

生体内の鉄及び含鉄成分に関する研究

牛乳過酸化酵素について(其の2)

金森正雄・速水登之助

MASAO KANAMORI·TONOSUKE HAYAMIZU : Studies on Form of Iron and
Iron-containing Material in Living Tissue.
On Lactoperoxidase (part 2)

A 緒 言

動植物各種の peroxidase の物理化学的諸性質, 生理作用, 反応機作等に関して従来 WILLSTÄTTER, KEILIN, SUMNER, THEORELL, CHANCE 等の人々が詳細な研究を行つてゐるのであるが, これら各種 peroxidase の生体内に於ける真の存在意義, 生理作用等に関しては尙不明な点が多く, 最も簡単な substrate の問題すらも解明されておらぬのである。例えば lacto peroxidase は pyrogallol test では horseraddish peroxidase⁽¹⁾ P. Z.= 900 に対して, 僅か P. Z.= 71.5 であり, この差は hemin か protein component かの何れかに存する訳であるが, この問題についても THEORELL⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ 及び CHANCE⁽⁵⁾ 等により enzyme reaction, enzyme substrate compound の性質等の観点から解明がなされつつあるが, 依然としてはつきりした結論が得られぬのである。これら動植物 peroxidase 相互間の基質に対する特異性, 作用能率等には可成顯著な差違があるのであつて, かかる簡単な根本問題の解決すら不可能な現在である

著者等も以上述べた諸問題殊に lactoperoxidase の反応機作, 生体内に於ける当該酵素の役割について研究を進めてゐるが, これに必要な純粋な lacto peroxidase preparation を得るために単離を試みた。元來 lactoperoxidase は ARNOLD⁽⁶⁾ により最初に発見されたもので, 其後 THEORELL, A°KESON, PAUL et al⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ によつて, 最近では POLISH & SCHMUKLER⁽⁷⁾ によつて, それぞれ硫酸分別, 熱処理, Pb-acetate 処理, aceton 処理, electrophoresis, 置換クロマトグラフイ等の方法によつて pure に単離されたのであるが, 著者等もこれらの方法に準じて下記する方法によつて, 極めて強力な lactoperoxidase preparation を得たので, その次第を報告する。

B 実験結果並に考察

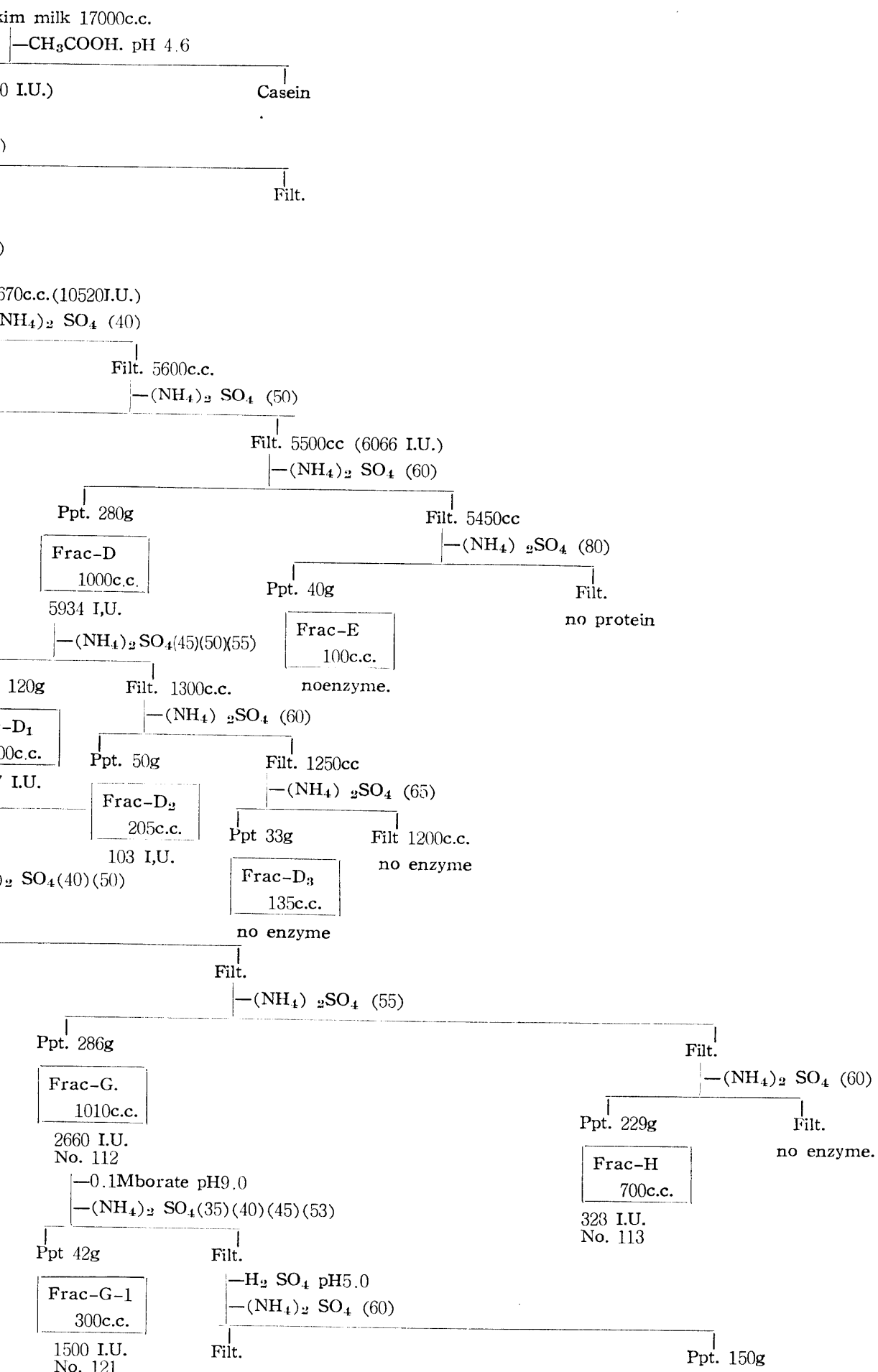
(1) Enzyme Assay.

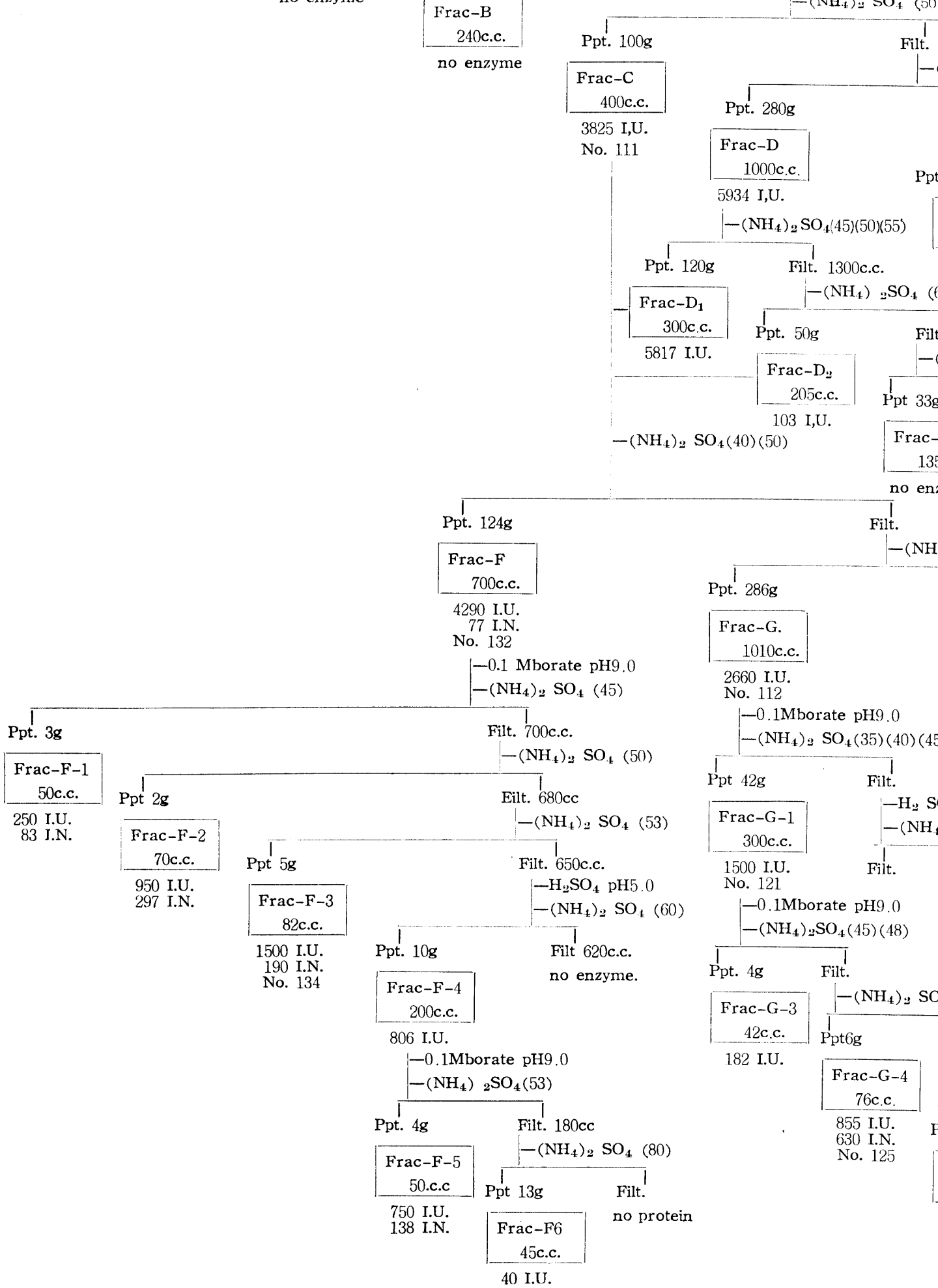
単離中の各 fraction の peroxidase 濃度は先に我々の設定した沃度法により Iodine Unit (I. U.) をもつて表示し, 亦 specific activity は乾燥酵素 1mg の有する I. U. を Iodine Number (I. N.) として表示し purity の標準となした。尙 isolation の進行と同時に 280, 310,

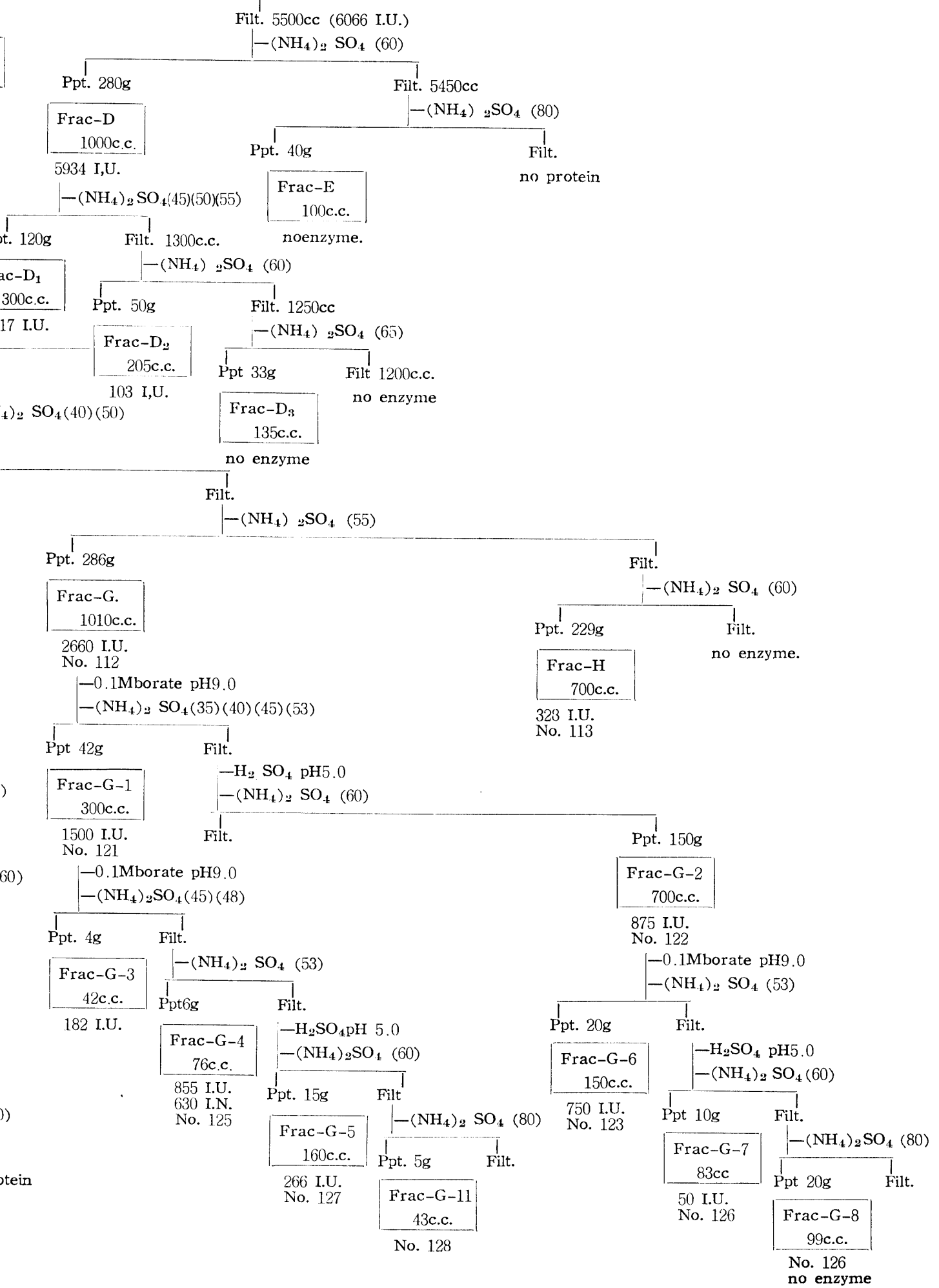
Table-2

		Frac-F-1	Frac-F-2	Frac-F-3	Frac-G-4	Frac-G-6	
3day's dialysed against water at 3°							
		70cc 195I.U.	105cc 677I.U.	138cc 1243I.U.	160cc 728I.U.	130cc 255I.U.	
Ca ₃ (PO ₄) ₂ gel							
		-14cc	-21cc	-58cc	-38cc	-26cc	
Cake							Supernatant
		Frac-F-1-1 Frac-F-2-1 Frac-F-3-1 Frac-G-4-1 Frac-G-6-1					
	-0.1M Na ₂ HPO ₄	81I.U.	65I.U.	25I.U.	7I.U.	9I.U.	
		0.1M Eluate					
		Frac-F-1-2 Frac-F-2-2 Frac-F-3-2 Frac-G-4-2 Frac-G-6-2					
	-0.2M Na ₂ HPO ₄	12I.U. 88I.N.	137I.U. 563I.N.	32I.U. 417I.N.	84I.U.	45I.U. 117I.N.	
Cake		0.2M Eluate					
		Frac-F-1-3 Frac-F-2-3 Frac-F-3-3 Frac-G-4-3 Frac-G-6-3					
		92I.U. 68I.N.	232I.U. 716I.N.	480I.U. 752I.N.	541I.U. 900I.N. No. 138	128I.U. 786I.N. No. 139	
3day's dialysed against water at 3°							
Ca ₃ (PO ₄) ₂ gel							
Cake							Supernatant.
	-0.1M Na ₂ HPO ₄						
Cake							0.1M Eluate
	-0.2M Na ₂ HPO ₄						
Cake							0.2M Eluate
		Frac-F-1-2G-6-4			Frac-F-3-4 Frac-G-4-4		
		366I.U. 1150I.N. No. 142			219I.U. 1114I.N. No. 143		
					187I.U. 1214I.N.		

ation of peroxidase from cow's winter milk.







414m μ の absorbancy を Beckmann Spectrophotometer にて測定し、沃度法と併用して活度の検定を行つた。

(2) Isolation of Lactoperoxidase.

Table 1, 2, 3 に示す如き方法にて、硫酸分別沈澱、吸着法並に acetone 処理等の方法を混用して isolate を行つた。同時に各 fraction について電気泳動分析及びスペクトル分析を行つた。先づ skim milk 17l. を用ひ N-CH₃COOH にて pH 4.6 となし caseinogen を沈澱除去して得られた whey 中には 12000 I. U. の lactoperoxidase を含有しており、一度これを完沈し

Fig 1 Electrophoretic patterns of isolated fractions

Exp. No.	Electrophoretic patterns		Potential gradient	Buffer	Sec.	Temp.
	Descending	Ascending				
No. 111			3.3	Phosphate buffer pH=8.0 $\mu=0.1$	4920	16°
No. 112			3.5		9300	16°
No. 113			3.3		6600	16°
No. 121			3.1		5820	16°
No. 122			3.0		5760	16°
No. 123			3.2		5700	16°
No. 125			3.3		8100	16°
No. 126			3.0		7380	16°
No. 127			3.0		5700	16°
No. 128			3.2		4200	16°
No. 132			3.1		5820	16°
No. 134			3.3		5160	16°
No. 138			3.1		7020	5°
No. 139			3.6		8280	5°
No. 142			3.1	Acetate buffer pH=5.0 $\mu=0.1$	9000	2°
No. 143			3.9		7200	2°
No. 145			4.3		5980	2°
No. 146			4.0		6000	2°
No. 147			4.1		12120	2°

て後水に溶解し硫安によつて分別沈澱を行ひ飽和度 (40) ~ (50), (50) ~ (60) のFrac-C,D を再び硫安飽和 (40) ~ (50), (50) ~ (55) で分別して Frac-F, G を得たが, 各々の peroxidase unit は 4290 I. U. 2660 I. U. で whey の total activity の約40%であつた。両 fraction の泳動は Fig-1 の No. 132, 112 に示す如くで Frac-F は 3 component より成り Frac-G は大部分 albumin fraction である 2 component から成つてゐた。尙硫安飽和 (55) ~ (60) の部分は No. 113 に示した如く殆ど albumin fraction で僅か peroxidase を含んでゐる。次に Frac-F の純度は 77 I. N. であり, この fraction に $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ を 0.1M になる迄添加すると溶液の pH は 9.0 附近となり, 溶液は暗赤色となる, かかる状態で硫安による分別を更に繰返して行つて Frac-F-1,2,3,4 の 4 fraction を得, 更に Frac-F-4 を今一回 borate による操作を繰返して Frac-F-5 を得た。Frac-F-1,2,3,5 の各々の純度はそれぞれ 83, 297, 190, 138 I. N. であり, 元の Frac-F の 1, 4, 3, 2 倍の純度の preparation を得た。これらの中 Frac-F-3 の泳動を示すと No. 134 の如くで 2 component より成り, 而も Frac-F の fast component が消失してゐることがわかるのであつて, 即ち borate, 硫安処理によつて 1 component が除かれた。同様に Frac-G に borate, 硫安処理を繰返して行い, Frac-G-4,5,7 の各 fraction を得たが, Frac-G-4 の purity は 630 I. N. であつて Frac-F の 9 倍の preparation で, その泳動 pattern は No. 125 に示す如く略同じ割合に含まれる 2 component より成つており impurity の component が減少してゐる。又 Frac-G-7 は大部分が β -lactoglobulin fraction であることが No. 126 の pattern からみられる。

次に硫安分別, borate 処理によつて純度の高くなつた Frac-F-1,2,3 及び Frac-G-4,6 の各 fraction を硫安皆無迄 3日 0° で流水透析を行い, これに $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel を 1/2 容加えて吸着精製を行つたのであるが, enzyme を吸着した gel を 0.1M Na_2HPO_4 で elute すると purity は倍に増し, 更に 0.2M Na_2HPO_4 eluate ではそれぞれ 681, 716, 752, 900, 786 I. N. の純度となつて, 吸着前の preparation の 9, 2, 5, 4, 2 倍に purity は上昇した。尙吸着精製は purity の悪い preparation 程精製結果が良かったのであつて, 大体 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel 吸着後これを 0.2M Na_2HPO_4 で elute すれば, 700~900 I. N. 迄 purity を高めることが可能であつた。更に続いて今一度流水透析, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel 吸着を行つて 1150, 1114, 1214 I. N. の Frac-F-1-2-G-6-4, Frac-F-3-4, Frac-G-4-4 を得て Frac-F の約 17 倍の purity を有する preparation を得ることが出来た。それらの泳動結果は No. 142, 143 に示した如くで 2 component より成つており peroxidase と考えられる component の含量が増大してゐる。

別に Frac-F-5, G-5, G-6 の 3 fraction を同様に borate, 硫安分別を行つて, Frac-K を得てこれを透析した後 0° に於て ice cold acetone を同容添加して得られた沈澱を除去し, 濾液を硫安で完沈し水にとかして, これを流水透析し, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel 吸着, Na_2HPO_4 elute の操作を繰返し, 更に Na_2HPO_4 eluate 中に $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel を投入して吸着精製する方法によつて Frac-K-I-II, Frac-K-I-II' の I. N. 1740, 2250 の preparation を得たが, Frac-F に比し, その純度は約 30 倍のものであつた。acetone 処理によつて不純物である red color fraction が大部分除去されたが, butanol を acetone の代りに使用しても同じ効果があつた。

が activity の loss が多く利用出来なかつた。

isolation 各段階に於ける各 fraction の 280, 310, 414m μ に於ける absorbancy ratio 並に specific activity は Table 4 に示す如くであつた。414/280 は Frac-F で 0.01 であり Frac-K-I- Π , Π' では 0.41, 0.61, 414/310 は Frac-F で 0.09, Frac-K- Π , Π' では 4.06, 4.19 であつた。尙亦 414/280 \times 414/310 は Frac-K-I- Π , Π' では 1.665, 2.556 で略 I.N. と比例した値が得られた。

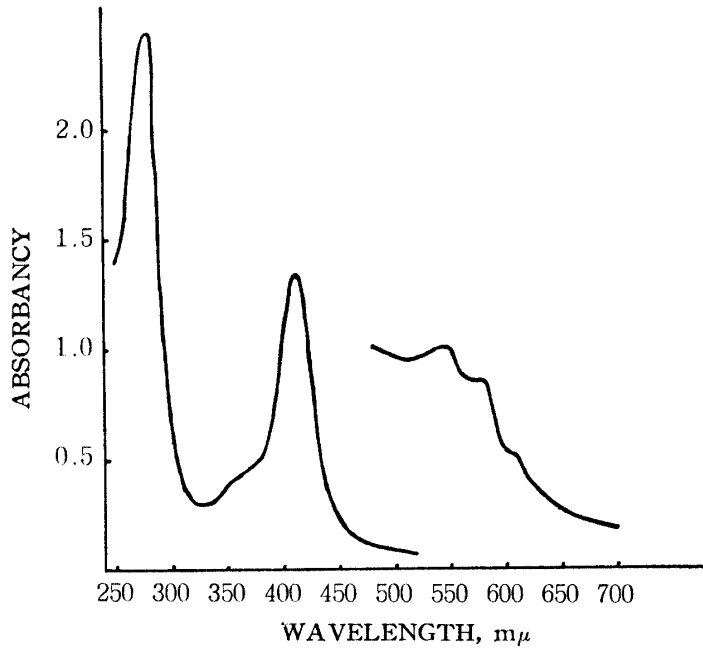
Table 4 Absorbancy ratio and specific activity of several isolated fractions

Fraction	A A414/A280	B A414/A310	A \times B	Specific activity
F	0.01	0.09	0.001	77 I.N.
F-1	0.06	0.22	0.013	83
F-2	0.04	0.17	0.007	297
F-3	0.04	0.17	0.007	190
G-4	0.03	0.16	0.005	630
G-6	0.01	0.07	0.001	—
G-4-1	0.01	0.06	0.001	—
G-4-2	0.02	0.47	0.009	—
G-4-3	0.09	0.62	0.056	900
G-4-4	0.09	—	—	1214
F-3-4	0.09	—	—	1114
F-1-2-G-6-4	0.07	—	—	1150
K-1	0.09	1.96	0.176	—
K-2	0.10	0.98	0.098	—
K-3	0.09	0.61	0.055	—
K-4	0.06	0.54	0.032	—
K-5	0.05	0.34	0.017	—
K-6	0.07	0.56	0.039	—
K-1-I	0.04	0.43	0.017	—
K-1-II	0.41	4.06	1.665	1740
K-1-II'	0.61	4.19	2.556	2250
K-1-III	0.19	0.74	0.147	—
K-2-4-V	0.08	0.68	0.054	—
K-2-4-VI	0.05	0.27	0.014	—
K-3-5-6-VII	0.05	0.23	0.013	—
K-3-5-6-VIII	0.05	0.21	0.011	—

次に Frac-F-1-2-G-6-4, Frac-F-3-4, Frac-K-1- Π , Frac-K-1- Π' の各 fraction の電気泳動結果は No. 142, 143, 146, 147 に示した如くで、各 fraction に於ける component の mobility は at 2°C, $I/2=0.1$, pH 5.0 acetate buffer, potential gradient 3~4 volt cm⁻² に於て $-0.75, -3.5 \times 10^{-5}$ cm² volt⁻¹ sec⁻¹ であつたが、果して何れが peroxidase に属する component なりやは判然としないのであり、又これ以上の component に分れないか如何かも不明である。然して lactoperoxidase も horse radish peroxidase と同様に lactoperoxidase, A,B の2つより成り、SCHMUKLER⁽⁷⁾によると pH5.0 acetate buffer でこの A,B はそれぞれ

-2.84, $-3.94 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ の mobility を有してゐると報告してゐるのであつて著者等は更にこの fraction について各種 pH による電気泳動分析を行つて詳細検討中であるが、著者等の分離した lactoperoxidase preparation 中には lactoperoxidase A, B とこれに

Fig. 2 Absorption spectrum of fraction K-1-II' obtained with Beckmann Spectrophotometer.



mobility の近似な impurity が含まれてゐるものと推定される。

Frac-K-1-II' の Beckman Spectrophotometer による結果は Fig-2 に示した如くで、280, 414, 540, 580, 610m μ に max. の吸収を示した。この結果を THEORELL,⁽²⁾ SCHMUKLER⁽⁷⁾ の値と比較すれば純度は僅か劣るが可成り純度の高い preparation であることが認められる。

終りに終始御懇篤な御指導御鞭撻を賜つた恩師京都大学教授近藤金助先生に深甚の謝

意を表する次第である。尙本研究の一部は文部省科学研究費助成補助金によつて遂行されたもので、茲に附記して謝意を表する。

C 要 約

冬期牛乳より硫酸による分別沈澱, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 及 acetone 処理, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel 吸着等の操作によつて I.N. 2250 の極めて高活性の lactoperoxidase を分離した。

文 献

- (1) H. THEORELL & A° A° KESON ; *Ark Kemi Mineral Geol* **B17** No. 71 (1943)
- (2) H. THEORELL & K.G. PAUL ; *ibid* **A18** No. 1210 (1944)
- (3) H. THEORELL ; *ibid* **A16** No. 2 (1942)
- (4) H. THEORELL & K. O. PEDRSON ; "*The Svedberg*" *Almqvist & Wiksell, Uppsala* (1944)
- (5) B. CHANCE ; *J. B. C.* **151** 553 (1943)
 - 〃 *ibid* **180** 947 (1949)
 - 〃 *ibid* **197** 577 (1952)
 - 〃 *Acta chem. Scand.* **1** 236 (1947)
 - 〃 *Nature* **161** 914 (1949)
 - 〃 *Arch, Biochem.* **21** 416 (1949)
 - 〃 *ibid* **22** 224 (1949)
 - 〃 *ibid* **24** 389 (1949)

- 〃 *Science* **104** 204 (1949)
〃 *Biochem. J.* **46** 387 (1950)
〃 *J. A. C. S.* **72** 1577 (1950)
(6) C. ARNOLD ; *Arch Pharm.* **219** 41 (1881)
(7) B. DAVID POLISH & H.W. SCHMUKLER ; *J. B. C.* **201** 475 (1953)
(8) 金森・湯塩：西京大報告，農學，**5** 63 (1953)

Summary

We isolated lactoperoxidase from cow's winter milk by means of fractionation with ammonium sulphate, sodium tetraborate and acetone, and adsorption method with tricalciumphosphate. Then we obtained the highly active lactoperoxidase preparation which had the activity of I.N.=2250.