ニジマス発生中の蛋白構成アミノ酸の変化

須 山 三 千 三

(東京水産大学)

Changes in the Amino Acid Composition of
Protein during the Development of Rainbow Trout Eggs

Michizo SUYAMA

The nitrogenous constituents of the fish eggs have been studied by many workers, but we know very little as yet as for the amino acid composition of egg-proteins and its changes during development. The total proteins of the unfertilized eggs and the larva at some developmental stages of rainbow trout, *Salmo irideus*, have been analyzed in respect of amino acid composition by the chromatographic technique of MOORE and STEIN¹³⁾ using a Dowex 50 column. In Fig. 1 is shown the elution curves obtained for the hydrolyzate aliquots of unfertilized eggs (No. 8) and the fry (No. 19); and in Table 1 is shown the results, the composition of amino acid.

1) The amino acid composition of total protein of unfertilized eggs bears some resemblance to that of vitellin⁴⁾ prepared from the yolk of chick-eggs except as to alanine and serine contents.

2) The unfertilized eggs show some changes in the amino acid composition of the protein during development; the contents of arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, hydroxyproline, lysine, methionine, and proline tended to increase, while the contents of alanine, isoleucine, leucine, phenylalanine, serine, threonine, valine, and amide-nitrogen tended to decrease.

From the rise and fall of glycine, glutamic acid, amide-nitrogen, etc., some discussion have been made regarding the consumption of total nitrogen and the formation of fish muscle protein during development.

卵は代表的な食品の一種で栄養学的研究が数多く行われている。殊に鶏卵については最も詳細に研究されており、その中蛋白構成アミノ酸については GRAU¹⁾, HESS 等²⁾, CSONEA³⁾, LEWIS 等⁴⁾ が夫々分析結果を報告している。一方魚卵ではサケ卵について ARRIZONI 等⁵⁾ 及び SEAGRAN 等^{6,7)} が、サケ及びニシン卵について DEAS 等⁸⁾ が必須アミノ酸又は数種アミノ酸の分布を研究しているに過ぎず、未だ明らかにされていない点も多いようである。

然し発生に伴う蛋白構成アミノ酸の変化に至つては鶏卵、魚卵共に詳細な研究例が殆んど無い。僅かにウニ (*Paracentrotus lividus*) の卵の発生に伴う変化について行われた GUSTAFSON 等⁹⁾ の研究がすぐれているのみである。著者はさきに共同研究者の荻野と共にニジマスの発生中及び稚魚の成育中に於ける蛋白構成アミノ酸の変化をペーパー・クロマトグラフィー及び二三の比色定量法で測定し、発生中蛋白のアミノ酸組成には大きな変化は認められないが、孵化直後の胚と摂餌後三日経過した稚魚との間には alanine の減少並びに glycine の増加が顕著であり、その他二三のアミノ酸は僅かな減少があることを報告した¹⁰⁾。

然しながらこの実験に於ては発生段階を追う試料に乏しく、孵化直後の胚試料と摂餌三日の稚魚試料とを比較している点等、発生中の一連の変化を見るにはやや不足しているものがあると思われる。

著者は前報¹¹⁾ に於てニジマス発生中の一般成分の変化を報告し、発生中全窒素、脂質等は漸次減少し、非蛋白態窒素、灰分等は増加すること、並びにこれら変化は孵化後に著明に進行すること等を明らかにした。そこで今回この分析に使用した試料と全く同一のものから蛋白試料を調製し、その分解液中のアミノ酸をイオン交換樹脂を用うるカラム・クロマトグラフィーによつて定量することを試みた。その結果発生中の蛋白の glycine 及び alanine について夫々増加及び減少が再確認され、同時に glutamic acid, methionine, pro-

line 等数種のアミノ酸含量の変化に新しい知見を得ることが出来た。以下その概略を報告する。

実 験

試料 本研究に用いた試料は長野県水産指導所に於て飼育したニジマス *Salmo irideus* GIBBONS の親魚より採った成熟未受精卵並びに発生途次にある数種の胚で、前報¹¹⁾の一般分析を行つた試料と全く同一である。唯、発生中の全窒素及びエキス窒素の消長は孵化前に於ては極めて緩慢であるが、孵化後は比較的急激であると言う前報の結果を考慮してこの中より未受精卵 (No. 8), 発眼卵 (No. 13), 孵化直後の sac fry (No. 16), 臍囊内容物を約 1/3 吸収した sac fry (No. 17) 及び浮上魚 (No. 19) を選出し分析に供した。

アミノ酸定量用蛋白試料は、エキス窒素分析に用いた残渣を長時間沸騰アルコールで処理してリピドを出来るだけ分離し、次いでエーテルで処理して可溶性物質を浸出除去した後、硫酸デシケーター中で数日間乾燥して調製した。これを試験管にとり、20 倍量の 3 N HCl を加えて封管し、水蒸気圧 15 lbs. で 10 時間加水分解を行つた。又 tryptophan を定量するために 30 倍量の 4 N NaOH で同様に加水分解を行つたが、KUIKEN 等¹²⁾に従い試料に対し予め 40% 量の cysteine-HCl を添加して加水分解中の酸化を防止した。加水分解量はカラム・クロマトグラフィーを実施する際の便宜並びに精度を考慮して 0.1 g 近辺をとり、分解液を一定容 25 cc. としてその 1 cc. (約 4 mg のアミノ酸に相当) をクロマトグラフィーにかけることとした。

定量法 MOORE 等¹³⁾の報告に従い、イオン交換樹脂 Dowex 50-X8 を用いてアミノ酸の分離定量を行つた。但し、樹脂は 200~400 mesh のものと 400 mesh 以上のものを等量混合した場合に glycine 及び alanine と tyrosine 及び phenylalanine が夫々よく分離することを知つたのでこの混合物を使用した。フラクション・コレクターによつて分取したアミノ酸の発色並びに比色は YEMM 等¹⁴⁾の方法に基づき著者等¹⁵⁾の吟味を加えて行つた。

結果及び考察

未受精卵 (No. 8) 並びに浮上魚 (No. 19) 蛋白の加水分解液のアミノ酸流出曲線を第 1 図に示す。何れもベックマン分光々度計により proline 及び hydroxyproline は 440 m μ に於て、その他のアミノ酸は 570 m μ に於て吸光値を測定したものである。MOORE 等¹³⁾の報告に比較して glutamic acid 及び proline の分離がやや悪く、その他のアミノ酸の分離状態は比較的良好であつた。tryptophan は第 1 図に記入しなかつたが 15 cm カラムの 50 cc. 附近にゆるやかな山をなして画かれる。

各試料についての最終結果を第 1 表に示す。これによれば第一にニジマス卵の蛋白質には代表的アミノ酸のすべてが含まれていることがわかる。LEWIS 等⁴⁾の雞卵黄 vitellin のアミノ酸分析結果に比較的類似しているが、やや alanine が多く serine が少いようである。本邦に於てはニジマス卵は殆んどすべてが鱒の人工養殖を目的として採卵され食用に供せられることは少いが、アメリカ等では食料及び飼料 (主に dog food) に向けられる量も多い。少くも蛋白構成アミノ酸の種類の上からは栄養上優れたものであると言えよう。

発生中の蛋白構成アミノ酸の変化については第 1 表の右端に増加或いは減少の符号を附して明記したように多くのアミノ酸量に変化が見られる。最も著しい変化は既に報告したように glycine の増加と alanine の減少である¹⁰⁾。然し glutamic acid の増加も又顕著である。前研究¹⁰⁾に於ては増加するアミノ酸はこれ以外には見当らなかつたが、第 1 表では尚 arginine, aspartic acid, hydroxyproline, lysine, methionine 及び proline の増加が数えられる。これは恐らくアミノ酸分析の精度の違いによるものであろう。発生中減少するアミノ酸には alanine の他に leucine 及び serine の減少が著しく、valine も同様である。又これ以外に減少の傾向を示すものとして isoleucine, phenylalanine, threonine が数えられる。

amide 窒素の減少は注目に値する。即ち amide 窒素の量は蛋白中の dicarboxylic acid である glutamic acid 及び aspartic acid の遊離酸基に於ける amide 結合の量を示し、これが発生中に漸次減少してゆくことを意味する。然も一方に於て glutamic acid 及び aspartic acid の量は増加しているため、発生中にこれら酸性アミノ酸の遊離酸基が次第に数多く出現してゆくことが推察される。CHEN¹⁶⁾はイモリ的一种 *Triton alpestris* 発生中のエキス中の glutamic acid 及び glutamine の変化について研究し、glutamic acid は原腸胚期までは減少するがその後増加し、glutamine はそれと反行して増減するが、発生後期に於ては glutamic

Fig. 1. Runs on hydrolyzate aliquots of unfertilized egg (No. 8) and fry (No. 19) containing about 4 mg. total amino acid using a 100 cm. or 15 cm. Dowex 50 column. Abscissa: tube number; ordinate: optical density of the color developed (0.1776 corresponding to 0.1 mM leucine).

Table 1. Changes in amino acid composition of total protein during the development of rainbow trout (values given as % of protein, calculated to 16.0% N).

Sample†	No. 8	No. 13	No. 16	No. 17	No. 19	Increase*	Decrease*
Amino acid	Unfertilized egg	Eyed egg	Sac fry, just after hatching	Sac fry, ca. 1/3 yolk was absorbed	Fry		
Alanine	8.24	8.23	8.20	7.73	5.30	+	++
Arginine	5.68	5.71	5.34	5.39	6.03		
Aspartic acid	9.15	9.24	9.37	9.35	10.40		
Cystine	1.05	1.00	1.13	1.34	1.10		
Glutamic acid	11.70	12.00	12.30	12.40	13.90	++	
Glycine	2.67	2.70	3.02	3.70	6.58		
Histidine	2.45	2.48	2.50	2.48	2.36		
Hydroxyproline	0.72	0.73	0.82	1.01	0.99		
Isoleucine	4.89	4.52	4.50	4.15	3.52	+	++
Leucine	9.67	9.22	9.15	8.82	7.79		
Lysine	7.25	7.34	7.44	7.40	7.91		
Methionine	2.87	2.91	2.94	2.89	3.17		
Phenylalanine	5.71	5.24	5.24	5.15	4.68	+	+
Proline	6.67	6.70	6.83	7.00	7.28		
Serine	6.20	5.99	5.87	5.52	4.46		
Threonine	4.89	4.75	4.77	4.70	4.48		
Tryptophan	0.99	0.97	0.99	0.94	1.08		++
Tyrosine	4.14	4.32	4.28	4.19	4.00		
Valine	6.26	6.19	6.15	5.58	4.52		
Amide-N	1.91	1.92	1.74	1.66	1.56		
Total	101.20	100.24	100.84	99.74	99.55		
Per cent N accounted for	97.4	97.0	95.9	94.7	95.4		

† Samples are the same as those used in previous report (this journal, **23**, 758 (1958)).

* + or ++ shows that the change is slight or remarkable.

acid の絶対量がかかなり増加することを見ている。従つて, glutamic acid では遊離型及び結合型の両タイプに於て上記の傾向がとられることが予想される。

第1図に見られる cysteic acid は cystine の一部が酸で分解して生じたものであろう^{17,18)}。第1表に示した cystine 量はこれを加算したものである。

peak A が如何なる化合物によるか今の所不明である。DAMODARAN 等¹⁹⁾ は鰵鱈蛋白 elastoidin の加水分解物に於て著者の得た peak A よりやや前の流出区に同様な小さい peak を認めて β -alanine ではなからうかと述べている。然し著者の peak A は流出位置から言つて hydroxylysine と思われるが、この点は今後確かめたい。

全般的にアミノ酸含量の増加も減少も孵化後顕著になる傾向にある。そこで問題となるのはアミノ酸含量の変化と蛋白質の消耗との関係である。一般分析の結果¹¹⁾では発生中に蛋白態窒素(全窒素よりエキス窒素及びリピド窒素を減じた値)が減少し、浮上期に於ては未受精卵に較べて半量以下になることを示したが、第1表のアミノ酸組成の上では、例えば glycine は浮上までに2倍以上に達している。即ちこの二つの事実より蛋白中の glycine の全量は発生中殆んど変化しないと言う計算が成り立ち、glutamic acid, aspartic acid, arginine 等の増加率の低いアミノ酸並びに変化の見られなかつたアミノ酸は消耗があり、第1表で減少を示したアミノ酸はより著しい消耗があることが推察されるのである。

摘 要

イオン交換樹脂を用うるカラム・クロマトグラフィーによりニジマスの未受精卵の蛋白構成アミノ酸を定量した結果、アミノ酸組成の点からは栄養上優れたものであることを知つた。次いで発眼卵、孵化後の胚、浮上魚等の蛋白について定量したが、発生中、glycine, glutamic acid, aspartic acid, arginine, hydroxyproline, lysine, methionine, proline 等の含有量は増加し、alanine, leucine, serine, valine, isoleucine, phenylalanine, threonine, amide 窒素等の含有量は減少することを見た。又これらの変化について二三の考察を述べた。

本研究を行うに当り終始御懇篤なる御指導を賜つた東京大学教授森高次郎先生、並びに試料採集に際して多大の御便宜を与えられた本学教授稲葉伝三郎先生、長野県水産指導所長谷崎正生氏に感謝の意を表する。又本研究に要した費用の一部は昭和31年度文部省科学試験研究補助金によつて支弁されたことを附記して謝意を表する。

文 献

- 1) C. R. GRAU: J. Biol. Chem., **168**, 485 (1947).
- 2) W. C. HESS, E. H. KRAMKE, J. C. FRITZ and H. W. HOWARD: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **67**, 552 (1948).
- 3) F. A. CSONKA: J. Nutrition, **42**, 443 (1950).
- 4) J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSCHMANN and H. FRAENKEL-CONRAT: J. Biol. Chem., **186**, 23 (1950).
- 5) L. ARRIZONI and L. FISCHER: J. Am. Pharm. Assoc., **32**, 155 (1943).
- 6) H. L. SEAGRAN: Com. Fish. Rev., **15**, 31 (1953).
- 7) H. L. SEAGRAN, D. E. MOREY and J. A. DASSOW: J. Nutrition, **53**, 139 (1954).
- 8) C. P. DEAS and H. L. A. TARR: J. Fish. Res. Bd. Can., **7**, 513 (1949).
- 9) T. GUSTAFSON and M-B. HJELTE: Arkiv Kemi, **2**, 363 (1950).
- 10) 荻野珍吉, 須山三千三: 本誌, **23**, 227 (1957).
- 11) 須山三千三, 荻野珍吉: 本誌, **23**, 758 (1958).
- 12) K. A. KUIKEN, C. M. LYMAN, F. HALE, S. DIETERICH, M. BRADFORD, and M. TRANT: J. Biol. Chem., **171**, 551 (1947).
- 13) S. MOORE, and W. H. STEIN: *ibid.*, **192**, 663 (1951).
- 14) E. W. YEMM and E. C. COCKING: Analyst, **80**, 209 (1955).
- 15) 須山三千三, 鴻巣章二: 本誌, **23**, 555 (1958).
- 16) P. S. CHEN: Exptl. Cell Res., **10**, 675 (1956).
- 17) W. H. STEIN and S. MOORE: J. Biol. Chem., **211**, 915 (1954).
- 18) H. H. TALLAN, S. MOORE and W. H. STEIN: *ibid.*, **211**, 927 (1954).
- 19) M. DAMODARAN, C. SIVARAMAN and R. S. DHAVALIKAR: Biochem. J., **62**, 621 (1956).