

エビのチロシナーゼに関する研究—I.

活性測定方法及び二, 三の酵素化学的性質,
該酵素の体内分布並びにその活性*

藤井 実・片岡一治・坂田 修

Studies on the Tyrosinase of Prawn (*Penaeus orientalis* KISHINOUE) I.

Several Enzymatic and Chemical Properties, Distribution and Activities of Tyrosinase, with Special Reference to Determination of the Activity by Colorimetry of the Tyrosine Using of α -Nitroso- β -Naphthol as Indicator*

By

Minoru FUJII, Kazuharu KATAOKA and Osamu SAKATA

- 1) The degree of red colour originated to the tyrosine in case of using of α -nitroso- β -naphthol is relative to the tyrosine quantity until 1.5 mg of tyrosine. The standard curve, therefore, can be drawn between the ratio of the percent of transmittance by the spectrophotometer and the concentration of tyrosine.
- 2) Optimal pH value of tyrosine-activity for internal organs is about 6.8 and optimal temperature is about 40°C. The activity of this enzyme was completely inactivated by heating for more than 45 minutes at 97°C. The tyrosinase-activity for intestines was *ca.* two times stronger than that of another portion and the activity for muscle (portion of tail-end) was similar to that of internal organs.

緒 論

エビ(大正エビ)は捕獲されてから後の変質が, 硬骨魚類に比較して著しく早く, その内でも黒変現象はエビの品質を著しく低下させるものとして最もいやがられる。この黒変現象の原因の一つとしてチロシナーゼの影響が考えられる。チロシンはチロシナーゼにより酸化されて, 3,4-ジヒドロキシ-フェニール-アラニン(3,4-dihydroxy-phenyl-alanine)となり更に非酵素的に酸化, 重合の過程を経てメラニン(melanine)になると考えられるが, エビの体内に存在するチロシンとチロシナーゼがこの黒変現象の第一段階

* 水産講習所研究業績 第383号, 1962年5月31日 受理。
Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 383.
Received May 31, 1962.

に関与するであろうと考えるのは当然である。このような考えの下に柿本¹⁾等はエビにおけるチロシナーゼの分布と黒変の関係を追究した。そしてエビの各器官に於けるその強弱を比較した結果、その活性は血液が最高で胃、腸、肝臓、生殖腺、筋肉の順に低下する。又チロシンの含量は肝臓、生殖腺、胃に多く、血液には含まれないと述べている。著者等もエビのチロシナーゼに就いて研究を行ないつつあるが、今日まで示されているチロシナーゼ活性測定法は定性的であって定量的方法として満足すべきものが見当たらないので、先ず定量方法を確立し、この定量法をもってエビチロシナーゼの酵素化学的性質の二、三を検討し、更にチロシナーゼの体内分布及びその強弱を測定した。そして従来の見解と異なる知見を得た。

実 験 の 部

I 活 性 測 定 法

1) 標準検量線の作り方

高野²⁾はチロシンの定量法として α -ニトロソ- β -ナフトール (α -nitroso- β -naphthol... α - β 試薬と略す) を発色剤として使用して、ジャガイモの皮に存在するチロシナーゼを分光光度計で比色定量した。著者等はこの高野の方法を参考とし、 α - β 試薬及びチロシンの使用量及びその実施条件等について検討を加え、発色の条件を決定した。実験に使用したチロシン濃度はすべて 30 mg/100 ml のもので α - β 試薬は常温で水に飽和したものを使用した。

2) チロシンの使用濃度の決定

α - β 試薬 15 ml に対しチロシン溶液の使用限界を求めた。即ち α - β 試薬 15 ml 宛を各 100 ml 容三角瓶に入れ之にチロシン溶液を順次 1, 2... 5 ml 宛加え蒸留水を夫々順に 7, 6... 3 ml 宛加える。次に 2.5 規定硝酸溶液 1 ml, 20% 塩酸 6 ml を各瓶に加えて各試料の全容量を同一とした後、各瓶を沸騰水中に入れて内部液温が 90°C に達してから正確に 2 分間加熱し発色 (赤色) させた後、流水で冷却し常温になし各試料を蒸留水で 50 ml とする。対照はチロシンの代わりに蒸留水を使用しその他の条件は全く同様にしたものである。あるこの対照をメーターの 100% に合わせて波長 500 m μ で得た各試料の透過率を示すと第 1 表及び第 1 図の通りである。

第 1 表、第 1 図から明らかな様にチロシンが 3 ml (即ちチロシン 0.9 mg) まではチロシン濃度とその赤色度は比例の関係にあることが判った。そこで分光光度計に使用されている電流計の感度³⁾ 上からメーターの中央の部分 20~70% の範囲を使って標準検量線を作った。即ち第 1 表で示される試料 1, 2, 3 及び 6

Table 1. Transmittance to the various concentrations of tyrosine.

Sample No.	1	2	3	4	5	6 (control)
Tyrosine (ml) (30 mg/100 ml)	1	2	3	4	5	—
α -nitroso- β -naphthol (ml)	15	15	15	15	15	15
2.5 N HNO ₃ (ml)	1	1	1	1	1	1
20% HCl (ml)	6	6	6	6	6	6
Distilled water (ml)	7	6	5	4	3	8
Transmittance (%)	70.9	50.2	36.3	33.6	30.0	100

Note: The total solution of reaction after development filled with distilled water to 50 ml.

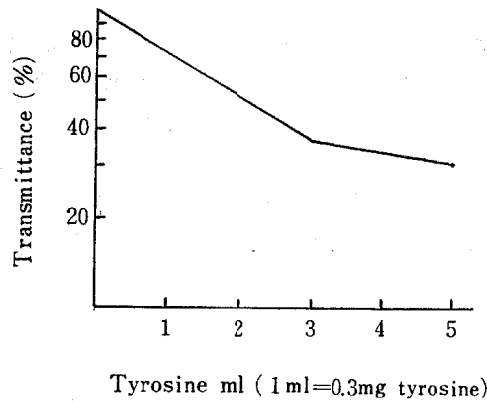


Fig. 1. Transmittance (%) to various concentration of tyrosine.

を使用し No. 3 の赤色をメーターの透過率 20% に合わせて 500 m μ の波長で試料 2, 1 及び 6 の比較値を求め之を片対数紙上に記録して此等の点を結ぶ線を検量線とした。その関係は第 2 表及び第 2 図で示される。

Table 2. Transmittance for correspondence to the various concentrations of tyrosine.

Sample No.	3 (control)	2	1	6
Tyrosine (ml) (30 mg/100 ml)	3	2	1	—
α -nitroso- β -naphthol (ml)	15	15	15	15
2.5 N HNO ₃ (ml)	1	1	1	1
20% HCl (ml)	6	6	6	6
Disilled water (ml)	5	6	7	8
Transmittance (%)	20.0	27.8	37.9	53.9

Note: The total solution of reaction after development filled with distilled water to 50 ml.

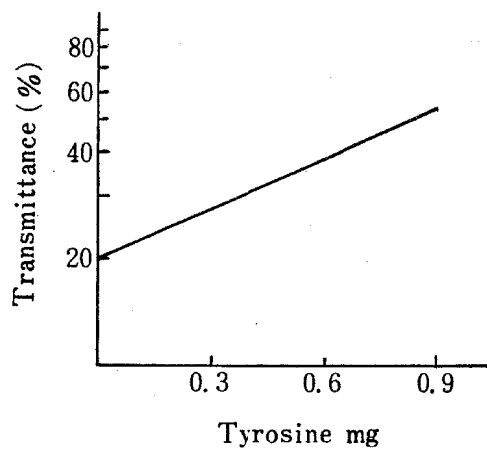


Fig. 2. Tyrosine (mg) decomposed by the action of tyrosinase, corresponding to the transmittance (%).

3) 活性測定実施法

酵素試料をそのまま或いは稀釈してその一定量を予め40°Cにした混合液(チロシン溶液3mlにpH6.8の緩衝液10mlを混合)に加えて1時間40°Cに保った後上記の如く発色剤 α - β 試薬及びその他の試薬を添加して発色させる。対照は、チロシン反応液に予め α - β 試薬及びその他の試薬を添加したものに酵素試料を添加し直ちに加熱発色させて得たものである。この対照をメーターの透過率20%に合わせ、之を標準として試料の比較透過率を求め之を標準検量線上に求め、之に対応するチロシンの分解量から酵素液1ml又は固体試料1mgに対する分解量(mg)を求めて之をチロシナーゼ活性とする。

II 酵素化学的性質

1) 至適 pH について

試料として新鮮内臓(処理直前まで生かしていたもの)に水及び珪砂を添加してよくすりつぶし、その上澄液を使用した。即ち各種 pH の緩衝液を添加したチロシン溶液に同一量の酵素試料を添加して1時間反応させた後常法の如く発色させる。次に各 pH に応ずる夫々の対照を作り夫々の対照に比較して得た値を示すと第3表の通りである。

Table 3. Optimal pH of tyrosinase.

pH	6	6.5	6.8	7	7.5	8
Transmittance (%)	26.0	27.0	28.1	27.5	25.6	25.0

2) 至適温度について

試料は上記と同様である。試料一定量を30, 35, 40, 45及び50の各温度でpH6.8, 1時間反応させた後常法の通りに比較値を求めた。第4表はその結果を示す。

Table 4. Optimal temperature of tyrosinase.

Temperature (°C)	30	35	40	45	50
Transmittance (%)	48.0	48.3	50.0	48.8	48.1

第3表の結果は該酵素の至適 pH は6.8であることを示す。第4表の実験で温度を5°Cの差にとったことは試料が残り少なかったためであって、40°C前後の温度を更に細かくとるべきであった。しかしこの実験の示す通り40°Cの場合の値は35°Cの夫よりも45°Cの値に近い数値を示している。柿本²⁾は、イセエビの血液のチロシナーゼの至適温度を37°Cと示したが、この場合の反応時間は24時間という長時間であり、之に反し著者等は1時間という短時間である。従って反応時間が短いほど至適温度は高くなるということからこの実験条件では一応40°Cを至適温度として差支えないと思う。

3) 失活温度

上記酵素試料をpH7に於て加熱し、内部液温が97°Cに達してから一定時間加熱を続けた後冷却常温にした後常法の通りチロシン反応液に作用させ、然る後発色させた。15分間加熱のものをメーターの透過率20%に合わせて之に対して得られた他試料の比較値を第5表で示す。

次表で示されるようにエビチロシナーゼは97°Cで45分間加熱して始めて失活するものようで、熱に

Table 5. Influence of heating at 97°C on the activity of tyrosinase (Blank: No. 2).

Sample No	1	2	3	4	5	6
Heating time (min)	7	15	20	30	45	60
Transmittance (%)	20.1	20.0	19.9	19.0	18.5	18.5

対する抵抗性が非常に強く、之を硬骨魚類のプロテアーゼが 97°C, 4 分間で失活するのに比較すれば一つの特異性を示していると考えることが出来る。

4) エビ体内に於ける該酵素の分布及びその活性

エビを内臓、筋肉及び背綿(腸管)に分ち筋肉を更に3分して頭部接着部より順に頭部、中部、尾部と区分する。これら試料を蒸留水でよく洗滌した後、濾紙で軽く圧して蒸留水をふき取った後ハサミで出来るだけ細切し、その一部を使用して重量測定後水分を定量する。更に他の一部を秤量した後海砂を加えて搗碎し pH 7 の緩衝液を加えて混和した後、遠心分離(12,000rpm)して得た上澄液を一定量にした後その一部を酵素試料として常法の通り反応後発色させ、同様に処理して得た対照との比較値を求め之を検量線にあてはめて分解チロシナーゼを求めた。そして更に固体量(絶乾量) 1 mg に対する分解量を求めてその活性を比較した。得た結果は第6表の示す通りである。(実験はエビ内臓チロシナーゼの酵素化学的性質をもとに行なった)

Table 6. Tyrosinase activity of various organs in prawn (*Penaeus orientalis* KISHINOUE).

Organs	Internal organs excepting intestines	Muscle (head)	Muscle (middle)	Muscle (tail)	Intestines
weight of dry matter (mg)	1.228	1.312	1.150	1.023	0.396
Transmittance (%)	30.4	29.4	29.3	28.7	27.7
Tyrosine decomposed (mg)	1.025	0.925	0.920	0.850	0.775
Activity / 1mg of dry matter	0.835	0.705	0.800	0.831	1.982

上表の結果から意外にも内臓の活性は他部位の夫れに比して特に強いというわけではなく逆に背綿(腸管)は内臓の2倍以上の活性を示し、筋肉部も夫々内臓に劣らない値を示し、又筋肉の部位では尾部を含む筋肉の活性がやや強い活性を示した。筋肉に附着する血管は可及的に除去したのであるが、筋肉中に散存する又は毛細管中に残存する微量の血液の完全除去は困難である。しかしこの筋肉部に存在する血液量は内臓部に存在する血液量に比較して非常に微量であろうと推定されるのにも拘らず、筋肉部にかかる強力な活性が示されたことはチロシナーゼが単に血液中のみならず筋肉それ自体の中にも相当量存在することを明示するものである。

総 括

エビのチロシナーゼの研究を行なうため α -ニトロソ- β -ナフトール試薬を発色剤とする比色定量法を制定し、この方法に基づいてエビ内臓チロシナーゼの二、三の酵素化学的性質を検討し、更にチロシナーゼの体

内分布及びその活性を求めた。その結果は次の通りである。

1) α -ニトロソ- β -ナフトールはチロシンの一定濃度以内で之と反応してその濃度と比例的な発色をする。従ってチロシン濃度とその発色度の関連を示す標準検量線を求めることが出来た。

2) 内臓に於ける該酵素の二、三の酵素化学的性質を検討した結果、その至適 pH は 6.8, 至適温度は 40°C を得た。又 97°C で 45 分加熱すると失活する。

3) 1)の検量線を利用してチロシナーゼの体内分布及びその活性を求めたところ、背綿が最も強く他部位の 2 倍強の活性を示した。次に内臓、筋肉の順であったが、特に尾部筋肉には内臓に劣らない活性が示された。最後に、この実験を行なうにあたり貴重な試料を提供された大洋漁業研究室に対し感謝の意を表します。この論文の要旨は日本水産学会支部例会（昭和37年 5 月下旬市）で講演した。

文 献

- 1) 柿本一壺・金沢昭夫, 1956: 日水誌, **22**.
- 2) 高野 トミ, 1961: 日化総, **35** (東女医大誌, **30**, 1960).
- 3) 柳沢 文正, 1955: 光電比色計の実際. 共立出版株式会社, 東京.