

Srrengacher 法の変法による catechol oxidase 活性の特異的比色測定法の検討

加藤好夫\*，黒部真章，坂幸子\*\*，谷口古登美

（岐阜薬科大学薬剂学教室）

An Examination on A Specific Spectrophotometric Determination of Catechol oxidase Activity by the Modified Srrengacher's Method

YOSHIO KATO\*, MASAYUKI KUROBE, YUKIKO BAN\*\*, KOTOMI TANIGUCHI

Department of Pharmaceutical Sciences, Gifu College of Pharmacy

(Received September. 6, 1977)

The effect of ascorbic acid (AsA) on the *in vitro* activity of potato tyrosinases and the improvements of the method of Srrengacher for the use of the insoluble samples as the enzyme preparation were examined.

1. There was a delay in the onset of color development and a marked decrease on the formation of the product, although AsA did not inhibit the enzyme activity. The results obtained do not make possible to interpret that the lag time in the onset of color development is, as mentioned previously, dependent upon the reversible reduction of the product by AsA.
2. The method of Srrengacher with some modifications was equivalence to that of Fling et al.. The sensitivity of the modified method was slightly superior to that of Fling et al..
3. It was possible to utilize the insoluble samples such as homogenate for the enzyme, because the denaturation agents did not affect the formation of osazone derivative of dehydro-AsA. The osazone of dehydro-AsA was stable to stand for 60 min at room temperature.

メラニン生合成の key enzyme であるチロジナーゼは広く自然界に分布しているが、いわゆるチロジナーゼは monophenol を *o*-diphenol に酸化する monophenol oxygenase 活性と *o*-diphenol を対応する *o*-quinone に酸化する catechol oxidase 活性の両方を持つといわれている。一方、精製法により両活性比が一定しないこと<sup>1)</sup>、Sephadex G-100 のゲルろ過法<sup>2)</sup>、DEAE-Sephadex A-50によるイオン交換法<sup>3)</sup>、あるいは電気泳動法<sup>4)</sup>で高 monophenol oxygenase, catechol oxidase 活性画分に分離し得ることから、これらの活性は同一酵素分子の異なる活性部位に基づくのではなく異種分子によるという主張があり今だ明らかにされていない。

チロジナーゼ活性測定法は、既に manometric 法<sup>5,6)</sup>、比色法<sup>7,8)</sup>、Srrengacher 法<sup>9,10)</sup>、及び pomerantz 法<sup>11~14)</sup>が報告されている。manometric 法は混濁着色酵素標品にも使用でき最も繁用されているが、チロシンあるいはドーパから出発しメラニンに至るまで一連の反応として進行するにもかかわらず、メラニンがただ単に indol quinone の酸化型 homopolymer でないことが明らかになっているので、酸素吸収量を直ちに基質量に帰属することはできない。また、monophenol oxygenase 活性と catechol oxidase 活性とを厳密に区別することは難しい。原理的に catechol oxidase 活性だけを特異的に測定する比色法、Srrengacher 法は、*o*-quinone または酸化されたアスコル

\* 現，城西大学薬学部，

\*\* 現，岐阜薬科大学機器センター

ビン酸 (以下AsA) 量をそれぞれ経時的に追跡する方法であるが、いずれも着色混濁酵素標品に適用することはできない。更に、比色法は、*o*-quinone からメラニンに至る反応 (重合反応も含む) が非酵素的に進行するため反応の初期部に使用が限られ、Srrerangacher 法は酵素分子と AsA との相互作用 (酵素の阻害あるいは活性) のないことを必須条件とする。

AsA のチロジナーゼ活性への影響は、酸素吸収速度には変化を与えないにもかかわらず誘導期間が存在し生成物の減少を認める点にその特徴がある。<sup>15),16)</sup> 一般に誘導期間の延長は、AsA が *o*-quinone を還元し見かけ上反応が進まないためと考えられている。一方、ジャガイモチロジナーゼは AsA で阻害を受けるという報告があり明らかでない。<sup>17)</sup>

著者らは AsA によるチロジナーゼ活性に与える影響を追試した後、catechol oxidase 活性に特異的な Srrerangacher 法の長所を留保し、しかも混濁酵素標品にも適用できる測定法への改良を目的に検討を加えた。

### 実験材料ならびに方法

**試薬** AsA, 2,4-dinitrophenylhydrazine は和光純薬工業KK, 4-methylcatechol (以下4-MC) は半井化学薬品工業KK製, 他の試薬類はすべて市販の特級試薬を用いた。水はすべての実験に精製水を使用した。

**酵素試料** 酵素試料はバレイシヨ皮質部から Patil らの方法<sup>18)</sup>を若干修飾して調整した。Patil らの方法に準じて調整したアセトン粉末 (20g) と不溶性 polyvinylpyrrolidone (10g) を、1% iso-AsA を含む 20mM 酢酸緩衝液 (pH5.7) 200ml にて0°, 40分間攪拌抽出後、三重層ガーゼでろ過, 11,000×g, 10分間遠心分離し抽出液を得た。抽出液 203ml に 300ml の冷却アセトンを加え攪拌, 遠心分離し沈渣を得る。150ml の上記酢酸緩衝液に溶解, 遠心分離して得られる清澄上清に等容量の冷却アセトンを加え同様に操作, 得られる沈渣を 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解した。25—50%飽和硫酸安分を約 30ml の 10mM リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶かし酵素試料とした。本酵素試料は薄い褐色を呈し、冷蔵庫内に保存すれば数ヶ月間使用することができる。

**基質液** 各基質の0.05M酢酸緩衝液 (pH6.0) 溶解液

**活性測定法** manometric 法, 比色法及び Srrerangacher 法の変法を用いた。

1. manometric 法 酸素吸収量はクラーク型酸素電極 (Beckmann Instrument, USA) を用い、反応槽を30°に

	Test	Blank
Substrate soln. (4-MC, 3mM)	500 $\mu$ l	
Ascorbic acid soln. (0.5mM)	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Buffer (50mM acetate buffer, pH 6.0)		500 $\mu$ l
↓ preincubation at 30° for 5 min		
Enzyme soln.	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
↓ incubation at 30° for directed time (3 min)		
Denaturation soln.	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
↓ centrifugation at 3000rpm for 10 min		
↓ 500 $\mu$ l of supernatant was subjected to determine the amount of dehydroascorbic acid and DKG by the method of Kagawa et al <sup>19)</sup>		
↓ OD 530nm		

Chart 1 Assay Procedure

恒温保示しながら測定した。

2. 比色法 Fling<sup>7)</sup> らの方法を準用した。

3. Srrengacher 法の変法 Chart 1 に示した test と blank の反応系を用意し, 30°, 5 分間 preincubate. 酵素試料 100 $\mu$ l を加え一定時間反応後, 終濃度 5 (W/V)% trichloroacetic acid (あるいは sulfosalicylate, metaphosphate) の 400 $\mu$ l を加え, 遠心分離し除蛋白, 得られた清澄な上清 500 $\mu$ l を香川<sup>19)</sup>らの方法で処理し, 2, 4-dinitrophenylhydrazine の osazone 誘導体に変換, 日立139型分光光度計で 530nm の吸収を測定した。

## 結果と考察

### AsA のチロジナーゼ活性に与える影響

monophenol oxygenase 活性, catechol oxidase 活性はいずれも分子状酸素を必要とする。L-tyrosine, *p*-cresol, L-DOPA 及び 4-MC を基質にそれぞれ酸素吸収量を測定した。その結果, AsA はいずれの基質も control に比して有意な酸素吸収を示さなかった。このことは, 稲垣らの報告と一致し,<sup>16)</sup> AsA はバレイシヨチロジナーゼの作用を阻害しないという Ingraham<sup>10)</sup> らの結論を支持している。

比色法を用いて追試した結果を Fig.1, Fig.2 に示した。Fig. 1, 2 に示されている様に, L-DOPA-tyrosinase 系, 4-MC-tyrosinase 系はいずれも明らかな誘導期間の延長と生成物の減少を認めた。

4-MC を基質に酵素反応後, 粉末 AsA を添加処理した時の UV 吸収スペクトル変化を Fig. 3 に示した。4-MC の酵素酸化生成体 4-methyl-*o*-benzoquinone に基づく 410nm に吸収極大をもつ peak の drastic な消失を認めた。しかし, L-DOPA の時には, UV 吸収スペクトルに全く変化を認めなかった。このことは AsA が生成物の *o*-quinone を可逆的に還元することを示している。L-DOPA を基質にした時の生成物は DOPA quinone ではなく, 更に非酵素的に変換された DOPA chrome であるため, AsA により還元を受けず, UV 吸収スペクトルに変化が認められなかったものと考えられる。

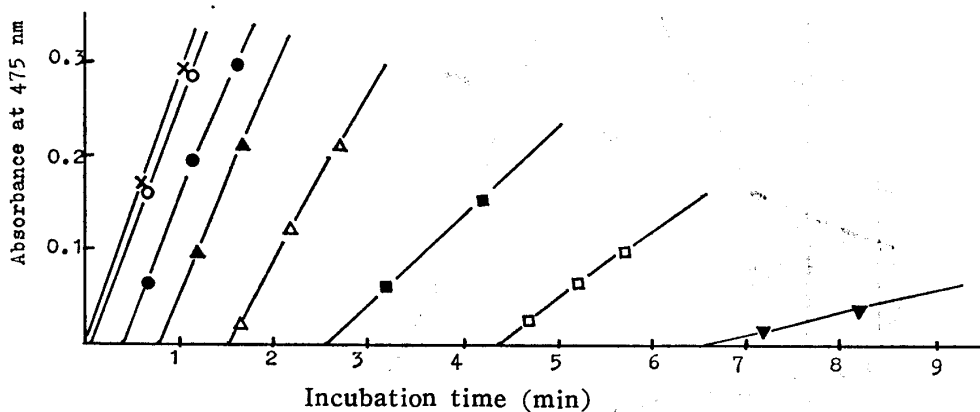


Fig. 1 Effect of Increasing Ascorbic Acid Concentration on the Rate of Enzyme Action at L-DOPA as Substrate

—x— ; no ascorbic acid added, —o— ;  $10^{-5}$ M ascorbic acid added, —●— ;  $5 \times 10^{-5}$ M ascorbic acid added, —▲— ;  $10^{-4}$ M ascorbic acid added, —△— ;  $2 \times 10^{-4}$ M ascorbic acid added, —■— ;  $3 \times 10^{-4}$ M ascorbic acid added, —□— ;  $4 \times 10^{-4}$ M ascorbic acid added, —▽— ;  $5 \times 10^{-4}$ M ascorbic acid added

In each experiment 0.2 ml of enzyme solution (200unit/ml), 3 mM of L-DOPA and ascorbic acid as shown in a total volume 3.2 ml was used.

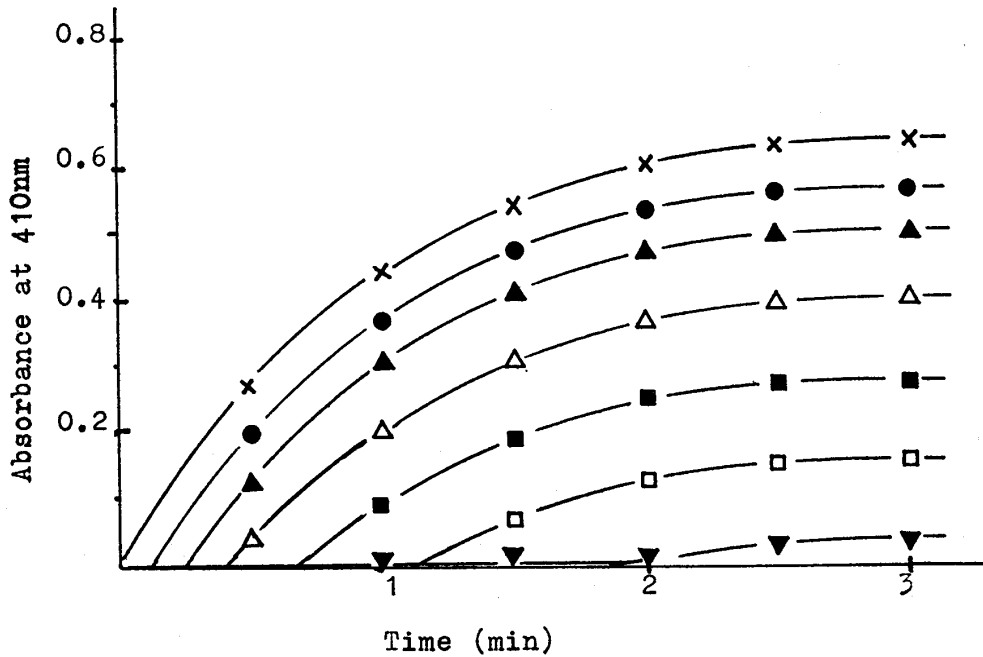


Fig. 2 Effect of Increasing Ascorbic Acid Concentration on the Rate of Enzyme Action at 4-methylcatechol as Substrate

—x—; no ascorbic acid, —●—;  $5 \times 10^{-5} M$ , —▲—;  $10^{-4} M$ , —△—;  $2 \times 10^{-4} M$ , —■—;  $3 \times 10^{-4} M$ , —□—;  $4 \times 10^{-4} M$ , —▼—;  $5 \times 10^{-4} M$

In each experiment 0.2ml of enzyme solution (200 unit/ml) 3 mM of 4-methylcatechol and ascorbic acid as shown in a total volume 3.2ml was used.

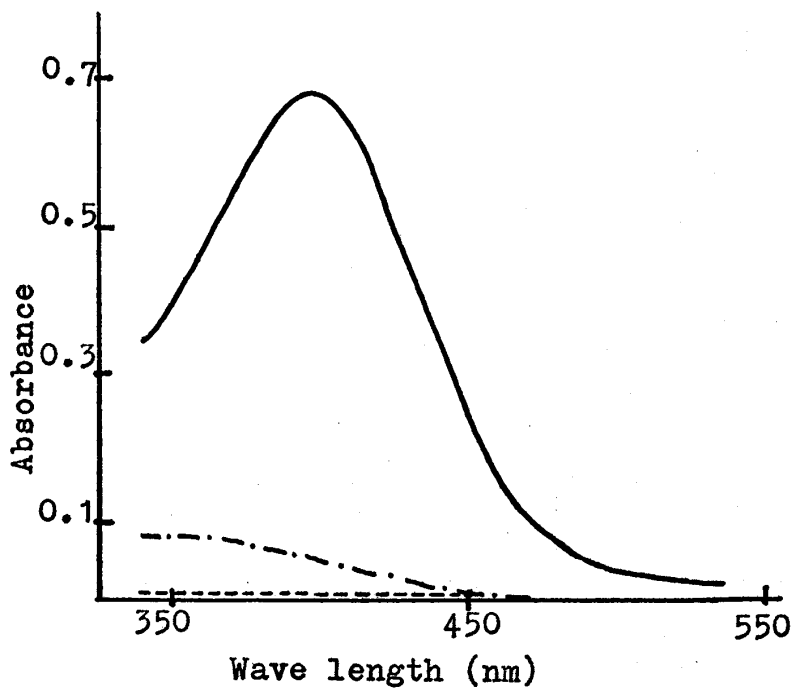


Fig. 3 Effect of Ascorbic Acid on UV Spectrum

To 3ml of 4-methylcatechol (final 3mM) dissolved in 50mM acetate buffer at pH 6.0 (----), 0.1ml of tyrosinase solution (200unit/ml) was added. After incubating at  $30^\circ$  for 2min (—), 0.1ml of ascorbic acid (final concentration;  $5 \times 10^{-4} M$ ) was added to the reaction mixture and immediately measured UV spectrum (-.-.-).

誘導期間と AsA 濃度を両対数グラフにプロットした結果を Fig. 4 に示した。その結果, L-DOPA の場合は誘導期間が単純に AsA の可逆的還元に基づくと考えた時の理論的勾配 (45°) にほぼ一致したが, 4-MC の場合は一致しなかった。このことは, AsA によるチロジナーゼ活性発現までの誘導期間は, ただ単に生成物 *o*-quinone の可逆的還元に基づくという推察と異なる結果である。

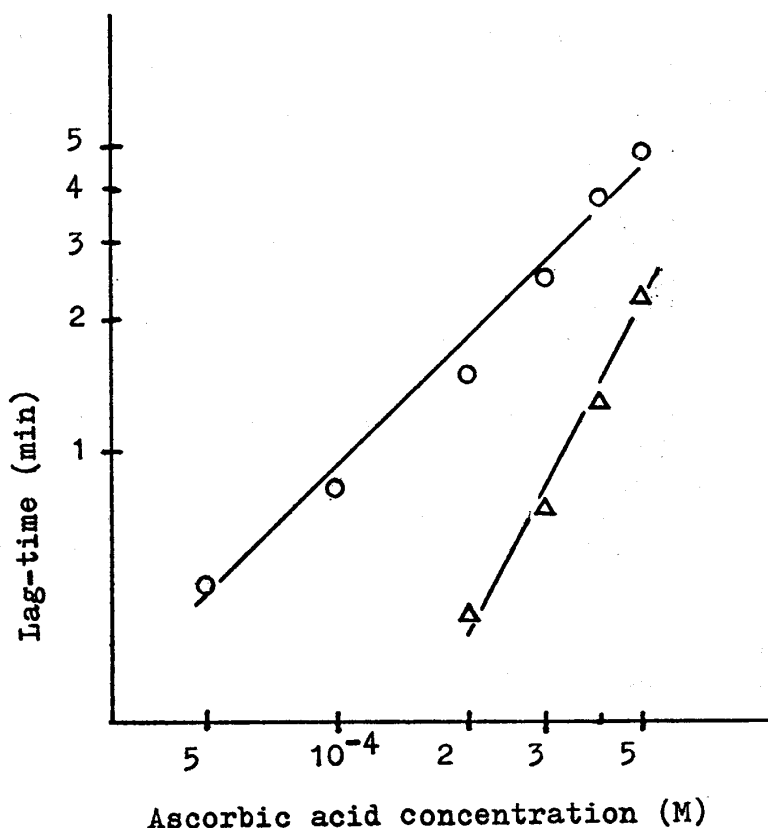


Fig. 4 Relationship between Lag-Time vs Ascorbic Acid Concentration  
 —○—; L-DOPA as substrate, —△—; 4-methylcatechol as substrate  
 The experimental condition was described in Fig. 1 and text.

AsA のチロジナーゼ活性への影響は, 誘導期間の延長と生成物の減少を示す (Fig. 1, Fig. 2) 点にその特殊性がある。誘導期間内での酸素吸収は AsA で影響されないこと, dehydro AsA 自身も酸素吸収に無関係であること<sup>16)</sup> から, 誘導期間の延長と生成物の減少現象を, 単純に AsA の生成物可逆的還元だけでそのすべてを説明することはできない (Fig. 4), しかし, この間, AsA の可逆的還元能が重要な役割を果たしている事は否定できない (Fig. 3)。中嶋らのマッシュェルムチロジナーゼの AsA による阻害機構の研究も同様な推察をしているが, その機構の<sup>15)</sup> 詳細は今だ不明であり, 今後の検討を待たねばならないと思われる。

#### Srreerangacher 法の変法の検討

AsA のチロジナーゼ活性への影響は, 前述した様に今なお不明な点が多い。しかし, 酸素吸収量に影響を与えないこと, 生成物の *o*-quinone が AsA で還元される (Fig. 3) ことから, catechol oxidase 活性の測定に減少する AsA 量を追跡する替りに, 生成する dehydro AsA 量を測定する Srreerangacher 法の変法を検討した。dehydro AsA の定量は, AsA と dehydro AsA とを容易に分別定量できる香川らの方法<sup>10)</sup> を準用した。

#### 1. 比色法と Srreerangacher 法の変法との比較

Fig. 5, Fig. 6 に AsA による誘導期間内での dehydro AsA と dehydro AsA の開環体である 2,3-diketo-

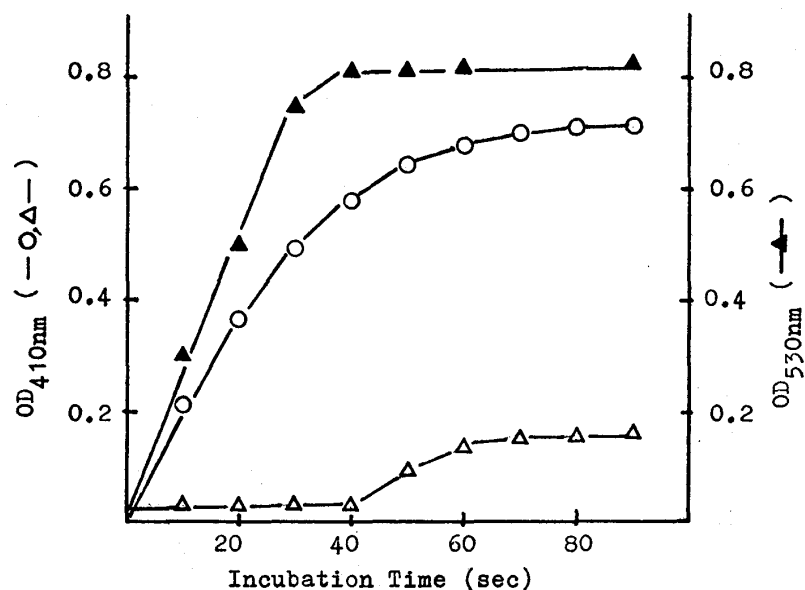


Fig. 5 The Amount of Dehydro Ascorbic Acid and DKG Osazone Derivative during a Lag-Time

The open symbols were determined by the method of Fling et al, and the closed symbols by the modified Srrerangacher method. Concentrations of 4-MC as substrate and ascorbic acid (AsA) were  $2.8 \times 10^{-3}$  and  $4.7 \times 10^{-4}$ M, respectively.

- : control
- △—: added AsA
- ▲—: dehydro AsA and DKG osazone

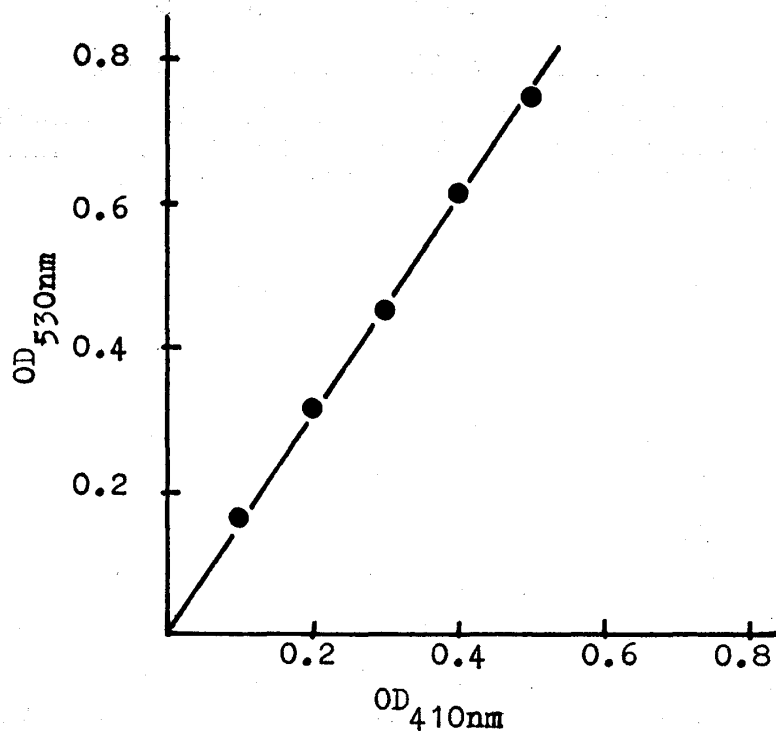


Fig. 6 Relationship between the Colorimetric Method vs the Modified Srrerangacher's Method

The experimental conditions were shown in Fig. 5.

gulonic acid (DKGと略) との総和量を香川らの方法で定量した結果を示した。その結果, dehydro AsA と DKG との総和量と比色法との間には明らかな相関関係が成立し, Fig. 6 からその相関係数  $\gamma=1.5$  であった。このことは, 本法が Srreerangacher 法と等価であり, しかも Fling らの方法にくらべ, 若干感度が優れていることを示している。

## 2. 変性剤の検討

Fig. 7 に示したように, 多用される蛋白質変性剤である trichloroacetic acid, sulfosalicylate, metaphosphate はいずれも本変法に有意な影響を与えなかった。このことは, 比色法あるいは Srreerangacher 法とは異なり, 経時的に反応を追跡することなく一定時間後に反応を停止せしめ, 同時に除蛋白できることを示している。従って, 従来の方法とは異なり, 本法は不溶性酵素試料にも適用できると考えられる。

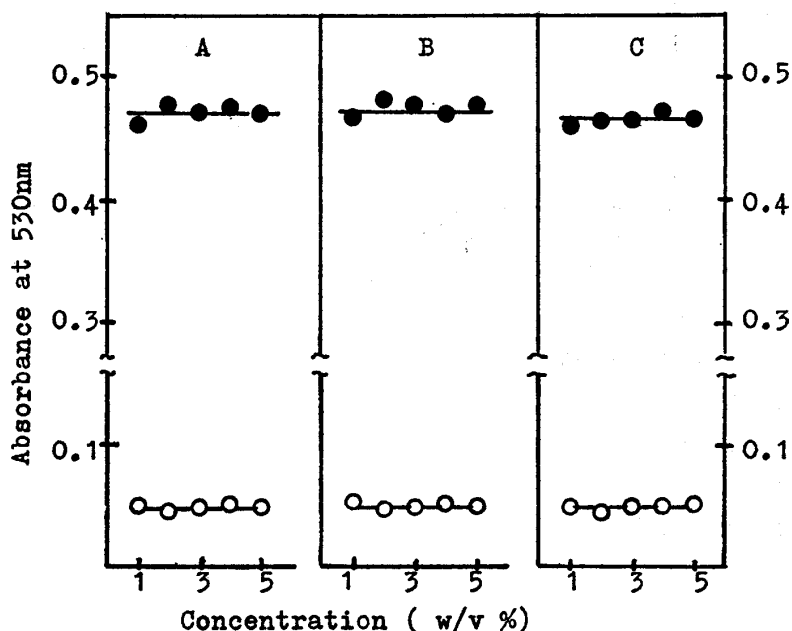


Fig. 7 Effect of the Denaturation Agents on the Formation of Osazone Derivative

A: Trichloroacetic acid

B: Sulfosalicylate

C: Metaphosphate

The experimental conditions were shown in chart 1.

—●—; Test, —○—; Blank

## 3. 基質の検討

各濃度の基質液を用い, 生成する dehydro AsA, DKG との総和量を測定した結果を Fig. 8 に示した。パレイショチロジナーゼは, 4-MC, ピロカテコール, L-DOPA, pyrogallol のいずれとも作用したが, 4-MC に対して最もよく作用した。この基質に対する活性を1.0とした場合, 他の3種に対する相対活性はいずれも約0.2~0.25であった。これら基質との親和力については, Patil らの報告と酷似していた。<sup>18)</sup>

## 4. AsA 量の検討

終濃度  $3.0 \times 10^{-3} M$  4-MC を基質に用い, AsA 濃度と dehydro AsA および DKG との総和量との関係について検討した。その結果 (Fig. 9),  $10^{-4} M$  AsA ではある酵素濃度以上では一定の値を示し, その値は添加 AsA を

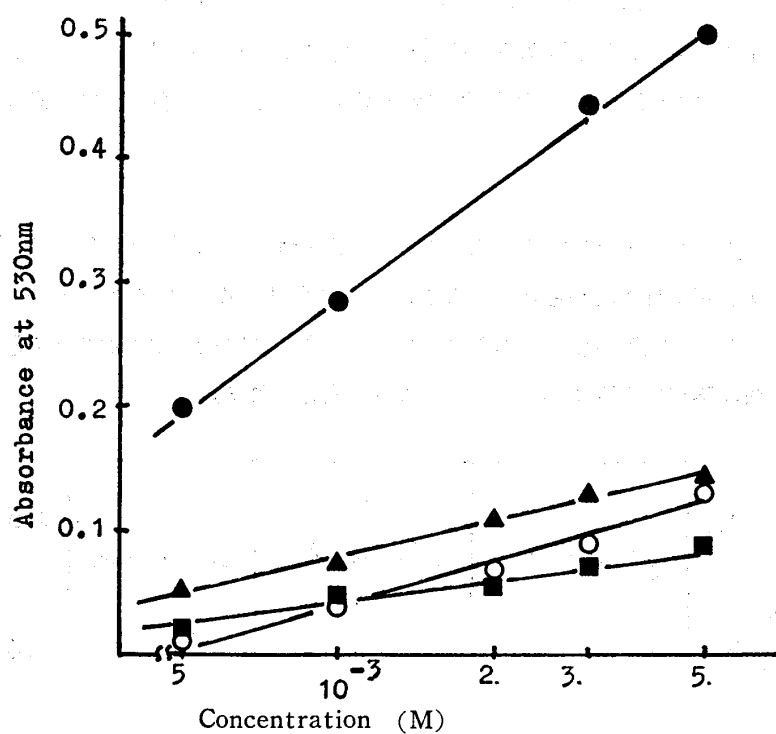


Fig. 8 Effect of the Substrates on the Formation of Osazone Derivative  
The experimental conditions were shown in chart 1.

- : 4-MC
- : L-DOPA
- : Pyrogallol
- ▲— : Pyrocatechol

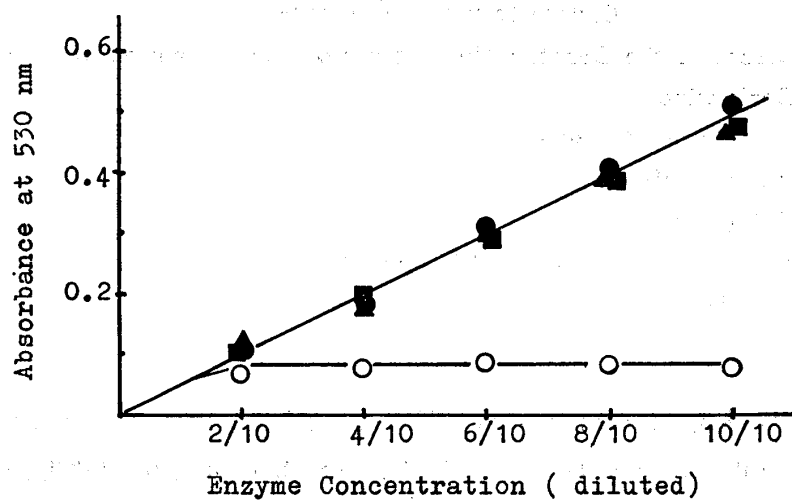


Fig. 9 Effect of Ascorbic Acid (AsA) Concentrations on the Formation of  
Osazone Derivative

The experiment conditions were shown in chart 1.

- ; 10<sup>-4</sup>M, AsA, —▲—; 5x10<sup>-4</sup>M, AsA, —●—; 10<sup>-3</sup>M, AsA,
- ; 3x10<sup>-3</sup>M, AsA



飽和臭素水ですべて酸化した時の dehydro AsA 量と一致した。5 × 10<sup>-4</sup>M 以上の AsA 濃度では、酵素濃度との間に直線関係が成立し、AsA 濃度による有意な差は認められなかった。このことは、AsA の酸化が生成物 o-quinone にのみ依存し、過剰の AsA は容易に dehydro AsA と分別できることを示している。従って、添加すべき AsA 量は基質と等モル以上加える必要がある。

#### 5. dehydro AsA, DKG の osazone 誘導体の安定性についての検討

酵素反応後、dehydro AsA, DKG の 2,4-dinitrophenylhydrazine の osazone 誘導体について、その安定性を検討した結果、室温、60分間、あるいは氷冷下60分間放置しても有意な変化を認めることはできなかった。このことから、dehydro AsA, DKG の osazone 誘導体は室温1時間放置しても充分安定であることが示された。

以上、Srrengacher 法の変法は、蛋白質変性剤を使用できることから、酵素反応の停止、ならびに除蛋白が可能である。osazone 誘導体は、容易に未反応の還元型 AsA と分別定量でき、しかもそれ自身あるいは蛋白質変性剤に対しても充分安定である。このことから、homogenate 等の不溶性懸濁酵素標品にも充分使用可能な、catechol oxidase 活性に特異的な測定法であると考えられる。しかし、AsA を酸化する物質あるいは o-quinone を還元する物質の共存する酵素試料に本法を適用することは原理的に不可能である。

最後に、Laccase, Ascorbate oxidase 等の酵素活性の測定にも本法を応用することができると考えられる。

### 結 論

AsA によるチロジナーゼ活性への影響および catechol oxidase 活性のみを特異的に測定できる Srrengacher 法の変法を検討し、次の結果を得た。

1. AsA はバレイショチロジナーゼ活性を阻害しないが、生成物の減少を認めた。しかし、以前からいわれている様な生成物の可逆的還元だけがその原因とは考えられない。
2. Srrengacher 法の変法は、Srrengacher 法と等価であり、Fling らの方法に比し、若干感度が優れていた。
3. 本法は蛋白質変性剤で全く影響を受けないため、経時的な反応追跡の必要がなく、除蛋白可能なことから、homogenate 等の不溶性懸濁試料にも使用できる。
4. 定量物質の dehydro AsA の osazone 誘導体は、室温60分放置しても、その吸光度に有意な差を認めない安定な化合物であった。

### 参 考 文 献

- 1) Bouchilloux S. McMahill P. and Mason H.S. : *J. Biol. Chem.*, 238, 1699 (1963)
- 2) Stafford H.A. and Dresler S. : *Plant Physiol.*, 49, 590 (1972)
- 3) Long T.J. Och F.F. and Alber J.O. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 146, 64 (1971)
- 4) Taneja S.R. and Sachar R.C. : *Phytochem.*, 13, 1367 (1974)
- 5) Smith J.L. and Krueger R.C. : *J. Biol. Chem.*, 237, 1121 (1962)
- 6) Jolley R.L. Robb Jr D.A. and Mason H.S. : *ibid*, 244, 1593 (1969)
- 7) Fling M., Horowitz N.H. and Heinemann S.F. : *ibid*, 238, 2045 (1963)
- 8) Gutteridge S. and Robb D. : *Eur. J. Biol.*, 54, 107 (1975)
- 9) Srrengacher H.B. : *Biochem. J.*, 37, 653 (1943)

- 10) Ingraham L.L. : *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 5095 (1956)
- 11) Pomerantz S.H. : *J. Biol. Chem.*, **241**, 161 (1966)
- 12) Pomerantz S.H. : *Science*, **163**, 838 (1969)
- 13) Oikawa A. Nakayasu M. and Nohara M. : *Develop. Biol.*, **30**, 198 (1973)
- 14) Varga J.M. Dipasquale A. Pawelek J. McGuire J.S. and Lerner A.B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 1590 (1974)
- 15) 中嶋洋子, 真田宏夫, 鈴江緑江郎, 山崎陽代, 河田正治 : *ビタミン*, **39**, 470 (1969)
- 16) 稲垣長典, 福場博保, 開原宏子 : *同誌*, **28**, 29 (1963)
- 17) Baruah P. and Swain T. : *Biochem. J.*, **55**, 392 (1953)
- 18) Patil S.S. and Zucker M. : *J. Biol. Chem.*, **240**, 3938 (1965)
- 19) Kagawa Y. and Shimazono N. : "*Methods in Enzymology*", Vol. 18A, ed by D.B. McCormick and L.D. Wright, Academic Press, New York, P.46 (1970)