血合筋肉の化学的研究—V.

マグロ血合筋肉よりのチトクロームCに就いて(其の1)*

松浦文雄・山田茂英・橋本周久

(東京大学農学部)

Chemical Studies on the Red Muscle ("Chiai") of Fishes—V.

Preparation of Cytochrome c from the Red Muscle of Tunny-fish (I)

Fumio MATSUURA, Shigehide YAMADA and Kanehisa HASHIMOTO

Cytochrome c (Cyt) preparations containing about 0.34 % iron were prepared from the deep-seated red muscle of tunny (*Thunnus orientalis*) according to the method of KEILIN and HARTREE⁶⁾, the iron being determined by DRABKIN's o-phenanthroline method¹¹⁾. "0.43% Fe" preparations were prepared by means of Amberlite IRC-50 after MARGOLIASH¹⁰⁾, from the above-mentioned preparations (Table 1). At the same time, Cyt preparations were obtained from the heart muscle of horse for reference.

The spectral characters of tunny and horse Cyt's were then investigated (Fig. 1 & Table 2, 3). Both in the "0.34 % Fe" and in the "0.43% Fe" preparation, there were no significant differences between the spectra of these species Cyt's; i.e., the absorption bands of these Cyt's appear at the same wave-lengths and their spectrophotometric constants are fairly close each other.

Cytochrome c (Cyt. と略記) に関する研究は古く、特に THEORELL¹⁾ 及び KEILIN & HARTREE²⁾ が純粋物質の抽出に成功して以来、多くの生物の Cyt についての研究があるが、魚類に関する報告は極めて少い。二戸氏³⁾はマグロ筋肉色素の研究で Cyt ラシキ物質を得たといっているが、鉄含量等の点から考えてかなり不純のものと思われる。BECHTOLD⁴⁾はタラ及びニシンの一種の血合筋につき α -band を観察したと述べているが文意が不明瞭である。最近 PALÉUS & NEILANDS⁵⁾はサケの心臓から KEILIN & HARTREE⁶⁾法により鉄含量 0.24% の粗 Cyt を調製し、之を更にイオン交換樹脂を用いて精製し 0.447—0.461% Fe の Cyt を得ているが、残念ながらスペクトルの性質に関する記載がない。藤田氏等⁷⁾は独自の定量法を用いてカツオ、マグロ肉中の Cyt を測定し、その血合筋肉中に夫々 83, 26.9 mg % の定量値を報告している。著者等⁸⁾も先に諸種の魚類筋肉中の水溶性色素の定量に於て、所謂赤身の魚類の血合筋肉中には一般に相当量の Cyt が存在すること、例えばカツオ、マグロの深部血合筋肉に各 40, 10 数 mg % 含有されることを認めた。これらの量は、人、馬、犬、鼠等の心筋中の含量⁹⁾に匹敵乃至は之を凌駕する。この定量法に使用した Cyt の分子量、分子吸光係数は従来、馬、牛等の心筋 Cyt につき測定せられた値を便宜上そのまま採用したが、これで差支えないか否かを確かめる為には魚類の Cyt のスペクトルの性質を明らかにしなければならない。又斯様な研究は比較生物化学の立場からも興味あることと思われたので本研究に着手した。

実 験

0.34 % Fe Cyt の調製：試料入手の都合上マグロ (*Thunnus orientalis*) の可及的新鮮な深部血合筋肉及び比較の為屠殺直後の馬の心臓を用い、KEILIN & HARTREE⁶⁾法に従い Cyt を水溶液として得た。収量は試料 1 kg より鉄含量 0.34 % 近いものがマグロで 100 mg、馬で 140 mg 程度得られた。

0.43 % Fe Cyt の調製：上記の如くして得た Cyt を更に MARGOLIASH¹⁰⁾法に従い Amberlite IRC-50 で処理して調製した。鉄含量を基準にして殆ど定量的に回収することも可能であつたが、elute の Cyt 濃

1954 年 12 月 27 日受理 (印刷費負担)

* 昭和 29 年 10 月 3 日、清水市に於る日本水産学会水産食品分科会に於て講演した。

度の点から考えて 70% 程度の収量に抑えた。

Cyt 極品の鉄含量の測定：上記の Cyt 水溶液を適当濃度 (50—100 mg %) に稀釈の上, DRABKIN の o-phenanthroline 法¹¹⁾により鉄含量を測定した(前報参照)。尚水溶液の一部を白金坩堝を使用し 102—105°C で乾燥, 乾物量を求めて Cyt の鉄含量の算出に用いた。測定結果を第1表に示す。

Table 1. Fe content of cytochrome c preparations (o-phenanthroline method¹¹⁾).

Cytochrome c preparation	Material	Fe content §
"0.34 % Fe" preparation*	Deep-seated red muscle of tunny I	0.346 %
	" II	0.362
	Heart muscle of horse I	0.328
	" II	0.346
"0.43 % Fe" preparation**	Deep-seated red muscle of tunny	0.427
	Heart muscle of horse	0.435

§ Iron recovered in the recovery tests ranged from 99.7 to 100.5%, except in the last case, 103.7%.

* Prepared according to KEILIN & HARTREE⁶⁾.

** Prepared by treating the cytochrome c preparations of 0.383 % Fe (tunny) and 0.336 % Fe (horse) with Amberlite IRC-50 according to MARGOLIASH¹⁰⁾.

Table 2. Spectrophotometric constants ϵ ($c=1\text{mM}$ per l., $d=1\text{cm.}$), based upon Fe determination for cytochrome c preparations. (Spectrophotometry was carried out upon 0.2 N NaOH solution.)

Form	Wave length	"0.34 % Fe" preparation*				"0.43 % Fe" preparation**	
		Tunny §		Horse §§		Tunny §	Horse §§
		I	II	I	II		
Reduced	550 m μ (α) ⁺	29.03	27.16	29.67	29.56	29.84	28.95
	535 m μ (m)	7.65	7.46	7.71	7.95	8.09	8.30
	520 m μ (β)	15.03	14.47	15.92	15.27	15.80	15.82
	Extinction ratio						
	$\epsilon_{550}/\epsilon_{535}$	3.79	3.63	3.85	3.73	3.69	3.49
	$\epsilon_{520}/\epsilon_{535}$	1.97	1.94	2.06	1.93	1.94	1.91
Oxidized	534—536 m μ (max.) ⁺⁺	—	9.30	10.31	10.48	10.09	9.47

*, ** See the foot-note in Table 1.

§ Deep-seated red muscle.

§§ Heart muscle.

+ α , maximum of the α band; β , maximum of the β band; m, minimum.

++ Diffuse band.

Table 3. Spectrophotometric constants ϵ ($c=1\text{mM}$ per l., $d=1\text{cm.}$) for cytochrome c from this paper and literature. (Spectrophotometry was carried out at acidic pH.)

Source	Tunny*	Horse*	Horse ¹⁴⁾	Beef ¹⁴⁾	Beef ⁵⁾	Beef ¹⁵⁾	Pig ¹⁴⁾	Chicken ¹⁴⁾
Fe content	0.427%	0.435%	0.456%	0.453%	0.466%	0.43%	0.430%	0.421%
Wave length								
550 m μ (α) ⁺	29.60	26.04	27.84	26.40	26.88	26.11	28.03	26.98
535 m μ (m)	7.89	7.23	7.23	7.03	7.04	7.39	7.34	7.15
520 m μ (β)	16.37	15.24	—	—	15.47	15.47	—	—

pH of Cyt solution in spectrophotometry	4.9	4.9	6.0	6.0		4.10—4.92	6.0	6.0
Extinction ratio								
$\epsilon_{550}/\epsilon_{535}$	3.75	3.60	3.83	3.76	3.82	3.53	3.82	3.77
$\epsilon_{520}/\epsilon_{535}$	2.07	2.11	—	—	2.22	2.09	—	—

* Present data.

+ α , maximum of the α band; β , maximum of the β band; m, minimum.

Spectrophotometry : Cyt 水溶液の一部を適当濃度 (0.011—0.015 mM) に稀釈し, BECKMAN's spectrophotometer を使用して, 主として可視部に於ける酸化還元両型の吸収スペクトルを観察した。酸化型については原液に 1 N NaOH を加え 0.2 N NaOH 溶液となる如くして autoxidize せしめたものを, 還元型についてはこの酸化型 Cyt 溶液に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加えて還元したものを測定した。結果を第 2 表及び第 1 図に示す。之は前記の Cyt 定量法⁸⁾に於ける操作と一致せしめる為に斯く行つたものであるが, 更に又多数の動物の Cyt についての従来の data と比較する為に別に原水溶液の一部をとり acetate buffer に加え (最終濃度 0.09 M, 最終 pH 4.9), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元したものについても測定を行つた。この結果を他の著者の data と共に第 3 表に記した。

結果及び考察

第 1 表に示せる如く, マグロ, 馬, 何れの場合も夫々 2 ケの Cyt 標品の鉄含量の間に稍々開きが見られる。而も中には 0.34% を超過するものも認められる。其の後の実験に於ても, 鉄含量の 0.34% より高い標品を得ることが屢々であり, 之を更に同一の処理をすると鉄含量が尙一層高くなる傾向が認められた。この点は TINT & REISS¹⁴⁾ も同様の事実を報告している。我々の場合只一回の処理のみで 0.418% にも及ぶことがあつた。之が他の水溶性色素蛋白の混入によるものでないことはそれらの鉄含量から考えて明かである。又元来鉄含量の高い鉄蛋白等の混入によるものでもなさそうである¹⁴⁾。従つて之は電気泳動処理又は Amberlite 処理等によつて脱落せられるところの “non-Cyt” fraction が Cyt の一部の分子から分離していることを示すものと想像される。とすればこゝに用いた KEILIN & HARTREE 法⁶⁾は “0.34% Fe” Cyt の調製法としては不適當であることとなる。仍つてこゝに得られた Cyt は “0.34% Fe” Cyt と “0.43% Fe” Cyt との混合物であるとの疑いを生ずる。即ち今仮りに偶々, 0.34% Fe 標品が得られたとしても, その均一性については大いに疑問の存するところである。

上記の意味に於て本報告の諸数値も更に今後詳細な検討を要するものと思われるが, 之迄に得られた結果について一応の考察を加えて見ることにする。第 2 表及び第 1 図によつてマグロと馬の “0.34% Fe” 標品間のスペクトルの性質を比較して見るとそれらの吸収極大極小の現れる位置は全く一致して居り, その分子吸光係数は多少の差異を示すが, 吸収曲線の形に根本的な相違は認められない。“0.43% Fe” 標品についても略々同様のことが言える。KEILIN¹²⁾は菌類酵母等の下等生物より哺乳類に至る広い範囲の生物の Cyt が

Fig. 1. Absorption curves of “0.34% Fe” cytochrome c of tunny (full line) and horse (dotted line).

殆ど一致する吸収帯を示すことを見出し、又 NEILANDS¹³⁾も銹菌と牛との Cyt が吸収帯の位置も吸収係数も酷似することを報じて居り、生物の種類による特異性の極めて小さいことが推察せられる。ここに、魚類の Cyt も例外たり得ないことが証明せられたものと思う。従つて魚類の Cyt の定量に際し、従来の馬、牛等についての分子吸光係数を用いて大過ないと思われるが、他方 TINT & REISS¹⁴⁾の云う如く、動物の種類により分子吸光係数に多少の特異性の現れることも否定し得ないようであるので、更に詳細に検討の上採用すべき数値を確立し度いと考えらる。

尙、本実験は myoglobin 結晶調製（前報参照）と並行して行つた関係で、先ず myoglobin 抽出のため磨碎筋肉を水で抽出し、その残渣を Cyt 抽出に利用せんと試みたが、魚肉の場合は殆ど Cyt が残存して居らず、又一例しか実験して居ないが、カツオの心臓筋肉についても同様であつた。之に反して馬の心臓の場合には水で抽出せられる Cyt の量が極めて少い。後者の事実は已に DRABKIN⁹⁾も諸種哺乳類の心筋の場合について指摘しているところである。魚類に於るこの現象が果して如何なる理由によるか不明であるが、之は魚の Cyt 自体の特性（例えば等電点の相異等）により細胞物質と Cyt との結合が比較的緩かなること或は鮮度の点で馬の心筋に劣ることの影響の何れかに因るものと想像せられる。

本実験に当り、終始御指導を賜つた森教授に謝意を表する。尙本研究費の一部は文部省総合科学研究費の補助に仰いだ。又本報告は静岡県鑑詰協会及び静岡県より印刷費の援助を受けた。爰に記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) H. THEORELL : Biochem. Z. **279**, 463 (1935); **285**, 207 (1936).
- 2) D. KEILIN & E. F. HARTREE : Proc. Roy. Soc. (London) **B 122**, 298 (1937).
- 3) 二戸一磨 : 水研誌, **32**, 306 (1937).
- 4) E. BECHTOLD : Biochem. Z. **311**, 211 (1942).
- 5) S. PALÉUS & J. B. NEILANDS : Acta Chem. Scand. **4**, 1024 (1950).
- 6) D. KEILIN & E. F. HARTREE : Biochem. J. **39**, 289 (1945).
- 7) A. FUJITA, T. HATA, I. NUMATA & M. AJISAKA : Biochem. Z. **301**, 376 (1939).
- 8) 松浦文雄・橋本周久 : 日水誌, **20**, 308 (1954).
- 9) D. L. DRABKIN : J. Biol. Chem. **182**, 317 (1950).
- 10) E. MARGOLIASH : Biochem. J. **56**, 529 (1954).
- 11) D. L. DRABKIN : J. Biol. Chem. **140**, 387, (1941).
- 12) D. KEILIN : Proc. Roy. Soc. (London) **B 98**, 312 (1925).
- 13) J. B. NEILANDS : J. Biol. Chem. **197**, 701 (1952).
- 14) H. TINT & W. REISS : ibid. **182**, 385, 397 (1950).
- 15) D. L. DRABKIN : ibid. **140**, 373 (1941).