

食品の核酸成分に関する研究*

(第19報) マツタケの核酸分解酵素系

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄

Studies on Nucleic Acid Related Substances

(XIX) Nucleic acid Degrading Enzyme of Matsu-take

(*Tricholoma matsutake*)

Takenori Mouri, Wataru Hashida and Iwao Shiga

Enzyme fractions decomposing nucleic acid and related substances were isolated from the fruiting body of Matsu-take (*Tricholoma matsutake*), 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. Ribonuclease (RNase) from 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°C~45°C and pH 4.5~4.8, respectively.

Yeast RNA was degraded by each RNase fraction of matsutake 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 acid range-enzyme activities of fruiting bodies is different from that of shii-take, and common mushroom.

緒 言

前報¹⁾においてシイタケ、マッシュルームの核酸分解酵素系と核酸成分の分布について報告した。マツタケについては臭いを主体としたきのこことされている。著者らは前報までにマツタケにおいても5'-GMP等RNAを構成する4種のヌクレオチドが、遊離の状態が存在し、また生成される。こ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。

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調べた。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。

* 日本食品工学誌所載

実験の部

1. 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。

2. マツタケ (*Tricholoma matsutake*)

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、木綿にてろ過し、そのろ液を粗酵素液とした。

3. 分析方法

総 5', 3'-ヌクレオチドは中島²⁾らの酵素法に依った。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 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⁴⁾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

粗酵素液 2.5 l に硫酸アンモンを飽和になるまで加え、18,500G 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 で一夜 0.01M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析した。透析内液 (蛋白量として 300mg) を DEAE-cellulose カラム (3×25cm) に吸着させ、acetate buffer で 0.01M より 0.5M まで gradient elution を行った。そのクロマトグラフィは Fig. 1のごとくである。

RNase 活性及び PDase 活性は pH 7.0 で、PMase 活性は pH 5.0 で測定した。流出位置は

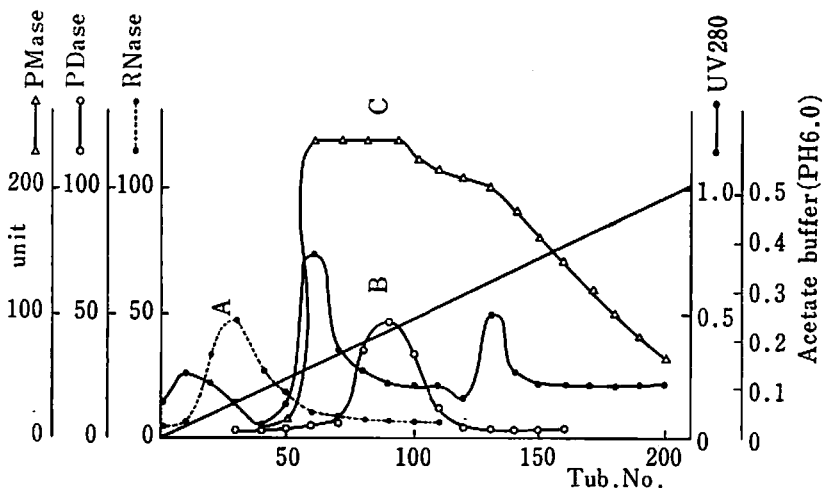


Fig. 1. Chromatography of the extract from matutake on DEAE-cellulose column.

RNaseが初めに溶出され、PDase, PMase活性が続いて同時に溶出された。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B, C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った。すなわち、その部分を減圧濃縮した後、0.01M acetate buffer (pH 6.0) に対して透折しその内液を DEAE-cellulose カラムに吸着した後 0.01M より 0.2M まで、gradient elution した。そのクロマトグラフィは Fig. 2 のごとくである。

この操作の後にも、Sephadex G-100 または CM-cellulose によるクロマトグラフィでも PMase と PDase 両活性部分の流出位置はまったく一致した。

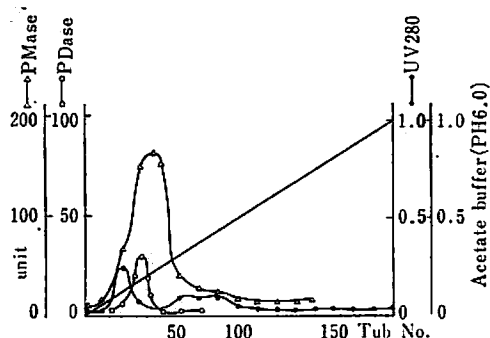


Fig. 2. Rechromatography of PMase Cfraction from matutake on DEAE-cellulose column.

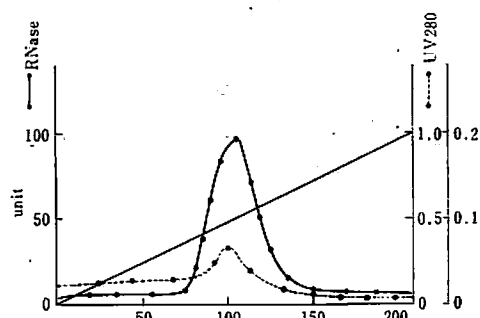


Fig. 3. Rechromatography of RNase A fraction from Matsutake on DEAE-cellulose column.

ピークAについても再クロマトグラフィを行なった結果は、

Fig. 3 のごとくである。

その部分を減圧濃縮した後、0.01M acetate Buffer (pH 6.0) より 0.1M まで gradient elution した。その結果、一つのピークを示した。

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 の活性および比活性の消長は Table 1~3 のごとくである。

これらの処理によって RNase は10倍、PDase は20倍、PMase は30倍程度に濃縮された。

Table 1. Purification of RNase of Matsu-take.

| Purification step | RNase (units) | Protein (mg) | Specific activity (units/mg protein) |
|---|---------------|--------------|--------------------------------------|
| Matsu-take Filtrate of extract | 44,000 | 1,949.7 | 22.5 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out | 9,065 | 87.2 | 104.0 |
| DEAE-Cellulose | 1,104 | 3.3 | 341.7 |

Table 2. Purification of PDase of Matsu-take.

| Purification step | PDase (units) | Protein (mg) | Specific activity (units/mg protein) |
|---|---------------|--------------|--------------------------------------|
| Matsu-take Filtrate of extract | 25,300 | 1,949.7 | 12.9 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out | 3,700 | 87.2 | 42.4 |
| DEAE-Cellulose | 982.8 | 3.6 | 270.0 |

Table 3. Purification of PMase of Matsu-take.

| Purification step | PMase (units) | Protein (mg) | Specific activity (units/mg protein) |
|---|---------------|--------------|--------------------------------------|
| Matsu-take Filtrate of extract | 451,000 | 1,949 | 231.3 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out | 231,250 | 87.2 | 2,654.9 |
| DEAE-Cellulose | 37,500 | 5.7 | 6,567.4 |

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は濃縮したのち蒸留水に対して24時間透析を行った。その内液を酵素液としてその性質をしらべた。

(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. 4 のごとく 7.0~7.5 であった。

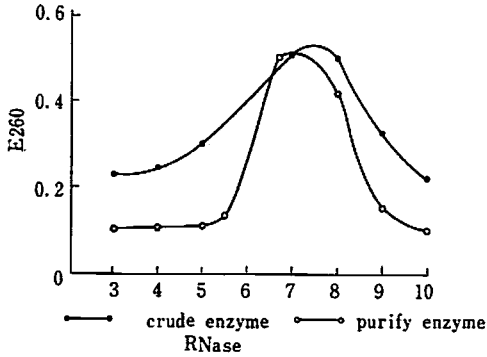


Fig. 4. Effect of pH on RNase activity.

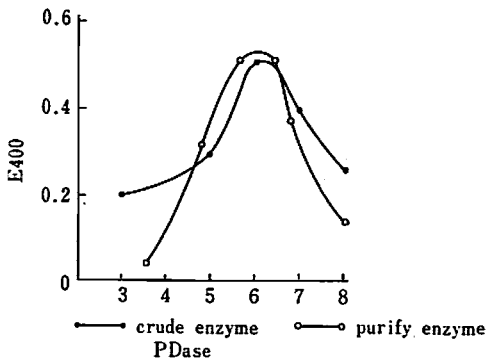


Fig. 5. Effect of pH on PDase activity.

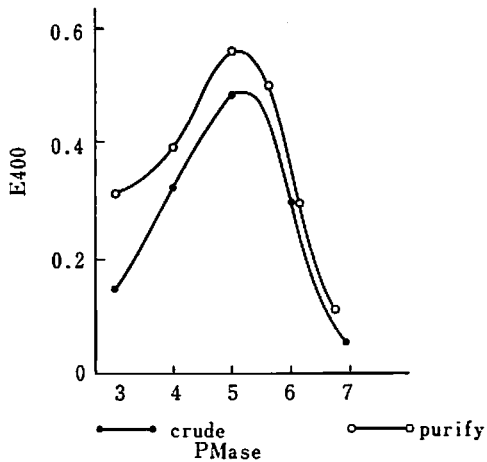


Fig. 6. Effect of pH on PMase activity.

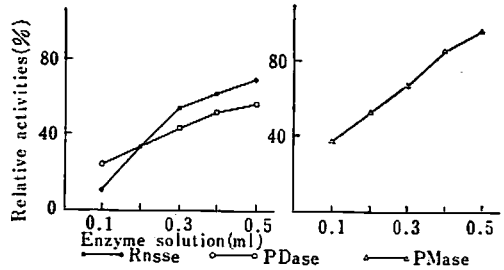


Fig. 7. Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solution.

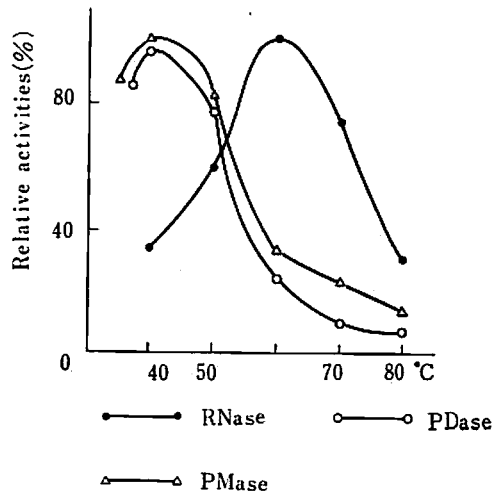


Fig. 8. Effect of temperature on enzymatic activity.

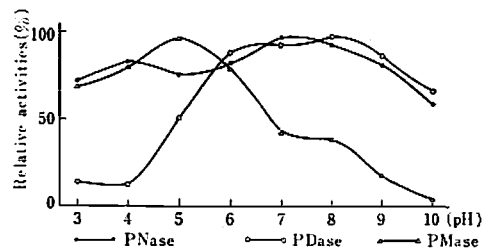


Fig. 9. Effect of pH on stabilities of enzymatic activities (25°C, 18hrs).

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 の最適 pH は Fig. 5 のごとく 6.0~6.5 であった。

PNPP を基質にしてピーク C の最適 pH は Fig. 6 のごとく 4.5~4.7 であった。

(b) 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間係をしらべると Fig. 7 のごとくである。

RNase は 0.1ml~0.3ml, PDase および PMase は共に 0.1ml~0.4ml 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その直線範囲内で酵素液を希釈して測定した。

(c) 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. 8 のごとく最適温度は RNase で 60°C, PDase および PMase は共に 40°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 3.0~pH 10.0 の範囲の 1/10M 緩衝液に 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検討した結果は Fig. 9 のごとくである。

RNase 活性は pH 3.0~pH 10.0 まで殆ど安定であった。PDase は pH 3.0~pH 4.0 付近では不安定で pH 5.0~pH 8.0 で安定であり pH 10.0 では不安定であった。PMase は pH 5.0 で安定で pH 10.0 では不安定であった。

(e) 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 15 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。その結果は Fig. 10 のごとくである。

RNase は高温においても比較的安定で 60°C において約 50%, 100°C においては約 20~30% 活性が残存していたが PDase は 70°C で PMase

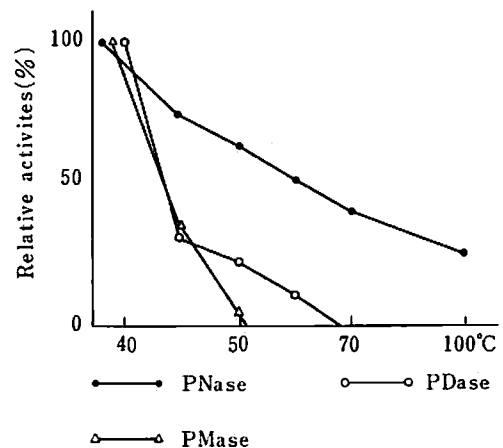


Fig. 10. Heat stability of enzymatic activities.

Table 4. Effects of metal ions on some enzyme activities.

| | | RNase A | PDase B | PMase C |
|-------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| Control | | 100 | 100 | 100 |
| MgCl ₂ | 1×10 ⁻³ | 97 | 96 | 110 |
| | 1×10 ⁻² | 104 | 76 | 100 |
| CaCl ₂ | 87 | 87 | 98 | |
| | 103 | 70 | 99 | |
| CoSO ₄ | 71 | — | — | |
| | 81 | 69 | — | |
| CuSO ₄ | 50 | 31 | 55 | |
| | 78 | 66 | 58 | |
| ZnSO ₄ | 98 | 80 | 80 | |
| | 86 | 57 | 85 | |
| MnSO ₄ | — | — | — | |
| | 103 | — | — | |

—: The experiment was not done.

Table 5. 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 | 44 | 12 |
| | 1×10 ⁻² | 88 | 65 | 20 |
| Na ₂ HPO ₄ | 75 | 65 | 98 | |
| | 100 | 65 | 100 | |
| EDTA | 57 | 27 | 89 | |
| | 89 | 35 | 98 | |
| Na-citrate | 75 | 100 | 115 | |
| | 91 | 91 | 100 | |

は 50°C で殆ど失活した。

(f) 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。RNase は Co^{++} , Cu^{++} に阻害されキレート剤では EDTA によって阻害された。PDase は Cu^{++} , Co^{++} , NaF , Na_2HPO_4 , キレート剤では EDTA によって阻害をうけた。PMase では Cu^{++} , NaF が阻害した。

3. 酵母 RNA の酵素分解による 5'-ヌクレオチドの生成

前述のごとくマツタケ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、その分解生成物を調べた。

ピーク A の濃縮部分を 0.2M Tris buffer (pH 7.5) の中で Fig. 11 のごとく反応させたがこの場合、RNA の分解率は約 40% であった。

Fig. 12 に示す様に酵母 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とが認められた。

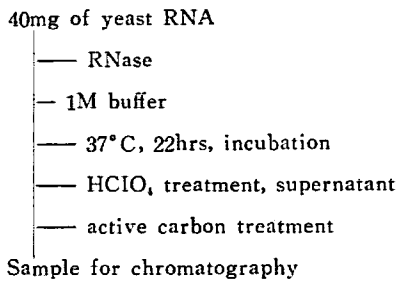


Fig. 11. Digestion of RNA

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

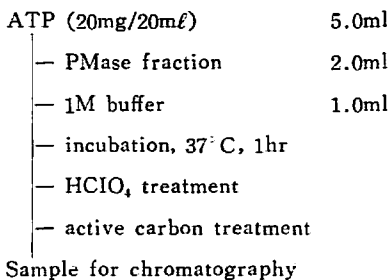


Fig. 13. Degradation of ATP

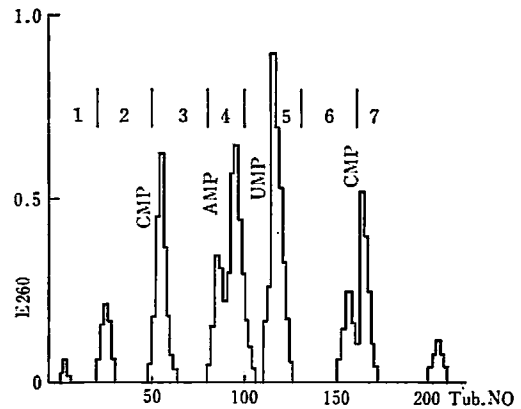


Fig. 12. Formation of nucleotides by degradation of yeast RNA with fraction A.

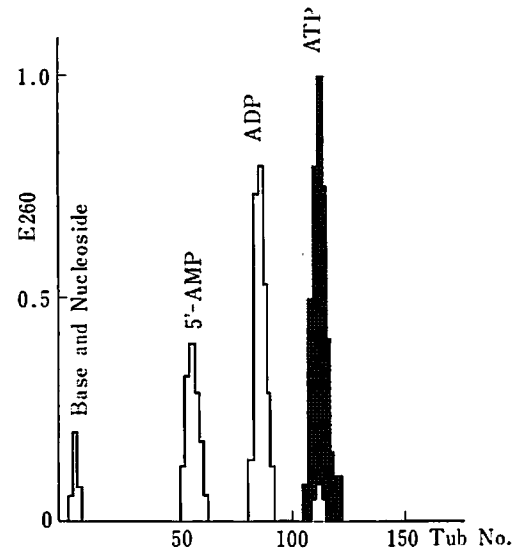


Fig. 14. Incubation of corn PMase C fraction with authentic ATP

ち ATP に対して Fig. 13 に示す方法で作用させた結果 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。

考 察

マツタケの酵素活性画分のマツタケ A は RNA を分解するが BPNPP は分解しなかった。しかし RNase 画分と PDase, PMase 画分とは分離することができた。しかし PDase 画分と PMase 画分とは CM cellulose, Sephadex G-100, Amberlite CG-50 によっても分離されなかった。

マツタケ A 画分はマッシュルーム A, シイタケ A-3 画分と良く似た性質を示した。最適 pH 7.0, 最適温度 60°C とほぼ一致し、また BPNPP は分解しなかった。これらの RNase 画分は塩基特異性の低い一種の exonuclease が一旦、オリゴヌクレオチドを作り PDase によってヌクレオチドにまで分解するのかについて今後検討しなくてはならないと考える。

これらの結果より、マツタケ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 RNA の分解は少なく Nucleoside polyphosphate からの分解があるのみであるがヌクレオチダーゼがもっとも強いためにヌクレオチドとしては蓄積されない。pH 6.0 で 50°C~70°C に温めると食品の煮出し操作近似の条件となり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うけずに蓄積することが考えられる。マツタケは pH 7.0 にピークをもつ 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。また弱アルカリ側ではヌクレオチダーゼ活性がほとんどみ出されず、一方 RNase 活性はかなり強いので 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。

要 約

DEAE-cellulose を用いてマツタケの核酸分解酵素系を分離精製した。RNase 活性をもつピーク 1 個, PDase 活性をもつピーク 1 個, PMase 活性をもつピーク 1 個を認めた。

最適温度では RNase 活性が高く PDase 活性, PMase 活性の順に低くなっている。

最適 pH では RNase 活性は 7.0~7.5 また PDase 活性は pH 6.0~6.5 にみとめられ, PMase 活性は pH 4.5~4.7 の間に最適 pH をもっていた。

この様なことから著者らが前報りに発表したような加熱処理工程における 5'-ヌクレオチドの消長がうらづけられまた呈味成分の 5'-GMP などが蓄積することを説明できると考える。

文 献

- 1) 橋田・毛利・志賀・寺本：醸酵工誌, 42, 434 (1964).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 43, 335 (1965).
毛利・橋田・志賀・寺本：醸酵工誌, 43, 34 (1965).
- 2) 中島・市川・鎌田・藤田：日本農芸化学誌, 37, 558 (1963).
- 3) Colowick, S, P, Kaplan, NO: *Method in Enzymology*, II, 427, 519 (1955).
- 4) 須原・草葉・大村：酵素化学シンポジウム第16号, 115 (1964).