

第28回麻布環境科学研究会 一般演題7

ササクレヒトヨタケに含まれる ポリフェノール酸化酵素の特性について

慶林坊健太¹, 堂ヶ崎知格²¹麻布大学大学院環境保健学研究科, ²麻布大学生命・環境科学部食品衛生学

1. 目的

当研究室ではこれまで、食用茸の一種であるササクレヒトヨタケ (*Coprinus comatus*) の性状を明らかにするために、含有成分について種々の生理活性を検索している。ササクレヒトヨタケは成熟すると傘部分が一夜にして黒インク状に溶けてしまうという性質があり、何らかの酵素が深く関与していることが考えられる。茸類の黒変と関わりが深いとされる酵素としてはチロシナーゼがある。チロシナーゼは生物界に広く分布するメラニン合成に関与するフェノール酸化酵素であり、アルキルフェノール類などの有害物質の除去や抗腫瘍作用、抗酸化作用など、各種の有用な機能が報告されている。今回は、含有酵素の特性について検討するとともに、チロシナーゼとの関連性を検索した。

2. 実験および方法

2-1：酵素の抽出と精製

10 g のササクレヒトヨタケ乾燥粉末に10倍量の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え4℃でよく攪拌しながら抽出した。遠心分離し、その上清を粗抽出液とした。粗抽出液に冷却したアセトンを経過濃度が20%となるように加え、生じた沈殿を遠心分離により除き、この上清に最終濃度が80%となるように冷却したアセトンを加えた。沈殿物を遠心分離により集め、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して透析を行い、その膜内液を酵素抽出液とした。

2-2：酵素の性質

2-2-1：酵素活性と基質特異性

10 mM の基質／リン酸緩衝液 溶液 1.0 ml に対し0.5 ml の酵素抽出液を加え5分間反応させた後、420 nm における吸光度を測定し、1分当たりの吸光度の増加量0.1を1 unitとして酵素活性を表した。対照は基質溶液を100℃により失活させた酵素抽出液を用いた。

次いで、基質として種々のポリフェノール化合物を用い、基質特異性を測定した。

2-2-2：最適pHおよび最適温度

最適pHはL-DOPAを基質として、pH 5.0～8.0の範囲で調製したリン酸緩衝液を用いて測定した。結果は最大活性を100%とした相対値で表した。

また、最適温度は、反応時の温度を25～80℃の範囲で変化させ測定した。結果は最大活性を100%とした相対値で表した。

2-2-3：pH安定性

L-DOPAを基質として、pH 5.0～8.0リン酸緩衝液に酵素抽出物を溶解し4℃で24時間静置後、残存する活性の測定を行った。結果は残存する酵素活性を最大活性100%とした相対値で表した。

2-2-4：熱安定性

L-DOPAを基質として、30～80℃温度で酵素溶液を20分間加熱処理した後、残存する活性の測定を行った。結果は最大活性を100%とした相対値で表した。

2-2-5：ミカエリス定数 (K_m) の測定

基質溶液の最終濃度が0.1～50 mMの範囲になる

ように変化させて活性の測定を行い、反応速度 (v) と基質濃度 $[S]$ の関係を Hanes-Woolf Plot により表した。

2-2-6：分子量の測定

SDS-PAGE およびゲルろ過により行った。PAGE は、Native-PAGE により行なった。10 % ポリアクリルアミドを使用し、染色は、タンパク質についてはクマシーブリリアントブルーを、活性染色には 10 mM DOPA 溶液を用いた。ゲルろ過は、TOYOPEARL HW-55 を用い溶離液として 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて行った。

2-2-7：種々の化合物の酵素活性への影響

種々の化合物を終濃度が 10 mM となるように反応液に添加し、活性に及ぼす影響を測定した。結果は化合物の代わりに超純水を用いた時の活性を 100 % とした相対値で表した。

3. 結果

粗抽出液（乾燥物）の収量はササクレヒトヨタケ乾燥粉末 1 g あたり約 380 mg であり、酵素抽出液（乾燥物）は約 240 mg であった。また、ブラッドフォード法によりタンパク質含量を測定したところ、23.1 % であった。L-DOPA を基質として、酵素抽出物の比活性 (unit/mg protein) を求めたところ、60.3 であり、そのミカエリス定数 K_m は 1.43 であった。

基質特異性については、L-DOPA を最も強く酸化し、次いでカテコールであった。しかし、クロロゲン酸、カフェ酸、ピロガロール、ビスフェノール A に関しては比較的弱く、没食子酸、グアヤコール、ABTS は酸化しなかった。最適 pH は 7.3 であったが、最も活性が残存する pH は、5.5 であり、ついで 6.7 であった。最適温度は 40 °C であり、熱安定性に関しては、50 °C 以下では 80 % 以上の残存活性が認められ、60 °C 以上では大きく活性が低減したものの、完全に失活することはなかった。SDS-PAGE およびゲルろ過の結果から、その分子量は約 45,000 であった。酵素の阻害活性はアスコルビン酸が最も強く、次いでシステインの順であった。

以上より、1) L-DOPA を特に強く酸化することからチロシナーゼに類する酵素と推定される 2) *o*-ジフェノール類を強く酸化し、*m*-ジフェノール類およびトリヒドロキシベンゼン類を殆ど酸化しない 3) 酸性側の pH で安定である 4) 60 °C 以上においても完全に失活しないことから若干の耐熱性を持つ 5) 分子量は約 45,000 であり、アイソザイムを持たない 6) アスコルビン酸やシステインのような還元剤の阻害作用により活性が強く抑制されることなどが明らかとなった。また、ジフェノール類に対して広い基質特異性を持つことから、有害なジフェノール化合物の分解酵素としての利用が期待される。