

スキムミルクなどを助剤とする植物体からの酵素タンパク質の抽出法の開発 — *Eleocharis vivipara* の PEPC の抽出を例として —

永松 裕章¹, 阪上 綾¹, 山崎 恭央¹, 吉村 一恵¹, 関井 愛¹, 秋田 求^{1,2}, 泉井 桂^{1,2}

要旨

われわれは陸生型 *Eleocharis vivipara* の C_4 光合成型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の環境応答や酵素の活性調節などの研究の過程で、この PEPC が従来から広く植物材料に対して用いられてきた、不溶性のポリビニルピロリドン (PVPP) を助剤とする抽出法ではほとんど抽出されないという困難に遭遇した。本研究ではこの問題を解決するため、抽出方法の検討を行った。その結果、スキムミルク (Skim milk) が助剤として非常に有効であることを見出し、PEPC の抽出効率を飛躍的に高めることに成功した。詳細な解析の結果、Skim milk の主成分であるカゼイン (Casein) が PEPC 抽出に有効であることを示し、さらに Casein よりも溶解性の高い Casein のナトリウム塩 (Casein sodium salt) の方が高い効果を示すことを見出した。Casein の主要構成成分である α -、 β -、及び κ -casein はいずれも同程度に有効であった。通常は、PVPP を助剤として用いる場合には可溶性のポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) をさらに加えることはないが、われわれは偶然、PVP を PVPP と併せて用いてみたところ、抽出率が非常に良くなることを観察し、PVP には PVPP にはない抽出能力があることを見出した。平均分子量を異にする PVP について検討した結果、平均分子量が約 10,000 と小さいものが最も有効であった。さらに、本抽出法の応用性及び新たな可能性について論じた。

1. 結論

Eleocharis vivipara (図 1) は北米南東部に自生するカヤツリグサ科ハリイ属の水陸両生の植物で、雨期と乾期で光合成の様式を変化させる。乾期には陸生し C_4 光合成 (NAD-リンゴ酸酵素型) を行い、形態的にもいわゆるクランツ構造をとる。雨期には沈水して C_3 光合成を行い、クランツ構造をとらない。同一種内で C_3 光合成と C_4 光合成の可逆的転換を行うことから、 C_4 光合成の成立に必要な遺伝子やタンパク質の探索を行うのに格好の材料であると考えられる⁽¹⁾。われわれは、 C_4 光合成の初期炭酸固定酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) (EC4.1.1.31) が、本植物においてどのような環境応答や活性制御を示すかを明らかにすることを旨として研究を行ってきたが、研究の初期段階で本植物の C_4 型 PEPC の抽出率が、トウモロコシなどに有効な従来法では著しく低いことが明らかになった。水生型の柔らかい葉の状態では PEPC は従来法で抽出できたことから、陸生型 *E. vivipara* の葉が堅く繊維質に富む構造特性を持っていることが酵素抽出の妨げになっていると考えられた。つまり、維管束のリグニンやタンニンその他のポリフェノール類を含む繊維質が疎水的な力や強力な水素結合を介して PEPC を吸着するためではないかと考えた。本研究では、このような吸着を妨げることで、PEPC 抽出が効果的に行われることを期待し、スキムミルク (脱脂乳、Skim milk、Non fat dry milk) をトウモロコシ用の酵素抽出液に添加することにより、PEPC の抽出率が約 60-100 倍と飛躍的に改善されることを見出したので報告する。Skim milk はイムブロッティングの際のメンブレンのブロッキング剤に用いられ、タンパク質のメンブレンへの吸着を防ぐ効果があるとされており⁽²⁾、この性質により抽出率が向上したと思

原稿受付 2009年11月30日

1. 近畿大学生物理工学部生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1



図1 *Eleocharis vivipara*

われる。われわれは、さらに、Skim milk 中の有効成分について詳細に検討し、酵素抽出液の最適組成の検討を行った。他方、可溶性のポリビニルピロリドン(Polyvinylpyrrolidone, PVP) にも Skim milk と同様に酵素の抽出能力があることを見出し、これは不溶性のポリビニルポリピロリドン(Polyvinylpolypyrrolidone, PVPP) には見られない性質であることがわかったのでこれについても報告する。Skim milk 添加法は、他の植物で酵素抽出が難しいとされるものについても有効であり、本手法の一般的な有用性が示唆された。

2. 材料と方法

2. 1 試薬類

特に断りがない場合は、Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Sigma (Saint Louis, USA) 及び Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) の試薬を使用した。その他の特殊試薬、機材に関してはその都度述べる。

2. 2 *Eleocharis vivipara* の栽培

Eleocharis vivipara は、九州大学大学院農学研究科の上野修教授より供与していただいた。陸生型のもは通常のガラス温室 (冬期は 16°C) で、自動散水器で毎日 1 回 1 分間散水し、自然光下で栽培した。

2. 3 *E. vivipara* からの PEPC の抽出

葉の部分をはさみで切り取り、冷水にひたして軽く洗った。水をきっておよそ 0.2 g を量とり、液体窒素で凍結後、ミキサーミル MM301 (Retsch, Haan, Germany) により凍結破碎した (振盪速度 30 往復/分、振盪時間 1 分、30 秒ごとに液体窒素で冷却)。粉末状になった *E. vivipara* の入った 2 ml チューブの中に、葉の重さの 5 倍量の氷冷した酵素抽出用緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 14 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM MgCl₂, 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5% (v/v) Glycerol, 1 錠/50 ml Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche, Basel, Swiss), 添加物) を加えて懸濁し、PVPP を葉の重さの 1/10 量加えて抽出を行った。得られた破碎液中の未破碎組織断片などをミラクロスで除去し、20,000×g、4°C で 30 分間、遠心分離を行った。上清を注意深くとり、これを酵素抽出液とした。添加物には、Skim milk (Difco, Ref. No. 232100)、Casein (Sigma, Product No. C7078)、Casein sodium salt (Sigma, Product No. C8654)、α-casein (Sigma, Product No. C6780)、β-casein (Sigma, Product No. C6905)、κ-casein (Sigma, Product No. C0406)、Lactalbumin (MP Biomedicals, Fr., Cat No. 102128)、PVP (MW:10,000、24,500、40,000)、を用いた。

2. 4 *E. vivipara* のクロロフィル含量の測定

液体窒素で凍らせた *E. vivipara* の葉 0.2 g をミキサーミルで破碎した後、水 (MiliQ (Milipore, Billerica, USA)) 400 μl、Acetone 1600 μl を添加しボルテックスミキサーで攪拌後、1,500×g、室温で 15 分間遠心分離を行った。上清を注意深くとり、それらの 663.6 nm、646.6 nm の吸光度を UV-2500PC (SHIMADZU, Kyoto, Japan) で測定した。クロロフィル含量は Porra の式 (Porra ら⁽³⁾, 1989) を用いて算出した。

Chl *a* = 12.25 × A_{663.6} - 2.55 × A_{646.6}, Chl *b* = 20.31 × A_{646.6} - 4.91 × A_{663.6}, Chl *a*+*b* = 17.76 × A_{646.6} + 7.34 × A_{663.6}

2. 5 PEPCの活性測定

PEPCの活性測定は、0.1 mM NADH (Roche, Basel, Swiss) および 1.5 IU Malate dehydrogenase (MDH) (Roche, Basel, Swiss) を含む反応混液 (100 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 10 mM KHCO₃, 10 mM MgSO₄) に、酵素抽出液 20 μ l と終濃度 2 mM になるように PEP tricyclohexylammonium salt を添加することで反応を開始し、340 nm の吸光度の減少を追跡することで測定した (Terada ら⁽⁴⁾, 1991)。

活性測定は、光路長 10 mm, 光路幅 5 mm の吸光度測定用セルを用いて行い、反応混液の量は 1.0 ml とした。活性測定は全て 30°C にて行い、分光光度計は UV-2500PC を使用して、UVPC 用カイネティックソフトウェアで反応を追跡し、活性値や半飽和基質濃度などのデータ処理を行った。この時の活性は、NADH の 340 nm での吸光係数を $\epsilon_{340} = 6,220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 、1 分間に 1 μ mol の NADH を酸化する活性を 1 単位 (unit) として算出した。本研究では、クロロフィル量あたりと酵素液量あたりの 2 種類の単位で比活性を算出している。単位換算は、 $1 \times 10^{-1} (\text{Units}/\mu\text{g Chl}) = 1.27 (\text{Units}/\text{ml})$ となる。本報で示したデータは多くのデータの中の代表的なものを示した。

3. 結果

3. 1 助剤の検討

トウモロコシなどについて用いられる従来の酵素抽出法では、陸生型 *E. vivipara* の PEPC の抽出率が著しく低い (トウモロコシの 1/60 程度) ことが明らかになった。抽出効率を改善するため、従来報告されている方法も含めて種々の助剤の検討を行うことにした。本研究では、牛血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA)、エチレングリコール (Ethylene glycol)、Blocking Agent (GE Healthcare, Little Chalfont, England)、Skim milk などの物質について検討した。PEPC と陸生型 *E. vivipara* の発達した維管束系の物質との相互作用を弱めることを企図して、BSA を用いる方法は上野ら⁽⁵⁾によって報告されたものである。Blocking Agent とはイムノプロットングの際に用いるブロッキング剤の一種であり、その組成は公表されていない。

これらを用いて酵素抽出を行い PEPC の酵素活性値の比較を行った結果、Skim milk や Blocking Agent の添加は劇的に酵素抽出率を改善することが見出された (図 2 A)。

Skim milk に関しては最適濃度を検討し、5 % (w/v) 以上の濃度で最大の抽出率を与え、それ以上の濃度では抽出率は飽和する傾向が示された (図 2 B)。

3. 2 Skim milk 中の有効成分の探索

Skim milk を助剤として用いることで陸生型 *E. vivipara* からの PEPC の抽出率が大幅に増加することを見出したので、Skim milk 中の有効成分について検討した。Skim

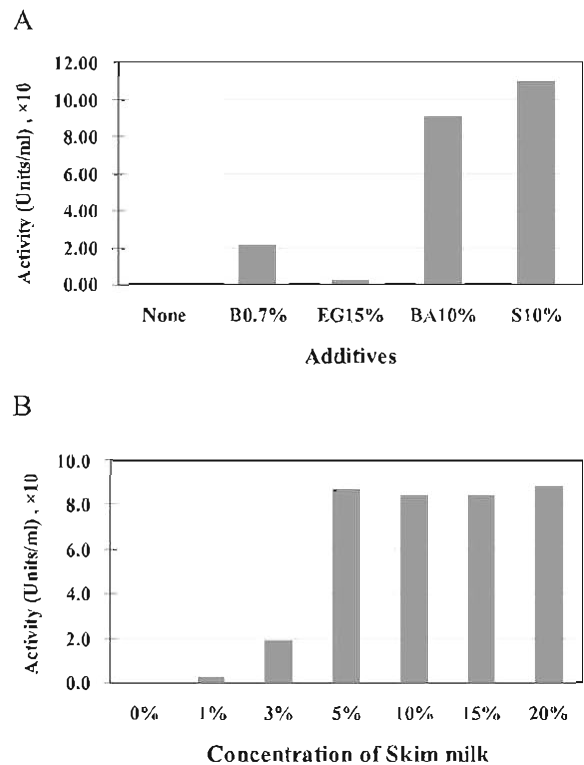


図 2 酵素抽出に用いる助剤の検討

A : 助剤の酵素抽出率の比較、B : Skim milk の最適添加濃度の検討

(A) None : 助剤なし、B0.7% : 0.7% (w/v) BSA、EG15% : 15% (w/v) Ethylene glycol、BA10% : 10% (w/v) Blocking agent、S10% : 10% (w/v) Skim milk (B) 20% (w/v) までの添加濃度の検討を行った。

Skim milk は可溶性画分と不溶性画分から成ることから、まず各画分の抽出率の違いを検討した。酵素抽出用緩衝液に、5% (w/v) になるように Skim milk を添加したのち懸濁し、20,000×g、4℃にて 15 分間遠心分離し、更に中間層を 20,000×g、4℃にて 15 分間遠心分離し、可溶性画分、不溶性画分、コロイド性の中間層に分離した。それぞれの画分を元の体積に戻し、抽出率の比較を行った。その結果、中間層の抽出率が高く、次いで不溶性画分の抽出率が高いことが明らかになった。可溶性画分に関してはあまり抽出効果のないことが確認された (図 3)。中間層と不溶性画分について酵素抽出に対する有効性が認められたことから、カゼイン(Casein)の存在が考えられた。Casein は乳固形分の一で Skim milk の主要成分である。Brunner⁽⁶⁾により、Casein は Skim milk 内に約 80-95%含まれ、Casein micelle という微粒子の状態で存在していると報告されている。これらのことから、遠心分離により得られた不溶性画分もミセルとして十分分散されなかった Casein であろうと推測された。実際、Skim milk の 10% 懸濁液を EGTA の存在下、pH4.5 に調整して Casein を沈殿させ、沈殿物と上清をもとの pH に NaOH によって戻し、5%の濃度に再調整したのについて、それらの抽出効果を調べたところ、抽出効果は Casein の画分にみとめられ、ラクトアルブミン(Lactalbumin)および乳糖などの低分子化合物を含む可溶性画分にはみとめられなかった (データ表記略)。

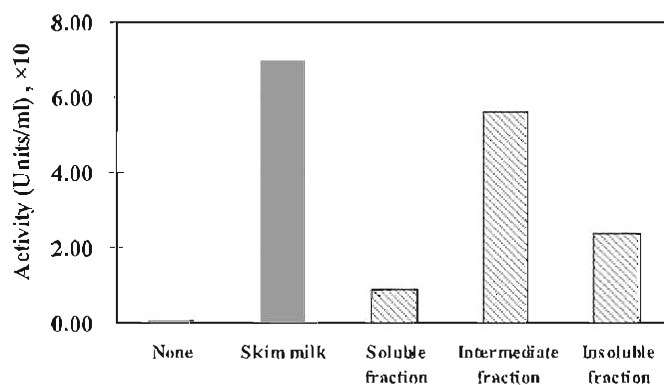


図 3 Skim milk の可溶性、不溶性、中間層画分の酵素抽出率の比較

Casein は水に対して比較的難溶であるが、Casein のナトリウム塩(sodium salt)は水溶性が高く取り扱いが簡単である。これは Skim milk から Casein を酸性条件下で沈殿させて、 Ca^{2+} やリン酸カルシウムを除去したのち、NaOH で中和して調製したものである。これらの助剤について酵素抽出率の添加濃度依存性を調べた結果、共に Skim milk (5%) を添加した時よりも酵素抽出率が高く、Casein sodium salt に関しては最大 3 倍程度抽出率が上昇することが明らかになった。そして、Casein では 3% (w/v)、Casein sodium salt では 5% (w/v) が最適添加濃度であることが確認された (表 1)。10% Casein の添加では抽出率の低下する傾向がみられた。これらのことから Skim milk 中の主として Casein が酵素抽出に関わっていることが示唆された。なお、Lactalbumin 自身には抽出効果はなかった (データ表記略)。

表 1 Casein、Casein sodium salt の添加濃度別の PEPC の酵素活性
5% (w/v) Skim milk 添加した時の比活性は 3.62×10^{-2} (Units/ μg Chl) であった。

Concentration	Activity (Units/ μg Chl), ×100				
	0%	1%	3%	5%	10%
Casein	0.03	5.33	8.36	6.33	3.97
Casein sodium salt	0.03	8.55	8.04	11.30	10.10

3. 3 α -、 β -、 κ -casein の酵素抽出率の比較

先にも述べたように、Casein は Skim milk 中でミセルとして存在している。粉末状の Casein を抽出用水溶液に完全に分散させることはなかなか困難であり、極く一部が十分分散されるにすぎない。しかし、この部分（図3の Intermediate fraction）に強い抽出効果がみられたことは、ミセルの有効性を示唆するものであった。Casein ミセルは主に α -、 β -、 κ -casein で構成されている⁽⁷⁾。 α -、 β -casein は疎水的な性質を持ち単独では溶解性が低い、親水的及び疎水的なドメインを両方持つ κ -casein とそれぞれ複合体を形成し、安定したサブミセル (sub-micelle) を形成する⁽⁸⁾。それらが集合体を作り、Casein ミセルを形成するとされている。われわれは、このミセル中のどの成分が抽出効率の増大に寄与しているのかを明らかにするために、 α -、 β -、 κ -casein それぞれについて添加濃度を変えながら抽出効率を検討した。その結果、1% (w/v) 添加以上ではそれぞれ Skim milk と同等もしくはそれ以上の酵素抽出能力を示したものの、各分子種間では抽出率に大きな差はないことが示された (表2)。しかし、それぞれの酵素抽出後の溶液の色には明らかな差が見られたことから (データ省略)、色素や微量成分など酵素以外の物質に関しては抽出される成分に違いがあることが示唆された。われわれは Casein ミセルの形成に重要な役割を果たす κ -casein が抽出率の向上に最も大きく寄与するのではないかと予想したが、そうではなかった。表1の Casein sodium salt では1%でも大きな抽出効果を示したことから、これらの分子種がより有効なミセルを形成して相乗的に作用している可能性も考えられた。

表2 α -、 β -、 κ -casein の酵素抽出能の比較

Skim milk、Casein、Casein sodium salt 添加時の比活性はそれぞれ、5% (w/v) Skim milk = 3.62×10^{-2} (Units/ μ g Chl)、3% (w/v) Casein = 8.36×10^{-2} (Units/ μ g Chl)、5% (w/v) Casein sodium salt = 11.3×10^{-2} (Units/ μ g Chl)であった。

concentration	Activity (Units/ μ g Chl), $\times 100$				
	0%	0.5%	1%	2%	3%
α -casein	0.03	0.170	6.28	8.23	6.14
β -casein	0.03	1.45	4.24	5.50	7.16
κ -casein	0.03	1.26	3.74	5.29	6.59

3. 4 PVP の酵素抽出に与える影響

PVPP は PVP を架橋することによって調製される。PVP は水溶性であるのでこれを不溶性にしたものが PVPP である。PVPP は不溶性で容易に回収が可能であるため、植物由来のポリフェノール類を吸着除去するために広く工業的に利用されている。植物材料から酵素タンパク質を抽出する場合にも、PVPP を助剤として使用することはいまや常識的に行われている⁽⁹⁾。これに対して、PVP は PVPP と同様の化学的性質をもちながら水溶性であるため、PVPP ほどにはよく使用されていない。われわれも常に PVPP を抽出液の基本助剤として加えていたので、改めて同じ化学的性質の PVP を助剤として用いるこ

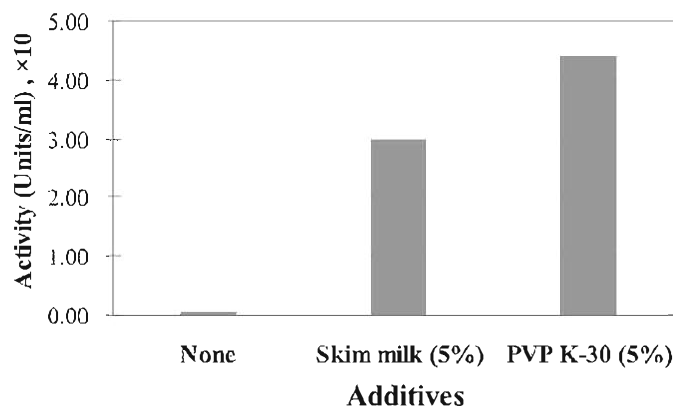


図4 PVP K-30 と Skim milk の酵素抽出率の比較
PVP K-30 は分子量 40,000 の PVP である。

とは考えていなかった。しかし、ある偶然から、PVP を PVPP と併用することとなり、PVP には著しく抽出効率を高める働きのあることを見出した。その効果は Skim milk 以上に強かった(図4)。PVP は Skim milk や BSA と同様にイムノブロッティングのブロッキング剤として用いられている化合物であり、工業的にも溶解補助剤やフィルムやコート紙のコーティング剤として一般的に用いられているものであり、Skim milk と同じような効果を抽出にもたらしたと考えられる。

タンパク質由来以外の物質で効率的に酵素抽出を行うことができたことから、さらに PVP について検討した。PVP は平均分子量の違うものがいくつか製品化されているので、分子量 10,000 の PVP 10、分子量 24,500 の PVP 25、分子量 30,000 の PVP K-30 を用いてそれぞれの酵素抽出率を比較した。その結果、PVP 10 の酵素抽出率が一番高いことが明らかになり、分子量が小さいほど酵素抽出率が高くなることが観察された(表3 A)。PVP 10 の酵素抽出率が高いことから、この物質の最適添加濃度についても調べたところ、5% (w/v) 添加が最適であった(表3 B)。

これまでの結果を含め総合的に考察すると、PVP も非常に有効な助剤で、Casein sodium salt と同等程度の効果があることが明らかになった(図5 A)。図5 B は各抽出液についてイムノブロッティング解析をした結果を示し、全ての助剤で PEPC の抽出が確認された。

表3 種々の PVP の酵素抽出効率の比較
A: 分子量の違う PVP 間での酵素抽出率の違い、B: PVP 10 の最適添加濃度の検討

A	
	Activity (Units/ml), ×10
None	0.3
PVP 10 (5%)	6.8
PVP 25 (5%)	5.0
PVP K-30 (5%)	4.0

B	
Conc.	Activity (Units/ml), ×10
0%	0.06
1%	5.3
3%	9.3
5%	10.5
10%	9.1
15%	8.7

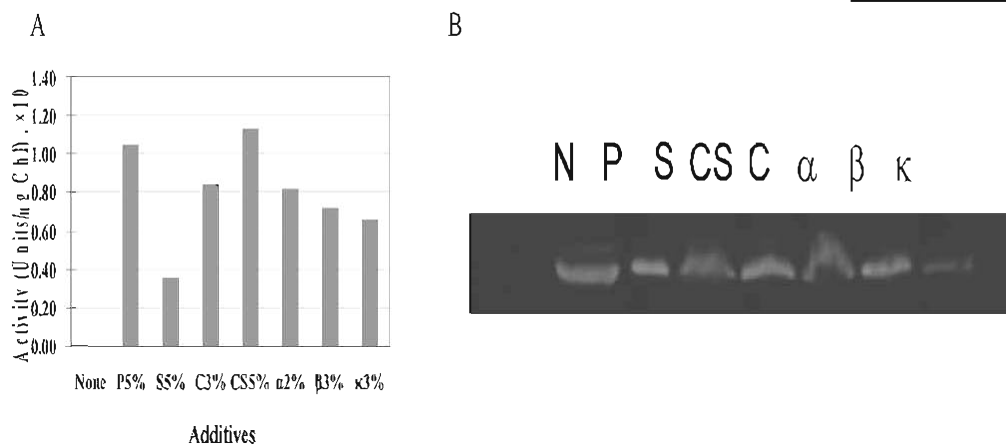


図5 それぞれの助剤の最適濃度での酵素抽出率の比較 (A) とイムノブロッティング解析 (B)

それぞれの助剤で一番酵素抽出率の高かった添加濃度での酵素活性値を比較し、それらについてトウモロコシ PEPC に対するウサギ抗体⁽¹⁰⁾を用いてイムノブロッティングを行った。None: 助剤なし、P5%: 5% (w/v) PVP 10、S5%: 5% (w/v) Skim milk、C3%: 3% (w/v) Casein、CS5%: 5% (w/v) Casein sodium salt、α2%: 2% (w/v) α-casein、β3%: 3% (w/v) β-casein、κ3%: 3% (w/v) κ-casein。

4. 考察

本研究では、陸生型 *E. vivipara* からの PEPC 抽出効率を高めることを目的として実験を行った。その結果、Ueno ら⁽⁵⁾の BSA を助剤とする方法では、499 μmol/mg Chl/hr、すなわちわれわれの用いた単位に換算

して 0.0083 Unit/ μ g Chl、であったのに対して Skim milk を用いる方法ではこれより 9 倍ほど高い比活性が得られた (表 2 のレジェンド参照)。本研究によって、水生型から陸生型への移行過程における PEPC の発現の時間経過など環境応答の生理学的研究に役立つ抽出法が確立できた。Skim milk 中の有効成分について、さらに詳細な解析を行い、Skim milk 中の Casein 及び Casein ミセルを構成する α -、 β -、 κ -casein それぞれは同程度の抽出効率をもつことを示した。今回これらの助剤の抽出メカニズムについては明らかにするには到っていないが、有効成分を明らかにしたことは意義深いものと思われる。Skim milk のような多くの不特定多数のタンパク質を含む物質を抽出液に加えるのは、酵素タンパク質を精製する場合には却って純度を下げることになるので、比較的純度が高く経済的な Casein sodium salt や不純物の混入を厳密に避けるには Casein 分子種の精製標品を用いることが有効であろう。

すでに PVPP を含む酵素抽出液に、PVP をさらに加えることで抽出効率が飛躍的に増大したことは予想外のことであり、PVP には PVPP にはない抽出能力のあることが示された。このことについて過去の論文を検索したところ、われわれと同様に、ヨーロッパアカマツから Monoterpene cyclase を抽出する場合には、PVPP は無効であるが、PVP は有効であることが報告されていた⁽¹¹⁾。また、PVPP と PVP を同時に助剤として加えている報告もあった⁽¹²⁾。両者の効率の違いの作用機作は現在も不明である。

Skim milk や PVP についてはイムノブロッティングのブロッキング剤のように作用したと考えられる。すなわち、酵素抽出時には陸生型 *E. vivipara* の発達した維管束を持つ堅い桿状の葉を粉砕することで維管束の断片がたくさん生じ、それらが抽出液に懸濁された際に疎水的な作用または強い水素結合を介して PEPC を吸着すると考えられ、助剤が維管束の表面を覆うことで、PEPC が吸着されずに酵素抽出液に溶解してくると考えられる (図 6)。

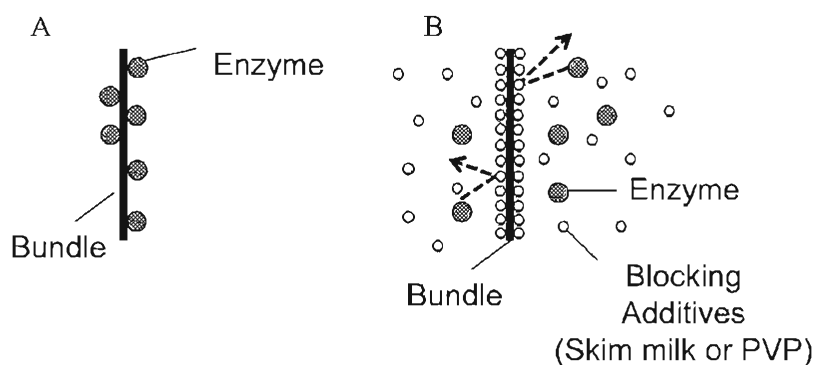


図 6 助剤が酵素抽出に与える効果のメカニズムモデル

(A) 助剤なし、(B) 助剤あり

維管束を助剤がコートすることにより酵素の吸着が抑えられていると考えている。

酵素抽出は酵素研究において最初の重要な過程であり、本手法によりこれまで酵素抽出が困難とされてきたものに関して応用することで、研究の範囲が広がることを期待できる。他の植物への応用に関しては本報で詳しく論じていないが、植物片や細胞片などの不溶物質への吸着が見られる場合であれば適用できると考えている。われわれもクロマツ (*Pinus thunbergii*) に関して本酵素抽出法を実験的に応用してみたところ、Casein sodium salt を助剤として用いることで、既報の抽出法⁽¹³⁾よりも 3 倍程度 PEPC の抽出率が向上することが確認された (データ省略)。マツも陸生型 *E. vivipara* と同様に破碎時に維管束系の植物片が生じるが、その他にも油やヤニのような物質も多く葉に含まれており、それらが複合的に酵素抽出を妨げ

ているのではないかと考えている。詳しいメカニズムについては明らかではないが、本方法は他の植物にも十分適応できることを示した。PEPC は酵素分子の表面に比較的広い疎水領域をもっており、大腸菌の PEPC の場合には長鎖脂肪酸やその CoA 誘導体、および Dioxane などの有機溶媒によって活性化され⁽¹⁴⁾、シロイヌナズナの PEPC の場合には酸性脂質と結合しやすいこと⁽¹⁵⁾などが知られている。筆者らが以前報告したプラスチック容器からの微量の溶出物による大腸菌 PEPC の活性化もこのような性質に起因するものと考えられる⁽¹⁶⁾。

本研究では植物からのタンパク質の抽出における助剤として Skim milk が有効であることを明らかにしたが、最後にその応用について述べる。Skim milk は食品由来である事から食品への適用が非常に有効であると思われる。本手法を用いることにより、今まで抽出のできなかつた新規のタンパク質や物質を抽出することが可能になることが期待される。医療においては、植物を宿主とする組換え体ワクチン（経口ワクチン）の効率のよい抽出法として役立つかもしれない⁽¹⁷⁾。α-, β-, κ-casein を助剤として用いるとそれぞれ抽出液の色が大きく異なることから、抽出できる物質がそれぞれ違うことが示唆される。種子などの堅い殻を持つ材料や維管束の多い植物など、物質の抽出が難しい材料においては非常に有効な方法であると期待される。他にも緑茶や紅茶などの茶類の抽出に適応することで、水抽出では得られない新規の有効成分探索にも利用しようと考えている。抹茶ミルク、インドのミルクで煮出す紅茶（チャイ）、ミルクを加えて調理する種々の料理や松葉ジュースなど、ミルクを用いることによってどのような有用な物質が抽出されてくるか検討することも意味があるのではないと思われる。湯で淹れた紅茶の生理作用に及ぼすミルク添加の影響を調べた研究⁽¹⁸⁾や、ポリフェノールと Casein との反応を調べた研究⁽¹⁹⁾なども最近行われているようであり興味深い。

5. 謝辞

吉川正明教授（京都大学大学院農学研究科）には Skim milk に関する基礎的研究法について多くの有益な助言をいただき、ここに謝意を表す。

6. 参考文献

- (1) Ueno, O. (2001) Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant physiol.* 127: 1524-1532
- (2) Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H. (1984) Improved technique utilizing non fat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitro cellulose. *Gene Anal. Tech.*, 1: 3-8
- (3) Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975:384-394.
- (4) Terada, K., Izui, K. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase: His138 is essential for the second partial reaction., *Eur. J. Biochem.*, 202: 797-804
- (5) Ueno, O. (1998) Induction of Kranz anatomy and C₄-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid., *Plant Cell*, 10: 571-583
- (6) Brunner, J.R. (1977) Milk proteins, In *Food Proteins* (ed. J.R. Whitaker and S.R. Tannenbaum), AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, pp. 175-208.
- (7) Schmidt, D. G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in Dairy Chemistry 1*: 61
- (8) Wong, N.P. (1988) *Fundamental of Dairy Chemistry*, 3rd edn., Van Nostrand Reinhold, New York, pp.481-492.
- (9) Loomis, W.D., Battaile, J. (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes., *Phytochemistry*, 5: 423-438.
- (10) Ueno, Y., Imanari, E., Emura, J., Yoshizawa-Kumagaye, K., Nakajima, K., Inami, K., Shiba, T., Sakakibara, H.,

- Sugiyama, T., Izui, K. (2000) Immunological analysis of the phosphorylation state of maize C₄-form phosphoenolpyruvate carboxylase with specific antibodies raised against a synthetic phosphorylated peptide. *Plant J* 21: 17-26
- (11) Lewinsohn, E., Gijzen, M., Savage, T., Croteau, R. (1991) Defense mechanisms of conifers. *Plant Physiol.* 96: 38-43.
- (12) Sung, S.-J.S., Xu, D.-P., Black, C.C. (1988) Identification of activity filling sucrose sinks. *Plant Physiol.* 89: 1117-1121.
- (13) Alexander, G., Ivanov, A., Marianna, Krol., Dimitri, Sveshnikov., Gunilla, Malmberg., Per, Gardeström., Vaughan, Hurry., Gunnar, Öquist., Norman, P. A. Huner. (2006) Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine. *Planta.* 223: 1165-1177
- (14) Izui, K., Yoshinaga, T., Morikawa, M., Katsuki, H. (1970) Activation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli* by free fatty acids or their Coenzyme A derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 949-956
- (15) Testerink C, Dekker HL, Lim ZY, Johns MK, Holmes AB, Koster CG, Klistakis NT, Munnik T (2004) Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J* 39: 527-536
- (16) 徳永浩樹、松村浩由、甲斐泰、泉井桂 (2007) 緩衝水溶液と接触した食品包装用プラスチック製品からの酵素活性化作用をもつ微量物質の溶出. *Mem. School. B.O.S.T. Kinki University No.19:* 37-50
- (17) Smith, M.L., Keegan, M.E., Mason, H.S., Shuler, M.L. (2002) Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems. *Biotechnol. Prog.* 18: 538-550.
- (18) Lorenz, M., Jochmann, N., von Krosigt, A., Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V. (2007) Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur. Heart J.* 28: 219-223.
- (19) Jobstl, E., Howse, J. R., Fairclough, J.P.A., Williamson, M.P. (2006) Noncovalent Cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecular force microscopy. (2006) *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4077-4081.

英文抄録

Development of a highly efficient method for extraction of enzyme proteins from plant materials by the use of skim milk as an assisting agent: A case study of extraction of PEPC from *Eleocharis vivipara*

Hiroaki Nagamatsu,¹ Aya Sakagami,¹ Yasuhiro Yamazaki,¹ Kazue Yoshimura,¹ Ai Sekii,¹ Motomu Akita,^{1,2} and Katsura Izui^{1,2}

Eleocharis vivipara is an amphibious sedge plant, a habitat in southern part of North America. The plant takes a terrestrial form with slightly stiffened culms and performs C₄ photosynthesis in dry season, while it changes to a submerged form with soft culms and performs C₃ photosynthesis in rainy season. During the course of our study on phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC4.1.1.31) involved in C₄ photosynthesis, we found that the previously reported method for the enzyme extraction from the culm of terrestrial form did not work or was not efficient enough, and hence an improvement of extraction method was required. Here we report that the inclusion of skim milk (defatted dry milk) in the usual extraction medium which contains insoluble Polyvinylpyrrolidone (PVPP) as an absorbent of polyphenols, brings about a remarkably high yield of PEPC. More detailed study revealed the followings: 1) An opalescent fraction obtained by centrifugation of the extraction medium containing skim milk showed the highest extraction activity, suggesting the involvement of casein micelles in the extraction. 2) Both native casein and casein sodium salt which had been prepared by the removal of calcium and calcium phosphate, were almost equally effective for the extraction. 3) Individual casein micelle constituents, α -, β - and κ -casein, were almost equally effective, though physicochemical properties of α - and β -casein are known to be different from κ -casein. Although the usual extraction medium contained PVPP, further addition of soluble polyvinylpyrrolidone (PVP) strikingly improved the extraction efficiency of the enzyme protein. This indicated that the mode of action of PVPP is not always the same with PVP. Among the three classes of PVP tested, PVP10 with the smallest average molecular weight (ca. 10,000 Da) was the most effective for the extraction. Thus an inexpensive way to be tested for highly efficient extraction of enzyme proteins from unusual plant materials may be the use of skim milk or PVP as an assisting agent. When the extraction is required to be carried out with the medium of defined composition, skim milk can be replaced by one of the purified casein proteins. Possible usefulness of the use of skim milk for extraction of nutritious compounds from foodstuffs was also discussed.

原稿受付 2009年11月30日

1. Department of Biological Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Frontier Technology Multidiscipline Laboratory, Kinki University, Wakayama 642-0017, Japan