報 文

キサンテン系食用色素の光化学反応による トリプシン失活の機構

1. 酸素の影響について

(昭和 46 年 6 月 7 日受理)

村上浩紀^{*1} 坂田幸平^{*2} 波多野昌二^{*1} 渡辺忠雄^{*1}

Mechanism of Inactivation of Trypsin by Photo-chemical Reaction of Xanthene Dyes

1. On the Effect of Oxygen

Hiroki MURAKAMI^{*1}, Ko-hei SAKATA^{*2}, Shoji HATANO^{*1} and Tadao WATANABE^{*1}

(^{*1} Faculty of Agriculture, Kyushu University: Fukuoka; ^{*2} Meiji Sugar
Manufacturing Co., LTD. Tobata Refinery: Kita-kyushu)

Inactivation of trypsin in the presence of xanthene dyes was observed through the irradiation of visible ray, but not observed in the dark. As the substrate for trypsin, rose bengale-bound casein was only 80% effective as compared with untreated casein.

The inactivation under the visible ray was accelerated by the elimination of the air, and was prevented in the atmosphere of oxygen. It was assumed that those xanthene dyes inhibit the trypsin activity *via* triplet energy transfer. Since the presence of oxygen was essential for the photo-degradation of tryptophan and histidine by rose bengale, it was suggested that photo-inactivation of trypsin was induced without degradation of amino acid residue in the trypsin molecule.

(Received June 7, 1971)

緒 言

キサンテン系色素が光化学的作用を有することはよく知られており¹⁾, すでに宮沢ら^{5), 6)}は本色素による *Flavobacterium* の致死効果の発現がその光増感酸化反応に基づくものであることを報告している。

食用色素は体内に摂取されたのち代謝作用により種々の産物を生成する。一方食品に添加された色素は食品の製造工程中、あるいは保存中にも変化することが考えられ、その変化が食品の性質を低下させる可能性があり、さらにこのように変化した色素は未変化色素に対する安全性の基準には必ずしも合致しない場合があることも想像される。

これらの観点からキサンテン系色素が種々のタンパク

質におよぼす影響について検討し、今回はトリプシンを用いて、本色素が光存在下にのみ酵素を失活させ、この失活が酸素分子によって抑制されることを明らかにした。

実 験

1. 色素液の調製: 使用した色素は国立衛生試験所標準品のローズベンガル、フロキシン、エリスロシンおよびアシッドレッドであった。またフルオレセインナトリウム塩は市販フルオレセイン(和光純薬製、特級)を希水酸化ナトリウム液によりナトリウム塩にしたのちエタノールから再結晶して用いた。これらの色素は 4×10^{-3} M 水溶液として調製し、密せんで冷暗所(4°)に保存した。この溶液は一週間以上にわたって使用することはなかった。

2. 酵素液の調製: トリプシン(和光純薬製)を

^{*1} 九州大学農学部: 福岡市箱崎

^{*2} 明治製糖戸畑工場: 北九州市戸畑

10^{-2} N 塩酸 (pH 2) に溶解したのち、酵素剤中の安定剤を除去するために冷暗所 (4°) で希塩酸中で透析した。これを $O.D._{280\text{ m}\mu}:10.5$ となるように希塩酸で希釈し、原液として 3 ml 宛小試験管に分注し凍結保存した。この原液を 5×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で70倍に希釈したものを酵素液として用いた。この酵素液は使用前に、以下に述べる酵素反応系(色素無添加)でカゼインの分解力を検定し、 37° 、90分間の保温によって銅-フォリン法による酸可溶性画分の発色が $O.D._{750\text{ m}\mu}:0.7$ 以下の場合には使用しなかった。酵素原液を上記のようにして保存すれば少なくとも1か月以内ではこの値から変動することはなかった。

3. 酵素反応: カゼイン (Hammersten 製) を 2.4 % 溶液になるように 5×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中に加温溶解した。このカゼイン溶液に同量の 0.44 M トリクロル酢酸(TCA)を加えて沈殿させたとき、上澄は銅-フォリン試薬によっては発色が認められなかった。

反応液の組成は、カゼイン液 0.5 ml、酵素液 0.5 ml、色素液 (あるいは蒸留水) 0.5 ml および 5×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1.5 ml からなり、 37° 、90分保温後その 1 ml をとり、1 ml の冷 0.44 M TCA を加え、酸可溶性画分を銅-フォリン試薬によって発色させ $O.D._{750\text{ m}\mu}$ で比色測定した。

トリブシンはこの測定条件下では経時的に部分失活する。したがって本報で示した酵素の失活度は反応初速度の比較で求めたものではない。

アシッドレッド、フルオレセインを除いては反応液中の色素はTCAによってほとんど完全に沈殿するか、あるいは銅-フォリン反応に際して希釈され、比色定量を妨害することはなかった。アシッドレッド、フルオレセインのように色素の吸収が発色操作時に混入する場合には、これらの色素を相当する濃度に希釈後、TCA および銅-フォリン試薬を混合したものを盲検値として用いた。

なお酵素反応はすべて遮光下で行ない、TCA 添加により反応を停止させたのち明所で操作した。

4. 空気中でのトリブシン-色素に対する光照射: トリブシン溶液 3.5 ml、色素液 3.5 ml を内径 8.7 cm の底面のなめらかなペトリザラ中にとり、一様に広げた。このとき液の厚さは平均 1.3 mm であった。ふたをしたのちペトリザラの周囲を氷冷し、東芝けい光ランプ (FL 10/NL, 10 W) を液面から 10 cm の距離に保持して照射した。液面における照度は 1600 Lux. であった。30分間の照射によっても液表面の温度上昇はほとんど認められず、 $2 \sim 4^{\circ}$ であった。一定時間照射後、ペトリザラを振とうして光照射および空気の影響を均一化したのち、その 1 ml をとり酵素活性を測定した。

5. 脱気下でのトリブシン-色素液に対する光照射: ツンベルク管の主室に酵素液 1.5 ml、副室に色素液 1.5 ml を入れ、約 25 mm Hg で暗所、氷冷下にとときどき振

とうしながら吸引した。そののち両液を混合し、ツンベルク管を氷片上にならべ、約 5 cm の距離から前述の光源で照射した (6.4×10^3 Lux.) 一定時間ごとにその 1 ml をとり暗所で開せんしたのち、酵素活性の測定を行なった。管中の溶液に光照射を行なうときには管のガラス壁や内容液の厚さが増加することによって光照射の効果が減少するので脱気の効果をしらべるためには、脱気しないツンベルク管を用いて同様な光照射を行なうことによって比較した。

6. 酸素気中でのトリブシン-色素液に対する光照射: 純粋な酸素を得るため、硫酸酸性の過酸化水素と二酸化マンガンから、酸素を発生させ、濃水酸化ナトリウム液 (50%) で洗浄したのち固体水酸化ナトリウムで乾燥したものをを用いた。

ツンベルク管の主室に色素液 1.5 ml、副室に酵素液 1.5 ml を入れ、暗所で色素液中に酸素ガスを導入して可及的に空気と置換したのち密せんして両液を混合した。混合後光照射を行ない、一定時間ごとに酵素活性の測定を行なった。

7. アミノ酸-色素溶液への光照射: イソロイシン、スレオニン、メチオニン、グルタミン酸、トリプトファン、アルギニン、セリン、リジン、ヒドロキシプロリン、フェニルアラニン、バリン、ヒスチジン、シスチン (以上味の素製) およびシステイン (和光純薬製) についてしらべた。0.1%アミノ酸-リン酸緩衝液 1 ml と 4×10^{-3} M ローズベンガル溶液 1 ml をツンベルク管中で脱気後、あるいは脱気することなしに混合し、光源から 5 cm の距離において 8 時間照射した。照射後、混液 50 μ l を東洋濾紙 No. 50 につけ、ブタノール-酢酸-水 (3:1:1) で上昇法により12時間展開した。熱風乾燥後、ニンヒドリン試薬によりアミノ酸の存否をしらべた。この展開溶媒系では色素は先端に移行した。

結果および考察

1. 光照射下での色素によるトリブシンの失活, (A) 空気中での照射: Fig. 1 に示すようにハロゲンを含むキサントニン色素で処理すると、光照射時間が増すにつれてトリブシンの活性の低下度は増大した。また色素を添加していないトリブシン溶液も光照射によって徐々に失活した。

アシッドレッドおよびフルオレセインのように、ハロゲンを含まない色素は酵素の失活度を強めることなく、色素無添加状態のトリブシンに光照射を行なった場合と同様の経過を示した。

これらの色素の照射下におけるトリブシン活性に対する阻害の程度は、フロキシ>ローズベンガル $\geq$ エオシン>エリスロシンの順であった。ただし、この比較は使用した酵素反応系から得られた結果であって、初速度の比較によったものではない。この処理によるトリブシンの活性の減少は吸光度-照射時間のグラフにおいて一

Fig. 1. Photo-inactivation of trypsin in the presence of xanthene dyes

3.5 ml of trypsin soln. in 5×10^{-2} M phosphate buffer (pH 7.5) and 3.5 ml of 4×10^{-3} M aqueous soln. of dyes were placed respectively in flat layer (8.7×0.13 cm), and were exposed to visible ray (Toshiba FL 10/NL, 1600 Lux).

One ml of the mixture was taken out at intervals of 5 min. and the activity of trypsin was measured in the dark using casein as a substrate. One ml of the enzyme soln. used in the measurement contained 0.18 mg of protein.

Decrements of the absorbance at $750 \text{ m}\mu$ by irradiation were shown in Fig. 1 and these solutions were marked as follows: enzyme soln.: ○—○, mixture of enzyme and acid red: ●—●, fluorescein: ●—●, eosine: ●—●, erythrosine: ●—●, rose bengale, ●—● and phloxine ●.....●.

Trypsin was completely inactivated by the second addition of 1 ml of phloxine soln. under the ray, shown by an arrow.

般により直線性をしめした。ただし、フロキシンの場合にはまだ色素が多量に残存しているにもかかわらず、酵素の失活速度が漸減し、フロキシ液 1 ml を 15 分後に再添加すると失活速度の増加が再び認められた。同様のことはローズベンガルについてもみられ、30 分以上の照射によって酵素活性の低下速度は減少したが、色素の再添加によってその失活速度は増加した。これらの事実は本照射反応において色素の不安定な特定の状態が酵素の失活に関与していることを示している。上記の阻害能の順列はその特定状態の生成しやすさを反映していると思われる。

なおこの反応系では以上のように色素が制限要因であり、したがって反応系中の酵素分子数を一定にしておくことが必要であるので、酵素タンパク量および活性をつねに検定して、同タンパク量、同活性を示す酵素液で実験を行なった。

遮光下にローズベンガルと酵素の混液を $2 \sim 4^\circ\text{C}$ で各時間放置しても Table 1 に示すように酵素活性の低下はまったく認められなかった。

色素を添加しなかった酵素も失活がまったく起こらず Fig. 1 で、光照射下では徐々にその活性が低下したとことと比較される。Fig. 1 および Table 1 において、色素と混合したトリプシンの活性が照射時間 0 あるいは放置時間 0 において色素無添加の場合の約 80% であるのは後述するようにトリプシンの基質であるカゼインと色素との結合が冷暗所でも急速に起こり、カゼインの被分解性を低下させたことによるものである。アシッドレッドおよびフルオレセインではこのような現象は認められず、酵素の活性にもまったく影響がなかった。

(B) 脱気下での照射: トリプシン溶液 1.5 ml, 色素液 (4×10^{-3} M) 1.5 ml を脱気下に混合して光照射を行なうと、エオシンおよびフロキシを用いた場合に Fig. 2 a, b の結果が得られた。

脱気下に色素と混合したトリプシンに光を照射すると、脱気しないで光照射した場合にくらべて、照射時間が短い範囲においては酵素の失活速度が著しいことが認められた。このことから空気中には光との協力によってキサンテン系色素がトリプシンの失活を起こす作用を抑制する因子が存在することが唆された。脱気下での色素によるトリプシンの失活は上記のように急速であった

Table 1. Effect of Rose Bengale to Trypsin in the Dark at $2 \sim 4^\circ\text{C}$

	O. D. $_{750 \text{ m}\mu}$ at					
	0 min	5	10	15	20	25
Trypsin + H_2O	0.750	0.755	0.750	0.744	0.751	0.753
Trypsin + rose bengale	0.610	0.620	0.612	0.622	0.608	0.630

Enzyme solution (3.5 ml) was mixed with 4×10^{-3} M of rose bengale solution (3.5 ml) in the dark. The mixture was left for each time indicated at $2 \sim 4^\circ\text{C}$, then the enzymatic activity was assayed.

Fig. 2. Dye-sensitized photo-inactivation of trypsin under the reduced pressure of 25 mm Hg

(a) Eosine 1.5 ml of eosine soln. (4×10^{-3} M) was mixed with 1.5 ml of trypsin soln. (0.18 mg protein) and irradiated in the air or under 25 mm Hg. Enzymatic activity was measured by use of casein as substrate.

(b) Phloxine 4×10^{-3} M of phloxine was used in the same condition as (a).

Irradiation in the air: ○—○, under 25 mm Hg: ●—●.

が、短時間のうちにその速度が低下して、最終的には脱気しない場合にくらべてわずかに高い酵素の失活度を示したにすぎなかった。これは (A) で述べたように、本照射反応が、酵素の失活に関与する特定状態をとりうる色素の量が制限要因となっているような条件下にあることによると考えられる。

(C) 酸素気中での照射: 空気を酸素で可及的に置換して 4×10^{-3} M ローズベンガル液によるトリプシンの失活を光照射下に観察すると Fig. 3 の結果が得られた。光照射下におけるローズベンガルのトリプシン失活作用は脱気によって促進され、酸素の添加によって抑制されることが明らかとなった。

Fig. 3. Dye-sensitized photo-inactivation of trypsin in the atmosphere of oxygen

1.5 ml of rose bengale soln. (4×10^{-3} M) was mixed with 1.5 ml of trypsin soln. (0.18 mg protein) and irradiated in the air: ○—○, in oxygen: ■—■ and under 25 mm Hg: ●—●.

(D) 色素を結合したトリプシンに対する照射: キサントン系色素は光増感作用を有しており、とくにエオシン、ローズベンガルは三重項増感剤としてよく用いられる¹⁾。また本反応系におけるトリプシンの失活が三重項消光剤である酸素分子によって抑制されることは、トリプシンの失活がキサントン系色素の三重項エネルギー移動によって起こることを強く推定させる。しかし色素の光分解中に生成する中間体の酵素への結合、あるいは光照射によって遊離する可能性のある色素中のハロゲン原子¹⁾の酵素タンパクとの結合による失活も考慮する必要がある。

後者については (E) でふれることにし、まず前者の

可能性について検討した。トリプシン原液をリン酸緩衝液で2倍濃度に希釈し、その1 mlに 1.4×10^{-2} Mローズベンガル-リン酸緩衝液溶液1 mlを遮光下に混合したのち、2で述べる方法によってSephadex G-25を用いて色素の結合したトリプシンを得た。このトリプシンのタンパク濃度を銅-フォリン法で定量し、常用する酵素濃度になるようにリン酸緩衝液で希釈した。

Fig. 4. Inactivation of dye-bound trypsin

Preparation of dye-bound trypsin was as followed. One ml of trypsin soln. (12.6 mg protein) was mixed with 1 ml of rose bengale soln. (1.4×10^{-2} M) at pH 7.5. The mixture was left at 0°C in the dark for 10 min. The mixture was gel-filtered with Sephadex G-25 to isolate dye-bound enzyme. Dye-bound red enzyme was adsorbed weakly on dextran. A dye-bound enzyme seemed to contain 8 molecules of dye in it. One ml of dye-bound trypsin soln. (0.18 mg protein) was irradiated with ◐—◐ or without 1 ml of rose bengale soln. (4×10^{-3} M) ●—●. Irradiation to trypsin in the dye solution was shown as ○—○.

この色素結合酵素に照射を行なっても、Fig. 4に示すように、色素無添加のトリプシンの活性変化と同様であり、あらたに色素を添加して照射したときにのみ著しい活性の低下がみられた。この結果は色素の結合は酵素活性の消失に関与しないことを示唆している。

(E) 前照射処理したローズベンガル-トリプシン混液に対する照射：ローズベンガル溶液 (4×10^{-3} M) の

みに空气中、あるいは脱気下に2時間照射を行ない、トリプシンと混合後、空气中で照射をすると、Fig. 5に示すように、空气中で前処理した色素は酵素と混合後照射を行なってもトリプシンの失活を起こすことはなかった。

Fig. 5. Pre-irradiation to trypsin-inactivating dye

- : Irradiation to enzyme soln
- : Irradiation to the mixture of 1 ml of rose bengale soln. (4×10^{-3} M) which was previously irradiated for 2 hours in the air, and 1 ml of trypsin soln. (0.18 mg protein).
- ◐—◐: Irradiation to the mixture of 1 ml of rose bengale soln. (4×10^{-3} M) which was previously irradiated for 2 hours in 25 mm Hg, and 1 ml of trypsin soln. (0.18 mg protein).

一方脱気下に前照射した色素を空气中でトリプシンと混合したのち照射操作を行なうと、トリプシンは急速に失活し、その速度は前照射をしない色素を用いた場合にほぼ一致する。

前照射処理をした色素がトリプシンの失活に対して無効であったことによって色素の光分解産物の影響を無視することができる。さらに空气中で可視光によって励起された色素は、酸素分子によって消光されるとともに不活性な分子種へ不可逆的に変化したが、一方無酸素状態では光照射によって励起された色素は照射を中止すればすみやかに基底状態に移行し、安定に保たれた。

2. カゼインへの色素の結合

Fig. 1 および Table 1 において照射時間0でのトリプシンによるカゼインの加水分解量が色素の存在しない

ときのそれにくらべて約80%にしか達しなかった。この原因を、色素が暗所でカゼインと結合して、生成した色素-カゼイン結合体がトリプシンの作用を受けにくいものに変化したことによるものと推定した。事実これらの色素はタンパク質と結合能を有していることが分光光度法によって証明されている^{2),3)}。

しかし分光光度測定はその性質上光照射を伴うので本法によっては遮光下における反応の性質について検討することはできない。そこでリン酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 カラム (1.8×90 cm) を用い、ゲルろ過

を暗所で行なうことによってカゼイン-色素結合体を遊離の色素から分離した。キサントゲン系色素は Sephadex に吸着するので流出が著しくおくれ、カゼイン-色素結合体を分離するのは容易であった。この操作で得られたカゼインにはその分子量を 3.7×10^5 ダルトンと仮定すると、1分子中に約7個の色素を結合していた。このカゼインをコロジオンバックで濃縮後、基質として用いてトリプシンを作用させると Table 2 に示すように、正常のカゼインにくらべて約80%加水分解を受けたにすぎなかった。

Table 2. Hydrolysis of Normal Casein and Rose Bengale-bound Casein by Trypsin

Casein	O. D. _{750 mμ} of each time of hydrolysis		
	60 min.	75	90
(a) Normal	0.585	0.690	0.735
(b) Rose bengale bound	0.470	0.500	0.535
(b)/(a) × 100	80.0	72.5	73.0

Rose bengale-bound casein was separated from free dye by the use of Sephadex G-25 column

この結果から Fig. 1 の色素無添加のトリプシンと色素添加トリプシンを用いてカゼインを分解したときに認められる、0時における見かけの活性の差の原因を説明することができる。すなわち、光照射後カゼイン溶液と酵素液を混合したときに、酵素溶液中の色素が遮光下にカゼインと急速に結合して基質としての性質を劣化させることによると考えられる。

3. 色素とアミノ酸の反応

前記14種のアミノ酸をローズベンガルと共に脱気下あるいは脱気せずに8時間照射した。空気中で光処理した場合にはトリプトファンおよびヒスチジンが消失しており、これらの消失は照射時間の増加に平行的であった。他のアミノ酸は無処理の場合と変化がなかった。脱気下に光照射したときにはすべてのアミノ酸に異常が認められなかった。

Fig. 6 に各条件下でのトリプトファン およびヒスチジンの挙動を示した。

光照射下でのローズベンガルによるアミノ酸、とくにヒスチジン、トリプトファンの分解には空気が必要であることがわかった。ヒスチジンはローズベンガルの存在下に光酸化を受けることが知られており⁴⁾、これらのアミノ酸の分解には酸素の共存が必要である。

一方トリプシンの失活は色素分子の三重項励起エネルギー移動が関与する現象と考えられ、酸素はこの失活に抑制的であった。これらはキサントゲン系色素による可視光下でのトリプシン失活が酵素分子を構成するアミノ酸の破壊によるものではなく、酵素の高次構造の変化によ

Fig. 6. Paper chromatography of photo-oxidized tryptophan and histidine

Visible ray was irradiated to the mixture of rose bengale (2×10^{-3} M) and tryptophan (2.5×10^{-3} M) or histidine (3.22×10^{-3} M) in the air or under 25 mm Hg. Solvent system: Butanol: acetic acid: water = 3:1:1. Rose bengale moved to the front of the chromatogram in this system. Amino acids were detected with ninhydrin reaction.

るものであることを推定させる⁴⁾。

キサントゲン系色素が可視光照射下に発現する作用には種々の形式が考えられるが、トリプシンの失活の場合には酸素分子の存在は必要でなく、アミノ酸の分解には酸素が要求される。また *Flavobacterium* の致死作用の

発現には光酸化の過程が考えられている^{5),6)}。しかしトリプシンやカゼインなどのタンパク質に色素が結合するためには光は必要でなく、光照射によって色素のタンパクへの結合量がふえることもなかった。RNA ポリメラーゼは暗所でもキサントン系色素によって完全に活性を失う⁷⁾が、トリプシンは遮光下には失活しなかった。

結 論

1. キサンテン系色素によるトリプシンの失活は光照射下のみ観察され、遮光下には認められなかった。
2. この光化学反応は脱気によって促進され、酸素によって抑制された。このことから本反応が色素の三重項エネルギー移動を経由するものであると推定した。
3. 遮光下においては、色素のトリプシンへの結合はその活性に影響を与えなかった。
4. 遮光下で色素と結合したカゼインはトリプシンに

よる分解を約20%程度うけにくくなった。

5. キサンテン系色素の光化学反応によるアミノ酸の分解はトリプシンの失活反応とは異なった機構で起きていると考えられた。

文 献

- 1) 松浦輝男：有機光化学 (1970) 化学同人。
- 2) 相沢秀俊：食衛誌, **8**, 40 (1967)。
- 3) 相沢秀俊, 半沢文子：同上, **8**, 391 (1967)。
- 4) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄：同上, **13**, 19 (1972)。
- 5) 稲田邦子, 宮沢文雄：同上, **10**, 344 (1969)。
- 6) 稲田邦子, 宮沢文雄, 谷村顕雄：同上, **11**, 238 (1970)。
- 7) 村上浩紀, 波多野昌二, 渡辺忠雄：同上, **12**, 298 (1971)。