

食品中の核酸成分に関する研究* — XIV

アスパラガスの核酸分解酵素系

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄・寺本 四郎**

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Foodstuffs - XIV

Nucleic acid degrading enzymes of asparagus

TAKENORI MOURI, WATARU HASHIDA, IWAO SHIGA
and SHIRO TERAMOTO**

Ribonuclease (RNase), phosphodiesterase (PDase), and phosphomonoesterase (PMase) active fractions were isolated from edible portions of green and white asparagus and purified by the DEAE-cellulose column technique.

The enzymatic pattern of the white asparagus was the same as that of the green one. For the RNase fraction the optimum temperature was 70°C and the optimum pH ranged 7.5–8.0. The PDase activity could not be separated from the PMase fraction, the optimum temperature and pH for the PMase fraction were 50°C and around 5.0 respectively. Four kinds of 5'-nucleotides, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, and 5'-UMP were accumulated at pH 7.5 with the digestion of yeast RNA by asparagus RNase. The PMase decomposed ATP, 5'-AMP, and 3'-AMP. 3'-AMP was decomposed more rapidly than 5'-AMP.

It seems reasonable that the presence of nucleotides and their related substances in raw asparagus and their changes during the mild heating of asparagus with water at around pH 6.0 may be accounted for by the action of nucleic acid related enzymes.

緒 言

前報¹⁾において生シイタケ並びにマッシュルーム可食部(子実体)に含まれる核酸分解酵素系を分画しそれらの性質を調べ生の個体における 5'-GMP, 5'-AMP などヌクレオチドの組成と水と共に加熱するというような加工操作におけるヌクレオチドの変化について酵素学的観点からの検討を

* 醗酵工学46巻2号132 (1968) 所載

** Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University,
大阪大学工学部醗酵工学教室

行なった。その結果水と共に加熱したりあるいは特定の pH の下では RNase あるいは PMase の作用により 5'-ヌクレオチドを蓄積したり分解したりすることが認められた。

一方野菜類のアスパラガスは特徴あるヌクレオチド組成をもっておりそれらの変化も興味深いと考えられる。本報ではアスパラガス可食部に含まれる核酸成分の分布と変化の原因を解明するために、アスパラガス磨砕抽出液中の数種の核酸分解酵素系を DEAE-Cellulose で分画しそれらの活性を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。
2. 試料調製法アスパラガス（東洋食品研究所栽培）の可食部を5倍量の蒸留水と共にホモジナイズし 5°C で4時間抽出し、木綿で濾過した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⁾の酵素法に依った。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で蛋白質は Folin-Ciocalteu³⁾の呈色法または 280 m μ の吸収によって定量した。リン酸定量は Fiske-Subbarow 法に依った。
4. 核酸分解酵素活性の測定法 須原、大村ら⁴⁾の報告に準じて RNase, PDase, PMase, DNase 活性を測定したが詳細な条件は前報¹⁾記載の如くである。

実 験 結 果

1. DEAE-cellulose による酵素系の分画

粗酵素液 2.5 l 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 0.01 M acetate buffer (pH 6.0) に溶解し、その上澄液を 5°C で一晩 0.01 M acetate buffer (pH 6.0) 液中で透析した。透析内液（蛋白質として 300 mg）を DEAE-cellulose カラム（3×25cm）に吸着させ acetate buffer (pH 6.0) で 0.01M より 0.6 M まで gradient elution を行なった。そのクロマトグラムは Fig. 1, 2 のごとくである。

Fig. 1 はグリーンアスパラガス、Fig. 2 はホワイトアスパラガスで共に RNase は pH 7.5 で測定した。また PDase, PMase 活性は共に pH 5.0 で測定したが互いによく似たピークを示し流出位置も一致した。一般的に PMase が強い活性を持っていた。RNase, PDase, PMase 活性のピークをそれぞれピーク A, B, C, と仮に命名した。

ピーク A について相互の分離と精製を目的にして再クロマトグラフィを行なった。すなわちその部分を硫酸塩析した後沈澱を集め 0.01 M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析しその内液を DEAE-cellulose に吸着した後 0.01 M~0.3 M まで gradient elution した。そのクロマトグラムは Fig. 3 のごとくである。

グリーンアスパラガスも同様であった。PDase 活性, PMase 活性のあるピーク B と C の部分を

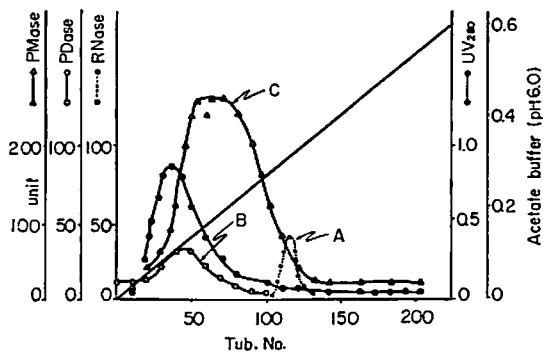


Fig. 1 Chromatography of the extract from green asparagus on DEAE-cellulose column.

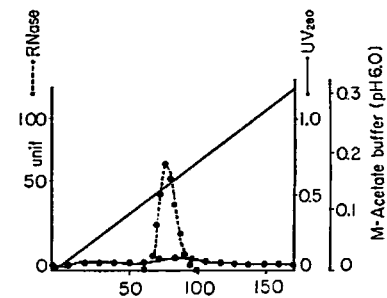


Fig. 3 Rechromatography of RNase A fraction from white asparagus on DEAE-cellulose column.

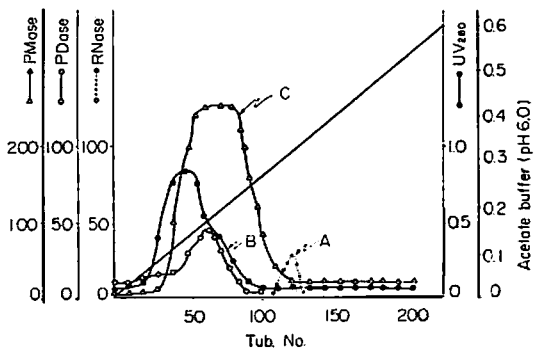


Fig. 2 Chromatography of the extract from white asparagus on DEAE-cellulose column.

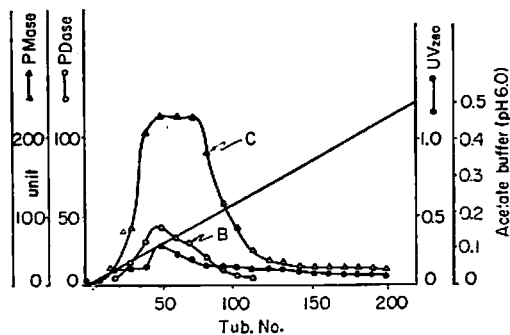


Fig. 4 Rechromatography of PMase C fraction from white asparagus on DEAE-cellulose column.

硫酸塩析しその沈澱を集めその後 0.01 M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析しその内液を DEAE-cellulose カラムで 0.01 M~0.5 M まで gradient elution で分離した結果は Fig. 4 のごとくである。

Fig. 4 はホワイトアスパラガスの例であるが、PMase と PDase 両活性部分の流出位置は互に全く一致した。グリーンアスパラガスも同様であった。このままでは PMase 区分が大きいために数種のピークが混在していることが考えられるので再び濃縮し 0.01 M-Tris-amino-methane buffer (pH 8.0) に対して透析し、その内液をあらかじめ 0.01 M Tris-buffer (pH 8.0) で bufferize した DEAE-cellulose に吸着させ 0 から 0.3 M ま

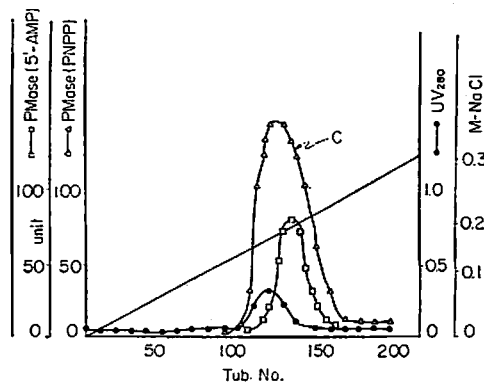


Fig. 5 Rechromatography of PMase C fraction from white asparagus on DEAE-cellulose column.

での食塩溶液で gradient に溶出した結果は Fig. 5 のごとくである。

PMase 活性のピークは一個あらわれた。このピークには PDase 活性も認められた。なお 5'-AMP を基質とし、従来 PMase 測定 of 基質としている PNPP と並行に pH5.0 で作用させたところ 5'-AMP を分解するヌクレオチダーゼのピークは PNPP を基質とする PMase と全く一致した。この傾向はグリーンアスパラガスもホワイトアスパラガスも同様であった。

上述のごとく粗酵素液を硫酸アンモンで塩析し、DEAE-cellulose で精製した諸経過における RNase, PDase, PMase の活性および比活性の消長は Table 1～3 のごとくである。

グリーンアスパラガスの場合 RNase は 50倍, PDase は13倍, PMase は100倍程度, またホワイトアスパラガスの場合 RNase は100倍, PDase は60倍, PMase は100倍程度に濃縮された。

Table 1 Purification of RNase of green asparagus.

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	3,500	1,646.4	2.12
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	443.8	253.4	1.75
DEAE-Cellulose 1	298.5	21.4	13.88
DEAE-Cellulose 2	206.0	2.80	73.50

Purification of RNase of white asparagus.

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	2,100	1,617	1.12
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	437	147	2.99
DEAE-Cellulose 1	217.5	3.1	68.8
DEAE-Cellulose 2	102.1	0.91	113.3

Table 2 Purification of PDase of green asparagus.

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	9,800	1,646.4	5.95
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	9,643	253.4	38.05
DEAE-Cellulose 1	1,161.1	21.4	54.20
DEAE-Cellulose 2	193.6	2.55	75.90

Purification of PDase of white asparagus.

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	6,888	1,616	4.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	1,267	147	8.6
DEAE-Cellulose 1	411	6.2	66.3
DEAE-Cellulose 2	300	1.2	238.0

Table 3 Purification of PMase of green asparagus.

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	373,800	1,646.4	227.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	75,522	253.4	297.3
DEAE-Cellulose 1	65,790	21.4	3,071.4
DEAE-Cellulose 2	31,930	1.2	26,608.3

Purification of PMase of white asparagus.

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	318,080	1,617	196.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	118,070	146	803.0
DEAE-Cellulose 1	58,800	6.2	9,483.0
DEAE-Cellulose 2	17,000	1.26	13,492.0

2. 分画された酵素系の諸性質

前項の操作で精製された酵素活性の部分を濃縮した後蒸留水に対して24時間透析を行なった。この内液を酵素液としてその性質をしらべた。

2-1 最適 pH: 酵母 RNA を基質にしてピーク A となる RNase 活性の最適 pH は Fig. 6 のごとくで 7.5~8.0 であった。なおピーク A は BPNPP には作用しなかった。BPNPP を基質にしてピーク B (PDase 活性) の最適 pH は Fig. 7 のごとく 5.0~5.5 であった。PNPP を基質にしてピーク C (PMase 活性) の最適 pH は Fig. 8 のごとく pH 5.0 にあった。したがってピーク B とピーク C の両酵素液と精製酵素との間には最適 pH についての相違は殆んど認められなかった。

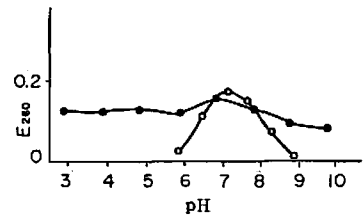


Fig. 6 Effect of pH on white asparagus RNase activity.
●—● crude enzyme
○—○ purified enzyme

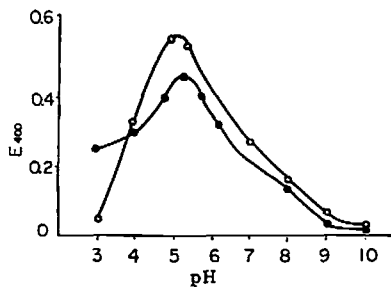


Fig. 7 Effect of pH on white asparagus PDase activity.
●—● crude enzyme
○—○ purified enzyme

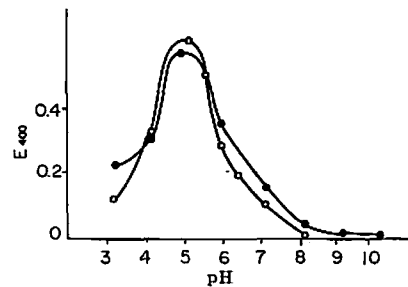


Fig. 8 Effect of pH on white asparagus PMase activity.
●—● crude enzyme
○—○ purified enzyme

2-2 酵素液量と活性との関係：RNase, PDase, PMase について酵素液量と活性との関係をしらべると Fig. 9のごとくである。RNase, PDase, PMase いずれも 0.1 ml/~0.4 ml の範囲で活性と直線関係があった。したがって爾後の測定では RNase, PDase, PMase 4~8 unit の範囲の活性になるように酵素液を希釈して基質に作用させた。

2-3 最適温度：RNase, PDase, PMase それぞれの最適 pH での反応温度の影響は Fig. 10のごとくで最適温度は RNase で 70°C, PDase で 50°C, PMase で 50°C であった。

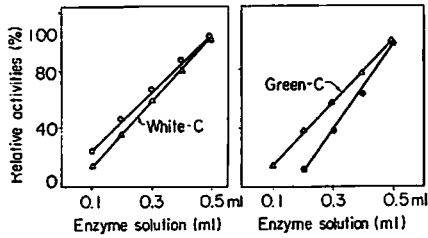


Fig. 9 Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solution.
RNase ●—● PMase △—△
PDase ○—○

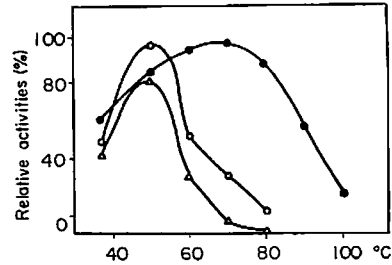


Fig. 10 Effect of temperature on enzymatic activity.
RNaseA ●—● PDaseB ○—○
PMaseC △—△

2-4 種々の pH における安定性：各酵素液をそれぞれ pH 3~pH 10 の範囲の M/10 緩衝液中に 37°C で18時間保持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, PDase, PMase の諸活性はいずれも pH 7 付近で安定であると考えられる。

2-5 熱安定性：各酵素液をそれぞれ最適 pH の 0.2M 緩衝液で希釈し種々の温度で10分間保持した後急冷し常法にしたがって残存活性を測定した結果は Fig. 12のごとくである。RNase A は 80°C で20%残存した PDase B は 80°C で 約5%残存していた。また PMase C は 65°C で殆んど失活した。

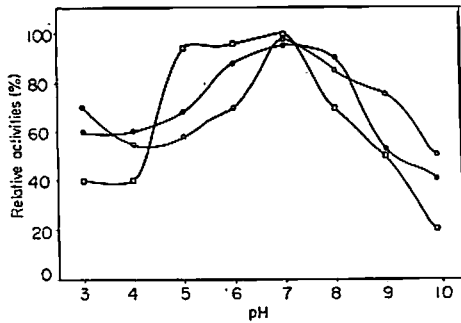


Fig. 11 Effect of pH on stabilities of enzymatic activities. (37°C, 18 hrs)
●—● RNase A ○—○ PDase B
□—□ PMase C

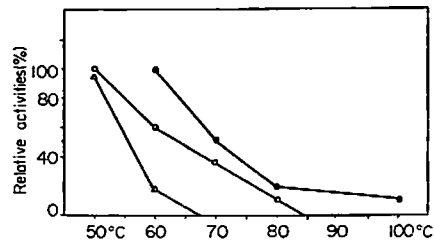


Fig. 12 Heat stability of enzymatic activities.
RNaseA ●—● PDaseB ○—○
PMaseC △—△

2-6 金属イオンおよび阻害剤の影響：各酵素の活性に及ぼす金属イオンまたは阻害剤としての試薬の影響をしらべると Table 4, 5 のごとくである。

Table 4 Effects of metal ions on some enzyme activities.

		RNase A	PDase B	PMase C
Control		100	100	100
MgCl ₂	6 × 10 ⁻³ M	112	137	108
	6 × 10 ⁻² M	120	146	111
CaCl ₂	"	102	111	116
	"	98	109	116
CoSO ₄	"	85	—	129
	"	68	—	114
CuSO ₄	"	25	—	46
	"	20	—	45
ZnSO ₄	"	56	100	46
	"	45	94	46
MnSO ₄	"	110	—	—
	"	101	—	—

— : not examined

Table 5 Effects of anions, and chelating agents on some enzyme activities.

		RNase A	PDase B	PMase C
Control		100	100	100
NaF	6 × 10 ⁻³ M	95	94	12
	6 × 10 ⁻² M	92	86	10
Na ₂ HPO ₄	"	82	88	62
	"	75	76	38
EDTA	"	110	101	123
	"	105	92	119
Na-citrate	"	120	100	119
	"	103	92	114

RNase は Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺ により阻害された。PMase は Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ により阻害された。キレート剤などの阻害は RNase に対してリン酸が若干ある程度であり、PDase は NaF と Na₂HPO₄ により若干阻害された。PMase は NaF, Na₂HPO₄ により著しく阻害された。また促進的な作用をするものは殆んどなかった。

3. 酵母 RNA の酵素分解による 5'-ヌクレオチドの生成

前述のごとくアスパラガス酵素系の中でピーク A 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。ピーク A の濃縮部分を Tris-buffer (pH 7.5) 中で Fig. 13 のごとく反応させたがこの場合 RNA の分解率は約30%であった。Fig. 14 に示すように酵母 RNA の分解によって 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP 計4種の 5'-ヌクレオチドが生成するこ

40mg of yeast RNA
 —RNase
 500units of RNase A in buffer (pH7.5)
 —37°C, 22hrs, incubation
 —HClO₄ treatment, supernatant
 —active carbon treatment
 Sample for chromatography

Fig. 13 Digestion of RNA

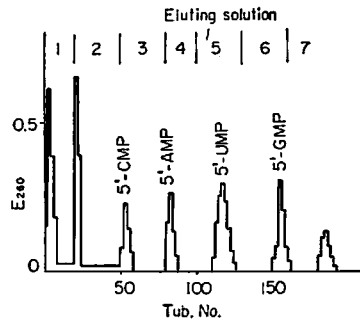


Fig. 14 Formation of 5'-nucleotides by degradation of yeast RNA with fraction A.

とが認められた。

4. ヌクレオチドおよびその誘導体に対する PMase 画分の作用

PMase 活性のあるピーク C は前述のごとく合成基質 PNPP を分解するだけでなく自然界の種々の核酸成分に対して活性を示した。すなわち ATP に対して Fig. 15 に示す方法で作用させた結果は Fig. 16 のごとくである。あらかじめ反応系に基質として加えた authentic の ATP は分解されて、ADP, AMP, アデノシンが生成された。5'-ヌクレオチド類の一つとして 5'-AMP に、また 3'-ヌクレオチド類の一つとして 3'-AMP にピーク C を作用させた場合酵素活性に及ぼす pH の影響を示すと Fig. 17 のごとくで最適 pH は両者共に pH 4~5 にあった。またそれらの比活性を示すと Table 6 のごとくである。

ATP (20mg/20ml) 5.0ml
 —PMase fraction (28.2 unit) 2.0ml
 —IM buffer (pH 4.5—5.0) 1.0ml
 —incubation, 37°C, 1hr
 —HClO₄ treatment
 —active carbon treatment
 Sample for chromatography

Fig. 15 Degradation of ATP

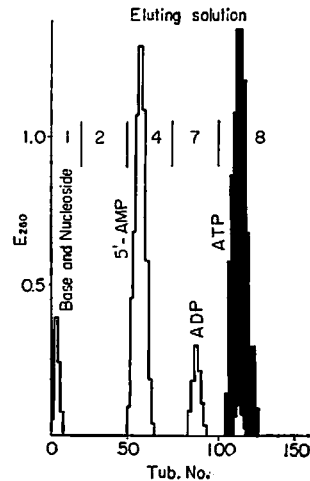


Fig. 16 Incubation of asparagus PMase fraction with authentic ATP.
 ▬ before incubation
 ▨ after incubation

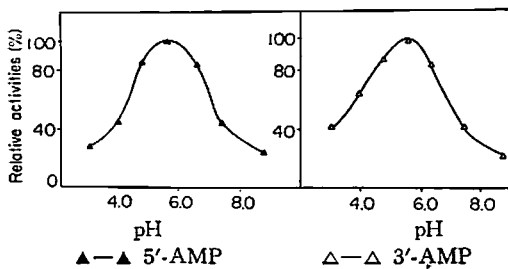


Fig. 17 Activities of PMase C to 5'-AMP or 3'-AMP at various pH.

Table 6 Activities of PMase C fraction to 5'-AMP or 3'-AMP.

	substrate	unit	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Green Asparagus	5'-AMP	17.49	0.12	145
	3'-AMP	38.7	0.12	322
White Asparagus	5'-AMP	10.8	0.10	108
	3'-AMP	21.6	0.10	216

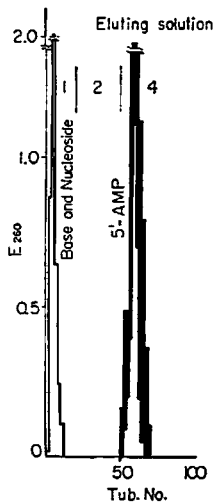


Fig. 18 Incubation of asparagus PMase fraction with authentic 5'-AMP.
 ▬ before incubation
 ▬ after incubation

3'-ヌクレオチドに対する活性が 5'-ヌクレオチドに対する活性よりも約 2 倍程度強かった。

また 5'-AMP を分解することが Fig. 18 のカラムクロマトグラムに示すようにみとめられた。

また RNase 活性の画分 A をヌクレオチド並びに BPNPP に作用させたが分解は認められなかった。またグリーンアスパラガスとホワイトアスパラガスは性質もほぼ一致した。

考 察

アスパラガスの酵素活性画分のうちでピーク A は RNA を分解したが BPNPP には作用しなかった。また、PDase, PMase 活性の各区分とは分けることができた。この酵素の RNase 活性は前報¹⁾のシイタケにおけるアルカリ性側 RNase、またマッシュルームの RNase と熱安定性が良く似ているが同一酵素であるか否かは詳細に検討する必要がある。

この RNase 活性は Eavens⁵⁾ の *Serratia marcescens*, 杉本ら⁶⁾ の *Streptomyces* No. 41 また前報¹⁾でのマッシュルーム子実体に類似している。PDase B 区分また PMase C 区分は RNase A 区分とは分離されたが PDase B 区分と PMase C 区分は Sephadex G-25, Amberlite CG-50, DEAE-cellulose によっては互に分離することができず同一酵素蛋白が 2 種の酵素活性を示すものと考えられるが詳細についてはなお検討を要する。

このピークは ATP を分解する ATPase, 5'-あるいは 3'-AMP を分解するヌクレオチダーゼ活性が混在していると考えられる。とくに 5'-ヌクレオチドよりも 3'-ヌクレオチドに強く作用することは興味深いことである。これらの結果からアスパラガスにおけるヌクレオチドの蓄積について考察する。

酸性側では nucleoside polyphosphate の分解が大きく 5'-ヌクレオチドが生成されるが同時にヌクレオチダーゼが強いためヌクレオシド以下まで分解されヌクレオチドとしての蓄積は殆どない。pH 6.0 で食品の煮出し (温水抽出) と近似の条件では室温から温度を漸次上げるために

PMase 活性は最適 pH 域がずれていても約50%の活性が存在するために ATP→ADP→5'-AMP →アデノシンの分解経路は進むものと思われ 5'-AMP の蓄積は 5'-AMP からアデノシンに分解される速度より ATP→ADP→5'-AMP になる速度の方が速いためではないかと考えられるがこのことは今後検討する必要があると思われる。3'-ヌクレオチドが RNA の分解で多少生成するが殆んど残存しないものと考えられる。アルカリ性側ではヌクレオチダーゼ活性が殆んど見出されず一方 RNase 活性が強いため RNA の分解により 4 種の 5'-ヌクレオチド類が蓄積される。

このようにアスパラガスでは酸性側で PMase, PDase が強く RNase が殆どなく微アルカリ性で RNase 活性が強い。シイタケでは酸性側で RNase が強く、この酸性側酵素系の相違により 5'-ヌクレオチドの分布および煮出しにおける 5'-ヌクレオチド含量の相違がもたらされるといえる。アスパラガスにおいて PMase 区分によって 5'-ヌクレオチドより 3'-ヌクレオチドの方が2倍程度強く分解されるということはシイタケやマッシュルームに見出されない特徴であるが 5'-ヌクレオチドの蓄積また含量の相違はこのようなことにも由来すると考えられる。鳥蘭⁹⁾の提案による食品中の 5'-ヌクレオチド分布型式では plant type を示すものといえる。またこのような酵素系によって食品の旨味成分が少しでも醸成されよう。

要 約

アスパラガス可食部の核酸分解酵素系を DEAE-cellulose を用いて分離精製しそれらの一般的性質をしらべた。

RNase 活性のピーク 1 個, PDase 活性ピーク 1 個, PMase 活性のピーク 1 個が認められた。

酵素作用の最適条件は RNase (ピーク A) で pH 7.5~8.0, 温度 70°C PDase (ピーク B) では pH 5.0, 温度 50°C, PMase (ピーク C) は pH 5.0, 温度 50°C であった。

これらの結果からアスパラガスの温水抽出(煮出し)における 5'-ヌクレオチドの消長が説明された。マッシュルームとよく似た酵素系を示すがシイタケとは酸性側において酵素系の性質が異なっておりこれが相互の 5'-ヌクレオチド分布型式の相違をもたらすものと考えられる。

終りに臨み貴重な薬品、酵素類など多大のご援助を賜わっている 武田薬品工業株式会社の方々および実験を分担された当短大寺田潤子嬢に深謝します。

本報はアミノ酸、核酸集談会(名古屋, 1966)において発表したものである。

文 献

- 1) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 335 (1965).
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, No. 5, 237 (1966).
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, No. 5, 248 (1966).
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 925 (1966).
- 2) 中島, 市川, 鎌田: 農化 37, 558 (1963).

- 3) Folin, O., Ciocalteu, V : *J. Biol. Chem.* 73, 629 (1927).
- 4) 須原, 大村, 草葉 : 酵素化学シンポジウム第16号 115 (1964).
- 5) Eavens, G.N., Jeffries, C.D. : *J. Bact.* 85, 273 (1963).
- 6) 杉本, 岩浅, 横塚 : 農化 36, 277 (1962).
- 7) 島蘭 : *Amino acid and Nucleic acid* 10, 179 (1964).