

# 魚類の肉質変化に関する生化学的研究—XI\*

## 魚肉 actomyosin 区による ATP の分解

日 高 富 男 ・ 斎 藤 要

### Studies on the Biochemical Change in Fish Muscle—XI

#### On the Enzymic Degradation of ATP by Unpurified Actomyosin Fraction of Fish Muscle

Tomio HIDAOKA and Kaname SAITŌ

In this paper, we dealt with the enzymic degradation of ATP shown by unpurified actomyosin fractions prepared from muscle of mackerel, in the following elements, the amount of inorg. -P,  $\text{NH}_3$  and adenosine polyphosphate. The results obtained were summarized as follows.

In the actomyosin fraction, the activity of AMPdeaminase was distinctly observed (Fig. 1). Then the amount of  $\text{NH}_3$  and inorg. -P in the mixed solution of ATP and the actomyosin fraction showed comparatively rapid increase at the beginning of the enzymic reaction (Table 1 and Fig. 2). In this stage, the amount of ATP and ADP fraction in the same solution showed a reducing tendency (Fig. 3). On the other hand, when the actomyosin fraction was held at  $50^\circ\text{C}$ . for 30 min., the mixed solution showed no considerable change in amount of inorg. -P and ATP (Table 2 and Fig. 4).

Moreover, the quantity of inosine fraction which was derived from the breakdown of AMP fraction, increased rapidly in the solution to be almost the same in both case above mentioned (Fig. 3 and 4).

According to these results, it was considered that the activity of ATPase ( $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{Pi}$ ), myokinase ( $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ ) and AMPdeaminase ( $\text{AMP} \rightleftharpoons \text{IMP} + \text{NH}_3$ ) was present in the unpurified actomyosin fraction of fish muscle.

前報<sup>1)</sup>において著者等は魚類筋肉中の AMPdeaminase の酵素学的性質を明らかにし、且つ魚肉の actomyosin 区に ATPase 作用と共にかなり顕著な AMPdeaminase 作用を認めた。筋肉中の myosin 系蛋白質はそれ自体筋肉蛋白の主要成分をなし、筋肉収縮機能の構成体であり、同時に adenosine polyphosphate を分解する数種の酵素系を含む酵素集団であることが知られている。斎藤、新井等<sup>2)</sup>はコイ肉の死後経過時間に伴う核酸系化合物の変化を追跡し、その変化の過程は  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} \rightarrow \text{inosine} \rightarrow \text{hypoxanthine}$  なる段階を踏んで分解されるものと推測している。また古江<sup>3)</sup>は glycerin 処理筋を ATP で短縮した場合に急速な無機磷酸 (Pi) の生成に伴う  $\text{NH}_3$  の発生を認め、これは AMP, adenine から脱アミノされたものと報告している。

著者等は *in vitro* の条件において ATP に魚肉の actomyosin 区を作用させた場合も ATP の脱磷酸により遊離する Pi の他に  $\text{NH}_3$  を発生することを見出し、その変化の過程を COHN & CARTER<sup>9)</sup> のイオン交換樹脂に依る adenosine polyphosphate 定量法で追求し、actomyosin 区中に含まれる数種酵素の関連性の解析を試みて若干の知見を得た。

\* 本報告の一部は 1958 年 4 月 日本水産学会年次大会 (東京) で発表した。

## 実験方法

1. **actomyosin 区液の調製.** 前報<sup>1)</sup> 同様サバ肉より氷冷 BAILEY 液 10 倍量で 4~5 時間抽出した後遠沈, その抽出原液に 20 倍量の氷冷水を加えて放置し, 析出する actomyosin 沈澱を集めて終濃度 0.5 M KCl 液に溶解したものである. この際本実験の目的からより以上の精製は行わなかった.

2. **adenosine polyphosphate の分析法.** COHN & CARTER 等のイオン交換法に準じた宮崎<sup>4)</sup>, 斎藤等<sup>2)</sup> の方法を用いた.

樹脂: Amberlite IRA-400 を宮崎等<sup>4)</sup> の方法に依つて前処理したものを 1.0 cm<sup>2</sup> × 12 cm の樹脂柱として使用した.

展開液: 0.01 N NH<sub>4</sub>Cl…… I 液 (adenine, adenosine 区分)

0.003 N HCl…… II 液 (AMP 区分)

0.02 N NaCl, 0.01 N HCl …… III 液 (ADP 区分)

0.2 N NaCl, 0.01 N HCl …… IV 液 (ATP 区分)

展開液の流速は 1 ml/min. とした.

測定: 各流出液を 20 ml 毎に分割し, 日立分光光度計 (EPU-2 型) にて 250 m $\mu$ , 260 m $\mu$  の吸光値を求めた.

3. **NH<sub>3</sub> 定量法.** NH<sub>3</sub> は柴田製微量拡散検測器を用いて CONWAY<sup>5)</sup> の微量拡散法にて定量した.

4. **無機磷酸 (Pi) 定量法.** FISKE & SUBBAROW 法<sup>10)</sup> にて比色定量した.

## 実験結果

### 1. AMP の分解による Pi, NH<sub>3</sub> の生成

AMP 液 (0.25%) 7.5 ml, 酢酸緩衝液 (PH 6.5) 25 ml, actomyosin 区液 (protein-N 60 mg%)

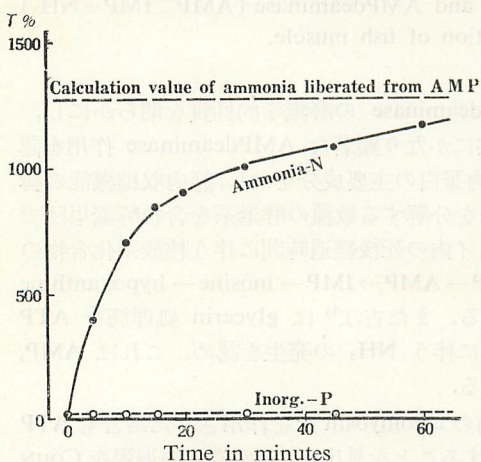


Fig. 1. Changes in amounts of inorg.-P and NH<sub>3</sub> liberated from AMP by the enzymic action of actomyosin fraction isolated from mackerel muscle.

[AMP]:  $1.3 \times 10^{-3}$  Mol/L, Acetate buffer at pH 6.5, Incubated at 38°C.

10 ml を混和, 38°C に放置する. 所定時間後反応液 5 ml をとり 4% HCl 2 ml を添加して反応を止め, 遠沈してその上清について NH<sub>3</sub> と Pi を定量した. 反応時間 0 における夫々の量を対照値として, 各時間後における定量値より差引き生成量を算出した. その結果は Fig. 1 の如くである. この結果より前報<sup>1)</sup> でも報告した通り actomyosin 区によつて AMP は脱アミノされ NH<sub>3</sub> を生成することは明らかである. その生成量は反応初期 20 分間頃までは急激に増加し, その後徐々に増して反応 60 分間後の NH<sub>3</sub> 量は反応液中の AMP を脱アミノして生じ得る NH<sub>3</sub> 計算量の約 85% 位に達している. 之に対し AMP から脱磷酸する作用は全くみられず, Pi の増加は認められなかった.

## 2. ATP の分解による Pi, NH<sub>3</sub> の生成

魚肉 actomyosin 区-ATPase 作用の最適 pH は pH 9.0 にあり, AMPdeaminase のそれは pH 6.5 であるが, ATPase は pH 6.5, AMPdeaminase は pH 9.0 においてもかなりの活性を有し夫々最適条件にて反応させた時の 70~90% の活性を示す (前報参照). 又両酵素系は他の作用条件にも類似性があるので, ATPase と AMPdeaminase とが共存している actomyosin 区を ATP に作用させた場合これらの酵素は同一条件においても何等かの関連をもつて ATP の分解に与る事が推察される. そこで ATP を pH 6.5, pH 9.0 の条件にて actomyosin 区で分解し Pi と NH<sub>3</sub> の量的変化を検討してみた. 即ち ATP 液 (Δ7 P 23mg%) 5ml, 緩衝液 (glycine-NaOH 緩衝液 pH 9.0 又は酢酸緩衝液 pH 6.5) 5ml, 0.18 N CaCl<sub>2</sub> 液 0.5ml, actomyosin 区液 (protein-N 55mg%) 10ml を混和, 30°C に放置して反応させる. 所定時間後反応液 2 ml をとり 5% TCA 5ml 加えて反応を止め, 遠沈してその上清について Pi と NH<sub>3</sub> を定量した. 反応時間 0 における夫々の量を対照値として各時間後の定量値より差引き生成量を算出した. その結果は Fig. 2 の如くであつて, Pi 生成量は pH 9.0 と pH 6.5 とでは後者の方が生成量は大きく, 又通常精製した actomyosin 区-ATPase では ATP の一つの Pi を遊離するに止まるとされており, 実際十分に精製した actomyosin 区ではその事を裏付けする実験結果<sup>11)</sup>を得ているが, 本実験では供試 ATP の理論的 1 Pi 量より多い Pi を遊離する結果であつた. この事実は本実験で用いた actomyosin 区による分解反応が ATP から ADP の過程で止まらず更に脱磷酸されていく事を示し, actomyosin 区中に ADPase 又は myokinase の存在が考えられる. 一方 NH<sub>3</sub> 生成量は反応の進行に従い Pi 生成と同様の傾向で増加し, pH 6.5 における NH<sub>3</sub> の生成量は pH 9.0 の場合の約 2 倍量に達している. 即ちこの反応系では deaminase 作用も正常な酵素反応を行つているものと推測される. この際の NH<sub>3</sub> 生成量は計算値の 80%程度におよんでおり, AMP に作用させた場合と同様の分解率を示している. この NH<sub>3</sub> を発生する母体が AMP であるとすれば, さきの脱磷酸の過程と考えると ATP が AMP にまでなる経過を段階的に追跡しなければならない.

## 3. ATP 分解液の adenosine polyphosphate

所定条件下で ATP に actomyosin 区を作用させて生ずる ATP 分解物を分割定量して ATP の分解過程と特に NH<sub>3</sub> の生成母体を明らかにしようと考え次の実験を試みた. 即ち ATP 液

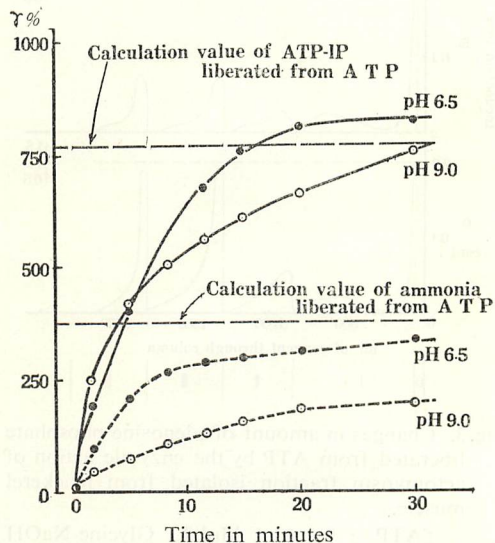


Fig. 2. Changes in amount of inorg. -P and NH<sub>3</sub> liberated from ATP by the enzymic action of actomyosin fraction isolated from mackerel muscle.

[ATP]:  $9 \times 10^{-4}$  Mol/L, Acetate buffer at pH 6.5 or glycine-NaOH buffer at pH 9.0, Incubated at 30°C.

— Amount of inorganic phosphate  
 - - - - - Amount of ammonia-N

Table 1. Amounts of inorg. -P and NH<sub>3</sub> liberated from ATP by the enzymic action of actomyosin fraction isolated from mackerel muscle. (%)

Incubation time (minutes)	0	5	15
Inorg. -P	0	1690	1790
NH <sub>3</sub> -N	0	290	510

[ATP]:  $9 \times 10^{-4}$  Mol/L, Glycine-NaOH buffer at pH 9.0, Incubated at 30°C.

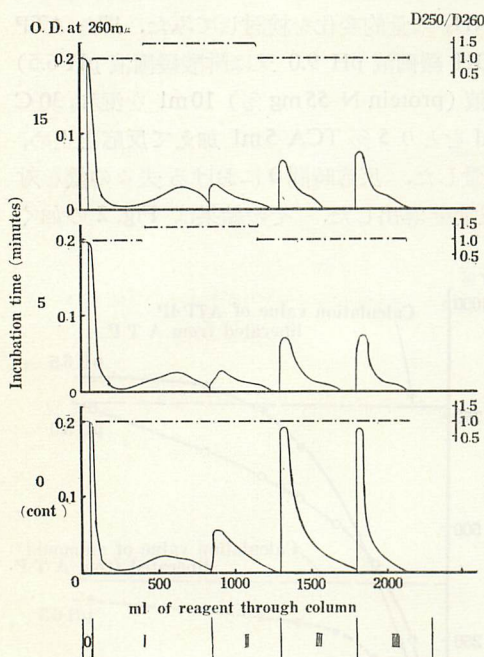


Fig. 3. Changes in amount of adenosine phosphate liberated from ATP by the enzymic action of actomyosin fraction isolated from mackerel muscle.

[ATP]:  $9 \times 10^{-4}$  Mol/L, Glycine-NaOH buffer at pH 9.0, Incubated at 30°C.

Exchanger;

Amberlite IRA-400, 1.0 cm<sup>2</sup> × 12.0 cm, 100-300 mesh.

Eluting solution;

0 ..... Passed solution  
 I ..... 0.01 N NH<sub>4</sub>Cl  
 (adenine, adenosine fraction)  
 II ..... 0.003 N HCl  
 (AMP fraction)  
 III ..... 0.02 N NaCl in 0.01 N HCl  
 (ADP fraction)  
 IV ..... 0.2 N NaCl in 0.01 N HCl  
 (ATP fraction)

Flow speed: 1.0 ml/min.

The conditions of exchanger and eluting solution are applicable in Fig. 4.

3 ml, 緩衝液 3 ml, 0.18N CaCl<sub>2</sub> 0.3 ml, actomyosin 液 6 ml を 50ml 容フラスコにとり 30°C で所定時間放置し, 直ちに 5% TCA 15ml を添加し反応を停止して東洋濾紙 No. 5C で濾過, その濾液の一部で Pi, NH<sub>3</sub> を定量, 別に残液を NH<sub>4</sub>OH で pH 8~9 とし, 予め準備したイオン交換樹脂柱で adenosine polyphosphate を分割測定した. adenine 系物質は 260m $\mu$  の吸光値で表わし, 又 inosine の混在を観知するため D250/D260 を算出し図示した.

ATP の分解過程: 反応時の pH 条件を glycine-NaOH 緩衝液 pH 9.0 とし ATP に actomyosin 区を対照, 5, 15 分間作用させ, 各々について Pi と NH<sub>3</sub> の生成量とイオン交換法で求めた溶離曲線を示すと Table. 1 及び Fig. 3 の如くである. Table. 1 によると Pi は反応 5 分間で急増し, 反応後 5~15 分の間では増加量が少い. NH<sub>3</sub> 量も反応初期 5 分間に比し, 反応後 5~15 分間の増加量は少い. 次いで Fig. 3 の溶離曲線を観察すれば, 対照にも IV 液区分の他に I, II, III 液区分に溶離物が見られるが D250/D260 は全区分を通じて 1.0 又はそれ以下である. 5 分間, 15 分間分解液の溶離曲線では対照に比し III, IV 液区分は減少しており, しかも IV 液区分の減少に比べ III 液区分の減少もかなり大きい. これらにおいても III, IV 液区分の D250/D260 は 1.0 以下で全く inosine の出現は認められないが, I, II 液区分では D250/D260

が 1.5 附近となり AMP, adenine が脱アミノされて IMP, inosine に変る機構の存在することがうかがわれる。一方 III, IV 液区分の D250/D260 値が 1.0 以下であることよりこの区分に inosine 系物質の混在は否定され, ATP 及び ADP は脱アミノされていないとみられるから ATPdeaminase, ADPdeaminase の作用は一応考えられない。

熱処理 myosin 区による ATP の分解: ATP の分解に供する actomyosin 区を予め 50°C, 30 分間加熱処理して ATPase を破壊した状態の区分と無処理の区分とに分ち, それらによる ATP の分解過程について検討した結果は Table. 2, Fig. 4 の如くである。Table. 2

Table 2. Amounts of inorg. -P and NH<sub>3</sub> liberated from ATP by the enzymic action of actomyosin fraction kept at 50°C. for 30 minutes. (r %)

Incubation time (minutes)	0	15	15*
Inorg. -P	0	160	1280
NH <sub>3</sub> -N	0	440	640

[ATP]:  $1.5 \times 10^{-3}$  Mol/L, Acetate buffer at pH 6.5, Incubated at 30°C.

\* The result was obtained from actomyosin fraction without the heating treatment.

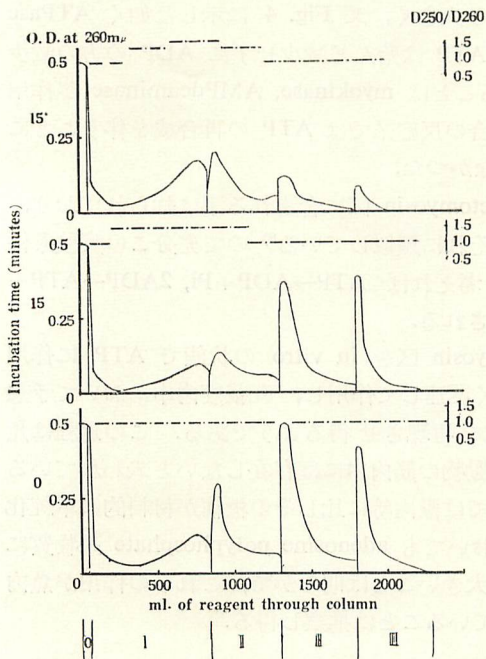


Fig. 4. Changes in amount of adenosine phosphate liberated from ATP by the enzymic action of actomyosin fraction kept at 50°C. for 30 min.

[ATP]:  $1.5 \times 10^{-3}$  Mol/L, Acetate buffer at pH 6.5, Incubated at 30°C.

\* The result was obtained from actomyosin fraction without the heating treatment.

より対照に比し熱処理 actomyosin 区による分解液は Pi が僅かに増すのみであるが NH<sub>3</sub> の増加は大きく deaminase 作用が優位に作用していることが諒解される。無処理 actomyosin 区による分解液では Pi, NH<sub>3</sub> 共に著しい量の生成が認められた。これらの反応液中における adenosine polyphosphate の変化を Fig. 4 の溶離曲線より検討すれば, 熱処理 actomyosin 区による分解液は対照(作用時間 0 分)に比し, IV 液区分の減少はごく少ないが III 液区分の減少は大きい。又 III 及び IV 液区分の D250/D260 は 1.0 以下であり, I 及び II 液区分のそれは 1.5 附近を示し, I 及び II 液区分においては脱アミノの傾向が認められる。これに対し無処理 actomyosin 区による分解液では III, IV 液区分共に相当減少しており, このものでも I, II 液区分で脱アミノされ III, IV 液区分では脱アミノの形跡は認められない。

## 考 察

以上の結果を酵素集団と見做される actomyosin 区の諸酵素作用 (ATPase, myo-

kinase, AMPdeaminase, ADPdeaminase 等) と関連づけて若干の考察をすれば、先づ Fig. 3 の結果より本実験で基質に供した ATP 液の中に ADP, AMP が混在していることが知られた。この様な基質に actomyosin 区を作用させれば、actomyosin 区中の ATPase は ATP に作用して Pi を遊離し、又 ADPdeaminase は混在する ADP と ATP から脱磷酸されて生じた ADP を脱アミノし AMPdeaminase は AMP を脱アミノして夫々 NH<sub>3</sub> を生成することが推察される。しかし実験の結果では ADP は脱アミノされた形跡がないので ADPdeaminase は作用していないものと一応考えられる。又本実験の反応で ATPase が ATP の 1Pi のみを遊離し、混在する AMP のみが deaminase により脱アミノされて NH<sub>3</sub> を生成すると云う単純な過程を経たにしては検出された Pi 及び NH<sub>3</sub> 生成量が余りにも多いようである。従つて ATP が脱磷酸して ADP となり ADP が更に AMP となつて脱アミノされてゆく段階が存在し得ることも考えなければならぬ。ATP が ADP を経て更に AMP になるには、先づ ATP が ATPase によつて ADP となり次いで ADPase によつて AMP になる過程と、最近ある種の動物の actomyosin 区分に発見された ATP から直接 2Pi を脱磷酸して AMP にする酵素<sup>6)</sup> 又は  $ATP \rightarrow ADP + Pi$ ,  $2ADP \rightarrow ATP + AMP$  (myokinase) の作用とが注目される。

Fig. 3 の溶離曲線によれば反応進行に伴い ATP と ADP が共に分解減少する傾向がみられ ATP の減少に比し ADP の減少がかなり大きく、又 Fig. 4 に示した如く ATPase を破壊した actomyosin 区を作用させた場合 ATP は殆んど減少せずに ADP の方の減少が大きく、しかもかなりの NH<sub>3</sub> 量を生成することは myokinase, AMPdeaminase が作用している可能性が考えられる。しかしこの場合の反応系では ATP の再合成を伴うことになるがこれを確認するに充分な結果は得られなかつた。

myokinase は安定な酵素であつて粗製の actomyosin 区に含まれる事は知られており、且つ作用条件も ATPase, AMPdeaminase のそれに類似している<sup>6)</sup> ので充分この実験条件で作用し得る。従つて myokinase の存在を考えれば  $ATP \rightarrow ADP + Pi$ ,  $2ADP \rightarrow ATP + AMP$ ,  $AMP \rightarrow IMP + NH_3$  の分解経路が推測される。

以上述べた如く筋肉中から抽出した actomyosin 区を in vitro の状態で ATP に作用させた場合も actomyosin 区中の酵素系がよく関連して作用し、死後筋肉中において予想し得る ATP の段階的分解過程と同様の変化を再現させ得るようである。この過程は魚肉の場合もウサギ肉同様かなり複雑で、軟体動物の筋肉中には存在しないと云われている AMPdeaminase も明らかに検出され、現段階では獣肉等に比しその機構が材料的に単純化されている傾向は殆んど認められず、魚肉においても adenosine polyphosphate 系物質に対する actomyosin 系蛋白質の酵素学的意義の大きいことは明らかで、これらの作用が魚肉の自己消化過程における肉質の変化に関与していることは推察し得る。

## 要 約

鮮度良好なサバの筋肉より抽出した未精製の actomyosin 区を ATP に作用させた場合の分解生成物の変化について検討し次の結果を得た。

ATP に actomyosin を作用させると Pi 及び NH<sub>3</sub> の著しい生成並びに ATP と ADP 区分の明らかな減少が認められたのに対し、加熱処理 (50°C, 30 分間) をした actomyosin

区を作用させた場合は  $P_i$  の生成及び ATP 区分の減少は殆んど見られないが ADP 区分の減少と明らかな  $NH_3$  の生成が認められた。しかし adenosine 及び AMP 区分の脱アミノによる inosine の生成は両反応液とも同様に認められた。

以上の結果から魚肉から抽出した未精製の actomyosin 区分は ATPase, myokinase, AMPdeaminase 等の混在する酵素集団と考えられ、各酵素はよく関連して ATP の段階的分解に与つている事が推定された。

終りに本研究を行うに当り御指導を賜つた本学高田幸二教授に深甚の謝意を表する。

#### 文 献

- 1) 齋藤 要・日高富男：X報。魚肉 AMP deaminase について，日水誌投稿中。
- 2) 齋藤恒行・新井健一：日水誌，**23**，265-268 (1957)。
- 3) 古江生子：日本生理誌，**20**，287-295 (1958)。
- 4) 宮崎英策・内田倅喜・佐藤寛：札医誌，**5**，371-374 (1954)。
- 5) 石坂首治：微量ガス拡散分析提要，柴田，東京，(1951)，pp. 3-9。
- 6) 赤堀四郎・水島三一郎：蛋白質化学，**V**，共立，東京，(1957)，pp. 185-189。
- 7) 赤堀四郎：酵素研究法，**III**，朝倉，東京，(1957)，p. 62。
- 8) 赤堀四郎：酵素研究法，**II**，朝倉，東京，(1956)，pp. 623-626。
- 9) W. E. COHN & C. E. CARTER：J. Am. Chem. Soc., **72**，4273 (1950)。
- 10) C. W. FISKE, & Y. SUBBAROW：J. Biol. Chem., **66**，375 (1925)。
- 11) 齋藤 要・日高富男：日水誌，**21**，925-928 (1955)。