdR および HxR を基質とした反応を行ない。あわせて  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{PO}_4^{---}$  の影響を検討し結果を第 4 表に示した。

この結果によると、脱磷酸を行なった透析酵素液は HxR を Hx に変化させる酵素活性を十分に保有していて  $\text{PO}_4^{---}$  は全く無影響であるから、イカ筋肉中の HxR の分解は nucleoside hydrolase によるものと考えてよいであろう。また adenosine deaminase も存在しているため AdR は Hx に変化していた。AMP を脱磷酸する酵素活性は本来強くない上に、透析によってさらに活性の低下が起こったので充分検討しなかった。なお透析酵素液を使用した反応における  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{F}^-$  の影響は粗酵素液の場合と全く同じ傾向であった。ただ、AdR の変化に対する  $\text{Cu}^{++}$  の影響が顕著な阻害を示していることが粗酵素液の場合の弱い阻害に比べてやや異なっているだけであった。このように

各基質の変化に対する3種のイオンの影響が子牛の場合と異なっている事実は、各基質に働らく酵素系のちがいを予想させるものであろう<sup>10)</sup>。

以上の諸結果から考えると、イカ筋肉中のAMPは相対的に遅い脱磷酸に続いて非常に速い脱アミノそして脱リボース反応をこの順序どおりにうけることは、ほとんど確定的である。またATPからAMPまでの分解はすでに知られている常識的な分解をうけるとすると、イカ筋肉中のATPの分解経路は次に示すようになる。



これは先に著者らがイカ筋肉を貯蔵したときにおこるATPの動的変化の研究結果<sup>4)</sup>から推定した分解経路を裏づけるようなものであった。

### 考 察

本実験はスルメイカ筋肉に関するものであるから、ホモジェネート調製のためにスルメイカ筋肉と等張である0.55 M KCl溶液を使用した。しかし、KClの濃度は特定の蛋白質の溶解度と顕著な関連があることから考えると、この場合使用するKCl濃度は一考を要するものであろう。たとえばLee, C. A. らが子牛の筋肉について使用した0.16 M KClでは酵素系の活性は変化するであろうか。この疑問のために、0.55 M KClと0.16 M KClホモジェネートを調製しAMP, AdR, HxRを基質として反応させ、一定時間に消失する基質の量から分解速度を比較し第5表にあげた。

すなわち0.55 Mおよび0.16 M KClホモジェネートの示す各酵素活性の強さには多少の差異がみられるのであって、AdRの脱アミノを行なう酵素およびHxRの脱リボースを行なう酵素は0.16 M KClホモジェネートにおいて強く、AMPの脱磷酸酵素は0.55 M KClホモジェネートにおいて強かった。しかし、3種の酵素活性の強さの比についてはあまり差異はなく、したがってATPの分解経路に関する著者らの仮説には訂正を加える必要はないのである。

本実験は複合酵素系の実験であるため、個々の関連酵素が働らく最適条件については検討していない。そこで次にpH 9.7, 7.4および5.4の緩衝液を使用して各基質に対する反応を行なってみた。その結果を第6表に示す。

この結果によると、以上の実験条件ではAMPはpH 7.4で、HxRもpH 7.4で、そしてAdRはpH 7.4および9.7で相対的に強い活性が見られるけれども、いづれも他のpHの場合と大差はないので、この要因もATPの分解経路に関する前述の推定と矛盾しなかった。なお各酵素の最適条件に関する問題は今後さらに充分な検討が必要であろう。

本報告の実験結果はスルメイカ筋肉に関するものであるが、一方ヤリイカ(*Doryteuthis bleekeri*)筋肉では各酵素の活性が一般にやや弱い傾向がある他は各基質の分解の速さの比は、スルメイカ筋肉の場合と大差なかった。

Table 5. Comparison of the degradation rate of AdR, HxR and AMP added in crude enzyme with 0.55 and 0.16 M KCl solution

Substrate	Main reaction product	Incubation time	Crude extract with	
			0.55 M KCl	0.16 M KCl
AdR	HxR	1 min.	5.66	7.15
HxR	Hx	20 min.	3.49	5.95
AMP	Hx	5 hr.	7.05	5.94
(μ mole converted)				

Table 6. The rate of degradation of AMP, AdR and HxR added in crude enzyme of squid muscle at pH 5.4, 7.4 and 9.7 ( $\mu$  mole/reaction mixture)

Substrate		AMP			
Incubation time		0	5 hr.		
pH			9.7	7.4	5.4
Reaction product	AMP	9.78	8.74	7.66	8.60
	AdR	0	0	0	0
	HxR	0.25	0.05	0.30	1.45
	Hx	0.90	1.80	2.65	0.15
	Total	10.93	10.59	10.61	10.20
Substrate		AdR			
Incubation time		0	1 min.		
pH			9.7	7.4	5.4
Reaction product	AMP	2.96	2.80	2.90	2.73
	AdR	5.05	3.29	3.19	3.55
	HxR	0.20	2.62	2.85	2.44
	Hx	1.28	0.89	1.04	0.89
	Total	9.49	9.60	9.98	9.61
Substrate		HxR			
Incubation time		0	15 min.		
pH			9.7	7.4	5.4
Reaction product	AMP	3.00	3.16	3.10	3.18
	AdR	0	0	0	0
	HxR	9.61	9.00	7.86	8.50
	Hx	0.72	1.10	2.49	1.71
	Total	13.33	13.26	13.45	13.39

Reaction mixture: 2 ml, crude enzyme+1 ml, substrate soln.+2 ml., buffer

Buffer: Borax-NaOH (pH 9.7) Tris-NaOH (pH 7.4) Acetate (pH 5.4)

### 要 約

スルメイカ粗酵素液による 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によって分析し検討した。

1) 37°C で加温すると、各基質は次のような変化をする。

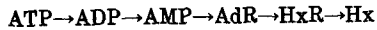
AMP→Hx, 7.60 $\mu$  mole/6 hrs., AdR→Hx, 6.02 $\mu$  mole/1 min., HxR→Hx, 1.48 $\mu$  mole/5 min.

したがって、相対的に強い Adenosine deaminase の存在が予想される。

2) 5'-nucleotidase を粗酵素液に添加すると、AMP の脱磷酸が促進されることによって、Hx の生成が進行する。したがって一連の分解経路のうち、AMP の脱磷酸反応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  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{F}^{-}$  の影響を検討した。この結果を先に C. A. Lee らが子牛について報じた結果と比較した。
- 4) 透析した粗酵素液によっても, HxR の脱リボース反応が行なわれることから, nucleoside hydro-lase の存在が予想される。
- 5) 以上の結果から, スルメイカ筋肉中の ATP の分解経路は次のように考えられる。



謝辞 本研究の遂行にあたり, 終始御懇切な御指導を賜った斎藤恒行教授, 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期大学田中ツネ講師に深甚の謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄・寺本四郎 (1965). 醸酵工学誌 **43**, 35.
- 2) 小原正美・前田清一・小俣 靖・松野武雄・氏家勇次郎 (1964). 日本農芸化学関東支部大会講演.
- 3) 中島宣郎・市川恒平・鎌田政喜・藤田栄一郎 (1961). 農化誌 **35**, 803.
- 4) 斎藤恒行・新井健一・田中ツネ (1958). 北大水産集報 **9**, 121.
- 5) 新井健一 (1961). 同誌 **11**, 67.
- 6) ——— (1961). 同誌 **11**, 225.
- 7) ———・古河俱江・斎藤恒行 (1961). 同誌 **12**, 66.
- 8) Arai, K. and Saito, T. (1961). *Nature* **192**, 451.
- 9) 新井健一 (1966). 日水誌 **32**, 174.
- 10) Lee, C. A. and Newbold, R. P. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 349.
- 11) Jones, N. R. (1960). *The analyst* **85**, 111.
- 12) 新井健一・斎藤恒行 (1963). 日水誌 **29**, 168.
- 13) ——— (1966). 昭和 41 年学位論文 (北海道大学水産学部).
- 14) Tarr, H. L. A. (1955). *Biochem. J.* **59**, 386.
- 15) Tarr, H. L. A. (1958). *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**, 517.