

アコヤガイ内臓抽出液による メラニン様色素の形成について*

谷 口 忠 敬

On the Formation of Melanin-like Pigment by the Extract Solution of Internal Organs of *Pinctada martensii*

Tadataka TANIGUTI

The nature of the black pigment of black baroque cultured pearls and some properties of the tyrosinase of internal organs of *Pinctada martensii* have been studied. The results obtained from the experiments are as follows.

- 1) The black pigment of the organic matter which has been packed between the component layer and the nucleus of the pearl was considered to be melanin-like pigment from its property on solvent and on oxidizer and from the absorption spectrum of it (Fig. 3).
- 2) The tyrosinase of the crude enzyme solution extracted from the internal organs was inactive, and it was activated by the addition of Cu^{++} (Fig. 1). Fe^{++} and Ni^{++} could be substituted for Cu^{++} to some degree (Table 1). The black pigment formation was largest in pH 7.5 to 8.0 (Fig. 2).
- 3) When the whole suspension of internal organs was stored in the temperature range from 0° to 5°C , its tyrosinase became inactive in 4 days and was again activated after 5 to 8 days. But the tyrosinase of the whole suspension, which was added toluene, and of the supernatant was not activated by the storage (Fig. 4).

緒 言

真珠養殖において商品価値のほとんどない、いわゆる屑珠の出現はかなり高率を示し、その中でも異型で核と真珠層の中間に黒色有機物質のつまったもの、あるいは核の表面に黒色有機物が付着して真珠層が全くないものも少なくない。いわゆるしみ珠（黒色異型真珠）の生因については、遊走細胞¹⁾あるいは生殖液²⁾が真珠袋内に抱含されるためといわれている。異常真珠の生成について研究した大森氏³⁾は機械的衝撃、ケソの付着および有機物質の付着することも原因であるが、多くは核と一緒に入れたピース（外套膜片）の不潔によると報告し、また小竹氏⁴⁾はアコヤガイが抵抗力のある場合には細菌に浸されても病死せず黒い欠点珠が出来ることを指摘している。

著者はしみ珠の生因に関連し、先ず異型真珠内の黒色有機物を研究してメラニン様黒色色素が含まれることを確かめた。依ってアコヤガイ内臓組織中にチロシナーゼの存在を予想し、内臓浸出液の場合には微量の

* 本研究の一部は文部省科学研究費によって実施した。

銅イオンを添加することによってチロシナーゼが活性化されることを知った。しみ珠の生成には多くの要因が関与すると思われ、単にチロシナーゼの存在のみによって直ちに關係づけられないが、この報告では異型真珠中の黒色色素とメラニン様色素の形成について実験した結果について報告する。

実 験 の 部

実験I しみ珠の核と真珠層との間につまっている有機質の黒色色素について

しみ珠の核と真珠層との間には黒色の有機質がつまっている。この有機質中の黒色色素の性状についてはほとんど報告を見ないようである。依って先ずこの黒色色素の溶媒、酸化剤に対する性質および吸収スペクトルを試験・測定した結果は次の通りであった。

この黒色の色素は有機溶媒（クロロフォルム、メタノール、エタノール、四塩化炭素、エーテル、アセトン、ベンゼン）に不溶にして、また氷酢酸、6N-HClにも溶けないが0.1N-NaOHおよび濃硫酸には溶解する。濃硫酸に溶解した色素は稀釈すると再び沈澱する。またこの色素は過酸化水素、塩素等の酸化剤によって漂白される。メラニンの特異性はこの種々の溶媒および化学試薬に対し抵抗性の強いこと、酸化剤で脱色されること等であるがこの黒色色素も類似の性質を示している。

黒色有機質を2N-NaOHに加熱溶解し、残渣を遠心除去した後に、2N-NaOH溶液をHCl酸性にし黒色色素を沈澱させる。水洗した後再び0.1N-NaOHに溶解してからベックマン分光光度計によってその吸収スペクトルを測定した結果はFig. 3に示した。すなわちしみ珠の黒色色素の吸収スペクトルは220m μ から500m μ にかけて特別の吸収がなく次第に低下する。この傾向は柿本氏等⁵⁾がエビ血液のチロシナーゼをL-チロシンに作用させて生成した黒色色素のそれと類似している。

以上の諸性質および吸収スペクトルから見てこの黒色色素は恐らくメラニン様色素であろうと思われる。

実験II アコヤガイ内臓懸濁液中のチロシナーゼの二、三の性質について

しみ珠の黒色色素はメラニンであるとすれば当然、アコヤガイにはチロシナーゼの存在が予想される。従って先ずアコヤガイ内臓懸濁液を用いてチロシナーゼ作用について実験した。粗酵素液の調製およびチロシナーゼの測定は次の方法によった。

粗酵素液の調製：アコヤガイ (*Pinctada martensii*) は2年ものを用い、脱殻した後、閉殻筋、鰓、外套膜、足および収足筋を取り去った残余の内臓部分全部を粗酵素液の調製に用いた。すなわちその10gを珪砂および10mlの0.85%食塩水とともに十分に磨砕し、同食塩水90mlを追加して十分に懸濁させる。この懸濁液を12,000g、20分間遠心し、その上層部を粗酵素液として使用した。

チロシナーゼ作用の測定：チロシナーゼの作用力は便宜的に生成黒色色素を比色する方法⁶⁾によって測定した。すなわち粗酵素液1ml, L-チロシン(2mg/ml) 0.5ml, M/15 磷酸緩衝液3.5ml, 0.01M 硫酸銅あるいは蒸溜水1.0ml, 全量6.0mlの反応系とし、これに5%チモール含有トルオール0.1ml宛を添加し25°Cに放置する。一定時間後にN-NaOH 1.0mlを反応液に添加して生成した黒色色素を十分に溶解させてからFilter 430を用いてその吸光度 (Optical Density) を測定した。

1. アコヤガイ内臓抽出液のチロシナーゼ作用に対する銅および他の二価金属イオンの効果

最初粗酵素液をL-チロシンに作用させたが、黒色色素の生成すなわちチロシナーゼの作用はほとんど認められなかった。黒しみの形成が徐々に進行するとしても余り弱いので、いわゆるプロチロシナーゼ⁷⁾の状態が存在するのがあるいは阻害物質が存在するためかを確かめるために種々の試験を行なった。尿素の添加は効果的な場合と阻害的な場合が認められ条件が安定しなかった。チロシナーゼはCu²⁺によって活性化されるが、アコヤガイ内臓の粗酵素液の場合にもCu²⁺の添加は明らかに有効であった。Cu²⁺を硫酸銅として添加した場合の効果はFig. 1に示した。すなわち6 γ のCu²⁺を加えると黒色色素の形成が認められ(この添加量は内臓組織の6 $\times 10^{-5}$ 倍に相当する)、また300 γ 以上の添加では最高の黒変を示した。

更にCu²⁺以外の2価の金属イオンがチロシナーゼの活性化に有効なことが指摘されている⁸⁾のでFeSO₄, MgSO₄, ZnSO₄, NiSO₄, CoCl₂およびMnCl₂を添加し黒色色素の生成に及ぼす影響を見た結果はTable 1に示した。すなわちFe²⁺およびNi²⁺はある程度Cu²⁺に代り得たがNi²⁺の場合には黒変しないで赤色に留まった。他の供試金属イオンの影響は全く認められなかった。

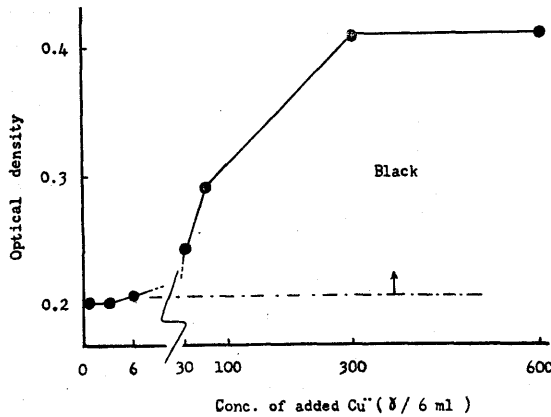


Fig. 1 The activation of the tyrosinase of the extract solution of internal organs of *Pinctada martensii* by the addition of Cu^{2+}

Reaction systems: crude enzyme solution 1.0ml, L-tyrosine (2mg/ml) 0.5ml, M/15 phosphate buffer (pH 7.0) 3.5ml, CuSO_4 solution 1.0ml and toluene (contained 5% thymol) 0.1ml. Incubation: 25°C, 11 hrs. Optical density: measured by use of filter 430m μ .

Crude enzyme solution: 10g of internal organ of *Pinctada martensii*, in which mantle, gill, adductor muscle, foot and retractor muscle were not contained, was ground with sand and 10 ml of 0.85% NaCl solution. The mixture was satisfactorily suspended in 90ml of 0.85% NaCl solution and then centrifuged at 12,000 \times for 20 minutes. The supernatant fluid was used as crude enzyme solution.

2. アコヤガイ内臓抽出液による黒色素の生成とpHとの関係

チロシナーゼの至適 pH は抽出状態によって移動する⁹⁾といわれる。アコヤガイ内臓の0.85%食塩水抽出液の場合は、pH7.5~8.0において最も黒変が著しかった。また生成色素は pH 7.0以上では黒色であったが pH 6.8 以下では帯赤色であった (Fig. 2)。

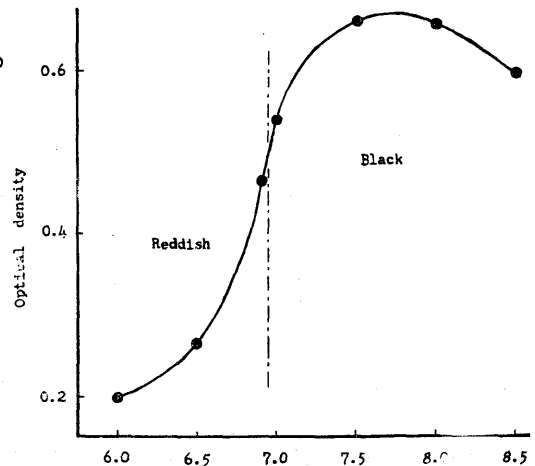


Fig. 2 The relation of the black pigment formation by the extract solution of internal organs of *Pinctada martensii* and pH

Incubation: 25°C, 11 hrs.. Addition of Cu^{2+} : 1.0ml of 0.01 M- CuSO_4 /6 ml of reaction systems.

Table 1 The effect of metallic ion on the black pigment formation by the extract solution of internal organs of *Pinctada martensii*

Addition volume/6 ml	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}	Co^{2+}	Mg^{2+}
0.01 M. 0.1 ml	(black) +	(black) +	(reddish) -	-	-	-	-
1.0 ml	##	##	+	-	-	-	-

Incubation: 25°C, 41 hrs. (pH 7.0).

3. アコヤガイ内臓の抽出液をL-チロシンに作用させて生成した色素の吸収スペクトル

アコヤガイ内臓の粗酵素液をL-チロシンに作用させて生成した黒色素 (pH8.0で反応) はHCl酸性で不溶および可溶の2区分に分けられた。この可溶部は HCl酸性でブタノール層に移行する。また pH 6.5 で生成した赤色色素は HCl酸性で淡褐色を呈しブタノール層に移行する。この色素は 0.1N-NaOH 溶液中では赤色であるが加温すると淡褐色に褪色する。これを再度熱湯中で加熱した場合には赤色になるが放冷すると再度褪色してから淡褐色になる。この赤色色素の吸収スペクトル (D) は 330m μ に明瞭な最大吸収を示し

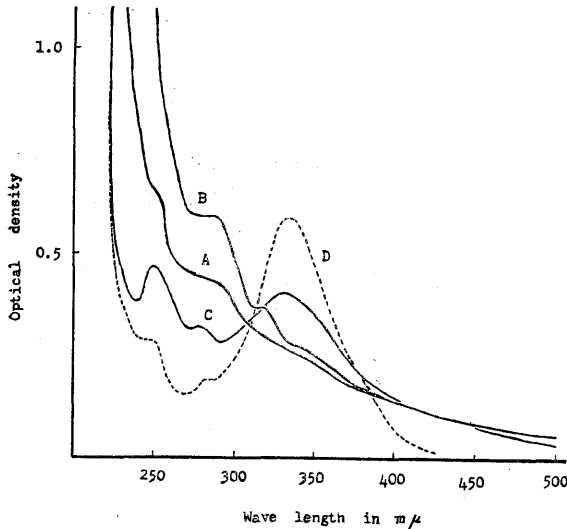


Fig. 3 The absorption spectra of the black and red pigments

Solvent : 0.1 N-NaOH. A : the black pigment of black baroque pearls. B : the black pigment formed by the extract solution of internal organs of *Pinctada martensii* at pH 8.0 (HCl insoluble). C : the black pigment formed by the extract solution at pH 8.0 (HCl soluble). D : the red pigment formed by the extract solution at pH 6.5.

てアコヤガイ内臓の全懸濁液 (pH 7.0, M/15 磷酸緩衝液で抽出), これにトルオール (チモール5%含有) を添加したもの, 更に全懸濁液を12,000×g, 20分遠心した上層部および沈澱部の4区分に分けて冷蔵庫 (0~5°C) に貯蔵し, その間のチロシナーゼ作用の変化を観察した結果は Fig. 4 に示した. すなわち沈澱部は最初から全くチロシナーゼ作用はなく貯蔵期間中においてもその作用は認められなかった. トルオールを添加しない全懸濁液では4日でその作用は一旦消失したが5~8日に至って再び活性化され, 22日では

Crude Enz. solution	Days						
	2	4	6	8	10	12	22
Whole Suspension	Black		1st. Exp.		3rd. Exp.	2nd. Exp.	Black
Whole Suspension added toluene	Black						
Supernatant (12,000×g, 20 min.)	Black						
Sediment (12,000×g, 20 min.)							

Fig. 4 The activation of the tyrosinase of the suspension of internal organs of *Pinctada martensii* by the storage
Crude enzyme solution was extracted in M/15 phosphate buffer (pH 7.0), and stored in 0° to 5°C

Reaction systems (pH 7.0, CuSO₄ was added) was incubated at 25° C for 48 hrs.

た. 一方HCl酸性・可溶性の黒色色素の吸収スペクトル(C)は330mμ附近に最大吸収を示すが赤色色素に比して明らかにその吸収が低下し, HCl不溶性の黒色色素(B)およびしみ珠の黒色色素(A)と赤色色素(D)との中間的な型を示している (Fig. 3). すなわち赤色色素(D)の330mμの最大吸収が低下し, 逆に低い部分が上昇してHCl酸性・不溶性の黒色色素のスペクトル(B)になるように見られ, 恐らくこの赤色色素はメラニンの中間生成物であるハラクロームではないかと思われる.

以上の実験IIの結果, アコヤガイ内臓抽出液には明らかにチロシナーゼが存在し, 微量の銅イオンの添加によって始めて活性化し, L-チロシンを基質にした場合に pH7.5~8.0で最も黒変が著しかった.

実験III アコヤガイ内臓懸濁液のチロシナーゼ作用の貯蔵中における再活性化現象

最初アコヤガイ内臓の全懸濁液は冷蔵庫に貯蔵し, 試験に供したがチロシナーゼ作用の持続性が一定しなかった. 従って

最初とほとんど同程度の作用を示した. (この場合にも Cu²⁺ を添加しない場合にはチロシナーゼ作用は認められなかった) しかしトルオールを添加した全懸濁液および遠心上層部では4日でチロシナーゼ作用は消失し, その後の再活性化現象は見られなかった.

このことからアコヤガイ内臓の全懸濁液のチロシナーゼの再活性化には遠心上層部と下層部の両方が必要であると考えられ

る。しかしこのチロシナーゼ作用の消長が活性物質によるものか阻害物質によるものかは明らかでない。

考 察

しみ珠の黒色素は主としてメラニン様色素であり、アコヤガイ内臓にはチロシナーゼが存在することが明らかとなった。もししみ珠の黒色素はアコヤガイのチロシナーゼの作用により生成するとするならば、この場合、手術操作によって生殖細胞あるいは遊走細胞が、また細菌の作用により崩壊組織あるいは遊走細胞等が真珠袋内に包含されチロシナーゼ作用が再活性の様式で進行するのではないと思われる。貯蔵によるチロシナーゼの活性化についてはBODINE等⁷⁾はgrass hopper (バッタの一種)の卵の孵化の場合プロチロシナーゼとして存在し、これに活性物質が作用してチロシナーゼを生成するとし、また大西氏等¹⁰⁾はショージョーバエの場合、体液中にチロシナーゼは不活性の型で存在し組織中から活性物質が溶出してこれを活性化するとしている。HOROWITZ⁹⁾も同じくショージョーバエのチロシナーゼについて最初その作用は認められないが低温に貯蔵した場合、活性化されることを報告し(前駆物質) + (活性物質) → (チロシナーゼ) + (2分子の活性物質)という式を提唱している。またNeurospora¹¹⁾についても貯蔵によるチロシナーゼの活性化が報告されている。このように昆虫類およびNeurosporaのチロシナーゼの貯蔵による活性化については多く報告されているが軟体動物については余り報告を見ないようである。

他方アコヤガイ内臓の粗酵素液および貯蔵前後の全懸濁液のチロシナーゼ作用はCu⁺⁺の添加によって初めて認められた。しかし実際にしみ珠の形成、すなわち黒変現象においてL-チロシンを基質としてこのようなCu⁺⁺によるチロシナーゼの活性化が関与しているかどうかは明らかでない。これに関連して、手術時におけるE.D.T.A. (Ethylenediamine-tetraacetic Acid)等のキレート試薬の使用がしみ珠形成の防止すなわちCu⁺⁺によるチロシナーゼの活性化の防止に有効であるかどうかは今後の研究にまたねばならない。また本研究では酵素液としてアコヤガイの全内臓の懸濁液・抽出液を用いたが臓器別のチロシナーゼ等についても更に検討すべきであると思う。

要 約

しみ珠の核と真珠層との間につまんでいる黒色有機物中の色素はその化学的性質から主としてメラニン様色素であることを知った。

アコヤガイ内臓からの粗酵素液ではチロシナーゼは微量のCu⁺⁺の添加によって活性化され、L-チロシンから黒色の色素を形成する。その至適pHはpH 7.5~8.0である。

アコヤガイ内臓の全懸濁液においては貯蔵によるチロシナーゼ作用の再活性現象が見られた。この再活性には全懸濁液の遠心上層部(12,000×g, 20分)および下層部の両方が必要であると考えられる。

この研究に当り、終始懇篤な指導を与えられた本学・銭谷武平教授、有益な御教示を戴いた活水女子短大・立石新吉教授ならびに種々の援助を惜しまれなかった八木原真珠・八木原四郎氏に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 青木 駿：真珠研究会伊勢部会会報，8，24 (1958)
- 2) 山口正男：“Cultured Pearls”，神戸真珠検査所編，pp. 150 (1956)
- 3) 大森啓一：真珠の研究，1，3 (1950)
- 4) 小竹子之助：日水会誌，20，679 (1955)
- 5) 柿本大壺・金沢昭夫：日水会誌，22，471 (1956)
- 6) 柿本大壺・金沢昭夫：日水会誌，22，476 (1956)
- 7) BODINE, J. H., et al. : *J. Cellular Comp. Physiol.*, 14, 173 (1939) .9) による
- 8) LERNER, A. B., et al. : *J. Biol. Chem.*, 187, 793 (1950)
- 9) HOROWITZ, N. H., and FLING, M. : “A Symposium on Amino Acid Metabolism”, Johns Hopkins Press, Baltimore, pp. 207 (1955)
- 10) OHNISHI, E. : *Japan. J. Zool.*, 11, 69 (1953) .9) による
- 11) HOROWITZ, N. H., and Shen, S. C. : *J. Biol. Chem.*, 197, 513 (1952)