魚類組織のリポキシダーゼに関する研究—Ⅱ—

肝臓および血合肉のリポキシダーゼ作用

小 野 豊 樹・永 山 文 男

(東京水産大学)

Studies on the Lipoxidase in Fish Tissues—Ⅱ—

Lipoxidase Action of Liver and Dark Muscle.

Toyoki ONO and Fumio NAGAYAMA

Carotenoids are oxidized secondarily by the peroxide of linoleate which has been formed by the soybean lipoxidase. As for the oxidation of linoleate by animal tissues, there are some investigators postulating that it might be caused by heme compounds in the tissues, while others are of opinion that the lipoxidase action in animal tissue is essential.

Present authours, observing the oxidation of β -carotene by the extracts of liver and dark muscle of fish, found that these tissues oxidize β -carotene in the presence of linoleate. The optimum pH for the reaction was found to be at 6.98 which differs from the optimum pH for the β -carotene bleaching activity of hemoglobin. As for the optimum temperature, two values were found for liver extract : 14° and 45° C. From this result, it seems likely that the present extract contained two components which catalyze the oxidation of β -carotene at different temperatures.

先に著者等^{1,2)}は、魚類肝臓に含まれるビタミンAを酸化する酵素は大豆リポキシダーゼに類似するものであると報告した。

WATTS 等³⁾、TAPPEL^{4,5)}等は、動物組織の不飽和脂肪酸酸化作用は、リポキシダーゼの如き酵素によるものではなく組織中のヘム化合物に因るものであるとしているが、REISER⁶⁾は豚の脂身について観察し、ヘム以外に脂肪酸を酸化する酵素的因子の存在を認めている。更に KHAN⁷⁾はニシンの血合肉に多量に含まれる脂肪酸酸化酵素を精製し、その酵素が全く鉄を含まず、リノール酸の過酸化物を生ぜしめる点から大豆リポキシダーゼと同様のものであると述べている。この酵素が普通肉に無く血合肉に多いというKHANの報告は先に BROCKLESBY 等⁸⁾がサケの肝臓にビタミンA酸化酵素の存在を認めたことと併せて、魚の脂質代謝の研究上極めて興味あることである。

リポキシダーゼ作用の測定的一般的方法は、リノール酸の過酸化物による 234 m μ の吸光度の変化を読むものであるが、粗酵素標品では誤差が大きい。簡単な方法としてカロチノイドの二次的な酸化を比色測定する方法^{10,11,12,13)}がある。本報では β -カロチンの酸化(褪色)法によつてサバの肝臓、ソウダガツオの肝臓および血合肉のリポキシダーゼ作用について観察した結果を告する。

実 験

試料および方法

(1) 試料 1954 年 7 月沼津港に水揚げされたサバ *Scomber japonicus* の肝臓と、同年 8 月沼津沖で著者等が竿釣で漁獲したソウダガツオ *Auxis tapeinosoma* の肝臓および血合肉を搗潰し、冷アセトン 10 容、低沸石油エーテル 3 容で処理し脱脂乾燥粉末 (mesh 150) として -25°C に保管した。

(2) 酵素液 肝臓粉末は M/15 磷酸塩緩衝液 5 容、血合肉は 3 容で抽出し、遠心分離して得る上澄を用いた。

(3) 試薬

(a) カロチン溶液 結晶 β -カロチン 10~15 mg をアセトンに溶かし 100 ml とする。

(b) リノール酸溶液 アマニ油から常法により得たりリノール酸メチルエステル 5 g をアセトンに溶かし 25 ml とする。

(c) 醋酸鉛溶液 塩基性醋酸鉛の 20 % 水溶液。

(4) 方法 20 ml の共栓試験管に M/15 磷酸緩衝液 1 ml, (b) 液 0.1 ml, (a) 液 0.1 ml を入れ酵素液 1 ml を加え振盪しながら一定時間反応せしめた後 (c) 液 0.3 ml, アセトン 10 ml を加えて激しく振盪してから遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) して, 上澄液の β -カロチン量を比色計により測定する。対照試験はクロチンの比色法¹³⁾ に準じて, (c) 液とアセトンを加えた後酵素液を加える方法を探った。

Fig. 1. Extinction coefficient at various wave lengths of acetone solution of β -carotene. $\bigcirc$, 0.246 mg. %; $\bullet$, 0.149 mg. %. Cuvett, 15 mm. depth.

Fig. 2. Relationship between extinction coefficient and concentration of β -carotene at 470 mμ.

Hilger Biochem 型比色計を用いて, β -カロチンのアセトン溶液の吸光度を測定した結果は Fig. 1 に示したように, 470 mμ のフィルターで最大吸光がみられ, この波長でのカロチン濃度 (y r/ml) と吸光度 (x) との関係は $x < 0.4$ において $y = 6.72x$ であった。

(Fig. 2) 尚比色管は比色計所属の径 15 mm のものを用いた。

結果及び考察

Fig. 3 にみられるように β -カロチンの酸化反応はソウダガツオの血骨肉および肝臓酵素液では極めて急速に行われ 10 分後に反応が平衡に達したが, サバ肝臓酵素液では反応が緩慢で 60 分後もお平衡に達しなかつた。しかし, こゝに用いたサバは市場から購入したものであるもので, 漁獲後或程度時間を経過したものであり, 一方ソウダガツオは漁獲と同時に船上でアセトン処理を行つたため, 両者の鮮度差はかなり大きいとみてよい。従つてこの測定結果に現われたサバとソウダガツオの酵素活力の差は単に魚種の相違によるものでなく, 酵素源の鮮度の影響もあると思われる。酵素源として普通の市財のサバを用いると更に低い活力の酵素液しか得られないので, 試料は出来るだけ鮮度のよいものを選ぶ必要がある。Fig. 3 の実験は恒温槽を用いず室温 (26~30°C) で行つたのであるが温度差の影響は僅少と考えた。尚, リノール酸溶液を添加しない場合はカロチンの脱色は全く行われなかつた。

Fig. 3. β -Carotene oxidizing activities of the livers of pacific mackerel ($\bullet$) and frigate mackerel ($\bigcirc$), and of the dark muscle of frigate mackerel ($\odot$). Reaction mixtures were incubated at room temperature (26°-30°C.). pH 6.98. Amount of β -carotene oxidized by 1 ml. of an enzyme solution is expressed in r.

(1) pH の影響 M/15 磷酸緩衝液により種々の pH (5.59~8.04) について酵素活力を測定した結果, Fig. 4 に示したように, サバ, ソウダガツオいずれの組織より得た酵素液も pH 6.98 において最も強い活力が認められ, それよりも酸性側ではアルカリ側よりも活力がやゝ小さい。こゝで得られた至適 pH の

Fig. 4. Effect of pH on β -carotene oxidizing activities of the livers of pacific mackerel and frigate mackerel, and of the dark muscle of frigate mackerel. Reaction mixtures were incubated for 10 minutes at room temperature. Indications are same with Fig. 3.

Fig. 5. Effect of temperature on β -carotene oxidizing activities of the liver of pacific mackerel and the dark muscle of frigate mackerel. Reaction mixtures were incubated for 10 minutes at room temperature, pH 6.98.

値は, ヘモグロビンのカロチン脱色作用⁶⁾ に関して得られた値 pH 5.5 とは明かに異なるものであるが, 豚の脂身⁶⁾ についての値 pH 5~7 と完全に一致はしていない。

(2) 温度の影響 サバ肝臓とソウダガツオ血合肉の各温度における酵素活力は Fig. 5 に示したように 15°C 附近 (ソウダガツオでは 15°C, サバ肝臓では 14°C) で両者共活力が大きい, サバ肝臓では 14°C の他に更に 45°C でも大きな活力を現わした。サバ肝臓についてみられるこのような温度に関する特性は, この酵素液の組成が単一でなく, 14°C の他に 45°C の如き高温で賦活されるような酵素又は酵素類似の物質を含むためであろうと考えられるが, このことを明かにするためには純度の高い標品を調製して観察せねばならない。又ヘム化合物および脂肪酸と魚類組織のリポキシダーゼ作用との関連性についても現在観察を続行中である。

要 約

1. 魚類の肝臓および血合肉の抽出液はリノール酸の共存下に β -カロチンを急速に酸化する。
2. 魚類の肝臓および血合肉の抽出液が β -カロチンを酸化する至適 pH は 6.98 であり, ヘモグロビンの作用とは異なるものと考えられる。
3. 至適温度はソウダガツオ血合肉では 15°C であるが, サバ肝臓では 14° および 45°C の二点であり酵素液組成が単一のものでないと思われる。

文 献

- 1) 小野豊樹・須田正雄・永山文男 : 本誌, **18**, 509 (1953).
- 2) 小野豊樹・永山文男 : 本誌, **23**, 206 (1957).
- 3) B. M. WATTS and Da Hwei PENG : *J. Biol. Chem.*, **170**, 441 (1947).
- 4) A. L. TAPPEL : *Food Res.*, **17**, 550 (1952).

- 5) A. L. TAPPEL : *ibid.*, **18**, 104 (1953).
- 6) R. J. REISER : *Am. Oil Chem. Soc.*, **26**, 116 (1949).
- 7) M. M. R. KHAN : *J5 Fish. Res. Bd. Canada*, **9**, 393 (1952).
- 8) H. N. BROCKLESBY and N. I. ROGERS : *Fish. Res. Bd. Canada, Prog. Rep. Pac.*, **50**, 4 (1941) ; Ind. Memo. No. 6 (1941).
- 9) H. THEORELL, S. BERGSTROM and Å. ÅKESON : *Pharm. Acta Helv.*, **21**, 318 (1946).
- 10) R. REISER and G. S. FRAPS : *J. Assoc. Off. Agr. Chemists*, **26**, 186 (1943).
- 11) A. K. BALLS, B. AXELROD and M. W. KIES : *J. Biol. Chem.*, **149**, 491 (1943).
- 12) G. N. SMITH and J. B. SUMNER : *Arch. Biochem.*, **17**, 75 (1948).
- 13) 福場博保 : 日農化誌, **25**, 483 (1952).