

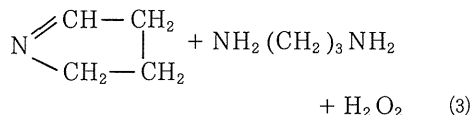
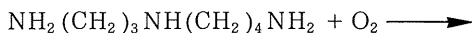
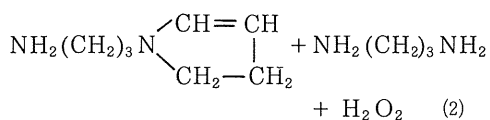
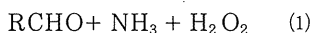
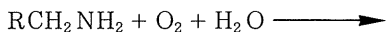
# エンドウ豆幼芽のジアミン酸化酵素の精製と性質

平松 昭, 土屋満寿美, 赤塚尹巳

## 緒 言

動物・微生物起源のアミン酸化酵素に対し、植物起源のアミン酸化酵素の研究報告は比較的少ない。また植物起源のアミン酸化酵素は植物体内での役割がまた明らかでないが、次の2つの仮説が報告されている。1) MotthesとSchütte<sup>1)</sup>により“植物アルカロイドと呼ばれるいくつかの、この酵素によって生成するaminoaldehydeから合成される”こと、2) ClarkとMann<sup>2)</sup>により“tryptamineはindol-acetic acid(以下IAAと略す)の前駆物質と考えられ、この酵素によりtryptamineが酸化され、indolacetaldehydeとなった後、植物生長ホルモンであるIAAとなる”と報告した。

植物起源のアミン酸化酵素は2大別される。その1つ



は(1)式を触媒するアミン酸化酵素でMann<sup>3)</sup>によってエンドウ豆の芽に存在することを報告し、Hill<sup>4)</sup>によって詳しく研究され、1,4-diaminobutane(putrescine)と1,5-diaminopentane(cadaverine)等のジアミン類をモノアミン類より良く触媒することから、ジアミン酸化酵素(EC1.4.3.6, DAOと略す)といわれ、活性発現に銅が必須である。(2)および(3)式を触媒するアミン酸

化酵素として、大麦、トウモロコシ等のイネ科植物に存在<sup>5)</sup>し、spermine, spermidine等のポリアミン類を良く酸化し、アンモニアを生成しないことから、ポリアミン酸化酵素(EC1.5.3.3)といわれ、フラビン(FMN, FAD)類が必須である。

著者らの研究はClarkとMann<sup>2)</sup>の仮説を実証する目的で一連の研究を行なっている。今回はエンドウ豆幼芽を用いジアミン酸化酵素を精製し、その酵素化学的性質を検討した結果をHillとMann<sup>5)</sup>、Hill<sup>4)</sup>およびMcgowanとMuirの結果と比較検討した。

## 実験方法

### 1. 実験材料

三十日絹莢エンドウ豆(*Pisum sativum* L. cv *kinusaya*)はタキイ種苗株式会社から購入した。1,4-diaminobutane 塩酸塩, 3-hydroxytryptamine 塩酸塩, tyramine 塩酸塩およびspermine りん酸塩は東京化成株式会社、ならびにその他アミン類およびジアミン類は和光純薬工業株式会社から購入した。Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemical Co.) およびP-Cellulose (Brown)は生化学工業株式会社、ならびにhydroxylapatite (Biochemicals)は第一化学薬品株式会社から購入した。

### 2. エンドウ豆の発芽および粗酵素液の調製

三十日絹莢エンドウ豆1ℓ(800g)を水道水で洗い、質の悪いものは取り除いて、さらに純水で数回洗い、24時間純水中に浸漬して十分に膨潤させた。4枚重ねのガゼを敷いたバットの上に膨潤エンドウ豆を載せて、23~25°Cに保った恒温暗室中で、1日1回適当な湿度をあたえながら、8日間発芽させた。発芽種子の芽のみ摘出し(約350g)、これを細かく切断して、等量の0.1M

りん酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) を加えてミキサーで磨砕した。これをガーゼでろ過後、ろ液を10,000 xgで20分間、4℃で遠心分離し、その上清液 (780ml) を粗酵素液とした。

### 3. 酵素活性測定法

ジアミン酸化酵素活性は酵素反応によって消費される酸素量を Clark の酸素電極 (Yellow Spring 社の 5331 型) を使用し、循環水 (37℃) によって恒温に保たれた反応セル (全容 1.2ml) 中で、反応混液を常にマグネチックスターラーで攪拌しながら測定した。反応混液は酵素液 0.3ml, 0.1M りん酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) 0.2ml および 0.69ml の水を反応セル内に入れ、37℃に平衡化した後、12mM 基質溶液 (特記しない場合基質として 1,4-diaminobutane を使用) 0.01ml を加え、消費した溶存酸素量を自記記録計 (日立製 056 型) で記録した。なお酸素電極と自記記録計を接続する電気回路は Estabrook<sup>9)</sup> が報告した回路を使用した。また酵素反応前の反応液中の溶存酸素量は Robinson と Cooper<sup>10)</sup> が報告した方法に従って、N-methylphenazonium methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) およびカタラーゼを用いて測定し、

溶存酸素量 = 214  $\mu$ mol/ml at 37℃  
と算出された。

酵素単位 (unit) は 1 分間に消費された酸素量の  $\mu$ mol で表示した。また比活性は上記酵素単位を使用したタンパク質量 (mg) で除して表示した。

### 4. タンパク質量の測定法

タンパク質量は Lowry<sup>11)</sup> 法に従って測定した。この際標準タンパク質として牛血清アルブミン (2 回結晶, Sigma 社) を使用した。また場合によっては 280nm の吸光度から、吸光係数  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 15.1$  を使用して算出した。

### 5. 銅の定量法

酵素タンパク質中の銅含量は不破と Vallee<sup>12)</sup> の方法に従って、酵素溶液を硝酸濃度を 2N として原子吸光度計 (日本・Jarrell-Ash 社, AA-855 型) を用いて

測定した。

### 6. Disc電気泳動法

酵素タンパク質の純度を検討する目的で disc 電気泳動を Davis<sup>13)</sup> の方法に従って行なった。ゲル濃度は 5% で、Tris-ホー酸緩衝液 (pH8.6) 中で、ゲル 1 本当たり 2.5mA で 90 分泳動した。泳動後 1 本のゲルは常法により amido black 10B で染色した。他方 2 本のゲルはそれぞれ 2.5mm の長さにカミソリの刃で切り、個々のゲル切片をそれぞれの試験管に入れ、0.1M りん酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) 1ml を加え、ホモジネートし、4℃で 3 時間酵素を抽出し、この抽出液の酵素活性を 1,4-diaminobutane と tryptamine をそれぞれ基質として測定した。

### 7. 分子量の測定法

酵素タンパク質の分子量は Andrews<sup>14)</sup> のゲルろ過法に従って測定した。0.15M NaCl を含む 0.1M りん酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) で平衡化した Sephadex G-200 カラム (0.9×45cm) に酵素を展開し、流速 3.0 ml/hr で溶出液を 2ml づつ分画した。標準タンパク質として、カタラーゼ (牛肝臓, Sigma 社), アルコールデヒドロゲナーゼ (酵母, Boehringer Mannheim GmbH 社), 牛血清アルブミン (Sigma 社), 卵アルブミン (半井化学株式会社) およびチトクローム c (馬心筋, 日研化学株式会社) を使用した。

酵素の subunit の分子量の測定には Wu と Bruening<sup>15)</sup> の方法に従って SDS-disc 電気泳動法を行なった。ゲル濃度 7.5% で、ゲル 1 本当たり 2.5mA で 8 時間泳動した。標準タンパク質として、牛血清アルブミン、卵アルブミンおよびチトクローム c を使用した。

### 8. 等電点の測定法

酵素タンパク質の等電点の測定には Vesterberg と Svensen<sup>16)</sup> の方法に従って等電点分画を行なった。Ampholine は pH 範囲 3~10 (40% 水溶液, LKB 社) を使用し、ampholine 濃度 1% で、4℃で 21 時間、300V の電圧で電気泳動した。泳動後、3.3ml づつ分画し、各分画液は 4℃で pH を測定した。

## 9. アポ酵素の調製法

酵素のアポ酵素の調製法には、酵素液 10ml (570 $\mu$ g のタンパク質を含む) に 1M sodium diethyldithiocarbamate を含む 0.1M リン酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) 0.5ml を加え (この試薬の混液中の濃度は 0.05M), 4 $^{\circ}$ C で 1 夜静置した。混液中よりタンパク質に結合した銅および過剰の試薬を除くために Sephadex G-25 を用いたゲルろ過法で除去した。0.1M リン酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) をカラム (2 $\times$ 30cm) に 60 ml/h の流速で展開し、溶出したタンパク質画分を集めアポ酵素液とした。このアポ酵素は酵素活性が認められなかった。

## 実験結果

### 1. ジアミン酸化酵素の精製法

Hill<sup>4)</sup> の精製法を主体に McGowan と Miur<sup>7)</sup> の精製法を組合せた方法、すなわち 1) 硫酸分画、2) Sephadex G-200 ゲルろ過、3) P-Cellulose および 4) hydroxylapatite クロマトグラフィーによって精製した。なお精製には 4 $^{\circ}$ C の冷房室内で行なった。

#### 1) 硫酸分画

粗酵素液に結晶硫酸 (190g/l) を加え、35% 飽和とし pH7.0 で 1 時間静置後、10,000 $\times$ g、20 分間遠心し、その上澄液を集めた。この上澄液をさらに 60% 飽和硫酸 (165g/l) とし、同様の操作により沈殿を集めた。35~60% 飽和硫酸で生成した沈殿は 0.1M リン酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) 40ml に溶解し、同緩衝液に対して 1 夜透析した。

#### 2) Sephadex G-200 ゲルろ過

0.1M リン酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) で平衡化した Sephadex G-200 カラム (4 $\times$ 81cm) に前記透析液 20ml をカラム上加え、同上緩衝液を流速 32ml/hr で展開し、溶出液 17ml づつ分画した。この結果は Fig. 1 に示した。1,4-diaminobutane を基質とした酵素活性ピークと tryptamine を基質とした酵素活性ピークは分画番号 28~42 に認められ、その他の画分には認められなかった。酵素活性を示した画分を集め、0.02M

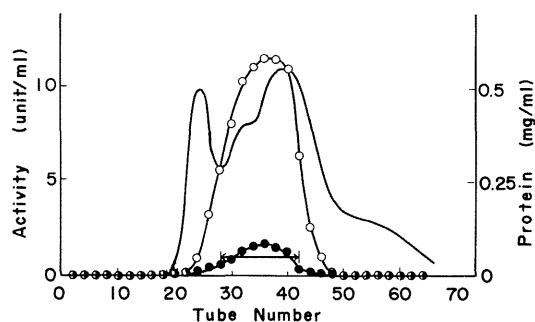


Fig.1 Chromatography of the diamine oxidase on a column of Sephadex G-200.

The dialyzed enzyme solution fractionated with 35 to 60% saturation of ammonium sulfate was placed on the top of a column (4.0 $\times$ 81cm) of Sephadex G-200 which had been equilibrated with 0.1M potassium phosphate buffer at pH7.0. The flow rate was 32ml per hour and fractions of 17ml were collected. Horizontal arrow indicate fractions pooled. —, concentration of protein; —○—, putrescine oxidized activity; —●—, tryptamine oxidized activity.

リン酸カリウム塩緩衝液 (pH6.0) に対し 1 夜透析した。

#### 3) P-Cellulose クロマトグラフィー

0.02M リン酸カリウム塩緩衝液 (pH6.0) で平衡化した P-Cellulose カラム (2.1 $\times$ 46cm) に酵素液 170 ml をカラム上加え、同上緩衝液でカラムを十分洗浄した。酵素は緩衝液濃度を 0.02~0.3M まで直線的に変化させて溶出した。流速は 51.7ml/hr で 15ml づつ分画した。この結果は Fig.2 に示した。1,4-diaminobutane と tryptamine とをそれぞれ基質にして測定した酵素活性はともに P-Cellulose に吸着し塩濃度 0.24M で溶出された画分 (分画番号 43~50) と、カラムを 0.02M リン酸カリウム塩緩衝液で洗浄した画分 (分画番号 16~19) との二ヶ所に認められた。前者はこのクロマトグラフィーの回収率が 86% で、この酵素画分をジアミン酸化酵素 A (以下 DAO A と略す) とし、後者は回収率が 8% で、この酵素画分をジアミン酸化酵素 B (以下 DAO B と略す) とした。

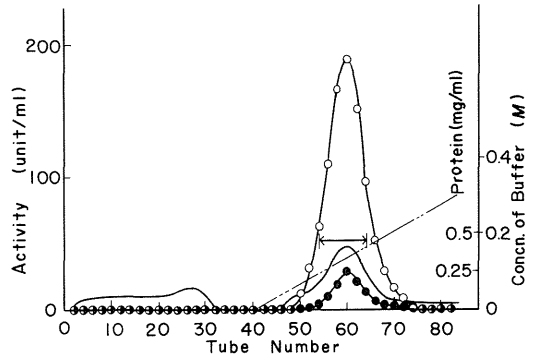
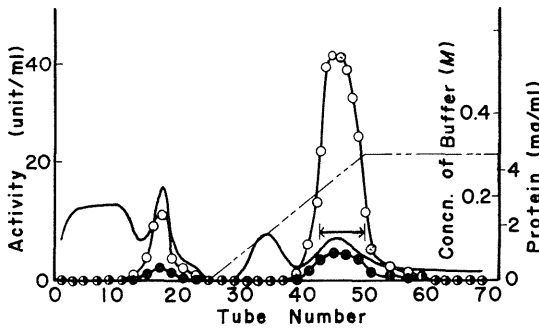


Fig.2 Chromatography of the diamine oxidase on a column of P-Cellulose.

Enzyme solution fractionated by chromatography of Sephadex G-200 was placed on the top of a column (2.1×46cm) of P-Cellulose which had been equilibrated with 0.1M potassium phosphate buffer at pH 7.0. After the column was washed with the starting buffer and the enzyme was eluted with a linearly increasing concentration of buffer from 0 to 0.3M. The flow rate was 51.7ml per hour and fractions of 15ml were collected. Horizontal arrow indicate fraction pooled. ———, concentration of protein; —○—, putrescine oxidized activity; —●—, tryptamine oxidized activity; - - - - -, concentration of buffer.

Fig.3 Chromatography of the diamine oxidase A on a column of hydroxylapatite.

The diamine oxidase A fractionated by chromatography of P-Cellulose was placed on the top of a column (2.1×46cm) of hydroxylapatite which had been equilibrated with 0.025M potassium phosphate buffer at pH 7.0. After the column was washed with the starting buffer and the enzyme was eluted with a linearly increasing concentration of buffer from 0.025 to 0.3M. The flow rate was 57.5ml per hour, and fractions of 15ml were collected. Horizontal arrow indicate fractions pooled. ———, concentration of protein; —○—, putrescine oxidized activity; —●—, tryptamine oxidized activity; - - - - -, concentration of buffer.

DAO Aは0.025Mりん酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.0) に対して1夜透析し, 次の精製段階に使用した。DAO Bは限外ろ過法 (東洋ウルトラフィルター UK-10) により濃縮した後, 0.02Mりん酸カリウム塩緩衝液に対し1夜透析し, 精製DAO B酵素液として以下の実験に使用した。

4) Hydroxylapatite クロマトグラフィー

前記のDAO A透析酵素液350mlは0.025Mりん酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) で平衡化したhydroxylapatite カラム (1.5×5cm) 上加え, 同上緩衝液でカラムを十分洗浄した後, りん酸カリウム塩緩衝液の濃度を0.025~0.30Mまで直線的に変化させDAO Aを溶出した。流速は57.5ml/hrで, 9.0mlづつ分画し

た。この結果はFig.3に示した。1,4-diaminobutaneとtryptamineとをそれぞれ基質にして測定した酵素活性ピークはタンパク質ピーク (分画番号54~64) と同一画分に認められた。その他の画分には酵素活性は認められなかった。

DAO Aは0.02Mりん酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.0) で1夜透析し, 精製DAO A酵素液とし, 以下の実験に使用した。

DAO AおよびBの精製を一覧表にまとめ, Table Iに示した。DAO Aは約218倍に精製され, 回収率28%であった。また酵素の比活性は318unit/mg of proteinであった。

Table I Purification of the Diamine Oxidase A and B from Epicotyls of *Pisum sativum*

Procedures	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)
Crude extract	5262	7720	1.46	100
35-60% ammonium sulfate precipitation	1064	6176	5.80	80
Sephadex G-200 chromatography	283	5404	19.10	70
P-Cellulose chromatography	51 19*	3628 388*	71.80 20.74*	47 5*
Hydroxylapatite chromatography	7	2162	318.0	28

One unit of the oxidized activity was defined as the amount of enzyme that liberates assay solution for 1,4-diaminobutane as the substrate corresponding to one  $\mu$ mole of  $O_2$  per min per ml of enzyme solution. Specific activity was expressed in units per mg of protein of the enzyme solution.

\* Data of diamine oxidase B.

2. 酵素の均一性と二・三の蛋白質化学的性質

DAO Aはdisc電気泳動法, SDS-disc電気泳動および等電点分画法によって, ならびにDAO Bはdisc

電気泳動法によってそれぞれ均一性を調べた。これらの結果の内 Fig.4, および5には両酵素の disc 電気泳動の結果を示した。

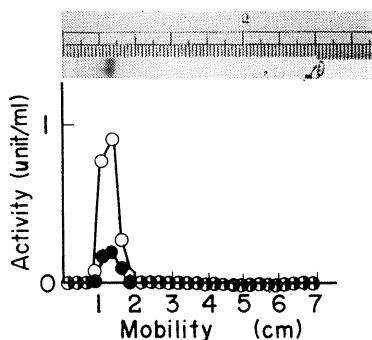


Fig.4 Electrophoresis of the diamine oxidase A on acrylamide gel.

Electrophoretic pattern was obtained by the method of Davis<sup>13)</sup> using 5 per cent acrylamide gel at pH 8.6. Electrophoresis was carried out at 2.5mA for 90min, and gel was stained for protein with amidoblack 10B.

—○—, putrescine oxidized activity; —●—, tryptamin oxidized activity.

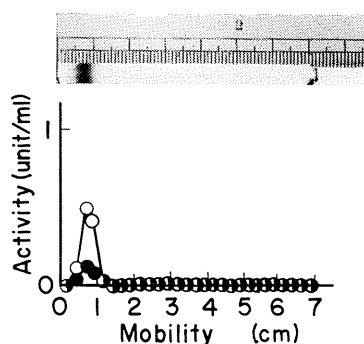


Fig.5 Electrophoresis of the diamine oxidase B on acrylamide gel.

The conditions were the same as those used on obtaining the data in Fig.4.

DAO AはdiscおよびSDS-disc 電気泳動で1本のタンパク質バンドが認められた。またdisc 電気泳動および等電点分画法では1,4-diaminobutaneとtryptamineとをそれぞれ基質にして測定した酵素活性ピークはタンパク質バンドまたはピークと良く一致した。

DAO Bはdisc 電気泳動で1本のタンパク質バンドが認められ、1,4-diaminobutaneとtryptamineとをそれぞれ基質として測定した酵素活性ピークはタンパクバンドと良く一致した。またDAO BはDAO Aより易動度が小さかった。

DAO Aの分子量はSephadex G-200ゲルろ過法によって測定した結果をFig.6に示し、約120,000であった。またDAO Aのsubunitの分子量はSDS disc 電気泳動法で測定した結果をFig.7に示し、約60,000と推定された。従ってDAO Aは2量体をなすと考えられる。

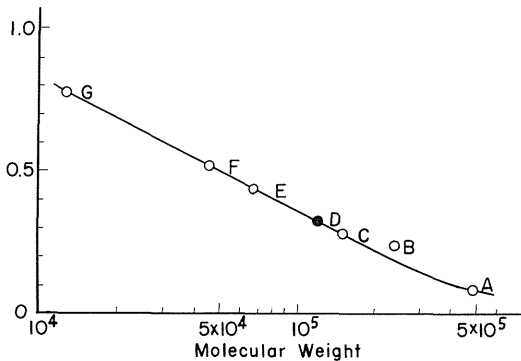


Fig.6 Estimation of molecular weight of the diamine oxidase A by Sephadex G-200 gel filtration.

The column (2.0×70cm) of Sephadex G-200 was equilibrated with 0.1M potassium phosphate buffer at pH 7.0. Elution was performed with the same buffer at the flow rate of 13.4 ml per hour. A, urease; B, catalase; C, alcohol dehydrogenase; D, diamine oxidase; E, serum albumin; F, ovalbumin; G, cytochrome c.

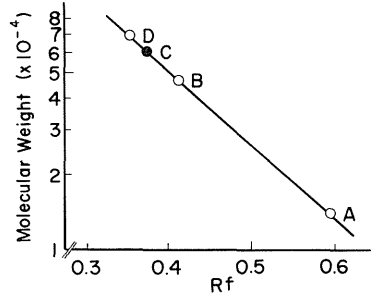


Fig.7 Estimation of molecular weight of the diamine oxidase A subunit by SDS disc electrophoresis.

The procedure is described in "Materials and Methods". A, cytochrome c; B, ovalbumin; C, diamine oxidase A; D, serum albumin.

DAO Aの等電点は6.7であった。またDAO Aの銅含量を原子吸光法で測定した結果、酵素タンパク質36.4 μg中に0.025 μgの銅を含んでいた。先に推定したDAO Aのsubunitの分子量を60,000として計算するとsubunit 当り0.7原子の銅を含むことから、subunit当り1原子の銅を含むと考えられる。

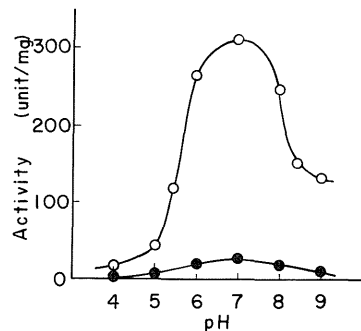


Fig.8 Effect of pH on the activities of the diamine oxidase A and B

The reaction mixture contained 0.3ml of the enzyme solution (4.6 μg for DAO A or 46.5 μg for DAO B) in 1.2ml of substrate buffer solution at various pH's and 37°C. Buffers used were 0.2ml of 0.2M veronal-acetate-HCl buffer for pH 4.0 to 9.0 or 0.2M Tris-HCl buffer for pH 7.0 to 9.0 (ionic strength = 0.05). —○—, DAO A; —●—, DAO B.

### 3. 酵素化学的性質

#### 1) 最適 pH

DAO A および B の酵素作用の最適 pH を検討して Fig.8 に示した。両酵素共に最適 pH は 7.0 であった。pH 作用範囲はかなり狭いことを示した。

#### 2) 最適温度

最適 pH 7.0 で DAO A および B の酵素作用の最適温度を検討し、Fig.9 に示した。両酵素共に最適温度 40 ~ 50 °C で、温度の上昇と共に酵素活性は低下する。80 °C で酵素活性を失った。

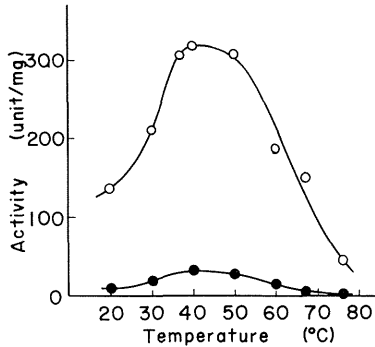


Fig.9 Effect of temperature on the activities of the diamine oxidase A and B.

The reaction mixture contained 0.3ml of the enzyme solution (4.6  $\mu$ g for DAO A or 46.5  $\mu$ g for DAO B) in 1.2ml of substrate buffer solution at pH 7.0. The assay solution was incubated at various temperatures.

—○—, DAO A; —●—, DAO B.

#### 3) pH 安定性

酵素液を 0.1N HCl および 0.1N NaOH を用いて所定の pH に調整し、4 °C で 20 時間放置した後、pH 7.0 に戻して、これら処理酵素の残存酵素活性を測定して、DAO A および B のそれぞれの pH 安定性を調べ、Fig. 10 に示した。両酵素は共に pH 4 ~ 9 の範囲で安定であった。この範囲を越えると急速に酵素活性を失った。

#### 4) 熱安定性

酵素液を pH 7.0 で 10 分間各温度に放置後、氷水中で 10 分間急冷した後、直ちに残存酵素活性を測定し、

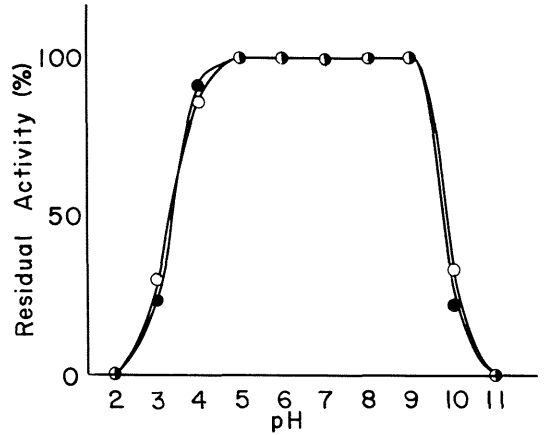


Fig.10 pH stabilities of the diamine oxidase A and B.

The enzymes were preincubated with the buffer at the indicated pH's for 20hr at 4 °C in a total volume 1.0ml. The enzymes used were 36.8  $\mu$ g for DAO A or 372  $\mu$ g for DAO B. —○—, DAO A; —●—, DAO B.

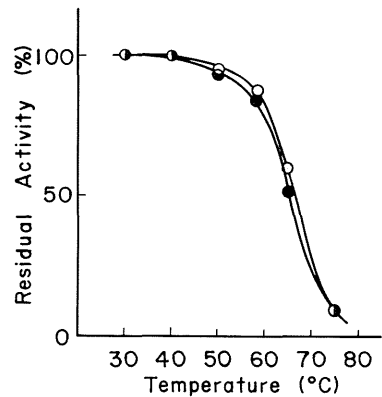


Fig.11 Thermal stabilities of the diamine oxidase A and B.

The enzymes were heated an indicated temperature for 10 min in 1.0ml of 0.1M phosphate buffer at pH 7.0 and immediately cooled at 0 °C. The enzymes used were 18.4  $\mu$ g for DAO A or 186  $\mu$ g for DAO B. —○—, DAO A; —●—, DAO B.

DAO A および B の温度に対する安定性を調べた結果を Fig.11 に示した。両酵素は共に 40 °C まで安定であ

るが、温度の上昇とともに少しづつ酵素活性は低下し、65℃以上では失活がはげしくなった。

5) 各種金属イオンの影響

DAO Aの酵素活性におよぼす各種金属イオン( $3.3 \times 10^{-4} M$ )の影響をpH 7.0, 37℃において測定し、Table IIに示した。DAO Aは $Hg^{++}$ で強く阻害された。またDAO Aのアポ酵素は $3.3 \times 10^{-4} M Cu^{++}$ の存在によって、ポロ酵素の活性の96%まで酵素活性を回復した(Table IIおよびFig.12参照)。その他の金属イオンではほとんど活性の回復は認められなかった。

Table II Effect of Metal Ions on the Activity of Diamine Oxidase A and on the Reactivation of the Diamine Oxidase A Apoenzyme

Metal ions	Residual activity of DAO A	Reactivation of DAO A apoenzyme
none	100	0
$CuCl_2$	96	96
$MnCl_2$	91	0
$MgCl_2$	93	6
$AlCl_3$	92	3
$CaCl_2$	100	5
$NiCl_2$	76	4
$ZnCl_2$	75	2
$SnCl_2$	99	0
$CoCl_2$	99	0
$FeCl_3$	94	0
$PbCl_2$	100	0
$HgCl_2$	8	0
$CdCl_2$	100	0

Enzymes (4.6  $\mu g$  for DAO or 4.9  $\mu g$  for DAO A apoenzyme) were treated with indicated metal ions at concentration of  $3.3 \times 10^{-4} M$  (pH 7.0) for 10min at room temperature, in a total volume 1.2ml.

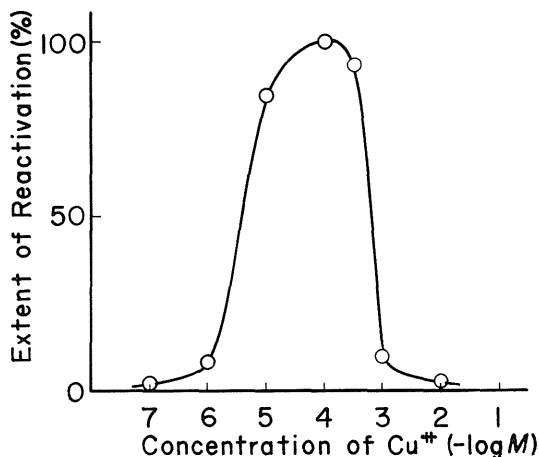


Fig.12 Reactivation of the diamine oxidase A apoenzyme by cooper ion.

The apoenzyme (5.0  $\mu g$ ) of DAO A in 0.1M phosphate buffer at pH 7.0 was incubated at 20°C for 10min in presence of various concentration of copper ion.

6) 各種試薬の影響

DAO AおよびBの酵素活性におよぼす各種試薬の影響をpH 7.0, 37℃で測定し、Table IIIに示した。両酵素共にphenylhydrazine, semicalbazine等のカルボニル試薬によって強く阻害を受けた。また1,10-phenanthroline, ethylen diaminotetraacetic acid, diethyldithiocarbamate等のキレート試薬により阻害され、p-chloromercuribenzoateのSH試薬およびdiisopropylfluorophosphateのタンパク質中のセリン残基修飾試薬によっては阻害されなかった。

植物の生長抑制剤であるN-dimethylaminosuccinamic acid (B-NineまたはB-995, 日本曹達株式会社より分与された。以下B-Nineと略す), 2-hydroxyethylhydrazine (BOHと略す), 1,1-dimethylhydrazine (UDMHと略す), maleic hydrazine (MHと略す), (2-bromo-



Table III Effect of Various Chemicals on the Activities of the Diamine Oxidase A and B

Chemicals	Concn. of chemicals (mM)	Inhibition		Note
		DAO A	DAO B	
1,10-Phenanthroline	0.1	91	91	Che
Diethyldithiocarbamate	0.1	78	76	Che
Neocuproine	0.1	9		Che
Ethylenediamine-tetraacetate (EDTA)	0.2	91	94	Che
Phenylhydrazine	0.01	100	100	Car
Semicarbazine	0.02	100	100	Car
Aminoguanizine	0.02	78		Car
N-Dimethylaminosuccinic acid (B-Nine)	0.67	95	97	Gro Car
1,1-dimethylhydrazine (UDMH)	0.67	95		Gro Car
2-hydroxyethylhydrazine (BOH)	0.67	83		Gro Car
Maleic hydrazine (MH)	0.67	16		Gro Car
Sodium borohydride	0.1	40		Car
(2-Bromoethyl) trimethylammonium (BCB)	0.67	3		Gro
(2-Chloroethyl) trimethylammonium (CCC)	0.67	5		Gro
p-Chloromercuribenzoate (PCMB)	0.1	0	0	SH
Photooxidation (0.001% Rose Bengal)		97		His
Ethoxyformic anhydride	0.1	62		His
Diisopropylfluorophosphate (DFP)	0.1	0	0	Ser

Enzymes (4.6  $\mu$ g for DAO A or 46.5  $\mu$ g for DAO B) were treated with the indicated chemicals at indicated concentrations for 10min at room temperature, in a total volume of 1.2ml. Car, carbonyl reagent; Che, chelating agent; Gro, growth retardant, SH, -SH reagent; His, modification of histidine residue of protein; Ser, modification of serine residue of protein.

ethyl)trimethylammonium (BCBと略す)および、(2-chloroethyl)trimethylammonium (CCCと略す)がDAO Aに対する影響を調べた。ヒドラジン系の植物生長抑制剤であるB-Nine, BOHお

よびUDMHはDAO A 酵素活性を強く阻害した。しかしヒドラジン系であるがリング状化学構造をもったMHはDAO A 酵素活性をあまり阻害しない。第4級アンモニウム系の植物生長抑制剤であるBCBおよび

CCCは阻害しなかった。

7) 基質特異性

各種基質に対する DAO A および B の酵素活性を pH 7.0, 37°C で測定し, Table IV に示した。DAO A および B は 1,4-diaminobutane および 1,5-diaminopentane を最もよく酸化した。1,2-diaminoethane

および 1,3-diaminopropane は全く酸化しなかった。spermidine および spermine はあまりよく酸化されなかった。tryptamine は 1,4-diaminobutane の 14% しか酸化されなかった。その他のモノアミン類, ジアミン類, 芳香族アミン類およびリジンをそれぞれわずかに酸化した。

Table IV Actions of the Diamine Oxidase A and B on Various Amine and Diamine

Substrate	Relative activity	
	DAO A	DAO B
1,2-Diaminoethane	0	0
1,3-Diaminopropane	0	0
1,4-Diaminobutane (putrescine)	100	100
1,5-Diaminopentane	100	
1,6-Diaminohexane	38	
1,8-Diaminooctane	10	8
Agmatine	34	
Spermidine	26	29
Spermine	17	15
Lysine	8	
Methylamine	8	
Ethylamine	8	
n-Propylamine	9	
n-Butylamine	7	5
n-Hezylamine	9	
Benzylamine	6	
2-Phenylethylamine	21	
Tyramine	20	
Dopamine	13	
Tryptamine	14	13
Histamine	7	6

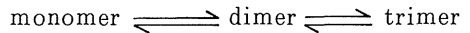
Enzyme were used 4.6 μg for DAO A or 46.5 μg for DAO B. Concentration of substrate was 1mM in digestion mixture.

## 考 察

Hill<sup>4)</sup>の報告したエンドウ豆ジアミン酸化酵素の精製方法が一般によく使用されているが、ethanol-chloroformおよびpHによる沈殿法は収率が悪いので、著者らはこれらの操作を除き、McGowanとMuir<sup>5)</sup>が精製方法に使用したP-Celluloseクロマトグラフィーと、新たにSephadex G-200ゲルろ過法を加えた操作法により(Table I参照)エンドウ豆幼芽抽出液からジアミン酸化酵素の精製を行なった。この精製操作の内、P-Celluloseカラムクロマトグラフィーに吸着するジアミン酸化酵素(DAO A)と、カラムに吸着しないジアミン酸化酵素(BAO B)に分離された。DAO AおよびBの精製酵素標品はともにdisc電気泳動的に均一であった(Fig. 4およびFig. 5参照)。精製DAO Aの比活性は318 unit/mg of proteinでHill<sup>4)</sup>の報告した酵素の比活性が73.1 unit/mg of proteinと比較して約4倍高かった。McGowanとMuir<sup>7)</sup>が得た酵素はdisc電気泳動で2本のタンパク質バンドを示し、比活性の高い酵素はbenzylamineを基質として1.005 unit/mg of proteinで、benzylamineと1,4-diaminobutaneとのVmaxの比から1,4-diaminobutaneに換算しても比活性は17.56 unit/mg of proteinとかなり低い。NylinとSzybek<sup>17)</sup>はHill<sup>4)</sup>の精製方法で80 unit/mg of proteinの酵素標品を得た。

一連の精製操作において、1,4-diaminobutaneとtryptamineを基質とし、並行して酵素活性を測定したが、使用した3つのカラムクロマトグラフィーで、両基質に対する酵素活性がDAO AおよびBのそれぞれのタンパク質とよく一致し、他に単独でtryptamineを酸化する酵素活性は見出せなかった。DAO AはDAO BがP-Celluloseに吸着しないのに対し、吸着すること、Disc電気泳動における易動度が大きいこと、および比活性が高いことを除いて、最適pH、最適温度、安定性、各種試薬に対する影響、各種基質に対する特異性等、酵素化学的性質が良く類似していた。Hill<sup>4)</sup>の

精製したジアミン酸化酵素がDEAE-Celluloseに吸着しないこと、hydroxylapatiteに吸着すること、酵素1分子中に1原子の銅を含むこと等、酵素化学的性質がDAO Aの結果と良く一致した。McGowanとMuir<sup>7)</sup>の精製したアミン酸化酵素はP-Celluloseに吸着することはDAO Aの結果と一致するが、1,4-diaminobutaneよりspermidineをよく酸化(約1.5倍)することが異なる。またHillとMann<sup>3)</sup>はジアミン酸化酵素の分子量が電子顕微鏡写真から96,000、銅含量から73,000、McGowanとMuir<sup>7)</sup>は沈降降法から185,000\*、またNylenとSzybek<sup>17)</sup>はphenylhydrazine適応による酵素活性の阻害から、HillとMann<sup>3)</sup>の報告した96,000が正しいことを報告しているが、DAO Aの分子量が120,000で、subunitの分子量が60,000であった。いずれも測定方法が違っているため、今後の研究に待たねばならないが、エンドウ豆ジアミン酸化酵素が2量体であるという報告はなかった。Yasunobuら<sup>19)</sup>は牛血漿ジアミン酸化酵素のsubunitの分子量が85,000\*\*または87,000\*\*\*で、native酵素の分子量が170,000または263,000で



のような平衡関係があることを報告し、精製操作中で、formの違いによりDEAE-Celluloseおよびhydroxylapatiteカラムクロマトグラフィーによりそれぞれ2つの画分に酵素が分離されることを示唆している。DAO AとBは酵素化学的性質がきわめて類似しているが、タンパク質化学的性質の異なることから、これら両酵素もformの違いによるものと考えている。

エンドウ豆ジアミン酸化酵素の各種試薬による阻害効果からdiisopropylfluorophosphateとp-chloromercuribenzoateにより阻害されることからセリン残基とSH基が活性に関与しないことが推測される。semicalbazineやphenylhydrazine等のカルボニル

\* 偏比容は牛血漿ジアミン酸化酵素の偏比容<sup>28)</sup> 0.76 ml/gを使用して算出した。

\*\* 沈降係数と拡散係数から算出した。

\*\*\* SDS-disc電気泳動から求めた。

試薬により強く阻害されることからカルボニル基が活性に関与していると考えられる。これらの結果は Hill<sup>4)</sup> の報告と一致する。一般にカルボニル基はピリドキザールリン酸が補酵素であることが考えられるが、 $10^{-4}$  M の水素化ホー素ナトリウムにより 40% 阻害された。この結果は他のカルボニル試薬による阻害と比較してかなり穏やかである。動物・微生物起源のジアミン酸化酵素、たとえば牛血漿ではけい光ペプチド<sup>19)</sup> の結果から、*Aspergillus niger* では 380 nm の吸収スペクトル<sup>20)</sup> から、および基質-水素化ホー素ナトリウムの阻害<sup>21)</sup> から、豚血漿ではけい光ペプチドから、それぞれピリドキザールリン酸の存在を実証しているが、しかしエンドウ豆では Hill<sup>23)</sup> が 380 nm の吸収スペクトルからピリドキザールリン酸の存在を実証することが出来なかった。今後の検討課題の一つである。

四十九院ら<sup>27)</sup> は牛血漿ジアミン酸化酵素のヒスチジン残基が活性に必須であることを証明した際に、エンドウ豆ジアミン酸化酵素が ethoxyformic anhydride により強く阻害されることを報告した。著者らの精製酵素も  $10^{-4}$  M の ethoxyformic anhydride で 62% 阻害され、0.001% Rose Bengal 存在下での光酸化により 97% 阻害されることからヒスチジン残基が活性に関与していることが明らかになった。

以上のことからエンドウ豆ジアミン酸化酵素の活性発

現には銅、カルボニル基およびヒスチジン残基が必須であると考えられる。Yasunobu ら<sup>19)</sup> は牛血漿ジアミン酸化酵素の活性中心構造の模式図を Fig. 13 のように示した。エンドウ豆ジアミン酸化酵素も同様の模式図が考えられる。

Mann<sup>3)</sup> はエンドウ体内で indolacetic acid (以下 IAA と略す) の前駆物質の 1 つである tryptamine はジアミン酸化酵素により酸化され、indolacetaldehyde を経て IAA になると報告した。このことを証明する報告として Reed ら<sup>25)</sup> および鈴木と山崎<sup>26)</sup> は B-Nine や BOH のような植物生長抑制物質が、ジアミン酸化酵素による tryptamine 酸化を阻害し、生長ホルモンである IAA の生成を抑制するために、植物はわい化すると報告した。著者の実験でも DAO A および B は B-Nine や BOH により強く阻害されたが、IAA の生成が植物体内で抑制された証明にはならない。しかし tryptamine を酸化する酵素はエンドウ体内ではジアミン酸化酵素で、他にトリプタミン酸化酵素は見出せなかった。現在、B-Nine と BOH (商品名ポバイン) は市販され、観賞用植物、果樹、トマト等のわい化剤として使用されている。市販されているこれら以外のわい化剤で、第 4 級アンモニウム系の CCC や BCB はエンドウ豆のジアミン酸化酵素を全く阻害しないことから、B-Nine や BOH とは異なる作用機構によりわい化するものと考えられる。

## 要 約

1. エンドウ豆幼芽抽出液よりジアミン酸化酵素を硫酸分画 → Sephadex G-200 ゲルろ過 → P-Cellulose カラムクロマトグラフィー → hydroxylapatite カラムクロマトグラフィーにより約 218 倍に精製した。

2. ジアミン酸化酵素は P-Cellulose カラムクロマトグラフィーで 2 酵素、DAO A と B に分離し、これら酵素の最適 pH 7.0, 最適温度 40°C, pH 安定性, 熱安定性, 各種試薬に対する影響および基質異性はよく一致した。また Hill<sup>4)</sup> の報告したジアミン酸化酵素の酵素化学的性質とも良く一致した。また両酵素の 1,4-dia-

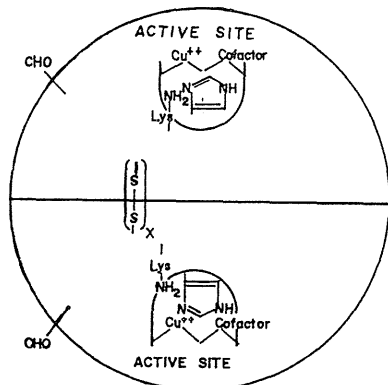


Fig. 13 A model of the molecular structure of bovine plasma amine oxidase.

minobutaneとtryptamineをそれぞれ基質にした酵素活性は各クロマトグラム上の同一画分に示された。

3. ジアミン酸化酵素(DAO A)の比活性は318 unit/mg of proteinで, disc電気泳動的に均一で, 等電点6.7で, 分子量が120,000で, subunitの分子量が60,000の2量体であった。また活性発現に銅, カルボニル基およびヒスチジン残基が必須であった。

4. 本酵素の活性は植物生長抑制剤中のヒドラジン系のB-Nine, BOHおよびUDMHによって阻害され, 第4級アンモニウム系のCCCおよびBCBによって阻害されない。

本研究の遂行に協力された大堀弘子, 国分睦子両君に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Mothes, K. and H. R. Schütte : *Angew. Chem. (internat. Edit.)*, **2**, 341 (1963).
- 2) Clark, A. J. and P. J. G. Mann : *Biochem. J.*, **65**, 763 (1957).
- 3) Mann, P. J. G. : *Biochem. J.*, **79**, 623 (1961).
- 4) Hill, J. M. : *Methods in Enzymology*, ed. by H. Tabor and C. W. Tabor, Vol. 17B, p. 731 (1971) Academic Press, New York.
- 5) Smith, T. A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1452 (1970).
- 6) Hill, J. M. and P. J. G. Mann : *Biochem. J.* **91**, 171 (1964).
- 7) McGowan, R. E. and R. M. Muir : *Plant Physiol.*, **47**, 644 (1971).
- 8) 松田仁志, 鈴木米三 : 第43回植物学会大会(千葉)研究発表記録 134頁(1978).
- 9) Estabrook, R. W. : *Methods in Enzymology*, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Vol. 10, p. 41 (1967) Academic Press, New York.
- 10) Robinson, J. and J. M. Cooper, *Anal. Biochem.*, **33**, 390 (1970).
- 11) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 12) Fuwa, K. and B. L. Vallee : *Anal. Chem.*, **35**, 942 (1963).
- 13) Davis, B. J. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 406 (1964).
- 14) Andrews, P. : *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 15) Wu, G. J. and G. E. Bruening : *Virology*, **46**, 596 (1971).
- 16) Vesterberg, O. and H. Svensen : *Acta Chem. Scand.*, **20**, 820 (1966).
- 17) Nylén, U. and P. Szybek : *Acta Chem. Scand.*, **28**, 1153 (1974).
- 18) Achee, F. M., C. Chervenka and K. T. Yasunobu : *Biochemistry*, **7**, 4329 (1968).
- 19) Yasunobu, K. T., H. Ishizaki and N. Minamiura, *Molecular & Cellular Biochemistry*, **13**, 3 (1976).
- 20) Yamada, H. and K. T. Yasunobu : *J. Biol. Chem.*, **238**, 2669 (1963).
- 21) Yamada, H., O. Adachi and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 912 (1965).
- 22) Adachi, O. : ph. D. Thesis (Kyoto University) (1969).
- 23) Blaschko, H. and F. Buffoni : *Proc. Roy. Soc. (London)*, **163**, 45 (1965).
- 24) Hill, J. M. : M. S. Thesis. (1967).
- 25) Reed, D. J., T. C. Moore and J. D. Anderson : *Science*, **148**, 1469 (1965).
- 26) Suzuki, Y. and K. Yamasaki : *Enzymologia*, **39**, 57 (1970).

**Purification and Properties of Diamine Oxidase from Epicotyls of  
*Pisum sativum***

AKIRA HIRAMATSU, MASUMI TSUCHIYA and TADAMI AKATSUKA

1. The purification of the diamine oxidase from the extract of epicotyls of *Pisum sativum* L. cv *kinusaya* was attempted by the fractional precipitation with ammonium sulfate, chromatography on columns of Sephadex G-200, P-Cellulose and hydroxylapatite. On the column of P-Cellulose, we achieved a success in separation of the diamine oxidase, namely diamine oxidase A and B. The purified diamine oxidase A was purified about 218 fold.

2. The protein content and enzymatic activities, using 1,4-diaminobutane or tryptamine as the substrate, gave quite similar patterns by chromatography used the purification. The diamine oxidase A and B were found to be homogeneous on disc electrophoreses.

3. The enzymatic properties of the diamine oxidase A were the same as it of the diamine oxidase B and belonged to the same kind as the diamine oxidase reported by Hill<sup>4)</sup>, too. The specific activity of the diamine oxidase A was 318 units per mg of protein, and the molecular weight of the enzyme and the subunit were 120,000 and 60,000, respectively. The isoelectric point of the enzyme was pH 6.7.

4. The protein-bound copper, the carbonyl group and the histidine residue of the diamine oxidase A were essential for enzymatic activity. The activity of the enzyme was inhibited by B-Nine, BOH and UDMH, which were the hydrazine compounds, but not inhibited by CCC and BCB, which were the tetraammonium compounds.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.30, 47 ~ 60, 1982)