

食品中の核酸成分に関する研究*—IX

マッシュルーム子実体の核酸分解酵素系

毛利 威 徳 ・ 橋 田 度 ・ 志 賀 岩 雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS-IX NUCLEIC ACID DEGRADING ENZYMES OF MUSHROOM (*PSALLIOTA BISPORUS*)

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

To clarify the formation of 5'-nucleotides in mushroom (*Psalliota bisporus*) during mild heat processing (as covered in Journal of Fermentation Technology 43, 344 (1965)), some enzymes which degrade nucleic acid relating substances were isolated and purified using the DEAE-cellulose column technique.

Ribonuclease fraction (designated as RNase A) had an optimal temperature of 60°C and pH range of 7.5-8.0. There was also a phosphodiesterase activity, with the optimal temperature of 45°C and pH range of 7.5-8.0. Both phosphomonoesterase fractions (C-1 and C-2) had identical optimal temperatures of 40°C and pH ranges of 4.0-5.0. Four kinds of 5'-nucleotides, 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, and 5'-UMP were accumulated with the digestion of yeast RNA at pH 7.5.

The acid range-enzyme activities of mushroom are different from those of Shii-take (*Lentinus edodes*) (Journal of Fermentation Technology 44, 248 (1966)), and the fact may account for the difference of the distribution pattern of 5'-nucleotides between both. It seems reasonable to consider that during the mild heating of mushrooms with water with a pH of around 6.0, 5'-AMP and 5'-UMP are formed from nucleoside polyphosphate by the action of phosphomonoesterase.

* 本研究は大阪大学工学部醱酵工学教室教授寺本四郎先生との協同研究である。ご懇切な御助言、御協力を賜ったことに深謝いたします。

醱酵工学44巻12号P. 925 (1966) 所載

脚注：本報においてはつぎの略号を使用する。

5'-AMP: adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP: cytidine-5'-monophosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP: uridine-5'-monophosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP: inosine-5'-monophosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP: guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

RNA: ribonucleic acid

RNase: ribonuclease

DNA: deoxyribonucleic acid

DNase: deoxyribonuclease

ADP: adenosine diphosphate

PDase: phosphodiesterase

ATP: adenosine triphosphate

PMase: phosphomonoesterase

緒 言

前報¹⁾において生しいたけ可食部（子実体）に含まれる核酸分解酵素系、すなわち RNase, PDase, PMase DNase について検討し、煮出しというような pH 6.0 付近における温水抽出に際しての5'-ヌクレオチドの生成が高分子核酸または nucleoside polyphosphate の分解によることを裏付けた。

生しいたけには5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP, 計4種の5'-ヌクレオチドが一樣に見出されるが、マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) では5'-AMPと5'-UMPが主体で5'-CMPと5'-GMPはほとんど見出せない。しかし、マッシュルームでも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認められる。これらの相違がそれぞれの核酸分解酵素系の相違によるのではないかとの観点から、本報ではマッシュルーム子実体に含まれる核酸分解酵素系を解明するために、マッシュルーム磨砕抽出液をDEAE-celluloseカラムで分離し、それらの活性を調べ、しいたけの場合と比較したので報告する。

実験方法

1. 供試標準物質

前報¹⁾に準じた。

2. 試料調製法

マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) (東洋食品研究所栽培) の可食部を5倍量の蒸留水とともにホモゲナイズし、5°Cで2時間抽出し、木綿で濾過した濾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ーで、蛋白質はFolin-Ciocalteuの呈色法^{3,4)}または280m μ の吸収によって定量した。磷酸定量はFiske-Subbarow法、また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、大村ら⁵⁾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による酵素系の分離

粗酵素液 2.5 ℓ に硫酸アンモンを飽和になるまで加え、18500×G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(蛋白質として300mg)をDEAE-celluloseカラム(3×25cm)に吸着させ、acetate buffer (pH 6.0)で0.01Mより0.5M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。

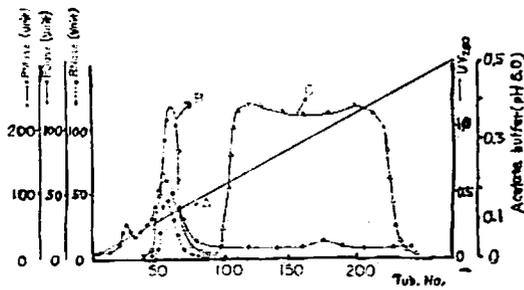


Fig. 1 Chromatogram of the extract from mushroom on DEAE-cellulose column.

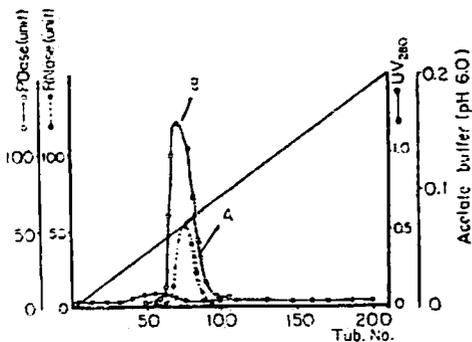


Fig. 2 Rechromatogram of RNase A fraction from mushroom on DEAE-cellulose column.

カラムで 0.01M より 1.0M まで gradient elution で分離した結果は Fig. 3 のごとくである。このままでは 2 個のピークを完全に分離できなかったので、ふたたび濃縮し 0.02M Tris-amino methane buffer (pH 8.0) に対して透析し、その内液をあらかじめ 0.02M Tris buffer で bufferize

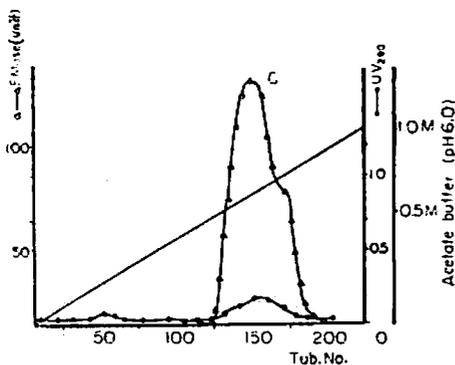


Fig. 3 Rechromatogram of PMase fraction from mushroom on DEAE-cellulose column.

RNase ならびに PDase 活性は共に pH 7.5 で測定したが同様のピークを示し、流出位置も一致した。PMase 活性は pH 4.5 で測定したが、一般的に強い活性をもちピークは一つだけではないと考えられた。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 A と B 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ーを行なった。すなわち、その部分を減圧濃縮した後、0.01M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析し、その内液を DEAE-cellulose に吸着した後、0.01M より 0.2M まで gradient elution した。そのクロマトグラムは Fig. 2 のごとくである。この操作の後にも RNase と PDase 両活性部分の流出位置はまったく一致した。

PMase 活性のあるピーク C の部分を減圧濃縮した後に 0.01M acetate buffer (pH 6.0) に対して透析し、その内液を DEAE-cellulose

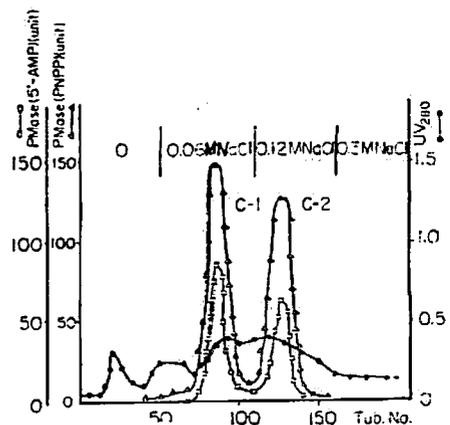


Fig. 4 Rechromatogram of PMase fraction from mushroom on DEAE-cellulose column.

した DEAE-cellulose に吸着させ、濃度を stepwise に 0, 0.06M, 0.12M, 0.3M と変化させた食塩溶液で溶出した結果は Fig. 4 のごとくである。PMase 活性のピークが2個あらわれたのでピーク C-1, C-2 と仮に命名した。なお、基質を従来の PNPP より 5'-AMP に変えて pH4.5 で PMase と同じ条件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ピークは PNPP を基質とする PMase の2個のピークとまったく一致した。

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30倍、PDase は60倍、PMase は20倍程度に濃縮された。

Table 1. Purification of RNase of mushrooms.

Purification step	RNase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
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 mushrooms.

Purification step	PDase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
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 mushrooms.

Purification step	PMase (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Filtrate of extract	2,125,000	1155	1854
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting-out	1,420,000	280	5072
DEAE-Cellulose-1	420,323	59.8	7029
DEAE-Cellulose-2	253,506	6.45	39303
DEAE-Cellulose-3 Peak-1	14,625	1.31	11164
" Peak-2	10,352	1.62	6390

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濃縮してのち、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 の RNase 活性の最適pHは Fig. 5 のごとく 7.5~8.0であった。BPNPP を基質にしてピーク B (PDase 活性) の最適 pH は Fig. 6

のごとく 7.5~8.0 で両酵素活性の最適 pH に一致がみられた。

PNPP を基質にしてピーク C-1 (PMase 活性) の最適 pH は Fig. 7 のごとく 4.0~5.0 にあった。なお、ピーク C-2 の最適 pH は C-1 に一致した。

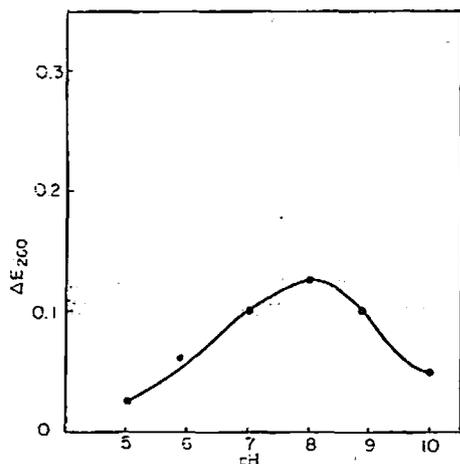


Fig. 5 Effect of pH on RNase activity. (RNase A)

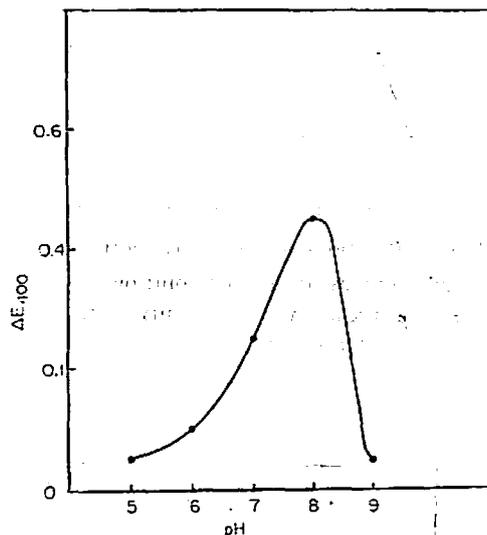


Fig. 6 Effect of pH on PDase activity. (PDase B)

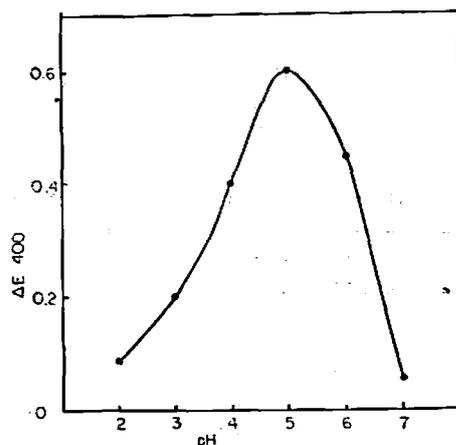


Fig. 7 Effect of pH on PMase activity. (PMase C-1)

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関係を調べると Fig. 8 のごとくである。RNase, PDase は 0.1~0.2ml, PMase は 0.1~0.25ml 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 RNase 4~7, PDase 3~8, PMase 4~8 (それぞれ unit) の範囲の活性になるように、酵素液を希釈して基質に作用させた。

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. 9 のごとくで、最適温度は RNase で 60°C, PDase

で 45°C, PMase で 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~pH 10 の範囲の 1/10M 緩衝液中に 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. 10 のごとくである。RNase, PDase, PMase の諸活性はいずれも pH 7 近辺で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最適 pH の 0.2M 緩衝液で希釈し、種々の温度で 15 分間

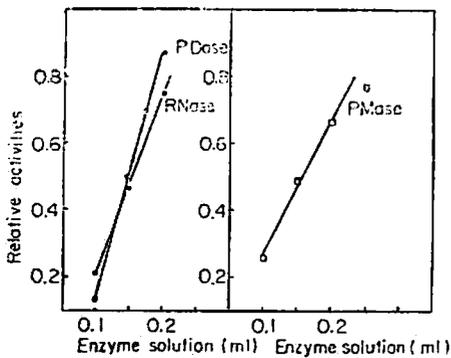


Fig. 8 Relations of enzymatic activities and volumes of enzyme solutions.

●—● RNase A, ○—○ PDase B
□—□ PMase C-1

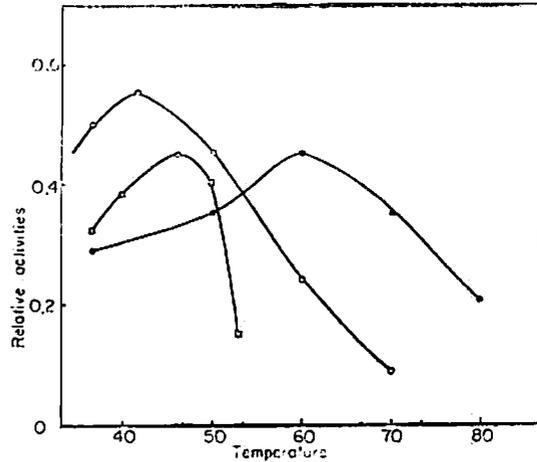


Fig. 9 Effect of temperature on enzymatic activity.
●—●RNase A, □—□PDase B, ○—○PMase C-1

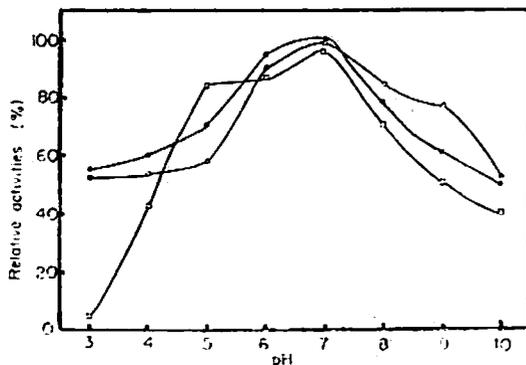


Fig. 10 Effect of pH on stabilites of enzymatic activities. (37°C, 18hrs)

●—● RNase A, ○—○ PDase B
□—□ PMase C-1

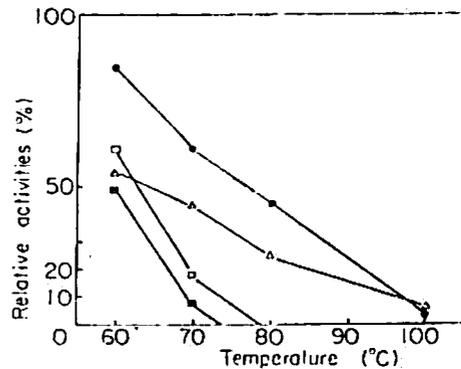


Fig. 11 Heat stability of enzymatic activities.

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

保持した後、急冷し、常法に従って残存活性を測定した結果は Fig. 11 のごとくである。RNase A, PDase B とも高温においても比較的安定で80°Cにおいて前者は約50%、後者は約30%も残存していた。PMase C-1, C-2は70°Cにおいてほとんど失活した。

f) 金属イオンおよび阻害剤の影響：各酵素の活性におよぼす金属イオンまたは阻害剤としての試薬の影響を調べると Table 4, 5のごとくである。

RNaseはCu⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺により、PDaseはCu⁺⁺, Mn⁺⁺により、PMaseはCu⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺により阻害された。なお、PMaseはMg⁺⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺により若干活性化された。

RNaseに対してキレート剤などの阻害はほとんどなく、PDaseはEDTA, クエン酸により阻害された。PMaseはNaFにより著しく阻害され、また磷酸の阻害があった。

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

		RNase A	PDase B	PMase C-1	PMase C-2
Control		100	100	100	100
MgCl ₂	6×10 ⁻² M	100	94	179	165
	6×10 ⁻³ M	110	125	180	166
CaCl ₂	"	106	97	142	130
	"	100	118	150	161
CuSO ₄	"	29	62	74	84
	"	17	62	87	85
CoSO ₄	"	96	109	75	80
	"	100	114	55	63
ZnSO ₄	"	56	106	14	12
	"	41	101	24	25
MnSO ₄	"	82	44	142	133
	"	77	50	116	121

Table 5. Effects of anions and chelating agents on some enzyme activities.

		RNase A	PDase B	PMase C-1	PMase C-2
Control		100	100	100	100
NaF	6×10 ⁻² M	107	106	14	12
	6×10 ⁻³ M	102	101	24	25
EDTA	"	110	44	142	133
	"	105	50	116	121
Na ₂ HPO ₄	"	105	97	89	88
	"	107	93	65	54
Na-citrate	"	97	62	101	100
	"	100	60	62	75
Cystein	"	95	90	102	102
	"	86	94	77	89

3. 酵母 RNA の酵素分解による 5'-ヌクレオチドの生成

前述のごとくマッシュルーム酵素系の中でピーク A は RNase 活性を有するので、酵母 RNA

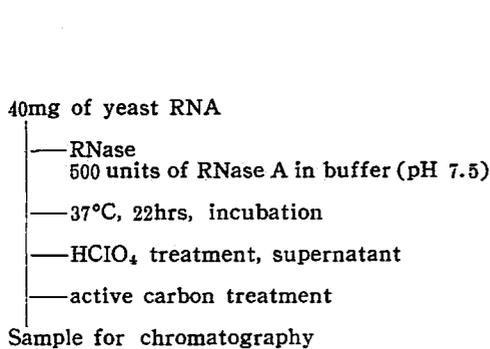


Fig. 12 Digestion of RNA.

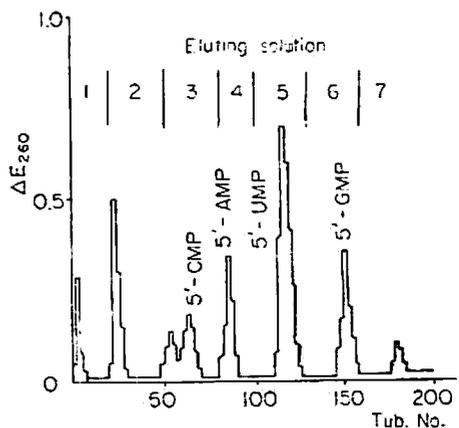


Fig. 13 Formation of 5'-nucleotides by degradation of yeast RNA with fraction A.

に作用させて、その分解生産物を調べた。ピーク A の濃縮部分を 0.2M Tris buffer (pH7.5) の中で Fig. 12 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. 13 に示すように酵母 RNA の分解によって 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 計4種の5'-ヌクレオチドが生成することが認められた。

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-1, C-2 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. 14 に示す方法で作用させた結果は Fig. 15 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、酵素活性におよぼす pH の影響を示すと Fig. 16 のごとくで、最適 pH は 4~5, 最適温度は 40~50°C の範囲にあった。また、ヌクレオチド類も分解することが認められた。

また、RNase 活性の画分 A, PDase 活性の画分 B をヌクレオチドならびにヌクレオシドに作用させたが分解は認められなかった。

ATP (20mg/20ml) 5.0ml
 —PMase fraction (28.2unit) 2.0ml
 —1M buffer (pH4.5—5.0) 1.0ml
 —incubation, 37°C, 1hr
 —HClO₄ treatment
 —active carbon treatment
 Sample for chromatography

Fig. 14 Degradation of ATP.

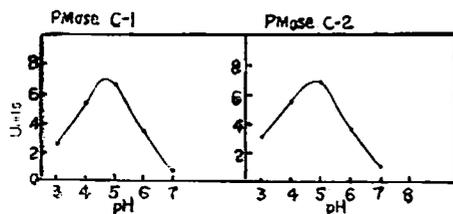


Fig. 16 Activities of PMases (C-1, C-2) to 5'-AMP at various pH.

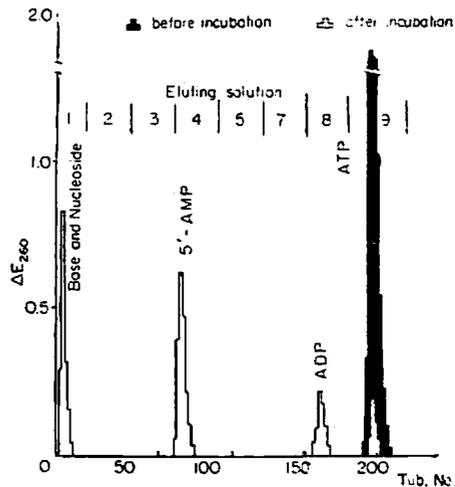


Fig. 15 Incubation of mushroom PMase fraction with authentic ATP.

考 察

マッシュルームの酵素活性画分のうちで、ピーク A は RNA, DNA を共に分解し、ピーク B は BPNPP を分解した。A と B は Sephadex G-25, Amberlite CG-50, DEAE-cellulose によっては互いに分離することができず、同一酵素蛋白が2種の酵素活性を示すものと考えられるが、詳細についてはなお検討を要する。この酵素の RNase 活性ならびに PDase 活性はしいた

け子実体のそれらとはかなり性質が異なっていた。マッシュルームの RNase 活性は Eaves⁶⁾ の *Serratia marcescens*, 杉本ら⁷⁾ の *Streptomyces* No.41, 猿野ら⁸⁾ の *Monascus* 属に類似しており, また PDase 活性は小腸⁹⁾, 蛇毒¹⁰⁾ のそれらによく似ている。PMase 画分は RNase, PDase 活性画分とは分離され, 自身 2つのピークより成っていた。このピークは ATP を分解する ATPase, 5'-AMP など分解するヌクレオチダーゼ, 一般のヌクレオシダーゼの活性部分が混合していると考えられる。

これらの結果から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。酸性側では nucleoside polyphosphate の分解が大きく, 5'-ヌクレオチドが生成されるが, 同時にヌクレオチダーゼが強いためにヌクレオシド以下まで分解され, ヌクレオチドとしての蓄積はほとんどない。pH 6.0 で食品の煮出し (温水抽出) と近似の条件では, ヌクレオチダーゼの熱による不活性化と PMase の最適 pH 域をずれるために, ヌクレオチダーゼの作用が弱く生成した 5'-ヌクレオチドは分解されずにかかなり蓄積する。アルカリ性側ではヌクレオチダーゼ活性がほとんど見出されず, 一方 RNase 活性が強いで, RNA の分解により 4種の 5'-ヌクレオチド類が蓄積される。

このようにマッシュルームでは酸性側で PMase が強く, RNase がほとんどなく, 微アルカリ性で RNase, PDase 活性が強い。しいたけでは酸性側で RNase が強く PMase も存在し, 微アルカリ性では RNase, PDase が強い。マッシュルームとしいたけの両きのこの酸性側酵素系の相違により, 5'-ヌクレオチドの分布および煮出しにおける 5'-ヌクレオチド含量の相違がもたらされるといえよう。島菌¹¹⁾ の提案による食品中の 5'-ヌクレオチドの分布型式では, マッシュルームは Plant type, しいたけは Autolysate type を示すものといえよう。また, このような酵素系の作用によって食品としての旨味成分が醸成されるのであろう。

要 約

マッシュルーム子実体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調べた。RNase 活性 (DNase 活性もある) のピーク 1個, PDase 活性を持つピークを 1個, PMase 活性を持つピーク 2個が認められた。酵素作用の最適条件は RNase (ピーク A) では pH 7.5~8.0, 温度 60°C, PDase (ピーク B) では pH 7.5~8.0, 温度 45°C, PMase (C-1, C-2) は pH 4.0~5.0, 温度 40°C であった。これらの結果からマッシュルームの温水抽出 (煮出し) における 5'-ヌクレオチドの消長が説明された。マッシュルームとしいたけは, それぞれの酸性側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。

終りに臨み, 貴重な薬品, 酵素類など多大のご援助を賜わっている武田薬品工業株式会社の方々および実験を分担された当短大寺田禎子嬢に深謝します。本報はアミノ酸核酸集談会シンポジウム (京都, 1966) において発表したものである。

文 献

- 1) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 248 (1966)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 335 (1965)
- 2) 中島, 市川, 鎌田: 農化, 37, 558 (1963)
- 3) Folin, O., Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem., 73, 629 (1927)
- 4) 萩原: 酵素研究法 (赤堀) Vol. 164 (1956)
- 5) 須原, 草葉, 大村: 酵素化学シンポジウム 第16号, 115 (1964)
- 6) Eaves, G. N., Jeffries, C. D.: J. Bact., 85, 273 (1963)
- 7) 杉本, 岩浅, 横塚: 農化, 36, 277 (1962)
杉本, 岩浅, 横塚: 農化, 37, 677 (1963)
- 8) 猿野: 醗酵工学, 42, 475 (1964)
- 9) 下村: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 734 (1964)
- 10) 前野: 蛋白質, 核酸, 酵素, 6, 738 (1964)
- 11) 島蘭: Amino acid and Nucleic acid, 10, 179 (1964)
島蘭: Food Technol., 18, (3) 36 (1964)