

核酸成分の変化から見た缶詰原料の鮮度—IV

かきの核酸分解酵素系

毛利 威徳・橋田 度・平井 厚子・川崎 陽子

Assesment of Freshness of Marine Products Based on Composition in Nucleic Acid Related Substances in Canned Sea-Food-IV

Nucleic Acid Decomposing Enzyme of Oysters.

Takenori Mori and Wataru Hashida, Astuko Hirai, Yoko Kawaski

To investigate the changes of nucleic acid related compounds in oysters during frozen storage and thawing enzymes responsible decomposition of nucleic acid and the relating substances were isolated and purified by using DEAE-cellulose and DEAE-sephadex column techniques, with the latter phosphomonoesterase was isolated.

Four phosphomonoesterase fractions (A, B, C, D) with the optimal temperature of 40°C and optimal pH range of 4.0 or 10.0 were obtained. Fraction C also contained activity with the optimal temperature of 40°C and optimal pH range of 3.5.

It seems reasonable to consider that frozen storage and thawing of oyster meat brings about the formation of 5'-AMP and 5'-IMP from nucleoside polyphosphate by the actions of PMase and DAase contained in the oyster meat.

1. 緒 言

貝類においては 5'-IMP は存在しないと言われているが前報¹⁾においてかきに 5'-IMP を見出しまたイノシン、ヒポキサンチンも同様に見出している。これらの 5'-IMP, イノシン, ヒポキサンチンの生成は、ほぼ酵素による生成が主体と考えられるので、クルマエビ、マツシユルム等の食品と同様に核酸分解酵素を調べることは貝類でのヌクレオチド消長また鮮度の判定には興味深いものとする。

本報ではかきのむき身の可食部より核酸分解酵素系を抽出し、分離精製後、その酵素学的性質を調べた。尚それらの結果からかきにおける 5'-IMP, イノシン, ヒポキサンチンの分布、また種々の条件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。

2. 実験方法

2・1 供試物質 前報¹⁾に準ずる。

2・2 試料の調製 かきをホモジナイズし、常法により、アセトン粉末を作り、そのアセトン粉

末より5倍量の蒸留水にて5°C 2時間抽出し、補助口剤で濾過し、その濾液を粗酵素液とした

2・3 分析方法 核酸成分の分析は前報¹⁾に準じた。蛋白酵素の分画は、Sephadex G-100によるゲルろ過、DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィーによった。蛋白質はFolin-ciocalteu²⁾の呈色法、または280m μ の吸収によって定量した。

2・4 核酸関連物質分解酵素活性の測定 Deaminase 活性(5'-AMP)はKalkar³⁾の方法、PMase 活性は須原⁴⁾らの方法に依った。

3. 実験結果

3・1 Sephadex, DEAE-cellulose による酵素系の分画 粗酵素液 1.0 l に硫酸アンモンを飽和になるまで加え1,8000G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で一昼夜 0.01M acetate buffer (pH 6.0)で透析した。透析内液(蛋白量として250mg)をSephadex G-100にてゲルろ過を行った。そのクロマトグラムはFig 1である。

溶出液は0.05M acetate bufferにて溶出を行った。PMase 活性はpH 5.0とpH 10にて測定を行った。PMase 活性を有する画分は1個であるが、その中にpH 3.0とpH 11.0にピークを持つことが明らかになった。PMase 活性の画分を画分Oと仮に命名した。画分Oについて相互の分離と精製を目的に再クロマトグラ

フィーを行った。またPMase 活性を有する画分Oには、Deaminase 活性を存在することを認めた。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-cellulose に吸着した後0.01M acetate buffer で食塩濃度0.015M から0.3M まで

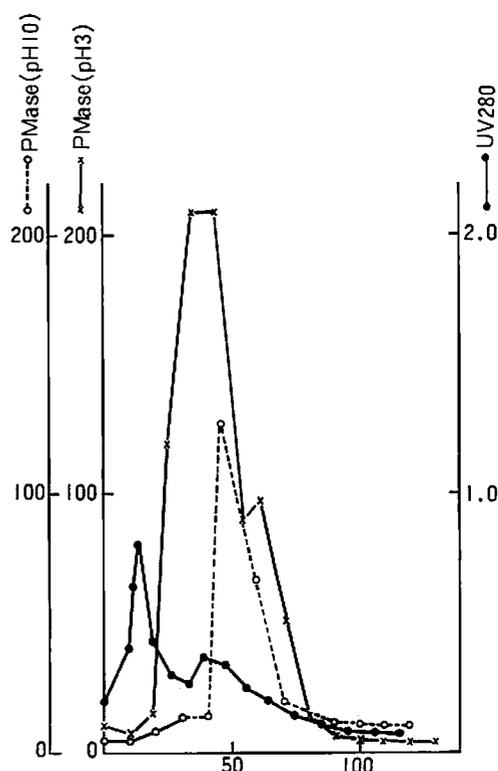


Fig 1 Chromatography of the extract from oyster on Sephadex column (Solvent : 0.01 M acetate buffer)

Table 1 Purification of PMase of oysters.

		PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	1	27,500	290.5	94.6
	2	9,000	290.5	31.0
Ammonium aulfate	1	9,400	58.1	161.7
	2	7,200	58.1	123.9
Sephadex G-100	1	3,600	3.4	1058.8
	2	2,004	3.4	588.2
DEAE-cell	1-a	820	0.5	1040.0
	1-b	1,030	0.5	2000.0
	1-c	650	0.6	1083.3
	2	5,060	0.6	8433.3

Stepwise にて溶出を行った。そのクロマトグラムは Fig 2 のごとくである。

画分Oが DEAE-cellulose カラムにより PMase 活性画分中の pH 3.0 に最適 pH を有する画分が3個また pH 10.0に最適 pH を有する画分1個を見出し、その画分を仮に A, B, C, D とする。上述のごとく粗酵素液を硫酸アンモンで塩析し、Sephadex G-100, DEAE-cellulose で精製した諸経過における PMase の活性, DAase 活性の消長は Table 1 の如くである。

PMase 活性はA画分が約16, B画分が20, C画分が10, D画分が20倍に濃縮された, DAaseは約250倍に濃縮された。

しかし DAase (上記での緩衝液は pH 3.0~7.0までは酢酸緩衝液を、また pH 6.0~10.0まではトリス緩衝液を使用した。) PMase 活性のある A, B, C画分は pH 3.5~4.0に最適 pH を見出した。B画分では、DAase活性を有する画分と PMase 活性を有する画分を分離することは出来なかった。

3・2 分画された酵素系の諸性質 1 最適 pH, 最適温度, 熱安定性について, PNPP と 5'-AMP で PMase 活性の最適 pH, 又 DAase 活性は 5'-AMP を基質として最適 pH を検討した結果 Fig 3, 4, 5 の如くである。また PMase 画分, DAase 画分のそれぞれの最適 pH での最適温度を調べた結果は Fig 6 の如くである。

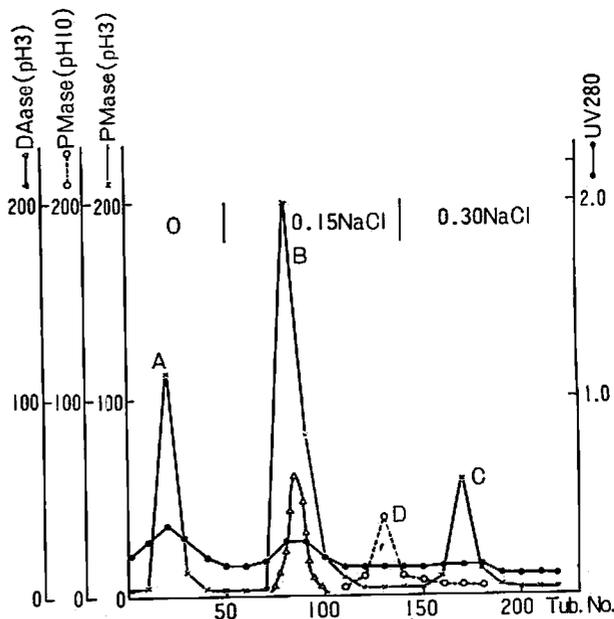


Fig 2 Rechromatography of PMase fraction from Oyster on DEAE-Cellulose column.

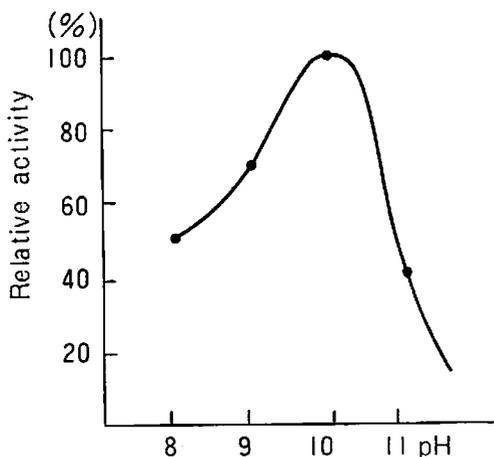


Fig 3 Effect of pH on PMase A, B, C fraction activity.

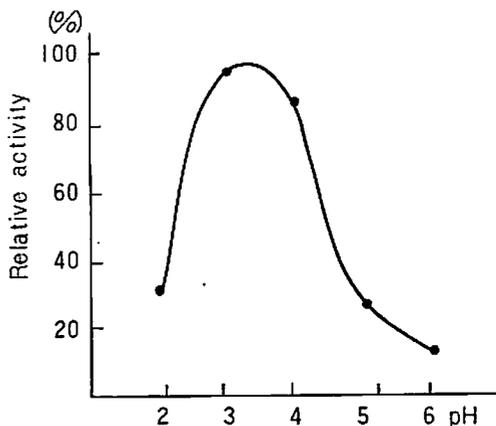


Fig 4 Effect of pH on PMase D fraction activity

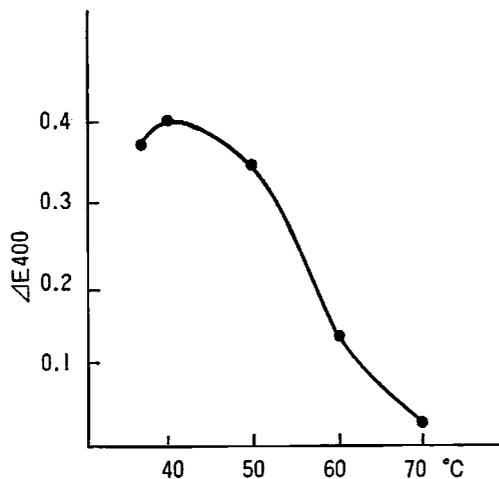


Fig 5 Effect of pH on Deaminase activity.

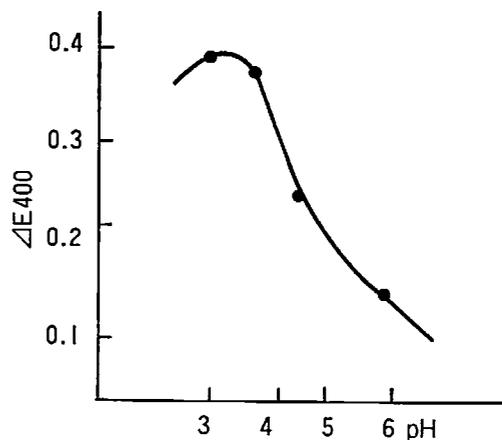


Fig 6 Effect of temperature on enzymatic activities.

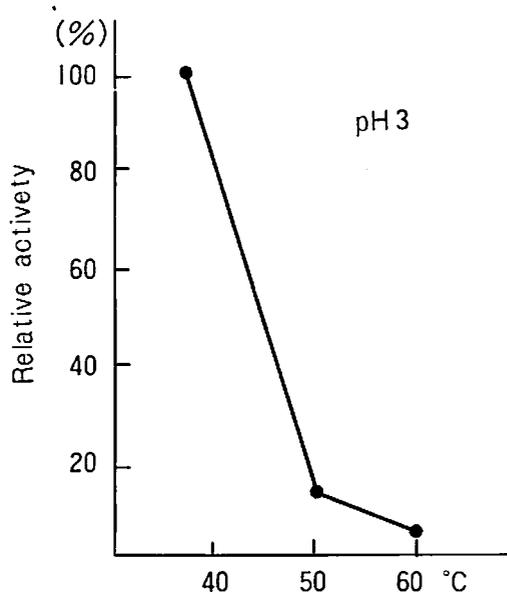


Fig 7 Heat stability of enzymatic activities.

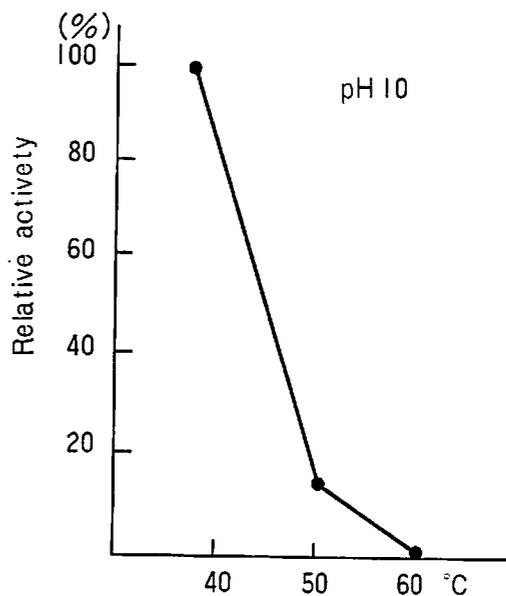


Fig 8 Heat stability of PMase D fraction activities.

また熱安定性は、各酵素液をそれぞれの最適 pH (0.2 M 緩衝液) で希釈し種々の温度で15分間保持した後、急冷し常法によって残存活性を測定した。その結果 Fig 7, 8のごとくである。

またそれらを表にまとめると

Table 2 Effect of pH, Temperature and Heat stability for enzymatic activities.

	PMase		DAase
	A, B, C	D	B
Effect of pH	3.5~4.0	10.0	3.5
Heat stability	50° C 90% lose	50° C 80% lose	50° C 90% lose
Effect of temperature	40° C	40° C	40° C
Effect of metal, Ions.	Mg ⁺⁺ , K ⁺ , Na-citrate accelerate NaF, Na ₂ HPO ₄ prevent		

Table 2のごとくである。

A, B, C画分は3.5に最適 pHを有する。又D画分は pH 10.0に最適 pHを見出した。最適温度もA, B, C, D画分共に 40°C, DAase画分も 40°Cであった。熱安定性においてもA, B, C画分ともに 50°Cで90%失活し、DAase画分も50°Cで90%失活することがわかった。

2 金属イオン及び阻害剤の影響 各画分の活性におよぼす金属イオンおよび阻害剤としての試薬の影響を調べると Fig 9の如くである。

PMase画分は Mg^{++} , K^+ , クエン酸で促進され NaF, Na_2HPO_4 で阻害された。DAase画分は Mg^{++} , Ca^{++} で促進され、NaF, Na_2HPO_4 で阻害した。

3 5'-AMP, アデノシン, アデニンに対する DAase画分の作用 DAase活性のある画分は前述のごとく 5'-AMPを 5'-IMP にデアミネーションするばかりでなく、アデノシン, アデニンにも作用するのではないと思われる

ので pH 3.0 (酢酸緩衝液) pH 6.0, pH 10.0 (トリス緩衝液) の3種で DAaseの作用を検討した結果 Table 3のごとくである。

この様に pH 3.0 でアデノシン 5'-AMP には活性を示したがアデニンについては、デアミネーションされなかった。した

がって 5'-AMP は 5'-IMP にアデノシンはイノシンにデアミネーションされることが明らかになった。またその内でもアデノシンからイノシンになる経路がかなり強いことが明らかになった。

4 5'-AMP, アデノシンからの DAaseによる 5'-IMP, イノシンの生成前述のごとくカキにおいては、DAase活性を有するので、5'-AMP アデノシンに作用させ、その分解生成物を調べた。その作用方法は Fig 10のごとくである。

反応させた 5'-AMP, アデノシンのペーパークロマトグラフィを行った。その結果は Fig 11のご

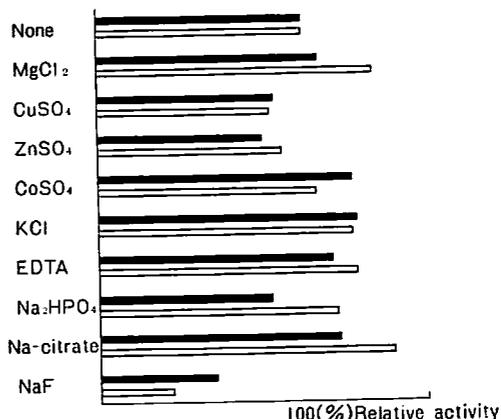


Fig 9 Effect of metal, Ions on some enzymatic activities.

Table 3 Activities of Daminase of oyster.

pH	Sample	DAase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
3.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	660	33.6	19.6
	5'-AMP	160	33.6	14.7
6.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	308	33.6	9.1
	5'-AMP	28	33.6	0.83
10.0	Adenine	—	33.6	—
	Adenosine	—	33.6	—
	5'-AMP	—	33.6	—

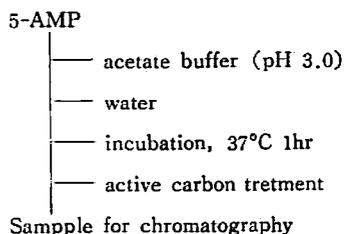


Fig 10 Degradation of 5'-AMP

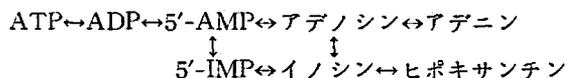
とくである。

Fig 11 に示すごとく粗酵素液の作用によって 5'-AMP からはイノシンが生成され、またアデノシンからはイノシンが生成されたが、アデニンには作用せずアデニンのままで残存していた。

4. 考 察

かきにおいては前報¹⁾ のマツシュルーム、シイタケのごとく、RNase、PDase は見出されなかったが、PMase、

DAase の活性を見出した。PMase 画分は前報¹⁾ のクルマエビに良く似ているがアルカリ性側の画分においてかなり異なっていた。DAase画分の報告は貝類、軟体動物において少ないと思われる。現在までアデノシンをイノシンにデアミネーションすることは、新井⁵⁾ らによってアワビ等で報告されたが、5'-AMP をデアミネーションする酵素作用は見出されていない。



かきにおいて 5'-AMP をデアミネーションし、5'-IMP を生成することを認めた。この様なことより、かきにおける 5'-IMP の生成と分解について裏付けると次のようになると考える。ホスファターゼ活性が強いため 5'-AMP が、5'-IMP に変化してもすぐに分解されてイノシンになること、またアデノシンからイノシンに変る経路が最も強いため、5'-IMP でなくイノシンでかなり蓄積されるものと思われる。また前報の市販品での 5'-IMP の存在しない理由として酵素系より明らかに証明することができた。すなわち店頭での放置時間と温度のためにホスファターゼの作用が大きく、消費者が手にした時は 5'-IMP でなく、すでにイノシンになっていることが明らかになった。

5. 要 約

カキの可食部の PMase と DAase を Sephadex, DAEA-cellulose を用いて分離精製し、それらの一般的な性質を調べた。PMase 活性の画分 4 個、DAase 画分 1 個が認められた。それぞれの酵素作用の最適条件は pH 3.5~4.0、10.0最適温度は共に 40°C であった。これらの結果からカキの 5'-IMP、イノシン、ヒポキサンチンの生成について説明されるものと考えられる。

文 献

- 1) 毛利；日食品工会誌投稿中
- 2) Folin-uocalleu ; J. Biol. chem 73, 629 (1957).
- 3) Kalkar ; J. Biol. chem. 67, 429 445 (1954)
- 4) 須原；酵素化学シンポジウム第16号 115 (1964)
- 5) 新井；昭和40年日本水産学会秋季大会シンポジウム