薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (1) 86-90 (1985)

ビリルビンオキシダーゼ及びフェノールオキシダーゼの基質特異性
—安息香酸誘導体に対する呈色反応—

大阪府立大学農学部,^a 大阪薬科大学^b

村尾澤夫,^{*,a} 松村瑛子,^a 山本栄子,^b 田中憲彰,^a 新 隆志^a

Substrate Specificity of Bilirubin Oxidase and Phenol Oxidase
—Coloration Reaction against Benzoic Acid Derivatives—

SAWAO MURAO,^{*,a} EIKO MATSUMURA,^a EIKO YAMAMOTO,^b
NORIAKI TANAKA,^a and TAKASHI SHIN^a

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture,^a
Sakai, Osaka, 591, Japan and Osaka College of
Pharmacy,^b Kawai, Matsubara-shi,
Osaka, 580, Japan

(Received September 25, 1984)

Substrate specificity of bilirubin oxidase (EC 1.3.3.5) and phenol oxidase (EC 1.10.3.2) against benzoic acid derivatives was investigated by the enzyme catalyzed coloration reaction.

As a result, it was found that the both enzymes individually react with benzoic acid derivatives to give characteristic colored compounds. Especially, in the presence of 4-aminoantipyrine or 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt as coupler, sensitive, conspicuous and versatile chromogenic reactions were catalyzed by the enzyme.

Keywords—bilirubin oxidase; phenol oxidase; benzoic acid derivative; 4-aminoantipyrine; 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; oxidative coupling reaction; enzymatic coloration reaction

著者らが土壌中より分離し、*Myrothesium verrucaria* MT-1 と同定した不完全菌は、テトラピロール核を有する物質を酸化する銅酵素を産生していた。^{1,2)} この酵素は、特にビリルビン (赤褐色) を強く酸化しビリベルジン (緑色) を生成する反応を触媒することより、新規な酵素であることを認め、ビリルビンオキシダーゼ [BO] と命名し、本酵素の単離精製を行い、その性質について検討した。³⁾ 更に、その基質特異性について、同じく酸化還元を司る銅酵素であるラッカーゼ、チロシナーゼなどのフェノールオキシダーゼ [PO] との比較検討を検圧法 (酸素消費量) を用いて行った。その結果、カテコール、ピロガロールなどのフェノール誘導体に対しては、BO、PO ともに活性を示し、呈色性の物質を与えたが、ビリルビンなどのテトラピロール核を有する物質に対しては、BO は強く作用するが、PO はほとんど作用しないという顕著な差異があることを明らかにした。⁴⁾

ところで、数種の PO は、フェノール誘導体の他に、プロトカテキュ酸、没食子酸など 2, 3 の安息香酸誘導体に対しても活性を有することが報告されている。^{5,6)}

今回、安息香酸誘導体に対する反応性について、BO と PO の差異及び起源を異にする PO における差異を明らかにする目的で、30 種の安息香酸誘導体を基質として検討した。反応は下に示す 3 種の異なった条件下で行い、酵素反応の結果は、反応液の呈する色調及び呈色強度によって判定した。

- 1) BO あるいは PO のみを作用させた場合、
- 2) 酵素とともに、4-aminoantipyrine [4-App] を発色剤として用いた場合、
- 3) 酵素とともに、2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt [ABTS] を発色

TABLE I. Coloration in Enzymatic Oxidation

Substrate	Bilirubin oxidase			Phenol oxidase-A			Phenol oxidase-B			Phenol oxidase-C and -D		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
(2-OH)BzOH	—	—	—	—	—	—	—	±(P)	—	—	—	—
(2,3-OH)BzOH	—	—	±(G)	±(B)	±(BR)	±(G)	—	±(R)	±(Y)	—	±(P)	—
(2,4-OH)BzOH	—	—	±(R)	—	±(R)	±(R)	—	±(Br)	±(R)	—	±(Y)	±(G)
(2,5-OH)BzOH	—	—	—	—	±(R)	±(Y)	—	±(Br)	—	—	±(Y)	±(R)
(2,6-OH)BzOH	—	—	—	—	±(R)	±(O)	—	±(Br)	±(O)	—	±(Br)	±(Y)
(3-OH)BzOH	—	—	±(V)	—	±(R)	±(P)	—	±(P)	±(V)	—	±(P)	±(O)
(3,4-OH)BzOH	—	±(P)	±(Y)	±(O)	±(P)	±(Y)	±(Y)	±(R)	—	±(Y)	±(R)	±(Y)
(3,5-OH)BzOH	—	—	±(O)	—	±(R)	±(O)	—	±(R)	±(O)	—	±(P)	±(O)
(4-OH)BzOH	—	—	±(B)	—	±(R)	±(B)	—	±(P)	±(B)	—	±(P)	±(B)
(2,4,6-OH)BzOH	—	—	—	—	±(Y)	±(Y)	—	±(V)	±(Y)	—	—	±(Y)
(3,4,5-OH)BzOH	—	±(Y)	±(Y)	±(Y)	±(O)	±(O)	±(Y)	±(Br)	±(Y)	±(Y)	±(Y)	±(Y)
(2-NH ₂)BzOH	—	±(RV)	±(Br)	—	±(V)	—	—	±(RV)	±(Br)	—	±(RV)	±(P)
(3-NH ₂)BzOH	—	±(R)	±(RV)	—	±(RV)	±(RV)	—	±(R)	±(P)	—	±(P)	±(V)
(4-NH ₂)BzOH	—	±(P)	±(Br)	—	±(RV)	—	—	±(RV)	±(Br)	—	±(P)	±(P)
(3,5-NH ₂)BzOH	±(V)	±(V)	±(V)	—	±(V)	±(V)	±(Br)	±(Br)	±(V)	±(Y)	±(Br)	±(RV)
(2-OH, 4-NH ₂)BzOH	—	±(O)	±(R)	—	±(O)	±(R)	—	±(R)	±(R)	±(Y)	±(P)	±(R)
(2-OH, 5-NH ₂)BzOH	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)	±(Br)
(3-OH, 2-NH ₂)BzOH	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(O)	±(Br)	±(O)
(4-OH, 3-MeO)BzOH	—	±(P)	±(O)	±(P)	±(R)	±(O)	—	±(R)	—	—	±(P)	—
(2-NH ₂ , 4-Cl)BzOH	—	±(RV)	±(Y)	—	±(RV)	—	—	±(R)	—	—	±(P)	—
(2-NH ₂ , 3,5-Cl)BzOH	—	—	±(P)	—	±(P)	—	—	±(P)	—	—	±(P)	—

Abbreviation. BzOH: benzoic acid.

Phenol oxidase-A: *P. versicolor*, -B: *C. consors*, -C: *N. crassa*, -D: *A. bisporus*.

(a) = no coupler, (b) = 4-Ap as coupler, (c) = ABTS as coupler.

—: unchanged color, +: coloration.

(V) = violet, (Br) = brown, (O) = orange, (P) = pink, (Y) = yellow, (R) = red, (G) = green, (B) = blue.

剤として用いた場合。

その結果, BO, PO は安息香酸誘導体に対して, それぞれに異なった基質特異性を示し, 反応液は異なった色調を呈すること, また BO, PO とともに 4-Ap あるいは ABTS 存在下に安息香酸誘導体に作用させると, 呈色強度が顕著に増大し, 特徴ある色調を与えることを見出したので報告する。

酵素は, *Myrothesium verrucaria* より前報⁸⁾記載の方法に従って精製した BO, *Polyporus versicolor* IFO 9791 [*P. versicolor*] より Fåhræus ら⁷⁾の方法で精製した PO, その培養液の中に PO の存在が報告されている数種の菌種のうち, その活性が比較的強くまた 2, 3 種の安息香酸誘導体に作用することが報告されている *Coriolus consors* IFO 8348 [*C. consors*], *Neurospora crassa* IFO 6068 [*N. crassa*], *Agaricus bisporus* IFO 7214 [*A. bisporus*] の 3 株を選び, それぞれ文献^{8,9)}記載の方法に従って得た培養液を, PO の粗酵素液として準備した。なお以後本論文では, *P. versicolor*, *C. consors*, *N. crassa*, *A. bisporus* から得た PO を, それぞれ PO-A, -B, -C, -D と略記した。

まず それぞれの酵素の作用至適 pH を, 5-アミノサリチル酸を基質として測定したところ, BO では pH 7.0, PO-A, -B, -C, -D では pH 5.5 を示した。ただし, 今回の安息香酸誘導体への特異性の検討は, BO 及びすべての PO において十分な活性を示した pH 6.0 において行った。

呈色色調の検討は, 各安息香酸誘導体を充分量溶解させた 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 1 ml に, 適当量の酵素を加え, 各酵素の活性の強さに応じて 1—3 時間 37°C で反応し, 反応液の呈色色調を酵素ごとに定性的に調べた。また発色剤を用いた場合, 各誘導体溶液 1 ml に, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した 4-Ap (0.1%) あるいは ABTS (0.2%) の溶液 0.5 ml を加え, 37°C で反応し, 反応後の呈色色調を調べた。なお反応時間は, 各酵素の活性の強さに応じて, 4-Ap を用いた場合 1—2 時間, ABTS を用いた場合 10—60 分間で行った。ただし, ABTS を用いた場合においては, 反応後 1 M アジ化ナトリウム溶液 0.1—0.2 ml を添加して, 呈色色調の判定の妨げとなる酸化型 ABTS (緑色) を無色の還元型にもどしてから判定を行った。

その結果, 検討した 30 種の基質のうち, ベンゼン環上の置換基として水酸基, アミノ基を有する安息香酸誘導体に対しては, いずれの酵素においても特徴的で強い呈色を示すものが多かった。チオサリチル酸, 3,5-ジニトロ安息香酸, 5-ニトロサリチル酸, 3,5-ジニトロサリチル酸に対しては, 1)—3) の反応条件下では, どの酵素も呈色性を示さなかった。また, 4-クロル安息香酸, 4-ニトロ安息香酸, アニス酸では, BO が ABTS を発色剤とした場合においてのみ, 若干の活性を示し, うすいピンク色ないしはうすい褐色を呈した。Table I に, 各酵素において有意な呈色を示した基質について, 呈色色調及び強度を定性的に判定し, 各酵素ごとにまとめた。なお, PO-C と -D の呈色性は, ほぼ類似していたため, 同一項にまとめた。

Table I の結果を要約すると, 以下の通りである。

Fig. 1. Absorption Spectra of Phenol Oxidase- or Bilirubin Oxidase-Catalyzed Oxidative Coupling of Benzoic Acid Derivatives

- 1, 3-aminobenzoic acid-ABTS-bilirubin oxidase,
- 2, 4-hydroxybenzoic acid-ABTS-bilirubin oxidase,
- 3, 4-amino-salicylic acid-4-Ap-phenol oxidase-A,
- 4, 3-hydroxyanthranilic acid-4-Ap-phenol oxidase-A.

The reaction mixture contained 3 μ mol substrate, 3 μ mol ABTS or 4-Ap and 0.02 ml enzyme solution (about 0.7—8.0 μ g) in a total volume of 3.02 ml buffered with 50 mM phosphate buffer (pH 6.0). The reaction was carried out at 37°C for 4 to 8 min. The reaction was terminated by adding 0.2 ml of 1 M Na₂S₂O₃.

TABLE II. The Wavelength of Maximum Absorbance ($\lambda_{\max}$) and Absorbance at $\lambda_{\max}$ of the Coloration Reaction with Phenol Oxidase^{a)}

Substrate	ABTS ^{b)}		4-Ap ^{c)}	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorbance at $\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorbance at $\lambda_{\max}$
(4-OH)BzOH	590	0.257	505	0.119
(3-OH)BzOH	515	0.402	491	0.152
(2-NH ₂)BzOH	—	—	540	1.275
(3-NH ₂)BzOH	563	0.263	533	0.483
(4-NH ₂)BzOH	—	—	533	0.086
(3,5-NH ₂)BzOH	547	0.995	560	0.514
(2-OH, 4-NH ₂)BzOH	515	0.622	473	0.450
(2-OH, 5-NH ₂)BzOH	450	0.035	460	0.289
(3-OH, 2-NH ₂)BzOH	455	0.118	455	0.107

a) Phenol oxidase-A from *P. versicolor* was used.

b) The enzymatic reaction was carried out at 37°C in the mixture containing 0.1 μ mol substrate, 0.5 μ mol ABTS, 4.1 μ g enzyme and 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) in a total volume of 3.8 ml. After 10 min, the reaction was terminated by addition of 0.2 ml of 1 M NaN₃. Then the absorbance at $\lambda_{\max}$ of the reaction mixture was measured.

c) 1 μ mol substrate and 2.5 μ mol 4-Ap were used, and other conditions were the same as described above.

(1) 発色剤無添加時では、BO と PO 類ではベンゼン環上に水酸基のみを有する安息香酸誘導体に対して異なった呈色性を示した。つまり、BO においてはまったく呈色が認められないのに対して、PO 類では互いに隣接する水酸基を有する 2,3-ジヒドロキシ安息香酸、プロトカテキ酸、没食子酸に特徴的な呈色を認めた。

(2) 4-Ap あるいは ABTS を共存させた場合、酵素を単独で作用させた時より呈色する誘導体の数が増し、しかも最大吸収波長を異にする物質の生成が示唆された。例えば、ベンゼン環上に水酸基を有する誘導体においてもその置換位置により、赤色、黄色、青色などの異なった呈色が認められた。

(3) PO 類においては、その起源の違いによって作用する基質及び呈色色調が異なっていた。例えば、ベンゼン環上にアミノ基を有する誘導体（アントラニル酸、4-アミノ安息香酸）に対して、発色剤として ABTS を用いた場合、PO-A ではまったく呈色が認められないのに対して、他の 3 種の PO では呈色性を示していた。

次に、このような BO, PO 類の呈色反応について、その呈色物質のスペクトルの性質について検討した。いずれも最大吸収波長の異なる強い呈色を示した。そのうち、(3-アミノサリチル酸)-(ABTS)-(BO), (4-ヒドロキシ安息香酸)-(ABTS)-(BO), (4-アミノサリチル酸)-(4-Ap)-(PO-A), (3-ヒドロキシアントラニル酸)-(4-Ap)-(PO-A) の反応について、その吸収スペクトルを、Fig. 1 に示す。また、全般的に特徴的な強い呈色を示した PO-A を用いて、数種の基質に対する呈色物質の最大吸収波長及び呈色度を、Table II に示す。

更に、酵素の種類による呈色性の差異を明らかにするため、呈色反応の time course について検討した。Fig. 2 に、3-ヒドロキシアントラニル酸を基質とし、(4-Ap)-(PO-A), (4-Ap)-(BO), (ABTS)-(PO-A), (ABTS)-(BO) を作用させた場合の呈色度の経時的変化を示す。その結果、4-Ap を用いた場合は PO-A が、ABTS を用いた場合は

Fig. 2. Reacting Rate against 3-Hydroxyanthranilic Acid in the Presence of Coupler

●—●: bilirubin oxidase, ■—■: phenol oxidase-A.

The enzyme activity was determined spectrophotometrically as the rate of increase in the oxidative coupling product. The reaction was performed in a mixture containing of 4 μ mol 3-hydroxyanthranilic acid, 4 μ mol 4-Ap or ABTS and the enzyme with about 10 μ g in a total volume of 4.05 ml buffered with 50 mM phosphate buffer (pH 6.0). The reaction was carried out at 37°C for 5 to 60 min. The absorbance at $\lambda_{\max}$ (455 nm) of the reaction mixture was measured, but when ABTS was used as coupler, the absorbance at 455 nm was measured after adding 0.2 ml of 1 M NaN₃.

BO が強く敏速に反応することが判明した。また、基質として 3-アミノ安息香酸, 3,5-ジアミノ安息香酸, 5-アミノサリチル酸, バニリン酸を用いた場合にも、同様の結果を得た。

以上のように、BO, PO 類は安息香酸誘導体に対して異なった作用を示し、発色剤の種類によって、特徴ある呈色物質を与えた。このような呈色反応は、BO, PO の酸化作用による基質と発色剤の酸化縮合反応と推定されるが、その反応様式あるいは反応生成物(呈色物質)の構造について、現在検討中である。

近時、各種の臨床検査及び衛生試験部門において、4-Ap-ペルオキシダーゼ-H₂O₂ 法によるフェノール性物質の比色定量法¹⁰⁻¹²⁾ その他、同様の酸化縮合反応による呈色を利用した比色定量法¹³⁻¹⁷⁾が汎用されている。ここに述べた BO あるいは PO による発色剤(4-Ap あるいは ABTS)存在下における安息香酸誘導体の特徴的な呈色反応は、生体物質あるいは酵素などの臨床学的定量法への応用が期待できるものである。

著者らは、この呈色反応を各種測定法に応用するために、更に、もう 1 つの酵素“ウレタンヒドロラーゼ”(Z-アミノ酸の Z 基を除去する酵素)¹⁸⁾を開発し、このウレタンヒドロラーゼと PO-A を共役させたアンジオテンシン I 変換酵素の新しい比色定量法(基質: 4-ヒドロキシヒプリールヒスチジルロイシン)や、カルボキシペプチダーゼ A の活性測定法(基質: 4-ヒドロキシヒプリールフェニルアラニン)について検討し、日本農芸化学会において発表した。^{19,20)}更に、他方面への応用についても、現在検討中である。

引用文献及び注

- 1) S. Murao, N. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2383 (1981).
- 2) S. Murao, N. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2031 (1982).
- 3) N. Tanaka, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2499 (1982).
- 4) N. Tanaka, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1627 (1983).
- 5) M. Dubernet, P. Ribereau-Gayon, H. R. Lerner, E. Harel, A. M. Mayer, *Phytochemistry*, **16**, 191 (1977).
- 6) S. C. Froehner, K.-E. Eriksson, *J. Bacteriol.*, **120**, 458 (1974).
- 7) G. Fåhræus, B. Reinhammar, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2367 (1967).
- 8) One Pharmaceutical Co., Ltd., Japan. Patent 58-47489 (1983) [*Chem. Abstr.*, **98**, 214155 (1983)].
- 9) D. A. Wood, *J. Gen. Microbiol.*, **117**, 327 (1980).
- 10) P. R. N. Kind, E. J. King, *J. Clin. Path.*, **7**, 322 (1954).
- 11) 宮本邦彦, 山東英幸, 横山 剛, *衛生化学*, **24**, 175 (1978).
- 12) 佐谷戸安好, 中室克彦, 松井啓子, *衛生化学*, **22**, 350 (1976).
- 13) P. Trinder, *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 14) C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, P. C. Fu, *Clin. Chem.*, **20**, 470 (1974).
- 15) N. Gochman, J. M. Schmitz, *Clin. Chem.*, **17**, 1154 (1971).
- 16) Y. Kasahara, Y. Ashihara, *Clin. Chem.*, **27**, 1922 (1981).
- 17) H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Graßl (eds.), "Methods of Enzymatic Analysis," 3rd ed., Vol. I, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1983, pp. 197-232.
- 18) S. Murao, E. Matsumura, T. Shin, T. Kawano, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1673 (1984).
- 19) 日本農芸化学会昭和 59 年度大会, 東京, 1984 年 4 月, 講演要旨集, 3I-23, p. 454.
- 20) 日本農芸化学会関西支部例会第 336 回講演会, 大阪, 1984 年 7 月, 講演要旨集, 4, p. 3.