魚類の肉質変化に関する生化学的研究—X.

魚肉の AMPdeaminase について*

日 高 富 男・齋 藤 要

(1960 年 5 月 23 日受理)

STUDIES ON THE BIOCHEMICAL CHANGE IN FISH MUSCLE—X.
ON THE AMP-DEAMINASE ACTIVITY OF SOME FRACTIONS
PREPARED FROM FISH MUSCLE

Tomio HIDAHA and Kaname SAITŌ**

In this paper the authors dealt with the AMPdeaminase activity of some fractions extracted from carp and mackerel muscle.

The results obtained were as follows:

1) AMPdeaminase activity was similarly found in both actomyosin fraction and water extract II fraction which prepared by KALCKAR's method, while ATPase activity was not observed in the latter.

2) The enzymic characteristics of AMPdeaminase activity (such as opt. pH and opt. temp.) was found to be almost identical in both fractions. The optimum pH of the activity lay at pH 6.5, the optimum temperature being 38°C. The activity was not lost completely even by exposure to 50°C. for 30 minutes. At the concentration of 0.01~0.001 mol/l Ca^{++} and Mg^{++} showed no effect on the enzymic action, but Cu^{++} and Ag^{+} inhibited the activity even in very low concentration.

3) In case of the fish muscle kept at 25°C., it was observed that AMPdeaminase activity of water extract II fraction increased with time so far as the experiment was concerned (from 5 to 12 hours after its death).

On the basis of some experimental evidences, it was suggested that ammonia accumulation during autolysis was caused, at least in part, by deamination of AMP.

著者等は前報^{1),2)}において魚肉の myosin 区-ATPase 作用と、その関連成分の鮮度低下に伴う変化について報告した。ところで脊椎動物筋肉の myosin 区には ATPase 作用とともに AMP よりアンモニヤを遊離する AMPdeaminase 作用のあることが G. SCHMIDT³⁾ や H. M. KALCKAR⁴⁾ および S. Z. HERMANN, G. JOSEPOVITS⁵⁾ 等によつて明らかにされており、これら両酵素作用の反応関与物質である ATP とアンモニヤは魚肉の死後経過に伴い増減する成分で、前者は死後短時間内におこる自己消化過程において急減し、後者はかなり増加することが知られている^{1),6)}。本報ではそのアンモニヤの由来を酵素学的に追求する一端として魚肉 AMPdeaminase の魚肉各抽出区分における分布と、AMPdeaminase 活性におよぼす魚肉鮮度の影響ならびにその二、三の酵素学的性質を ATPase のそれらと対比しながら検討した結果を報告する。

実 験 の 部

実験材料 実験に供した魚類は淡水魚のコイ *Cyprinus carpio* LINNÉ, 海水魚のマサバ *Scomber japonicus* (HOUTTUYN) である。コイ (平均体重 620g) は養殖の活魚を即殺して用い、マサバ (平均体重

* 本報告は昭和 32 年 4 月 日本水産学会年会において発表した。

** 鹿児島大学水産学部 (Fac. Fish., Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan).

520g) は水揚げ直後の鮮度良好なものを選び、ともに背側精肉のみを使用した。

酵素反応の基質として使用した ATP は和光純薬の Zellstoffabrik Waldhof 製のナリウム塩で、AMP は L. Light & Co., Ltd. の筋肉製 5' AMP である。

酵素液の調製 供試魚の精肉を充分細切し、10 倍量の冷塩化カリ液 (BAILEY 液: 0.5 M KCl-0.03 N NaHCO₃, pH 8.5) で抽出した原液と、それに 20 倍量の冷水を加えて精製した actomyosin 区分^{1), 7)}、また別に魚肉を冷水抽出した原液 (水抽出 I 区分) およびそれを KALCKAR 法⁴⁾に準拠して精製した水抽出 II 区分をそれぞれ酵素液として使用した。

AMPdeaminase 活性度測定法 反応系における基質濃度ならびに酵素濃度の影響について種々検討した結果、SCHMIDT 法に準じて 0.25% (7.2×10^{-3} M) の AMP 液 0.75 ml, 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) 2.5 ml, 酵素液 (40~60 mg% Prot-N) 1.0 ml の混液を 38°C で 45 分間反応させた。ついで 4% 塩酸液 1.0 ml を添加して反応を停止せしめ、その反応液中に遊離したアンモニア量を CONWAY⁸⁾の微量拡散法により定量した。なお前記基準条件下における酵素液の蛋白態窒素 1 mg 当り生成アンモニア態窒素量 (γ) で比活性度を表わした。

ATPase 活性度測定法 前報⁹⁾と同様に行う。

蛋白態窒素の定量法 試料の蛋白態窒素量はビュレット法により比色定量した。

実験結果および考察

1. 魚肉各抽出区分の AMPdeaminase と ATPase 作用

現在のところ筋肉中の AMPdeaminase 抽出法には一定の方法はなく、myosin 区ばかりでなく冷水抽出区分にもその活性が認められている。そこで即殺したコイ肉より前記 4 区分を調製し、各区分の蛋白収量、ATPase・AMPdeaminase 両酵素活性および超沈澱量⁷⁾等を比較測定した数例の実験結果を要約すると、Table 1 のごとくである。この結果より、各抽出区分に AMPdeaminase が認められることは明らかで、水抽出区分に比し塩化カリ抽出区分の方が蛋白収量は多いが AMPdeaminase 比活性度には大差がない。ATPase 活性と超沈澱現象とは塩化カリ抽出原液と actomyosin 区分にだけ認められ、水抽出 I および II

Table 1. Enzymic activity and amount of some fractions extracted from carp muscle.

Fractions	Yield	AMPdeaminase activity	ATPase activity Qp value	Superprecipitated-Protein Ratio %*
	Prot.-N mg Muscle 100g	NH ₃ -N γ Prot.-N mg		
Water ext. I **	1040	68	6	2.5
Water ext. II ***	350	98	0	0
KCl soln. ext. **	1400	71	240	33.4
Actomyosin ****	540	118	570	98.7

* $\frac{\text{Amount of superprecipitated protein-N mg.}}{\text{Amount of original protein-N mg.}} \times 100$

** This fraction was prepared by extraction from fish muscle with tenfold volume of the solvent.

*** Prepared by the method of KALCKAR⁴⁾.

**** Purified by the method of BAILEY¹⁾.

The determination of AMPdeaminase action was carried out on the reaction mixture (0.75 ml of 0.25% AMP sol., 2.5 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 and 1 ml of enzyme sol.) in which the reaction was stopped by addition of 1 ml of 4% HCl after 45 minutes incubation at 38°C.

This experimental condition was used throughout from Fig. 1 to Fig. 3, unless otherwise noted.

区分にはほとんど検出されなかつた。こゝように actomyosin 区分と水抽出 II 区分とを比較した場合、ATPase 作用と超沈澱現象における挙動が著しく異なるにもかかわらず、両者の AMPdeaminase 作用はほぼ同程度の比活性度を示した。これに関して ENGELHARDT¹⁰⁾ らは myosin に AMPdeaminase 活性物質が結合すると述べているが、この結合物質が水抽出区分に現われる AMPdeaminase と本質的に同じであるか否かはなお検討の余地がある。しかし両区分の酵素学的性質に類似点があることは後述のごとくである。

2. 魚肉 AMPdeaminase の酵素学的性質

マサバ肉より抽出した actomyosin 区および水抽出 II 区分について常法の反応系で AMPdeaminase 作用の温度活性度曲線、熱抵抗曲線ならびに pH 活性度曲線を求めた結果は Fig. 1 のごとくである。すなわち両区分ともに至適温度は約 38°C で、酵素液を 50°C で 30 分間熱処理を施してもなおかなりの活性を示し、また至適 pH は約 6.5 であることが諒解された。これらの結果は SCHMIDT³⁾ の報告による家兎肉の AMPdeaminase の場合とはほぼ同様で、種属的な差異はほとんど認められず、また actomyosin 区-AMPdeaminase は actomyosin 区-ATPase に比較すると耐熱性の酵素であることが明らかである。

Fig. 1. Effect of temperature and pH on the AMPdeaminase activity of mackerel muscle extract.

—●— Actomyosin fraction
—○— Water ext. II fraction

* Heat-inactivation curve: Changes in AMPdeaminase activity of mackerel muscle extract exposed to various temperatures for 30 minutes.

つぎに actomyosin 区分の AMPdeaminase 作用に対する塩類の影響を同区分の ATPase 作用に対するとはほぼ同様の条件で検討したが、 Ca^{++} 、 Mg^{++} は 0.01~0.001 mol/l の濃度では顕著な影響は認められず、 Cu^{++} 、 Ag^{+} の重金属イオンは ATPase 作用に対すると同様 AMPdeaminase 作用をも全く阻害した。この事実は actomyosin 区-ATPase が Ca^{++} によつて賦活され、 Mg^{++} によつて一部阻害されたこと⁹⁾とは若干趣を異にしている。しかし actomyosin 区分の AMPdeaminase 反応は同区分の ATPase の反応条件下でも起り得ることは確かである。

3. 酵素液および魚肉の放置による AMPdeaminase 活性の変化

ヨイ肉より抽出した各区分の酵素液を 5°C に放置して比活性度の変化を検討した結果は Fig. 2 のごとくである。この結果によると各区分の活性度は放置 10 日後においても認められ、特に抽出原液では放置初期 5 日頃までに一過性の増加がみられることは興味深い現象である。このような活性度増加現象は魚肉を放

Fig. 2. Changes in AMPdeaminase activity of carp muscle extract during kept at 5°C. for various period.

Fig. 3. Changes in AMPdeaminase activity of some fractions prepared from carp muscle which was stored at 25°C. and extracted at various time interval.

mine のごとき amide や adenosine, adenine 等の脱アミノも考慮しなければならないが、この点については別報に譲る。

要 約

コイ、マサバを試料とし魚肉の水抽出原液、塩化カリ抽出原液、ならびにそれらの精製区分について

置した場合にも認められた。すなわちコイ肉を 25°C に放置し、所定時間後に各区分を抽出しそれぞれの比活性度を測定した結果は Fig. 3 に示すごとくである。各区分の比活性度は死直後では大差ないが、死後約 12 時間以内では放置時間の経過に伴い増加する傾向があつて、その傾向は水抽出 II 区分が特に顕著であり、12 時間後のものは死直後のものの数倍の比活性度を示し、他区分の比活性度より相当優位を占めている。蛋白収量より算出した全活性度においても類似の傾向がみられた。この結果から魚肉中の AMPdeaminase がかなり安定であることと、死後時間経過に伴い actomyosin 区分より水抽出 II 区分の方が比活性度が高くなり、更に死直後の肉よりも死後数時間を経た肉から抽出した区分の方が抽出蛋白中における該酵素蛋白の密度が高くなることが考えられる。

ところで魚体の疲労度によつて多少の時間的差はあるが、死後の筋肉では ATP の消失期前後にアンモニヤ量の増加がみられる。このアンモニヤの増加期が魚肉 AMPdeaminase の比活性度増加の過程内にみられる事実や、さきに著者等が in vitro の条件で ATP に魚肉 actomyosin 区を作用させた場合も無機リンおよびアンモニヤの著しい増加と inosine の生成を認めた事実¹¹⁾より前述の生成アンモニヤには AMPdeaminase 作用に起因するものが含まれることは確かであろう。なおこのアンモニヤの生成については glutamine

AMPdeaminase 活性を検討しつぎの結果をえた。

1) actomyosin 区分と水抽出 II 区分 (KALCKAR 法) は ATPase 作用および超沈澱現象において見掛上異なる性質を示すが、両区分ともほぼ同様の AMPdeaminase 比活性度を示した。

2) actomyosin 区分および水抽出 II 区分の AMPdeaminase 作用の酵素学的性質はほとんど一致し、至適温度 38°C, 至適 pH 6.5 であつた。また actomyosin 区-AMPdeaminase と actomyosin 区-ATPase とでは熱抵抗性、酵素作用に対する塩類の影響等に若干の差異が認められた。

3) 死後 25°C に 5~10 時間放置した魚肉から抽出した各区分の AMPdeaminase 比活性度は死直後のそれより高くなり、その傾向は水抽出 II 区分において顕著であつた。二、三の実験事実に基づき、自己消化過程内にみられるアンモニヤの増加現象には AMPdeaminase 作用も関与していることを認めた。

文 献

- 1) 斎藤 要・日高富男: 鹿大水紀要, 4, 90~96 (1955).
- 2) 斎藤 要・日高富男: 本誌, 21, 1025~1028 (1956).
- 3) G. SCHMIDT: *Z. Physiol. Chem.*, 179, 243 (1928).
- 4) H. M. KALCKAR: *J. Biol. Chem.*, 167, 461 (1947).
- 5) S. Z. HERMANN and G. JOSEPOVITS: *Nature*, 164, 845 (1949).
- 6) 天野慶之・尾藤方通・河端俊治: 本誌, 19, 487~498 (1953).
- 7) 斎藤 要・日高富男: 本誌, 24, 196~200 (1958).
- 8) 石坂首治: 微量ガス拡散分析提要, 柴田, 東京 (1951), pp. 3~9.
- 9) 斎藤 要・日高富男: 本誌, 21, 925~928 (1955).
- 10) 赤堀四郎・水島三一郎: 蛋白質化学, V, 共立, 東京 (1957), p. 189.
- 11) 日高富男・斎藤 要: 鹿大水紀要, 8, 75~81 (1960).