

数種のきのこにおける核酸分解酵素系とその作用*

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄・寺本 四郎**

Nucleic acid Decomposing Enzymes of Some Mushrooms

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

Enzyme fractions decomposing nucleic acid and related substances were isolated from the fruiting bodies of Shii-take (*Lentinus edodes*), Matsu-take (*Tricholoma matsutake*), and common mushroom (*Psalliota bisporus*), and they were partially purified with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -saturation and chromatography using DEAE-cellulose column. Their properties were examined by general methods.

Two of three peaks of ribonuclease (RNase) from *L. edodes* had an optimum temperature of 65°C and a pH of 4.5, but in the other peak they were 65°C and pH 8.0, respectively. Both two peaks of phosphodiesterase (PDase) activity had an optimum temperature of 60°C and pH of 7.5. The optimum temperature and pH of phosphomonoesterase (PMase) were 45°C and pH 4.5, respectively.

RNase from *T. matsutake* had an optimum temperature of 60°C and a pH range of 7.0~7.5. The ranges of optimum temperature and pH of PDase and PMase were 40~45°C and pH 6.0~6.5, and 40~45°C and pH 4.5~4.8, respectively.

RNase fraction from *P. bisporus* had an optimum temperature of 60°C and pH range of 7.5~8.0. There was also a PDase activity, with an optimum temperature of 45°C and a pH range of 7.5~8.0. Two PMase fractions had identical optimum temperatures of 40°C and pH ranges of 4.0~5.0.

Yeast RNA was degraded by each RNase fraction of mushrooms under optimum condition for its activity, and four kinds of 5'-nucleotides, namely 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-AMP and 5'-GMP were accumulated abundantly in its digest. The formation of 5'-AMP was found as the result of breakdown of ATP with mushrooms' PMase fractions.

The acid range-enzyme activities of *P. bisporus* is different from that of *L. edodes*, and the fact may account for the difference of the distribution pattern of 5'-nucleotides between both. It is reasonable to consider that during mild heating of mushrooms in water, some kinds of 5'-nucleotides are formed from RNA and nucleoside polyphosphate by the actions of their enzymes.

* Amino Acid and Nucleic Acid 醱酵と代謝 17号 (1968) 所載

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

結 言

きのこ類の風味を食品化学的にみると、5'-GMP など核酸系物質が旨味成分として注目すべきものと考えられる。前報¹⁾において、きのこ類の核酸系成分の分布を調べたが、きのこの種類によって遊離の 5'-ヌクレオチドの含量等に若干の相違があることを見出した。また加熱処理など食品加工工程においても、核酸成分の変化にそれぞれ差異のあることを見出した。すなわち、シイタケ、マツタケにおいては、5'-GMP 等 RNA を構成する 4 種のヌクレオチドが遊離の状態で存在し、また生成されるが、マッシュルームにおいては 5'-AMP 5'-UMP の 2 種のヌクレオチドを認めるにすぎなかった。しかし、そのマッシュルームでも、一旦 pH 8.0 で自己分解させると 4 種の 5'-ヌクレオチドの蓄積が見出された。これらの原因として著者は核酸分解酵素系に特徴があるためではないかと考えた。植物²⁾、魚肉³⁾、微生物⁴⁻¹¹⁾、蛇毒など¹²⁻¹⁴⁾ については核酸分解酵素系に関する既往の文献が見られるが、きのこについてはあまり報告がみあたらない。

本報では、きのこ可食部より核酸分解酵素系を抽出分離精製し、その酵素学的性質をしらべた。なおそれらの結果から生のきのこにおける 5'-ヌクレオチドの分布、また種々の条件での加熱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。

実 験 の 部

1 供試標準物質：定性定量のための標準物質として 5'-ヌクレオチド、3'-ヌクレオチドは何れもナトリウム塩を、またポリホスフェート類、ヌクレオシド、核酸塩基類は市販品を用いた。

2 試 料：シイタケ (*Lentinus edodes*)、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) は市販品、マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) は東洋食品研究所栽培のものである。それぞれ可食部を 5 倍量の蒸留水と共にホモジナイズし 25°C で 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。

本文では次の略号を使用した。

- 5'-AMP : 5'-adenylic acid
- 5'-UMP : 5'-uridylic acid
- 5'-GMP : 5'-guanylic acid
- RNA : ribonucleic acid
- RNase : ribonuclease
- DNA : desoxyribonucleic acid
- PDase : phosphodiesterase
- ADP : adenosine diphosphate
- PMase : phosphomonoesterase
- ATP : adenosine triphosphate
- PNPP : *p*-nitrophenylphosphate
- BNPP : bis-*p*-nitrophenylphosphate

3 分析方法：総 5'-3'-ヌクレオチド量は中島¹⁵⁾らの酵素法によった。個々のヌクレオチドは Dowex 1×8 を用いるカラムクロマトグラフィーで測定した。酵素の精製には DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex, イオン交換樹脂を用いた。

蛋白質は Folin-Ciocalteu¹⁶⁾ の呈色法または 280m μ の吸収によって定量した。磷酸は Fiske-Subbarow 法¹⁷⁾, 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：須原, 大村¹⁸⁾らの報告に準じて RNase, PDase, PMase 活性を測定した。

実 験 結 果

1 DEAE-cellulose による核酸分解酵素系の分画

シイタケ, マツタケ, マッシュルーム共に粗酵素液 2.5 l に硫酸アンモニアを飽和になるまで加え, 18,500×g で遠心分離し生じた沈殿を 0.01 M acetate buffer に溶解し, その上澄液を 5°C で 1 晩 0.01 M acetate buffer (pH 6.0) に対し透析した。透析内液 (蛋白量として 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 0.5 M まで gradient elution を行った。そのクロマトグラムはシイタケでは Fig. 1, マツタケでは Fig. 2, マッシュルームでは Fig. 3 のごとくである。

シイタケでは RNase 活性を持つピーク 3 個, マッシュルーム, マツタケでは 1 個のピークを示した。また PDase 活性はシイタケで 2 個, マッシュルーム, マツタケで各 1 個見出された。PMase 活性については, シイタケ, マツタケで各 1 個見出され, マッシュルームでは Fig. 4 の再クロマトグラムの結果, PMase 画分が 2 個あることを認めた。

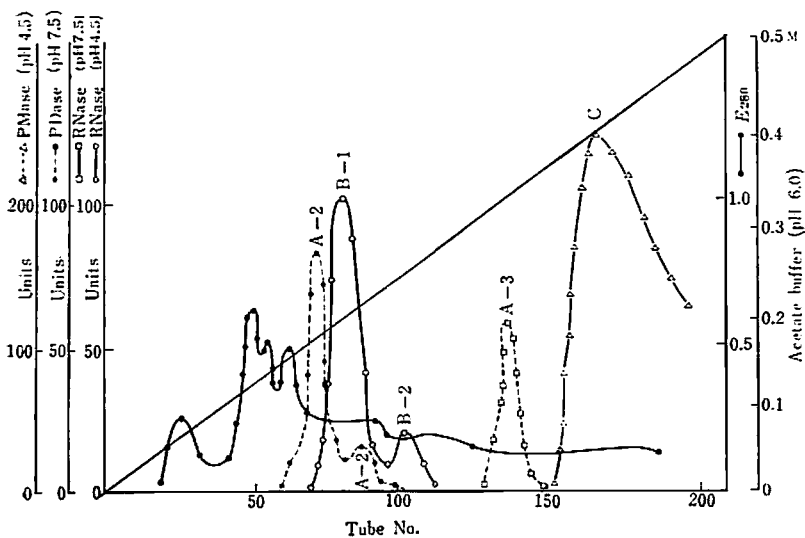


Fig. 1 Chromatography of the extract from Shii-take on DEAE-cellulose column.

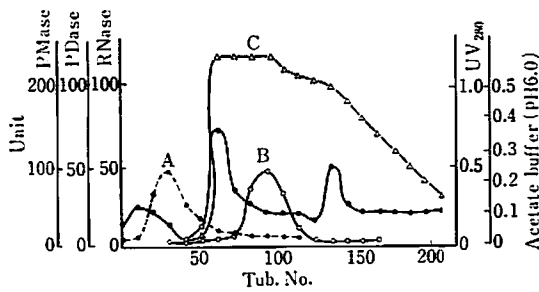


Fig. 2 Chromatography of the extract from Matsu-take on DEAE-cellulose column.

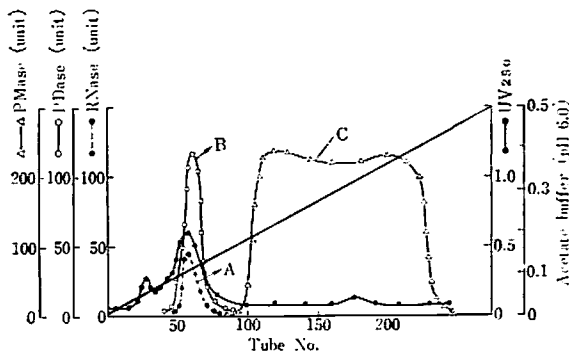


Fig. 3 Chromatogram of the extract from Mushroom on DEAE-cellulose column.

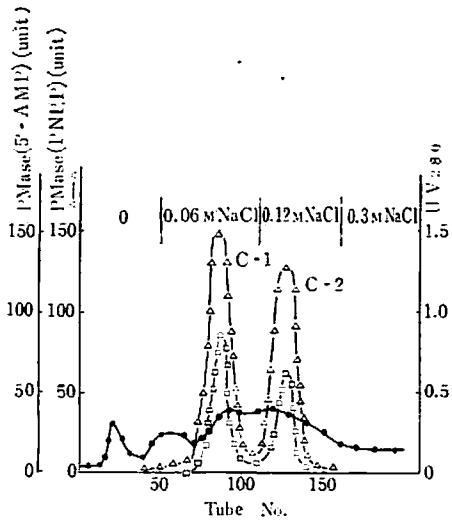


Fig. 4 Rechromatogram of PMase fraction from Mushroom on DEAE-cellulose column.

シイタケ、マツタケ、マッシュルームの RNase, PDase, PMase の各ピークをそれぞれ仮に A, B, C と命名した。シイタケにおいて A-1, A-2 画分、マッシュルーム A-1, A-2 画分は BPNPP に作用することが見出されたが、シイタケ A-3, マツタケ A では BPNPP には作用しなかった。またマツタケにおいて C 画分、すなわち PMase 画分は BPNPP に作用した。

2 精製段階における諸酵素系の活性

上述のごとく粗酵素液を硫酸アンモニウムで塩析し、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。

DEAE-cellulose で精製することによって、シイタケでは RNase で 100 倍、PDase 200 倍、PMase 20 倍、マツタケでは RNase が 10 倍、PDase 20 倍、PMase 30 倍程度、マッシュルームでは RNase 30 倍、PDase 60 倍、PMase は 20 倍程度、濃縮精製された。

3 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濃縮した後、蒸留水に対して 24 時間透析を行った。この内液を酵素液としてその性質を調べた。

Table 1 Purification of RNase of Shii-take, Matsu-take, and Mushroom

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Shii-take			
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 A-3	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 A-3	2,120	0.4	5170
Matsu-take			
Filtrate of extract	44,000	1949.7	22.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	9,065	87.2	104.0
DEAE-cellulose	1,104	3.3	341.7
Mushroom			
Filtrate of extract	19,500	1155	16.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	9,200	280	32.8
DEAE-cellulose 1	2,240	62.3	36.8
DEAE-cellulose 2	1,040	5.8	193
DEAE-cellulose 3	484	0.93	520

Table 2 Purification of PDase of Shii-take, Matsu-take, and Mushroom

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Shii-take			
Filtrate of extract	42,500	2070	20.5
Ammonium sulfate	13,170	174.7	59.1
DEAE-cellulose 1 Peak B-1	9,762	30.9	316.2
Peak B-2	1,936	5.7	341.2
DEAE-cellulose 2 Peak B-1	6,338	1.30	4875.3
Peak B-2	950	0.15	6333
Matsu-take			
Filtrate of extract	25,300	1949.7	12.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	3,700	87.2	42.4
DEAE-cellulose	982.8	3.6	270.0
Mushroom			
Filtrate of extract	55,350	1155	48.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	17,232	280	61.4
DEAE-cellulose 1	8,970	62.3	140.2
DEAE-cellulose 2	8,385	5.8	1445
DEAE-cellulose 3	2,508	0.93	2696

Table 3 Purification of PMase of Shii-take, Matsu-take, and Mushroom

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Shii-take			
Filtrate of extract	624,000	2,070	302
Ammonium sulfate	540,000	174.7	3,112
DEAE-cellulose 1	135,600	38.7	3,505
DEAE-cellulose 2	20,250	3.18	6,305
Matsu-take			
Filtrate of extract	451,000	1,949	231.3
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	231,250	89.2	2,654.9
DEAE-cellulose	37,500	5.7	6,567.4
Mushroom			
Filtrate of extract	2,125,000	1,155	1,854
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	1,420,000	280	5,072
DEAE-cellulose 1	420,323	59.8	7,029
DEAE-cellulose 2	253,506	6.45	39,303
DEAE-cellulose 3 Peak-1	14,625	1.31	11,164
Peak-2	10,352	1.62	6,390

3-1 きこ諸酵素の最適 pH と最適温度：酵母 RNA を基質として RNase 活性の最適 pH を、また BPNPP で PDase 活性、PNPP で PMase 活性の最適 pH を検討した結果は Table 4 のごとくである。

シイタケ RNase のピーク A-1, A-2 では共に pH 4~4.5 に、ピーク A-3 では 7~7.5 に、マツタケ RNase のピーク A では 7.0~7.5 に、マッシュルームでは pH 8.0~8.5 に、それぞれの最

Table 4 Optimum pH and temperatures of enzyme fractions of some mushrooms

Enzymes		Enzyme fractions	Optimum pH	Optimum temperature
RNase	Shii-take	A-1	4.0~4.5	60~65°C
		A-2	4.0~4.5	60~65°C
		A-3	7.0~7.5	55~60°C
	Matsu-take	A	7.0~7.5	60°C
	Mushroom	A	8.0~8.5	60°C
PDase	Shii-take	B-1	7.0~7.5	60°C
		B-2	7.0~7.5	60°C
	Matsu-take	B	6.0~6.5	40~45°C
	Mushroom	B	7.5~8.0	45~48°C
PMase	Shii-take	C	4.5~5.0	45~50°C
		C	4.5~4.8	40~45°C
	Mushroom	C-1	4.5~5.0	40°C
		C-2	4.5~5.0	40~45°C

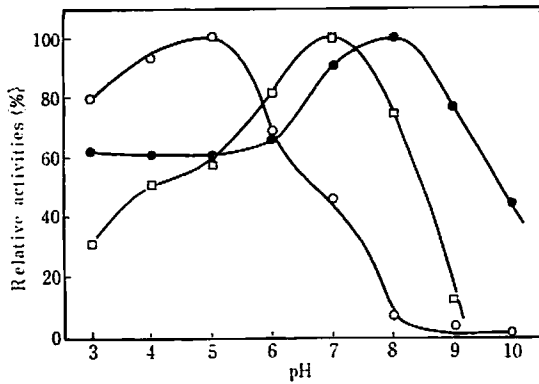


Fig. 5 Effect of pH on stabilities of enzymatic activities of Shii-take. (37°C, 18 hr)
 ●—● RNase A-1 □—□ PDase B-1
 ○—○ PMase C

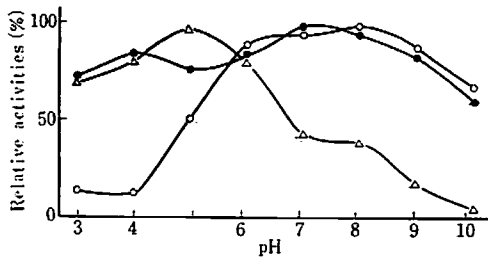


Fig. 6 Effect of pH on stabilities of enzymatic activities of Matsu-take. (37°C, 18 hr)
 ●—● RNase A ○—○ PDase B
 △—△ PMase C

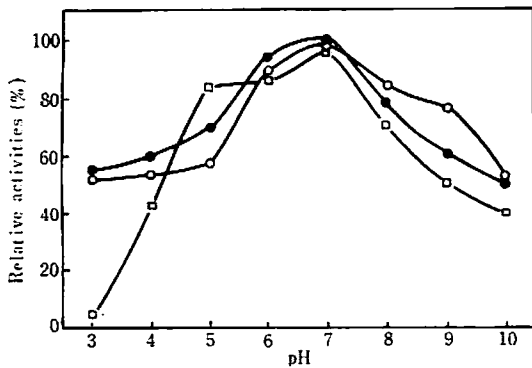


Fig. 7 Effect of pH on stabilities of enzymatic activities of Mushrooms. (37°C, 18 hr)
 ●—● RNase A ○—○ PDase B
 □—□ PMase C

適 pH を見出した。PDase の諸ピークではシイタケ B-1, B-2 が共に pH 7.0~7.5, マツタケ B は 6.0~6.5, マッシュルーム B は 7.5~8.0 に最適 pH をもっていた。また PMase 活性の場合、シイタケ C が 4.5~5.0, マツタケ C 画分が 4.5~4.7, マッシュルーム C-1, C-2 ピーク共に 4.5~5.0 にそれぞれ最適 pH をもっていた。

また最適温度について、シイタケ、マツタケ、マッシュルームの RNase 活性では、シイタケ A-1, A-2 は 60~65°C, ピーク A-3 は 55~60°C, マツタケ A は 60°C, マッシュルーム A は 60°C, また PDase はシイタケ B-1, B-2 で 60°C, マツタケ B で 40~45°C, マッシュルーム B で 45~48°C に最適温度を持っていた。

PMase 活性はシイタケ C で 45~50°C, マツタケ C で 40~45°C, マッシュルーム C-1, C-2 で 40~45°C に最適温度を認めた。

3-2 酵素液量と活性との関係：シイタケ、マツタケ、マッシュルームの RNase, PDase, PMase について酵素量と活性との関係をしらべた。シイタケ、マツタケ、マッシュルーム共に直線関係があり、その直線範囲内で酵素量を希釈して測定した。

3-3 各種 pH における安定性：各酵素液をそれぞれ pH 3~10 の範囲の 1/10 M 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. 5~7 のごとくである。

シイタケ RNase は A-1, A-2, A-3

共に pH 8.0~8.5 が安定であった。マツタケ RNase A は 7.0~8.0, マッシュルームでは 6.5~7.0 がもっとも安定であった。また PDase についてはシイタケ B-1, B-2 共に pH 7.0, マツタケ pH 6.0~8.0 の範囲, マッシュルームは pH 6.0~7.0 であった。PMase 活性はシイタケ C で pH 4~5, マツタケ C で 4.0~5.0, マッシュルーム C-1, C-2 共に pH 6.0~7.0 が比較的安定であった。

3-4 熱安定性: 酵素液を 0.2M 緩衝液 (pH は最適 pH によった) で希釈し各温度で 15 分間処理後急冷し, 常法に従って残存活性を測定した結果は Fig. 8~10 のごとくである。

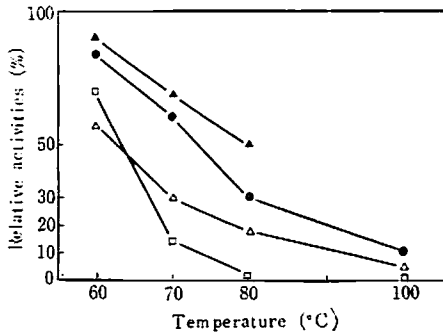


Fig. 8 Heat stability of enzymatic activities of Shii-take.

▲—▲ RNase A-3
△—△ PDase B-1
●—● RNase A-1
□—□ PMase C

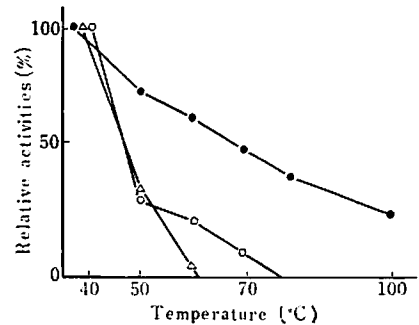


Fig. 9 Heat stability of enzymatic activities of Matsu-take.

●—● RNase A
○—○ PDase B
△—△ PMase C

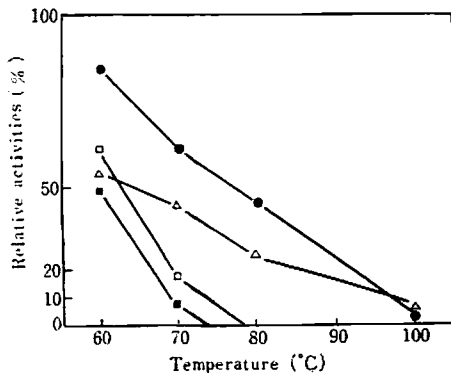


Fig. 10 Heat stability of enzymatic activities of Mushrooms.

●—● RNase A
△—△ PDase B
□—□ PMase C-1
■—■ PMase C-2

RNase はシイタケ, マツタケ, マッシュルーム共に 100°C でも活性は残存した。シイタケでは RNase A-1, A-2 で 20%, A-3 で 30% 残存し, マツタケ A も 20%, マッシュルームでも約 10% 残存した。マッシュルームの PDase は 100°C で約 10% 残存したが, シイタケ, マツタケでは活性は殆んど無くなっていた。PMase はシイタケで 80°C, マツタケ 50°C, マッシュルーム 70°C で, ほとんど活性はなくなっていた。

3-5 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 5, 6, 7 のごとくである。

シイタケ RNase は $6 \times 10^{-2}M$, $6 \times 10^{-3}M$, PDase, PMase では $5 \times 10^{-3}M$, $1 \times 10^{-2}M$, マツタケ, マッシュルームは RNase, PDase, PMase 共に $6 \times 10^{-2}M$, $6 \times 10^{-3}M$ の濃度で影

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

		Shii-take			Matsu-take	Mushroom
		A-1	A-2	A-3	A	A
Control		100	100	100	100	100
MgCl ₂	6×10 ⁻² M	76	71	100	97	100
	6×10 ⁻³ M	83	101	95	104	110
CaCl ₂	"	98	100	95	87	106
	"	87	107	97	103	100
CoSO ₄	"	58	48	74	71	96
	"	95	84	80	81	100
CuSO ₄	"	54	0	61	50	29
	"	73	0	20	78	17
ZnSO ₄	"	63	78	83	98	56
	"	97	96	106	86	41
MnSO ₄	"	76	37	73	—	82
	"	88	117	84	103	77
NaF	"	100	85	115	82	107
	"	97	83	100	88	102
Na ₂ HPO ₄	"	70	23	58	75	105
	"	78	86	79	100	107
EDTA	"	99	80	115	57	110
	"	90	82	95	89	105
Na-citrate	"	105	32	92	75	97
	"	95	62	100	91	100
Cystein	"	110	66	107	—	95
	"	100	107	110	—	86

— : The experiment was not done.

響を調べた。

シイタケ RNase は Co⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Na₂HPO₄ によって、キレート剤では Na-citrate で阻害された。促進的に作用するものはほとんどなかった。

マツタケでは Co⁺⁺, Cu⁺⁺, キレート剤では EDTA によって阻害された。

マッシュルームにおいては Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ に阻害され、促進的に作用するものはなかった。

PDase 活性については、シイタケでは Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, NaF, Na₂HPO₄, および EDTA に阻害され、Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ により促進された。マツタケでは Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺, NaF, NaHPO₄, キレート剤では EDTA により阻害された。マッシュルームでは Cu⁺⁺, Mg⁺⁺, およびキレート剤の EDTA, Na-citrate によって阻害を受けた。

PMase 活性では、シイタケでは Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, NaF, Na₂HPO₄ により阻害され、EDTA, Na-citrate は促進的傾向があった。マツタケでは Cu⁺⁺, NaF が阻害した。マッシュルームでは C-1, C-2 共に Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺, NaF が阻害し、Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, EDTA が促進的傾向を示した。

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

		Shii-take			Matsu-take B	Mushroom B
		B-1	B-2			
Control		100	100		100	100
MgCl ₂	1×10 ⁻² M	112	104	6×10 ⁻² M	96	94
	5×10 ⁻³ M	129	117	6×10 ⁻³ M	76	125
CaCl ₂	"	131	115	"	87	97
	"	156	135	"	70	118
CoSO ₄	"	—	—	"	—	109
	"	—	—	"	69	114
CuSO ₄	"	9.4	15.8	"	31	62
	"	13.6	23.2	"	66	62
ZnSO ₄	"	47.2	105	"	80	106
	"	52.5	106	"	57	101
MnSO ₄	"	—	—	"	—	44
	"	—	—	"	—	50
NaF	"	42	90	"	44	106
	"	69	88.5	"	65	101
Na ₂ HPO ₄	"	39	92.5	"	65	97
	"	39	95.0	"	65	93
EDTA	"	3.1	22.3	"	27	44
	"	5.3	32.3	"	35	50
Na-citrate	"	72.5	76.0	"	100	62
	"	100.0	86.0	"	91	60
Cystein	"	96.5	61	"	—	90
	"	96.5	68	"	—	94

—: The experiment was not done.

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 A-3 in buffer (pH 7.5)

-37°C, 22hr, incubation

-HClO₄ treatment, supernatant

-active carbon treatment

Sample for chromatography

Fig. 11 Digestion of RNA.

4 酵母RNAの酵素分解による

5'-ヌクレオチドの生成

前述のごとくシイタケ、マッシュルーム酵素系の中で RNase 活性を有するそれぞれのきのこのピークAは相互に最適pH あるいは性質はかなり異なるが、それぞれの最適条件において酵母RNA に作用させてその分解産物を調べた。シイタケピークAの濃縮部分を pH 4.5 の buffer の中で反応させ

た1例を示すと Fig 11, 12 の示すように、酵母 RNA の分解によって 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP 計4種の 5'-ヌクレオチドの生成することがみとめられた。その他のきのこについても同様な結果が得られて、その分解率は40~75%であった。

Table 7 Effects of metal ions, anions, and chelating agents on PMase activities
(Relative activities)

		Shii-take C		Matsu-take C	Mushroom	
					C-1	C-2
Control		100		100	100	100
MgCl ₂	1 × 10 ⁻² M	34	6 × 10 ⁻² M	110	179	165
	5 × 10 ⁻³ M	144	6 × 10 ⁻³ M	100	180	166
CaCl ₂	"	72	"	98	142	130
	"	72	"	99	150	161
CoSO ₄	"	91	"	—	75	80
	"	115	"	—	55	63
CuSO ₄	"	62	"	55	74	84
	"	56	"	58	87	85
ZnSO ₄	"	61	"	80	14	12
	"	93	"	85	24	25
MnSO ₄	"	—	"	—	142	133
	"	—	"	—	116	121
NaF	"	3	"	12	14	12
	"	4	"	20	24	25
Na ₂ HPO ₄	"	47	"	98	89	88
	"	55	"	100	65	54
EDTA	"	112	"	89	142	133
	"	180	"	98	116	121
Na-citrate	"	176	"	115	101	100
	"	175	"	100	62	75
Cystein	"	146	"	—	102	102
	"	104	"	—	77	89

—: The experiment was not done

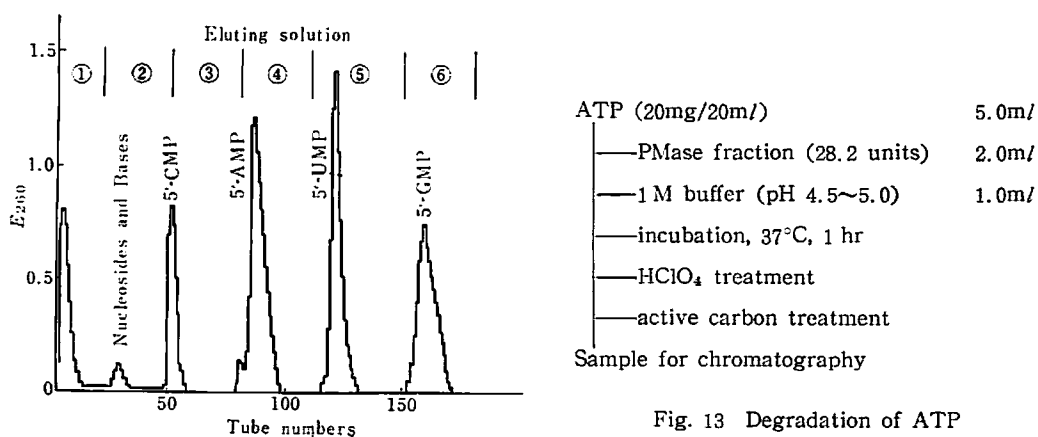


Fig. 12 Formation of 5'-nucleotides by degradation of Yeast RNA with Shii-take fraction A-1.

Fig. 13 Degradation of ATP

5 ヌクレオチドおよびその誘導体に対する PMase 画分の作用

シイタケ、マツタケ、マッシュルームで 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。1 例としてマッシュルーム C 画分を ATP に対して Fig. 13 に示す方法で作用させた結果は Fig. 14 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, アデニンが生成された。なお同様に GTP に作用させると GDP, GMP, グアノシン, グアニンが生成された。5'-ヌクレオチド類の 1 つとして 5'-AMP にピーク C-1, C-2 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. 15 のごとくで最適 pH 4~5, 最適温度 40~50°C の範囲であった。

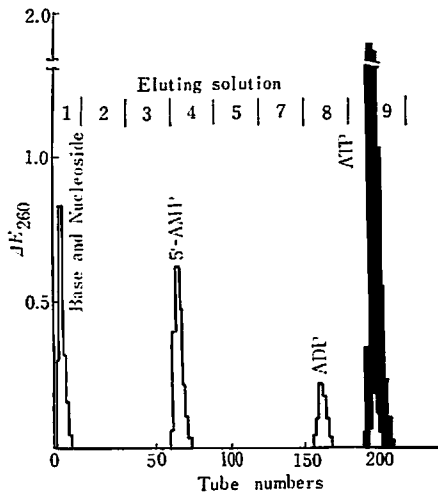


Fig. 14 Incubation of Mushroom PMase fraction with authentic ATP.

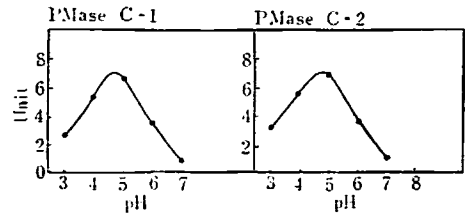


Fig. 15 Activities of PMases (C-1, C-2) to 5'-AMP at various pH.

また、シイタケ、マツタケ、マッシュルームの RNase 活性区分をヌクレオチド、ヌクレオシドに作用させたが分解は認められなかった。マツタケの PDase 活性は PMase 活性画分と一致するためにヌクレオチド、ヌクレオシドを

分解するが、シイタケ、マッシュルームの PDase 活性画分はヌクレオチド、ヌクレオシドを分解することは認められなかった。

考 察

シイタケ、マツタケ、マッシュルームの酵素活性画分のうちで、シイタケピーク A-1, A-2, A-3, マツタケ A, マッシュルーム A は RNA を分解し、そのうち、シイタケ A-3 およびマツタケ A は BPNPP を分解せず、他の PMase, PDase と分離された。シイタケ A-1, A-2, マッシュルーム A のそれぞれの画分に含まれている PDase 活性は Sephadex G-25, Amberlite CG-50, DEAE-cellulose によっては RNase 活性と分離することができなかった。

シイタケ A-1 と B-1, A-2 と B-2 の画分は、それぞれ相互に分離できなかった。RNA 分解の最適 pH が pH 5.0 付近にあり、BPNPP 分解の最適 pH が 8.0 であるが、同一酵素蛋白で

あるとして2種の酵素活性を示すことには今後の検討が必要と考える。蛇毒のPDase¹⁴⁾とは明らかに異っている。

マッシュルームAとBのピークは最適pHも同一で、同一画分が2種の酵素活性を示すものと考えられる。

マッシュルームのRNase活性はEaves⁶⁻⁷⁾の*Ser-ratia marcescens*, 杉本⁸⁾らの*Streptomyces* No. 41, 猿野⁹⁾らの*Monascus* 属に類似しており、またPDase活性は、蛇毒¹⁴⁾のそれによく似ている。この3つのきのこ類のRNase活性については互に共通性はないが、これらの酵素は塩基特異性の低い一種の exonuclease であると思われる。

シイタケ、マツタケ、マッシュルーム3種のPMase酵素活性のピークC、マツタケC、マッシュルームC-1、C-2はPNPPを分解し、マツタケ以外はRNase活性、PDase活性と完全に分離された。しかしマツタケについてはSephadex A-50、DEAE-celluloseによっても互に分離できなかった。

pH活性等から同一酵素蛋白が2種の酵素活性を示すものと考えられ、杉本⁸⁾らの*Streptomyces* No. 41とよく一致するが、他の酵素系はいわゆる酸性フォスファターゼに属すると考えられる。このピークはATP、ADP等のnucleoside polyphosphateを分解する活性があり、また5'-GMP等のヌクレオチドを分解し、ヌクレオチダーゼ、活性部分が混在していると考えられる。

これらの結果から、シイタケ、マツタケ、マッシュルームにおけるヌクレオチドの蓄積について考察すると、pHが酸性側ではシイタケではRNAやnucleoside polyphosphateからの分解が大で、5'-ヌクレオチドが生成すると同時にヌクレオチダーゼが強いために直ちにヌクレオシドまで分解されて、ほとんどヌクレオチドとして蓄積されない。マツタケ、マッシュルームの場合は、RNAの分解は少くnucleoside polyphosphateからの分解があるが、シイタケと同様にヌクレオチダーゼの作用によってヌクレオチドとして蓄積されない。pH 6.0で50~70°Cに温めると食品の煮出し操作(温水抽出)近似の条件となる。ヌクレオチダーゼの作用には不適當な条件となるので、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。シイタケ、マツタケの場合はRNAを構成する4種のヌクレオチドの存在を認めるが、マッシュルームは5'-AMPと5'-UMPの2種が見出されるだけである。この原因として、シイタケでは酸性側にRNase活性がみとめられ、またマツタケはpH 7.0にピークを持つRNase活性があるために、RNAの分解によるヌクレオチドの蓄積が主体であるが、マッシュルームの場合、RNase活性がpH 8.0~8.5にあるために、その作用が少いためと考えられる。なおマッシュルームではnucleoside polyphosphateの分解による5'-AMP、5'-UMPの蓄積が考えられる。

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の活性はシイタケ、マツタケ、マッシュルーム共にかなり強いので5'-ヌクレオチドを生成し、それがそのまま蓄積すると考えられる。きのこ類のヌクレオチド分布型式を分類した場合、島嶼¹⁰⁾氏が提案したplant typeとautolysate typeの2種に大別されることが裏付けられた。

上述のように、きのこの種類によってそれぞれ特徴ある酵素系の作用がみとめられ、それが食品

としての風味の上にそれぞれ影響していることが考えられるのである。

要 約

DEAE-cellulose を用いてシイタケ、マツタケ、マッシュルームの核酸分解酵素系を分離精製した。シイタケでは RNase 活性を持つピーク 3 個 (A-1, A-2, A-3), マツタケ 1 個 (A), マッシュルーム 1 個 (A), PDase 活性を持つピークはシイタケで 2 個 (B-1, B-2), マツタケ 1 個 (B), マッシュルーム 1 個 (B), PMase 活性を持つピークはシイタケ 1 個 (C), マツタケ 1 個 (C), マッシュルーム 2 個 (C-1, C-2) を認めた。

最適温度では、一般に RNase 活性が比較的高く、PDase, PMase の順に低くなっている。

最適 pH では RNase がシイタケで酸性側で認められた他は、アルカリ性側、また PDase は中性または弱アルカリ性側に認められ、PMase は 3 者共に pH 4.0~5.0 の間に最適 pH を持っていた。このようなことより、著者らが前報¹⁾ で発表したようなきのこ類の加熱処理工程における 5'-ヌクレオチドの消長がきのこの種類によって異なることや、煮出しにおいてシイタケなどで呈味成分の 5'-GMP などが蓄積することを説明できると考えられる。

文 献

- 1) 橋田度, 毛利威徳, 志賀岩雄, 寺本四郎: 醗酵工学, 42, 434 (1964); 43, 335 (1965); 43, 344 (1965).
- 2) S. Matushita and F. Ibuki: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 316 (1963).
- 3) 中野智夫: 日水誌, 28, 453 (1962).
- 4) K. Takahashi: *J. Biochem.*, 49, 1 (1961).
- 5) K. Tanaka: *ibid.*, 50, 62 (1961).
- 6) S.P. Colowick, and N.O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, II, 1955, p. 427, 519.
- 7) G.N. Eaves, and D.D. Jeffries: *J. Bact.*, 85, 273 (1963); 85, 1194 (1963).
- 8) 杉本洋, 岩浅孝, 横塚保: 農化, 36, 277 (1962); 37, 677 (1963); 38, 135 (1964).
- 9) 猿野琳次郎: 醗酵工学, 42, 475 (1964).
- 10) M. Kuo and H.J. Blumenthal: *Biochem. Biophys. Acta*, 52, 13 (1961).
- 11) 鈴木友二, 岩永貞昭: 蛋白質核酸酵素, 6, 265 (1964).
- 12) 浅野仁子: 同上, 6, 731 (1964).
- 13) 下村道夫: 同上, 6, 734 (1964).
- 14) 前野弘夫: 同上, 6, 738 (1964).
- 15) 中島宣郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎: 農化, 35, 797 (1961); 35, 803 (1961); 37, 558 (1963).
- 16) O. Folin and V. Ciocalteu: *J. Biochem.*, 73, 629 (1927).
- 17) C.H. Fiske and Y. Sabbarow: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
- 18) 須原郁雄, 草葉美美子, 大村栄之助: 酵素化学シンポジウム第16号, 115 (1964).
- 19) 島岡平雄: *Amino acid and Nucleic acid* 10, 179 (1964); 島岡平雄: *Food Technol.*, 18, 36 (1964).