

食品中の核酸成分に関する研究*—VIII

しいたけ子実体の核酸分解酵素系

毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS-VIII NUCLEIC ACID DEGRADING ENZYMES OF SHII-TAKE (*LENTINUS EDODES*)

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

In a previous report (Journal of Fermentation Technology 43, 344 (1965)), it was assumed that the formation of 5'-GMP and other 5'-nucleotides during boiling process (mild heating with water) of Shii-take was due to the activities of the RNA and nucleoside polyphosphate degrading enzyme systems.

A crude extract of Shii-take was saturated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and the precipitate was fractionated by gradient elution with acetate buffer on the DEAE-cellulose column. Ribonuclease fractions thus obtained were designated as RNase A-1, A-2, and B. Both fractions A-1 and A-2 had an optimal temperature of 65°C and a pH of 4.5, but in fraction B they were 65°C and pH 8.0, respectively. Fractions D-1 and D-2 had a phosphodiesterase activity, decomposing bis-p-nitrophenylphosphate, with an optimal temperature of 60°C, and pH of 7.5. The optimal temperature and pH of phosphomonoesterase fraction (designated as PMase C) were 45°C and pH 4.5, respectively. In the digests of yeast RNA by RNase A-1 in acetate buffer (pH 4.5) or by RNase B in Tris-buffer (pH 7.5), four kinds of 5'-nucleotides, namely, 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-AMP, and 5'-GMP were accumulated abundantly.

* 本研究は大阪大学工学部醱酵工学教室教授寺本四郎先生との協同研究である。ご懇切な御助言、御協力を賜ったことに深謝致します。

醱酵工学44巻5号P248 (1966) 所載

脚注：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

RNase: ribonuclease

DNA: desoxyribonucleic acid

DNase: desoxyribonuclease

ADP: adenosine diphosphate

PDase: phosphodiesterase

ATP: adenosine triphosphate

PMase: phosphomonoesterase

It is reasonable to consider that when Shii-take is heated in water (at temp. 50-70°C, around pH 6.0), RNases A-1, A-2, and B in Shii-take hydrolyze RNA giving a mixture of four kinds of 5'-nucleotides. On the other hand, the activity of PMase C is low enough that PMase would have been inactivated at that temperature. Therefore, 5'-nucleotides furthermore formed are accumulated in a fairly large amount. It was suggested that when fresh Shii-take is incubated at pH 8.0, remarkable amounts of 5'-nucleotides are accumulated probably because of the degradation of RNA by RNase B, which are stable due to the lack of PMase C activity at that pH.

緒 言

きのこ類の核酸成分分布また食品加工工程、とくに加熱処理に際しての核酸成分の変化については、すでに著者¹⁾、中島ら²⁾が報告した。すなわちきのこ類のうち、しいたけでは5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMPが存在し、それらの温水抽出において温度の影響を見ると30°Cに対して、60°Cでは約15倍も抽出量が増加した。これら5'-ヌクレオチドの蓄積原因として単なる物理的原因の他に、酵素的反応を伴う自己核酸の分解あるいは Nucleoside polyphosphate の分解が考えられることを報告した。これからきのこ類の核酸分解酵素系を検索することは興味深いと思われる。蛇毒、高等動物組織中あるいは微生物の核酸分解酵素系については従来かなりの報告があるが、植物体に関してはあまり報告がみられない。

本報ではしいたけ可食部での酵素反応について、さらに詳しく解明するために、しいたけ子実体の磨砕抽出液中の核酸分解酵素系を DEAE-Cellulose カラムで分画し、それらの活性を検討したので報告する。

実験の部

I 実験方法

- 1) 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。
- 2) 試料調製法 しいたけ (*Lentinus edodes*) 500g をホモジナイズし5倍量の蒸留水にて5°C, 2時間抽出して木綿にて濾過し、その濾液を粗酵素液とした。
- 3) 分析方法 総5', 3'-ヌクレオチド量は中島ら²⁾の酵素法によった。個々のヌクレオチドは Dowex 1×8 を用うるカラムクロマトグラフィーで定量した。蛋白質は Folin-Ciocalteu, 3,4) 呈色法また 280m μ の吸収によって定量した。磷酸定量は Fiske-Subbarow 法、またリボースはオルシノール法によった。
- 4) 核酸分解酵素活性の測定 測定に当っては須原ら³⁾の報告を参照した。DNase, RNase, PDase, PMase をつぎのように測定した。
 - a) DNase 0.3% DNA 0.2ml, 0.04M MgCl₂ in 0.2M acetate buffer (pH4.5) 0.1ml, 酵素液 0.1ml よりなる反応液を37°C 30分放置し U.P.C.A. (70% perchloric acid 21.4ml, uranyl acetate 2.5g に水を加えて 1ℓ にしたもの) 0.4ml を加えて反応を停止し、5分後 2000 rpm 5分

間低温で遠沈して上澄液 0.2ml をとり水 3.8ml を加えて ΔE_{260} (260 μ における吸収増加量) を測定する。 $\Delta E_{260}=0.1$ を 1.0unit とする。

クロマトグラフィーの各試験管の DNase 活性は 0.1% DNA 0.2ml, 1M acetate buffer (pH 4.5) 0.2ml, 1M MgCl₂ 0.05ml, 酵素液 0.2ml を加えて 4.5ml にし 37°C 2hrs 放置し, 上記反応液中の酵素液 0.2ml の代わりに蒸留水 0.2ml 加えたものを対照とし ΔE_{260} を測定した。

b) RNase 4% RNA (キリンビール(株)) 0.1ml, 1M acetate buffer (pH4.5), または tris buffer (pH7.5) 0.1ml, 水 0.5ml, 酵素液 0.1ml よりなる反応液を 37°C 30分放置したのち U.P.C.A. 0.8ml を加えて停止し, 10分後生じた沈澱を 2000rpm で 5分間遠心分離して上澄液 0.1ml をとり, これに蒸留水 3.9ml を加えて ΔE_{260} を測定した。 ΔE の値が 0.1 増加した時, 酵素単位を 1 unit とした。

c) PDase 1mM Bis-(p-nitro phenyl) phosphoric acid (BPNPP) 1.0ml, 1M tris-buffer (pH 7.5) 0.2ml, 0.05M MgCl₂ 0.1ml, 酵素液 0.5ml, 水 0.4ml を加え 37°C 30分放置した後 0.1 N.NaOH 2.8ml を加えて ΔF_{400} を測定した。 ΔF_{400} の値が 0.1 増加した時, 酵素単位を 1.0 unit とした。

d) PMase 1mMp-nitro phenyl phosphoric acid (PNPP) 1.0ml, 1M acetate buffer (pH 4.5) 0.2ml, 0.05M MgCl₂ 0.1ml, 酵素液 0.5ml, 水 0.4ml を加え 37°C 30分放置した後 0.1N. NaOH 2.8ml を加えて ΔE_{400} を測定した。 ΔE_{400} の値が 0.1 増加した時, 酵素単位を 1.0unit とした。

II 実験結果

1) DEAE-cellulose による酵素系の分画 粗酵素液 2.5l に硫酸アンモンを飽和になるまで加え 18500×G で遠心分離し生じた沈澱を 0.01M acetate buffer に溶解し, その上澄液を 5°C で一晩 0.01M acetate buffer (pH6.0) 液中で透析した。透析内液を DEAE-cellulose カラム (3

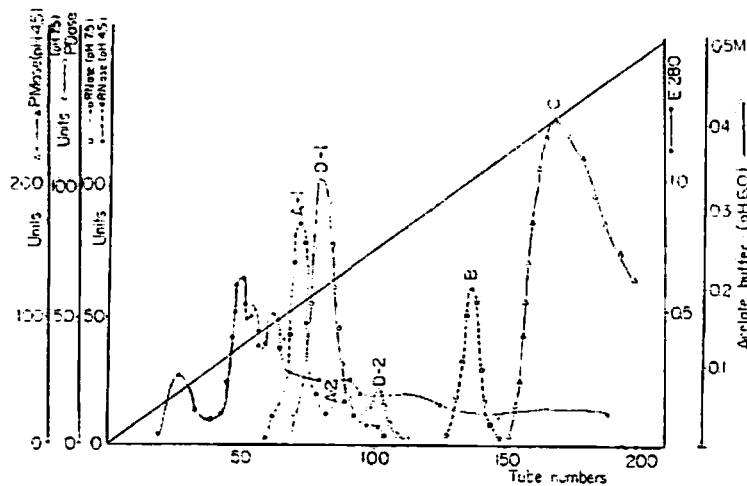


Fig. 1 Chromatography of the extract from Shii-take on DEAE cellulose column.

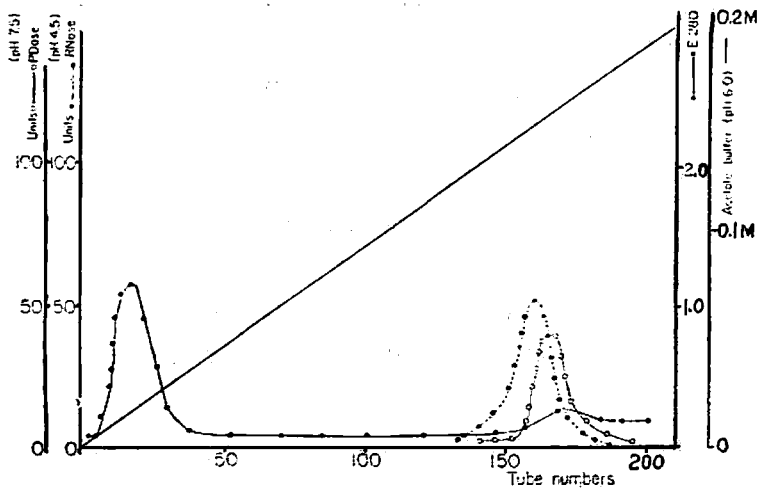


Fig. 2 Rechromatography of RNase A-1 fraction from Shii-take on DEAE cellulose column.

×25cm) (あらかじめ 0.01 M-acetate buffer pH 6.0 で bufferize) に吸着させ 0.01M→0.5M-acetate buffer pH 6.0 で gradient elution を行なった。(添加した蛋白量は 300mg である) そのクロマトグラムは Fig 1, 2 のごとくである。

溶出した画分の酵素活性は pH 4.5 と pH 7.5 の二つの場合について測定した。Fig 1 の RNase 活性を持つピークを A-1, A-2, B また PMase 活性を持つピークを C, PDase 活性を持つピークを D-1, D-2 と仮に命名した。RNase 活性のあるそれぞれの A-1, A-2 の画分と PDase 活性のある D-1, D-2 画分は最適 pH も異なり, かつ完全に分離できなかったため, そのフラクションを減圧濃縮した後 0.01M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析し, その内液を

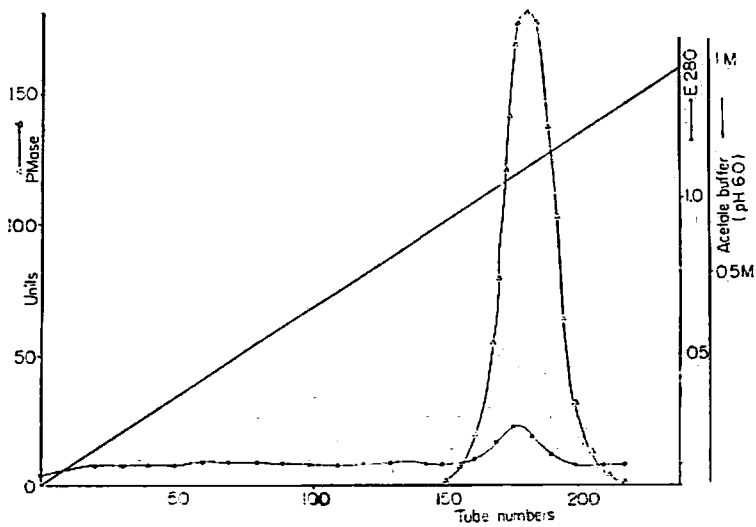


Fig. 3 Rechromatography of PMase fraction from Shii-take on DEAE cellulose column.

DEAE-cellulose に吸着した後 0.01M→0.2M まで gradient elution で再クロマトグラフィーを行なった。そのクロマトグラムは Fig. 2 のごとくである。

RNase は pH 4.5, PDase は pH 7.5 で活性を測定した。この結果からも RNase と PDase を完全にわけることはできなかった。RNase B 画分は 2 回のクロマトグラム単一ピークとして得られた。また PMase 画分も減圧濃縮した後 0.01M acetate buffer (pH6.0) で透析し、その内液を DEAE-cellulose に吸着した後 0.01M→1.0M まで gradient elution を行なった結果は Fig. 3 のごとくである。PMase は pH 4.5 で測定し、単一ピークとして得られた。

2) しいたけ子実体の核酸酵素の活性および比活性 粗酵素液を硫酸アンモンで塩析し、また DEAE-cellulose により精製した。RNase, PDase, PMase の活性および比活性は Table 1～3 のごとくである。

DEAE-cellulose で精製することによって RNase で 100 倍程度 PDase では 200 倍、PMase で 20 倍程度比活性が増加した。

Table 1 Purification of RNase of Shii-take.

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg Protein)
Filtrate of extract	250,000	2070	120.7
Ammonium sulfate	90,000	174.7	515
DEAE-Cellulose 1 Peak A-1	35,047	30.8	1168
Peak A-2	2,652	5.6	467.7
Peak B	3,167	3.4	105.6
DEAE-Cellulose 2 Peak A-1	12,507	1.3	8851
Peak A-2	1,250	0.1	8333
Peak B	2,120	0.4	5170

Table 2 Purification of PDase of Shii-take.

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	42,500	2070	20.5
Ammonium sulfate	13,170	174.7	59.1
DEAE-Cellulose 1 Peak A-1	9,762	30.9	316.2
Peak A-2	1,936	5.7	341.2
DEAE-Cellulose 2 Peak A-1	6,338	1.30	4875.3
Peak A-2	950	0.15	6333

Table 3 Purification of PMase of Shii-take.

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg Protein)
Filtrate of extract	624,000	2070	302
Ammonium sulfate	540,000	174.7	3112
DEAE-Cellulose 1	135,600	38.7	3505
DEAE--Cellulose 2	20,250	3.18	6305

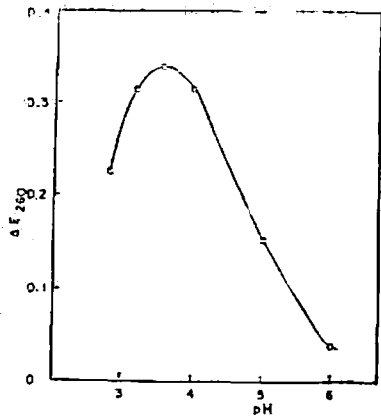


Fig. 4 Effect of pH on DNase activity.

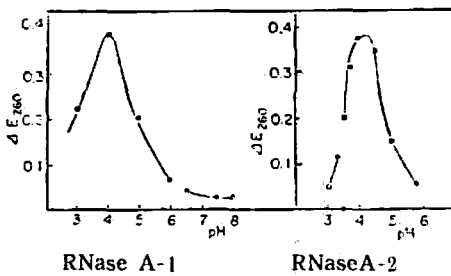


Fig. 5 Effect of pH on RNase activity.

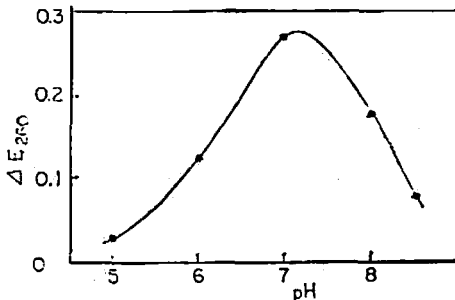


Fig. 6 Effect of pH on RNase (B) activity.

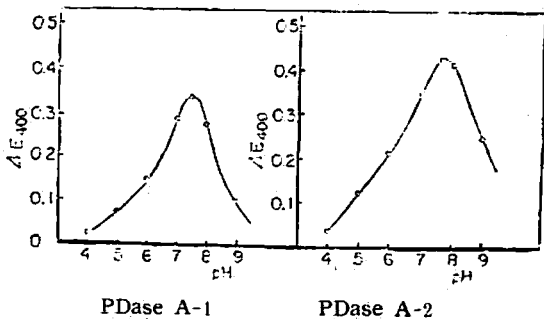


Fig. 7 Effect of pH on PDase activity.

3) しいたけ子実体の核酸分解酵素系の諸性質

前項(2)の操作で精製された酵素について24時間蒸留水にて透析を行なった酵素液について酵素学的性質を検討した。

a) 最適 pH DNA を基質にした場合、ピーク A-1, A-2 では最適 pH は Fig. 4 のごとくであるが、B フラクシオンでは DNase 活性は認められなかった。

RNA を基質にした場合、ピーク A-1, A-2 では最適 pH は Fig. 5 またピーク B は Fig. 6 のごとくである。

BNPP を基質にした場合、ピーク D-1, D-2 で

は最適 pH は Fig 7 のごとくである。最適 pH は 7.5~8.0 にあり PDase 活性を持っている。

このように BNPP を分解するピークの中に酸性側で RNA を分解する酵素が混在している。PNPP を基質にした場合、最適 pH は Fig 8 のごとくである。

最適 pH は 4~5 にあり PMase 活性を持っている。

b) 酵素量と活性 RNase, PDase, PMase について酵素液量の最適量を検討した結果 Fig 9 のごとくである。

RNase は 0.05~0.15ml, PDase, PMase は 0.1~0.2ml が酵素液量と活性が比例しており最適の条件と考えられるので活性はこの範囲内で測定した。

c) 最適温度 RNase, PDase, PMase の最適 pH での反応温度の影響は Fig 10 のごとくである。

RNase は 60°C 前後, PDase は 55°C ~60°C, PMase は 45°C ~50°C にピークを持っており、最適温度がある。

b) 各種 pH における安定性 酵素液をそれぞれ pH 3~pH 10 の範囲の 1/10M 緩衝液中に、37°C, 18時間放置した場合の

酵素活性の安定性について検討した結果は Fig 11 のごとくである。

RNase は pH 6.0~9.0 の広域にわたって、また PDase は pH 6.0~8.0, PMase は pH 3.0~6.0 にわたって比較的安定であった。

e) 熱安定性 酵素液を 0.2M 緩衝液 (pH は最適 pH によった) に希釈し、各温度で 15 分間処理後、急冷し常法に従って残存活性を測定した。その結果は Fig 12 のごとくである。

RNase B および A は 80°C でもそれぞれ 50 および 30% 以上も残存していた。また PDase は

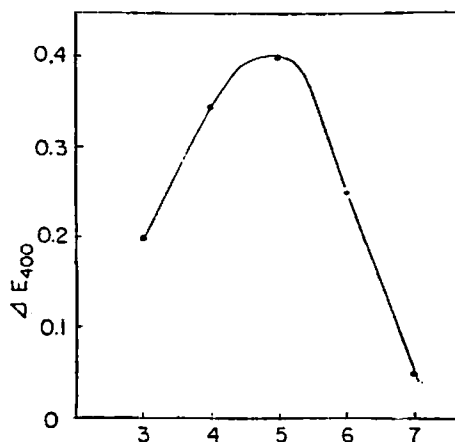


Fig. 8 Effect of pH on PMase activity.

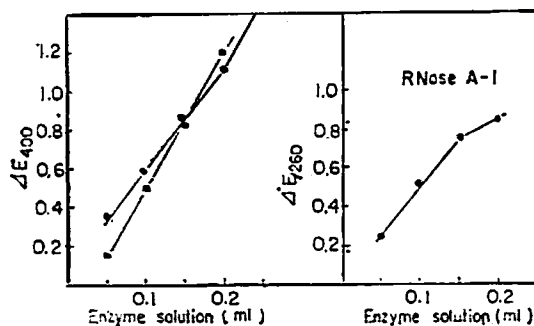


Fig. 9 Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solutions.

●—● PMase ■—■ PDase

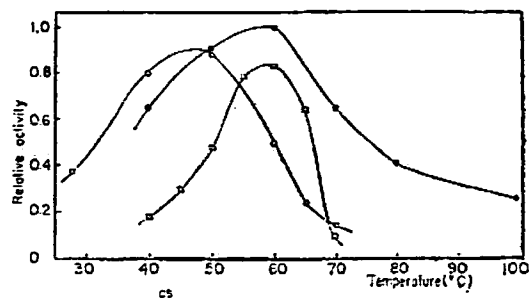


Fig. 10 Effect of temperature on enzymatic activities.

●—● RNase A-1 □—□ PDase
○—○ PMase

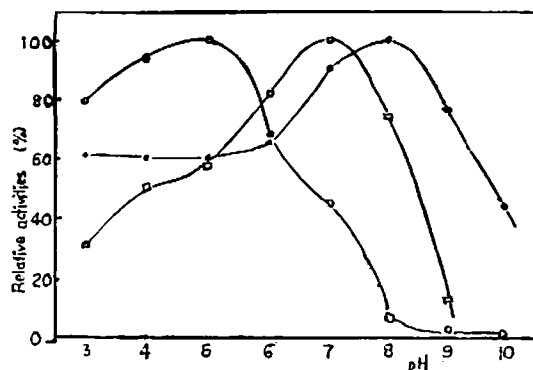


Fig. 11 Effect of pH on stabilities of enzymatic activities. (37°C, 18 hrs)

●—● RNase A-1 □—□ PDase A-1
○—○ PMase

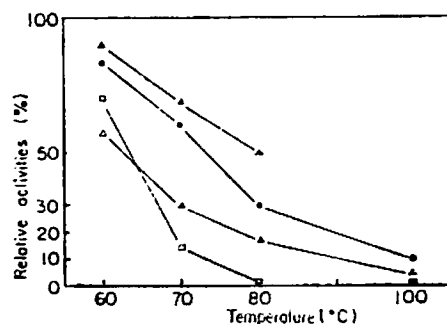


Fig. 12 Heat stability of enzymatic activities.

▲—▲ RNase B △—△ PDase
●—● RNase A-1 □—□ PMase

100°Cではほとんど活性はなく
なっているが80°Cでは、30%
残存している。PMaseは80°C
で活性がなくなっていることが
認められた。

f) 金属イオンおよび阻害剤の
影響 本酵素の活性におよ
ぼす各種金属イオンまたは阻害
剤としての試薬の影響を検討し
た。

RNase について反応時 $6 \times 10^{-2} M$, $6 \times 10^{-3} M$ の金属イ
オンまたは阻害剤の影響を示す
と Table 4 のごとくである。

RNase は Co^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}
によって阻害された。 Mn^{++} ,
 Na_2HPO_4 では70%活性が残っ
ていた。EDTA, NaFではほと
んど阻害されなかった。

Table 4 Effects of metal ions, anions, and chelating agents on RNase activities (Relative activities).

		A-1	A-2	B
Control		100	100	100
MgCl ₂	$6 \times 10^{-2} M$	76	71	100
	$6 \times 10^{-3} M$	83	101	95
CaCl ₂	"	98	100	95
	"	87	107	97
CoSO ₄	"	58	48	74
	"	95	84	80
CuSO ₄	"	54	0	61
	"	73	0	20
ZnSO ₄	"	63	78	83
	"	97	96	106
MnSO ₄	"	76	37	73
	"	88	117	84
NaF	"	100	85	115
	"	97	83	100
Na ₂ HPO ₄	"	70	23	58
	"	78	86	79
EDTA	"	99	80	115
	"	90	82	95
Na-citrate	"	105	32	92
	"	95	62	100
Cystein	"	110	66	107
	"	100	107	110

Table 5 Effects of metal ions, anions, and chelating agent on PDase activities (Relative activities).

		A-1	A-2
Control		100	100
MgCl ₂	$1 \times 10^{-2} M$	112	104
	$5 \times 10^{-3} M$	129	117
CaCl ₂	$1 \times 10^{-2} M$	131	115
	$5 \times 10^{-3} M$	156	135
CuSO ₄	"	9.4	15.8
	"	13.6	23.2
ZnSO ₄	"	47.2	105
	"	52.5	106
NaF	"	42	90
	"	69	88.5
Na ₂ HPO ₄	"	39	92.5
	"	39	95.0
EDTA	"	3.1	22.3
	"	5.3	32.3
Na-citrate	"	72.5	76.0
	"	100	86.0
Cystein	"	96.5	61
	"	96.5	68

Table 6 Effects of metal ions, anions, and chelating agents on PMase activities (Relative activities).

Control		100
MgCl ₂	$1 \times 10^{-2} M$	34
	$5 \times 10^{-3} M$	144
CaCl ₂	"	72
	"	72
CoSO ₄	"	91
	"	115
CuSO ₄	"	62
	"	56
ZnSO ₄	"	61
	"	93
NaF	"	3
	"	4
Na ₂ HPO ₄	"	47
	"	55
EDTA	"	112
	"	180
Na-citrate	"	176
	"	175
Cystein	"	146
	"	104

Na-citrate の阻害は A-2 で阻害された。

PDase については反応時 $1 \times 10^{-2}M$, $5 \times 10^{-3}M$ の金属イオンまたは阻害剤の影響については Table 5 のごとくである。

PDase A-1 では Mg^{++} , Ca^{++} は促進した。 Cu^{++} , Zn^{++} , NaF, Na_2HPO_4 , EDTA には阻害された。 A-2 酵素では Zn^{++} , NaF, Na_2HPO_4 では阻害されなかった。

PMase については反応時 $1 \times 10^{-2}M$, $5 \times 10^{-3}M$ の金属イオンまたは阻害剤の影響は Table 6 のごとくである。

PMase では NaF, Na_2HPO_4 で阻害され Ca^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} で40%の活性が阻害された。

4) 酵母RNAの酵素分解による5'-ヌクレオチドの生成 前述のごとくピークA-1, A-2, B は RNase 活性を有するので酵母 RNA に作用させて,その分解生産物をしらべた。その反応方法は Fig. 13 のごとくである。ピークA-1, A-2 は 0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.5) にて反応し, またBは 0.2M トリス緩衝液 (pH8.0) にて反応させた。その結果をカラムクロマトグラフィーでしらべると Fig. 14 のごとくである。A-1, A-2, B いずれの酵素によってもRNAの分解

40mg of yeast RNA

-RNase
140 units of RNase A-1 in buffer (pH 4.5)
or 430 units of RNase A-2 in buffer (pH 4.5)
or 430 units of RNase B in buffer (pH 7.5)

-37°C, 22hrs, incubation

-HClO₄ treatment, supernatant

-active carbon treatment

Sample for chromatography

によって 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP 計4種の5'-ヌクレオチドを生成することが認められた。またこの場合の RNA 分解率はピークA-1, ピークA-2で75%, ピークBでは60%であった。

Fig. 13 Digestion of RNA.

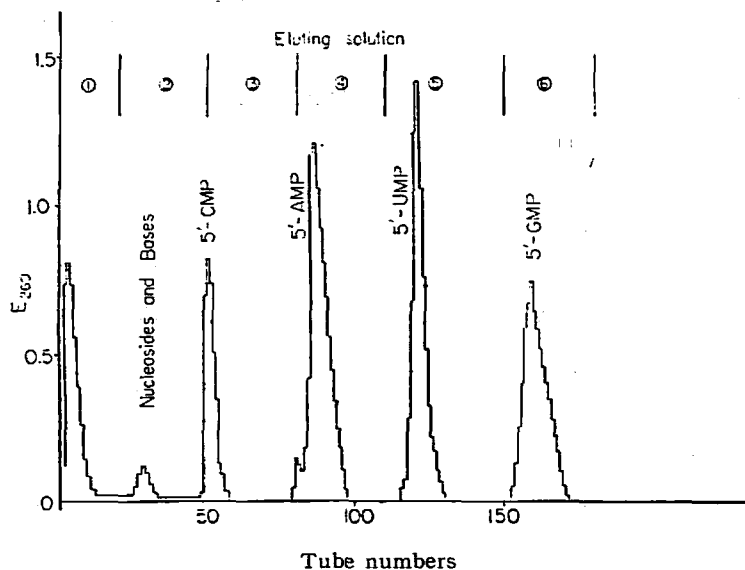


Fig. 14 Formation of 5'-nucleotides by degradation of yeast RNA with fraction A-1.

5) ヌクレオチド類およびその誘導体に対する Phosphomonoesterase 画分の作用 PMase 画分 C は前述のごとく合成基質の P-nitro-phenylphosphate を分解するだけでなく、自然界にある種々の核酸成分に対しても活性を示した。すなわちまず ATP に対して Fig 15 に示すような方法で作用させた結果は Fig 16 のごとくである。

同図において ATP は分解されて ADP, AMP, アデノシン, アデニンを生成し、また GTP については GDP, GMP, グアノシン, グアニンと分解されることが認められた。

ATP (20mg/20ml) 5.0ml
 -PMase fraction (18.4 units) 2.5ml
 -1M buffer (pH 4.5) 1.0ml
 -incubation, 37°C, 1hr
 -HClO₄ treatment
 -activecarbon treatment
 Sample for chromatography
 Fig. 15 Degradation of ATP

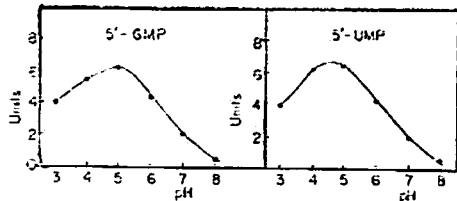


Fig. 17 Activities of PMase to 5'-GMP and 5'-UMP at various pH.

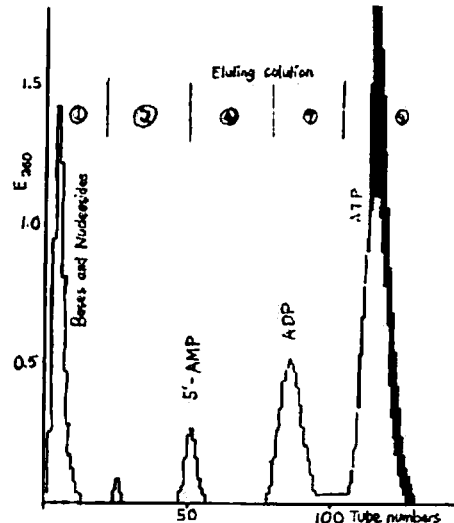


Fig. 16 Incubation of Shii-take's PMase fraction with authentic ATP.

■ before incubation
 □ after incubation

また PMase C を 5'-ヌクレオチド類として 5'-GMP, 5'-UMP に作用させた結果は Fig 17 のごとくである。その作用は pH 4~5 にピークがあり、また温度 40°C~50°C の範囲にピークを持っていた。また種々のヌクレオチド類もヌクレオチドと同様に分解された。このように PMase 活性を有する画分 C は ATP などの Nucleosidepolyphosphate, 5'-ヌクレオチド類に作用して、いずれも分解作用を示すものと認められた。また RNase, PDase 画分である画分 A-1, A-2, D-1, D-2 についてヌクレオチド, ヌクレオチドなどに作用したが、分解は認められなかった。よって PMase 画分 C は一般的にいわれているホスファターゼと考えられる。

考 察

しいたけ可食部より分離した数個の画分のうち、活性を示す A-1, A-2, B 画分ともに DNA および RNA に作用し、RNA を 5'-ヌクレオチドにまではほぼ定量的に分解することが認められたが、この酵素は塩基特異性の低い一種の exonuclease であると思われる。なお RNase 画分

A-1, A-2 活性について現在のところでは2種の酵素すなわち RNase と PDase がそれぞれ独立して混在しているものか、2種の酵素が存在しているのか、また同一酵素蛋白が2種の酵素活性を示すものかについては不明である。小腸、蛇毒中⁶⁻¹¹⁾などに見られるいわゆる PDase とは明らかに異なっている。また RNase 画分Bは BPNPP に作用しないので明らかに小腸、蛇毒中の RNase とは異なっていると考えられる。

核酸分解酵素系の諸性質について検討を行なった結果、きのこ子実体自体の RNA の加水分解は pH 3.0~6.0 では A-1, A-2 の酵素の働きで 5'-ヌクレオチドが生成し、また pH 7.5~8.0 付近では B 酵素による 5'-ヌクレオチドの生成が考えられ、これは著者ら¹⁾、中島ら²⁾ の推察を裏付けるものである。本酵素 A-1, A-2 は従来の文献中には類似しているものがほとんどないが、新しい酵素であるか否かは今後検討しなければならないと考えられる。B 酵素は Eaves^{12,13)} の *serratia marcescens*、杉本ら¹⁴⁾ の *streptomyces* No.41、猿野ら¹⁵⁾ の *Monascus* 属の酵素に類似していると考えられる。PDase は一般的に PMase と共存することが多いが¹⁴⁻¹⁶⁾、しいたけにおいては RNase A-1, A-2 の画分が PDase 活性も持っていた。最適 pH が 7.5 というピークを持っているが RNase 活性の方はピークが 4.5 という点が異なり、かつ PMase とは分離することができた。なお相互に A-1, A-2 と一応分離することができるが、両画分の最適 pH, pH 安定性、最適温度、温度安定性、金属イオンの影響は両者ともに一致するので、全く別個のものとして分離することはできないと思われる。

A-1, A-2 画分について RNase 活性画分と D-1, D-2 画分について PDase 活性画分をさらにわけするために Sephadex G-50, A-25, Amb, GC-50, DEAE-cellulose での分画を試みたが、分離することはできなかった。なお今後も検討する余地がある。

PMase 活性画分は DEAE-cellulose による分画で一つのピークを持っており、またその活性は RNase, PDase とは明らかにわけることができた。この酵素画分は ATP, ADP などを分解する ATPase を含み、また 5'-GMP などのヌクレオチドを分解した、ヌクレオチダーゼ、ヌクレオシダーゼの活性の部分と混合して存在していると考えられる。

これらの結果からしいたけにおいてヌクレオチドの蓄積について考察すると pH 酸性側では RNA や nucleoside polyphosphate からの分解が大で 5'-ヌクレオチドが生成するが、同時にヌクレオチダーゼが強いために、ただちにヌクレオシド、塩基まで分解されてほとんどヌクレオチドとして蓄積はされない。pH 5.0~6.0 で食品の煮出し操作(温水抽出)近似の条件となるが、50°C~70°C に上げるとヌクレオチダーゼが熱により不活性化することと pH がヌクレオチダーゼの作用には不適当な条件であるので生成した 5'-ヌクレオチドはそのまま分解を受けずに蓄積することが考えられる。また弱アルカリ性側ではヌクレオチダーゼの活性がほとんど見出されず、一方 RNase の活性はかなり強く生成した 5'-ヌクレオチドが蓄積すると考えられる。

島蘭¹⁷⁾は食品中のヌクレオチドの分布型式を分類し植物体については Plant type と Autolysate type の2型式があると述べている。しいたけやマッシュルームを煮出す場合には生体中常温で徐々に起っているこれらの変化が温度上昇のために急速に行なわれると考えられる。

しいたけの場合は主として Autolysate type の変化を示すものと考えたと鳥菌の提説をよく裏付けているといえよう。このような酵素系の作用によって食品としての旨味が増加すると考えられる。

要 約

DEAE-cellulose を用いてしいたけ子実体の核酸分解酵素系を分離精製した。DNase 活性を持つピーク 2 個 (A-1, A-2), RNase 活性を持つピーク 3 個 (A-1, A-2, B), PDase 活性を持つピーク 2 個 (D-1, D-2), PMase 活性を持つピーク 1 個 (C) を認めた。核酸分解酵素系の諸性質は DNase では pH 4.5~5 また 60°C~70°C に最適温度があった。また RNase の A-1, A-2 は pH 4~4.5, 温度 65°C が最適であった。PDase の D-1, D-2 は pH 7.5~8 温度は 60°C に最適値を持っていた。PMase は pH 4.5~5, 最適温度は 45°C~50°C にあった。このようなことより著者らが前報で発表したような、しいたけの加熱処理工程における 5'-ヌクレオチドの消長が裏付けられた。

終りに臨み貴重な薬品、酵素類など多大な御援助を賜った武田薬品工業株式会社の方々および実験に協力された当短大寺田潤子嬢に深謝致します。本報は昭和40年度アミノ酸、核酸シンポジウム(大阪)で発表した。

文 献

- 1) 橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 42, 434 (1964)
- 2) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 35, 797 (1961)
- 3) Folin, O., Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem., 73, 629 (1927)
- 4) 萩原: 酵素研究法 (赤堀) Vol. I, 164 (1956)
- 5) 須原, 草葉, 大村: 酵素化学シンポジウム 第16号, 116号, 115 (1964)
- 6) Takahashi, K.: J. Biochem., 49, 1 (1961)
- 7) Tanaka, K.: J. Biochem., 50, 62 (1961)
- 8) 鈴木, 岩永: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 265 (1964)
- 9) 浅野: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 731 (1964)
- 10) 下村: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 734 (1964)
- 11) 前野: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 738 (1964)
- 12) Colowick, S. P., Kaplan, N. O.: Methods in Enzymology, II, 427, 519 (1955)
- 13) Eaves, G. N., Jeffries, C. D.: J. J. Bact 85, 273 (1963)
- 14) 杉本, 岩浅, 横塚: 農化, 36, 277 (1962)
- 15) 猿野: 醗酵工学, 42, 475 (1964)
- 16) Kuo, M., Blumenthal, H. J.: Biochem. Biophys. Acta, 52, 13 (1961)
- 17) 鳥菌: Amino acid and Nucleic acid (10) 179 (1964) Food Technol., 18(3), 36 (1964)