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

2. ハロゲン原子の作用

(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

2. Action of Halogen Atom

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)

Trypsin-inactivating xanthene dyes such as phloxine, erythrosine, rose bengale and eosine have a photo-labile α -substituted carbonyl group in each structure. The photo-effects of bromine and iodine to trypsin were investigated. Iodine partially inhibited (40%) the enzymatic activity in the dark. Under the light condition, the inactivation was occurred so rapidly and extremely. It was assumed that some photo-excited state of halogen atom would be necessary for the inactivation of trypsin.

(Received June 7, 1971)

緒 言

前報¹⁾においてハロゲン原子を含有するキサンテン系色素が分子状酸素を必要としない光化学的作用によってトリプシンを不活性化することを明らかにした。本色素中のハロゲン原子の一部は可視光線によって色素部分から離脱する²⁾。ハロゲン原子によるトリプシン失活の機構についてエリスロシン、ローズベンガルの構成成分であるヨウ素およびエオシン、フロキシンのそれとしての臭素を用いて検討し、キサンテン色素の光照射下での行動について考察を加えた。

実 験

ヨウ素および臭素はエタノールに溶解して1M溶液としたものを原液とし、冷暗所に保存した。使用時に蒸留水で 8×10^{-3} M に希釈した。

照射条件、酵素反応の操作は特記する外は前報の方法に従った。

結果および考察

エリスロシンおよびローズベンガルは1分子中に4原

子のヨウ素を、エオシンおよびフロキシンは4原子の臭素をおのおの含んでいるので、前報で用いた 4×10^{-3} M の色素濃度に対応する 8×10^{-3} M のヨウ素および臭素溶液を用いて、トリプシンとこれらのハロゲン溶液を混合後空气中で光照射を行なった。その結果を Fig. 1 に示した。

ハロゲン溶液中でトリプシンは短時間の照射によって急速に失活し、15分間の照射後にはトリプシンの活性はほとんど残存していなかった。臭素はヨウ素よりもやや強い作用力を有していることが観察された。さらに照射0時間におけるトリプシン活性はハロゲン溶液と混合しなかったトリプシンのその約70%であった。

この反応を脱気下あるいは前照射処理したハロゲン液を用いて行なっても、色素の場合と異なって、トリプシンの失活度は Fig. 1 の結果と差異は認められなかった。

キサンテン系色素は遮光下でカゼインと結合するためトリプシンによる水解を約20%程度受けにくくしたことは前報¹⁾で明らかにしている。そこでヨウ素とトリプシンの混合液を冷暗所 ($2 \sim 4^\circ$) に 0, 5, 10, 15, 20 および25分間放置後の酵素活性 (Fig. 2-a), ならびにヨウ

^{*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

Fig. 1. Photo-inactivation of trypsin by bromine and iodine solution

One ml of trypsin solution was mixed with 1 ml of 8×10^{-3} M of the halogen solution whose molarity corresponded to the amount of halogen atoms contained in 4×10^{-3} M of xanthene dye. Mixture of trypsin and bromine (◐—◐), mixture of trypsin and iodine (●—●) or trypsin solution (○—○) was exposed to the light (1,600 Lux. Toshiba FL 10/NL).

Fig. 2. Partial inactivation of trypsin by iodine in the dark

- (a) Activity of untreated trypsin (○—○), Mixture of trypsin and rose bengale (◐—◐), mixture of trypsin and iodine (●—●), and they were left in the dark, then enzymatic activities were assayed by the addition of the mixture to casein solution.
- (b) Activity of untreated trypsin (○—○), Mixture of casein and rose bengale (◐—◐), mixture of casein and iodine (●—●), Activity of trypsin was assayed by the use of each mixture as substrate of the enzyme

素とカゼイン溶液を混合し、同様に放置後、添加トリプシンによる水解度をしらべた (Fig. 2—b).

なお、ヨウ素を含むキサンテン系色素のうちローズベンガルを選び、同様の操作を行ない、その経過についても Fig. 2 に合わせて示した。色素はいずれの場合でもカゼインと結合することによってトリプシンによる分解を受けにくくし、その分解度は無処理カゼインのその約80%であった。色素量とカゼインの被分解性の低下との間には関連性が認められ、Fig. 2—b では同図—a の場合にくらべてカゼインと色素がより高濃度でふれ合うような機会があったが(酵素反応時には色素、カゼインの濃度比は a, b とも同一となる)カゼインの分解度は両者間に差が認められなかった。

ヨウ素は Fig. 2—a の場合は放置0時間においてトリプシンの活性を対照の67%に低下させ、放置時間とともにその活性はある程度低下し、最終的には約60%の残存活性を示した。一方 Fig. 2—b の操作によってヨウ素液と混合した酵素の活性低下は約5%に過ぎなかった。このことは遮光下ではトリプシンがヨウ素液との混合によってただちにその活性の33%を失い、混合時間が経過しても40%の失活度の段階で停止することを示し、カゼインへのヨウ素の作用はカゼインの被加水分解能に対して影響を与えなかったことを示唆している。ハロゲン原子は中性 pH 領域において、とくにタンパク質の芳香環を有するアミノ酸と結合することが知られている³⁾ので、遮光下での酵素に対する部分的不活性化の原因はハロゲン原子がタンパク質中の特定のアミノ酸残基に結合してその機能を弱めたことによると考えられる。

Fig. 2-b でヨウ素添加区の場合が対照区のそれよりも酵素活性がわずかに低いのは、カゼインと作用しなかった過剰のヨウ素がトリプシン中の芳香環アミノ酸残基と作用して酵素を部分的に失活させたことによると考えられる。このようにヨウ素は暗所においてもトリプシンと作用し、その活性の33%を急速に低下させ、Fig. 1の照射0時間における差とよく一致した。

トリプシンは暗所ではヨウ素によって最終的に約40%の活性を失ったのみであったが、光照射下にはほとんどその活性を消失した。このことは光照射下ではヨウ素が遮光下とは異なった状態で存在し、これが酵素活性の著しい破壊に関与していることを示している。

前報との結果を総合すると色素分子は以下に示すような過程で変化し、その途中に生起するエネルギー移動反応によってトリプシンを失活させ、この反応にはハロゲン原子が重要な役割を果していると考えられる。

Scheme. Inactivation of trypsin by xanthene dye in the light

* indicates the excited state, and X, halogen atom

すなわちキサンテン色素は可視光下に三重項エネルギー移動によって励起されるとともにそのハロゲン部分X（とくにカルボニル基からα位に存在する²⁾）が開裂すると考えられる。この反応は無酸素状態では可逆的であ

る。このようにして生じたX*（励起ハロゲン原子）が何らかの機構によってトリプシンの失活に関与しているものと考えられる。酵素を失活させるとともに基底状態にもどったXは不活性化されたタンパク質と結合する場合もあって、再び励起状態をとりうる機会は少ないと考えられる。これによって無酸素状態においてもなお酵素の失活が完全には起こらなかった事実¹⁾を説明することができる。

Ito⁴⁾ はリゾチームのエオシンYによる光失活を固相で検討して水分子の関与を指摘しており、酵素タンパク質の立体構造の変化がその活性の消失の一因であることを推定している。

光照射下での色素分子中の発色団部分の物理化学的性質は酸素の存在によって変化し、これにX*が再び結合したものの(III)は不活性物質となり、光照射によっても励起されてトリプシンを失活させることはないと考えられる。この過程によって、空气中で前照射処理した色素溶液中には遊離状態のハロゲンは存在なくなり、再照射によっても酵素は影響をうけなくなる。

以上のような機構によってキサンテン系色素分子中のカルボニル炭素からα位の炭素に結合したハロゲン原子の光化学反応による解裂が光照射下での本色素によるトリプシン失活の主要原因であると考えられる。

要 約

キサンテン系食用色素によるトリプシンの光不活性化の機構を色素分子中のハロゲン原子に注目して実験を行ない、光化学反応によって解裂したハロゲンが本酵素の失活に関与することを推定した。

文 献

- 1) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, **13**, 12 (1972).
- 2) 松浦輝男: 有機光化学 (1970) 化学同人.
- 3) 平良悦子, 船津軍喜, 石黒正恒, 船津 勝: 農化西日本支部例会講演, 第126回, 長崎 (1971).
- 4) Ito, T.: Curr. Mod. Biol. **3**, 233 (1970).