魚肉冷蔵中のイノシン酸分解に関与する 2 酵素 に対する塩の阻害様式

大羽和子*・丹羽栄二**

The Mode of Inhibition by Salts to Two Enzymes Involved in IMP Degradation in Fish Flesh

Kazuko ÔBA* and Eiji NIWA**

* Faculty of Home Economics, Nagoya Women's University
3-40, Shioji-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467

** Faculty of Bioresources, Mie University, 1515, Kamihama-cho, Tsu 514

In order to clarify the mode of inhibition by salts, some properties of two enzymes involved in IMP degradation during the cold-storage of fish flesh were studied. Crude 5'-nucleotidase from walleye pollack showed an optimum pH of about 8.0 and an apparent K_m value of 0.83 mM for IMP, while that from silver whiting showed the pH of above 9.0 and the K_m value of 0.18 mM. They were uncompetitively inhibited by NaCl with the K_i values of 0.38 and 0.36 M, respectively. $CaCl_2$ and KCl also inhibited their activity. On the other hand, crude purine nucleoside phosphorylase from walleye pollack showed the K_m value of 0.20 mM for inosine, while that from silver whiting showed the value of 0.1 mM. The former was not inhibited by NaCl and $CaCl_2$, but the latter was noncompetitively inhibited by NaCl with the K_i value of 1.0 M.

(Received Dec. 16, 1992)

さきに筆者らは、シロギスすり身冷蔵中のヒポキサンチン (Hx) 生成が、塩化ナトリウムの添加によって抑制されることを報告した¹⁾。さらに、スケトウダラ無塩冷凍すり身やマイワシすり身冷蔵中のイノシン酸 (IMP) の分解が、NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$ などの添加により抑制されること、および食塩を添加したスケトウダラすり身の冷蔵中、IMP が減少するにつれて Hx が蓄積するが、シロギスやマイワシでは Hx の生成はほとんどなく、替わってイノシン (HxR) が蓄積することなどを明らかにした²⁾。本研究ではスケトウダラとシロギスを材料とし、IMP の分解に関与する 2 種類の酵素、IMP から HxR への変換に関与する 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-Ribonucleotide phosphohydro-lase, EC 3.1.3.5) および HxR から Hx への変換に

関与するプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (Purine-nucleoside: orthophosphate ribosyltransferase, EC 2.4.2.1) に対する塩類の影響を調べ、魚肉冷蔵中の IMP 分解に及ぼす塩類の抑制機構を明らかにすることを目的とした。

実 験 方 法

1. 材 料

魚肉：スケトウダラ *Theragra chalcogramma* およびシロギス *Sillago japonica* 鮮魚は、魚市場から当日朝入荷されたものを名古屋市内小売店で購入した。

塩類：NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ は試薬特級を用いた。最近健康志向が高まり、KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ や $CaSO_4$ などを含む塩の消費が増えつつあるため、

* 名古屋女子大学家政学部 (〒467 名古屋市瑞穂区汐路町 3-40)

** 三重大学生物資源学部 (〒514 津市上浜町 1515)

Table 1 に示した微量元素の含有量の異なる 3 種の食塩, No. 1 (市販の食塩と同組成), No. 2 (市販の主な天塩と同組成) No. 3 (No. 2 の 2 倍量の微量元素を含有) を用いた.

2. 粗酵素の抽出

鮮魚から背肉 30 g を採取し, 冷蒸留水 90 ml とともにホモブレンダーで磨砕し, 遠心分離 (9 000 rpm, 15 分) した. 5'-ヌクレオチダーゼを抽出する場合, 上清を 10 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して 2.5 日間低温室で透析し, 透析内液を粗酵素溶液とした. プリンヌクレオシドホスホリラーゼの場合, 30 mM メルカプトエタノールを含む 2.5 mM トリスアセテート緩衝液 (pH 7.5) に対して 1.5 日間透析した.

3. 酵素活性の測定

(1) 5'-ヌクレオチダーゼ活性: 透析後, 冷蔵保存中に失活が大きいの (2 日間で 50% 失活), 透析終了当日に活性測定を完了した. 20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1.5 ml 中で, IMP (1.0 nmol) を基質にし

て, 塩類無添加及び共存下において 25℃ で一定時間酵素反応を行った. 8% トリクロロ酢酸 2.0 ml を加えて反応を止め, 遠心分離で沈殿を除去した. 上清に遊離した無機リン酸 (Pi) 量をモリブデン青比色法で定量し, 酵素活性を求めた.

(2) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ活性: 33 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 1.5 ml 中で, HxR (0.5 μ mol) を基質として, 塩類無添加及び共存下において 38℃ で 30 分間反応させ, 沸騰水中で 10 分間加熱して反応を止めた. 沈殿を除去し, 上清をミリポアフィルター (0.45 μ m) に通し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて HxR と Hx を分離し, ピーク面積からそれぞれを定量し, 酵素活性を求めた.

(3) HPLC の分析条件: 装置: TOSOH HLC-803 D, カラム: TOSOH-80 TM (4.0 $\times$ 250 mm), 溶媒: 0.1 M NaH₂PO₄-CH₃CN (98:2, v/v), 流速: 0.8 ml/min, 検出器: TOSOH UV-8000, 波長: 260 nm

Table 1 Composition of salt No. 1, No. 2 and No. 3

(%)

Salt	H ₂ O	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	KCl	CaSO ₄	MgSO ₄
No. 1	0.07	99.64	0.04	0.03	0.19	0.03	0
No. 2	0.05	98.20	0.68	0	0.21	0.48	0.38
No. 3	0.11	96.44	1.46	0	0.42	0.99	0.58

Fig. 1 Optimum pHs of 5'-nucleotidase from walleye pollack (left) and silver whiting (right)

●, ▲, ○, and ■, sodium succinate buffer, sodium maleate buffer, Tris-HCl buffer and glycine-NaOH buffer were used, respectively.

4. タンパク質の定量

バイオラッド社のタンパク質定量用試薬を用い、子牛血清アルブミンを標準タンパク質として、595 nm における吸光度からタンパク質量を求めた。

結果および考察

1. 5'-ヌクレオチダーゼの性質と塩類の影響

(1) 至適 pH: 0.2 M コハク酸緩衝液 (pH 4.0~6.0), 0.2 M マレイン酸緩衝液 (pH 5.5~7.1), 0.2 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.0~8.9), 0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.6~10.0) の4種類の緩衝液を用いて 5'-ヌクレオチダーゼの至適 pH を調べた。Fig 1 に示したようにスケトウダラの場合、pH 8.0 付

Fig. 2 Lineweaver-Burk plots of 5'-nucleotidase from walleye pollack (top) and silver whiting (bottom) in the absence (○) and presence (●, 0.3 M; ■, 0.5 M) of NaCl

v, reaction rate; (IMP), concentration of IMP.

近に最大活性が見られたが、シロギスでは9.0以上に見られた。この結果からスケトウダラ、シロギスともに本酵素の至適 pH はアルカリ側にあるが、その値は若干異なることが示唆された。

(2) 酵素反応速度と基質濃度の関係: IMP 濃度 (s) の上昇につれて反応速度 (v) は増加した。1/v を縦軸、1/s を横軸として Lineweaver-Burk プロットを画くと両魚種酵素ともに直線が得られた (Fig. 2)。スケトウダラ酵素の見かけの Michaelis 定数 (K_m) は 0.83 mM でサーモンやマダラ酵素の IMP に対する見かけの K_m 値³⁾⁻⁶⁾ とほぼ一致した。しかし、シロギス酵素の K_m 値は 0.18 mM で、コイの酵素の K_m 値に類似しており⁵⁾、スケトウダラの酵素に比べて IMP に対する親和性が高いことが示唆された。ゴウシュウマダイの酵素の K_m 値は 0.03 mM とさらに小さい値の報告もある⁹⁾。

(3) 塩類の影響: 酵素活性に及ぼす NaCl 添加の影響を調べた。NaCl 無添加の場合の酵素活性を 100 とした場合の相対活性を Fig. 3 に示した。スケトウダラ、シロギスの両酵素とも NaCl 濃度が増すにつれて酵素活性に対する阻害度は増加し、Lineweaver-Burk プロットより不拮抗阻害であることが判った (Fig. 2)。NaCl が存在すると K_m 値は減少するが、 V_{max} 値が減少したのは、酵素-基質複合体から生成物が生成さ

Fig. 3 Effect of NaCl on the activity of 5'-nucleotidase from walleye pollack (---●---) and silver whiting (—●—)

れるステップが NaCl によって阻害されたためと察せられる。阻害反応の Lineweaver-Burk プロットの2次プロットから NaCl に対する見かけの阻害定数 (K_i) を求めると、スケトウダラでは 0.38 M, シロギスでは 0.36 M であった。さきに富岡・遠藤⁶⁾はブリの5'-ヌクレオチダーゼが NaCl で拮抗的に阻害され、NaCl に対する K_i 値は 0.11-0.16 M と報告したが、魚種によって NaCl の阻害様式が異なる可能性もある。

通常、保蔵や調味のために魚肉に 0.5 M 程度の塩を添加するので、0.5 M の各種塩類を反応液に添加した場合の酵素活性を測定した。魚肉 g 当たりの酵素活性に及ぼす塩の影響を Table 2 に比較したが、スケトウダラでは塩無添加の時の酵素活性は 8.65 nmol/10 min/g であるのに対し、食塩 No. 1 を添加すると活性が 60%, 食塩 No. 2, No. 3 では 12~16% 阻害された。また、NaCl では 52%, KCl では 20%, $MgCl_2$ では 46%, $CaCl_2$ では 93% 阻害された。

一方、シロギスでは塩無添加の場合の酵素活性が 3.84 nmol/10 min/g でかなり低かった。食塩 No. 1, No. 2, No. 3 を添加すると活性がそれぞれ 49%, 35%, 25% 阻害されたが、この3者の間にスケトウダラに見られたような大きな差異はなかった。また NaCl では 52%, KCl では 33%, $MgCl_2$ では 42%, $CaCl_2$ では 88% 阻害された。タンパク質 mg 当たりの酵素活性に対する塩類の添加効果を比較したが、スケトウダラ、シロギスいずれの酵素においても魚肉 g 当たりの酵素

活性に及ぼす塩類の影響と類似していた。マダラの酵素では $CaCl_2$ で強く阻害されるのに対し、 $MgCl_2$ で活性化されるという報告もあるが³⁾、本研究では $MgCl_2$ で逆に阻害された。

2. プリンヌクレオシドホスホリラーゼの性質と塩類の影響

(1) 性質: HxR の Hx への分解には、プリンヌクレオシドホスホリラーゼが関与すると一般に考えられているが、イノシンヌクレオシダーゼ (Inosine ribohydrolase, EC 3.2.2.2) が関与するという報告もある^{7,9)}。前者は Pi を必須とするが、後者は必須としない。スケトウダラではいずれの酵素が優勢であるかを確かめるために、ここで HxR 分解反応における Pi の必要性を検討した。酵素活性をリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) とトリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中で比較したところ、前者では 76.0 nmol/10 min/g であるのに対して、後者では 13.0 nmol/10 min/g であり、この酵素反応にとって Pi の存在が必要ながことが判った。したがって、スケトウダラではプリンヌクレオシドホスホリラーゼが主に HxR の分解に関与していると考えられる。また、酵素量 (100~850 μ l), 反応時間 (0~60 分) が増すとともに活性は直線的に増加し、見かけの至適 pH は 7.5 付近であった。Lineweaver-Burk プロットを画くと Fig. 4 に示すような直線となった。スケトウダラ酵素の HxR に対する見かけの K_m 値は 0.20 mM であるのに対してシロギス酵素では 0.10 mM であることから、スケトウダラ酵素よりもシロギス酵素の HxR に対する基質親和性が高いことが示唆された。

(2) 塩類の影響: NaCl 無添加の酵素活性 (スケトウダラ 7.60 nmol/min/g, シロギス 8.86 nmol/min/g) を 100 とし、NaCl を添加した場合の相対活性をみると、スケトウダラ酵素の活性に及ぼす NaCl の影響はわずかで、1 M NaCl の存在下でも阻害は 10% 程度にすぎなかった。これに対してシロギス酵素では NaCl 濃度の増加につれて徐々に阻害度が増加し、0.5 M NaCl 存在下で 20% 阻害された。しかし、それ以上濃度を増しても阻害度は変わらなかった。NaCl の存在下で Lineweaver-Burk プロットを画くと阻害様式は非拮抗阻害で、 K_i 値は 1.0 M であった (Fig. 4)。

つぎに、酵素活性に及ぼす他の塩類の影響を調べた。魚肉 g 当たりの活性を比較すると (Table 3), スケトウダラでは、食塩 No. 1 によって 5% ほど阻害されたが、食塩 No. 2, 食塩 No. 3, $CaCl_2$ でむしろ活性化された。しかし、NaCl で 11%, KCl で 29%, $MgCl_2$

Table 2 Effect of various salts on the activity of 5'-nucleotidase from walleye pollack and silver whiting

Salt added	Relative activity (%)	
	Walleye pollack	Silver whiting
None	100*	100**
Salt 1	40	51
Salt 2	84	65
Salt 3	88	75
NaCl	48	48
KCl	80	67
$MgCl_2$	54	58
$CaCl_2$	7	12

Salt concentration was 0.5 M.

* and **, the measured enzyme activities at 100% were 8.65 and 3.84 nmol/10 min/g tissue, respectively.

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots of purine nucleoside phosphorylase from walleye pollack (top) and silver whiting (bottom) in the absence (●) and presence (○) of 0.5 M NaCl

v , reaction rate; (Inosine), concentration of inosine.

では21%の阻害が見られた。食塩 No. 1 と NaCl の阻害度が類似しているのは、食塩 No.1 の大部分が NaCl であることによると思われる。一方、シロギス酵素の食塩 No. 1, No. 2, No. 3 による阻害度は約30%で、NaCl や KCl で40%、CaCl₂ で30%、MgCl₂ で15%程度阻害された。タンパク質 mg 当たりの酵素活性に対する塩類の添加効果は、スケトウダラ、シロギスいずれの酵素ともに魚肉 g 当たりの活性で示した時の阻害度と殆ど変わらなかった。

スケトウダラ魚肉 g 当たりの5'-ヌクレオシダーゼとプリンヌクレオシドホスホリラーゼの活性を比較すると後者の活性が高かった。また、後者は塩に対する感受性が低く、IMP から Hx への分解過程では5'-ヌクレオシダーゼが律速酵素になっていることが示唆された。したがって、スケトウダラすり身を貯蔵する際に食塩を添加すると、IMP の減少が抑制され Hx の生成も抑制

Table 3 Effect of various salts on the activity of purine nucleoside phosphorylase from walleye pollack and silver whiting

Salts added	Relative activity (%)	
	Walleye pollack	Silver whiting
None	100*	100**
Salt 1	95	72
Salt 2	147	70
Salt 3	108	73
NaCl	89	58
KCl	71	61
MgCl ₂	79	85
CaCl ₂	165	71

Salt concentration was 0.5 M.

* and **, the measured enzyme activity at 100% were 7.60 and 8.86 nmol/min/g tissue, respectively.

される機構²⁾を解明した。

一方、シロギス酵素においては、魚肉 g 当たりのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ活性は5'-ヌクレオシダーゼ活性よりも高かったが、食塩によって30~40%の活性が阻害された。また、シロギスの5'-ヌクレオシダーゼは基質に対する親和性が高い(K_m 値が小さい)ことなどを考え合わせると、魚肉すり身に食塩を添加して冷蔵すると IMP の減少が抑制され、HxR が若干蓄積し、Hx の生成が完全に抑制された¹⁾ことが酵素レベルで説明できた。

要 約

魚肉冷蔵中の IMP の分解に関与する2酵素に対する塩の影響をスケトウダラおよびシロギスについて調べた。

1. 5'-ヌクレオシダーゼ：スケトウダラから抽出したその至適 pH は8.0付近で、IMP に対する見かけの K_m 値は0.83 mM であるのに対し、シロギス酵素の至適 pH は pH 9.0 以上、K_m 値は0.18 mM であった。いずれの活性も塩によって阻害され、その程度は CaCl₂ > 食塩 No. 1, NaCl, MgCl₂ > 食塩 No. 2, No. 3, KCl の順であった。NaCl による阻害は不拮抗的で、K_i 値はスケトウダラで0.38 M、シロギスで0.36 M であった。

2. プリンヌクレオシドホスホリラーゼ：スケトウダラから抽出した酵素の HxR に対する見かけの K_m 値

は 0.20 mM であった。その活性は NaCl によってほとんど阻害されなかったが、KCl, MgCl₂ によって阻害され、食塩 No. 2, No. 3, CaCl₂ ではむしろ活性化された。一方、シロギスから抽出した酵素の Km 値は 0.10 mM であり、その活性は NaCl, KCl > 食塩 No. 1, No. 2, No. 3, CaCl₂ > MgCl₂ の順に阻害された。NaCl による阻害は非拮抗的で、その Ki 値は 1.0 M であった。

3. これらの 2 種類の酵素に及ぼす塩の影響を調べることによって、魚肉の冷蔵中に起こる IMP の減少や Hx の生成に対する塩類の抑制機構が酵素レベルで説明できた。

本研究はソルト・サイエンス研究財団の助成金を受けて行われたものであり、深謝致します。

文 献

- 1) 大羽和子・勝 孝子・小野真知子：家政誌, **42**, 435 (1991).
- 2) 大羽和子・丹羽栄二：日食工誌, **39**, 1007 (1992).
- 3) TARR, H.L.A., GARDNER, L.J. and INGRAM, P.: *J. Food Sci.*, **34**, 637 (1969).
- 4) TOMIOKA, K. and ENDO, K.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1739 (1984).
- 5) 富岡和子・遠藤金次：日水誌, **50**, 889 (1984).
- 6) 富岡和子・遠藤金次：日水誌, **54**, 1947 (1988).
- 7) 丸尾文治・田村信雄監修：酵素ハンドブック, (朝倉書店, 東京), p. 524 (1982).
- 8) TARR, H.L.A.: *Biochem. J.*, **59**, 386 (1955).
- 9) NEDACHI, K. and HIROTA, H.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1905 (1992).

(平成 4 年 12 月 16 日受理)