HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Phycochromoproteidに關する研究：第1報「ウップルイノリ」よりPhycoerythrin, Phycocyanの単離精製及び吸收スペクトル |
| Author(s) | 高木, 光造; TAKAGI, Mitsuzo |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 3(4), 253-258 |
| Issue Date | 1953-03 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/22764 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 3(4)_P253-258.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# Phycochromoproteid に關する研究

## 第1報「ウップルイノリ」より Phycoerythrin, Phycocyan の単離精製及び吸收スペクトル

高　木　光　造　(水產食品化学教室)

## STUDIES ON PHYCOCHROMOPROTEID

## I. PREPARATION AND LIGHT ABSORPTION OF PHYCOERYTHRIN AND PHYCOCYAN FROM *Porphyra pseudolinearis*

Mitsuzo TAKAGI

(Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

1. Phycoerythrin and phycocyan were separated as shown in Fig. 1 from *Porphyra pseudolinearis* by means of fractional precipitation with amonium sulfate and by the difference of solubility in cold water.

2. The light absorption in the visible spectrum of phycoerythrin and phycocyan were measured with the results shown in Tables 2 and 3. The position of light absorption maxima of phycoerythrin was 555, 533 and 495 mμ, and that of phycocyan was 610 and 552 mμ.

### A　緒　　言

紅藻及び藍藻にはChlorophyl及びCarotinoid以外に水溶性色素が多量に存在している。Hadsonはこの水溶性色素を Hydrochrome と称し，Kylin[1] はこれを Phycochromoproteid と総称した。この Phycochromoproteid で従来知られたものは，紅藻における Phycoerythrin と藍藻及び若干の紅藻における Phycocyan の二つであるが，尙下等の絲藻，鞭毛藻，双鞭藻等にもこの色素蛋白に属するものが存在している。この色素の中，赤色のものを Phycoerythrin, 青色のものを Phycocyan と称する。これら両色素はMolisch[2] によつて蛋白に属し，Kylin[1] によつてGlobulineの性質を有することが明白になつた。これらは何れも螢光を有し，特性ある色調を有する。而して Kylin,[1] Svedberg,[3][4] Lemberg,[5] Lewis,[3] 北里,[6] 桂井[4] 等によつて可視部及び紫外部の吸収帶，窒素の分布，色素部分の性質及び分子量等，これら色素蛋白の性質に関して相当綿密に解明されたが，未だ色素部分も Chlorophyl の如くにわからず，蛋白部分の性質及び各々の結合状態も判つていない。特にこれら色素蛋白が果して Chlorophyl の如くに同化作用に関与するのか，またするとせば如何なる機構でするのか未だ多くの疑問を残している。著者はこれら色素蛋白が藻体にとつて如何なる生理的意義を有するかを究明するに先だつて，必要と思われるこれら色素蛋白の物理化学的諸性質について継続的研究を企図した次第である。こゝにえられた成果を報告して参考に供する。

## B 実　　験

### (1) Phycoerythrin 及び Phycocyan の分別調製

実験に用いた試料ウップルイノリ（*Porphyra pseudolinearis*）は函館近郊の沿岸で1月20日採取した極めて新鮮なものである。試料約 4kg を用い，これを水で5回洗い，可及的に塩分その他の夾雑物を除き，試料約 100g につき1L の蒸溜水を加え，室温（15°C）に3日間放置して抽出を容易ならしめた。然るのちトルオールを1%加え，冷暗所（0°C）に時々振盪攪拌しながら抽出を3週間行つた。（これら色素蛋白は日光に曝すと分解を生起するので暗所に保つ必要がある。）然るときは藻体は分解され色素蛋白は充分に抽出された。抽出液を綿布で搾汁し，これを約1cm のパット層で吸引濾過すると透過光線で美麗な牡丹色（rosolanc purple），反射光線で杏色（peach red）を呈する強い螢光ある抽出液 39.4Lをえた。この抽出液のpHは5.4，全窒素は 9.5337g で，試料の全窒素 21.9152g に対し43.50%に相当する。

この抽出液に加える $Am_2SO_4$ の飽和度を知るために 100cc の抽出液をとり，Osborne法[7] に従い固形の$Am_2SO_4$ を加えて飽和度を次第に増加させ，沈澱の色調と生成の程度を検定した。その結果を Table 1 に示した。いうまでもなく塩析に際して使用される飽和度は理論的にも実際的にも嚴密な意味を有しない便宜上の単位であり，従つて計算にあたつて溶液中の蛋白量を無視して行われるが，飽和度をあらわす単位としても蛋白溶液中に含有される飽和塩類溶液の容積と全容積との比であらわす Hofmeister法と一定容積の水に対して含有されている塩類量と飽和溶液のときの塩類量との比で表わす Osborne法とがあり，両者は飽和度の数値の等しいときにも実際の塩類濃度は相異なる。通常前者の方がよく用いられるが，この実験においては前者を用いると容積が非常に多量となり，実験操作に困難をきたすので後者を採用した。また文献を引用するにあたつて後者の方法に換算して記載することゝした。

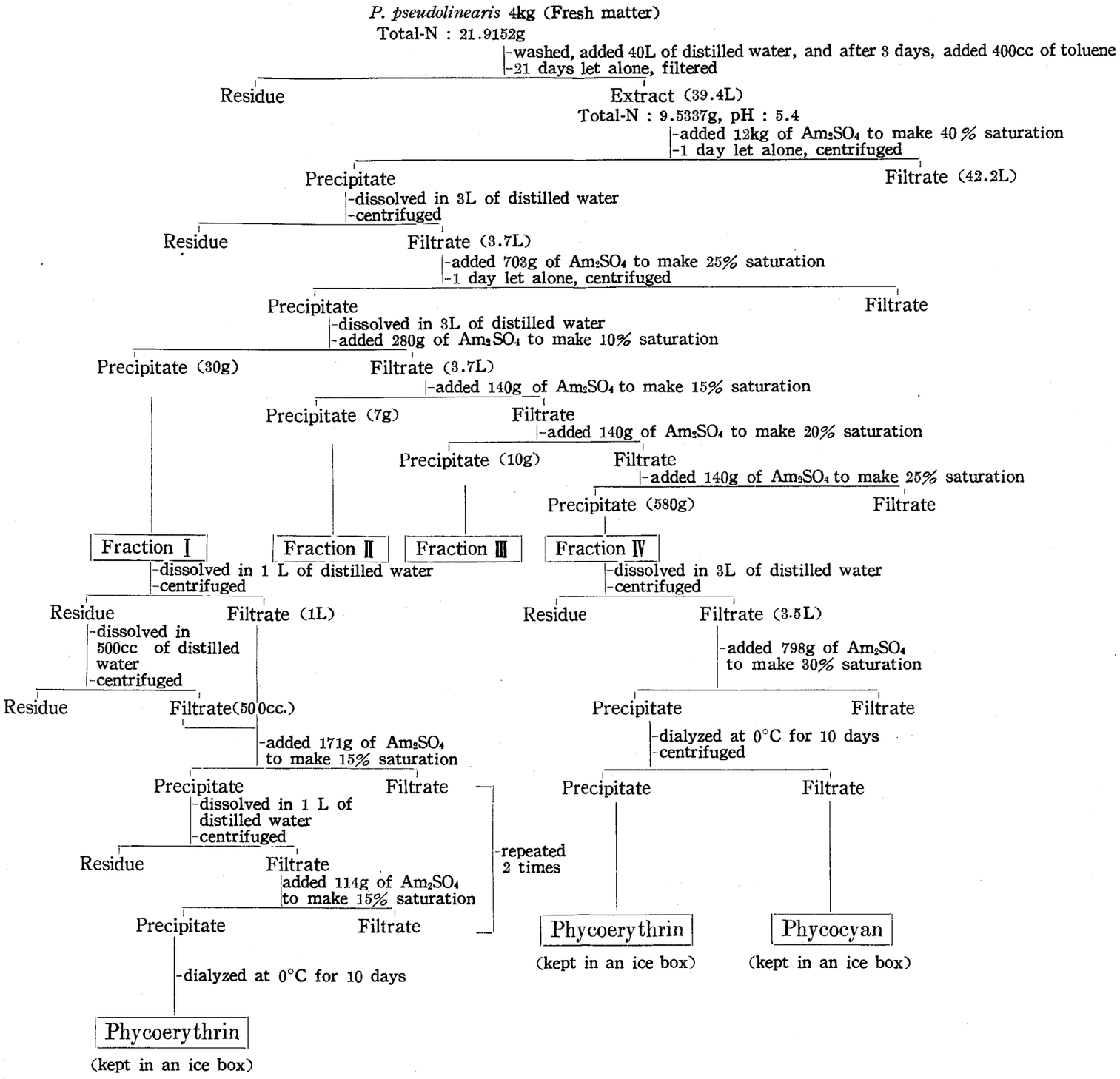
Table 1 The Relation between the Degree of Saturation of $Am_2SO_4$ and the Precipitation of Phycochromoproteid

| Saturation of $Am_2SO_4$ | Amount of $Am_2SO_4$ added in 100cc of the solution of less concentration | Precipitation | Colour of precipitate |
|---|---|---|---|
| % | g | | |
| 10 | 7.60 | + | Rosolanc purple having a tinge of red |
| 20 | 7.35 | + | Rosolanc purple having a tinge of purple |
| 30 | 7.04 | ++ | Same as above |
| 40 | 6.79 | +++ | Same as above |
| 50 | 6.55 | + | Same as above |
| 60 | 6.33 | + | Same as above |
| 70 | 6.13 | ± | Same as above |
| 80 | 5.94 | − | —— |
| 90 | 5.76 | − | —— |
| 100 | 5.59 | − | —— |

Table 1 の結果によると $Am_2SO_4$ 10%飽和のときの沈澱生成は極めて少量で，赤色をおびた牡丹色を呈した。20%飽和のときには10%と同様，極めて少量の沈澱を生じたが，紫色をおびた牡丹色を呈した。更に$Am_2SO_4$ の飽和度を30%にすると，前同様の沈澱をやゝ多量に生ず。更に40%にすると，色素蛋白の沈澱生成は概ね完成された。$Am_2SO_4$ の飽和度を更に增加して50%及び60%にしても極めて少量の沈澱を生じたにすぎず，更に70%とするときには沈澱の生成は殆んど痕跡程度であつて，飽和度をこれ以上に增加しても沈澱の生成は認められなかつた。

以上により，本実験において色素蛋白の沈澱生成のために，抽出液に加えられる$Am_2SO_4$ の飽和度は40%が適当と思われたので，それに従うことにした。即ち39.4L の抽出液に

Fig. 1 Preparation of Phycoerythrin and Phycocyan from *Porphyra pseudolinearis*



固形の $Am_2SO_4$ 12kg を攪拌しながら徐々に加え一日放置した。然るのち上澄液をサイフオンで徐き沈降物を更に遠心分離して上澄液と沈澱物とに分離した。このとき上澄液 42.2L と沈澱物（未乾燥）675g をえた。これは粗製の Phycoerythrin 及び Phycocyan の混合物よりなる。これに3Lの冷水を加え，暫時攪拌して溶解させたのち，遠心分離して沈澱せる夾雑物を除き，上澄液 3.7L をえた。これに $Am_2SO_4$ 703g を攪拌しながら加えて，飽和度を25%とし一日放置した。然るのち遠心分離して上澄液と沈澱物とに分離した。このとき上澄液 3.7L と沈澱物（未乾燥）627g をえた。これに蒸溜水を3L加えて攪拌し，全量を 3.7L とし，$Am_2SO_4$ 280g を攪拌しながら徐々に加えて，飽和度を10%とし一日放置すると，少量の沈澱を生じたので，遠心分離し，沈澱物（未乾燥）30g をえた。これを Fraction 1 とする。牡丹色を呈す。而してこの区分は Phycocyan を含まぬ Phycoerythrin よりなると思われる。Fraction 1 を分離した上澄液 3.7L に更に $Am_2SO_4$ 140g を攪拌しながら徐々に加えて，飽和度を15%とし一日放置したのち遠心分離して沈澱物（未乾燥）7g をえた。これを Fraction II とする。Fraction II を分離した上澄液に，更に $Am_2SO_4$ 140g を攪拌しながら徐々に加えて，飽和度を20%とし一日放置したのち遠心分離したが，沈澱物（未乾燥）10g をえたのみであつた。これを Fraction III とする。Fraction III を分離した上澄液に更に $Am_2SO_4$ を攪拌しながら徐々に加えて，飽和度を25%とし，一日放置すると色素蛋白の大部分は沈降した。これを遠心分離して沈降物（未乾燥）580g をえた。これを Fraction IV とする。而して Fraction II，III，IV は何れも Phycoerythrin 及び Phycocyan の混合物よりなると思われる。Fraction II 及び III は極めて少量のため，そのまゝ放置し，Fraction I 及び IV より夫々純粋に Phycoerythrin 及び Phycocyan をうるために更に次の如く操作した。即ち Fraction I に蒸溜水 1L を加えて一日放置したのち遠心分離して上澄液と沈降物とに分け，沈降物に更に蒸溜水500cc を加えて一日放置したのち遠心分離して上澄液と沈降物とに分離した。沈降物は水に不溶性であつた。而して上澄液を合して 1.5L をえた。このものは透過光線で牡丹色，反射光線で杏色を呈し，強い螢光を有する。これに $Am_2SO_4$ 171g を攪拌しながら徐々に加えて15%飽和とし一日放置したのち遠心分離して，上澄液と沈降物とに分離した。このときえた上澄液は無色であつた。沈降物を更に1L の蒸溜水に溶かし，遠心分離して不溶性の残渣を除き，上澄液に $Am_2SO_4$ 114g を攪拌しながら徐々に加えて，15%飽和とし，一日放置したのち遠心分離して，上澄液と沈降物とに分離する。この操作を更に二回繰返したのち遠心分離して沈降物を集め，コロヂオン膜にて0°C に10日間透析してえた沈降物及び上澄液を，そのまゝ褐色瓶にいれて氷室に保存した。次に Fraction IV に蒸溜水 3L を加えて氷冷しながら攪拌し，不溶性の残渣を遠心分離して除き，えた上澄液 3.5L に $Am_2SO_4$ 798g を氷冷攪拌しながら徐々に加えて30%飽和とし，一日放置したのち遠心分離して上澄液と沈降物とに分離した。沈降物を集めコロヂオン膜にて 0°C に 10日間透析したのち遠心分離してえた沈降物と上澄液をそのまゝ褐色瓶にいれて氷室に保存した。かくしてえた沈降物は Phycocyan を含まぬ Phycoerythrin，上澄液は Phycoerythrin を含まぬ Phycocyan の如く思われる。Fig. 1 は以上の分別調製法の大要を図示したものである。

(2) Phycoerythrin と Phycocyan の吸収スペクトル

可視部における吸収スペクトルは島津製 GW—30型波長分光計を用いて行つた。pH は6.8，Phycoerythrin 及び Phycocyan の濃度は夫々0.0220%，0.0342% で液層は 1 cm を用いた。Table 2 及び 3 はその実験結果を示したもので，それを図示すると Fig. 2 及び 3 の如くなる。これより比吸光係数 $\varepsilon/_c = {}^1/_{cd} \log ({}^{I_0}/_I)$ を波長に対して plot すると Fig. 4 及び 5 となる。但しC…濃度%，d…液層の厚さ cm，$I_0$… 溶媒を通過したのちの光の強さ，I… 溶液の同じ液層を通過したのちの光の強さである。而してこの結果を Tiselius，桂井，北里等の結果と比較すると Table 4 及び 5 の如くである。

Table 2 Extinction Coefficients ($\varepsilon = {}^{1}/_{d}\log {}^{I_0}/_{I}$) for Phycoerythrin (0.0220% Solution)

| Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε | Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε | Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε |
|---|---|---|---|---|---|
| 610 | 0.60 | 522 | 1.15 | 448 | 0.65 |
| 587 | 0.80 | 513 | 1.06 | 442 | 0.64 |
| 565 | 1.22 | 507 | 1.00 | 430 | 0.69 |
| 555 | 1.30 | 495 | 1.11 | 410 | 0.78 |
| 540 | 1.20 | 486 | 1.01 | 405 | 0.81 |
| 536 | 1.12 | 477 | 0.85 | 398 | 0.85 |
| 533 | 1.17 | 465 | 0.70 | | |

Table 3 Extinction Coefficients for Phycocyan (0.0342% Solution)

| Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε | Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε | Wave length λ ($m\mu$) | Extinction coefficients ε |
|---|---|---|---|---|---|
| 648 | 0.40 | 522 | 1.00 | 450 | 0.50 |
| 610 | 1.10 | 507 | 0.85 | 430 | 0.56 |
| 587 | 0.85 | 497 | 0.80 | 410 | 0.66 |
| 565 | 1.12 | 486 | 0.72 | 405 | 0.70 |
| 552 | 1.30 | 477 | 0.60 | 398 | 0.80 |
| 540 | 1.20 | 460 | 0.53 | | |

Table 4 Position of Light Absorption Maxima ($m\mu$)

| | Phycoerythrin from *Porphyra tenera* | | | Phycoerythrin from *Porphyra pseudolinearis* |
|---|---|---|---|---|
| prepared by | Tiselius | Kitazato | Katsurai | Takagi |
| observed by | Katsurai | Kitazato | Katsurai | Takagi |
| yellow band | 560 | 562 | 555 | 555 |
| green band | 533 | 526 | 534 | 533 |
| blue-green band | 496 | 495 | 496 | 495 |

Table 5 Position of Light Absorption Maxima ($m\mu$)

| | Phycocyan from *Porphyra tenera* | | Phycocyan from *Porphyra pseudolinearis* |
|---|---|---|---|
| prepared by | Kitazato | Katsurai | Takagi |
| observed by | Kitazato | Katsurai | Takagi |
| yellow band | 614 | 610 | 610 |
| green band | 546 | 552 | 552 |

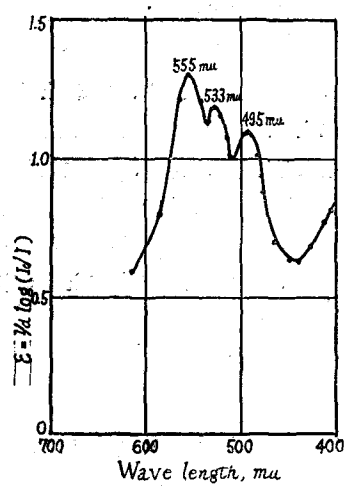



Fig. 2

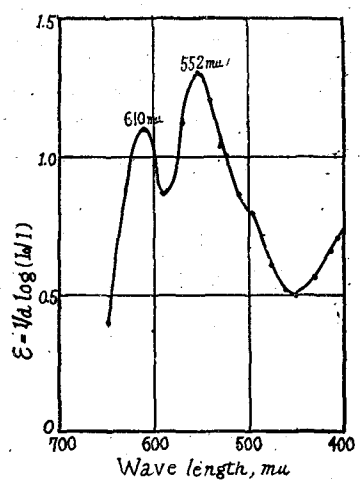



Fig. 3

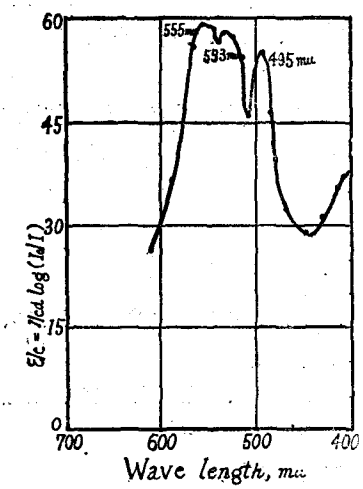



Fig. 4

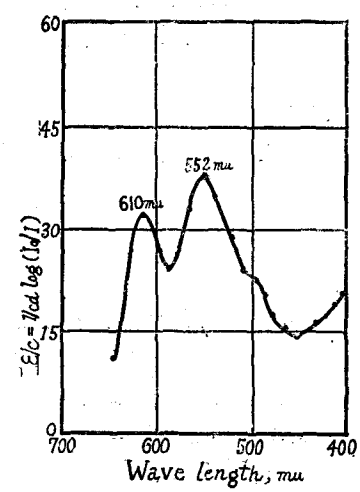



Fig. 5

以上によりウップルイノリよりえたPhycoerythrinの最大吸収点の波長は555，533及び495mμ，phycocyanの最大吸収点の波長は610及び552mμでTiselius,桂井，北里等の実験結果と概ね一致した。

## C 考　察

海藻より色素蛋白調製にあたり抽出液に加えられる$Am_2SO_4$の飽和度は，研究者によつて異り，Svedbergは*Ceramium rubrum*を試料としたときは20%を採用し，*Porphyra tenera*を試料としたときははじめ20%で沈澱する色素蛋白を溶解して再沈澱させるときの飽和度をさらに5%増加して25%としている。而して*Aphanizomenon flosaquae*からPhycocyanを分離するときには飽和度を33%として色素蛋白を沈降させ，再沈澱を繰返すときは飽和度を減少して12%としている。Kylinは同じく*Ceramium*を用いてえた抽出液に$Am_2SO_4$を40%となるよう加えて色素蛋白を沈降させ，再沈澱を繰返すときには飽和度を15%としている。またLembergは同じく*Ceramium*を用いているが，Kylinと同様最初えた抽出液に$Am_2SO_4$を40%に加え，粗製の色素蛋白をえ，これを再び水に溶かして再沈澱させるときの飽和度を20%とし，遠心分離してえた沈澱物より冷水に対する溶解度の差異を利用して，赤色液と青色液とに分離した。これより$Am_2SO_4$による分別沈澱並びに再沈澱を繰返してPhycoerythrin及びPhycocyanを純粋に分離した。かくの如く研究者により飽和度が異るのは色素蛋白の抽出条件，即ち濃度並びに抽出日数の異なるために生起した分子の大いさの差異に起因するものと思われる。その後に至りTiselius[8]は$Am_2SO_4$による分別沈澱によつては，両色素蛋白を完全に分離しえないことを認め，電気泳動装置によつて完全に分離した。本研究においても同様に$Am_2SO_4$による分別沈澱によつては両色素蛋白の分離は極めて困難であつたので，$Am_2SO_4$30%によつてえた沈降物を透析して$Am_2SO_4$を除去したのち，Lembergの如く冷水に対する溶解度の差異を利用してPhycoerythrin及びPhycocyanを分離した。

また，Phycoerythrinの溶解度について，Kylin は*Ceramium rubrum* よりえた Phycoerythrin は Phycocyan よりも水に溶け易いとし，一方 Lemberg は *Porphyra tenera* よりえた Phycoerythrin は Phycocyan より水に溶け難い事実を指摘しており，一般に Phycoerythrin は水に難溶性とされている。著者は本研究において $Am_2SO_4$ による分別沈澱を反復することにより Phycoerythrin が漸次不溶性となることを認めた。もとより Globulin の性質を有する蛋白はとくに塩類に対して鋭敏に作用し，塩類濃度のわづかの相違によつて溶解度を急激に変化せしめるものであるから，かゝる溶解度の減少は$Am_2SO_4$によつて phycoerythrin が変性された結果であり，これら色素蛋白が生体内にあるときは極めて稀薄な塩類溶液に可溶性であつて，体内の諸反応を円滑に遂行しているものと思われる。

## D 要　　約

1．ウップルイノリを用い $Am_2SO_4$ による分別沈澱及び冷水に対する溶解度の差異を利用して，Phycoerythrin 及び Phycocyan を単離精製した。

2．かくしてえたPhycoerythrin及びPhycocyanについて吸収スペクトルを撮影し，Phycoerythrinの最大吸収点の波長は555，533及び495m$\mu$，Phycocyan は610及び552m$\mu$にあることを認めた。

本研究は文部省科学研究助成費により遂行した。記して文部省に対して謝意を表する。また本研究を遂行するにあたり終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた本学部教授農学博士，医学博士村田喜一先生に深甚なる謝意を表する。

## E 文　　献

(1) H. Kylin : Zeitschr. Physiol. Chem., 69, 169 (1910); ibid 76, 396 (1912); ibid 163, 229 (1927); ibid 166, 39 (1927); ibid 197, 1 (1931)

(2) H. Molish : Bot. Zeit., 63, 131 (1905); Sitzungs-Ber. Kaiserl. Akad. Wis. Mathem. Naturw. Kl. 115,795 (1906)

(3) T. Svedberg & N. Lewis : J. Amer. Chem. Soc., 50 525 (1928)

(4) T. Svedberg & T. Katsurai : J. Amer. Chem. Soc., 51, 3573 (1929)

(5) R. Lemberg : Liebigs Ann. Chem. 461, 46 (1928)

(6) Z. Kitazato : Acta Phytochim., 2, 75 (1925)

(7) T. B. Osborne & E. Strauss : Abderhalden, Biol. Arbeitsmethoden, Abt. 1, Teil.8, 392

(8) A. Tiselius : Trans. Faraday Soc., 33, 524 (1937)

（水産科学研究所業績　第136号）