

令和元年6月14日現在

機関番号：32647

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14738

研究課題名(和文) 緑色を呈する天然型色素の生産技術開発

研究課題名(英文) Production of a natural-type green pigment from peptide and amino acid using tyrosinase

研究代表者

小西 康子 (Konishi, Yasuko)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号：80129238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チロシナーゼは、メラニン色素を合成する最初の反応で働く酵素で、酸素を使ってアミノ酸の一種であるチロシンを酸化する酵素である。ペプチド(アミノ酸が数個つながったもの)中のチロシンをチロシナーゼで酸化させると反応液は褐色になるが、反応液に他のアミノ酸を加えて凍結しておく、反応液は加えたアミノ酸の種類に依存して黄色～緑～青など様々な色に変化することを見いだした。今回はあざやかな青色を呈する反応に着目し、その反応条件および生成した色素の性質について調べ、凍結中に進行する本反応の反応機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品を美しく彩りその魅力を増して食欲と購買意欲を高めるため、食品には様々な色素が使用されてきた。消費者の安全志向から、現在では合成色素よりも天然色素の需要が高い。黄色や赤色には様々な天然色素が存在するが、緑色には不安定なクロロフィルに由来するものしかない。本研究では、酵素を使い、鮮やかな青色の色素をペプチドとアミノ酸から新規に調製する方法を示した。黄色色素と混合することで緑色の天然系色素ができる。

研究成果の概要(英文)：Tyrosinase is an enzyme which oxidizes an amino acid, tyrosine, using molecular oxygen, and is responsible for skin pigmentation in mammals. Tyrosinase was added to the reaction mixture containing a kind of amino acid and a substrate peptide that contains a tyrosine residue. The reaction mixture showed reddish brown color after the reaction. The mixture was changed to other colors (yellow, green or blue etc.) depending on the kind of amino acid in the freezing. In this study, we focused on the blue pigmentation and presented a plausible mechanism for the reaction proceeding under the freezing condition.

研究分野：酵素化学

キーワード：色素 酵素 チロシナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) チロシナーゼ (EC.1.14.18.1) は、分子状酸素を用いてモノフェノールを *o*-ジフェノールへ、さらに *o*-ジフェノールをキノンへと酸化する酵素である。チロシナーゼはタンパク質中のチロシン残基にも作用する。生成したキノンは反応性が非常に高く、求核性側鎖を持つアミノ酸残基と非酵素的に反応し、タンパク質分子内や分子間に架橋を形成する。

(2) 筆者らがナメコ子実体から単離したチロシナーゼ (引用文献、) は、一般的なマッシュルームチロシナーゼと比べてタンパク質やペプチド中のチロシン残基に対する反応性が高く、架橋形成能が強い。筆者らは、チロシン残基を含むペプチド (*N*-acetyl-Tyr-Val-Gly : Ac-YVG) に対する本酵素の反応性をアミノ酸共存条件下で測定したのち、褐色となった反応液を凍結保存しておいたところ、反応液の色がアミノ酸の種類に依存して変化することを見出した (図1)。

(3) 緑色は食品を美しく彩り、その魅力を増して食欲をそそる色合いとして好まれ、多くの食品に利用されている。消費者の安全志向から天然系色素の使用が求められている中で、緑色では不安定なクロロフィル以外の天然色素はないのが現状である。

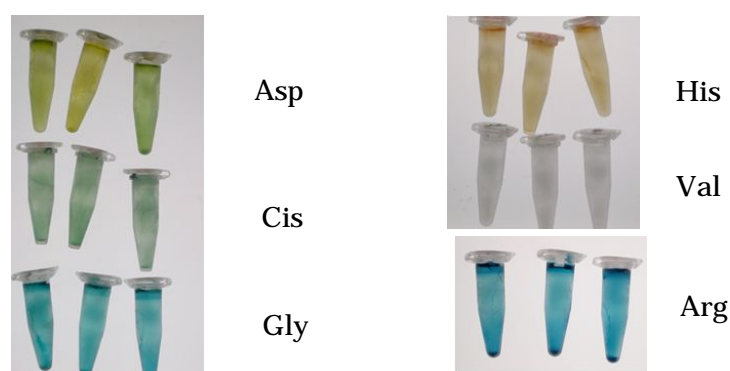


図1 種々のアミノ酸を添加してナメコ由来チロシナーゼと反応させた後、-30℃で一晩凍結保存した Ac-YVG ペプチド

2. 研究の目的

(1) 本研究では、メラニンのように赤や茶といった色しか知られていなかったチロシナーゼの酵素化学的反応を解析し、緑を中心とした食品に使える様々な色素を作り出す技術を開発する。

(2) まず、図1で示した反応液において最も鮮やかな呈色を示した青色を取り上げ、反応条件を検討し、青色呈色物質の性質および構造を明らかにする。

(3) 凍結保存中におこる本呈色反応のメカニズムを明らかにする。

(4) 基質ペプチドの配列を変え、またタンパク質の加水分解ペプチドを用いて、新たな呈色物質を調製する。

3. 研究の方法

(1) チロシナーゼの調製：引用文献の方法に従ってナメコ子実体より精製した。

(2) 反応条件の検討：Gly 共存下で Ac-YVG ペプチドとチロシナーゼを反応させたのち、遠心式限外ろ過ユニットを用いてチロシナーゼを取り除き、pH を 2~12 に調整してから -30℃ で凍結させた。

(3) 青色呈色物質の分析：(1)と同様にして pH 8.7 で凍結調製した青色反応液を ODS カラムを用いて 600 nm で HPLC 分析し、青色呈色物質を精製した。MALDI-TOFMS 分析では、CHCA と DHB をマトリックスとして用いた。NMR 分析では、¹H と ¹³C の一次元分析、COSY と HSQC の二次元分析を行った。

(4) 種々のアミノ酸を用いて調製した青色呈色物質：Ac-YVG ペプチドと 20 種類の標準アミノ酸を用いてチロシナーゼ反応を行ない、遠心式限外ろ過ユニットを用いてチロシナーゼを取り除き、pH を 8.0、8.7、9.0、10.0 に調整したのち凍結保存した。Gly、Ala、Val、Leu、Ile との反応物については融解後、吸収スペクトル測定および ODS カラムを用いた HPLC 分析を行った。分取したピーク成分について、精密 LC-MS および LC-MS/MS 測定を行い、構造予測を行った。

(5) 青色呈色物質の生成メカニズム：Ac-YVG ペプチドと Leu との反応液に、遠心式限外ろ過ユニットを用いてチロシナーゼを取り除いたのち、種々の濃度となるようにグリセリンを添加し凍結した。4%グリセリン添加反応液については、凍結後経時的に解凍し、吸収スペクトル分析、ODS カラムを用いた HPLC 分析、分取したピーク成分について精密 LC-MS および LC-MS/MS 測定を行い、構造予測を行った。

4. 研究成果

(1) 反応条件の検討：反応液の pH に依存して色調が異なる結果を得た(図 2)。最も強い青色を呈したのは pH 8.7 であった。そこで pH 8.7 の反応液を用いて、4℃ で遮光保存する時間を変えて凍結保存したところ、保存 0 時間では青色、24 時間で緑色、48 時間では黄緑色、72 時間では黄色になった(図 3)。従って、チロシナーゼ反応の生成物が、凍結中にチロシナーゼ非依存的、pH 依存的に青色呈色物質へ変化することが分かった。

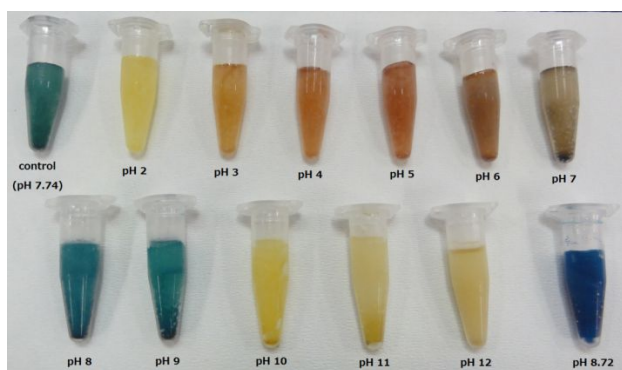


図 2. 凍結後の色調 (pH 2~pH 12)

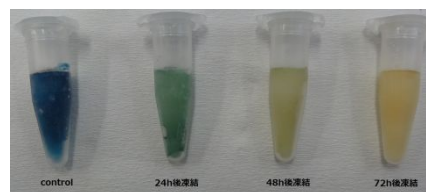


図 3. 保存時間による色調の違い

(2)青色呈色物質の分析：質量分析では、m/z 782 と 840 に強いピークが確認されたことから、青色呈色物質の質量は 782 か 840 のどちらか、あるいは両方であると考えられた。¹H 一次元 NMR

スペクトルにおいては、4 ppm のチロシン由来のメチン基のスペクトルが検出されず、¹³C 一次元 NMR スペクトルでは炭素の二重結合が検出されたことから、チロシンのメチン基部分は二重結合していると考えられた。二次元 NMR スペクトルにおいては、COSY および HSQC でアミノ酸由来のスペクトルが見られる一方、HSQC の 5~6 ppm ではアミノ酸には存在しない二重結合性のスペクトルが検出された。以上の結果からは、青色呈色物質の構造予測には至らなかった。

(3) 種々のアミノ酸を用いて調製した青色呈色物質： アミノ酸の種類や凍結時の pH を変えて分析したところ、以下の知見が得られた。

アミノ酸と凍結時の pH の組み合わせによって、反応液の色は変化する。

pH 10.0 以上の高い pH では、凍結中に呈色物質は形成されない。

凍結による呈色物質形成には、ペプチド、アミノ酸、チロシナーゼを同時に反応させる必要である。

色が異なる反応液では、呈色成分は同じで成分比が異なる。すなわち、反応液の緑色は、青色呈色物質と黄色呈色物質の混合によるものである。

青色呈色物質の基本構造は複素環を形成しており、アミノ酸の種類に依存せず同じである。

(4) 青色呈色物質の生成メカニズム： 反応液にグリセリンを添加することで、青色呈色反応における反応中間体の検出が可能であることがわかった。4 %グリセリン添加反応液について目的の反応中間体は HPLC 分析において 9 min 付近のピーク物質で、500 nm 付近に吸収極大を持つことが分かった。LC/MS、LC-MS/MS を用いて構造解析を行った結果、このピーク物質は、Ac-YVG ペプチドのチロシン残基がチロシナーゼにより酸化され *o*-キノンとなったものに、Leu 由来と考えられるアミノ基が結合した物質で、青色呈色物質の複素環を形成するために必須の物質であると考えられる。この反応中間体を含む青色呈色反応の、考えられる反応メカニズムを図 4 に示した。しかし、*o*-キノンにアミノ酸が結合した中間体(赤)と本研究で明らかになった中間体にアミノ酸が結合した中間体(青)は実際に検出されてはいない。これらの中間体の検出・構造解析ができればより反応メカニズムを確かなものにできると考えられる。600 nm での HPLC 分析で観察されている 25 min 付近のピークは、凍結日数によって変化することから、新たな中間体であると考えられ、今後さらなる検討が必要である。

(5) 青色呈色物質の構造解析とメカニズムの解明に時間がかかったため、目的(4)に記した「基質ペプチドの配列を変え、またタンパク質の加水分解ペプチドを用いた新たな呈色物質の調製」について、期間内に成果を出すには至らなかった。

<引用文献>

Y.Kawamura-Konishi, Purification, Characterization, and Molecular Cloning of Tyrosinase from *Pholiota nameko*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2007, 1752-1760.

Y.Kawamura-Konishi, Purification, Characterization, and Molecular Cloning of Tyrosinase from *Pholiota nameko*, *Appl. Microbiol. Biotech.* 90, 2011, 227-234.

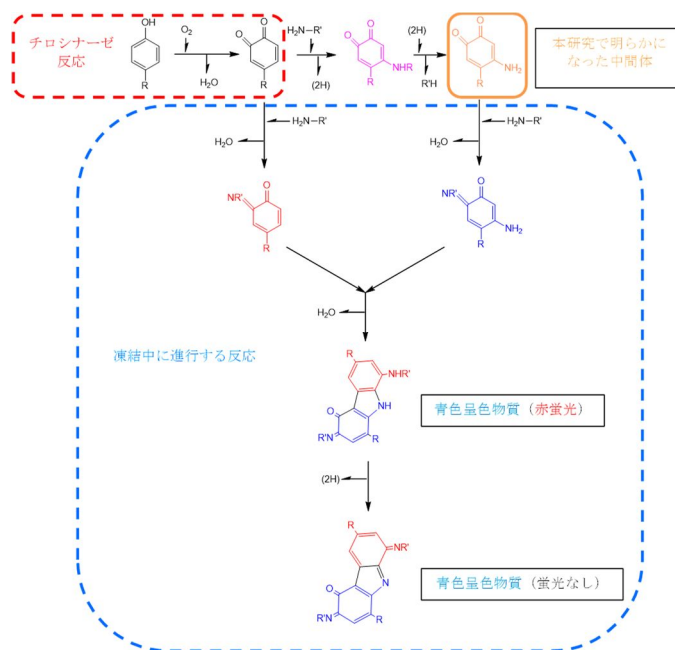


図4. 青色呈色反応 予想反応メカニズム
(Ac-YVG ペプチドと Leu をそれぞれ R、R' と表す)

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

小西康子、チロシナーゼ反応を用いて調製した青色呈色物質の生成メカニズム、第65回日本食品科学工学会大会、2018年

小西康子、チロシナーゼ反応を用いてペプチドとアミノ酸から調製した青色色素、第64回日本食品科学工学会大会、2017年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者指名：小椋 賢治

ローマ字指名：(OGURA, kenji)

所属研究機関：石川県立大学

部局名：生物資源環境学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：50270682

(2) 研究協力者

研究協力者指名：笹木 哲也

ローマ字指名：(SASAKI, tetsuya)