魚類筋肉の解糖作用に関する酵素学的研究—Ⅳ.

筋肉フォスホリラーゼの特性

永 山 文 男

(1961 年 10 月 5 日受理)

ENZYMATIC STUDIES ON THE GLYCOLYSIS IN FISH MUSCLE—IV.
SOME SPECIFICITIES OF MUSCLE PHOSPHORYLASE

Fumio NAGAYAMA*

Separation and purification of muscle phosphorylase from seabass were tried, and some specificities of the enzyme were investigated.

The enzyme preparation showed the specific activity twenty times higher than the crude muscle extract, but the enzyme was not obtained in crystalline form. It was considered that the total activity of phosphorylase in the muscle of seabass is one fourteenth of the phosphorylase content in rabbit muscle.

The enzyme of seabass showed the maximum activity at 37°C, although the enzyme of rainbow trout showed the maximum activity at 25°C. The existences of two types of phosphorylase, a and b, were demonstrated by the experiment with the effect of adenylic acid (5'-AMP). Starch and 3'-AMP did not induce the enzyme action.

第Ⅰ報¹⁾において、スズキ筋肉の抽出液について、グリコーゲン分解能からそのフォスホリラーゼ作用を推定したが、さらに細かい特性を明らかにするために酵素の精製を試み、その二、三の性質を明らかにした。

実験試料および方法

試料 第Ⅲ報と同様にスズキの活魚を供試した。

酵素調製法 GREEN ら²⁾の方法に準じた。すなわち、原料筋肉を等容の冷蒸留水で2回抽出し、HClで pH 6.4 にして流水に透析する。これを pH 6.0 にし遠心分離し沈澱を除く。上澄を KHCO_3 で pH 6.9 にし、pH 6.9 の飽和硫酸液で 0.41 (または 0.45) 飽和にし遠心分離する。沈澱を蒸留水に溶かし流水に透析後、pH 6.8 のシスティングリセロリン酸ソーダ緩衝液に透析する。この液を 0.41 (または 0.45) 飽和区とする。また 0.41 飽和時の上澄にさらに硫酸を加え 0.65 (または 0.75) 飽和にしたとき生じた沈澱も集め、これを 0.65 (または 0.75) 飽和区とする。

酵素活力の測定法 ILLINGWORTH ら³⁾の方法にしたがつた。すなわち、pH 6.8, 30°C で基質 G1P から遊離される無機リン酸の量によつて酵素活力を求めた。

基質の G1P は MCCREADY の方法⁴⁾で酵素的に合成した。また酵素液の蛋白質濃度は FOLIN の比色法⁵⁾か紫外吸収法⁶⁾によつて求めた。

実験結果および考察

酵素精製試験 GREEN ら²⁾はウサギ筋肉フォスホリラーゼは 0.41 飽和区にはほとんど回収されると報告しているが、スズキの筋肉を用いた本実験では、0.45 飽和沈澱を除いた後の上澄液から 0.65 あるいは

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fish., Shiba Kaigandori 6, Minato-ku, Tokyo).

0.75 飽和沈澱を集めてみると、かなりのフォスフォリラーゼ活力が認められた。

精製試験の一例を Table 1 に示した。すなわち、原抽出液中に含まれるフォスフォリラーゼの約 40% が 0.45 飽和区に含まれ、透析上澄の蛋白質濃度から算出される mg 当りの酵素単位は 225 であった。また原抽出液中の酵素の約 30% が 0.65 飽和区に回収されたが、この分画の mg 当りの酵素単位は 16 で、夾雑蛋白が多いものであった。

Table 1. Fractionation of muscle phosphorylase from seabass.
500 g. of the muscle was used.

Fraction	Volume ml	*** $k \times 10^3 / \text{ml}$	$k \times 10^3 / \text{mg}$	Total units	Recovery
Crude extract	1,000	145	—	145,000	100
0.45 fraction*	20	2,775	225	55,500	38.3
0.65 fraction**	60	685	16.0	41,100	28.3

* Ppt. at 0.45 saturation of ammonium sulfate.

** Ppt. at 0.65 saturation of ammonium sulfate after removal of 0.45 fraction.

*** phosphorylase activity.

ウサギの後肢筋肉 100 g. から、CORI⁷⁾ は mg 当り 2.515 単位の結晶フォスフォリラーゼ a を 40~80mg, FISCHER⁸⁾ は 1,580 単位の結晶フォスフォリラーゼ b を 290mg 得たと報告しており、本実験の結果とはかなりの差がある。しかし FISCHER の原抽出液がスズキの場合の約 14 倍の酵素量を含む点から、原料筋肉の酵素含量が異なるものと思われる。

結晶化はできなかつたが、魚肉の酵素特性を観察するには充分と考え、以下の実験には随時上記のように調製した酵素液を用いた。

アデニル酸の影響 フォスフォリラーゼには a, b の 2 種があり、a 型は b 型 2 分子とリン酸の結合したもので⁹⁾、PR (phosphorylase rupturing) 酵素により分解されると b 型になる¹⁰⁾。b 型はまた b → a キナーゼと ATP により a 型に再生される¹¹⁾。a, b 両型ともアデニル酸 (5'-AMP) により賦活されるが、a 型はアデニル酸がなくても 60~70% の活性を現わし、b 型はアデニル酸がないとほとんど活性を現わさない¹⁰⁾。確証はないが筋肉が疲労すると一時的に a → b の反応が起こり、筋肉グリコーゲンが保持されるものであらうと考えられている。

スズキのフォスフォリラーゼに対するアデニル酸の影響をみると、Fig. 1 のようにアデニル酸の賦活作用は明らかであった。すなわち Table 2 の実験 I の項からもみられるように 0.41 飽和区の大部分は a 型、0.75 飽和区のはほとんどは b 型の性質を示した。しかし Table 2 の実験 II の場合には、0.45 飽和区も 0.65 飽和区もアデニル酸なしにかなりの活性を示し、a 型の含量が多いと思われた。したがって a, b 両型の存

Fig. 1. Effect of adenylic acid on the muscle phosphorylase of seabass. Activity of the enzyme was determined at pH 6.8, 30°C, in the presence (+) or the absence (-) of adenylic acid.

Table 2. Effect of adenylic acid on the muscle phosphorylase of seabass. The enzyme activity was determined at pH 6.8, 30°C, and was expressed as $k \times 10^3$.

Experiment No.	Fraction	Adenylic acid		Ratio - / +, %
		+	-	
I	0.41 fraction *	17.5	9.88	57.1
	0.75 " **	35.2	2.12	6.02
II	0.45 " ***	44.0	17.9	40.7
	0.65 " ****	40.6	23.8	58.6

* $\times 100$, ** $\times 20$, *** $\times 50$, **** $\times 10$

在比は調製操作中にも変動すると思えなければならない。

5'-AMP の代わりに 3'-AMP を添加しても賦活は全く認められなかつた。またグリコーゲンを添加しないと G1P から無機リン酸を遊離せず、グリコーゲンの代わりに植物澱粉を加えても全く反応は起こらなかつた。

以上の諸点から、スズキの筋肉フォスホリラーゼも、ウサギの筋肉フォスホリラーゼと同様に、5'-AMP の共存下にグリコーゲンの合成分解を触媒し、a 型と b 型が存在することが認められた。

Fig. 2. Effect of temperature on the muscle phosphorylase of seabass.

温度の影響 温度特性をみると Fig. 2 および Table 3 のように、37° でもつとも大きな活力を示し、それより高温でも低温でも活力は小さかつた。特に 0.45 飽和区が 0.75 飽和区よりも温度による影響が顕著であるが、これは夾雑蛋白の有無によると思われる。

魚類の生活環境の温度は哺乳動物のそれより 10° あるいはそれ以上低いのが普通であるから、酵素の至適温度も低いことが予想されるのであるが、微生物あるいは哺乳動物の酵素などが高い活力を示す 45° において、スズキのフォスホリラーゼが著しい失活を示したのは当然であろう。

さらにこの点を明確にするために、冷水性魚類であるニジマスの筋肉フォスホリラーゼの温度特性をみ

Table 3. Effect of temperature on the muscle phosphorylase of seabass.

Temperature °C	0.45 fraction*		0.75 fraction**	
	$k \times 10^3$	Relative activity, %	$k \times 10^3$	Relative activity, %
8	—	—	2.0	5.6
25	2.35	70	23.8	67
30	3.38	100	35.2	100
37	7.82	230	41.0	117
45	1.19	35	29.9	84

* $\times 500$ ** $\times 20$

Fig. 3. Effect of temperature on the muscle phosphorylase of rainbow trout.

Table 4. Effects of reagents on the muscle phosphorylase of seabass.

Additive	Concentration M	$k \times 10^3$	
		0.45* fraction	0.65** fraction
None	—	41.3	27.9
NaF	0.0125	43.3	—
MgCl ₂	0.0125	39.8	37.6
CH ₂ ICOOH	0.0125	0	0
"	0.00125	38.2	19.8
NaCl	0.5	36.1	12.6

* $\times 50$, ** $\times 20$

ると Fig. 3 のように、至適温度は 25° であった。

このように酵素の温度特性が生活環境によつて異なり、

反応の至適温度が実際の生活環境よりやや高めの点にあることは、広義の自己消化を考慮する漁獲物処理の面で充分留意されなければならない。しかしいずれの場合にも、ごく低温では反応が阻止または抑制されることも明らかである。

薬品の影響 数種の薬品の影響について観察し Table 4 の結果を得た。0.125 M NaF はやや賦活作用を示し、0.125 M MgCl₂ は 0.45 飽和区ではやや抑制するようにみえるが 0.65 飽和区では反応を促進した。0.5 M の NaCl は抑制効果を示した。またヨード酢酸は 0.0125 M で完全に反応を抑えたが 0.00125 M ではその効果は小さかった。

これら薬品の影響はウサギの筋肉フォスホリラーゼの場合に類似するものである。

要 約

1. スズキの筋肉フォスホリラーゼの精製を試み、原抽出液の約 20 倍の比活性をもつ標品を得た。
2. 至適温度は 37° 付近で、アデニル酸の影響から a, b 両型の存在が認められた。
3. 種々の薬品の影響からもスズキ筋肉フォスホリラーゼはウサギの筋肉フォスホリラーゼと類似の性質をもつものと思われた。

本実験にご指導賜わつた九州大学富山哲夫教授、東京水産大学小野豊樹教授、ならびに実験に協力された塚田新一、友松茂の両氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 小野豊樹・永山文男: 本誌, 23, 260 (1957).
- 2) A. A. GREEN and G. T. CORI: *J. Biol. Chem.*, 151, 21 (1943).
- 3) B. ILLINGWORTH and G. T. CORI: *Biochem. Prepn.*, 3, 1 (1953).
- 4) R. M. MC CREADY: *ibid.*, 4, 63 (1955).
- 5) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 6) O. WARBURG and W. CHRISTIAN: *Biochem. Zeits.*, 310, 384 (1941).
- 7) G. T. CORI: *J. Biol. Chem.*, 158, 333 (1945).
- 8) E. H. FISCHER and E. G. KREBS: *ibid.*, 231, 231, 65 (1958).
- 9) E. G. KREBS, A. B. KENT and E. H. FISCHER: *ibid.*, 231, 73 (1958).
- 10) G. T. CORI and A. A. GREEN: *ibid.*, 151, 31 (1943).
- 11) E. G. KREBS and E. H. FISCHER: *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 150 (1956).