水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究—III. コイ筋肉中の adenosine polyphosphate に 及ぼす貯蔵温度の影響

斎藤 恒行・新井 健一

(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—III.

Effects of Storing Temperature upon the Adenosine

Polyphosphate Content of Carp Muscle

Tsuneyuki SAITO and Ken-ichi ARAI

Post-mortem changes in adenosine polyphosphate content occurring in carp muscle, which had been stored at various temperatures (16°C ., 0°C ., -8°C ., liquid air), were studied by ion exchange chromatography. The results may be summarized as follows.

(1) When carp muscle was held at 16°C ., ATP and ADP were broken down rapidly and a large amount of decomposed compounds were accumulated in the fractions of adenine and adenosine (Fig. 1).

(2) Held at 0°C ., the changes in amounts of ATP and ADP were comparatively slow and the decomposed compounds were mainly in the fraction of AMP (Fig. 2).

(3) Held at -8°C ., and after 6 hrs. from start, muscle was completely solidified by freezing. The contents of ATP and ADP decreased markedly and the decomposed compounds, which will be considered as IMP, appeared in the fraction of AMP (Fig. 3).

(4) In liquid air, rapid freezing occurred and the contents of ATP and ADP showed almost no changes (Table 1).

動物筋肉中の高エネルギーリン酸化合物はその動物の死後に急速に分解してゆくものである。BATE-SMITH 及び BENDALL¹⁾ は筋肉(ウサギ)の死後硬直と adenosine triphosphate (ATP) の急激な消失が一致して起る事実を報告し、更にまた BENDALL²⁾ はウサギの筋肉に就いて死後に於ける creatine phosphate (CP) と ATP との変化を測定して、先ず CP が減少して後に ATP の減少が起ってくる事実を報じている。然しながら之等の報告は ATP 以外の nucleotide に関しては余り記載がない。著者等は既にコイ筋肉中の高エネルギーリン酸化合物の定量法に就いて検討し、adenosine phosphate の定量に関しては CORN 及び CARTER の提唱したイオン交換法によって目的を達することができると報告した³⁾。本法は高エネルギーリン酸化合物の中特に adenosine polyphosphate の変化を追求することができるばかりでなく、その他の nucleotide の変化をも追求可能である点に大きな特色を持っている。著者等は本方法を用いて貯蔵温度の異なる新鮮コイ筋肉中の高エネルギーリン酸化合物の変化を追求して二、三の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

試料としては市販養殖コイで体長 20~30 cm, 体重 300~400 g のものを用いた。

コイは可及的低温で断首し、直ちに三枚におろし、いわゆる背筋の部分を選んで採肉し、之を既に報告した方法³⁾ によって磨碎、抽出後 adenosine polyphosphate を分析して標準の値とした。一方残りの背筋部は大型のシャーレに入れて貯蔵温度をそれぞれ 16°C ., 0°C ., -8°C の各々とし、一定時間後に採肉し adenosine polyphosphate の分析を行つた。又急速凍結の実験としては、上記筋肉 1 g を切りとり細い銅線に懸

Fig. 1. Changes in the amounts of adenosine polyphosphates in muscle of carp during storage at 16°C.

Exchanger ;
Amberlite IRA-400, 1.0 cm². × 2.0 cm.
ca. 100-300 mesh.
Eluting solution ;
A 0.01 N NH₄Cl (adenine, adenosine fraction)
B 0.003 N HCl (AMP fraction)
C 0.02 N NaCl in 0.01 N HCl (ADP fraction)
D 0.2 N NaCl in 0.01 N HCl (ATP fraction)
Flow speed: 10. ml./min.
Sorbed material ;
perchloric acid ext. of carp muscle
(0.2 g. wet wt.)

Fig. 2. Changes in the amounts of adenosine polyphosphates in muscle of carp during storage at 0°C.

Exchanger ;
Amberlite IRA-400
1.0 cm². × 2.0 cm.
ca. 100-300 mesh
Eluting solution ;
A 0.01 N NH₄Cl (adenine, adenosine fraction)
B 0.003 N HCl (AMP fraction)
C 0.02 N NaCl in 0.01 N HCl (ADP fraction)
D 0.2 N NaCl in 0.01 N HCl (ATP fraction)
Flow speed: 1.0 ml./min.
Sorbed material ;
perchloric acid ext. of carp muscle
(0.2 g. wet wt.)

垂して、液体空气中に一定時間（秒）浸漬し直ちに抽出分析を行った。

実 験 結 果

貯蔵温度を 16°C , 0°C , -8°C として筋肉を放置し一定時間の経過ごとに adenosine polyphosphate の分析を行った結果をそれぞれ Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 に示す。

先ず 16°C に筋肉を放置した場合では Fig. 1 に示すように ATP の急激な減少が観察され、次いで ADP が多少遅れて減少するのが認められた。然し AMP の生成は余り顕著でなくてむしろ adenine, adenosine 区分の急激な増加が起つていることから、コイ筋肉では ATP, ADP はこの区分まで分解を受けると考えられる。

0°C に筋肉を放置するときは、Fig. 2 に示すように当然の結果として、ATP の減少の速度は 16°C の場合と比較して遅い。即ち 16°C では ATP が新鮮筋の約 50% 迄減少するに 8~10 時間を要するが、 0°C では 14~16 時間を要するが如きである。同様に ADP の減少の速度も前者に比較して明かに遅い。一方 adenine, adenosine 区分の増加は 16°C の場合ほど大きくなくむしろ AMP 区分の増加が多少目立っている。即ち 0°C に筋肉を放置する場合には ATP, ADP の分解は 16°C の場合に比較すれば可成り阻止され、分解生成物も AMP 区分に止まるものが多い。

更に -8°C に筋肉を放置した場合には、筋肉は約 4~6 時間を経過すれば凍結を生じ不透明となつて固化する。分析結果は Fig. 3 に示す。この結果によつて認められる特異現象は、筋肉が凍結を始める前は ATP と ADP は殆んど減少していないが、筋肉が凍結を完了した直後即ち 6 時間経過後は急激な減少を示し、特に ATP の消失は著しい。そして分解生成物は AMP 区分に顕著に増加してくる。adenine, adenosine 区分の増加は著しくない。又筋肉の凍結が完了した後はその後の変化は殆んど認められない。

尚各分析画分に就いて 250 $\text{m}\mu$ と 260 $\text{m}\mu$ に於ける吸光度の比を測定し、その値を記入した。 16°C , 0°C に放置するときは、各々 12, 16 時間後に ATP を除く区分にこの比率の上昇を認めた。この現象は adenosine 系統の化合物が deamination によつて inosine 系統の化合物に変化することを暗示する。又 -8°C に放置した場合は筋肉の凍結が完了した

Fig. 3. Changes in the amounts of adenosine polyphosphates in muscle of carp during storage at -8°C .

Exchanger ;

Amberlite IRA-400

1.0 cm^2 . $\times$ 2.0 cm .

ca. 100-300 mesh.

Eluting solution ;

A.....0.01 N NH_4Cl (adenine, adenosine fraction)

B.....0.003 N HCl (AMP fraction)

C.....0.02 N NaCl in 0.01 N HCl (ADP fraction)

D.....0.2 N NaCl in 0.01 N HCl (ATP fraction)

Flow speed: 1.0 $\text{ml.}/\text{min}$.

Sorbed material ;

perchloric acid ext. of carp muscle (0.2 g. wet wt.).

Fig. 4. Changes of 250/260 optical densities in muscle extract during storage at various temperatures.

6時間に於いてこの比率の急激な上昇を認めた。この現象は筋肉抽出液に就いて直接比率を測定した場合にも明確である。Fig. 4は筋肉抽出液の0.01 N HCl 稀釈溶液に就いて測定した値を示したものである。

即ち 16°C 及び 0°C の場合ではその比率はその温度に比例して時間と共に上昇の傾向をとるが、-8°C では凍結直前の2時間目から凍結完了の6時間に至る間に急激な上昇を認める。このことは酵素の一般的な性質即ち温度との相関性から考えると異質な現象であり、緩慢凍結現象と併せ考えて興味が深い。尙反応生成物としては inosinic acid が考えられるので、著者等は分離能力のよいイオン交換法により本物質を分離し、吸収スペクトル、paper chromatography、磷酸及び五炭糖の定量等を行って成果を得たが詳細は次報にゆずる。

次いで著者等は二つの異常現象が急速凍結の際にも認められるかどうかを確認するために、冷媒として液体空

Table 1. Amounts of adenosine polyphosphates in muscle frozen in liquid air

Time immersed in liquid air (sec.)	O. D. at 260 mμ*				D ₂₅₀ /D ₂₆₀ of original ext.
	Fraction				
	Adenine Adenosine	AMP	ADP	ATP	
0	.074	.088	.473	.457	0.88
3	.074	.082	.489	.445	0.87
15	.088	.090	.502	.429	0.91
30	.077	.080	.470	.464	0.88
60	.084	.088	.499	.426	0.90
0	.070	.119	.486	.339	0.88
3	.074	.124	.483	.333	0.90
15	.073	.131	.507	.302	0.89
30	.086	.128	.492	.318	0.88
60	.083	.120	.499	.321	0.87

* Total optical densities of 20 ml. effluents. (muscle, 0.2 g. wet wt.)

気を使用して筋肉を凍結し adenosine polyphosphate の分析を行った結果を Table 1 に示す。

1g の筋肉は液体空気によって 15~17 秒で完全凍結するが、adenosine polyphosphate の分析の結果は殆んど見るべき差異がない。即ちこの場合に於いては dephosphorylation 或は deamination のような化学変化は余り行われなかったものと考えられる。

考 察

著者等の実験に於いて最も興味ある現象はコイ筋肉を -8°C の冷蔵庫に放置して、筋肉が緩慢に凍結を行った際に筋肉中の ATP の含有量が急激に減少すると同時に、AMP 区分に多くの物質が集積し、而もこの物質は inosinic acid の傾向が大であるということである。今仮りに生成物が inosinic acid であるとすれば、その生成の主なる過程は deaminase によって AMP が deamination を受けて生じたものと解するのが適当であろう。もつともこの反応に就いては AMP⁴⁾ 以外に ADP⁵⁾ 或は adenosine⁶⁾ の deaminase 等に関しても報告がある。然しながらこの変化がコイ筋肉の緩慢凍結という物理的变化に伴なつて急激に起る処に特異的な性格がある。急速凍結の際に ATP 及びその他の化合物に大きな変化のないことは既に MOMMAERTS⁷⁾

の認めた処であるが、緩慢凍結に於いて ATP が急速に減少し、新たに消失した ATP と約等モルの Inosinic acid を生ずる現象に関しては酵素的な観点から之を追求したいと考えている。

尙著者は以上の実験に於いて adenosine polyphosphate の外に共在している CP の減少に就いても測定結果を得ているが、CP の減少は必ず ATP, ADP の減少に先行して起り、而も両高エネルギー磷酸化合物の消失の時間は従来コイに就いて報告されている死後硬直の到達時間と一致している。尙 CP についての詳細は後報にゆずる。

要 約

コイ筋肉を種々の環境温度 (16°C, 0°C, -8°C, 液体空気) に保存して筋肉中の adenosine polyphosphate の変化をイオン交換法を用いて追跡し次のような結果を得た。

- (1) 16°C では ADP, ATP が急激に減少し, adenine, adenosine 区分まで分解を受ける。
- (2) 0°C では ADP, ATP の変化は遅くなり, 分解生成物も多くは AMP 区分に止まる。
- (3) -8°C では筋肉は徐々に凍結し, 凍結が完了したときには ADP, ATP は激減し, 分解生成物は主として AMP 区分に集まり, 紫外部の吸収測定値から, inosinic acid の生成が考えられる。
- (4) 液体空気によつて急速凍結を行つた場合は ADP, ATP 等の変化は殆んど認められない。

文 献

- 1) E. C. BATE-SMITH & J. R. BENDALL : *J. Physiol.*, **106**, 177 (1947).
- 2) J. R. BENDALL : *J. Physiol.*, **114**, 71, (1951).
- 3) 斎藤恒行・新井健一 : 北大水産学部研究彙報, **6**, 228 (1955).
- 4) V. S. HERMAN & G. JOSEPOVITS : *Nature*, **164**, 845 (1949).
- 5) A. DEUTSCH & R. NILSSON : *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1898 (1954).
- 6) C. A. ZITTLE : *J. Biol. Chem.*, **164**, 499 (1946).
- 7) W. F. H. M. MOMMAERTS : *Nature*, **174**, 1084 (1954).