魚類筋肉の解糖作用に関する酵素学的研究—I.

フォスフォリラーゼ作用

小野 豊 樹・永 山 文 男

(東京水産大学)

Enzymatic Studies on the Glycolysis in Fish Muscle—I.

Activity of Phosphorylase

Toyoki ONO and Fumio NAGAYAMA

Through the decrease of glycogen and inorganic phosphorus as well as the increase of reducing sugar in the extract of fish muscle added with glycogen, the activity of phosphorylase of fish muscle was investigated.

An optimum pH was found to lie in the vicinity of 6.4, but at pH 5.3 and 7.8 the phosphorylase action seemed to be exhibited considerably. The activity of phosphorylase in the muscle stored at 25°C. for 6 hours was completely lost. The reaction rate was proportional to the substrate concentration in the reaction mixture for the extract of fresh muscle and not proportional for that of less fresh muscle. The activity of the enzyme in fresh muscle was inhibited at 0°C. On the contrary, in less fresh sample, the activity of the enzyme was not inhibited at 0°C. Although the differences among the enzyme activities of four parts of fish body were not so clear, the dorsal muscle showed a slightly stronger activity than the caudal and ventral muscles.

魚肉の鮮度に関する既往の研究の多くは、魚肉成分の分析的観察に基くものであり、変質に関する酵素系についての研究は殆んどなされていない。これは、死後の魚肉では酵素が急速に作用し、又失活することと、実験に必要な活魚の入手が他の陸上動物に比し困難であることなどによるものである。

山田等^{1,2,3)}は魚肉の鮮度に関連して、海産魚筋肉の死後における乳酸、還元糖、有機および無機リン、グリセロリン酸等の成分変化を観察し、天野等⁴⁾、藤巻等⁵⁾は死後の魚肉の解糖作用について観察している。

著者等は更に魚肉の変質に関する酵素作用を明かにする必要があると考え、先ず解糖酵素系について研究を続けているので、その結果の一部を報告する。

実験試料および方法

試料 品川地先で漁獲された小型のスズキ *Lateorabrax japonicus* (俗名フッコ) の活魚を3時間またはそれ以上水槽に蓄養したものをを用いた。

酵素液 活魚を断頭、脱血後す早く骨、皮、血合肉を除き、筋肉を氷冷しながら搗潰し、その5gをペロナル緩衝液 25ml と 30 秒 ホモジナイズして、1,500×g で 10 分間遠心分離した上澄液を用いる。

酵素活力の測定 酵素液 5ml に 1% グリコーゲン 1ml を加え、37°C に 1 時間 incubate したならば、反応液を二分し、一部はトリクロール醋酸で除蛋白して無機リンと還元糖を定量し、一部はグリコーゲンの定量に当てる。通常フォスフォリラーゼ活力は、グルコース-1-リン酸からグリコーゲンを合成する割合を無機リンとエステルリンとの比から測定する⁶⁾ が、粗酵素液を用いた本実験では、逆にグリコーゲンの分解から酵素活力を推定しようとした。無機リンは高橋の変法⁷⁾、還元糖は HAGEDORN-JENSEN⁸⁾ の方法、グリコーゲンは Good 等⁹⁾ の方法に準じて定量した。

実験結果および考察

pH の影響 クエン酸塩緩衝液、ペロナル緩衝液および炭酸塩緩衝液を用い、粗酵素液のみを pH 3.3

Fig. 1. Effect of pH on the variation of inorganic phosphorus in the enzyme solution during incubation. The enzyme solutions with various pH values were incubated for 1 hour at 37°C. without addition of substrate. The variation of inorganic phosphorus is expressed in mg. per 100 ml. of the solution. ●, sample 1, ○, sample 2.

Fig. 2. Effect of pH on the consumption of inorganic phosphorus in the enzyme solution. The enzyme solutions, prepared after 0, 3 and 6 hours from the time of death, were incubated for 1 hour at 37°C. with addition of glycogen (200 mg. to 100 ml. of the solution). The decrease of inorganic phosphorus is expressed in mg. per 100 ml. of the enzyme solution.

～9.6 の間で夫々 incubate した場合に起る無機磷の変化量をみれば Fig. 1 のようなものであり、魚体によつて多少差はあるが、同じような傾向を示す。無機磷の増加の少ない点において、無機磷の消費が行われるのでないかと考え、pH 5.3, 7.8, 6.4 の三点と、その逆の点 5.8 を選び、グリコーゲンを添加して同様に実験したところ Fig. 2 のような結果を得た。pH 6.4 で無機磷の減少量が最も多く、pH 5.8 で最も少い。又 pH 5.3 および 7.8 でも、Fig. 1 から予想される通り、かなりの磷の消費がみられる。従つて、フォスフォリラーゼ作用は pH 6.4 においてだけではなく、5.3, 7.8 でも促進されると考えられる。しかし反応量の最も大きいこと、兎筋肉のフォスフォリラーゼ⁶⁾の至適 pH に符合すること、生理的条件に近いことなどの点から、以下の実験には pH 6.4 を採用した。なお pH 5.3, 7.8 については更めて検討したい。

魚肉鮮度の影響 無機磷の消費量の他にグリコーゲン分解量、還元糖生成量を、鮮度の異なる魚肉から得た酵素液を用いて測定し、Fig. 3, a, b に示すような結果を得た。即ち Fig. 2 にもみられるが、死後6時間

Fig. 3. a. Effect of preparation time on the breakdown of glycogen and the formation of reducing sugar. The enzyme solutions, prepared after 0, 1.5, 3, 6 and 24 hours from the time of death, were incubated for 1 hour at 37°C. with addition of glycogen. G : glycogen, S : reducing sugar. b. Effect of preparation time on the consumption of inorganic phosphorus.

25°C に放置した魚肉は、殆んど酵素活力を示さない。一方、死後 1.5 時間のものは、グリコーゲン分解量および還元糖生成量が死直後のものより多く、又燐の消費量は死後 3 時間のものに多い。このようなことは恐らく死直後の筋肉よりも死後 1.5~3 時間経過した筋肉の方が、酵素又はその賦活物質が溶出し易い状態となるため、調製した粗抽出酵素液の酵素活力が大きく現われるのではないかと考えられるが、更に検討を要する。

グリコーゲンの分解量と還元糖の生成量が数値的に一致していないが、これは生成した還元糖が更に分解が進んだために、グリコーゲンの分解量よりも測定された還元糖が少かつたのではないかと考える。又燐の消費量変化と、グリコーゲンおよび糖の変化とが平行しないことは後の実験でも認められるが、粗酵素液を用いた本実験においては、その原因について言及することは難しい。

温度の影響 死直後の魚肉の酵素液では、グリコーゲンの分解、還元糖の生成は 0°C で殆んど抑制されるが、燐の消費は温度による差がない。死後 3 時間を経た魚肉の酵素液では、0°C の方が 37°C より僅かに反応量が少いが、酵素作用が 0°C で抑制されず、何れも死直後の場合に比して反応速度が甚しく大きく、短時間で平衡に達した (Fig. 4, a, b, c)。

Fig. 4. a. Effect of temperature on the breakdown of glycogen.

b. Effect of temperature on the formation of reducing sugar.

c. Effect of temperature on the consumption of inorganic phosphorus.

The enzyme solutions with glycogen were incubated for 4 hours at 0°C. and 37°C., and analyzed at 1/4, 1/2, 3/4, 1, 2 and 4 hours after the time of incubation. ● : the solution prepared immediately after the time of death and incubated at 37°C., ○ : at 0°C., ◐ : the solution prepared after 3 hours and incubated at 37°C., ◑ : at 0°C.

基質濃度の影響 添加基質の濃度を変えて、前述の三成分の変化量を測定した結果は、Fig. 5, a, b, c に明らかなように、死直後の魚肉から得た酵素液では、基質として添加したグリコーゲンの量に比例して、グリコーゲンの分解量と還元糖の生成量が増加するが、死後 3 時間のものでは 200 mg %以上グリコーゲン濃度を増しても反応量は増加しない。しかしながら、無機燐の消費量の変化は、グリコーゲンおよび糖とは全

Fig. 5. a. Effect of substrate concentration on the breakdown of glycogen.
 b. Effect of substrate concentration on the formation of reducing sugar.
 c. Effect of substrate concentration on the consumption of inorganic phosphorus.
 The enzyme solutions were incubated for 1 hour at 37°C. with addition of glycogen in different concentrations (40, 100, 200, 400, and 600 mg. to 100 ml. of the solution). ○ : the solution prepared immediately after the time of death, ● : the solution prepared after 3 hours from the time of death.

く逆の結果を示した。このように、無機燐の変化がグリコーゲンおよび還元糖の変化と併行しないことは、前述の通りどのような原因に基くものかは明かでない。

魚体の各部位の酵素活力 魚体を前背、後背、腹、尾の四部に分けて、各部筋肉の酵素活力を測定した結果は Fig. 6, a, b, c に示すように、部位による酵素活力の差異は明かに認められる程ではないが、前および後背部が腹および尾部より僅かに酵素活力が大きいように思われる。

以上の実験は粗酵素液について行われたものであり、前述の燐の変化量についての疑問の他に、不活性型のフォスホリラーゼを賦活するアデニル酸^{6,10)}についても検討を必要とすると考えられる。それらの点を

Fig. 6. a. Activity of the breakdown of glycogen in different parts of fish.
 b. Activity of the formation of reducing sugar in different parts of fish.
 c. Activity of the consumption of inorganic phosphorus in different parts of fish. The enzyme solutions were prepared from four different parts of fish after 0, 3 and 6 hours from the time of death, and incubated for 1 hour at 37°C. ● : posterior dorsal, ○ : anterior dorsal, ◐ : caudal, ◑ : ventral muscles.

明かにするためには、高純度の酵素標品を得なければならない。

要 約

1. スズキ筋肉のフォスホリラーゼは、他の陸上動物のフォスホリラーゼと同様 pH 6.4 附近でも最も活性であるが、5.3, 7.8 でもかなりの活力を示す。
2. 25°C に死後6時間放置した魚肉は、フォスホリラーゼ活力を失う。
3. 死後3時間を経過した魚肉のフォスホリラーゼは、死直後のものに比し反応速度が極めて大であり、0°C でもその作用が抑制されないが、死直後の魚肉フォスホリラーゼは 0°C で殆んど完全に抑制される。
4. 死直後の魚肉フォスホリラーゼは、基質濃度に比例して反応量を増すが、死後3時間を経たものでは基質（グリコーゲン）濃度 200 mg %以上では、反応量が比例的に増加しない。
5. 魚体部位による酵素活力の差異は明瞭ではないが、僅かに背部筋肉が活力が大きいと思われる。

文 献

- 1) 山田紀作・新聞弥一郎：本誌，14，23 (1948).
- 2) 山田紀作・新聞弥一郎・鈴木たね子：本誌，14，41 (1948).
- 3) 山田紀作：本誌，14，44 (1948).
- 4) 天野慶之・尾藤方通・河端俊治：本誌，19，487 (1953).
- 5) 藤巻正生・古城健三：本誌，19，499 (1953).
- 6) G.T. CORI, B. ILLINGWORTH, and P.J. KELLER : In "Methods in Enzymology" Vol. 1, 200, Academic Press, New York, N.Y. (1955).
- 7) 高橋善弥太：医学と生物学，26，235 (1953).
- 8) H.C. HAGEDORN and B.N. JENSEN : Biochem. Zs., 135, 46 (1923), and ibid., 137, 92 (1923).
- 9) C.A. GOOD, H. KRAMER and M. SOMOGYI : J. Biol. Chem., 100, 485 (1933).
- 10) W.Z. HASSID, M. DOUDOROFF and H.A. BARKER : In "The Enzymes" Vol. 1, Part 2, 1025, Academic Press, New York, N.Y. (1951).