缶詰食品の核酸関連物質

(第4報) カキの核酸分解酵素法

毛利威徳*・平井厚子*・川崎陽子*・宮本陽子*・橋田 度**

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Canned Foods

Part IV. Nucleic acid decomposing enzyme of oysters

TAKENORI MOURI, ATUKO HIRAI, YOKO KAWASAKI,
YOKO MIYAMOTO and WATARU HASHIDA

To investigate the changes of nucleic acid related compounds in oysters during frozen storage and thawing enzymes responsible for decomposition of nucleic acid and the relating substances were isolated and purified by using DEAE-cellulose and DEAE-sephadex column techniques. Four phosphomonoesterase fractions (A, B, C, D) with the optimal temperature of 40°C and optimal pH range of 4.0 or 10.0 were obtained.

Fraction C also contained activity with the optimal temperature of 40°C and optimal pH range of 3.5.

During frozen storage and thawing of oyster meat 5'-AMP and 5'-IMP seemed to be formed from nucleoside polyphosphate by the actions of PMase and DAase contained in the oyster meat.

(Received Aug. 1, 1973)

貝類においては5'-IMPは存在しないといわれているが前報¹⁾においてカキに5'-IMPを見出し、またイノシン、ヒポキサンチンと同様に見出している。これらの5'-IMP、イノシン、ヒポキサンチンの生成は、ほぼ酵素による生成が主体と考えられるので、クルマエビ、マッシュルームなどの食品と同様に核酸分解酵素を調べることは貝類でのヌクレオチド消長また鮮度の判定には興

味深いものとする。

本報ではカキのむき身の可食部より核酸分解酵素系を抽出し、分離精製後、その酵素学的性質を調べた。なおそれらの結果からカキにおける5'-IMP、イノシン、ヒポキサンチンの分布、また種々の条件におけるヌクレオチドの変化の原因について考察を行った。

* 東洋食品工業短期大学 (兵庫県川西市南花屋敷4丁目23-2)

Toyo Junior College of Food Technology. Kawanishi, Hyogo.

** 不二製油株式会社研究所 (大阪府泉佐野市住吉町1番地)

Research Laboratory, Fuji Seiyu Co., Izumisano, Osaka.

本報においてはつぎの略号を使用する

5'-AMP : adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP : cytidine-5'-monophosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP : uridine-5'-monophosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP : inosine-5'-monophosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP : guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

RNA : ribonucleic acid

DNA : deoxyribonucleic acid

ADP : adenosine diphosphate

ATP : adenosine triphosphate

bpNPP : Bis-*p*-nitro phenyl phosphoric acidpNPP : *p*-nitro phenyl phosphoric acid

Hyp : Hypoxanthine

Ino : Inosine

RNase : ribonuclease

DNase : desoxyribonuclease

PDase : phosphodiesterase

PMase : phosphomonoesterase

実験方法

1. 供試物質

前報¹⁾に準ずる。

2. 試料の調製

カキをホモジナイズし、常法により、アセトン粉末を作り、そのアセトン粉末より5倍量の蒸留水にて5℃2時間抽出し、補助剤でろ過し、そのろ液を粗酵素液とした。

2. 分析方法

核酸成分の分析は前報¹⁾に準じた。蛋白酵素の分画は、Sephadex G-100によるゲルろ過、DEAE-celluloseによるカラムクロマトグラフィーによった。蛋白質はFOLIN-CIOCALTEU²⁾の呈色法、または280 nmの吸収によって定量した。

4. 核酸関連物質分解酵素活性の測定

Deaminase 活性 (5'-AMP) は KALKAR³⁾ の方法、PMase 活性は須原⁴⁾らの方法によった。

実験結果

1. Sephadex, DEAE-cellulose による酵素系の分画

粗酵素液 1.0 l に硫酸アンモンを飽和になるまで加え 18,000 G で遠心分離し、生じた沈殿を 0.01 M acetate

Buffer (pH 6.0) に溶解し、その上澄液を 5℃で一昼夜 0.01 M acetate Buffer (pH 6.0) で透析した、透析内液（蛋白量として 250 mg）を Sephadex G-100 にてゲルろ過を行った。そのクロマトグラムは第1図である。

第1図 カキ抽出液の Sephadex G-100 によるゲルろ過

第2図 カキ抽出液の DEAE-セルローズカラムクロマトグラム

第1表 カキの PMase 活性と比活性

		PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	1	27,500	290.5	94.6
	2	9,000	290.5	31.0
Ammonium sulfate	1	9,400	58.1	161.7
	2	7,200	58.1	123.9
Sephadex G-100	1	3,600	3.4	1058.8
	2	2,004	3.4	588.2
DEAE-cell. Column	A	820	0.5	1640.0
	B	1,030	0.5	2060.0
	C	650	0.6	1083.3
	D	5,060	0.6	8433.3

1: 最適 pH を 3.5 に持っている粗酵素画分

2: 最適 pH を 10.0 に持っている粗酵素画分

溶出液は 0.05 M acetate buffer にて溶出を行った。PMase 活性は pH 5.0 と pH 10 にて測定を行った。PMase 活性を有する画分は 1 個であるが、その中に pH 3.0 と pH 11.0 にピークを持つことが明らかになった。PMase 活性の画分を画分 0 と仮に命名した。画分 0 について相互の分離と精製を目的に再クロマトグラフィーを行った。また PMase 活性を有する画分 0 には、Deaminase 活性も存在することを認めた。すなわちその部分を硫酸塩析したのち、沈殿を集め、0.01 M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析し、その内液を DEAE-cellulose に吸着したのち 0.01 M acetate buffer で食塩濃度 0.015 M から 0.3 M まで Step byse にて溶出を行った。そのクロマトグラムは第2図のごとくである。

画分 0 が DEAE-cellulose カラムにより、PMase 活性画分中の pH 3.0 に最適を有する画分が 3 個、また pH 10.0 に最適 pH を有する画分 1 個を見出し、その画分を仮に A, B, C, D とする。上述のごとく粗酵素液を硫酸アンモンで塩析し、Sephadex G-100, DEAE-cellulose で精製した諸経過における PMase の活性、DAase 活性の消長は第1表の如くである。

PMase 活性は A が約 16, B が 20, C が 10, D が 20 倍に濃縮された。DAase は約 250 倍に濃縮された。しかし DAase (上記での緩衝液は pH 3.0~7.0 までは酢酸緩衝液を、また pH 6.0~10.0 まではトリス緩衝液を使用した)。PMase 画分 A, B, C の画分は pH 3.5~4.0 に最適 pH を見出した。DAase 画分と PMase 活性を有する画分の B 画分は分離することは、できなかった。

2. 分画された酵素系の諸性質

(1) 最適 pH, 最適温度, 熱安定性について

PNPP と 5'-AMP で PMase 活性の最適 pH, また DAase 活性は 5'-AMP を基質として最適 pH を検討し

第3図 カキ酵素液の PMase 画分 A, B, C の 最適 pH

第4図 カキ酵素液の PMase 画分 D の最適 pH

第5図 カキ酵素液の E 画分の最適 pH

第6図 カキ酵素液の PMase 画分 A, B, C, D と E 画分の最適温度

第7図 カキ酵素液の PMase 画分 A,B,C の熱安定性

第8図 カキ酵素液の PMase 画分Dの熱安定性

た結果、第3, 4, 5図の如くである。また PMase 画分、DAase 画分のそれぞれの最適 pH での最適温度を調べた結果は第6図のごとくである。PMase 画分の A, B, C は同様な最適 pH, 最適温度、熱安定性を示した。

また熱安定性は、各酵素液をそれぞれの最適 pH (0.2 M 緩衝液) で希釈し種々の温度で 15 分間保持した後、急冷し常法によって残存活性を測定した。その結果第 7, 8 図のごとくである。

A, B, C 画分は 3.5 に最適 pH を有する。また D 画分は pH 10.0 に最適 pH を見出した。最適温度も A, B, C, D 画分ともに 40°C, DAase 画分も 40°C であった。熱安定性においても A, B, C 画分ともに 50°C で 90% 失活し、DAase 画分も 50°C で 90% 失活することがわかった。

(2) 金属イオンおよび阻害剤の影響

各画分の活性におよぼす金属イオンおよび阻害剤としての試薬の影響を調べた。PMase 画分は、 Mg^{2+} , K^{+} ,

第2表 カキ酵素の性質

	PMase		DAase
	A, B, C	D	B
最適 pH	3.5~4.0	10.0	3.5
熱安定性	50°C で 90% 失格	50°C で 80% 失格	50°C で 90% 失格
最適温度	40°C	40°C	40°C
薬剤の影響	Mg^{2+} , K^{+} , クエン酸で促進 NaF , Na_2HPO_4 で阻害		

第3表 カキ酵素液の DAase 活性

pH	標準物質	DAase (unit)	蛋白量 (mg)	比活性 (unit/mg prot)
3.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	660	33.6	19.6
	5'-AMP	160	33.6	14.7
6.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	308	33.6	9.1
	5'-AMP	28	33.6	0.83
10.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	—	33.6	—
	5'-AMP	—	33.6	—

クエン酸で促進され、 NaF , Na_2HPO_4 で阻害された。DAase 画分では、 Mg^{2+} , Ca^{2+} で促進され、 NaF , Na_2HPO_4 で阻害された。以上カキ酵素の性質をまとめると第2表のごとくである。

(3) 5'-AMP, アデノシン, アデニンに対する DAase 画分の作用

DAase 活性のある画分は前述のごとく 5'-AMP を 5'-IMP にデアミネーションするばかりでなく、アデノシン, アデニンにも作用するのではないかとと思われるので pH 3.0 (酢酸緩衝液) pH 6.0, pH 10.0 (トリス緩衝液) の3種で DAase の作用を検討した結果第3表のごとくである。

このように pH 3.0 でアデノシン 5'-AMP には活性を示したが、アデニンについては、デアミネーションされなかった。したがって 5'-AMP は 5'-IMP にアデノシンはイノシンにデアミネーションされることが明らかになった。またそのうちでもアデノシンからイノシンになる経路がかなり強いことが明らかになった。

(4) 5'-AMP, アデノシンからの DAase による 5'-IMP, イノシンの生成

前述のごとくカキにおいては、DAase 活性を有するので、5'-AMP, アデノシンに作用させ、その分解生成物を調べた。その作用方法は第9図のごとくである。

反応させた 5'-AMP, アデノシンのペーパークロマ

第9図 DAase の作用方法

 第10図 各種標品に対するカキ DAase 画分の作用
 展開液: 飽和硫酸・IM 酢酸ソーダ, イソプロパノール(80:20:2)

トグラフィを行った。その結果は第10図ごとくである。

第10図に示すごとく粗酵素液の作用によって5'-AMPからはイノシン酸が生成し、またアデノシンからはイノシンが生成されたが、アデニンには作用せずアデニンのままで残存していた。

考 察

カキにおいては前報¹⁾のマッシュルーム、シイタケのごとく、RNase, PDaseは見出されなかったが、PMase, DAaseの活性を見出した。PMase画分は前報¹⁾のクルマエビによく似ている、アルカリ性側の画分においてかなり異なっていた。DAase画分の報告は貝類、軟体動物において少ないと思われる。現在までアデノシンをイノシンにデアミネーションすることは、新井⁵⁾らによっ

てアワビ等で報告されたが、5'-AMPをデアミネーションする酵素作用は見出されていない。

カキにおいて5'-AMPをデアミネーションし、5'-IMPを生成することを認めた。このようなことより、カキにおける5'-IMPの生成と分解について裏付けると次のようになると考える。ホスファターゼ活性が強いために、5'-AMPか、5'-IMPに変化してもすぐに分解されてイノシンになること、またアデノシンからイノシンに変る経路が最も強いために、5'-IMPでなくイノシンでかなり蓄積されるものと思われる。また前報¹⁾の市販品での5'-IMPの存在しない理由として酵素系より明らかに証明することができた。すなわち店頭での放置時間と温度のためにホスファターゼの作用が大きく、消費者が手にしたときは5'-IMPでなくすでにイノシンになっていることが明らかになった。

要 約

かきの可食部のPMaseとDAaseをSephadex, DEAE-celluloseを用いて分離精製し、それらの一般的性質を調べた。PMase活性の画分4個、DAase画分1個が認められた。またPMase活性の酵素作用の最適pHは10.0、最適温度40°C、DAase活性の最適pHは3.5~4.0、最適温度は40°Cであった。これらの結果からかきの5'-IMP、イノシン、ヒポキサンチンの生成について説明されるものと考えられる。

文 献

- 1) 毛利: 食品工誌, 21, 367 (1974).
- 2) FOLIN-CIOCALLEU: *J. Biol. Chem.* 73, 629 (1957).
- 3) KALKAR: *J. Biol. Chem.* 67, 429, 445 (1954).
- 4) 須原: 酵素化学シンポジウム第16号 115 (1964).
- 5) 新井: 昭和40年日本水産学会秋季大会シンポジウム

(昭和48年8月1日受理)