カツオ筋肉の脱分枝酵素に関する研究

柴田 猛, 広瀬 裕, 川田 倫夫

(1986 年 12 月 1 日受理)

Studies on Glycogen Debranching System of Bonito Skeletal Muscle

Takeshi Shibata, Yutaka Hirose, and Michio Kawada*

In order to obtain more information of glycogen degrading metabolism in bonito skeletal muscle (red muscle), the glycogen debranching system (EC 2.4.1.25+EC 3.2.1.33) was purified and its properties were investigated.

SDS electrophoresis showed that the purified enzyme appears to be made up of a single polypeptide of molecular weight=165000. With a substrate, phosphorylase limit dextrin as the best substrate and α -1,6-glucosyl cyclodextrin was hydrolyzed by the enzyme, but glycogen and other related polysaccharides were not hydrolyzed. The enzyme have two different activities containing both α -1,6-glucosidase and glucosyltransferase. Sulfhydryl group reactivity of the enzyme and the inactivation by pH and temperature were reduced by the exogenous addition of glycogen or soluble starch. The debranching system appears to play no rate-limiting role in the process of glycogen degradation by phosphorylase.

これまで魚類筋肉の解糖系の調節作用の研究の一環としてグリコーゲン分解の面を取り上げ、ホスホリラーゼ¹⁾およびホスホリラーゼキナーゼ²⁻⁶⁾について二三の魚類酵素の諸性質を述べてきた。しかしホスホリラーゼはグリコーゲンの α -1,4-グリコシド結合を切断するが、分枝点となる α -1,6-結合を切断出来ない。ここで述べる脱分枝酵素 (Glycogen debranching system; 4- α -D-glucanotransferase EC. 2.4.1.25+Amylo-1,6-glucosidase EC. 3.2.1.33) は Fig. 1 に示したように、ホスホリラーゼ限界デキストリンに作用し、グリコシド転移を行うと同時に α -1,6-結合を切断してグルコースを生成する。分岐鎖から非還元末端の方向に転移されたグリコシド残基の延長部分が再びホスホリラーゼにより分解される。この酵素の存在によりグリコーゲンのほとんどの分解が可能になる。

動物筋肉の脱分枝酵素については Nelson ら^{7,8)}や Taylor ら⁹⁾によりウサギから、また、Becker ら¹⁰⁾によるツノザメについて報告されているが、魚類酵素についての研究は全く存在しない。この酵素が前述の二つの機能をもつこと、グリコーゲンや他の多糖類に対する基質特異性などの性質が理解されていない。とくにグリコーゲンの分解においてホスホリラーゼの補助的役割をもつことから、ホスホリラーゼとの関連性、グリコーゲン分

解に制限的な因子になるのかどうかを研究するのを目的とした。

ここでは二三の赤身魚と白身魚筋肉の酵素活性レベルを比較し、カツオ骨格筋からの精製酵素についていくつかの性質を検討したのでその結果を述べる。

実験方法

試料 気仙沼で水揚げされたカツオ *Euthynnus pelamis* の凍結魚を用いた。イワシ *Sardinops melanostictus*, サバ *Scomber japonicus* は付近の漁場で魚獲されたものを直ちに氷冷して持ち帰り測定した。コイ *Cyprinus Carpio* は市販の活魚を使用した。

酵素液の調製 各種魚類の活性レベルの比較には、筋肉に倍量の 4 mM EDTA (pH 7.0) 溶液を加えて抽出し、3000 rpm, 20 分間の遠心上清液を用いた。

酵素活性の測定 脱分枝酵素の活性測定のために反応組成液を Nelson 法⁷⁾に従い、30°C 10 分間の反応を行い、0.3 M 過塩素酸で反応を止め、中和上清液についてグルコース量を測定した。この定量にグルコースオキシダーゼ法¹¹⁾を用いたが、 α -アニシジンによる発色に誤差が多いように思われたので、ヘキシキナーゼとのカップリング法¹²⁾も併用した。この二つの方法では活性度が異なり、前者は後者の 7~10 倍の大きな値になった。も

* 北海道大学水産学部生物化学講座 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minatocho, Hakodate, 041, Japan).

Fig. 1. Proposed structure of the phosphorylase limit dextrin and mechanism of action of glycogen debranching system (from Reference 22). ○, glucose residues in α -1,4-linkage; ●, glucose residues in α -1,6-linkage.

し、指示がなければ活性には前者の方法を利用した。グリコシド転移活性は同じく Nelson らの方法⁹⁾に従った。ヨード呈色は Krisman 法¹³⁾を使用した。ホスホリラーゼ活性は Shimazu の反応組成液¹⁴⁾を用い遊離したリン酸量を Ohnishi 法¹⁵⁾に従って測定した。この場合の反応温度は 25°C であった。その外にグルコース-1-リン酸の測定は Bergmeyer and Klotzsch 法¹⁶⁾に従った。

SH 基の測定 Ellman 法¹⁷⁾を用いた。

限界デキストリンの調製 ウサギホスホリラーゼを用いて Taylor らの方法⁹⁾に従って調製した。グルコアミラーゼ法¹⁸⁾により測定した全グルコース量から、この標品の純度は 85% であった。

カツオ筋肉ホスホリラーゼの調製 カツオ冷凍肉を肉挽機で碎き、2.5 倍量の 10 mM メルカプトエタノール-0.01% Brij 35 溶液で抽出し、抽出液を固形重炭酸カリで pH 7.0 に中和し、硫酸を添加して 40~50% 飽和区分を集める。DEAE-セルロースを 5 mM トリス-1 mM EDTA-10 mM メルカプトエタノール緩衝液 (pH 7.4) で予め平衡化しておく。同緩衝液で透析した試料をカラムに吸着させ、不用たんばくを洗浄後、1 mM AMP を含む上記緩衝液を用い、0~0.1 M NaCl の濃度勾配法で溶出させる。活性区分を硫酸塩析により濃縮する。さらに、AMP-Sepharose 4B カラムを予め 50 mM β -グリセリン酸-1 mM EDTA-10 mM メルカプトエタノール緩衝液 pH 7.2) で平衡化しておく。これに同緩衝液で透析した試料を吸着させ、5 mM AMP 溶液を用いて溶出させる。活性区分を硫酸塩析により濃縮し、そのまま保存した。

Table 1. Activities of glycogen debranching system from various fishes

	Glycogen debranching system		Phosphorylase unit/g.tissue
	unit/tissue	Specific activity	
Mackerel	3.87	0.059	75.5
Sardine	13.97	0.196	96.4
	7.64	0.089	82.8
	9.17	0.086	168.0
Bonito	11.04	0.133	—
	11.59	0.202	139.0
Carp	4.75	0.082	70.3
	4.36	0.075	63.1
	4.81	0.087	73.6
	6.58	0.118	101.2
Rabbit	5.05	0.073	141.6

比活性度は 40~42 で、SDS 電気泳動では 1 本の minor バンドがみられたが、ほとんど単一の成分であった。使用時には Taylor らの方法⁹⁾に従い、 ω -amino-butyl-sepharose カラム処理をして脱分枝酵素を除去した。

たん白質量の測定 ビウレット法と色素法¹⁹⁾を条件により使い分けた。

その外、デスクおよび SDS 電気泳動法は常法²⁰⁾に従った。グルコオキシダーゼは Worthington 製、ペルオキシダーゼとグルコアミラーゼは東洋紡の製品を用い、他の補助酵素はすべてベーリンガー製を用いた。また、 α -1,6-glucosyl Schardinger dextrin は食品総合研究所の小林昭一博士から頂いた標品である。

結 果

各種魚類の酵素活性レベル 赤身魚において死後のグリコーゲンの分解が白身魚よりも速いことから、この脱分枝酵素の活性の違いによるものを検討するために、両種の魚類の活性レベルを比較した。サバとイワシは漁獲直後の新鮮魚を用いたが、カツオは凍結魚であった。組織グラム当たりの活性レベルを Table 1 に示した。同時にホスホリラーゼ活性も併せて示した。測定個体が少ないが、イワシ、カツオの赤身魚は白身魚の最も新鮮度のよいコイよりも高い活性レベルを保持していた。ホスホリラーゼ活性も赤身魚の方が比較的に高かった。ホスホリラーゼ活性との相関性は例が少ないので明らかでなかったが、コイの場合を例にすれば、関連性がありそうで、脱分枝酵素の活性の高いものはホスホリラーゼ活性も高くなっている。同一個体内のホスホリラーゼと脱分枝酵素の活性比は、コイでは 15:1、イワシは幅があり 7~18:1、カツオは 12:1 で、一方ウサギの場合は 28:1 であった。魚類ではこれらの比の値の大きいことから、グリコ

Table 2. Purification of glycogen debranching system from bonito skeletal muscle

Step	Volume ml	Activity unit/ml	Total activity unit	Specific activity unit/mg	Purification -fold
Crude Extract	1570	3.3	5181	0.13	1
40% satd. Ammonium Sulfate fraction	34	28.2	959	1.47	11
DEAE-cellulose	48	14.1	677	10.2	78
ω -amino-butyl agarose	110	6.6	726	17.5	134

Muscle: 470 g.

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of bonito glycogen debranching system. (D), Disc electrophoresis (30 μ g); (S), SDS electrophoresis (40 μ g).

ーゲンの分解に占める脱分枝酵素の割合が多いように推定された。

脱分枝酵素の精製 比較的活性が高く、比活性度も大きいカツオ筋肉を用いて次のように精製した。すなわち、細砕したカツオ凍結肉を2.5倍量の0.1% KHCO_3 -4 mM EDTA 溶液 (pH 7.5) で抽出し、40% 飽和硫酸区分を集め、5 mM トリス-1 mM EDTA-10 mM メルカプトエタノール緩衝液 (pH 7.2) で予め平衡化した DEAE-セルロースカラムに酵素を吸着させる。同緩衝液で洗浄後、5 mM NaCl を含む緩衝液でホスホリラーゼその外のかたん白質を溶出させる。さらに50 mM NaCl を含む緩衝液を流すと脱分枝酵素が溶出する。つぎに予め5 mM トリス-1 mM EDTA-10 mM メルカプトエタノール-50 mM NaCl 緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した ω -amino-butyl-agarose カラムに吸着させる。0.1 M と 0.2 M NaCl を含む緩衝液で、それぞれ不純たん白を溶出させ、最終的に0.5 M NaCl を含む緩衝液で目的の酵素を溶出する。溶出した酵素液をカーボワックス 6000 で 10 ml/位になる

Fig. 3. Calibration of the SDS gels with marker proteins. The arrow denotes the position at which the glycogen debranching system was located. The marker protein used was SDS-Page Marker I (RNA polymerase B).

Fig. 4. Effect of pH on the activity of bonito glycogen debranching system. Maleate buffer was used at 0.02M concentration.

迄濃縮し、さらに最終濃縮には固形のしょ糖を用いた。その精製法の要約を Table 2 に示した。比活性度はウサ

Fig. 5. Effect of temperature on the activity of bonito glycogen debranching system.

Fig. 6. Effect of substrate concentration on the activity of bonito glycogen debranching system.

ギで報告されている値よりも小さかったが、ツノザメの場合とは比活性度や収量などはほぼ一致していた。電気泳動法による均一性の検討した結果を Fig. 2 に示した。デスク電気泳動法によると、単一の成分を示したが、SDS 電気泳動法でも一本の minor 成分しか含んでいないほとんど単一の標品であった。標準たん白を用いて測定した分子量は Fig. 3 に示したように 165000 と決定された。

至適 pH マレイン酸緩衝液を用いての酵素の至適 pH を Fig. 4 に示した。図にみられるように pH 6.1 前後にあり、カツオホスホリラーゼの場合の至適 pH と一致している。pH 4.5 以下では全く活性がなく、また緩衝液の種類 (マレイン酸・リン酸) による差もなかった。

至適温度 至適温度は Fig. 5 に示したように 32~

Table 3. Substrate specificity of glycogen debranching system from bonito muscle

Substrates	Enzyme concentration unit/ml	Relative activity %
Phosphorylase limit dextrin	0.22	100
Glycogen	4.56	1.0
Soluble starch	4.56	1.3
Amylopectin (potato)	4.56	0.8
Pullulan	4.56	0.4

33°C 付近にありそれ以上の温度では活性の低下が速い。カツオホスホリラーゼの至適温度 (37~38°C) より低かった。

基質濃度の効果 酵素作用に対する限界デキストリンの濃度効果を Fig. 6 に示した。試料毎に多少変化するが、0.6% 近付の濃度で最大値を示した。しかし、その後の濃度増加により活性阻害がみられる。阻害を受けない範囲でグラフから求めた K_m は 0.02% となった。ウサギの 0.03% に近い値であった。

基質特異性 この酵素は α -1,6-結合を切断する性質をもつが、その結合の存在する場所により影響されると考えられるので、種々の基質特異性を検討した。その結果を Table 3 に示した。ホスホリラーゼ限界デキストリンの活性を 100 としたときの相対活性で示した。グリコーゲンを除いた他の多糖類はほとんど分解されていない。1,6-結合を主とするプルランは全く分解されていない。グリコーゲンの場合、粗抽出液を酵素源とすると、その分解率が大きくなる。おそらくマルターゼや他のグルコシダーゼの存在によるかも知れない。

Taylor and Whelan²¹⁾ は α -1,6-glucosyl Schardinger dextrin が 6th- α -glucosyl malto-tetraose と共に本酵素の基質になることを報告し、Her²²⁾ はホスホリラーゼ限界デキストリンとこの cyclodextrin の分解に一致した並行関係を認めたことから、グリコーゲン蓄積病の臨床試験にこの cyclodextrin が基質として利用出来ることを述べている。そこでこの cyclodextrin を用いて特異性を検討した。その結果、ホスホリラーゼ限界デキストリンを基質とした場合に比べて、グルコキシダーゼ法の測定では 10%、ヘキシナーゼ法では 48% の分解度を示した。また反応時間の延長により遊離グルコース量が増加することから、カツオの本酵素も α -1,6-glucosyl-cyclodextrin を分解出来ると推定された。しかし、これらの値は Nelson らの報告⁷⁾ と異なり、検討すべき余地を残している。

グリコシド転移反応 本酵素はまたグリコシド転移反応も行うのでヨード呈色反応を利用してその転移反応の検討を試みた。ホスホリラーゼ限界デキストリンを基質

Fig. 7. Effect of bonito glycogen debranching system on the iodine coloration of phosphorylase limit dextrin.

Solid curve: iodine spectrum of phosphorylase limit dextrin; Dotted curve: iodine spectrum of phosphorylase limit dextrin after 1 h incubation with bonito debranching system at 30°C; Dot-dash curve: the difference spectrum between 0 and 1 h. These curves were obtained on the absorbance scale after an appropriate dilution of the polysaccharide-iodine solution with additional iodine reagent.

としたときの吸収変化を Fig. 7 に示した。反応前は一定の吸収ピークを示さなかったが、一時間の反応により 470 nm に吸収ピークを示すようになり、反応前後の差スペクトルをとると 510~520 nm に最も大きい吸収差を示した。すなわちアミロース型の吸収曲線に近づき青みを帯びてくる。それ故にグリコシドの転移が行われた

Fig. 8. Effect of bonito glycogen debranching system on the iodine coloration of amylopectin.

Experimental conditions were the same as in Fig. 7, except that amylopectin was used. A broken curve and solid curve represent the iodine spectrum of amylopectin with or without bonito glycogen debranching system, respectively.

証拠と考えられる。一方、活性のみられなかったアミロペクチンは Fig. 8 に示したように全く吸収変化がなかった。この 520 nm の吸収変化を脱分枝酵素の活性の指標として用いると、前と異なり、マレイン酸とリン酸緩衝液を用いたときの至適 pH に違いをみせ、前者の緩衝液では pH 6.0 に、後者では 5.7~5.8 になり pH-活性曲線の形も変わった。

SH 基の反応性 本酵素も他の魚類酵素と同様に SH

Fig. 9. Titration of SH groups in bonito glycogen debranching system.

The enzyme (0.4 mg in 0.2 ml) was added to 2.8 ml of 10 mM phosphate buffer, pH 8.0, containing 1 mM EDTA with or without glycogen (25 mg/ml final concentration). The mixture were titrated with 0.02 ml of 10 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)=DTNB at 25°C and the reaction was stopped by diluting with 10 mM citrate buffer, pH 6.5, containing 140 mM β -mercaptoethanol. The reaction was followed by changes in absorbancy at 412 nm; enzymatic activity was determined by the coupled assay of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. For total SH group determination, the phosphate buffer contained 2% sodium dodecyl sulphate (broken line).

Fig. 10. Protective effect of polysaccharides on SH titration by DTNB of bonito glycogen debranching system.

The experimental conditions were the same as in described in Fig. 9, except that each polysaccharide was used at 2.2% concentration.

還元剤の存在で安定化するが、この還元剤の存在は活性には影響しない。そこで SH 基の存在状態を検討した。まず SDS の存在下で全 SH 基数を測定した。その結果を Fig. 9 に示した。2 分間で 55% 反応したが、全 SH 基が反応するためには 20 分以上を要した。酵素一分子当たりの全 SH 基数 (分子量を 16500 として) は 30 個で

Fig. 11. Protective effect of glycogen concentration on SH titration by DTNB of bonito glycogen debranching system. The experimental conditions were the same as in described in Fig. 9, except that glycogen concentration was varied and titration times were 30 (●) and 60 (○) min.

あった。ツノザメは 32 個、ウサギは 42 個と報告されており、ウサギ酵素とはかなり異なったが、ツノザメのものとはほとんど一致した。

次に活性低下と反応性 SH 基数との関係を検討した。その結果を前と同じ Fig. 9 に示した。SH 基がブロックされるに従い活性が低下した。50% の失活がみられた

Fig. 12. Temperature stability of bonito glycogen debranching system (A) and protective effect of polysaccharides on its temperature stability (B).

A: The enzyme (0.4 mg/ml) was preincubated with 50 mM maleate buffer (pH 6.5) at various temperature for 15 min. The preincubation mixture was diluted with cold 0.1 M maleate-0.05% gelatine buffer (pH 6.5). Aliquot was removed and the activity was assayed by the coupled assay of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. B: The procedure was carried out as described above, except that preincubation buffer contained 2.2% polysaccharides and the preincubation temperature was 45°C. (○), no addition; (□), glycogen added; (△), soluble starch added.

Fig. 13. pH stability of bonito glycogen debranching system (A) and protective effect of polysaccharides on its pH stability (B).

A: The enzyme (4.6 mg/ml) was preincubated with 0.01 M McIlvaine buffer at pHs indicated in the figure at 30°C for 15 min. The preincubation mixture was diluted with cold 0.5 M phosphate-0.05% gelatine buffer (pH 7.0). The enzyme activity was assayed the coupled method of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. B: the procedure was carried out as described above, except that the preincubation mixture contained 2.2% polysaccharides at a constant pH of 4.8. Control test was carried out at pH 6.6 without polysaccharide (●).

(○), no addition at pH 4.8; (□) glycogen added at pH 4.8; (△), soluble starch added at pH 4.8.

ときの反応した SH 基数は全 SH 基数の 45% (13~14 SH) になり、完全に失活したときには 75% (22~23 SH) が反応した。5~6 個の SH 基が反応しても活性の低下は 10% だけだったので、本酵素は SH 酵素でないことが確かめられた。しかし、この反応中にグリコーゲンが存在すると、活性の低下と SH の反応性が押さえられる。2.5% のグリコーゲンの存在は、非存在のときに完全に失活した 30 分付近でも、図にみられるように、まだ 80% の残存活性を示し、SH 基も 30% しか反応していない。これらの結果はツノザメ酵素の場合とよく類似している。

さらに、この現象がその代謝に関連してグリコーゲンのみに特有用な作用なのか、単に酵素の高次構造の維持のためなのか他の多糖類と比較検討した。各多糖類の SH 反応性への効果を Fig. 10 に示した。基質として作用しなかった多糖類でも程度の差はあれ、グリコーゲン同様に SH 基を保護し高次構造の維持に効果があった。とくに可溶性デンプンはグリコーゲンより効果が大きかった。アミロペクチンは濁りのために測定が出来なかった。

次にグリコーゲンの濃度による効果を検討した。その効果を Fig. 11 に示した。反応時間を 30 と 60 分との両方を示したが、何れも 0.5% 濃度で最大の効果を示した。図に示さなかったが、可溶性デンプンでは 0.8~

1.0% の間で徐々に保護効果を示したが、明確な最大値を示さなかった。

温度安定性 酵素の温度安定性と多糖類の熱変性の防止効果を検討した。酵素を pH 6.5 の緩衝液中に各温度に 15 分間保温した後の残存活性を測定した結果を Fig. 22 に示した。A 図にみられるように、35°C 付近までは安定であり、40°C を越えると急激に失活する。半減期の温度は 43°C 付近となった。

さらに、この温度安定性に及ぼすグリコーゲンと可溶性デンプンの効果を検討した結果を同図の B に示した。この図は保温温度を 45°C に設定して各多糖類を 2.5% にしたときの結果を示した。いずれの場合でも多糖類の存在は加熱変性を抑制している。可溶性デンプンの方がやや効果が大きかった。

pH 安定性 pH に対する酵素の安定性を検討した。15 分間の保温における各 pH での安定性を Fig. 13 に示した。A 図にみられるように pH 6.5~8.0 の間で安定性を示し、それ以上の pH で減少する。酸性側では pH 6 以下から急激に減少した。この pH の安定性に対する多糖類の保護効果を同図の B に示した。安定な pH の 6.6 と半減期の活性を示した pH 4.8 とで比較した。pH 6.6 では多糖類が存在しなくても安定であったが、pH 4.8 では多糖類が存在すると酵素の失活を保護し、安定化の傾向は熱変性の場合と同様に可溶性デンプンの方に

Fig. 14. Rates of glucose-1-phosphate and glucose formation from phosphorylase limit dextrin as a function of the concentration of glycogen debranching system.

The three fixed quantities of purified glycogen phosphorylase from bonito muscle were 0.17 ($\square$), 0.34 (Δ) and 0.68 ($\circ$) unit/ml. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.5% phosphorylase limit dextrin, 1 mM AMP, 5 mM NaF, various concentrations of phosphorylase and the glycogen debranching system in a final volume of 1 ml. Reaction time was 10 min at 30°C. Full line: glucose-1-phosphate formation; Dotted line: glucose formation.

効果があった。

脱分枝酵素とホスホリラーゼの関連性 限界デキストリンを基質として脱分枝酵素がホスホリラーゼのグリコーゲン分解に制限的な役割をするかどうかを検討した。種々の濃度の脱分枝酵素を一定量のホスホリラーゼに添加してグルコース-1-リン酸及びグルコースの生成を示した結果が Fig. 14 である。いずれの濃度のホスホリラーゼの場合においても、脱分枝酵素の添加量を増加するに従って糖リン酸の生成が増加しており、その曲線の最初の部分は僅かながらS字曲線を示している。使用した濃度は生体内濃度とは対応しないが、ホスホリラーゼと脱分枝酵素の活性比の 12:1 (Table 1 を参照) のところでは、ほとんど直線的な糖リン酸の生成がみられた。グルコースの生成には糖リン酸のように直線的な増

加がみられなかったが、脱分枝酵素の添加量の増加と共に、その生成量が増加した。しかし、ホスホリラーゼの添加量の増加は、僅かしか影響をみせなかった。

考 察

グリコーゲンが本酵素の種々の面の安定性に保護作用をもつことを述べた。Fig. 11 にみられたように、SH 酸化防止に 0.5% のグリコーゲン濃度で効果を発揮しており、この濃度は生体内濃度として可能な量となるので、グリコーゲンは酵素の安定性に役立っていると推定される。ウサギやツノザメ筋肉において本酵素がグリコーゲンと結合した顆粒を形成することが報告されているが^{9,10)} しかし、カツオ筋肉におけるこの顆粒の存在を確かめていない。もしホスホリラーゼもこの顆粒に共存するならばグリコーゲン分解が効率的に促進されるだろう。著者らはコイ筋肉において、ホスホリラーゼキナーゼと外生的なグリコーゲンとの結合実験から、グリコーゲン顆粒の存在を確認出来なかった。この顆粒の形成に種々の条件が必要とするかも知れない。グリコーゲン代謝に機能をもつと考えられているこのグリコーゲン顆粒の研究も代謝調節の追求に必要と思われる。

しかしながら、ホスホリラーゼと脱分枝酵素の作用の関連性を検討したが、少くとも脱分枝酵素はグリコーゲンの分解に制限的な役割をもたなかった。生体内に存在すると思われる両酵素の活性比では GIP の生成曲線が直線の部分に相当している。ホスホリラーゼは脱分枝酵素が作用出来るまでグリコーゲンを分解しなければならないので、むしろホスホリラーゼが制限的な役割をもつと考えられる。 β -アミラーゼや他のグルコシダーゼの存在はグリコーゲンの分解を促進するが、糖リン酸にならなければ乳酸に変わることが出来ないことから、魚肉の pH 調節のためのグリコーゲン分解の制限因子はホスホリラーゼ活性になるであろう。カツオ筋肉内のグリコーゲン分解における解糖系とグルコシダーゼ系による分解の役割分担などさらに詳細に検討されねばならない。

脱分枝酵素は一つの酵素でグルコシダーゼとグルコシド転移酵素の二元的な機能をもっている。しかし、これまでの研究^{10,23,24)} では、この二つの機能を分担する各々のサブユニットまたはポリペプチド部分の分離に成功していない。おそらく最終的には変異種を用いた遺伝子工学的な手法で分離せねばならないかも知れない。特殊な性質をもつ酵素として酵化学上、興味を与える酵素である。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (総合研究 A, 分担) によって行われた。ここに記して謝意を表しま

す。また貴重な試料を分与下さいました食品総合研究所
小林昭一博士に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 伊藤文能, 柴田 猛: 北大水産彙報 **35**, 83-96 (1984).
- 2) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **50**, 287-292 (1984).
- 2) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **52**, 1401-1407 (1986).
- 4) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **52**, 1409-1416 (1986).
- 5) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **53**, 151-157 (1977).
- 6) 川田倫夫, 柴田 猛: 北大水産彙報, **37**, 314-325 (1986).
- 7) T. E. Nelson, E. Kolb, and J. Larner: *Biochemistry*, **8**, 1419-1428 (1969).
- 8) T. E. Nelson, D. H. Palmer, and J. Larner: *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 269-260 (1970).
- 9) C. Taylor, A. J. Cox, J. C. Kernohan, and P. Cohen: *Eur. J. Biochem.* **51**, 105-115 (1975).
- 10) J. U. Becker, T. J. Long, and E. H. Fischer: *Biochemistry*, **16**, 291-297 (1977).
- 11) 馬場茂明, 向井正彦: 医化学実験法講座 第3巻 B (馬場茂明・奥田清編) 臨床化学 II 中山書店, 東京, 1973, pp. 126-127.
- 12) M. W. Slein: in "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, New York, 1963, pp. 117-123.
- 13) C. R. Krisman: *Anal. Biochem.*, **4**, 17-23 (1962).
- 14) T. Shimazu and A. Amakawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 335-348 (1968).
- 15) T. Ohnishi, R. S. Gall, and M. L. Mayer: *Anal. Biochem.*, **69**, 261-267 (1975).
- 16) H. U. Bergmeyer and H. Klotzsch: in "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, New York, 1963, pp. 131-133.
- 17) G. L. Ellman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).
- 18) D. Keppler and K. Decker: in "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. by H. U. Bergmeyer), 3rd ed., vol. VI, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 11-18.
- 19) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- 20) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).
- 21) P. M. Taylor and W. J. Whelan: *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 500-502 (1966).
- 22) H. G. Her, W. Verhue, and F. V. Hoof: *Eur. J. Biochem.* **2**, 257-264 (1967).
- 23) R. C. White and T. E. Nelson: *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 274-280 (1974).
- 24) R. C. White and T. E. Nelson: *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 154-161 (1975).