

マサバのヌレオニナルドラゼ

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	永山,文男 川村,正彦
発行元	日本水産學會
巻/号	39巻6号
掲載ページ	p. 683-687
発行年月	1973年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マサバのスレオニナルドラーゼ

永山文男・川村正彦*

(1973年1月19日受理)

Threonine Aldolase of Mackerel

Fumio NAGAYAMA and Masahiko KAWAMURA*

The tissue extracts of the Pacific mackerel contain the activity of threonine aldolase (E.C. 4.1.2.5) which produces acetaldehyde from L-threonine. Among the tissues examined, the liver showed the strongest activity forming 27.9 μ mole per hr per g protein in the 0.3-0.5 ammonium sulfate-fraction. The optimum pH for the enzyme activity was approximately 7.0. The *K_m* values for L-threonine at pH 7.0 and 7.6 were estimated to be 2.69 and 2.81 mM, respectively. For pyridoxal phosphate, the coenzyme, *K_m* was 18.4 μ M at pH 7.0. D-Threonine served neither as substrate nor as inhibitor for this enzyme. Both L-serine, an analogue of the substrate, and glycine, a product of the enzyme reaction, inhibited the enzyme activity. The action of L-serine was considered to be typical competitive inhibition, and the *K_i* was 2.9 mM. The *K_i* for glycine was calculated to be 6.2 mM on the assumption that its action is competitive.

アセトアルデヒドは、魚肉中に検出される揮発性カルボニルの主成分であつて^{1,2)}、魚の加工・貯蔵中に、褐変を誘起する1つの重要な因子になることも考えられる^{3,4)}。魚の鮮度低下に伴つてアセトアルデヒドの量が増加することが報告されているが²⁾、その生成の機構は明らかにされていない。

生物界には、アセトアルデヒドの生成反応を触媒するいくつかの酵素の存在が知られており、スレオニナルドラーゼ (E.C. 4.1.2.5) もその1つである。動物の肝臓⁵⁻⁹⁾、あるいは微生物^{9,10)}の酵素の性質についてはすでにいくつかの報告があるが、魚類の酵素についての観察例はみられない。

スレオニナルドラーゼの基質であるスレオニンは、魚肉中に遊離アミノ酸としてもみられるものであり、もし酵素が存在するならば、グリシンとアセトアルデヒドとに分解される可能性がある。われわれは、マサバの組織抽出液にこの酵素活性のあることを認めたので、最も活性の強い肝臓の抽出液について、2, 3の酵素的性質を明らかにした。

実 験

酵素液の調製 組織を等容の0.1 M りん酸塩緩衝液 (pH 7.0, 0.1 M NaF を含む) とホモジナイズし、18,000 rpm で30分遠心分離、その上澄液を硫酸塩析、0.3-0.5 飽和画分を集めて少量のりん酸塩緩衝液にとかし、同じ緩衝液に透析して酵素液とした。

酵素活性の測定 GREENBERG の方法⁹⁾を改変し、生成したアセトアルデヒドを水蒸気蒸溜後セミカルバゾンとして定量した。すなわち、0.5 M L-スレオニン 0.5 ml, 2 mM ピリドキサールりん酸 0.2 ml, pH 7.0 の0.1 M りん酸塩緩衝液 2 ml に酵素液 1 ml を加え、密栓して37°で一定時間反応させ、氷冷した5%トリクロル酢酸 2 ml を加える。この混液をゆるやかに水蒸気蒸溜し、pH 7.0 の0.1 M りん酸塩緩衝液にとかした6.72 mM 塩酸セミカルバジド溶液 5 ml の入った受器に受け、約45 ml になったら蒸溜を止め、水で50 ml にする。室温にしばらく放置後224 mm の吸光度からセミカルバゾンの量を求める。L-スレオニンを省いたも

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minatoku, Tokyo)

のを空試験とした。なお、反応中に生じたアセトアルデヒドの空中への拡散の有無を確かめるため、側室を備えた試験管の側室にカルバジド溶液を入れて酵素反応をさせたが、側室へのアセトアルデヒドの拡散は全く認められなかつたので、以後、通常の共栓試験管を用いた。

結果および考察

マサバ組織の酵素活性 普通肉、血合肉および肝臓から、同じ条件で調製した酵素液を用いてスレオニンアルドラーゼ活性を測定して、Table 1 の結果を得た。

Table 1. Threonine aldolase activity of mackerel tissue.

Each tissue was homogenized with an equal volume of 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaF (pH 7.0), and the supernatant obtained by centrifugation at 18,000 rpm was treated with ammonium sulfate. The fraction of 0.3–0.5 saturation was collected and dialyzed against the phosphate buffer, and the dialyzate was assayed for threonine aldolase activity. The reaction mixture consisting of 0.5 ml of 0.5 M L-threonine, 0.2 ml of 2 mM pyridoxal phosphate, 2 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and 1 ml of the enzyme solution was incubated at 37° for 2 (liver) or 48 (muscle) hr. After the reaction was stopped by the addition of 5% trichloroacetic acid, acetaldehyde was steam-distilled into a flask containing semicarbazide solution, and was assayed from the optical density at 224 nm.

Tissue	Activity, μ mole acetaldehyde per hr	
	per g protein in dialyzate	per 100 g fresh tissue*
Ordinary muscle	0.063	0.17
Dark muscle	0.230	0.19
Liver	27.9	167

* Approximate calculation.

肝臓の酵素活性は筋肉組織の活性にくらべて著しく強いが、筋肉組織でも、基質と補酵素が十分に存在するならば、アセトアルデヒドの生成がわずかながら起こり得ることが明らかである。

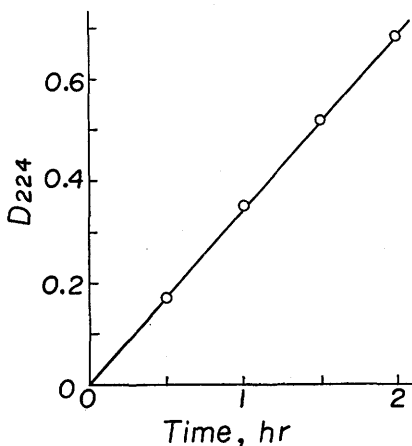


Fig. 1. Progress curve of threonine aldolase from mackerel liver at pH 7.6 and 37°C.

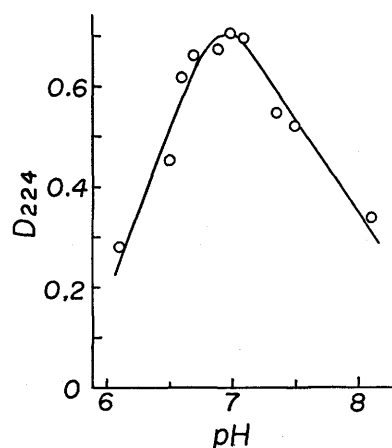


Fig. 2. Effect of pH on the activity of threonine aldolase from mackerel liver. The reaction mixture was incubated at 37° for 1 hr.

肝臓の酵素の性質 最も活性の強い肝臓の抽出液を用いて、酵素の性質をしらべた。

1. 反応の直線性: pH 7.0, 37° での反応量の増加は、反応時間と極めて明瞭な直線的相関を示し、Fig. 1 にみられるように、2 時間反応を行なわせても失活の傾向は認められなかつた。

2. pH の影響: 37° における反応速度は、Fig. 2 にみられるように、pH 7.0 付近で最も大きな値を示した。pH 5.5 以下ではほとんど活性が認められなかつた。哺乳動物の肝臓酵素⁵⁻⁷⁾の至適 pH は 7.6 付近と報告されているが本実験の場合、pH 7.6 での活性は pH 7.0 の場合の約 70% であつた。なお、*Clostridium*¹⁰⁾ の酵素の至適 pH は 6.5-7.0 と報告されている。

3. 基質濃度の影響: 本酵素は L-スレオニンを基質とするが、D-スレオニンに対しては全く作用を示さなかつた。L-スレオニンの濃度を変えた場合の反応速度の変化から K_m を求め、pH 7.0 および pH 7.6 でほぼ 2.7-2.8 mm の値が得られた (Fig. 3)。ヒツジの肝臓⁷⁾、ラットの肝臓⁹⁾ および *Clostridium* の酵素¹⁰⁾ について報告されている L-スレオニンの K_m はそれぞれ 69, 20, 0.42 mm である。この値を比較するならば、マサバのスレオニナルドラーゼの基質親和性は、哺乳動物の酵素のそれより大きいといふことができる。

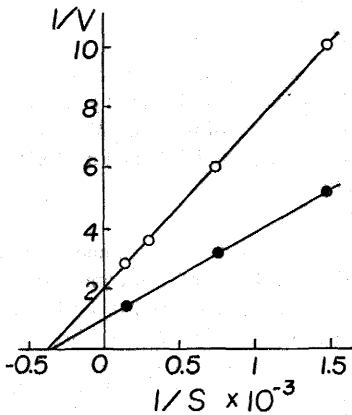


Fig. 3. Effect of L-threonine concentration of the activity of threonine aldolase from mackerel liver. The activity was assayed at 37° and pH 7.0 (○) or 7.6 (●) in the presence of 108 μM pyridoxal phosphate. K_m values for L-threonine at pH 7.0 and 7.6 were calculated to be 2.67 and 2.81 mm, respectively.

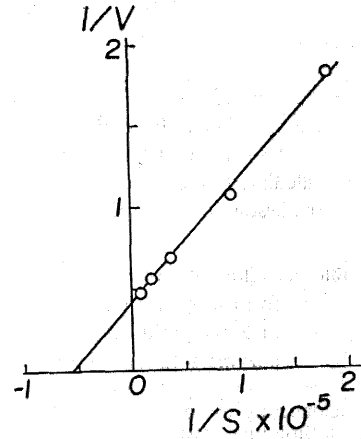


Fig. 4. Effect of pyridoxal phosphate concentration on the activity of threonine aldolase from mackerel liver. The activity was assayed at 37° and pH 7.0 in the presence of 67.6 mm L-threonine. K_m value for pyridoxal phosphate was calculated to be 18.4 μM .

4. ピリドサルリん酸の影響: この酵素の作用にはピリドキサルリん酸の共存が不可欠であつて、それを添加しないと全く活性が認められなかつた。ピリドキサルリん酸の K_m は Fig. 4 の実験結果から 18.4 μM と算出される。ヒツジの肝臓酵素⁷⁾ について報告されている値は 111 μM であるから (*Candida*¹¹⁾ では 0.25 μM)、マサバの酵素は補酵素親和性も哺乳動物の酵素より大きいといえる。

5. D-スレオニン、L-セリンおよびグリシンの影響: D-スレオニンはこの酵素の基質にならないばかりでなく、L-スレオニンを基質とする酵素反応に対して阻害作用も示さなかつた。スレオニンと類似の構造をもつ L-セリンは著しい阻害作用を示し、また、この反応の生成物であるグリシンにも、セリンほどではないがかなりの阻害作用が認められた (Table 2)。これらのアミノ酸によるスレオニナルドラーゼ阻害の度合は、基質濃度の低い場合にさらに大きくなる。L-セリンの阻害形式は Fig. 5 のプロットから明らかに拮抗阻害と思われ、その K_i は 2.9 mm で、L-スレオニンの K_m に極めて近い値である。一方、グリシンの阻害形式は、必ずしも拮抗阻害と断定し難いが、もし拮抗阻害と仮定するならばその K_i は 6.2 mm と算出される。

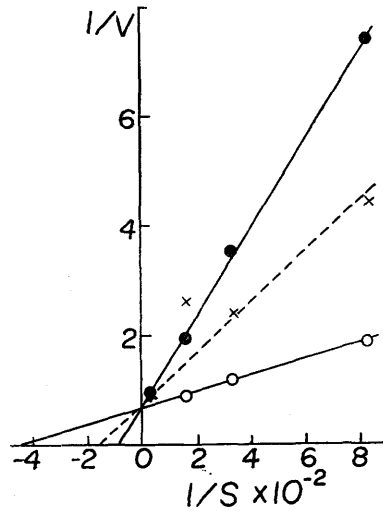


Fig. 5. Effect of L-serine and glycine on the Lineweaver-Burk's plots of threonine aldolase from mackerel liver at 37° and pH 7.0. The activity was assayed in the presence of 12 mM L-serine (●) or glycine, (×) and in the absence of the additive (○). K_i values were calculated to be 2.9 mM for L-serine (competitive inhibition), and 6.2 mM for glycine (on the assumption that the type of inhibition is competitive).

Table 2. Effect of D-threonine, L-serine and glycine on the activity of threonine aldolase from mackerel liver. Reaction mixture consisting of 0.5 ml of L-threonine, 0.2 ml of 2 mM pyridoxal phosphate 2 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, 1 ml of the enzyme solution, and 0.5 ml of the additive was incubated at 37° for 1 hr.

Concentration of L-threonine, mM	Additive and its concentration, mM	Activity, %
67.6	—	100
	D-threonine 24	100
	L-serine 24	58
	glycine 48	52
24	—	100
	D-threonine 12	100
	24	100
	L-serine 6	29
	12	16
	24	9
	glycine 6	51
	12	39
24	33	

本実験の結果から、マサバの組織、特に肝臓には基質親和度の高いスレオニナルドラーゼが存在し、基質 (L-スレオニン) および補酵素 (ピリドキサルリン酸) が適当な量共存するならばアセトアルデヒドが生成する可能性のあることが明らかである。この酵素は、生体内でヒドロキシアミノ酸の代謝に重要な役割を演ずるものと考えられるが、アセトアルデヒドの生成因子とみるならば、鮮魚あるいは冷凍魚の品質に対しても少なからざる影響を与えるものと推定される。魚種による活性の差異あるいは魚の取扱い中の動態に

ついてさらに検討する必要がある。

文 献

- 1) 松任茂樹・永山文男・小野豊樹: 本誌, **33**, 586-590 (1967).
- 2) 太田冬雄: 本誌, **24**, 334-337 (1958).
- 3) 小泉千秋・野中順三九: 本誌, **25**, 368-372 (1959).
- 4) 小野豊樹・永山文男: 本誌, **30**, 307 (1964).
- 5) A. E. BRAUNSTEIN and G. Y. VILENKINA: *Dokl. Akad. Nauk USSR*, **66**, 1243-1246 (1949).
- 6) S.-C. C. LIN and D. M. GREENBERG: *J. Gen. Physiol.*, **38**, 181-196 (1954).
- 7) M. KARASEK and D. M. GREENBERG: *J. Biol. Chem.*, **227**, 191-205 (1957).
- 8) D. M. GREENBERG: in "Meth. Enzymol. (S. COLOWICK and N. O. KAPLAN, ed.)" Vol. **5**, 931-936, Academic Press (1962).
- 9) L. I. MALKIN and D. M. GREENBERG: *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 117-131 (1964).
- 10) R. H. DAINY: *Biochem. J.*, **117**, 585-592 (1970).
- 11) H. KUMAGAI, T. NAGATE, H. YOSHIDA, and H. YAMADA: *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 779-790 (1972).