

食品中の核酸成分に関する研究**

(第17報) クルマエビの核酸分解酵素系

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄・寺本 四郎*

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Foodstuffs

(XVII) Nucleic Acid Degrading Enzyme of Kurumaebi

Takenori Mouri, Wataru Hashida, Iwao Shiga and Shiro Teramoto*

An enzymatic fraction with the phosphomonoesterase (PMase) activity was isolated from Kurumaebi (*Prawn*) by DEAE-cellulose-chromatography. The fraction containing PMase had the optimum temperature of 50°C and the optimum pH in the range of 4.5~5.0. As the degradation of ATP and ADP by the PMase fraction advanced, 5'-AMP and 5'-IMP were accumulated. The formation of 5'-IMP was found as a result of deamination of 5'-AMP with the same fraction. The properties of PMase fraction of Kurumaebi are different from those of mushrooms (ref. our report in Vol. 44, p. 925 (1966) of this journal.)

It seems reasonable to consider that a mild heating of Kurumaebi meat with water with the pH at around 6.0 brings about the formation of 5'-AMP and 5'-IMP from nucleoside polyphosphate by the action of a PMase-containing fraction.

緒 言

前報¹⁾までにアスパラガス、スイートコーン、シイタケ、マッシュルームの可食部に含まれる核酸分解酵素系を分画しそれらの性質をしらべた。

水産物の核酸分解酵素系については齋藤²⁾、遠藤³⁾、富山⁴⁾の研究がありほとんど主体がホスファターゼであることを報告している。

水産物の中でもクルマエビは一般魚類と軟体動物の中間と考えられるような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。このような水産物を水と共に加熱するというような加工操作においてヌクレオチドの変化が認められるのでその原因をしらべるために酵素学的観点から検討を行なった。

本報ではクルマエビ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クルマエビ磨砕抽出液中の核酸分解酵素系を DEAE-セルローズで分画しそれらの性質を検討した。

* 大阪大学工学部醸酵工学教室

** 醸酵工学48巻4号213 (1970) 所載

実 験 方 法

- (1) 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。
- (2) 試料調整製法 クルマエビ(市販品)の可食部を5倍量の蒸溜水と共にホモジナイズし5°Cで2時間抽出し冷却遠心機にて遠心しその上澄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を用い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280m μ の吸収によって定量した。リン酸定量は Fiske-Subbarow法⁴⁾によった。
- (4) 核酸分解酵素活性の測定法 須原, 大村らの報告*に準じて RNase, PDase, PMase 活性を測定したが詳細な条件は前報¹⁾記載のごとくである。

実 験 結 果

1. Sephadex, 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18,000Gで遠心分離し生じた沈澱を0.01M acetate buffer (pH 6.0)に溶解し, その上澄を5°Cで一晩0.01M acetate buffer (pH6.0)で透析した。透析内液(蛋白として300mg)をSephadex G-100カラム(3×25cm)に吸着させacetate buffer (pH 6.0)で0.01Mより0.3Mまでgradient elutionを行なった。そのクロマトグラムはFig. 1のごとくである。

PMase活性はpH 5.0で測定した。PMase活性画分1個見出されたがRNase, PDase活性は, ほとんど見出されなかった。PMase活性の画分を画分Cと仮に命名した。画分Cについて相互の分離と精製を目的にし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, 0.01M acetate buffer (pH 6.0)に対して透析し, その内液をDEAE-セルロースに吸着した後, 0.01M~0.5Mまでacetate bufferでgradient elutionした。そのクロマトグラムはFig. 2のごとくである。

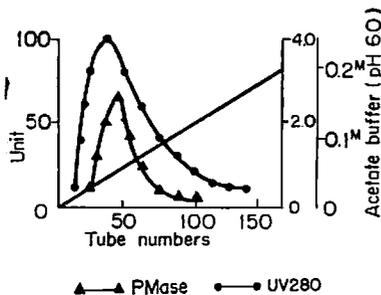


Fig. 1. Chromatography of the extract from kurumaebi on Sephadex column.

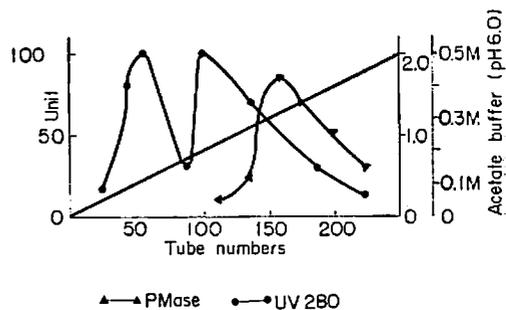


Fig. 2. Rechromatography of PMase fraction from kurumaebi on DEAE-cellulose column.

* 須原・草葉・大村: 酵素化学シンポジウム, 115 (1964).

このままでは PMase 画分が大きいために数種の画分が混在していることが考えられるので再び濃縮し、0.01M トリスアミノメタン buffer (pH 8.0) に対して透析し、その内液を予め 0.01M トリス buffer (pH 8.0) で bufferrize した DEAE-cellulose に吸着させ 0 から 0.3M までの食塩液で gradient elution した結果は Fig. 3 のごとくである。

5'-AMP と PNPP を基質とし pH 5.0 で並行して作用させたところ、その活性が全く一致した。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 PMase の活性および比活性の消長は Table 1 のごとくである。

PMase は約 20 倍程度濃縮された。

Table 1. Purification of PMase of kurumaebi.

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	18191	1750	10.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	7700	449	17.1
Sephadex G-100	2400	85	28.2
DEAE-cellulose	1739	10	173.9

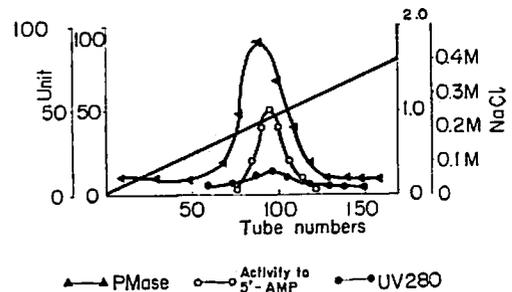


Fig. 3. Rechromatography of PMase fraction from kurumaebi on DEAE-cellulose column.

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液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調べた。

a) 最適 pH PNPP を基質として画分 C の PMase 活性の最適 pH は Fig. 4 のごとくで pH 4.5 であった。

b) 酵素液量と活性との関係 酵素液量と活性との関係をしらべると Fig. 5 のごとくである。

PMase 画分 C は 0.1ml~0.3ml の範囲で活性と直線関係があった。したがって、今後の測定では 4~8 unit の範囲の活性になる様に酵素液を希釈して基質

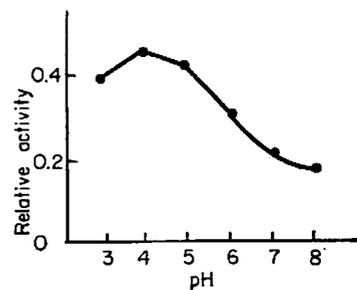


Fig. 4. Effect of pH on enzymatic activity.

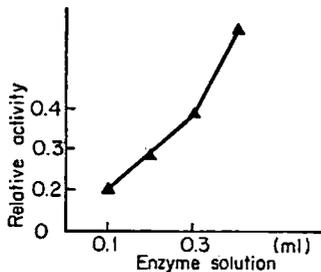


Fig. 5. Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solutions.

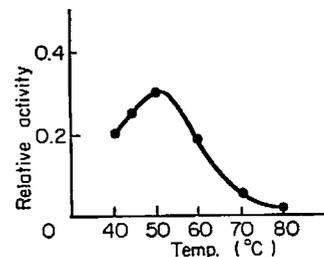


Fig. 6. Effect of temperature on enzymatic activity.

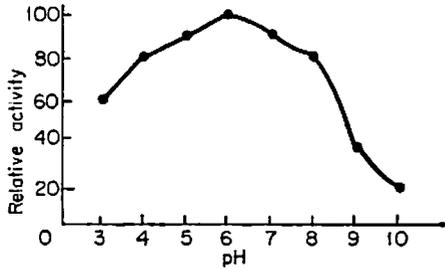


Fig. 7. Effect of pH on stability of enzymatic activities.

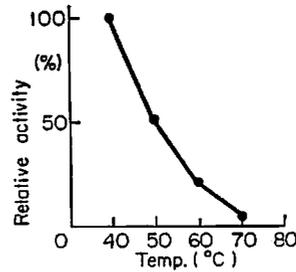


Fig. 8. Heat stability of enzymatic activities.

に作用させた。

c) 最適温度 最適 pH での反応温度の影響は Fig. 6 のごとくで最適温度は 50°C であった。

d) 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 1/10M buffer 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. 7 のごとくである。

PMase は pH 6.0 付近でもっとも安定であると考えられる。

e) 熱安定性 PMase C を最適 pH の 0.2M buffer 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 Fig. 8 のごとくである。

PMase は 70°C でほとんど失活した。

f) 金属イオンおよびキレート剤の影響 PMase 活性に及ぼす金属イオン または キレート剤の影響をしらべると Table 2 のごとくである。

促進剤となるものはあまり見当たらないが阻害剤としては NaF, Na₂HPO₄ が強く阻害し, EDTA, Ca⁺⁺ もわずかながら阻害した。

Table 2. Effect metal ions on some enzyme activity.

	Concentration	PMase (%)
Control		100
MgCl ₂	6×10 ⁻² M	98.0
"	6×10 ⁻³ M	103.0
CaCl ₂	"	70.1
"	"	105.0
KCl	"	92.0
"	"	101.2
NaF	"	17.2
"	"	22.2
Na ₂ HPO ₄	"	64.2
"	"	85.2
EDTA	"	63.5
"	"	114.2

3. ヌクレオチドおよびその誘導体に対する PMase C 画分の作用

PMase 活性のある画分は 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. 9 に示す方法で作用さ

ATP (20mg/20ml)	5.0ml
—PMase fraction	5.0ml
—1M buffer (pH5.0)	1.0ml
—incubation, 37°C, 1hr	
—HClO ₄ treatment	
—active carbon treatment	
Sample for chromatography	

Fig. 9. Degradation of ATP

せた結果 Fig. 10 のごとく、あらかじめ反応系に基質として加えた標品の ATP は分解されて ADP, 5'-AMP, 5'-IMP, アデノシン, イノシン, ヒポキサンチンが生成された。また, 5'-AMP に対して作用させた結果は Fig 11 のごとくである。5'-AMP を分解して対応する塩基およびヌクレオチドを生成するが一方 5'-IMP も生成した。すなわち, この画分には 5'-AMP を脱アミノする作用がみとめられた。

考 察

クルマエビにおいては前報¹⁾のアスパラガス, シイタケに見出された RNase, PDase は見だされなかったが PMase 画分は前報¹⁾までに報告した マツシュルーム, シイタケ, スイートコーン, アスパラガスの PMase と異なり 5'-AMP をデアミネーションする活性を持っている。すでに戸田⁹⁾は魚肉中のフォスファターゼの性質について報告しシログチ, ニベ, キグチではアルカリ性側にピークを持つフォスファターゼを有し, また, シバエビ, タコ, イカについては酸性側にピークを持っていることを報告しているが本報のクルマエビでは後者に類似していると思われる。

これらの結果からクルマエビにおけるヌクレオチドの蓄積について考察すると水産食品の煮出し(温水抽出 pH 6)と近似の条件では斎藤*が報告しているように ATP→ADP→5'-AMP→5'-IMP→イノシン→アデノシンになる過程において各段階における基質に対する酵素反応速度が異なるために 5'-ヌクレオチドとして蓄積するのに都合のよい状態になるのではないかと考えられる。pH が酸性の場合またアルカリ性の場合も同様なことが nucleoside polyphosphate の分解によって行なわれると考える。シイタケ, スイートコーンと異なり RNA からの分解は認められなかった。島菌⁹⁾の提案による食品中の 5'-ヌクレオチド分布型式では meat type を示し IMP を蓄積する型と言えよう。またこのような酵素のそれぞれの基質に対する反応速度の遅速によってクルマエビの旨味成分の生成の程度が異なることも当然起こり得ると考えられる。

要 約

クルマエビ可食部の核酸分解酵素系を Sephadex, DEAE-セルロースを用いて分離精製しそれらの一般的な性質をしらべた。PMase 活性の画分 1 個が認められ, それぞれの酵素作用の最適条件は pH 4~5, 温度 50°C であった。

* 新井: 日本水産学会秋季大会シンポジウム (1965)。

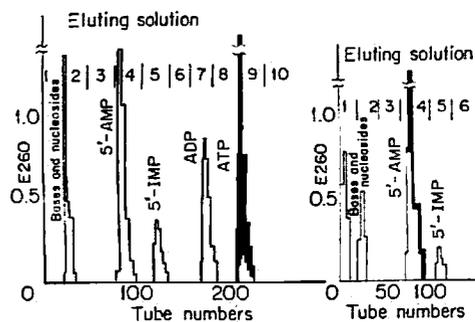


Fig. 10. Incubation of kurumaebi PMase fraction with authentic ATP.

Fig. 11. Incubation of kurumaebi PMase fraction with authentic 5'-AMP.

■ before incubation
□ after incubation

■ before incubation
□ after incubation

これらの結果からクルマエビの温水抽出（煮出し）における 5'-ヌクレオチドの消長が説明されるものと考えられよう。

文 献

- 1) 毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 44, 239 (1966).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 44, 925 (1966).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 45, 151 (1967).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 45, 254 (1967).
- 2) 斎藤：化学, 15, 101 (1961).
- 3) 山本・遠藤・門脇・岸田：家政学雑誌, 16, 263 (1965).
山本・遠藤・門脇・岸田：家政学雑誌, 16, 262 (1965).
- 4) 富山・小林・北原・白石・大庭：日水誌, 32, 262 (1966).
- 5) 中島・市川・鎌田・藤田：農化, 37, 558 (1961).
- 6) Folin, O, Ciocalteu, V. : *J. Biol. Chem.*, 73, 629 (1957).
- 7) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : *J Biol. Chem.*, 81, 629 (1929).
- 8) 戸田・中谷・石井・藤田：栄養と食糧, 18, 60 (1965).
- 9) 島蘭： *Amino Acid and Nucleic acid.*, 10, 179 (1964).
Food Technol., 18, 36 (1964).