カツオ筋肉の 5'-ヌクオチダーゼに関する研究—II

精製酵素の二、三の性質*

広 田 望

(1973 年 8 月 16 日受理)

Studies on 5'-Nucleotidase of Bonito Muscle—II

Some Properties of Purified Enzyme

Nozomu HIROTA**

Previously, the author reported the purification of 5'-nucleotidase from bonito muscle by extraction with water, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. In this paper, studies on some of the properties of the purified 5'-nucleotidase are reported.

This enzyme had a pH optimum of 5.5 in the presence of 0.01 M Mg^{2+} , with 5'-IMP as substrate. The rate of Pi liberation from 5'-IMP was linear for 80 minutes, the rate of hydrolysis decreasing slightly thereafter.

This enzyme showed highest relative activity with 5'-IMP as substrate, and also hydrolyzed other 5'-nucleotides. On the other hand, it did not act on 3'(2')-nucleotides.

Of several metal ions Mg^{2+} was most effective and Fe^{2+} also activated this enzyme. Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} inhibited the 5'-nucleotidase activity to 56%, 70%, 67% and 35% of the control activity respectively, while Ba^{2+} completely inhibited this enzyme.

The apparent K_m value of 1.08 mM and pK_m of 2.97 were calculated for 5'-IMP. Using Sephadex G-200 gel filtration, the molecular weight of this enzyme was estimated to be 115,000.

前報¹⁾では生鮮カツオ筋肉(普通肉)から 5'-IMP の分解に関与する酵素の分離および精製法について検討し、硫酸分画, pH 調整, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー, ゲル濾過 (Sephadex G-200) により電気泳動(ディスク)的に均一とみなされる酵素が得られたことについて報告した。今回はこの方法で得られた精製酵素の性質について検討した結果を報告する。

実 験 方 法

酵素試料 前報¹⁾で示したように生鮮カツオ筋肉(普通肉)から抽出した粗酵素液から精製した酵素試料を用いた。

酵素活性 前報に述べた方法に準じて測定した。

実験結果および考察

pH の影響 精製酵素の pH 活性曲線をしらべた結果は Fig. 1 に示すように、5'-IMP に対する至適 pH は 0.01 M Mg^{2+} 存在下で 5.5-6.0 付近に存在することが確認された。この至適 pH は TARR²⁾ が太平洋産タラ肉の 5'-ヌクレオチダーゼで観察した 7.6, LEVIN³⁾ による牛精液プラズマの 7.5, BJÖRK⁴⁾ のコブ

* 本報告は北海道大学に提出した学位論文の一部である。

** 宮城県水産加工研究所 (Miyagi Pref. Fish. Manuf. Res. Inst., Ishinomaki, Japan)

Fig. 1. Effect of pH on the activity of 5'-nucleotidase. The reaction mixture contained 0.005 M 5'-IMP, 0.2 M buffer solution, 0.01 M $MgCl_2$ and purified enzyme preparation. The mixture was incubated for 40 min at 37°C. Buffer solution: Acetate (pH 3-6), Tris-HCl (pH 7-9) and glycine-NaOH (pH 10-11).

Fig. 2. Time course of the P_i liberation from 5'-IMP. The reaction mixture contained 0.005 M 5'-IMP, 0.2 M acetate buffer (pH 5.5), 0.01 M Mg^{2+} and enzyme preparation. The mixture was incubated for various time intervals at 37°C.

ラ毒液の 7.5, BOSMANN に⁶⁾によるラット小脳の 6.8 ± 2 より低く, ITOH ら⁶⁾によるニワトリ肝臓の 6.5 よりやや低い値を示すが, FRITZSON⁷⁾によるラット肝臓の 6.2(5'-UMP), ヒト胎盤の 5.2-5.3 とほぼ近い値を示した。

酵素活性と反応時間 精製酵素の 5'-IMP に対する活性と反応時間との関係は Fig. 2 に示すように 37°C, 80 分反応まではその活性はほぼ直線を示しその後はやや減少する傾向を示した。

基質特異性 種々の基質に対する精製酵素の活性度を比較した結果を Table 1 に示す。なお各基質は 0.005 M になるように添加し 37°C, 50 分, 0.01 M Mg^{2+} 添加, pH 5.5 における活性を 5'-IMP を 100 としたときの活性度で比較した。

この結果からカツオ普通肉から精製した 5'-IMP に対して活性を有する酵素は 3'(2')-AMP, 3'(2')-GMP, 3'(2')-UMP に対する活性は認められず β -GP に対する活性も極めて低く, これに反して 5'-IMP および 5'-UMP に対しては高い活性を有しており 5'-AMP および 5'-GMP に対する活性も試められた。このことからこの精製酵素は 5'-ヌクレオチダーゼであることが明らかである。一般に 5'-ヌクレオチダーゼが 5'-UMP に対して強い活性を有することは太平洋産タラ肉²⁾, ラット肝臓⁷⁾, 小牛腸⁹⁾, 牛脳下垂体¹⁰⁾, コイ肉¹¹⁾などで観察されており, 本実験においても 5'-IMP と同程度の活性が認められた。また 5'-IMP と同様プリン塩基を有する 5'-GMP に対する活性は 5'-IMP の 42% と低い値を示したが, このことはタラ肉²⁾の 5'-ヌクレオチダーゼの 5-GMP に対する活性が 5'-IMP の 32%, コイ肉¹¹⁾でも同様 32% と示されておりこれらの魚種で観察された結果とほぼ一致している。

金属イオンの影響 種々の金属イオン

による影響をしらべた結果を Table 2 に示す。ただし金属イオンは反応液に対し 0.01 M 濃度になるように添加し pH 5.5, 37°C, 50 分反応させたときの 5'-IMP に対する活性で比較した。この結果, 金属イオン無添加の場合を 100 とし Mg^{2+} は 133, Fe^{2+} は 112 とそれぞれ活性は賦活されたが Co^{2+} , Ni^{2+} はほとんど

Table 1. Substrate specificity of 5'-nucleotidase.

Substrate 0.005 M	Activity P μ g/ml/min	Relative activity %
5'-IMP	0.33	100
5'-AMP	0.23	70
5'-GMP	0.13	42
5'-CMP	0.07	21
5'-UMP	0.33	100
3'(2')-AMP	0	0
3'(2')-GMP	0	0
3'(2')-UMP	0	0
β -GP	0.03	9

The reaction mixture contained 0.005 M substrate, 0.2 M acetate buffer (pH 5.5), 0.01 M MgCl₂ and enzyme preparation. The mixture was incubated for 50 min at 37°C.

Table 2. Effect of metal cations on the activity of 5'-nucleotidase.

Addition	Activity P μ g/ml/min	Relative activity %
Mg ²⁺	0.152	133
Ca ²⁺	0.064	56
Mn ²⁺	0.080	70
Fe ²⁺	0.128	112
Fe ³⁺	0.074	67
Ba ²⁺	0	0
Ni ²⁺	0.112	98
Co ²⁺	0.120	105
Zn ²⁺	0.040	35
None	0.114	100

The reaction mixture contained 0.005 M 5'-IMP, 0.2 M acetate buffer (pH 5.5), 0.01 M metal salts and enzyme preparation. The mixture was incubated for 50 min at 37°C.

影響は認められず、Mn²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺ によつてはいずれも活性阻害が認められ特に Zn²⁺ および Ba²⁺ による阻害作用が著しく Ba²⁺ 添加によつてはその活性がまったく抑止された。

5'-ヌクレオチダーゼの活性が Mg²⁺ によつて賦活されることについては、タラ肉²⁾、ラット小脳⁵⁾、ニワトリ肝臓⁶⁾、ラット肝臓^{7,12)}、小牛腸⁹⁾ などで認められているところであるが、一方活性阻害作用として Zn²⁺ についてはタラ肉²⁾、小牛腸⁹⁾、コイ肉¹¹⁾、ラット肝臓¹³⁾、ラット心臓¹⁴⁾ など多数の例で観察されており、Ca²⁺ についてもラット小脳⁵⁾、ヒト胎盤⁸⁾ でそれぞれ観察されている。また Ni²⁺、Co²⁺ についてはラット肝臓¹³⁾ では影響はみられず、ヒト胎盤⁸⁾ ではわずかに阻害されニワトリ肝臓⁹⁾ では Mg²⁺ 添加に対してそれぞれ 65%、26% であると報告されている。

次に Mn²⁺ については本実験では無添加区の活性を 100 としたとき 70 とやや阻害作用がみられたが、この Mn²⁺ の影響はニワトリ肝臓⁶⁾ についても同様のことが観察され Mg²⁺ に比し 24% の活性しか示さないことが報告されている。これに反してタラ肉²⁾ では Mn²⁺ は強い活性を与え小牛腸⁹⁾ やラット小脳⁵⁾ でも活性賦活効果のあることが認められている。

基質濃度と反応速度 精製酵素の 5'-IMP に対する基質濃度と反応速度の関係を次の方法¹⁵⁾ で検討した。すなわち各濃度の基質および酵素混液を別個の試験管に取り、あらかじめ 37°C に加温した後両者を混和し反応後毎 20 分毎の平均値の吸光度を水解初速度 Vi とし 1/S 座標 (S は基質濃度) にプロットするいわゆる LINEWEAVER-BURK 図表^{16,17)} から Km 値を求めた結果は Fig. 3 に示すように 1.08×10^{-3} M、pKM 値は

Fig. 3. Effect of substrate concentration on reaction velocity.

The reaction mixture contained 0.2 M acetate buffer solution (pH 5.5), 0.01 M Mg^{2+} , various amount of 5'-IMP and enzyme preparation. The mixture was incubated at 37°C.

Fig. 4. Determination of the molecular weight of the bonito muscle 5'-nucleotidase by gel filtration on Sephadex G-200 column (2.4 x 50 cm).

2.97 となつた。この K_m 値は牛精液ブラズマ 5'-ヌクレオチダーゼ³⁾ の $3.1 \times 10^{-5} M$ (pH 7.5) に比して大きくまたコイ肉¹¹⁾ の pK_m 4.57 に比し低い値を示しているが、タラ肉²⁾ およびニワトリ肝臓⁶⁾ から得られた酵素の K_m 値 $0.8 \times 10^{-3} M$ と大差なく、ラット肝臓⁷⁾ の $0.21 \times 10^{-3} M$ よりやや高い値を示した。

ゲル濾過法による精製酵素の分子量の測定^{18,19)} 0.05 M トリス酢酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した標準たん白質試料 (Böhringer Mannheim 社製) の等容混液 (2 mg/ml) 5 ml を Sephadex G-200 のカラム (2.4 x 50 cm) に注加し 0.05 M トリス酢酸緩衝液で溶出 (0.2 ml/min) した。各標準たん白質試料の溶出容積 (V_e) を求め V_e/V_o を分子量の対数に対してプロットすると Fig. 4 のごとく直線を示すことが認められた。次にカツオ筋肉から精製した 5'-ヌクレオチダーゼを同時に処理して V_e/V_o を求め直線上にプロットした結果、分子量は 115,000 と推定された。

要 約

カツオ筋肉から分離精製された 5'-ヌクレオチダーゼの性質について検討し次の結果を得た。

1. 5'-IMP に対する至適 pH (0.01 M Mg^{2+} 存在下) は 5.5-6.0 であることが認められた。

2. 5'-IMP に対する活性は 80 分反応まではほぼ直線的に進行するが、その後はやや減少の傾向を示した。

3. 5'-IMP に対する活性を 100 とした場合、5'-UMP, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP はそれぞれ 100, 70, 42, 21 であり、3'(2')-AMP, 3'(2')-GMP, 3'(2')-UMP に対する活性は認められなかつた。

4. 金属イオンに対する影響については、活性賦活効果は Mg^{2+} が最も高く、ついで Fe^{2+} であつたが Ni^{2+} , Co^{2+} によつてはほ

とんど影響がみられず Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} は活性阻害を示し Ba^{2+} ではまったく活性を示さなかつた。

5. 5'-IMP を基質とした際の精製 5'-ヌクレオチダーゼの K_m 値は $1.08 \times 10^{-3} M$ を示し Sephadex G-

200 によるゲル濾過により分子量は 115,000 と推定された。

終りに御指導と御校閲をいただいた北海道大学水産学部長斎藤恒行博士，同大学石原義雄教授，秋場稔教授に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 広田 望：本誌，**39**，1271-1278 (1973).
- 2) H. L. A. TARR, L. T. GARDNER and P. INGRAM: *J. Food Sci.*, **34**, 637-640 (1969).
- 3) S. J. LEVIN and O. BODENSKI: *J. Biol. Chem.*, **241**, 51-56 (1966).
- 4) W. BJÖRK: *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 195-204 (1961).
- 5) H. B. BOSMANN and G. Z. PIKE: 同誌，**227**, 402-412 (1971).
- 6) R. ITOH, A. MITSUI and K. TSUSHIMA: 同誌，**146**, 151-159 (1967).
- 7) P. FRITZSON: 同誌，**178**, 534-541 (1969).
- 8) D. L. DIPIETRO: 同誌，**235**, 458-465 (1971).
- 9) M. S. CENTER and F. G. BEHAL: *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 414-421 (1966).
- 10) J. LISKOWSKI: *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 321-331 (1966).
- 11) 山本喜男・遠藤金次・門脇蓉子・岸田日出子：栄養と食糧，**19**, 385-389 (1967).
- 12) C. ARSENIS and O. TOUSTER: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5702-5708 (1968).
- 13) C. S. SONG and O. BODANSKI: 同誌，**242**, 694-699 (1967).
- 14) J. M. SULLIVAN and J. B. ALPERS: 同誌，**246**, 3057-3063 (1971).
- 15) 赤松 茂：酵素研究法，**2**, 42-57 (1956).
- 16) H. LINEWEAVER and D. BURK: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666 (1934).
- 17) J. R. WHITAKER: *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1953 (1963).
- 18) 林 勝哉：生化学実験法，東大出版会，東京，1971，pp. 83-100.