

食品の核酸成分に関する研究*

(第18報) スイートコーンの核酸分解酵素系

毛利 威徳・橋 田 度・志賀 岩雄

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Food Stuffs

(XVIII) Nucleic Acid Degrading Enzyme of Sweet Corn

Takenori Mouri, Wataru Hashida and Iwao Shiga

Ribonuclease (RNase), Phosphodiesterase (PDase), and Phosphomonoesterase (PMase) active fractions were isolated from edible portion of Sweet Corn and purified by the DEAE-Cellulose column technique.

Their properties were examined by general methods. RNase from Sweet Corn had an optimum temperature of 60°C and a pH range of 5.0. The ranges of optimum temperature and of PDase and PMase were 60°C and pH 4.5~5.0, and pH 4.5~5.0 and 40°C~45°C respectively.

Four kinds of 5'-nucleotides, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP and 5'-UMP were accumulated at pH 5.0 with the digestion of yeast RNA by Sweet Corn RNase. The PMase decomposed ATP, 5'-AMP, and 3'-AMP was decomposed more rapidly than 5'-AMP.

The acid range of enzyme activities of Sweet Corn was different from than of Shii-take and Mushroom.

緒 言

前報¹⁾においてアスパラガスの核酸分解酵素系について報告したスイートコーンの可食部は種子であり植物体の部分としてのきのこ類、アスパラガスの可食部とは異なった役割りをしている。また特徴あるヌクレオチド組成と核酸分解酵素をもっているのではないかと考えられる。既にスイートコーンの発芽時の幼芽、幼根の RNase 活性については C. M. Wilson²⁾ 氏の報告があるが本報では加工用に成熟した種子を対称とし、その他の分解酵素系を含めて磨碎抽出液より DEAE-cellulose 分画した酵素系の活性を検討し、核酸成分の分布と変化の原因について考察した。

実 験 方 法

(1) 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。

(2) 試料調整方法

スイートコーン (東洋食品研究所栽培) の可食部を5培量の蒸留水と共にホモジナイズし、5°C

* 醸酵工学誌所載

で4時間抽出し、木綿でろ過したろ液を粗酵素液とした。硫酸分画により10~40%飽和でRNase活性を40~100%飽和にてPMase, PDase活性を分画した。

(3) 分析方法

総5', 3'-ヌクレオチドは中島³⁾らの酵素法に依った。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Folein-ciocaltu⁴⁾の呈色法または280m μ の吸収によって定量した。

(4) 核酸分解酵素活性の測定

須原, 大村⁵⁾らの報告に準じてRNase, PDase, PMase, DNase活性を測定したが詳細な条件は前報¹⁾記載のごとくである。

実 験 結 果

1. DEAE-cellulose による酵素系の分画

スイートコーン粗酵素液2.5 ℓ に硫酸アンモニウムを10~40%飽和でRNase活性, 次に40~100%飽和でPMase活性を18,500rpmで遠心分離し生じた沈澱を0.01M acetate buffer (pH 6.0)に溶解し, その上澄液を5°Cで一晩0.01M acetate buffer (pH 6.0)溶液中で透析した。透析内液(蛋白質量として300mg)をDEAE-cellulose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。そのクロマトグラフィはFig. 1, Fig. 2のごとくである。

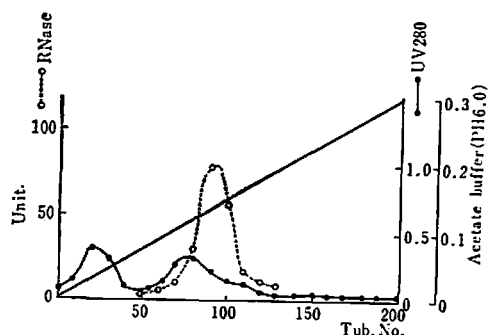


Fig. 1. Chromatogram of RNase A fraction from sweet corn on DEAE-cellulose column

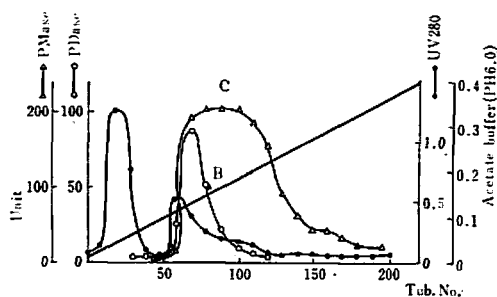


Fig. 2. Chromatogram of extract from sweet corn on DEAE-cellulose column.

Fig. 1はRNase, Fig. 2はPDase, PMaseで共にpH 5.0で測定した。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については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。既にその部分を硫酸塩析した後, 沈澱物を集め前報¹⁾にしたがってDEAE-celluloseに吸着後, 0.01M~0.2Mまでgradient elutionした。そのクロマトグラフィはFig. 3のごとくである。

PDase, PMase活性のある画分BとCの部分を硫酸塩析しその沈澱物を集め, DEAE-cellulose

で 0.01M~0.4M まで gradient に分離した結果は Fig. 4 のごとくである。

PDase, PMase 両活性部分の流出位置は互にまったく一致した。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 トリスマミノメタン buffer (pH 8.0) に対して透析し DEAE-cellulose に吸着させ 0 から 0.4M までの食塩溶液で, gradient に溶出した結果は Fig. 5 のごとくである。

しかし PDase 活性も認められ分離することはできなかった。なお 5'-AMP を基質とし従来 PMase 測定の基質として PNPP と並行に pH 5.0 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画分は PNPP を基質とする PMase と全く一致した。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 RNase, PDase, PMase の活性及び比活性の消長は Table 1 のごとくである。

RNase は約 50倍, PDase は 5 倍, PMase は 300倍程度に濃縮された。

2. 分画された酵素の諸性質

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調べた。

(a) 最適 pH 酵母 RNA を基質にしてピーク A (RNase活性) の最適 pH は Fig. 6 のごとく pH 5.0 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 pH 4.5 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 4.5 であった。

(b) RNase, PDase, PMase について酵素液量と活性との関係を調べると Fig. 9 のごとくであ

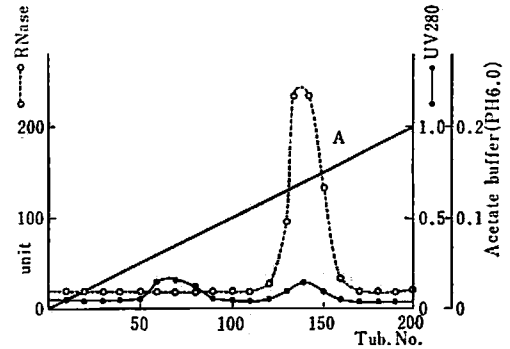


Fig. 3. Chromatogram of RNase A fraction from sweet corn on DEAE-cellulose column.

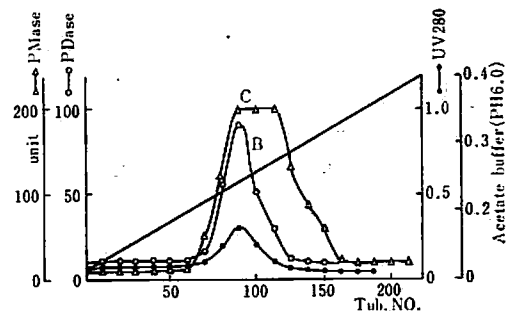


Fig. 4. Rechromatography of RMase C fraction from sweet corn on DEAE-cellulose column.

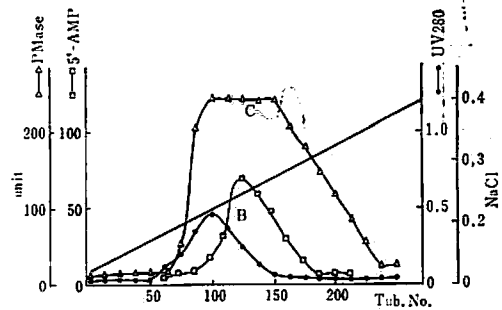


Fig. 5. Rechromatography of PMase C fraction from sweet corn on DEAE-cellulose column.

Table 1. Purification of RNase, PDase, PMase of Sweet Corn.

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	42,200	1,036	40.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	27,434	264	103.9
DEAE-Cellose 1	19,845	62	320.0
DEAE-Cellose 2	11,280	6	1880.0

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	123,200	1,036	118.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	37,583	264	142.3
DEAE-Cellose 1	9,954	71	140.1
DEAE-Cellose 2	1,848	5	330.0
DEAE-Cellose 3	734	1	582.0

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	282,800	1,036	272.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	122,720	264	464.8
DEAE-Cellose 1	65,625	71	925.7
DEAE-Cellose 2	29,160	5	5,207.1
DEAE-Cellose 3	12,000	1.2	9,523.8

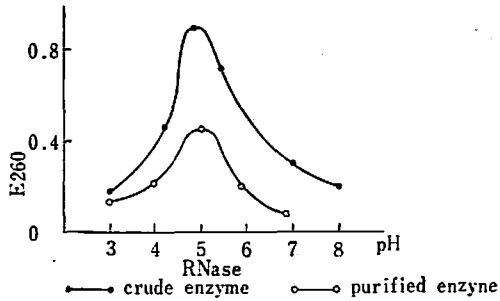


Fig. 6. Effect of pH on RNase activity.

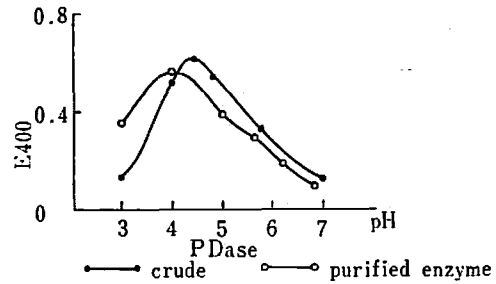


Fig. 7. Effect of pH on PDase activity.

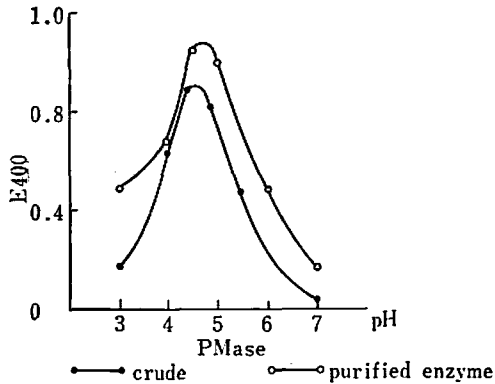


Fig. 8. Effect of pH on PMase activity.

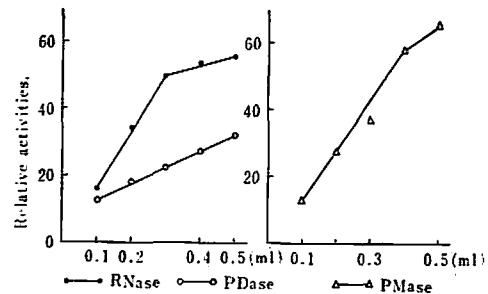


Fig. 9. Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solutions.

る。

RNase, PDase, PMase 4~8 unit の範囲の活性になる様に酵素液を稀釈して基質に作用させた。

(c) 最適温度

RNase, PDase, PMase のそれぞれの最適 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 60°C, PDase で 60°C, PMase で 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 M/10 緩衝液中に 25°C で 18 時間保持した場合の酵素活性の安定性について

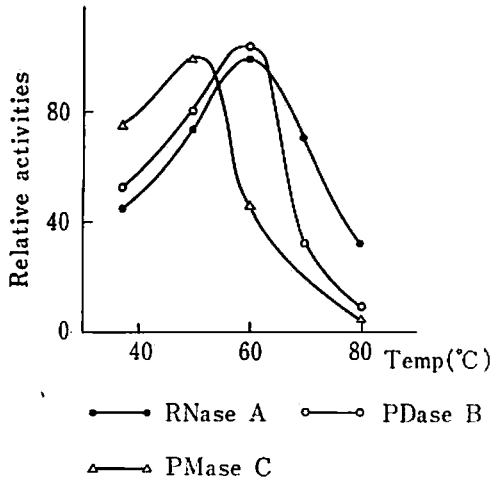


Fig. 10. Effect of temperature on enzymatic activity.

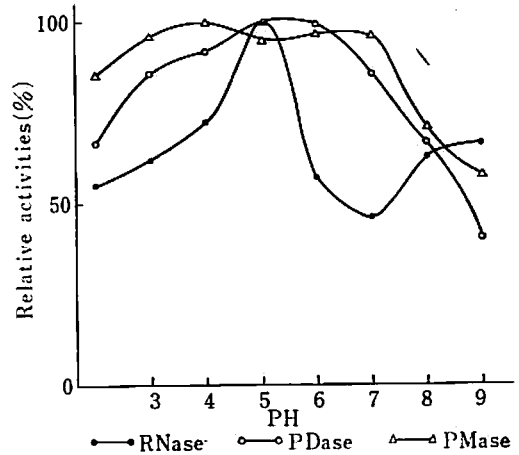


Fig. 11. Effect of pH on stabilities of enzymatic activities (25°C, 18hrs).

検討した結果は Fig. 11 のごとくである。

RNase で pH 5.0 付近, また PDase, PMase は中性付近が安定であると考えられる。

(e) 熱安定性 各酵素液をそれぞれの最適 pH の 0.2M 緩衝液で稀釈し, 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 は100°Cで10%残存し PDase は80°Cで PMase は60°Cで殆んど失活した。

(f) 金属イオン及び阻害剤の影響 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

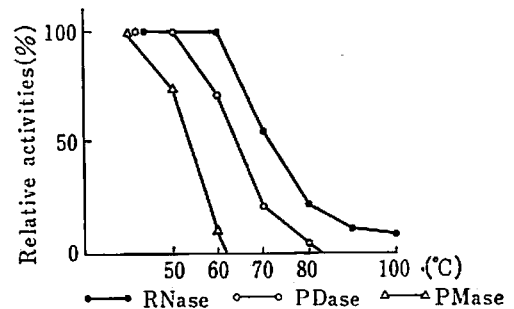


Fig. 12. Heat stability of enzymatic activities.

Table 2. Effects of metal ions on some enzyme activities.

		RNase A	PDase B	PMase C
Control		100	100	100
MgCl ₂	1×10 ⁻³	91	105	93
	1×10 ⁻²	89	72	108
CaCl ₂	"	91	98	97
	"	96	92	99
CuSO ₄	"	49	87	93
	"	49	54	67
CoSO ₄	"	103	—	—
	"	70	—	—
MnSO ₄	"	98	—	—
	"	91	—	—
ZnSO ₄	"	69	96	79
	"	43	55	56
KCl	"	85	85	97
	"	81	72	99

— : Not examined

Table 3. Effects of anions, and chelating agents on some enzyme activities.

		RNase A	PDase B	PMase C
Control		100	100	100
NaF	1×10 ⁻³	109	66	63
	1×10 ⁻²	81	47	35
Na ₂ HPO ₄	"	92	88	76
	"	92	28	44
EDTA	"	95	71	104
	"	83	68	108
Na-citrate	"	102	57	103
	"	90	47	90

試薬の影響をしらべると Table 2, 3のごとくである。

RNase は Cu^{++} , Zn^{++} により阻害された。PDase は Cu^{++} , Zn^{++} により阻害され、またキレート剤では Na_2HPO_4 , Na-citrate により阻害された。PMase は Zn^{++} により阻害され、キレート剤では Na_2HPO_4 により阻害された。

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成物をしらべた。ピーク A の濃縮部分を酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で Fig. 13 の如く反応させると酵母 RNA の分解率は 20% であった。

Fig. 14 に示すように 5 種類のヌクレオチドを生成することが認められた。

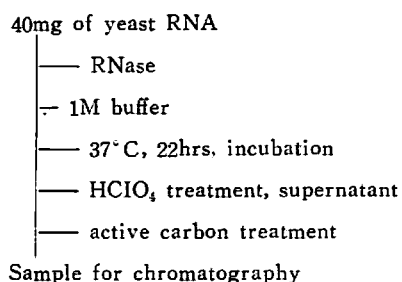


Fig. 13. Digestion of RNA

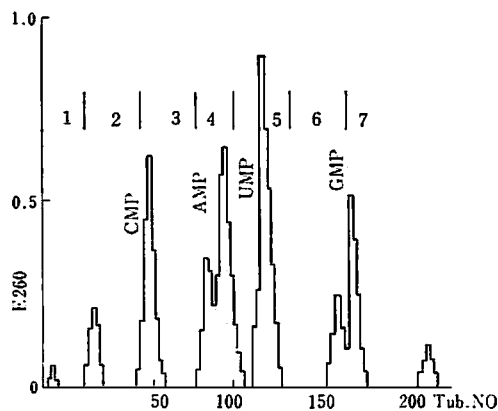


Fig. 14. Formation of nucleotides by degradation of yeast RNA with fraction A.

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

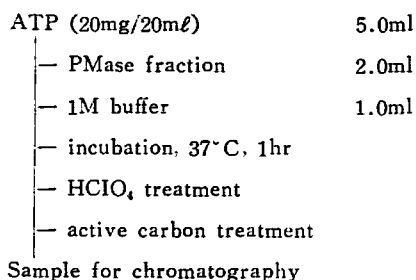


Fig. 15. Degradation of ATP

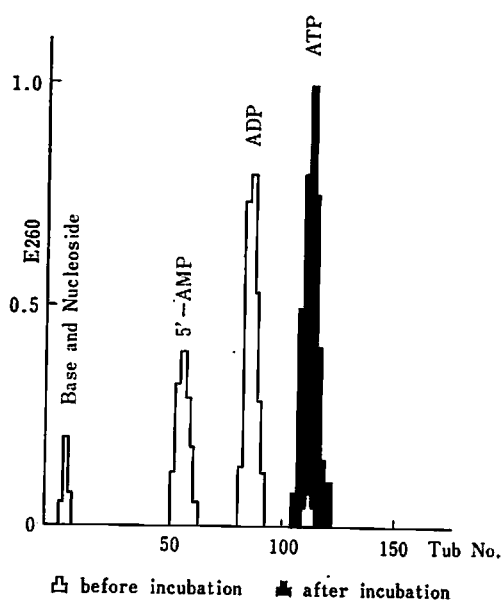


Fig. 16. Incubation of corn RMase C fraction with authentic ATP

ノシンが生成された。また 5'-AMP, 3'-AMP に作用させた場合それらの比活性を示すと Table 4 ごとくである。

アスパラガスと同様 3'-ヌクレオチドに対する活性の方が約3倍程度強かった。

Table 4. Activites of PMase C fraction to 5'-AMP or 3'-AMP

		Unit	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Sweet Corn	5'-AMP	23.0	0.13	176
	3'-AMP	61.0	0.13	469

考 察

スイートコーン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 活性の各区分とはわけることができた。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測 RNase または 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 C. M. Wilson²⁾らのスイートコーン発芽時の幼芽の RNase A画分 RNase B画分と比較したところ KCl の促進作用の点から RNase B画分に良く似ていた。

PMase, PDase 画分は RNase とは分離されたが PDase と PMase 画分は CM-cellulose, Sephadex G-100 によっても互に分離することができなかったがシイタケ、マッシュルームと異なり同一の蛋白でないと思われる。

スイートコーンの RNase 画分の RNA に対する作用は endnclease で 5'-ヌクレオチドが生成されるのか、オリゴヌクレオチドに一旦分解され PDase 活性の作用により 5'-ヌクレオチドが生ずるものと考えられるが、今後くわしく検討したい。また、PDase, PMase 画分には 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。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前報¹⁾でのシイタケ、マッシュルームには見出されていない特徴である。このような酵素系によって食品の旨成分が少しでも醸成されることも考えて良いのではないかと思う。

要 約

スイートコーン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 画分1個, PDase 画分1個, PMase 画分1個が認められた。スイートコーン酵素作用の最適条件は RNase (画分A) で pH 4.8~5.0, 最適温度 60°C, PDase では pH 4.0~4.5最適温度 60°C, PMase では pH 4.5~4.8, 最適温度 50°C であった。

この結果からスイートコーンの温水抽出(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。

文 献

- 1) 橋田・毛利・志賀・寺本：醸酵工誌, 41, 420 (1963).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 46, 132 (1968).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 44, 248 (1966).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 44, 925 (1966).
- 2) C. M. Wilson : *Biochim Biophysica acta* 68, 177 (1963), 76, 324 (1963).
- 3) 中島・市川・鎌田・藤田：日本農芸化学誌, 37, 558 (1963).
- 4) Colowick, S, P, Kaplan, NO : *Method in Enzymology*, II, 427, 519 (1955).
- 5) 須原・草葉・大村：酵素化学シンポジウム第16号, 115 (1964).