

エゾアワビ筋肉のAMP deaminaseについて

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	379
掲載ページ	p. 871-876
発行年月	1971年9月

エゾアワビ筋肉の AMP deaminase について

関 伸 夫

(1971年3月5日受理)

AMP Deaminase from Abalone Muscle

Nobuo SEKI*

AMP deaminase, which catalyzes the deamination of AMP to form IMP and NH_3 , has been known to be widely distributed in various kinds of animal tissue, however, its presence in the muscles of some invertebrates such as mollusca has been questioned.

The author has detected AMP deaminase activity in the muscle of the abalone, *Haliotis discus hannai*, and partially purified the enzyme by high speed centrifugation, ethanol fractionation, Li_2SO_4 precipitation and chromatography on DEAE cellulose.

The partially purified enzyme is rapidly inactivated in the absence of ATP by dialysis and heat. ATP is considered to activate and simultaneously to stabilize this enzyme effectively. The optimum pH was found to be near pH 6.4 in citrate Tris buffer. The enzyme is specific for 5'-AMP.

非常に広範囲の動物筋肉に強い AMP deaminase 活性が存在することは周知のことであるが、軟体動物筋肉、とりわけアワビ筋肉では筋肉中にほとんど IMP が検出されないこと、動物の死後の IMP の増加が見られないことなどから、本酵素活性の存在は疑問視されていた^{1,2)}。しかし今回著者はエゾアワビ筋肉には ATP で活性化される AMP deaminase 活性が存在することを確認し、また本酵素の部分精製を行ない若干の性質についての知見を得たので報告する。

実験方法および結果

AMP および ATP は Boehringer, または生化学工業製のものを使用した。ヌクレオチドはすべて Tris base あるいは NaOH で中和して使用した。酵素反応液は 5 mM AMP, 2 mM ATP, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) および酵素液からなり、30°C で 30 分間インキュベートした。反応液から 5 分おきに 50 μl を抜き取り、5 ml の 0.01 N HCl 中に入れ反応を停止し、このものの 265 $\mu\mu^3$ での吸収を測定して、反応の直線部分から 30 分間当りの基質の減少量を求めた。NH₃ の生成量は 15 分間または 30 分間同様にインキュベートしたのち、HClO₄ を加えて反応を停止させこの中から 1 ml をとつて Conway のユニットに入れて 37°C、90 分間拡散させたのち、ネスラー法⁴⁾によつて 425 $\mu\mu$ で比色定量して求めた。酵素活性の 1 単位は 30 分間当り 1 μmole の基質の減少量、あるいは NH₃ の生成量とした。

蛋白量はマイクロブローレット法により牛血清アルブミン (Fraction V) を標準にして求めた。DEAE セルロースクロマトグラフィーの蛋白量のモニターには 280 $\mu\mu$ での吸光値を用いた。

精製 精製中に用いた緩衝液にはすべて 0.1% 2-mercaptoethanol を添加した。

I, 抽出 一晚凍結したエゾアワビ筋肉 200 g を細断し、0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 800 ml および消

本報告では次の省略記号を用いた。AMP, アデノシン 5'-モノリン酸; ATP, アデノシントリリン酸; IMP, イノシンモノリン酸; d-AMP, デオキシアデノシンモノリン酸; GTP, グアノシントリリン酸。

* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

泡剤として *n*-octyl alcohol を数滴加えてブレンダーでホモジナイズした。

II. 遠心分離 およそ 1 l のホモジネートを 7,000×g で 20 分間遠心分離し沈澱を除去した。

III. 高速遠心分離 II で得た乳白色の上清をさらに 55,000×g 60 分間遠心分離した。

IV. エタノール分別 III の上清をアルコール-ドライアイスバス中に入れ、冷却 (0° ~ -5°C) しながらエタノールを添加して、7~23% 飽和で沈澱する部分を 20,000×g, 10 分間遠心分離して集める。沈澱を ATP を含む緩衝液 (2 mM ATP を含む 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) 120 ml にサスペンドし、一夜攪拌し溶解させる。

V. 塩析 Li_2SO_4 を 2 M になるように加え沈澱する部分を集め、IV と同様に ATP を含む緩衝液 60 ml に溶解する。これを透析チューブに入れ、50 倍量の 10 μM の ATP を含む 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) に対し 2 時間透析する。透析後直ちに DEAE セルロースカラムに吸着させた。

VI. DEAE セルロースクロマトグラフィー あらかじめ 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) で緩衝化させた DEAE セルロースカラム (2.8×42 cm) に試料を添加、吸着させた。緩衝化に用いたのと同じ緩衝液を 300 ml 流したのち、mixing vessel に 600 ml の 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) を、reservoir に 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 300 ml と 0.2 M citric acid-sodium citrate (pH 7.4) 300 ml を入れ、linear gradient により活性画分を溶出した (Fig. 1)。以下の実験には VI の段階まで精製した酵素を使用した。

Table 1. Purification of AMP deaminase.

Abalone muscle, 200 g, was used as starting material. The reaction mixture for enzyme assay contained 5 mM AMP, 2 mM ATP and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2). The reactions were incubated at 30°C.

Step	Total vol. ml	Total activity units*	Total protein mg	Specific activity units/mg protein	Yield %	Purification-fold
II. 7,000×g Supernatant	690	2156	2622	0.82	100	1
III. 55,000×g Supernatant	620	2466	1736	1.42	114	
IV. 7-23% Ethanol fraction	98	2116	772	2.74	98	
V. 0-2 M Li_2SO_4 precipitation	54	1894	592	3.20	88	
VI. DEAE-cellulose	47	201	7.5	26.80	9.2	32.4

* One unit of enzyme activity is defined as μ mole of AMP deaminated in 30 min.

IMP の生成 酵素反応生成物の同定のため、30 分間インキュベートした反応液 1 ml (蛋白量 68 μg) を Dowex 1-X8 (ギ酸型, 1×10 cm カラム) で分析すると、Fig. 2 に示すように 3 つの紫外線吸収ピークが得られる。ピーク I と ピーク III はそれぞれ未反応の AMP と ATP である。ピーク II は E_{250}/E_{260} が 1.71 であり、ペーパークロマトグラフィー (展開剤; 95% エタノール: M-酢酸アンモン緩衝液 (pH 7.5) = 75:30) で単一のスポットを与え、その紫外線吸収スペクトルはイノシンヌクレオチドのそれと一致する。イノシン、総リン酸、リボースのモル比は 1:1.09:1.03 であつた。以上の結果からピーク II は IMP と同定した。

反応液に加えられた ATP はインキュベーション中に全く変化はみられず、AMP の減少量と IMP の生成量が一致するので、AMP が脱アミノして IMP が生成することが示された。(Fig. 3)。

安定性 本酵素活性は透析によって速やかに失活するが、この失活は透析外液 (0.001~0.05 M Tris HCl, pH 7.4) に 2 mM ATP を加えることで完全に防止できる。10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 150 mM Li_2SO_4 , 150 mM sorbitol, 15 mM cysteine, 0.1% -2 mercaptoethanol, 2% glycerol はいずれも効果がなかつた。一度透析失活した酵素活性は ATP を添加しても活性の回復はみられなかつた。

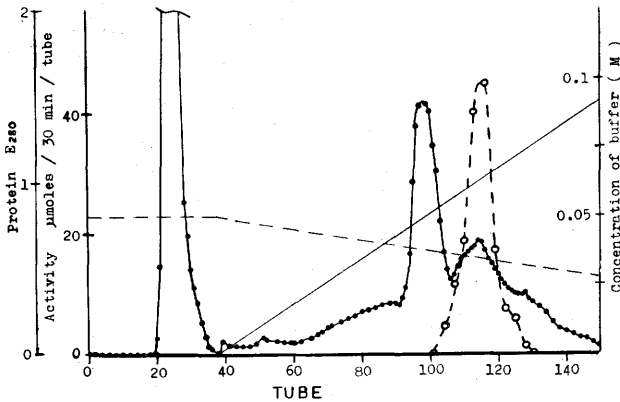


Fig. 1. DEAE cellulose chromatography of AMP deaminase. Fraction 10 ml. Tubes 113-117 saved and pooled.

●—●, protein; ○--○, activity; —, citrate; ---, Tris-HCl.

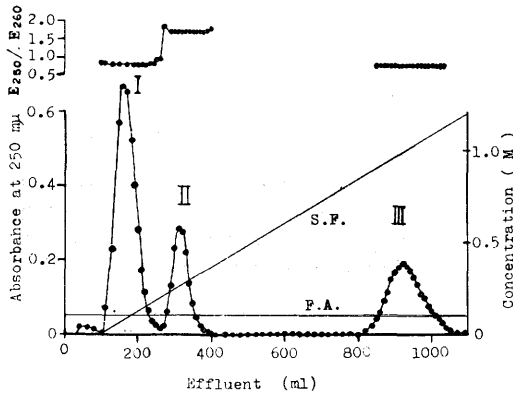


Fig. 2. Column chromatogram showing the formation of IMP by the deaminase from abalone muscle.

Peak I was identified as substrate AMP, peak II as IMP and peak III as ATP (activator). Exchanger used is Dowex 1-X8 formate, 1×10 cm. S.F.: Sodium formate, F.A.: Formic acid.

ATP の活性化の効果は基質濃度の低い場合に顕著である。ATP 濃度と活性の関係を Fig. 7 に示した。基質濃度 5 mM, 蛋白量 80 μ g/反応液 ml, 50 mM Tris-HCl, pH 7.2 の条件下では 2 mM ATP で活性は最大に達する。

考 察

エゾアワビ筋肉には Fig. 2 と 3 に示した結果から, AMP から IMP の生成を触媒する AMP deaminase 活性が存在していることが認められた。著者は先にニジマス肝臓⁵⁾中の AMP deaminase 活性の存在を Sephadex G 200 ゲル濾過による方法で示したが, この方法ではエゾアワビ筋肉からは deaminase 活性の検出はできなかつた。この酵素活性が透析によつて失活するのと同じ理由で, 少なくとも ATP が除去

本酵素活性 (蛋白量 0.46 mg/ml) は ATP が存在しない場合, 熱に対しても極めて不安定であり, 45°C 15 分間の加温で完全に失活し, 37°C, 30 分間で 50% 以上失活する。しかし 2 mM の ATP を加えると非常に安定化される (Fig. 4)。

2 mM ATP と 0.1%—2-mercaptoethanol の存在下で 0.05 M Tris HCl (pH 7.4) 中に 0°C で保存すれば, 1 カ月で 96% 以上の活性が残存しており安定な状態で保存することができる。

至適 pH 酵素反応液は蛋白量 68 μ g/反応液 ml を用い, 緩衝液は 20 mM citric acid-Tris を使用した。pH 6.4 付近にブロードなピーク

が得られた (Fig. 5)。

基質特異性 酵素反応液は蛋白量 70 μ g/反応液 ml を用い, いずれも 5 mM に調製した ATP, AMP, AMP, 3'-AMP, 2'(3')-AMP (混合), d-AMP, adenosine, adenine を基質にして, 2 mM ATP の存在および ATP を除いた場合について活性を測定した。この実験の場合は活性を 265 m μ における吸光値の減少量で示した。また追試のために NH₃ の生成量を測定し, これを 425 m μ での吸光値で示した。Table 2 に示したように 265 m μ での吸光値に減少を示したのは 5'-AMP だけであり, NH₃ の生成も AMP からのみ認められた。

基質濃度と ATP 濃度の影響 酵素活性(蛋白量 80 μ g/反応液 ml) を基質濃度に対してプロットすると, Fig. 6 のように S 字型を示す。AMP 濃度が低い場合はほとんど活性を示さないが, ATP が存在すると非常に活性化される。

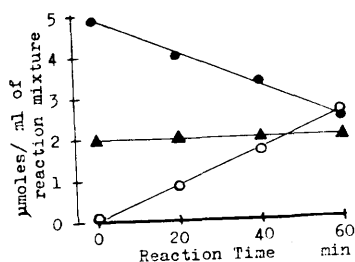


Fig. 3. Stoichiometric relationship between AMP deamination and IMP formation. ●—●, AMP; ○—○, IMP; ▲—▲, ATP.

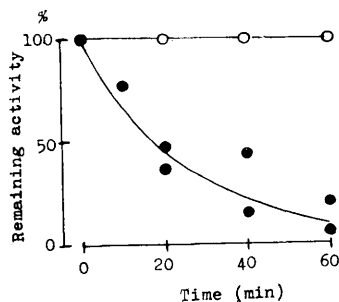


Fig. 4. Effect of ATP on stability of AMP deaminase. Aliquots (0.46 mg protein/ml) of step VI were incubated at 37°C in the presence (○—○) and in the absence (●—●) of 2 mM ATP.

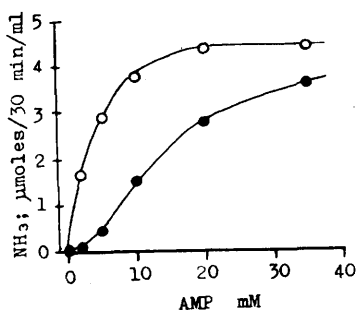


Fig. 6. Effect of AMP concentration on AMP deaminase activity. ●—●, without ATP; ○—○, in the presence of 5 mM ATP.

Table 2. Substrate specificity of the AMP deaminase from abalone muscle.

Purine compound (5 mM)	Without ATP	With ATP (2 mM)	
	$-\Delta E_{285}/\text{ml}/30 \text{ min}$	$\Delta E_{425}/\text{ml}/30 \text{ min}$	NH_3
5' AMP	4.0	15.5	430
3' AMP	0	0	0
2'(3') AMP (mix)	0	0	0
<i>d</i> -AMP	0	0	0
Adenosine	0	0	0
Adenine	0	0	0
ATP	0	—	—

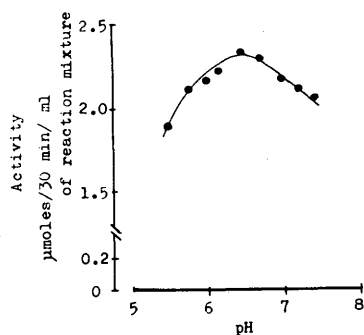


Fig. 5. Effect of pH on the activity of AMP deaminase. Measured at 30°C in the presence of 2 mM ATP and 20 mM citric acid-Tris buffer.

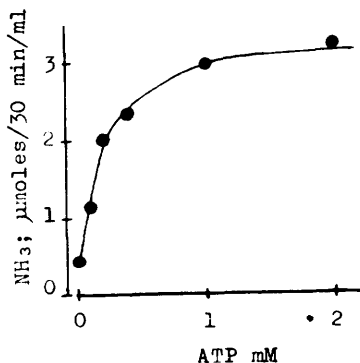


Fig. 7. Effect of ATP on AMP deaminase activity. The reaction mixture contained 5 mM AMP and 50 mM Tris-HCl, pH 7.2.

されることがゲル透過では活性画分が見出されなかつた原因の一つと考えられる。本報告の酵素の精製は SETLOW and LOWENSTEIN が⁹⁾ ウシの脳の酵素を精製するのに用いた方法を参考とした。エゾアワビ筋肉は組織が非常に堅いためにホモジネートの調製は難かしく、またブレンダーで高速でホモジナイズすると発泡

が著しく Total Volume の回収が極めて悪くなる。そこで一度凍結したあとでできる限り組織を細断して、ブレンダーに入れ、発泡防止のため、*n*-octyl alcohol を加えてホモジナイズする方法を用いた。凍結および *n*-octyl alcohol の添加のいずれも活性の低下は起さない。DEAE セルロースカラムからの活性の回収は悪いが、この点については、ATP の除去による酵素の不安定化による失活が考えられるが、SETLOW and LOWENSTEIN⁶⁾ は 0.25% Dextran 500 を入れると回収率を高めることができると述べており、この方法により今後精製法の改良が期待できるかもしれない。

エゾアワビ筋肉の AMP deaminase の比活性は従来の知見から当然予想されることであるが極めて弱い。たとえば、RONCA⁷⁾ らがカエル、ハト、ラッテ、ウサギの筋肉抽出液で得ている比活性が 5~24 であるのに比較して、エゾアワビでは Step II の比活性は 0.8 にすぎない。Step VI のものでもウサギ骨格筋^{7,8)} のホモジネートと同程度である。

至適 pH は 6.4 付近にある。これは LEE⁹⁾ のウサギ骨格筋やコイ筋肉^{9,10)} の値と同じである。

コイ筋肉の酵素⁹⁾ は熱に安定であり、40°C に 2 時間放置しても全く失活がなく、また 400 倍に精製した酵素¹⁰⁾ でも 4°C で 2 カ月は安定である。一方タラ筋肉¹¹⁾ のホモジネートの活性は 0°C で保存しても極めて不安定であるという。エゾアワビ筋肉の酵素も熱には不安定であるが、Fig. 4 に示したように、ATP の添加によつて安定化される。ATP による安定化はウシの脳の酵素⁶⁾ でも報告されている。

AMP deaminase が ATP により活性化されることは脳の酵素では古くから知られていたが¹²⁾、奈良は¹³⁾ コイ筋肉の酵素も ATP で活性化されることを認め、LOWENSTEIN ら¹⁴⁾ はラッテの種々の組織の酵素も ATP で活性化されることを報告している。エゾアワビ筋肉の酵素も ATP により活性化され、その効果は AMP 濃度が低い程大きいことが認められた。また活性化と同時に ATP が酵素を極めて安定化させる点でも興味を持たれる。AMP deaminase の生理的意義については今だに明確にされていないが、LOWENSTEIN らは¹⁴⁾ 脳のこの酵素は ATP で活性化され GTP により阻害を受けるところから、プリンヌクレオチド代謝におけるレギュレーターとしての役割を持つことを示している。軟体動物のエゾアワビ筋肉中にこのような ATP によつて活性化される酵素が存在することは、これと同様な意義が考えられ、また ATP 濃度や基質の濃度と活性、特にそれらの生理的濃度との関係、あるいは 1 価陽イオンとの関連については今後の問額として興味深いことと思われる。

魚肉中の IMP は呈味問題と関連して研究されて来たが、その生成経路は ATP→ADP→AMP→IMP の経路により、直接には魚肉中に存在する強い AMP deaminase 作用による AMP の脱アミノによつて生成することが認められている。一方エゾアワビ筋肉では死後魚肉に見られるような IMP の生成は見られず AMP の段階で反応が止まる²⁾。その理由は酵素活性が欠損するためではなく、エゾアワビ筋肉の AMP deaminase の比活性が極めて弱いこと、および ATP により安定化され、同時に活性化されるので、死後 ATP の再生産のない条件下では IMP の生成がほとんど起らなかつたものと推測される。

要 約

エゾアワビ筋肉に AMP deaminase 活性を認め、これを高速遠心分離、エタノール分別、塩析、DEAE セルロースクロマトグラフィーにより部分精製した。部分精製酵素は ATP より活性化され、同時に非常に安定化される。至適 pH は 6.4 付近にあり 5'-AMP に特異的である。

本研究の遂行にあたり、終始御懇切な御指導を賜わつた斎藤恒行教授、並びに新井健一博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) K. ARAI and T. SAITO: *Nature*, **192**, 451~452 (1961).
- 2) 新井健一: 本誌, **32**, 174~179 (1966).
- 3) H. M. KALCKAR: *J. Biol. Chem.*, **167**, 461~475 (1947).

- 4) J. F. THOMPSON and G. R. MORRISON: *Anal. Chem.*, **23**, 1153~1157 (1951).
- 5) 関 伸夫: 本誌, **37**, 322~325 (1971).
- 6) B. SETLOW and J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.*, **242**, 607~615 (1967).
- 7) S. RONCA-TESTONI, A. RAGGI, and G. RONCA: *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 101~112 (1970).
- 8) Y.-P. LEE: *J. Biol. Chem.*, **227**, 999~1007 (1957).
- 9) 奈良 盛: 生化学, **32**, 204~210 (1960).
- 10) J. PURZYCKA-PREIS and M. ZYDOWO: *Acta. Biochim. Pol.*, **16**, 235~242 (1969).
- 11) J. R. DINGLE and J. A. HINES: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**, 1717~1730 (1967).
- 12) J. MENDICINO and J. A. MUNTZ: *J. Biol. Chem.*, **233**, 178~183 (1958).
- 13) 奈良 盛: 生化学, **34**, 654~657 (1962).
- 14) B. SETLOW, R. BURGER, and J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1244~1245 (1966).