

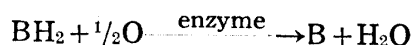
甘藷の Phenolase に関する研究 (第 1 報)

Phenolase の単離実験

山 本 喜 男

I. 緒 言

phenolase は次の一般式の如く phenols を酸化する酵素である。



本酵素は Bourquelot & Bertrand¹⁾ が種々の植物組織中の laccase を研究中 1895 年に発見したものであるが, tyrosinase, polyphenolase, polyphenol oxidase 等の別名がある。その中にも monophenol に作用するものを cresolase と称し diphenol のみに作用するものを catecholase と称している。

例えば potato, sweet potato, mushroom, banana, apple, pear などの切片を空气中に曝して置くと褐変するのは本酵素の作用結果である。

Wilson et al.²⁾ 並に Nelson et al.³⁾ が甘藷の phenolase を研究した結果によれば生甘藷の slice 中の cresolase activity は極めて強いが catecholase activity は弱い。けれども acetone, alcohol,²⁾ NaCl³⁾ などで slice の細胞を破壊すれば逆に catecholase activity が強くなつて cresolase activity は消失する。かくの如く甘藷の phenolase は cresolase と catecholase との両酵素作用をもつておるが、この両作用が同一酵素によつて働かれるのか否かは未知である。これに対して Mallett⁴⁾ らは mushroom の tyrosinase を研究して cresolase と catecholase の両酵素作用は同一の酵素蛋白の働きによるのであると認め、精製操作中に catecholase/cresolase の ratio が変わるのは二種の酵素が分別される結果であるとみなすよりも酵素蛋白が変異する結果であると考えておるようである。けれどもこの考えを甘藷の phenolase に適用してよいかどうかは疑問である。何となれば Eiger & Dawson⁵⁾ は甘藷の phenolase と mushroom の tyrosinase との性質を比較したが、この両酵素は同一の酵素的行為をなすということを示し得なかつた。

上記の如く plant phenolase については的確な知識を欠いておる。その主なる原因は本酵素の単離の困難さにあるが、さきに Rudkin & Nelson⁶⁾ が甘藷の phenolase に対する天然基質の一つとして chlorogenic acid を発見したので、これを基質に選べば本酵素の研究は著しく利便を得るであろう。筆者は甘藷の phenolase の本質を知ろうと欲して、まず単離のための予備実験を行い 2~3 の知見を得たので第 1 報として報告する。

II. 実 験

A. Catecholase Activity の測定法

catechol による酸素吸収量を測定するに当つて、反応液としては Gregg & Nelson⁷⁾ にならつて次の組成のものを採用した。

0.5% Catechol Solution	4 cc.
0.1 M Citrate—0.2 M Phosphate Buffer (PH 6.4)	2 cc.
0.5% Gelatin Solution	1 cc.
Water	0.5 cc.
Enzyme Solution	0.5 cc.
Total	8.0 cc.

測定要領は反応液を装置後正確に 10 分をすぎて温度平衡に達せしめてから栓を閉じ、側室より酵素液を加えて毎分 130 回の速度で Manometer を振盪する。初発から 1 分毎に 5 分まで読みをとるが、初発から 1 分目及び 2 分目の読みから平均値をとつて 1 分当りの酸素吸収量を算出した。

酵素単位 25°C において 1 分間に 10 mm³ の酸素を catechol に吸収せしめる酵素力を 1 catecholase unit とした。

Table 1 Enzyme Content in the Sweet Potatoes
(unit/g. of fresh matter)

	Variety		
	Gifu No. 1	Hayato	Nōrin No. 1
Cortex	20.0	21.1	17.7
Starchy Tissue	2.5	2.9	2.1

以上によつて甘藷の皮部及び澱粉質部について catecholase activity を測定した結果を例示すれば Table 1 の如くである。

この表によれば甘藷の品種によつて著しい変動はなく皮部は澱粉質部に比較して大約 8 倍の activity を有する

が重量の比率はその逆になつているので酵素含量の絶対量は大体同程度と考えてよからう。

B. Phenolase の分離実験

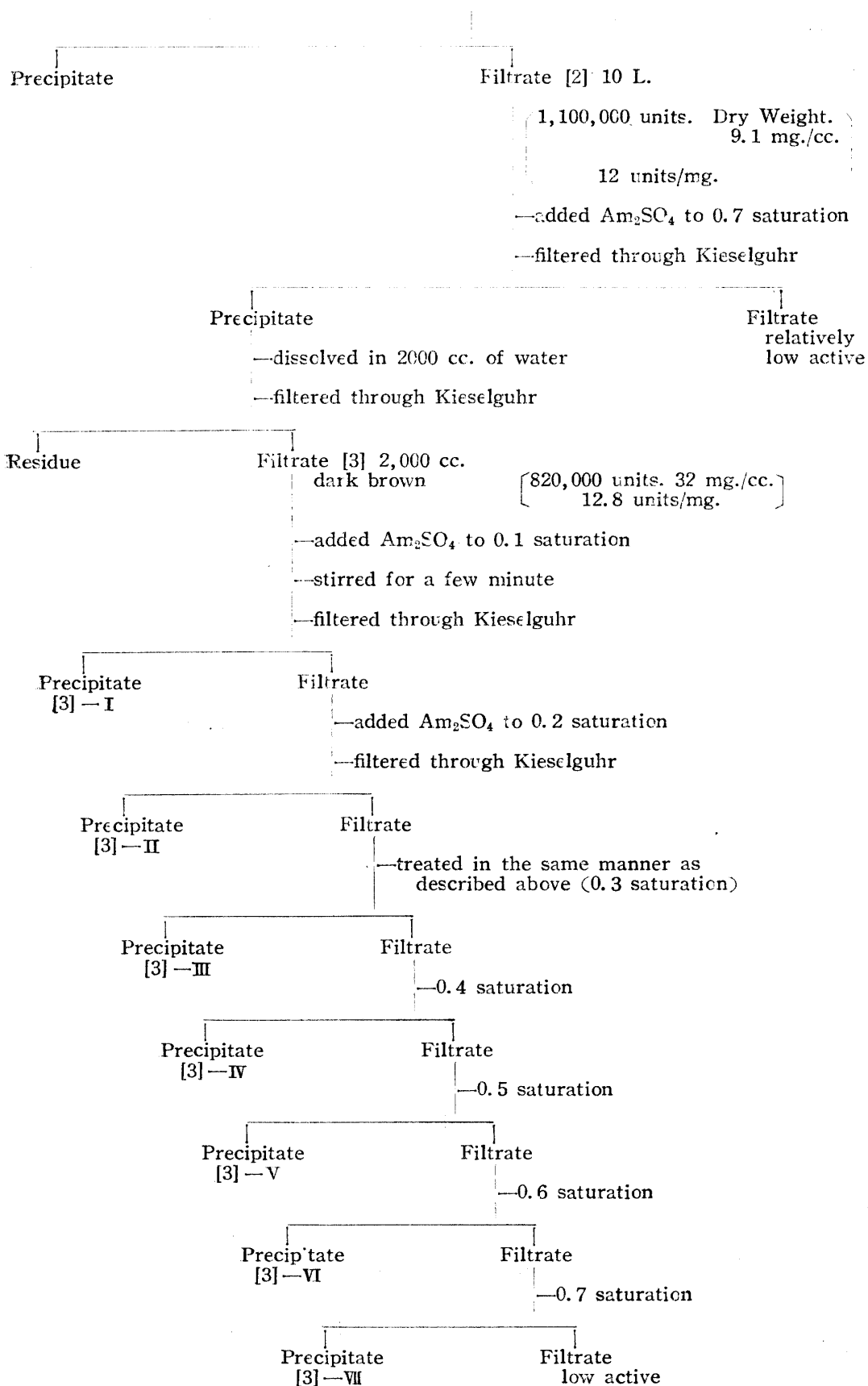
新鮮なる甘藷 (品種; 岐阜一号, 昭和 27 年 10 月 2 日京都大学農学部農場にて収穫) を用いて Eiger & Dawson⁸⁾ の方法に従つて Table 2 に示すように硫酸による分別を試みた。

Table 2 Isolation of Phenolase from the Sweet Potato Tuber

Sweet Potato 30 kg.

—sliced, minced and pressed

Cake discarded	Juice [1] 10.5 L. Catecholase Activity. 2,400,000 units. Dry Weight. 57.1 mg./cc. Purity Level 4 units/mg. of dry weight. —added Am ₂ SO ₄ (solid) to 0.3 saturation at room temperature —filtered through Kieselguhr
-------------------	---



(註) [] 内の数字は精製の段階を示す

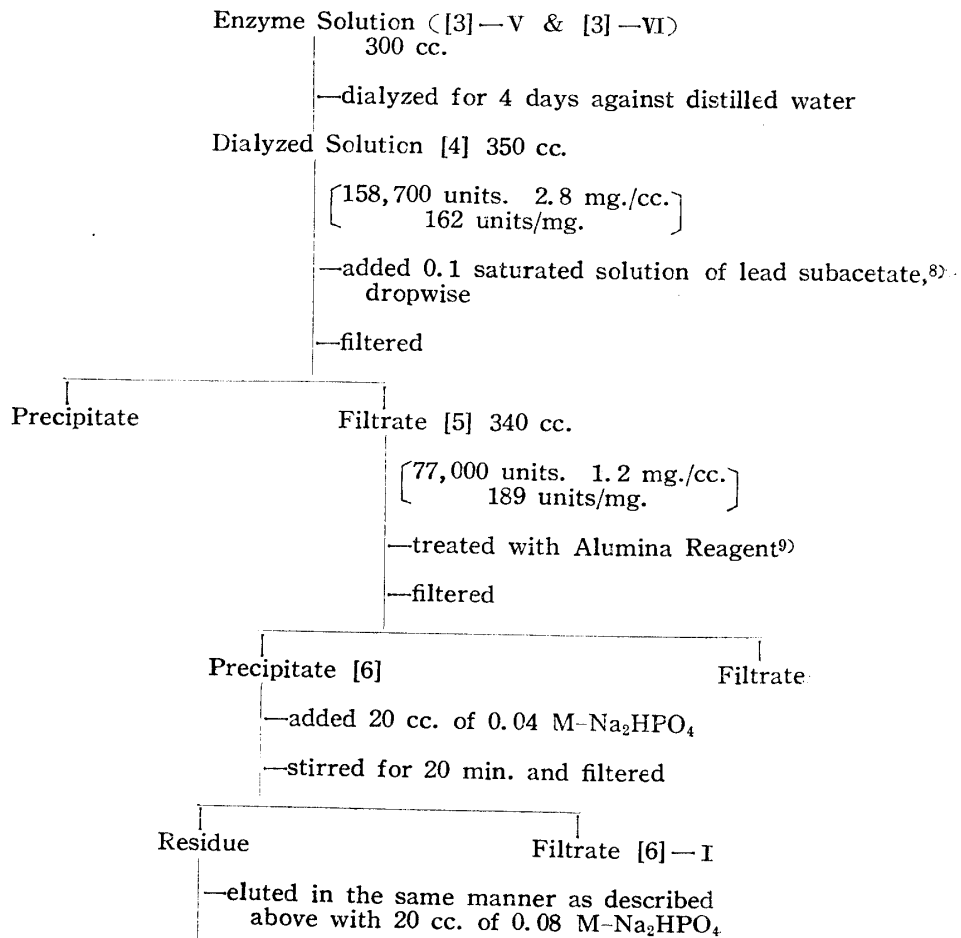
ここに得られた 7 fractions ([3]—I~[3]—VII) を直ちに水に溶解して catecholase activity を測定して Table 3 の結果を得た。

Table 3 Catecholase Activity in seven Fractions

No. of Fraction	Saturation of Am ₂ SO ₄	Volume (cc.)	Total Catecholase Units	Dry Weight (mg./cc.)	Units/mg.
[3]—I	0.1	250	66,000	24.0	11
[3]—II	0.2	370	216,500	65.0	9
[3]—III	0.3	300	122,400	30.0	14
[3]—IV	0.4	150	90,000	13.3	45
[3]—V	0.5	150	135,000	6.0	150
[3]—VI	0.6	150	114,000	4.0	190
[3]—VII	0.7	75	3,000	0.5	80

この結果によれば [3]—V 及び [3]—VI は他の fractions に比較して遙かに高度の activity を有していたのでこの両 fractions を合して alumina 及び Na₂HPO₄ による吸着、溶出を併用して精製を進めた。(Table 4)

Table 4 Purification of the Sweet Potato Phenolase



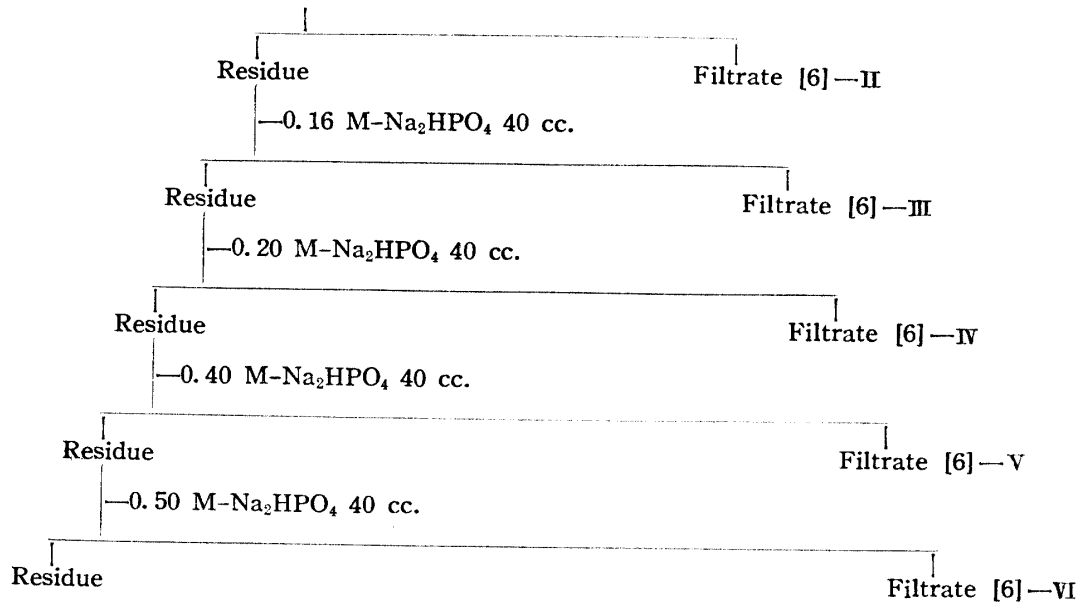


Table 4 に示した如く Na_2HPO_4 によつて溶出分別した 6 fractions ([6]-I~[6]-VI) について、各々の activity を比較して Table 5 の結果を得た。

Table 5 Catecholase Activity in six Eluates with Na_2HPO_4 from Alumina Adsorbate

No. of Eluates	Concentration of Na_2HPO_4 (M)	Volume (cc.)	Total Catecholase Units	Dry Weight (mg./cc.)	Units/mg.
[6]-I	0.04	20	500	0.5	50
[6]-II	0.08	20	2,500	1.1	114
[6]-III	0.16	40	5,700	1.1	130
[6]-IV	0.20	40	27,300	1.8	379
[6]-V	0.40	40	15,250	1.2	318
[6]-VI	0.50	40	2,000	0.7	71

上表の実験成績が示す如く 0.20 M- Na_2HPO_4 によつて溶出された fraction ([6]-IV) は他の fractions に比較して純度は遙かに高く 379 units/mg. of dry weight であつた。Dawson et al⁶⁾ が甘藷から単離した phenolase は 600 units/mg. の純度であつたと報告されている。これによれば筆者が分別したものは Dawson らが分別したものに比べて純度が低いようにみなされるであろう。けれども Dawson らは chronometric method¹⁰⁾ によつて酵素力を測定したのである。同法は筆者が採用した manometric method に比べて高単位を示出するのであるから上記の数値だけで Dawson らのものと筆者のものと純度を対比することは無意味であろう。

C. 精製段階中の吸収スペクトル

甘藷の phenolase は一種の銅蛋白質と考えられておる。従て、280 $m\mu$ 附近に tryptophan, tyrosine などの aromatic amino acids に基因する吸収帯を示す。¹¹⁾ そこで筆者は Beckman Model DU spectrophotometer により 1 cm silica cell を用いて紫外部の吸収スペクトルを測定して Fig. 1 & Fig. 2 を得た。

Fig. 1 The Absorption Spectra of the Preparations of Sweet Potato Phenolase

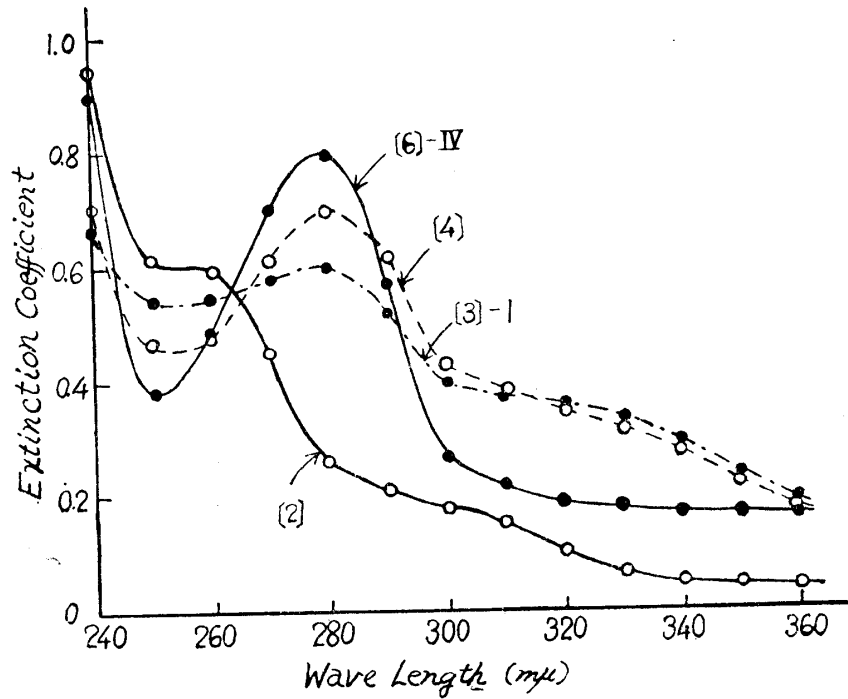
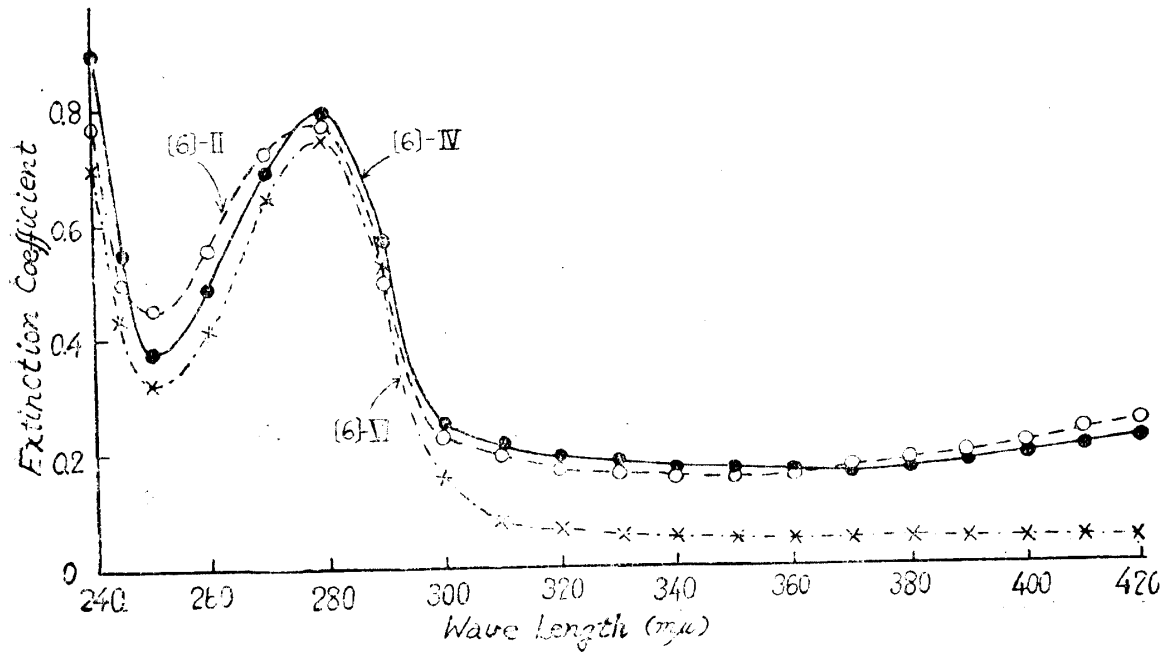
Fig. 2 The Absorption Spectra of the Eluates with Na_2HPO_4 

Fig. 1 によれば [2] の stage においては 260 $m\mu$ 附近に吸収極大を示したが、これは恐らく phenolic substances に基因するものであり分離精製の進行と共にこの物質による吸収は次第に消滅し、fraction [6]-IV では 280 $m\mu$ 附近に吸収極大が鮮明になる事実を物語っている。

しかしながら、Fig. 2 より判断すれば筆者が分離した fractions の中、最も純度の高かつた [6]—IV においても、400 mμ 附近に sorlet の吸収が僅かながらもあらわれている。これは恐らく peroxidase の混在を示すものであろう。¹²⁾

D. Spectrophotometric Method による Phenolase 量の測定 (Conversion Factor の決定)

一般に酵素量を定量するには絶乾秤量するのであるが乾燥前に完全透析することも必然的である。その間、誤差の機会も多く、また長時間を要する嫌いがある。これをさけるために Eiger & Dawson⁹⁾ は酵素液の吸光度測定値から酵素量を算出するための conversion factor を定めおくことを提案しておるので筆者は同氏らにならつて甘藷の phenolase に対する conversion factor を求めるために次の実験を行つた。conversion factor を求める要領は次の通りである。

$$\text{Conversion Factor} = \frac{E'_{\text{protein}}}{\text{mg. number of enzyme per cc. (determined)}}$$

但し

$$E'_{\text{protein}} = E'_{280\text{ m}\mu} - 3E'_{330\text{ m}\mu} + 2E'_{355\text{ m}\mu}$$

$$E' = E \times \text{dilution}$$

いま fraction [6]—III について E'_{protein} の測定値を例示すれば次の通りである。

$m\mu$	E	Dilution	E'	$3E'_{330m\mu}$	$2E'_{355m\mu}$
280	0.440	1 : 4	1.760		
330	0.291	1 : 1	0.291	0.873	
355	0.284	1 : 1	0.284		0.568

$$E'_{\text{protein}} = E'_{280m\mu} - 3E'_{330m\mu} + 2E'_{355m\mu} = 1.455$$

上述の方式にしたがつて筆者が分別した酵素液について吸光度 (E) を測定し、これより E'_{protein} を算出して conversion factor を求め、これによつて酵素量の実験値と計算値とを対比して Table 6 に示してみた。

Table 6 Constant Relationship between E'_{protein} and the Phenolase Content

No. of Sample	E'_{protein} (a)	Phenclase (determined) mg./cc. (b)	Conversion Factor (c) = $\frac{(a)}{(b)}$	Phenolase (calculated) mg./cc. $\frac{(a)}{1.30}$
[3]—IV	16.20	13.3	1.22	12.5
[3]—V	7.74	6.0	1.29	5.9
[3]—VI	5.54	4.0	1.39	4.3
[5]	1.62	1.2	1.35	1.2
[6]—I	0.62	0.5	1.24	0.5
[6]—II	1.56	1.1	1.42	1.2
[6]—III	1.46	1.1	1.33	1.1
[6]—IV	2.34	1.8	1.30	1.8
[6]—V	1.60	1.2	1.33	1.2
[6]—VI	0.81	0.7	1.16	0.6

mean 1.30 ± 0.06

Table 6 に示した如く conversion factor として 1.30 を求め得た。この要領によつて phenolase 液中の酵素量は簡単に知り得られるが正確を期するためにはさらに数多い data に基いてこの factor を修正しなければならないであろう。

III. 要 約

(1) 新鮮な甘藷根塊の汁液より硫酸による分別沈澱法と alumina による吸着次いで Na_2HPO_4 による溶出分別法を併用して 379 units/mg. の高活度を有する phenolase を分離した。

(2) この phenolase 中にはなお微量の peroxidase が混在することを吸収スペクトル測定によつて知り得た。

(3) 分離精製段階における fractions について吸収スペクトルを測定した結果として精製が進むにつれて phenolic substances に基因する吸収極大が漸減し、蛋白に基因する吸収極大が漸増する事実を認めた。

(4) phenolase 液中の酵素量を spectrophotometric method によつて簡便に知るために必要な conversion factor 1.30 を求め得た。(1953 年 2 月 10 日)

本研究は昭和 27 年度内地研究員として京大農学部滞在中行つたものであり、その間、終始御懇篤なる御指導と本稿の御校閲を賜つた恩師京都大学教授、近藤金助先生に深甚の謝意を表す。なお本報告の概要は昭和 28 年 4 月、日本農芸化学会大会において講演した。

文 献

- (1) G. Bertrand & E. Bourquelot; Compt. Rend. Soc. Biol., **48**, 811 (1896).
- (2) L. Scott, C. O. Appleman & M. Wilson; Agr. Exp. Sta. Univ. Maryland, Tech. Bull. No. A33 (1944).
- (3) E. M. Walter & J. M. Nelson; Dissertation, Columbia University (1947).
- (4) M. F. Mallette & C. R. Dawson; Arch. Biochem., **23**, 29 (1949).
- (5) I. Z. Eiger & C. R. Dawson; Arch. Biochem., **21**, 194 (1949).
- (6) G. O. Rudkin & J. M. Nelson; J. A. C. S., **69**, 1470 (1947).
- (7) D. C. Gregg & J. M. Nelson; J. A. C. S., **62**, 2500 (1940).
- (8) I. Z. Eiger & C. R. Dawson; Arch. Biochem., **21**, 181 (1949).
- (9) 化学実験学 (第二部) 第 12 卷, p. 779 (1947).
- (10) W. H. Miller, M. F. Mallette, L. J. Roth & C. R. Dawson; J. A. C. S., **66**, 514 (1944).
- (11) E. R. Holiday; Biochem. J., **30**, 1795 (1936).
- (12) 近藤, 森田; 京都大学食糧科学研究所報告, 第 10 号, 33 (1952).

RÉSUMÉ**Studies on the Sweet Potato Phenolase****1. The Preparation of the Phenolase**

Yoshio YAMAMOTO

(1) An attempt has been made to purify the phenolase from the juice of the fresh sweet potato tuber. The methods of purification applied in this study are described below; the fractional precipitation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the adsorption to alumina reagent and the fractional elution using Na_2HPO_4 of increasing concentrations. The best phenolase preparation obtained thus had a purity level of 379 units/mg. dry weight.

(2) It has been shown that even the best preparation contaminated a trace of peroxidase as the result of the spectrophotometric experiments.

(3) On the other hand, at each stage of the purification the samples were examined spectrophotometrically in the ultraviolet region of the spectrum. And the fact was shown that, with each succeeding stage in the purification, a maximum absorption at about $260\text{ m}\mu$, presumably due to contaminating phenolic substrate materials, showed a progressive decrease and a maximum absorption at about $280\text{ m}\mu$ due to proteins showed a progressive increase.

(4) A spectrophotometric method is described for the simple determination of the phenolase content and the result shows that a reasonably constant relationship exists between the phenolase content and the corrected protein extinction at $280\text{ m}\mu$ and a conversion factor of 1.30 may be used to determine the enzyme concentration.