HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	コイ筋肉の脱分枝酵素に関する研究
Author(s)	柴田, 猛; 広瀬, 裕; 川田, 倫夫
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 38(3), 293-300
Issue Date	1987-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23962
Type	departmental bulletin paper
File Information	38(3)_P293-300.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
38(3), 293-300. 1987.

コイ筋肉の脱分枝酵素に関する研究

柴田　猛*・広瀬　裕*・川田倫夫*

Studies on the Glycogen Debranching System of Carp Skeletal Muscle

Takeshi SHIBATA*, Yutaka HIROSE*
and Michio KAWADA*

Abstract

In order to obtain further information about the glycogen degrading metabolism in fish skeletal muscle, the glycogen debranching system (EC. 2.4.1.25+EC. 3.2.1.33) of carp skeletal muscle was investigated and compared with that of bonito muscle. The results obtained are as follows:

(1) Optimal pH and temperature are pH 6.1 and 37°C, respectively.

(2) Michaelis constant is 0.09% and substrate specificity for phosphorylase-limit dextrin is the highest.

(3) The titration of SH groups in the presence of SDS revealed 18 thiol groups per molecule; for 50% decreases in the catalytic activity, 35% of total thiol groups are reactive. Soluble starch protected the enzyme against modification of thiol groups with DTNB.

(4) The carp enzyme is stable in the pH range of 5 to 7 and up to the temperature of 35°C.

(5) Triethanolamine and Tris concentration for 50% decreases in the activity is 25 mM and 10 mM, respectively.

(6) Despite overall similarities, the number of total thiol groups are markedly different between the carp and bonito enzymes.

脱分枝酵素 (glycogen debranching system: EC. 2.4.1.25+EC. 3.2.1.33) は二つの機能，すなわちグルコシル転移と α-1, 6-結合を切断するグルコシダーゼ活性を同時にもつ酵素で，ホスホリラーゼに協力してグリコーゲンの分解を解糖方向に進行させる。白身魚と赤身魚の筋肉の死後の解糖系の分解速度に差があることが知られているが，ホスホリラーゼの性質を白身と赤身の両魚種について比較したが，そのグリコーゲンの分解速度の違いを十分に説明出来る結果が得られていない。そこで，グリコーゲン分解系に関与する本酵素の役割に注目した。これまでカツオ筋肉の本酵素についての精製法と諸性質を報告した[1]。赤身魚と白身魚の死後の解糖速度の違いを本酵素によって解明できるかどうかの可能性を追求するのを目的として，白身魚の例としてコイの本酵素の性質を検討したので，カツオの本酵素との性質の比較を述べる。

実　験　法

試料　コイ (*Cyprinus capio*) は市販の活魚を用いた。

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

酵素活性の測定 本酵素活性の測定のための反応組成液は Nelson 法[2] に従い，30°C, 10 分間の反応を行い，0.3 M $HClO_4$ で反応を停止させ，KOH の中和上清液についてグルコース量を hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase のカップリング法[3] を用いて測定した。

たんぱく質の測定，SH 基の測定および基質の調製などについて前報[1] に述べたのと同様に行った。

酵素の精製 精製法はカツオ筋肉の場合に述べた方法[1] と同様に行った。すなわち，コイ筋肉を 2.5 倍量の 4 mM EDTA (pH 7.0) で抽出し，45% 硫安分画区分を 5 mM トリス－1 mM EDTA-10 mM mercaptoethanol 緩衝液で予め平衡化した DEAE-cellulose カラムに吸着させ，5 mM NaCl を含む同緩衝液で洗浄後，50 mM NaCl を含む緩衝液で本酵素を溶出し，さらに同じ緩衝液で平衡化した ω-amino-butyl-agarose カラムに吸着させ，500 mM NaCl を含む緩衝液で溶出する。この精製酵素は比活性度は 1.95～2.20 (抽出液では 0.029～0.035) を示し約 55～76 倍の精製度であった。(カツオの場合は比活性度は 2.78 で 130 倍に精製された。) デスク電気泳動法では一本のバンドであったが，SDS 電気泳動法では本酵素のバンド以外にまだ二本の minor の不純たんぱく質のバンドが観察された。

実 験 結 果

至適-pH マレイン酸緩衝液を用いて，至適-pH を求めた結果を図 1 に示した。図に見られるように至適-pH は pH 5.8-6.2 の間にあり，pH 5.0 以下および 7 以上では活性低下が起こり，比較的 pH の至適範囲は狭い。カツオの本酵素の至適 pH とほとんど同じであった。

至適温度 至適温度は図 2 に示したように 35～40°C 付近にあり，前報[1] に述べたように，カツオの本酵素は 32～33°C に至適温度をもつので，それに比べてコイの方が 5°C 程至適温度が高く，しかも温度活性曲線は緩やかであった。

基質濃度の効果 酵素作用に対する限界デキストリンの濃度効果を図 3 に示した。0.6% 付近の濃度で最大値を示すことはカツオの場合と似ていた。しかし，その後の濃度増加による活性阻害の程度はカツオより低かった。阻害を受けない範囲から，グラフで求めた K_m は 0.09% となりカ

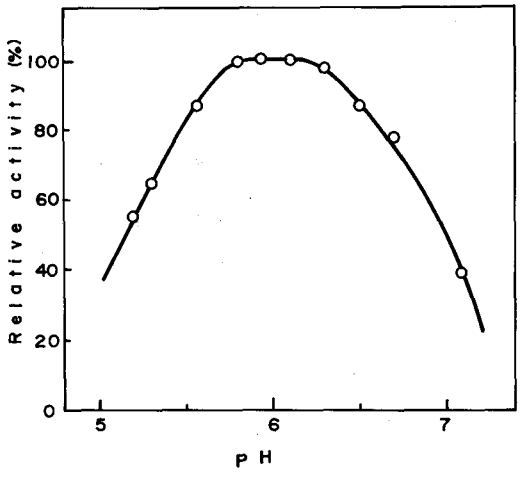

Fig. 1. Effect of pH on the activity of carp glycogen debranching system. Maleate buffer was used at 0.02 M concentration.

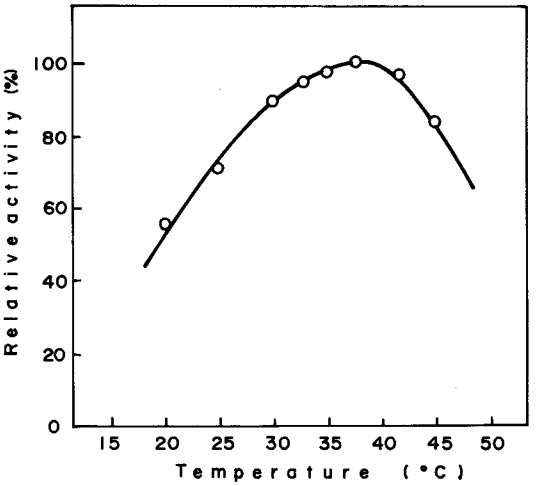

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of carp glycogen debrahching system.

ツオ[1]やウサギ[2]の値よりも大きかった。

基質特異性 2, 3の多糖類についてその基質特異性を検討した。その結果を表1に示した。ホスホリラーゼ限界デキストリンを基質としたときの活性に対する相対活性で表わした。各多糖類に対する分解程度はカツオの場合とほとんど同じであった。

SH基の反応性 本酵素もカツオの場合と同様にSH-還元剤の存在で安定化するが，10 mMのメルカプトエタノールの存在は活性に効果がないことから，そこでSH基の存在状態を検討した。まずSDSの存在下での全SH基数を測定した。その結果，酵素一分子当たりの全SH基数（分子量を165000と仮定して）は18個になりウサギ[4]は勿論のこと，カツオ[1]やツノザメ[5]の数とも大きく異なり，その数はそれらの値の半分より僅かに多いだけであった。

次に活性低下と反応性SH基数との関係を検討したその結果を図4に示した。反応するSH数が増加するに従い活性が低下した。50%の失活がみられたときの反応したSH基数は全SH基数

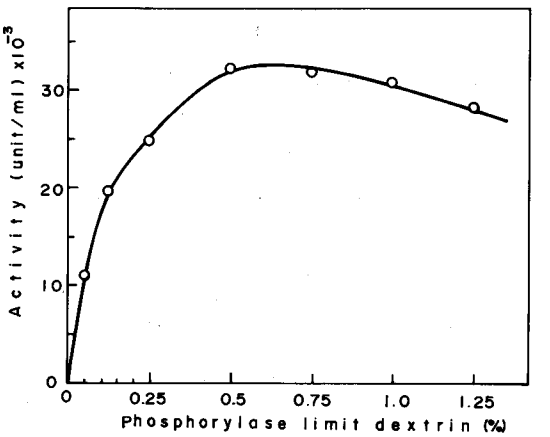

Fig. 3. Effect of substrate concentration on the activity of carp glycogen debranching system.

Table 1. Substrate specificity of glycogen debranching system from carp muscle.

Substrates	Enzyme Concentration (unit/ml)	Relative Activity (%)
Phosphorylase limit-dextrin	0.13	100
Glycogen	2.76	0.7
Soluble Starch	2.76	1.1
Amylopectin	2.76	0.2
Pullulan	2.76	0.3

Carp enzyme: specific activity = 1.95.

の 40% (7-8 個) になり，測定した範囲では完全に失活しなかったが，30 分では 93% の活性低下がみられ 73% (13 個) の SH 基が反応していた。これらの SH 基の反応数と活性低下の割合との関係はカツオの場合と同じであったが，それに達するまでの時間はカツオの場合と異なった。すなわち，初期の活性低下が速く，50% 失活には 6 分，50% SH 基が反応するための時間は 8 分とそれぞれカツオの場合の半分の時間で作用した。しかし，それに対して SDS の存在下における SH 基の反応性はカツオの場合よりも遅かった。すなわち，55% の SH 基が反応するのに 4 分かかり，カツオのときよりも 2 倍の時間を要し，30 分でもまだ未反応の SH 基を残し 60 分でやっと平衡になった。活性に関連する SH 基の構造維持という点ではカツオより緩やかと推定され，また，コイにはカツオに比べてより固い SH 基に関連する構造コアが存在すると推定された。

カツオの本酵素の SH 基がグリコーゲンおよび可溶性デンプンによって保護される。コイについても同じ試みを行った。2.5% の可溶性デンプンの添加により活性の低下と SH 基の反応性が抑えられたが，その保護作用はカツオにみられたよりも小さかった。すなわち，可溶性デンプンの

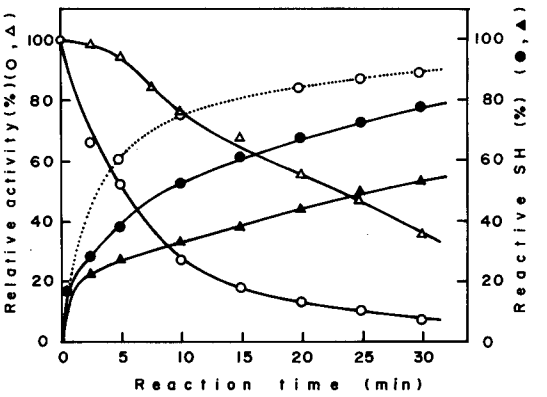

Fig. 4. Titration of SH groups in carp glycogen debranching system.
The enzyme (0.34 mg in 0.2 ml) was added to 2.8 ml of 10 mM phosphate-1 mM EDTA buffer (pH 8.0) with (closed mark) or without (open mark) soluble starch (final concentration: 2.5%). The mixture were titrated with 0.02 ml of 10 mM 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) at 25°C and the reaction was stopped by diluting with 10 mM maleate-140 mM β-mercaptoethanol buffer (pH 6.5). The reaction was followed by changes in absorbancy at 412 nm and enzyme activity was determined. For total SH groups determination, the phosphate buffer contained 2% SDS (dotted line).

存在しない条件ではほとんど失活した30分付近では残存活性は35%しかなく，SH基は50%が反応しており，カツオに比べて各々半分の値であった。しかし，初期の活性低下については十分に保護効果を示した。

トリスとトリエタノールアミンの阻害　ウサギの本酵素は緩衝液の種類により至適-pHが異なり，またカチオニック緩衝液，特にトリスによる阻害が報告[2]されている。ここではトリスとトリエタノールアミンの阻害の程度を検討した。これらの緩衝液は活性測定によく用いるからである。マレイン酸緩衝液に各試薬を加えて測定された。トリエタノールアミンの効果を図5に示した。図にみられるように，5 mMの濃度で25%，25 mMで50%の活性低下を示した。トリスの場合を図6に示した。5 mMの濃度では43%の阻害を示し50%阻害は約10 mMのトリスでえられ，トリスの方が前者よりも阻害の程度が大きかった。また同時にカツオの本酵素の結果も示した。ト

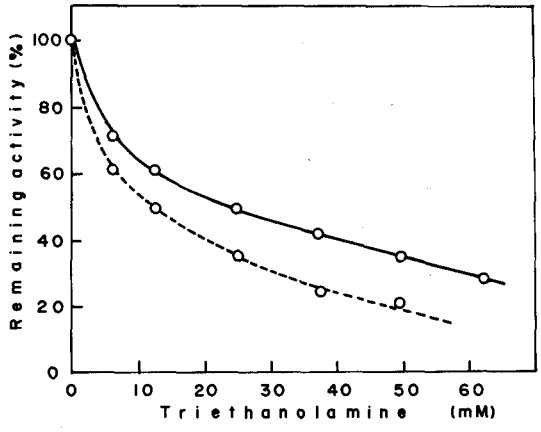

Fig. 5. Effect of triethanolamine on activity of carp glycogen debranching system.
Full line: carp enzyme (3.5×10^{-3} unit in the reaction mixture); broken line: bonito enzyme (4.5×10^{-3} unit in the reaction mixture).

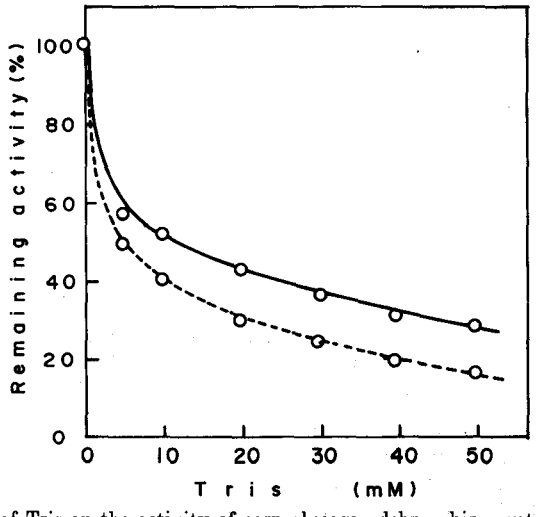

Fig. 6. Effect of Tris on the activity of carp glycogen debranching system.
Full line: carp enzyme; (3.5×10^{-3} unit); broken line: bonito enzyme (5.0×10^{-3} unit).

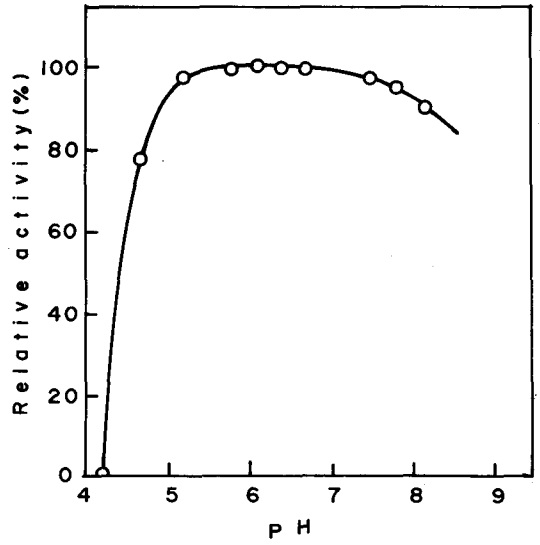

Fig. 7. pH stability of carp glycogen debranching system.
The enzyme (0.37 mg/ml) was preincubated with various pH of 0.01 M McIlvaine buffer for 15 min at 30°C. The preincubation mixture was diluted with cold 0.5 M phosphate-0.05% gelatine buffer (pH 6.5) and then the enzyme activity was assayed.

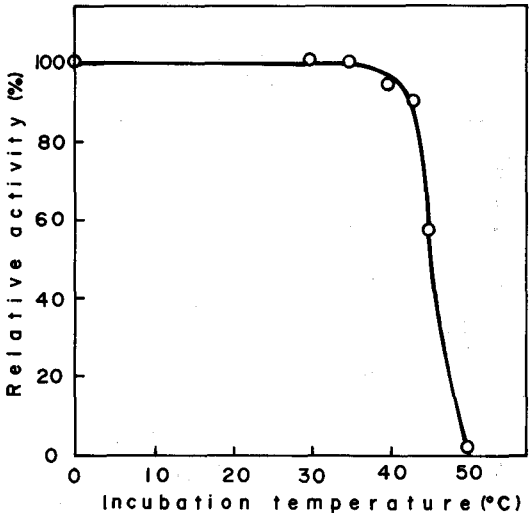

Fig. 8. Temperature stability of carp glycogen debranching system.
The enzyme (1.12 mg/mg) was preincubated with 50 mM maleate buffer (pH 6.1) at various temperature for 15 min. The preincubation mixture was diluted with cold 0.1 M maleate-0.05% gelatine-1 mM EDTA buffer (pH 6.1). Aliquot was removed and the enzyme activity was assayed.

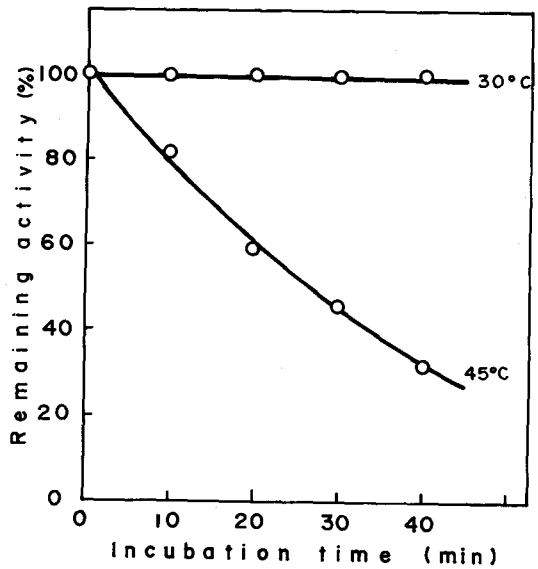

Fig. 9. Inactivation rate of carp glycogen debranching system.
Experimental conditions were the same as described in Fig. 8, except that the preincubations at two constant temperatures were carried out for various times. The inactivation rates of the enzyme were calculated according to first order kinetics.

リエタノールアミンにおいては，5 mM では 35%, 12 mM は 50% の活性の低下を示した。トリスにおいては，5 mM では既に 50% まで阻害されたが 40 mM では 80% の阻害を示した。トリスの方が阻害作用が強いことが共通の傾向としてみられたが，コイの場合よりも，カツオの本酵素がこれらのアミン緩衝液に阻害が受け易かった。

pH 安定性　pH に対する酵素の安定性を検討した。30°C で 15 分間の保温における各 pH での安定性を図 7 に示した。図にみられるように pH 5.0～7.0 の間で安定性を示した。この曲線はカツオの場合に比べてやや酸性側にずれていた。

温度安定性　酵素の温度安定性を検討した。酵素を pH 6.1 の 10 mM のマレイン酸緩衝液中に各温度に 15 分間保温した後の残存活性を測定した結果を図 8 に示した。図にみられるように，35°C 付近までは安定であり，40°C を越えると急激に失活する。半減期の温度は 45°C にあり，カツオの本酵素 (43°C) よりやや高かった。図 9 にはコイ酵素の 30°C と 45°C の保温中における失活の時間経過を示した。30°C には酵素活性の低下がみられないが，45°C は酵素活性の低下がみられ失活速度を一次式から求めると 1.9×10^{-4} (sec^{-1}) となり，同温度で求めたカツオの本酵素の失活速度も 1.7×10^{-4} (sec^{-1}) となり全く一致した。

考　　察

ここではコイとカツオの本酵素について比較を試みた。至適温度と温度安定性の温度に関係する性質に，コイの本酵素の方が見かけ上より高い安定性のある結果になったが，両種の本酵素は 35°C まで安定性をもち，45°C での失活速度も同じであるので，これらの性質も他の諸性質と同様にカツオの本酵素とほとん同じであると推定される。大きな相違は全 SH 基数で，コイの場合はカツオの値の 2/3 の数であった。ここで述べた SH 基は SDS 存在下の DTNB により滴定された SH

に限定されるので,-S-S-結合を含んでおらず,必ずしも酵素たんぱく中の全システイン量を表わしていない。コイとカツオの両酵素のシスティン含量はそんなに違いがないと想像されるので,コイの構造的コアは-S-S-結合に由来するかもしれない。しかしながら,酵素活性に関するSH基数や存在状態の構造的差異にはカツオとの違いは少ないと推定される。阻害作用の違いも含めてこれらの諸性質とSH基も含めた酵素構造との対応についての詳細な情報がないので,両種の魚類酵素の違いを説明出来ないが,これまでの結果から推定して類似性が大きいと考えられる。

また,これらの性質や構造の違いから赤身魚と白身魚による死後のグリコーゲンの分解速度の差を説明出来なかった。生体内における速度の違いはこれらの酵素の測定範囲外の細かい性質の違いの積み重ねや,細胞内の存在状態の違いが表面に大きく現われるものと考えられる。グリコーゲン分解に関係しては,ホスホリラーゼと脱分枝酵素の濃度,性質やその外の代謝物の効果など種々の細胞内の因子の共存により支配されるものと推定される。

目　　約

白身魚のコイ筋肉におけるグリコーゲン分解代謝の詳細を知るためにグリコーゲン脱分枝酵素の性質を研究し,カツオのそれとの比較を試みた。得られた結果は次の通りである。

(1) 至適-pHは6.1,至適温度は37°C付近にあった。

(2) ミハエリス恒数は0.09%となり,基質特異性は限界デキストリンに比べて他の多糖類の分解はほとんどみられなかった。

(3) 全SH数は一分子あたり18個となり,50%の活性低下には35%のSH基の反応が必要である。また,多糖類の添加はSH基の反応を保護する。

(4) pH安定性は5～7の間にあり,温度安定性は35°Cまで安定であった。

(5) アミン類による阻害において,50%の活性低下を示すトリエタノールアミン濃度は25 mM (カツオの場合には12 mM), トリスの場合は10 mM (カツオは5 mM) であった。

(6) カツオの本酵素と比較して多くの性質において類似していたが,全SH数に相違 (カツオの場合の2/3) が認められた。

文　　献

1. 柴田 猛・広瀬 裕・川田倫夫 (1987). カツオ筋肉の脱分枝酵素に関する研究. 日水誌 **53**, 1261-1267.
2. Nelson, T.E., Kolb, E. and Larner, J. (1969). Purification and properties of rabbit muscle amylo-1, 6-glucosidase oligo-1, 4 → 1, 4-transferase. *Biochemistry* **8**, 1419-1428.
3. Kunst, A., Draeger, D. and Ziegenhorn, J. (1981). D-glucose: UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. p. 163-172. In Bergmeyer, H.U. (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. VI, 701 p. 3rd Ed. Verlag Chemie, Weinheim.
4. Taylor, C., Cox, A.J., Kernoham, J.C. and Cohen, P. (1975). Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Purification, properties and physiological role. *Eur. J. Biochem.* **51**, 105-115.
5. Becker, J-U., Long, T.J. and Fischer, E.H. (1977). Purification and properties of debranching enzyme from dogfish muscle. *Biochemistry* **16**, 291-296.