

サツマイモ塊根組織の

チトクロムP-450系酵素に関する研究

藤 田 政 之

5 サツマイモ塊根組織の

10 テトクロム P-450 系酵素に関する研究

名古屋大学図書  
和 960806

15 藤田 政之

報告番号	Z第 2990 号
------	-----------

# 目次

第1章 序論 1

第2章 Ipomeamarone 15-hydroxylase  
の同定とその性質

第1節 序論 24

第2節 材料および実験  
方法 30

第3節 実験結果 43

第4節 考察 67

第3章 サツマイモ塊根組織におけ  
るチトクロム P-450 の外的  
刺激による誘導



第 1 節	序論	87
第 2 節	材料および実験 方法	91
第 3 節	実験結果	96
第 4 節	考察	110
第 4 章	病傷害サツマイモ塊根組織 における 2 種のチトクロム P-450 依存水酸化酵素 — <i>ipomeamarone 15-hydroxylase</i> と <i>cinnamic acid 4-</i> <i>hydroxylase</i> — 両の細胞内 局在性の相違	
第 1 節	序論	120
第 2 節	材料および実験	124

	方法	
第3節	実験結果	132
第4節	考察	151
第5章	サツマイモ塊根組織のチト クロム P-450 系酵素の酵素 化学的性質	
第1節	序論	162
第2節	材料および実験 方法	167
第3節	実験結果	174
第4節	考察	198
第6章	総合討論	209

第7章	要約	216
	文献	222

5

10

15

5

10

15

## ABBREVIATIONS

ADP	: adenosine diphosphate
AMP	: adenosine monophosphate
ATP	: adenosine triphosphate
BSA	: bovine serum albumin
CDP	: cytidine diphosphate
CM	: carboxymethyl
CoA	: coenzyme A
DEAE	: diethylaminoethyl
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate
FAD	: flavin adenine dinucleotide
FMN	: flavin mononucleotide
ITLC	: instant thin-layer chromatography
mRNA	: messenger ribonucleic acid
NADH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADP <sup>+</sup>	: oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMR	: nuclear magnetic resonance
POPOP	: 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]benzene
PPO	: diphenyloxazole
SDS	: sodium dodecylsulfate
TLC	: thin-layer chromatography
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDPG	: uridine 5'-diphosphate $\alpha$ -D-glucose

# 第 1 章

## 序 論

〔病傷害サツマイモ塊根組織における二次代謝系〕

高等植物には多彩な二次代謝系<sup>1,2)</sup>が存在しており、これらの代謝系によつて生産される非常に多種にわたる二次代謝産物は薬物・毒物・香料・染料等の形で人間生活と密いかわりあいをもち、ている。これらの二次代謝産物は、勿論こうした人類社会における利用という点で重要ではあるが、それ以上に生産者たる植物自身の生命現象にいかにかかわりあっているかが極めて重要な問題であり、多くの科学者の興味の対象となつてきた。高等植物における二次代謝系は、その生活環において恒常的に存在している場合も勿論あるが、物理的ないし化学的刺戟、さらには生物的刺戟等の環境因子によつて誘導されたり、植物

体自身の成長段階と関連した内的要因等によって制御されている場合も極めて多い。こうした誘導・制御を解析することによって、これらの二次代謝産物の植物体における生理的役割が明らかにされてきている。

サツマイモ塊根組織においても、正常な組織には存在しないが、ひとたび外的刺激を与えると顕著に誘導される2種の特有な二次代謝系が存在することが知られている。その一つはテルペノイド合成系<sup>3,4)</sup>で、黒斑病菌の感染により著しく誘発される。この代謝系は、病菌の感染以外<sup>5)</sup>でも、 $HgCl_2$  や  $CdSO_4$  等の重金属塩での処理、オクラトキシン等のマイコトキシンでの処理（予備実験による未発表データ）、アリモドキゾウムシによる食害<sup>6)</sup>等によっても誘導<sup>7)</sup>される。この二次代謝系はイポメアマロン<sup>7)</sup>をはじめとする種々の抗菌性フラノセスキテルペン類を産生し（図1）、かつ生成されたテルペン類は被害組織部にのみ蓄積する。このように、健全な植物体には存在し

ないが、病菌の感染に即応して植物が能動的に被害部に蓄積する抗菌性物質を総称してフィトアレキシン<sup>8)</sup>とよんでいる。例えば、ジャガイモのリシチン<sup>9,10)</sup>、エンドウのピサチン<sup>11,12)</sup>、コショウのカプシジオール<sup>13,14)</sup>等がそれに当る。これらのフィトアレキシンは構造的共通性に乏しく、イソフラボノイドやモノ、セスキ、ジテルペン等種々様々である。従ってまた、それらの抗菌性を示す機構も様々であろうと考えられている。イポメアマロンが抗菌性を示す一つの理由として、黒斑病菌<sup>15)</sup>の呼吸活性を抑えることが報告されている。

サツマイモ塊根のテルペノイド合成系は、他のイソプレノイド合成系と同様に、まずアセチル CoA を出発物質とし、律速酵素と考えられている 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase による還元反応を經由し、プレニルピロリン酸を合成する(図2)。こうした共通した代謝経路で合成されたプレニルピロリン酸は、その後極めて複雑でかつサツマイ

モに特有な経路によって代謝される(図1)。その複雑さは、特有の炭素骨格が形成されることは勿論、種々の部位で酸素原子や二重結合が導入されることにも起因している。アセチル CoA からフェルネシルピロリン酸までの経路については、組織レベルだけでなく無細胞抽出系を用い、放射性炭素で標識された中間体を基質として酵素学的に確かめられている。アセチル CoA の産生に参与する酵素も含めると、*pyruvate decarboxylase*<sup>16)</sup>、*acetaldehyde dehydrogenase*<sup>18)</sup>、*acetyl CoA synthetase*<sup>19)</sup>、*ATP-citrate lyase*、アセチル CoA から 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA への反応に参与する酵素<sup>20)</sup>、*3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase*<sup>21)</sup>、メバロン酸からイソペンテニルピロリン酸への反応に参与する酵素<sup>22)</sup>等が、この代謝系に参与することが確かめられており、かつまたこれらの酵素の活性がフラノテルペンの産生に先達して誘導的に増加することも確かめられている。



フェルネソール以後のイポメアマロンをはじめとする種々のフラノテルペンへの変換に關しては、放射性炭素で標識された中間体を用いた組織レベルでのトレーサー実験による結果にとどまらず、こゝに、デヒドロイポメアマロンをイポメアマロンに還元する *dehydro-*<sup>23)</sup>  
*ipomeamarone reductase* 活性のみが無細胞抽出系で検出されているにすぎない。そこで、フェルネソール以降のテルペン生成に關与する酵素の一つとして、イポメアマロンからイポメアマロールへの水酸化反応を触媒する酵素を無細胞抽出系にて検出し、その酵素学的性質を明らかにすることを本研究の一つの目的とした。

サツマイモ塊根組織で知られているもう一つの二次代謝系はフェニルプロパノイドを含むポリフェノール化合物の合成系<sup>(24)</sup> である。本合成系も、テルペノイド合成系と同様に、黒斑病菌の感染によつて強く誘発されるが、その外にも、切断傷害の様な単なる物理的刺

敷によ、こも誘導される。フェニルプロパノイド代謝系は高等植物全般にわた、こ幅広くその存在が知られているが、その最終産物としては、褐変の要因とな、こいるクロロゲン酸、木化や癒傷に重要な役割を担、こいるリグニン、植物性色素として重要な位置を占めるフラボノイド類など、その構造でも生理的役割でも多種多様である。これら多様な代謝産物は、フェニルプロパノイド代謝系、すなわちフェニルアラニンからシナピン酸までの代謝経路から分枝して産生される(図3)。サツマイモ塊根においては、そのフェニルプロパノイド代謝系の初期段階に関与している種の酵素について詳しい研究がなされている。一つはこの代謝系の律速酵素と考えられている *phenylalanine ammonia lyase* であり、もう一つはそのすぐ後に位置する *cinnamic acid 4-hydroxylase* である。両者とも、組織が切断傷害を受けた後、ポリフェノール化合物の産生に先立、こ顕著にその活性が高まる

誘導酵素である<sup>25)</sup>。そしてともに、切断傷害後  
 1日を境にして、その活性が減少する<sup>25)</sup>。前者  
 は可溶性酵素であり高度に精製され<sup>26)</sup>、それ  
 に対する抗体を用いて、その活性上昇が酵素タ  
 ンパク質の合成誘導<sup>27)</sup>に起因していることが証  
 明されている。後者は、膜結合酵素であり、  
 テトクロム P-450 関与の一原子酸素添加酵素  
 であることが示唆されている<sup>25)</sup>。

〔病傷害サツマイモ塊根組織の二次代謝系と

テトクロム P-450〕

生物代謝は大別するとエネルギー代謝と物  
 質代謝とに分けられようが、それら両者のう  
 ちに占める酸化反応の比重は極めて大きいと  
 いえよう。例えば、前者においてはミトコン  
 ドリア内膜での酸化的リン酸化があげられ、  
 後者においてはミクロソーム膜での薬物の酸  
 化的代謝があげられる。ミクロソーム膜での  
 薬物代謝が今世紀後半になら、こにわかに注目  
 されるようになったのは、動物肝における代  
 表的誘導酵素として知られるテトクロム P-

450 の発見<sup>28)</sup>によるところが大きい。これは Garfinkel<sup>29)</sup> と Klingenberg とにより、1958 年独自に発見され、1964 年、大村と佐藤<sup>30, 31)</sup> によりヘムタンパク質であることが証明され、還元状態下で CO を結合させると 450 nm で特異的な Soret 帯を示すことからその名がつけられた。ミクロソームのチトクロム P-450 はミクロソームの電子伝達系の末端酵素であり、分子状酸素のうちの 1 個の酸素原子を直接薬物等の基質に導入し、同時に残りの酸素原子を水に還元する mixed function oxidase である。チトクロム P-450 は動物や微生物で活発に研究が進められてきこおり、薬物代謝という点からのみならず、酵素化学、代謝調節、膜酵素の生合成、遺伝子解析など、いろいろな観点から多くの研究者の注目を集めている。その理由として、特異的なヘム吸収スペクトル、幅広い基質特異性、臓器特異性と分子多様性、フェノバルビタール、メチルコラントレンをはじめとする特定物質による著しい誘導性、

癌化への関与等があげられる。このように、チトクロム P-450 は生理・生化学という立場からは勿論、物理化学的にも細胞生物学的にも、さらには遺伝学・比較生物学的にも極めて興味深い酵素である。

これまでに数多くの種類のチトクロム P-450 が動物や微生物から単離、精製されている。これらのチトクロム P-450 は、研究方法や研究目的が相違していることもあり、種々の見方で分類されている。最も妥当と考えられる分類は、細胞内局在性の違いにより、2 群に大別することである。すなわち、ミクロソーム型とミトコンドリア内膜（または細菌）型に分類することである（図 4）。前者は一般に  $\text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{NAD(P)H-cytochrome P-450 reductase} \longrightarrow \text{cytochrome P-450}$  で表わされるミクロソームの電子伝達系を構成する。一方、後者は  $\text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{NAD(P)H-ferredoxin reductase} \longrightarrow \text{ferredoxin} \longrightarrow \text{cytochrome P-450}$  で表わされるミトコンドリア内膜（ま

たは細菌)型電子伝達系を構成する。ミクロソーム型チトクロム P-450 は、さらに、NADPH または NADH のいずれかのみを電子供与体とする単一電子伝達系型と、NADPH と NADH の両者を電子供与体として要求する複合電子伝達系型に分類されている(図4)。

近年、高等植物の二次代謝系にチトクロム P-450 に依存した一原子酸素添加酵素が関与しているという実験結果が報告されつつある。例えば、未成熟の Marach macrocarpus の種子における  $\text{ent-kaur-16-ene}$  とその酸化誘導体の酸化反応、エンドウ sorghum 幼苗、Jerusalem artichoke 塊茎、切断傷害サツマイモ塊根における桂皮酸のパラ位の水酸化反応、Vinca rosea 幼苗におけるゲラニオールとネロールの10位の水酸化反応 などである。これらの報告は、これらの酸素添加活性がミクロソーム画分に局在し、NADPH と酸素分子を要求し、CO により阻害を受け、その阻害が光により抑制されることを明らかにしている。

る。

高等植物のチトクロム P-450 については、その含量が極端に少ないため、単にその存在が示唆されているにすぎない。ただごく最近になつて、*チューリップ* 球根からチトクロム P-450 を精製したとの報告が発表された<sup>38)</sup>。また、NADPH-cytochrome *c* (P-450) reductase についてさえも、ミクロソームの標識酵素としてよく使われているにもかかわらず、電気泳動的に完全に単一に精製されたという報告はまだみあたらない<sup>39)</sup>。*Madyastha* と *Coscia* は、*Catharanthus roseus* から部分精製した NADPH-cytochrome *c* (P-450) reductase と、同じ材料から部分精製したチトクロム P-450 を用い、この両酵素をミクロソームからの脂質に組みこませて、モノテルペンの水酸化酵素系を再構成することに成功している。この結果は、高等植物のミクロソーム画分で検出されている二次代謝系に参与するいくつかの水酸化酵素系もまた、動物肝ミクロソームで証明され

ていふような  $\text{NADPH} \longrightarrow \text{NADPH-cytochrome P-450 reductase} \longrightarrow \text{cytochrome P-450}$  という電子伝達系を構成していることを示すより直接的な証明として興味深い。しかし、以上のことからわかるように、高等植物のチトクロム P-450 系の酵素化学的研究は、動物や微生物の場合に比べて著しく立ち遅れている。従って、今後こうした研究が強力に進められる必要がある。

前述したように、動物肝の場合には 3-メチルコラントレン、フェノバルビタール等の薬物が、それぞれに対応する複数種のチトクロム P-450 を顕著に誘導することがよく知られている。しかし、高等植物の場合には、このようなチトクロム P-450 の誘導に関する研究は極めて数少なく、従ってまた、有効な誘導剤もまだ見いだされていない。高等植物のチトクロム P-450 含量があまりにも少なく、その測定が容易でないことが、こうした誘導に関する研究を遅らせているものと考えられる。



これまでに報告された高等植物のチトクロム P-450 の誘導に関する研究としては、ジャガイモ塊茎<sup>40)</sup>や Jerusalem artichoke 塊茎<sup>35)</sup>における切断傷害に伴う誘導があげられる程度にとどま、ている。Jerusalem artichoke 塊茎においては、エタノール、フェニルビタール、 $MnCl_2$  および除草剤であるモニユロンやジクロベニルがチトクロム P-450 を誘導することも見いだされている<sup>41,42)</sup>。しかし、これらの誘導物質と誘導されるチトクロム P-450 の生理学的関係に関しては全くわか、ていない。このように、高等植物におけるチトクロム P-450 の誘導については、系統だ、った解析が全くなされてい、ないとい、ても過言でない。既に概説したように、サツマイモ塊根組織では、この種の特有の二次代謝系(テルペノイド合成系とポリフェノール化合物合成系)が種々の外的刺激により顕著に誘導される。それらにより産生される極めて多様な代謝産物は、全て含酸素化合物である。そのうち、前述したよ

うに、ポリフェニール化合物の合成系では、その中間体であるクマール酸のベンゼン環のパラ位の酸素原子は、チトクロム P-450 関与の *cinnamic acid 4-hydroxylase* によつて、酸素分子より導入されたものであることが示唆されている。*Cinnamic acid 4-hydroxylase* は高等植物に広範に存在しており、1971年の Russell による報告を境にチトクロム P-450 関与の水酸化酵素として活発に研究されてきている。これらの研究は、本酵素がミクロソーム、つまり *endoplasmic reticulum* に局在することを示してきている。一方、テルペノイド合成系については、Burka<sup>43)</sup>らが、 $\text{HgCl}_2$  で処理したサツマイモ塊根組織を用い、 $^{18}\text{O}_2$  と  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  でのトレーサー実験によつて、イポメアマロンに含まれる3個の酸素原子は、全て分子状酸素から由来したものであることを証明した。言い換えれば、イポメアマロン中の3個の酸素原子は、全てチトクロム P-450 によつて導入されている可能性が示唆された

わけである。この結果から演えきすると、イ  
ポメアマロンからイポメアマロノールへの水  
酸化反応もチトクロム P-450 が関与している  
のではないかと仮定することができよう。サ  
ツマイモ塊根組織においては、これらの酸素  
導入反応の他にも極めて多数の酸素導入反応  
が広く存在し、代謝産物の構造的、機能的多  
様性を生み出すのに一役を担っていることが  
よく知られている。そこで、これらの酸素が  
酸素分子から由来したものかそれとも水から  
導入されたものかが問題となる。もし、オキ  
シゲナーゼ反応によつて導入されるのであれば、  
二原子酸素添加酵素によるものなのか、  
それとも一原子酸素添加酵素によるものなの  
かが問題となる。そして、もし一原子酸素添  
加酵素によるのであれば、チトクロム P-450  
関与のものなのかフラビン系酵素によるもの  
なのかが問題となる。もしチトクロム P-450  
関与により導入されることがわかれば、たとえ  
ば、そのチトクロム P-450 は分類上ミクロソ

—ム型なのかミトコンドリア内膜型なのかそれとも全く新しい型に属するものなのかを明らかにする必要がある。そしてさらには、同一植物組織内で起こる複数の酸素添加反応が1種のチトクロム P-450 によるものなのか、それとも複数種のチトクロム P-450 によるものかを明らかにする必要もある。現在のところ、以上のような問題に関しては、全く不明のままになっている。チトクロム P-450 の誘導に関する問題も含め、サツマイモ塊根組織は高等植物チトクロム P-450 の研究にとって興味ある材料であると考えられる。

### 〔本論文の内容〕

本論文は、以上のような背景をふまえて行ってきたサツマイモ塊根組織のチトクロム P-450 系酵素の性質や誘導に関する研究の結果をまとめたものである。すなわち、サツマイモ塊根組織が病傷害刺激を受け、時に誘導される二次代謝系に着目し、この代謝系に参与するチトクロム P-450 系を酵素学的に研究し

に結果やこの組織でのチトクロム P-450 の誘導に関して検討した結果を記述したものである。

まず第2章では、近年高等植物における二次代謝系にチトクロム P-450 関与の水酸化反応が含まれていることが明らかになるにつれて、病害サツマイモ塊根組織のテルペン合成系中の酸素導入反応がチトクロム P-450 関与かどうかを検討する必要性がでてきたので、このことをイポメアマロンの酸素添加反応について検討した結果について述べる。すなわち、イポメアマロンからイポメアマロールへの反応がチトクロム P-450 関与の水酸化酵素—*ipomeamarone 15-hydroxylase*—によつて触媒されていることを説明する。そしてさらに、この酵素活性が病傷害刺激によつて誘導出現すること、病傷害組織には複数種のチトクロム P-450 が存在するらしいことについても述べる。

次に第3章では、サツマイモ塊根組織での

チトクロム P-450 の誘導について調べた結果を説明する。第2章でチトクロム P-450 関与の水酸化酵素—*ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase*—活性が組織が病傷害刺激を受けると誘導的に出現増加することを説明するが、このことはチトクロム P-450 それ自体が病傷害刺激で誘導される可能性があることを示唆している。そこで、サツマイモ塊根組織で、どのような刺激によ、てチトクロム P-450 が誘導されるのかを調べた結果を説明する。そして、チトクロム P-450 の誘導とテルペン蓄積量の間に相関関係がみられたことについても述べる。

第4章においては、*ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* の両チトクロム P-450 関与の水酸化酵素の、サツマイモ塊根細胞内での局在性について調べた結果について説明する。そして、*cinnamic acid 4-hydroxylase* の細胞内局在性の特殊性を強調すると共に、これら両水酸化酵素のチ

トクロム P-450 が互いに異なる証拠が得られたことについても述べる。

第5章においては、サツマイモ塊根組織のチトクロム P-450 系酵素の酵素化学的諸性質を明らかにするために、NADPH-cytochrome c (P-450) reductase とチトクロム P-450 を可溶化し精製することを試みた結果について説明する。前者を完全に精製することには成功したが、後者についてはその可溶化のみが成功したにすぎなかった。従って、NADPH-cytochrome c (P-450) reductase の性質を中心に説明する。





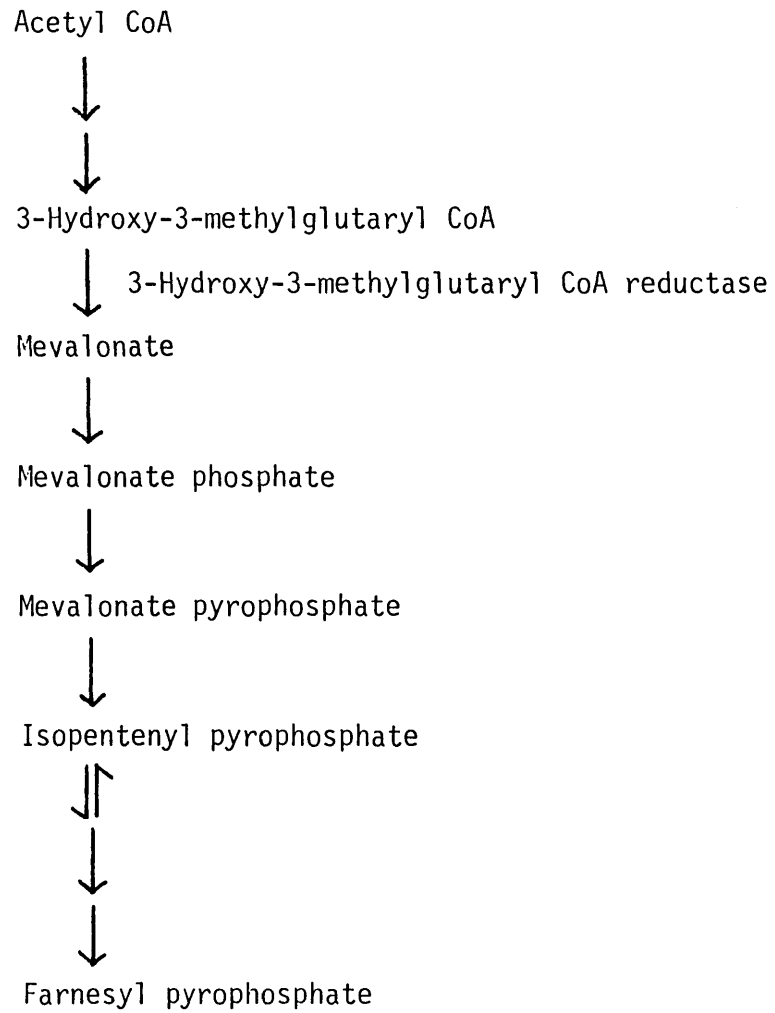


Fig. 2. Possible metabolic pathway from acetyl CoA to farnesyl pyrophosphate in sweet potato.

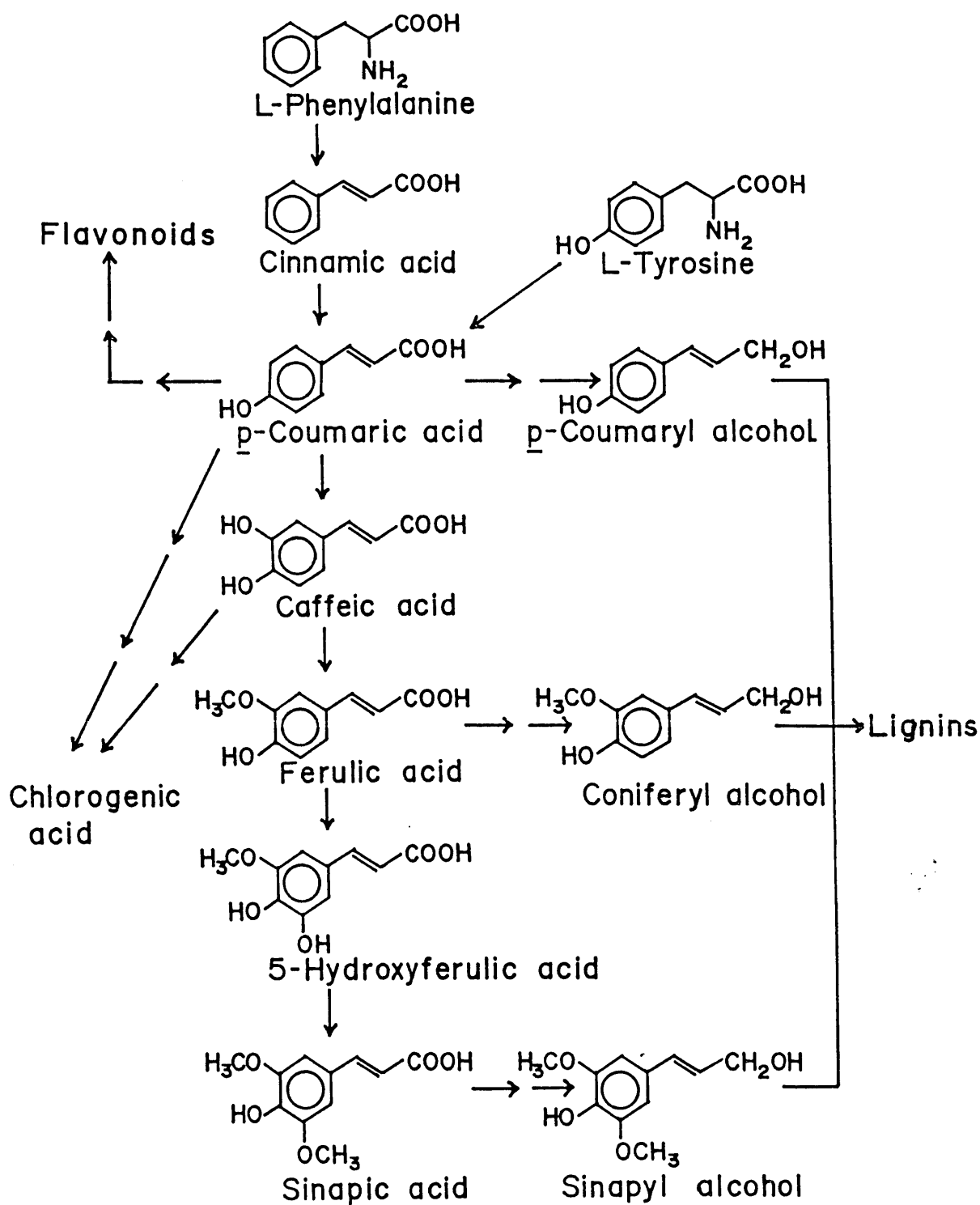
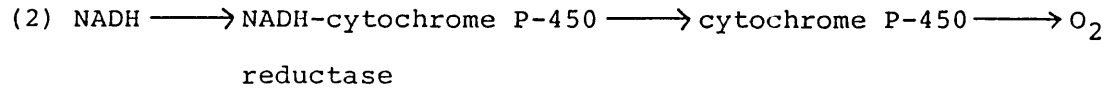
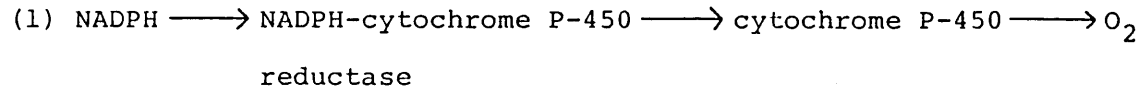


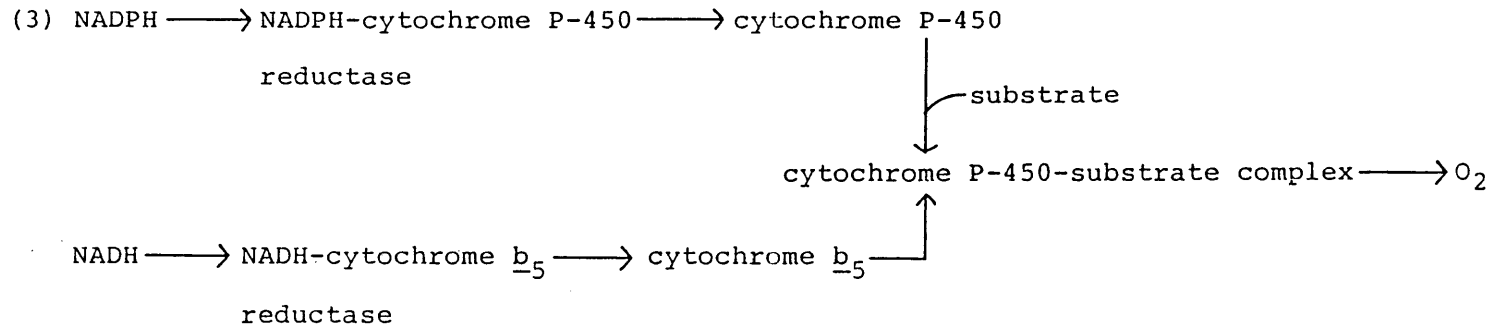
Fig. 3. Metabolic pathway of phenylpropanoid synthesis.

A. microsomal type

I. single electron transport system

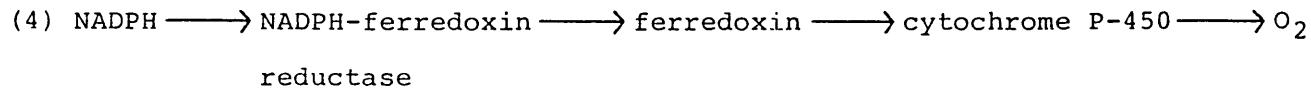


II. multiple electron transport system



B. mitochondrial type (bacterial type)

[mitochondria]



[bacteria]

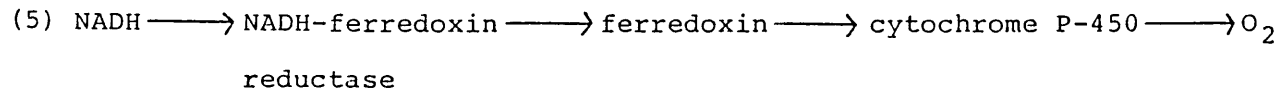


Fig. 4. Cytochrome P-450 dependent electron transport systems.

## 第 2 章

## Ipomeamarone 15-hydroxylase の同定とその性質

## 第 1 節 序論

サツマイモ塊根組織は黒斑病菌の感染や  $HgCl_2$  での処理を受けると、イポメアマロンをはじめとする多量の抗菌性フラノセスキテルペンを罹病部に蓄積する<sup>3,4)</sup>。それらの生合成経路に関しては、瓜谷を中心とするグループと Burka を中心とするグループにより、精力的に研究が進められてきた。その結果、サツマイモ塊根組織におけるフラノセスキテルペンの生合成経路は、解糖系やトリカルボン酸サイクルのような一次代謝系で見られる根幹のは、きりした経路ではなく、経路の途中で様々に分岐し、さらには合流する網状の代謝系であることがかなり確實にな<sup>44)</sup>ってきた(図

参照)。この複雑多岐に分枝した代謝系に含まれている多種のフラノセスキテルペンは、フラン環の酸素以外にも複数個の酸素原子を保有した含酸素化合物である。これらの酸素原子が、どの段階でどのような機構で挿入されるのか、またこうした酸素原子の挿入が、生理学的にどのような意味を持っているのかについては、酵素学的知見が極めて乏しい現在、まだ推論の域を出ていないのが現状である。

43)

1982年、BurkaとThorsenは、同位体酸素( $^{18}\text{O}$ )で標識した分子状酸素と水を $\text{HgCl}_2$ で処理したサツマイモ塊根組織に与え、組織で合成され蓄積されたイポメアマロンのマススペクトルを解析した。そしてその結果から、イポメアマロンに含まれる3個の酸素原子は分子状酸素から由来したものである、水やフラノセスキテルペンの前駆体であるフェルネソールの酸素原子から由来したものではないと結論した。つまり言い換えれば、イポメ

アマロンの3個の酸素原子はテトクロムP-450に依存した一原子酸素添加酵素かそれに類似した酸素添加酵素によって導入されることを示唆した。なお、フェルネソールの1位の水酸基の酸素原子が、フラン環が形成される際単純にそのまま組みこまれるのではなく、その前にいったん脱離し、新たに分子状酸素から別の酸素原子が導入されて、フラン環を構成する酸素原子となるという事実は極めて興味深い。すなわち、この一見静的にもとれる酸素原子は、実際には生体内において、酵素反応と密接にからみ合、た離脱と添加の産物であることを示していて興味深いものがある。

45)

一方、1982年、大羽<sup>45)</sup>らは<sup>14</sup>Cで標識した放射性イポメアマロンを用いたトレーサー実験を行い、サツマイモ塊根組織におけるイポメアマロンの代謝変換に関する結果を報告した。それによると、イポメアマロンは切断傷害のみを受けた組織において効率よく代謝され、

切断後  $HgCl_2$  で処理した組織や黒斑病菌を感染させた組織では、その代謝活性はむしろ弱いという。また、切断傷害組織に黒斑病菌を感染させた後、その組織でのイポメアマロンの代謝活性とテルペン蓄積の経時変化を調べた実験で、イポメアマロンの代謝活性が減少するとともに、テルペンの蓄積が増大していくことが観察されている。大羽らは、これらの結果から、以上のような *in vivo* で観察されるイポメアマロンの代謝はテルペンの分解に関係するものであり、その活性は、3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性と共に、テルペン蓄積の調節の一方の要となつていのではないかと推論した。なお、マススペクトルなどでの解析によつて、イポメアマロンの代謝での最初の産物はイポメアマロノールであることが証明された。

近年、高等植物における二次代謝にチトクロム P-450 に依存した水酸化酵素系が関与しているとの研究成果が報告されつつある。病

傷害サツマイモ塊根組織におけるポリフェノール化合物の合成に一役を担っている *cinnamic acid 4-hydroxylase* がチトクロム P-450 関与の水酸化酵素<sup>25)</sup> であることが示され、<sup>5)</sup> にもその一例である。しかし、傷害サツマイモ塊根組織における二次代謝系としてポリフェノール化合物合成系と並び称されるテルペノイド合成系に関しては、酸素添加反応が多いにもかかわらず、何ひとつ酵素学的知見<sup>4)</sup> が得られていなかった。そこで本研究では、まずこのテルペノイド合成系にチトクロム P-450 関与の酸素添加反応があるかどうかを探ることとした。

前述したように、Burka と Thorsen<sup>43)</sup> はイポメアマロンの3個の酸素原子は、分子状酸素から由来したものであることを示した。そこで、おそらくイポメアマロノールの15位の酸素原子もまた分子状酸素から由来するのであろうと考えた。そして基質であるイポメアマロンが容易に調製できることを考慮し、この



酸素添加反応がチトクロム P-450 関与によるものかどうかを検討することにした。本章では、こうした研究の結果を記述する。すなわち、大羽らによつて報告されたサツマイモ塊根組織で起こるイポメアマロンからイポメアマロニールへの変換が、無細胞抽出系で酵素的に起こることを証明し、本酵素を *ipomeamarone 15-hydroxylase* と命名したこと、*ipomeamarone 15-hydroxylase* はチトクロム P-450 が関与した一原子酸素添加酵素であると確認したこと、*ipomeamarone 15-hydroxylase* に関与するチトクロム P-450 は *cinnamic acid 4-hydroxylase* に関与するそれとは別種のものであり、したがってサツマイモ塊根組織には複数種のチトクロム P-450 が存在することを明らかにしたことについて述べる。

## 第2節 材料および実験方法

### 〔植物材料〕

静岡県伊藤農場で収穫されたサツマイモ塊根 (*Ipomoea batatas*、品種、農林1号) を使用した。使用直前まで、 $12\sim 14^{\circ}\text{C}$  で貯蔵しておいた。

### 〔粗ミクロソーム画分の調製〕

サツマイモ塊根を流水で十分洗い、 $0.05\%$  の次亜塩素酸ナトリウムで15分間消毒した後、再度流水で十分洗浄した。その柔組織より、厚さ $3\text{ mm}$ のスライス $40\text{ g}$ を調製し、 $29^{\circ}\text{C}$ の湿潤条件下で24時間インキュベートした。次に、それを $0.5\text{ M}$ スクロース、 $1\text{ mM}$  EDTA、 $1\%$  ( $\text{w/v}$ ) イソアスコルビン酸ナトリウム、ポリクラーラルAT (新鮮組織重量の5分の1量) と $0.5\%$  ( $\text{w/v}$ ) BSAを含んだ $100\text{ ml}$ の $50\text{ mM}$  Tris-HCl 緩衝液 ( $\text{pH } 8.5$ ) 中でウォーリングブレンダーにより最高速度で15秒間、6回まで碎した。ま碎液を2重のナイロンガーゼ

でこし、ろ液を  $10,000 \times g$ 、15分間遠心した。上清を  $0.5 M$  スクロース、 $1 mM$  EDTA と  $1 mM$  DTT を含んだ  $50 mM$  Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で前も、く平衡化させておいたセファデックス G-25 カラム (全ベッド容:  $500 ml$ ) につかけ、同じ緩衝液で溶出した。溶出したタンパク質画分を2時間  $100,000 \times g$  で遠心し、次般は  $0.5 M$  スクロースと  $0.3 mM$  DTT を含んだ  $5 ml$  の  $50 mM$  Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し、それを粗ミクロソーム画分とした。後述するが、イポメアマロンのイポメアマロールへの代謝活性は、ミクロソーム画分に局在することから、本粗ミクロソーム画分を酵素液として用いた。

切断傷害または黒斑病菌感染後の酵素活性の経時的変化を見る実験では、酵素液は以下のように調製した。まず、柔組織から厚さ  $1.0 \sim 1.5 cm$  の輪切り切片を調製した。切断傷害に関する実験では、そのまゝ  $29^\circ C$  で目的の時間インキュベートした。黒斑病菌感染組

織に関する実験では、輪切り切片の表面に黒斑病菌 (Ceratocystis fimbriata Ell and Halst) の内生分生子 (約  $1 \times 10^7$  個/ml) を接種後、同様に一定時間インキュベートした。インキュベーション後、切断傷害の場合は 1.0 ~ 1.5 mm の厚さで表面の組織を、黒斑病菌感染の場合は罹病部に隣接した健全組織を 1.0 ~ 1.5 mm の厚さで切り取った。切り取った組織より、上記の方法で酵素液を調製したが、膜画分全体の酵素活性をみるために、10,000 × g、15分間の遠心を 300 × g、10分間の遠心に変更して行った。

以上の操作のうち、組織のま碎以降の操作は 0 - 4°C で行った。

#### 〔粗テルペン画分の調製〕

サツマイモ塊根を水で十分洗い、その柔組織から輪切り切片 (厚さ 1.0 ~ 1.5 cm) を調製した。その切断面に黒斑病菌の内生分生子懸濁液 (約  $1 \times 10^7$  個/ml) を塗布し、29°C の湿潤条件下に 2-3 日間インキュベートした。黒

斑病菌の感染により褐変化した罹病部をカミソリで切り取り、それより粗テルペン画分を抽出した。まず、罹病組織をクロロホルム-メタノール(1:1、v/v)中でウォーリングブレンダーにより最高速度で約3分間まぜ、そのまぜ物をグラスフィルター(3G)で減圧ろ過した。残さについてこの操作をさらに2~3回繰り返した。次にろ液を合わせ、その約0.4倍容の蒸留水を加え敷しく振とうした。それを2,500 rpm、15分間の遠心にかけてクロロホルム層を分取し、減圧蒸留によりクロロホルムを除去した。最終的に得られた油状物質を粗テルペン画分とした。

#### 〔イポメアマロンの精製〕

<sup>46)</sup>

小国らの方法に多少改変を加え精製した。まず、粗テルペン画分をTLC板に付与し、*n*-ヘキサン-酢酸エチル(8:2、v/v)で展開し、イポメアマロン画分をかき取り、クロロホルム-メタノール(1:1、v/v)で抽出した。同じ操作をさらに2回行った。最後に、

n-ヘキサニ-酢酸エチル (9:1, v/v) の展開溶媒を用いたTLCにより精製を完了した。

### [ $^{14}\text{C}$ -標識イポメアマロンの調製]

“粗テルペン画分の調製”の項で述べた方法により、サツマイモ塊根組織に黒斑病菌の内生分生子を接種し、 $29^{\circ}\text{C}$ の湿潤条件下で36時間インキュベートした。次に、それより、片面に罹病部を含むように20個のディスク ( $20 \times 2 \text{ mm}$ ) を切り出した。蒸留水を湿らせたろ紙を敷いたペトリ皿にステンレスの金網を置き、その上に罹病組織が下になるようにディスクを載せた。ディスクの上面にむらなく1- $^{14}\text{C}$ -酢酸ナトリウム水溶液 ( $50 \mu\text{Ci}/\text{disc}$ ) を塗布し、1にだちにペトリ皿でふたをし、それをプラスチック製の密封容器に入れ $30^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。インキュベート中に発生する $^{14}\text{CO}_2$ を捕獲するために、ペトリ皿とプラスチック容器の両方に20% KOH水溶液を入れた器を入れておいた。6時間インキュベートした後、“粗テルペン画分の調製”の項

において記述した方法により、罹病組織から放射活性をもつ粗テルペン画分を調製した。この画分より“イポメアマロンの精製”の項で述べた方法と同じ方法で<sup>14</sup>Cで標識されたイポメアマロンを精製した。精製標品の比放射活性は  $5.5 \times 10^{11}$  dpm/mol であった。

〔イポメアマロノールの3,5-ジニトロベンゾイル誘導体の調製〕

イポメアマロノールの3,5-ジニトロベンゾ<sup>47)</sup>イル誘導体の調製は加藤らの方法に従った。部分精製したイポメアマロノールをシリカゲルを入れた減圧状態のデシケーター内で一昼夜乾燥した。次に、それを乾燥させたジエチルエーテルに溶かし、乾燥させたピリジン中で3,5-ジニトロベンゾイルクロライドと室温で4時間反応させた。反応液を2N HClで3回、蒸留水で2回、1M NaHCO<sub>3</sub>で3回、蒸留水で2回順次洗い、さらに飽和NaCl水溶液で水を取り、最終的にNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で脱水した。減圧蒸留してジエチルエーテルを除去し、シリ

カゲルカラムクロマトグラフィー、TLC を経てその残留物からイポメアマロノールの 3,5-ジニトロベンゾイル誘導体を精製し不定形結晶を得た。それを  $60^{\circ}\text{C}$  のジエチルエーテルに飽和状態になるように溶かし、室温にまでゆっくり冷却して無色透明の針状結晶<sup>47)</sup>を得た。精製標品の NMR スペクトルは加藤らの報告と一致した。また、融点は  $82^{\circ}\text{C}$  であり同報告よりもむしろ 1 度高く、純粋なイポメアマロノール-3,5-ジニトロベンゾエイトであると判断した。

### [ Ipomeamarone 15-hydroxylase 反応の解析 ]

活性測定 — 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M スクロース、1 mM DTT、 $62 \mu\text{M}$  放射性イポメアマロン (約 50,000 dpm のイポメアマロンを前もって 0.1 ml の蒸留水-アセトン < 50:1、 $\forall/\forall$  > に溶かしたものの)、0.87 mM  $\text{NADP}^+$ 、1.5 mM グルコース 6-リン酸、glucose 6-phosphate dehydrogenase (0.3 酵素



単位) および酵素液 (1 ~ 4 mg protein) を含んだ全容 1.5 ml の反応液を調製し、30°C で一定時間反応させた。反応は酵素液の添加により開始し、3.5 ml のクロロホルム-メタノール (1:1, v/v) の添加により停止した。反応の停止の際、少量の粗テルペン画分を添加し、反応生成物の非酵素的な分解を防ぐとともに、それを分離する時の示標とした。

5,500 rpm で1時間遠心してクロロホルム層を分取し、残りの水-メタノール層からさらに1.5 ml のクロロホルムで再度反応生成物を抽出した。分取したクロロホルムを合わせ窒素気流によりクロロホルムを気化させた。残留物は ITLC 紙に付与し、n-ヘキサン-酢酸エチル (6:4, v/v) で 6 cm、次に n-ヘキサン-酢酸エチル (9:1, v/v) で 15 cm 多重展開し、目的とする画分を切り取り、5 ml のシンチレーター (0.08 g PPO と 4 mg POPOP を 5 ml のトルエンに溶かしたもの) 中で放射活性を測定した。

反応生成物の同定—— (TLCによる同定)

1.25 mg の放射活性を有しないイポメアマロンを基質として用い、標準の ipomeamarone 15-hydroxylase 活性測定<sup>48)</sup>の10倍の規模で反応させた。30°C、1時間のインキュベーション後、35 mlのクロロホルム-メタノール(1:1、v/v)で反応を停止した。2,500 rpm で1時間遠心しクロロホルム層を分取し、残りの水-メタノール層をさらに15 mlのクロロホルムで処理した。分取したクロロホルム層を合わせ減圧蒸留した。残留物をクロロホルム-メタノール(1:1、v/v)に溶かしTLCプレートにスポットした。それをn-ヘキサン-酢酸エチル(1:1、v/v)で8 cmまで、次にn-ヘキサン-酢酸エチル(8:2、v/v)で16 cmまで多重展開し、そのプレートに Ehrlich's reagent を噴霧して発色させた。

(結晶化による同定) 放射性イポメアマロンを基質として得られた放射活性を有した反応生成物を、上記の方法により、3,5-ジニト

ロベンゾイルクロライドと反応させ、その誘導体を調製した。それを放射活性を持たない既知のイポメアマロノール-3,5-ジニトロベンゾエイトと混合し、ジエチルエーテル甲で3度再結晶化を繰り返し、そのたびに結晶の比放射活性を測定した。

気相および光の調節——酵素反応におよぼす反応系におけるガス組成の影響を調べるために、以下のように密封系にて目的の気相に調節した。反応液を入れたスピッツ遠心管をシリコン栓で封じ、それに三方コックを継いだ注射針を刺し込んだ。三方コックの注射針に継いだ口とは反対の口のうち一方を封じ、他の一方をロータリーポンプに継ぎ、1分間遠心管内の空気を排出した。次にロータリーポンプ側の口を封じ、それと同時に開封される口から窒素ガスを注入した。この操作をもう1回行い、3度目にロータリーポンプで1分間引いて減圧したものを無酸素状態とし、目的とするガス組成となるようにガスを注入

した。反応は遠心管をアルミホイルでおおい、光の当たらぬ条件下で行った。ただし、光の効果を見る場合には、アルミホイルではおおわず、遠心管の下に鏡を敷き、遠心管より30 cmの距離から500 Wの写真撮影用ランプを照射して反応を行った。

〔その他の酵素活性の測定〕

Cinnamic acid 4-hydroxylase ——— 田中らの<sup>25)</sup>方法 I に多少修正を加えて測定した。イポメアマロンの代わりに3-<sup>14</sup>C-桂皮酸を基質として使用した以外は、ipomeamarone 15-hydroxylaseの活性測定の場合と同じ反応液で1時間、30°Cで反応させた。反応は6 N HClを0.4 ml 添加して停止し、その際1.0 μmolのp-クマール酸を添加した。酸変性したタンパク質は2,500 rpm、30分間の遠心で沈殿させ、上清を分取した。沈殿したタンパク質を1.5 mlの蒸留水で洗い、2,500 rpm、30分間の遠心にかけて上清を取る操作を2回繰り返した。分取した上清を合わせ、5 mlの酢酸エチ

ルで3回抽出し、減圧蒸留により酢酸エチルを除き、残留物をエタノールに溶かし、それをクロマトグラフィ用ろ紙 (Toyo No. 51) に載せた。そのろ紙をベンゼン-酢酸-蒸留水 (2:2:1, v/v/v) を攪拌後の上層液を用いて 20 cm、25~30°C で展開し、目的画分を切り取った。放射活性の測定は Bray's<sup>49)</sup> solution を用いた。

NADPH-cytochrome c reductase — Masters<sup>50)</sup> の方法により測定した。2.22 mM  $\text{NaN}_3$ 、0.28 mM NADPH、3.33  $\mu\text{M}$  アンチマイシン A および 0.11 mM EDTA を含む 56 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) 0.27 ml に 9 mg/ml テトクロム c 20  $\mu\text{l}$  と酵素液 10  $\mu\text{l}$  を添加して 25°C で反応させた。活性はテトクロム c の還元による 550 nm の吸収の増加により測定した。

NADH-cytochrome c reductase — Mackler<sup>51)</sup> の方法により測定した。2.22 mM  $\text{NaN}_3$ 、0.27 mM NADH および 3.33  $\mu\text{M}$  アンチマイシン A を含んだ 22 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)

0.27 ml に 9 mg / ml ナトリウムクロム  $\text{Cr}^{2+}$  20  $\mu\text{l}$  と酵素液 10  $\mu\text{l}$  を添加して 25°C で反応させた。活性はナトリウムクロム  $\text{Cr}^{2+}$  の還元による 550 nm の吸収の増加により測定した。

〔タンパク質<sup>52)</sup>の定量〕

Lowry<sup>52)</sup>らの方法に従い、BSA を標準タンパク質として定量した。

## 第3節 実験結果

## 〔Ipomeamarone 15-hydroxylase の同定〕

イポメアマロンの代謝活性は切断後1日を経た傷害サツマイモ塊根組織において最も高いという大羽らの報告<sup>45)</sup>に従い、その組織より粗ミクロソーム画分を調製した。これを酵素液と仮定し、 $^{14}\text{C}$ で標識した放射性イポメアマロンを基質として $30^\circ\text{C}$ で3時間反応させた。反応液より抽出した粗テルペン画分をITLCにかけ、 $1\text{cm}$ ごとの放射活性を測定したところ、未反応のイポメアマロンによる高い放射活性の他に、比較的極性の高いイポメアマロノールと考えられる領域に高い放射活性が検出された。その他の画分にはほとんど放射活性は検出されなかつた。

反応生成物の同定に2種の方法を用いた。第1の方法は、反応生成物をTLCにかけ、Ehrlich's reagentで発色し、直接その展開状況と色を判断して同定する方法である。図5の

レーン3は、放射活性を持たないイポメアマロ  
ンを基質として用い、 $30^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ  
たもののクロマトグラムを示したものである。  
肌色を呈するイポメアマロン以外に、イポメ  
アマロノールの位置にそれぞれ特有の紫色のスポ  
ットが観察された。なお、図5のレーン1から  
3にかけて共通してみられる青色と黄緑色の  
スポットは、ミクロソームに由来する脂質が  
発色したものである。 $100^{\circ}\text{C}$ で10分間熱処理  
したミクロソームを用い同様に反応させた場  
合には、反応生成物(イポメアマロノール)  
に相当するスポットは検出されなかった(図  
5のレーン2)。データは示さないが、NADPH  
再生系を反応液から除去した時または $0^{\circ}\text{C}$ で  
反応させた時にも、紫色のスポットは検出さ  
れなかった。以上の結果より、切断傷害サツ  
マイモ塊根組織より抽出した粗ミクロソーム  
画分とイポメアマロンをインキュベートする  
とイポメアマロノールが生成すること、その  
生成にはミクロソームに存在する酵素が関与



している可能性が極めて高いことがわかった。

上述の結果をさらに確実にするために、第2の方法を用いて反応生成物の同定を行った。<sup>14</sup>Cで標識した放射性イポメアマロンを基質として反応を行い、それによつて得られる放射性反応生成物を3,5-ジニトロベンゾイル化し、既知のイポメアマロン-3,5-ジニトロベンゾエイトを担体として再結晶化を繰り返して、その比放射活性を測定した(表1)。

担体にするために合成したイポメアマロン-3,5-ジニトロベンゾエイトはNMRスペクトル、融点(82°C)の結果から純品であることを確認した。3回再結晶化したにも関わらず、その比放射活性に減少がみられなかった(表1)。このことから、反応生成物の3,5-ジニトロベンゾイル誘導体は、イポメアマロン-3,5-ジニトロベンゾエイトであると判断した。よつて、この放射性反応生成物はイポメアマロンであると判断した。

次に、粗ミクロソーム画分の量および反応

時間と反応生成量の間の関係を調べた。粗ミクロソーム画分量および反応時間とも、一定の範囲内において反応生成量との間に直線関係を示すことが確認された(データ省略)。

以上の結果をもとに、イポメアマロンからイポメアマロノールへの水酸化反応は酵素的に触媒されるものと結論し、本酵素を

*ipomeamarone 15-hydroxylase* と命名した(図6)。なお、以下で述べる酵素活性は、反応生成量と酵素量、反応生成量と反応時間の間に直線性が成り立つ範囲内で測定した。

[*Ipomeamarone 15-hydroxylase* の性質]

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性はミクロソーム、特に粗面ミクロソーム画分に分布していた。これに関しては第4章で詳細に述べる。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* の低温における安定性を調べたところ、 $-80^{\circ}\text{C}$  においては10日間ほとんど失活がみられなかった。よって、酵素液は $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存することにした。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性によらば

す反応液の pH の影響を pH 6.5 から pH 10.0 にかけて、3 種類の緩衝液を用いて調べた (図 7)。その結果、本酵素の活性の至適 pH は 8.0 であることがわかった。

5 Ipomeamarone 15-hydroxylase 活性におよぼす  
ピリジンヌクレオチドの効果調べた (表 8)。  
本酵素は活性発現に NADPH を必要とする  
が、NADP<sup>+</sup> を必要とはしなかった。ただし、  
1 mM の NADPH よりも 1 mM の NADP<sup>+</sup> を含んだ  
10 NADPH 再生系の方が高い活性を得ることが  
できた。NADH だけでは活性が得られな  
が、NADPH に併用して用いた場合には NADPH  
だけの活性よりも高い活性を得ることが  
できた。この関係について詳しく調べた結果を  
15 8 に示す。上述したように、NADPH が存在し  
ない時は、NADH を投与しても活性は無視  
できるほどであった。しかし、1  $\mu$ M の NADPH  
が存在する時には、1  $\mu$ M を臨界点として  
それを越える濃度の NADH は著しく活性を  
増大させた。しかし、NADPH の濃度が増加するに

伴い、NADH による酵素の活性化効果は減少した。NADPH の濃度を  $1 \text{ mM}$  にまであげると、NADH による活性化効果はほとんどみられなくなった。以上のことを要約すると、NADPH の濃度が本酵素の最大活性を与えるのに十分でない時には、共存する NADH は最大活性の範囲内で活性化するといえよう。これらの結果は、ミクロソームにおける NADPH を電子供与体とした電子伝達系と NADH を電子供与体とする電子伝達系との間で起こる synergistic 相互作用を反映するものと思われる。他の高等植物においても、類似の結果が *kaurane oxidase* (53,54) について Hasson と West により報告されている。

イポメアマロンと NADPH の濃度の逆数に対する *ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性の逆数をプロットし、それより  $K_m$  値を求めた。イポメアマロンに対する  $K_m$  値は約  $60 \mu\text{M}$ 、NADPH に対する  $K_m$  値は約  $2 \mu\text{M}$  であった。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性におよぼす

種々の化学物質の影響を調べた(表3)。チトクロム P-450 以外のヘム酵素の典型的阻害剤である KCN は酵素活性を阻害せず、むしろ約 1.5 倍に増大させた。表には示さないが、 $1 \text{ mM NaN}_3$  は活性に影響を与えなかった。エンドウ幼苗の *cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性を 27% 阻害すると報告されている  $\alpha, \alpha'$ -ジピリジル<sup>33)</sup> は、最終濃度  $1 \text{ mM}$  においても活性にはほとんど影響を与えなかった。SH 酵素の典型的阻害剤である p-クロロマーキエリ-安息香酸は、低濃度で活性を著しく阻害した。HgCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub> の重金属塩を同様な意味で使用してみたところ、これらも顕著に活性を阻害した。対照として MgCl<sub>2</sub> を使用したが、これは活性にはほとんど影響を示さなかった。ミクロソームの電子伝達系から電子を奪うと考えられるチトクロム c と p-ベンゾキノン<sup>34)</sup> は本酵素活性を著しく低下させた。Potts らは sorghum 幼苗の *cinnamic acid 4-hydroxylase* が p-ベンゾキノンによ、<sup>10)</sup> 効果的に阻害されることを報告し

ている。表には示さないが、0.2% (v/v) トリトン X-100 で活性は74%失活した。以上の結果は、ipomeamarone 15-hydroxylase がミクロソームの電子伝達系よりなる酵素であることを強く示唆している。すなわち、イポメアマロンが水酸化されてイポメアマロノールになる反応は、ミクロソームのチトクロム P-450 に依存した一原子酸素添加酵素により触媒されることを示唆している。

上記の示唆をより確かなものとするために、ipomeamarone 15-hydroxylase 活性における分子状酸素の役割、活性におよぼすCOの影響、その影響におよぼす光の効果について検討した(表4)。反応系の気相の $O_2/N_2$ 比を0.25(つまり空気の組成)から0.18、0へと減少させると、気相が空気の時の活性に対する相対活性は、それぞれ、90%、25%と減少した。この実験では、 $O_2/N_2$ 比が0の時25%の相対活性が検出されたが、これは反応系中の $O_2$ を $N_2$ で完全に置換できなから、たにめと思われる。

反応系中の  $O_2$  をより注意深く  $N_2$  で置換した別の実験では、全く活性がないことが確かめられた。よ、て、イポメアマロンからイポメアマロノールへの水酸化反応には、分子状酸素が必要であることがわかった。15%  $O_2$ 、85%  $N_2$  からなる気相の場合の酵素活性を100とした時、15%の  $N_2$  を  $CO$  で置換することでその相対活性は40に減少した。しかし、反応時間中反応液に光を照射しておくと、 $CO$  による阻害効果は緩和されその相対活性は78となった。この顕著な  $CO$  による阻害と光による阻害の緩和現象は、イポメアマロンからイポメアマロノールへの水酸化反応にヘム酵素が直接関与していることを示している。以上の結果により、ipomeamarone 15-hydroxylase はフラビン系の一原子酸素添加酵素ではなく、チトクロム P-450 関与の一原子酸素添加酵素であると判断した。

[ Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase の関係 ]

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* がチトクロム P-450 関与の一原子酸素添加酵素である。たのて、同じくチトクロム P-450 関与の一原子酸素添加酵素<sup>25)</sup>である *cinnamic acid 4-hydroxylase* と同じ酵素であるかどうかを調べた。すなわち、*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性におよぼす桂皮酸の効果と *cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性におよぼすイポメアマロンの効果を調べ、それぞれが拮抗的阻害を示すかどうかを調べた (表 5 と 6)。反応液が *ipomeamarone 15-hydroxylase* の基質として  $36 \mu\text{M}$  の放射性イポメアマロンを含んでいる時、基質の 28 倍の濃度に相当する桂皮酸 ( $1 \text{mM}$ ) を同時に添加してもほとんど酵素活性に影響を与えなかつた (表 5)。一方、*cinnamic acid 4-hydroxylase* の場合には、基質である放射性桂皮酸の濃度 ( $3.6 \mu\text{M}$ ) の約 30 倍以上の濃度のイポメアマロンで、その活性が阻害されることが観察された (表 6)。しかし、添加したイポメアマロンの濃度が基質の約 300 倍 (



1.0 mM) の時でも、その阻害度はわずか30%以下であった。以上の結果は、チトクロム P-450 が関与するこれら2種類の水酸化酵素は、互いに異なる酵素であり、同じタンパク質種ではないことを示唆している。言い換えれば、サツマイモ塊根組織には少なくとも2種類以上のチトクロム P-450 が存在することを示唆しているといえる。

[病傷害サツマイモ塊根組織における

ipomeamarone 15-hydroxylase 活性の変化]  
切断傷害を与えたサツマイモ塊根組織(傷害組織)および黒斑病菌を感染させた組織の罹病部に隣接する健全部位(病害組織)において、ipomeamarone 15-hydroxylase およびその他のミクロソームの酵素活性が切断後および感染後経時的にどのように変化するかを調べた(図9 A, B)。Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase の両活性は、共に新鮮組織では検出できなかった。しかし、両活性は病傷害両組織でほとん

ど潜伏期なしに急激に増大した。そしていずれの組織、いずれの活性の場合でも、1~1.5日で最大値に達し、それ以後は減少した。この減少速度は両活性の場合とも、病害組織の方が顕著であつた。病害組織における

*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性の最大値は傷害組織における<sup>(45)</sup>その約5倍であつた。この結果は、大羽らによつて報告された結果、すなわち *in vivo* でのイポメアマロンの代謝活性は病害組織よりも傷害組織の方が高いという結果と相反していた。この実験では、*cinnamic acid 4-hydroxylase* の極大活性は、病傷害両組織でほとんど相違がみられなかつた。しかし、実験によつては、病害組織の方が傷害組織よりも約3倍高い結果も得られている。第4章で述べる実験においては、後者の実験結果と符合する結果が得られているので、前者の実験結果はむしろ異例な結果であつたのかも知れない。

高等植物を含め種々の真核生物で、NADPH-

cytochrome c reductase およびアニチマイシン A-非感受性 NADH-cytochrome c reductase の両酵素は、ミクロソームの示標酵素として取り扱われており、実際にミクロソームにおける電子伝達系を構成する主要な成分である。この両酵素の活性は、病傷害両組織共に、1.0~1.5 日で極大に達し、その後徐々に減少した。Ipomeamarone 15-hydroxylase および cinnamic acid 4-hydroxylase の両活性は新鮮組織では検出されず、したがって、NADPH-cytochrome c reductase とアニチマイシン A-非感受性 NADH-cytochrome c reductase の両酵素については、比較的高い活性が検出された。なお、膜画分のタンパク質含量は病傷害両組織で増加し、その増加率は傷害組織よりも病害組織の方が高かった。

Table 1. Specific radioactivities of the product by recrystallization of 3,5-dinitrobenzoyl derivative

Recrystallization	Specific radioactivity (dpm/mg)
1st	453.6
2nd	455.8
3rd	455.9

Table 2. Effects of pyridine nucleotides on ipomeamarone 15-hydroxylase activity

Deletion	Addition	Relative activity <sup>b</sup> (%)
None (complete)	None	100
NADPH rgs <sup>a</sup>	NADPH (1 mM)	61
NADPH rgs	NADH (1 mM)	3
NADPH rgs	NADPH (1 mM) + NADH (1 mM)	87
NADPH rgs	NADP <sup>+</sup> (1 mM)	3
NADPH rgs	NADPH (0.5 mM)	43
NADPH rgs	NADH (0.5 mM)	3
NADPH rgs	NADPH (0.5 mM) + NADH (0.5 mM)	85
NADPH rgs	None	4

<sup>a</sup>NADPH rgs, NADPH regenerating system (1 mM NADP<sup>+</sup>, 2 mM glucose 6-phosphate and 0.3 unit glucose 6-phosphate dehydrogenase).

<sup>b</sup>The activity is expressed as percentage of the activity of the complete system, which is described under "Materials and Methods."

Table 3. Effects of reagents on ipomeamarone 15-hydroxylase activity

DTT and EDTA were removed from reaction mixtures.

Addition	Final concentration (mM)	Relative activity <sup>a</sup> (%)
None (complete)		100
KCN	1	148
$\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl	0.1	108
$\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl	1	106
<u>p</u> -Chloromercuri- benzoic acid	0.19	14
HgCl <sub>2</sub>	1	19
CuCl <sub>2</sub>	1	12
MgCl <sub>2</sub>	1	94
Cytochrome <u>c</u>	1	11
<u>p</u> -Benzoquinone	0.25	25
<u>p</u> -Benzoquinone	0.5	8

<sup>a</sup>The activity is expressed as percentage of the activity of the complete system.

Table 4. Inhibition of ipomeamarone 15-hydroxylase activity by carbon monoxide and its reversal by light

Gas mixture	Relative activity <sup>a</sup> (%)
Air	100
N <sub>2</sub> (100%)	25
O <sub>2</sub> (15%) + N <sub>2</sub> (85%)	90
CO (15%) + O <sub>2</sub> (15%) + N <sub>2</sub> (70%)	36
CO (15%) + O <sub>2</sub> (15%) + N <sub>2</sub> (70%) + light	70

<sup>a</sup>The activity is expressed as percentage of the activity of air control.

Table 5. Effect of cinnamic acid on ipomeamarone 15-hydroxylase activity

The reaction mixture contained 36  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]ipomeamarone as the substrate of ipomeamarone 15-hydroxylase. The reaction conditions are described under "Materials and Methods."

Addition	Final concentration (mM)	Relative activity <sup>a</sup>	
		Experiment 1 (%)	Experiment 2 (%)
None (complete)		100	100
Cinnamic acid	0.1		97
Cinnamic acid	0.5	93	95
Cinnamic acid	1.0		94

<sup>a</sup>The activity is expressed as percentage of the activity of the complete system.



Table 6. Effect of ipomeamarone on cinnamic acid 4-hydroxylase activity

The reaction mixture contained 3.6  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]cinnamic acid as the substrate of cinnamic acid 4-hydroxylase. Otherwise, the incubation conditions were the same as those for the experiments described in Table 5.

Addition	Final concentration (mM)	Relative activity <sup>a</sup>	
		Experiment 1 (%)	Experiment 2 (%)
None (complete)		100	100
Ipomeamarone	0.1	89	88
Ipomeamarone	0.5	76	88
Ipomeamarone	1.0	75	73

<sup>a</sup>The activity is expressed as percentage of the activity of the complete system.

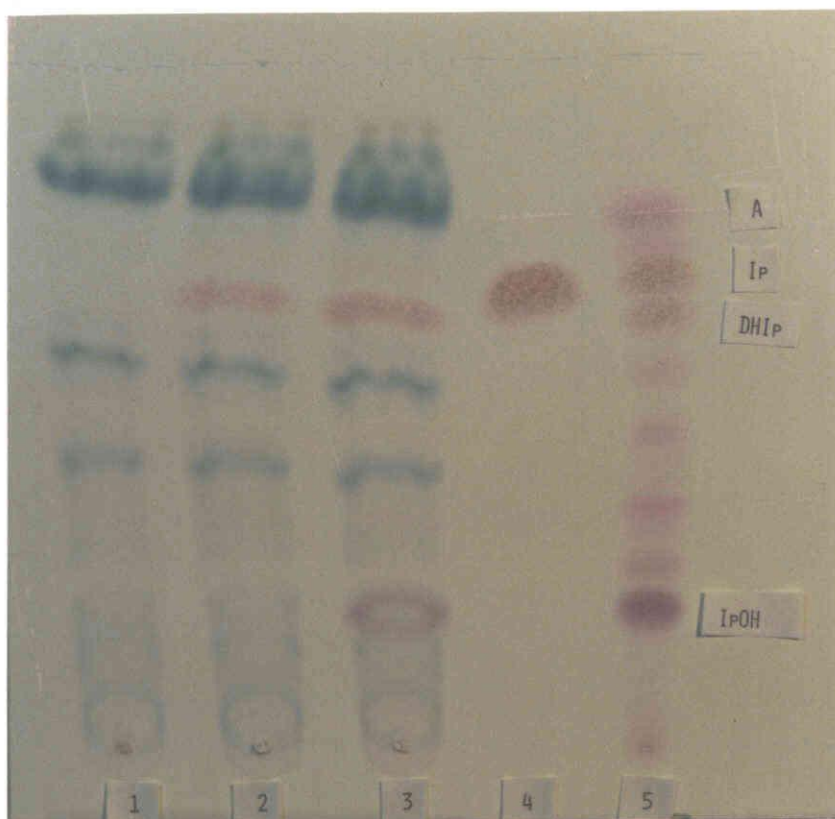


Fig. 5. Thin-layer chromatograms of the substances extracted with chloroform after incubation. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5: without substrate, with heated (100°C, for 10 min) enzyme, with enzyme (complete), ipomeamarone (Ip) itself (without incubation) and crude sesquiterpenes extracted from infected root tissue (without incubation), respectively. Spots in lane 1 were all lipids in the enzyme preparation. Visualized colors of Ip, ipomeamaronol (IpOH) and lipids were salmon orange, purple and blue, respectively, and effective for distinction of their substances. A and DHIP: component A and dehydroipomeamarone, respectively.

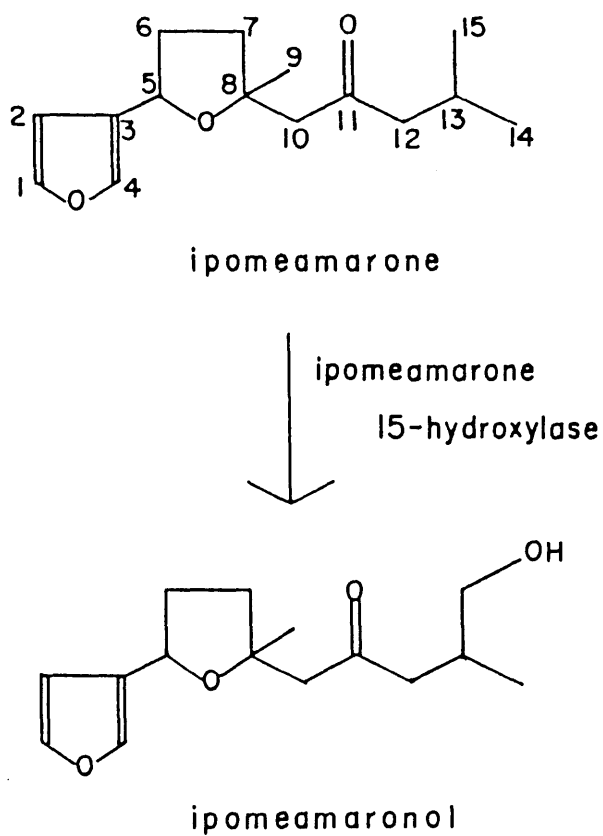


Fig. 6. Enzymic conversion from ipomeamarone to ipomeamaronol catalyzed by ipomeamarone 15-hydroxylase from cut-injured and Ceratocystis fimbriata-infected sweet potato root tissues.

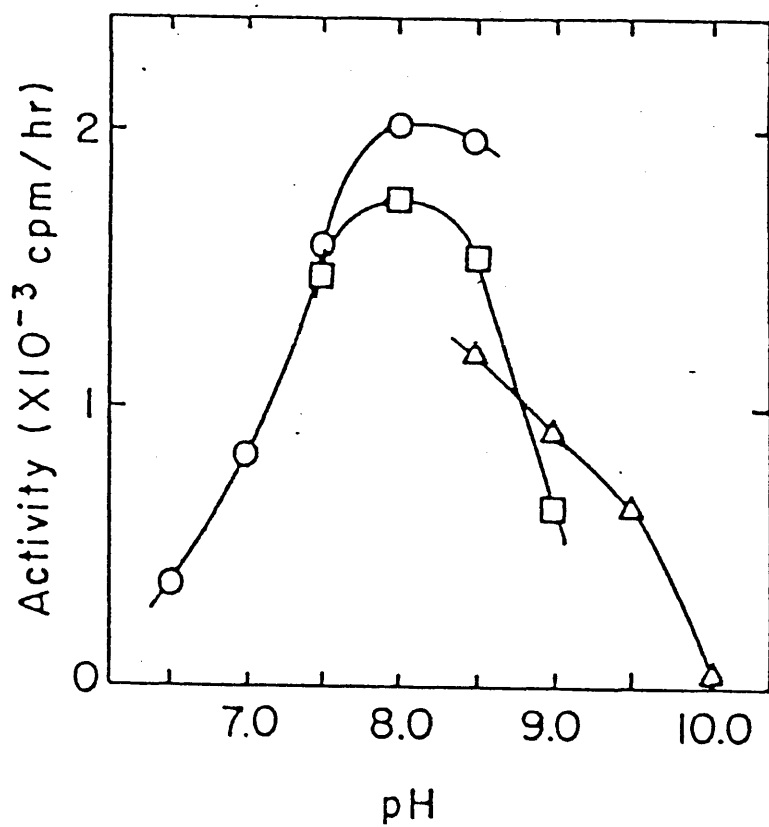


Fig. 7. Effect of pH on ipomeamarone 15-hydroxylase activity. The enzyme activity was assayed as described in "Materials and Methods" in following buffer solutions: ( O ), 50 mM potassium phosphate; ( □ ), 50 mM Tris-HCl; and ( Δ ), 50 mM glycine-KOH.

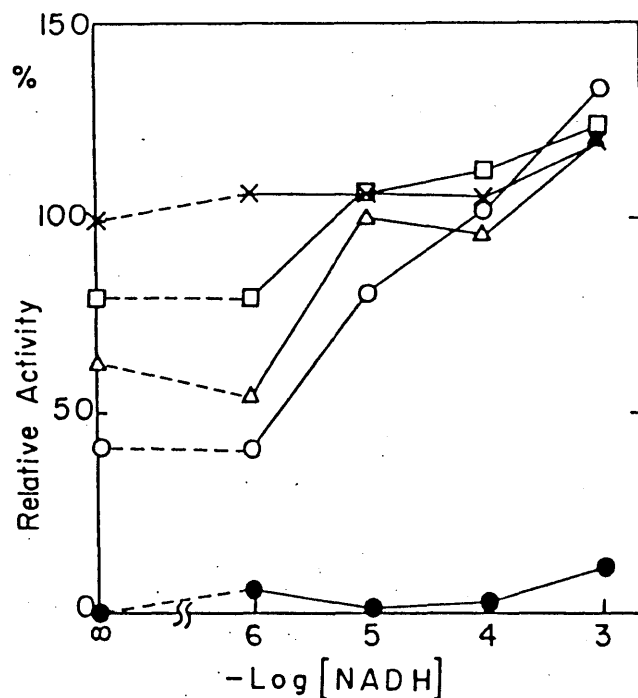


Fig. 8. Effect of combinations of NADPH with NADH on ipomeamarone 15-hydroxylase activity. Reactions were carried out as described in "Materials and Methods" in mixtures containing both NADPH and NADH which were in various concentrations as follows: (●), 0 M NADPH; (○), 1 μM NADPH; (Δ), 5 μM NADPH; (□), 10 μM NADPH; and (×), 1 mM NADPH. The concentration of NADPH is expressed, assuming that  $\text{NADP}^+$  added is immediately reduced to NADPH by glucose 6-phosphate dehydrogenase. The activity is expressed as percentage of activity with 1 mM NADPH and no NADH.

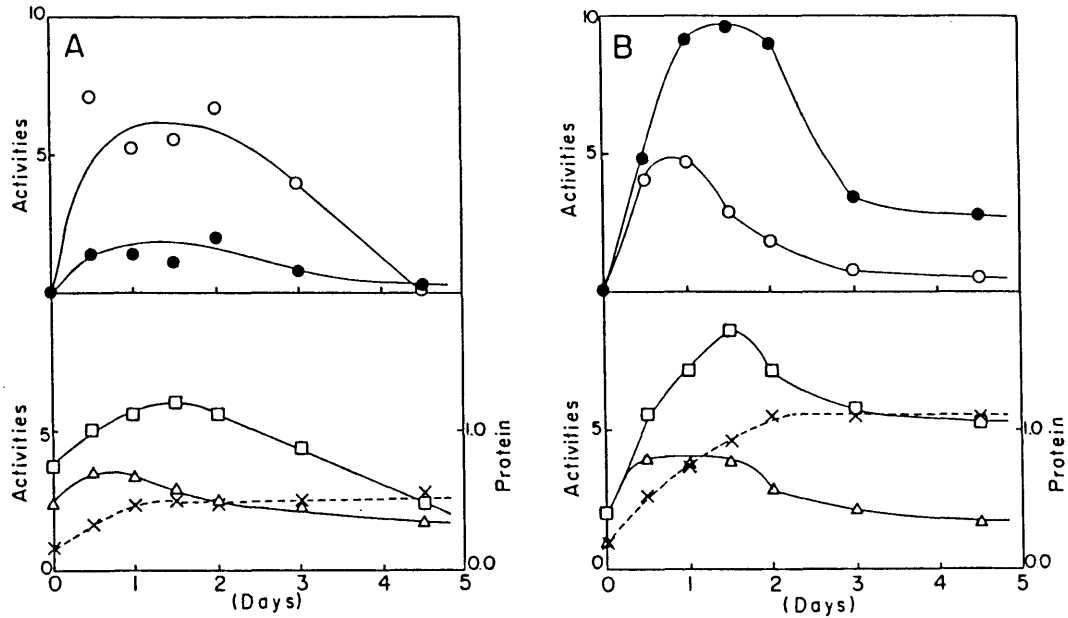


Fig. 9. Time courses of development of activities of ipomeamarone 15-hydroxylase and certain microsomal enzymes and protein content in tissues in response to cut-injury (A) and *Ceratocystis fimbriata* infection (B). The enzyme solution was prepared and the activities were assayed as described in "Materials and Methods." (●), ipomeamarone 15-hydroxylase activity (nmol/g tissue weight/h); (○), cinnamic acid 4-hydroxylase activity (nmol/g tissue weight/h); (Δ), NADPH-cytochrome c reductase activity ( $\Delta A_{550}$ /g tissue weight/min); (□), NADH-cytochrome c reductase activity ( $\Delta A_{550}$ /g tissue weight/min); (X), protein content (mg/g tissue weight).

## 第4節 考察

〔イポメアマロンの代謝に参与する酵素としての ipomeamarone 15-hydroxylase の同定〕

切断後1日間、30°Cでインキュベートしたサツマイモ塊根組織切片より調製した粗ミクロソーム画分を用い、イポメアマロンが代謝されるかどうかを調べたところ、*in vivo* で観察された代謝速度 ( $3 \sim 4 \text{ nmol/g.tissue weight}\cdot\text{h}$ ) に匹敵する速さ ( $2 \sim 3 \text{ nmol/g.tissue weight}\cdot\text{h}$ ) で代謝変換されることがわかった。サツマイモ塊根組織に直接放射性イポメアマロンを投与し、一定時間後の放射活性の行く方を見る *in vivo* <sup>55)</sup> でのトレーサー実験から、Burka と Kuhnert <sup>45)</sup> は 4-ヒドロキシマイオポロン、大羽らはイポメアマロノールに変換されると報告している。また最近、Schneider <sup>44)</sup> らは、病害サツマイモ塊根組織から新しく9種のセスキテルペンを検出し、そのうちのイポメアマロノライドがイポメアマ

ロンの代謝変換物質であるという可能性を示唆している。切断傷害サツマイモ塊根組織より調製した粗ミクロソーム画分を用いた本実験においては、反応生成物はTLCによる分画および誘導体の結晶化による同定からイポメアマロノールと断定され、4-ヒドロキシマイオポロンやイポメアマロノライドなどのその他の生成物は検出されなかった。

この *in vitro* でのイポメアマロンからイポメアマロノールへの代謝変換は、熱処理した粗ミクロソーム画分、NADPHを除去した反応系や0℃でのインキュベーションでは起こらなかった。また、反応生成量と反応時間、反応生成量と粗ミクロソーム画分量の間には、それぞれ定量性が成り立った。以上のことから、本実験において検出したイポメアマロンからイポメアマロノールへの転換反応は酵素反応であると判断した。そして、この反応ではイポメアマロンの15位の炭素が水酸化されることから、これを触媒する酵素を



ipomeamarone 15-hydroxylase と命名した。

イポメアマロンが *in vivo* で 4-ヒドロキシ  
シマイオポロン<sup>55)</sup> に代謝されると報告した Burka  
と Kuhnert の実験と本実験を比較し、本実験  
で 4-ヒドロキシシマイオポロンが検出できな  
か、た理由を考えこみると、次の4点が考え  
られる。第1に、Burka と Kuhnert は  $HgCl_2$   
で処理した組織切片を使用しているのに対し、  
本実験では切断傷害組織を用いたということ  
である。前者の組織では、3-hydroxy-3-  
methylglutaryl CoA reductase をはじめとする  
テルペン合成に携る諸酵素群が誘発されてお  
り、また実際にテルペンが蓄積する(第3章  
)。これに対し後者の組織では、数種のテル  
ペン合成に関与する酵素が検出されてはいる  
ものの、テルペン自体は全く蓄積しない。こ  
のように違、た外的刺激を与えられた組織の  
間で、イポメアマロンの代謝に関与する酵素  
群に相違があ、たとしてもそれほど驚くには  
値しない。後述(第3章)するが、各種の外

的刺激によ、て誘導蓄積されるテルペンは、単に量的のみならず、その組成の面においても違いがあることから考えても当然納得できることである。第2には、BurkaとKuhnertの実験では、イポメアマロンを組織切片に投与してから5日間もの長い間インキュベートして置くことである。しかも投与したイポメアマロンの約1%のみが4-ヒドロキシマイオポロンに変換されたにすぎない。すなわち、この代謝活性は極めて弱いものと推論される。第3には、イポメアマロンを4-ヒドロキシマイオポロンに変換する酵素が粗ミクロソーム画分以外の画分に局在するという可能性も否定できない。第4には、本実験で用いた反応条件が4-ヒドロキシマイオポロンに変換する酵素には適切でなか、たということも考えられる。たとえば補酵素の欠如、至適pHのずれなどが考えられる。

いずれにせよ、本実験でイポメアマロンを代謝する酵素の一つが初めて同定された。次

章で詳述するが、種々の外的刺激によ、サツマイモ塊根組織にイポメアマロノールが誘導蓄積されることからみこ、本研究で同定した *ipomeamarone 15-hydroxylase* が *in vivo* でのイポメアマロンの代謝で重要な働きを果たしていることは間違いない。また、本酵素はサツマイモ塊根組織のテルペン合成系でのファルネソール以降の代謝に関与する酵素<sup>23)</sup> としては、*dehydroipomeamarone reductase* について2番目に同定された酵素である。

### 〔*Ipomeamarone 15-hydroxylase* の性質〕

本実験は、*ipomeamarone 15-hydroxylase* がチトクロム P-450 関与の一原子酸素添加酵素であることを実証したといえる。

まず、*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性におよぼすピリジンヌクレオチドの効果調べた実験で、本酵素がチトクロム P-450 関与の酵素であることが強く示唆された。本酵素は NADPH 単独で酵素活性を十分発揮した。ただし、反応系に最終濃度  $1 \text{ mM}$  の NADPH を投与

するよりも  $1\text{ mM}$   $\text{NADP}^+$  を含んだ  $\text{NADPH}$  再生系を投与した方が高い活性が得られた。このことはイポメアマロンの水酸化による消費によつて  $\text{NADPH}$  が不足したためではない。なぜならば、イポメアマロン 1 分子の水酸化に 1 分子の  $\text{NADPH}$  が消費されるものと考えると、 $1\text{ mM}$  の  $\text{NADPH}$  は反応生成量の約 1,000 倍に相当するからである。おそらく、粗ミクロソーム画分中に混入していたミトコンドリアの断片によつて酸化されたためであろう。一方、 $\text{NADH}$  は、単独では ipomeamarone 15-hydroxylase に全く利用されなかった。しかし、 $\text{NADPH}$  の量が酵素活性を最大限に発揮させるほど十分でない場合には、 $\text{NADH}$  は本酵素活性を高める効果を示した。Cohenら<sup>56~58)</sup> および Hildebrandtら<sup>59)</sup> は、ウサギ肝ミクロソームのテトラロム P-450 関与の aminopyrine N-demethylase が  $\text{NADPH}$  で十分活性を示すが、 $\text{NADH}$  によつて活性化されることを報告している。<sup>53, 54)</sup> また Hasson と West は、高等植物で

ある Marah macrocarpus の未成熟種子のミクロソームに局在する *kaurene oxidase* について、同様な結果を報告している。

第1章で述べたように、チトクロム P-450 依存性電子伝達系は、ミクロソーム型とミトコンドリア内膜型（または細菌型）の2種に大別されている。前者は  $\text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{NAD(P)H-cytochrome P-450 reductase} \longrightarrow \text{cytochrome P-450}$ 、後者は  $\text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{NAD(P)H-ferredoxin reductase} \longrightarrow \text{ferredoxin} \longrightarrow \text{cytochrome P-450}$  という電子伝達系を形成している。上述のポリジシヌクレオチドの必要性および効果から判断して、*ipomeamarone 15-hydroxylase* はミクロソーム型に属するものと想定される。ミクロソーム型電子伝達系は単一電子伝達系と複合電子伝達系に分けられる（図4）。*Ipomeamarone 15-hydroxylase* が  $\text{NADH}$  によって活性化されるという事実は、この酵素がミクロソーム型複合電子伝達系に属していることを示唆している。複合電子

伝達系に関する概念は最初 Estabrook<sup>60)</sup>らによ  
 って提唱されたものである。その模式図を図  
 10に示す。チトクロム P-450 が基質、ついで  
 $O_2$  と結合し、反応生成物と水を放出するまで  
 の1回の catalytic cycle では2個の電子が必  
 要である。このうち、最初に受けとる電子は  
 $NADPH \longrightarrow NADPH\text{-cytochrome P-450 reductase}$   
 $\longrightarrow$  を経由する電子であり、次に受けとる電  
 子は  $NADH \longrightarrow NADH\text{-cytochrome } b_5 \text{ reductase}$   
 $\longrightarrow$   $cytochrome } b_5 \longrightarrow$  を経由する電子であ  
 る。ただし、2番目の電子については前者の  
 系からも供給される。また、 $NADPH\text{-}$   
 $cytochrome P-450 reductase$  とチトクロム  $b_5$  と  
 の間で両電子伝達系間の synergistic<sup>56)</sup> な相互作  
 用があることも報告されている。今回の実験  
 で、 $NADPH$  は単独で電子供与体となり得るが  
 $NADH$  は単独ではなり得ず、また  $NADPH$  が存  
 在する時に  $NADH$  が酵素活性を高める効果があ  
 るという結果が得られているが、このこと  
 は以上詳しく述べた複合電子伝達系という機

構でよく説明できる結果である。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* にミクロソーム型電子伝達系が関与しているということは、種々の化学物質の酵素活性への影響を調べた実験によりなお一層明らかとなった。チトクロム P-450 が関与する水酸化酵素の極めて一般的な特徴として、KCN では阻害されないという性質がある。これはヘム酵素では例外的な性質である。本酵素は KCN で阻害されず、かえ、て約 1.5 倍に活性化された。この活性化は、おそらく粗ミクロソーム画分に混入していたミトコンドリア破片による  $O_2$  消費が抑えられたことと、それに伴う NADPH の減少の抑制によるのであろう。さらに、本酵素は SH 酵素の典型的阻害剤である p-クロロマーキュリ-安息香酸によ、て強く阻害された。すなわち、 $0.19 \text{ mM}$  のこの阻害剤で 86% 阻害された。同じく SH 酵素の阻害剤である之種の重金属塩も  $1 \text{ mM}$  で p-クロロマーキュリ-安息香酸と同程度の阻害を示した。 $1 \text{ mM}$  の  $MgCl_2$

がほとんど活性に影響をおよぼさなかつたことから、この重金属塩の阻害作用はイオン強度によるものではないものと判断できる。これらのSH酵素阻害剤はNADPH-cytochrome P-450 reductase とチトクロム P-450 の両方を阻害しているものと考えられる。<sup>61)</sup> 西本と柴田はウサギ肝ミクロソームのNADPH-cytochrome P-450 reductase がその活性に密接に関連のあるSH基を有することを示しており、<sup>62)</sup> 羽生らはブタの同還元酵素を使いSH基がNADPHの結合に関係していることを示し、かつその付近のアミノ酸配列を決定している。また、チトクロム P-450 の活性中心であるヘム鉄の第5配座は、ペプチド鎖中のシステイン側鎖からくるチオレート基によることが、種々のモデル錯体を用いた研究により明らかとなり、<sup>63~65)</sup> さらには、芳香族化合物を基質とする水酸化反応の研究によつて、鉄-イオン結合の存在が反応に必須であることも明らかにされている。<sup>66)</sup> さらに、NADPH-cytochrome P-450 reductase から



電子を奪う非生理的電子受容体であるチトクロム c と p-ベンゾキノンは、ipomeamarone 15-hydroxylase 活性を抑制した。このことは、本酵素活性に、NADPH-cytochrome P-450 reductase からチトクロム P-450 への電子伝達系が必要であることを示唆している。

チトクロム P-450 関与の酸素添加反応は、分子状酸素の1個の酸素原子を基質に取り込みもう1個の酸素原子を水に還元する。本実験では、反応系中の酸素量を調節することによ、<sup>10</sup>マ、イポメアマロンに取り込まれる酸素原子は分子状酸素に由来することを示唆することができた。反応系中の酸素分子を注意深く窒素分子で置き換えると、ipomeamarone 15-hydroxylase はほとんど検出されず、<sup>15</sup>た。また15%の酸化炭素により活性が著しく抑制され、かつこの抑制は光照射により回復された。これらの事実は、ipomeamarone 15-hydroxylase 活性がチトクロム P-450 関与によることをより一層明確に示している。

以上のよう、ipomeamarone 15-hydroxylase はチトクロム P-450 関与の酵素であることがわかった。このため、以下、本酵素の諸性質を他のチトクロム P-450 関与の酵素と比較しながら説明していくことにする。まず、本酵素の至適 pH は 8.0 である。これは田中らによつて報告された、切断傷害サツマイモ塊根組織の cinnamic acid 4-hydroxylase の至適 pH と等しかつた。<sup>25)</sup> 一方、エンドウ幼苗と swede 根の cinnamic acid 4-hydroxylase、<sup>33)</sup> 発芽 Vicia faba の 16-ヒドロキシパルミチン酸の <sup>67)</sup> midchain hydroxylase はともに pH 7.5 である。発芽 Vicia faba の palmitic acid  $\omega$ -hydroxylase は Tris-HCl 緩衝液では pH 8.0、リン酸緩衝液では pH 7.0 と緩衝液の種類によつて異なつた至適 pH を示す。<sup>69)</sup> 本酵素の場合には、同じ pH においては Tris-HCl 緩衝液よりリン酸緩衝液での活性の方がやや高いものの、至適 pH に関しては両者でほとんど差異はみられなかつた。

次に、ipomeamarone 15-hydroxylase のイポメ

アマロシと NADPH に対する  $K_m$  値はそれぞれ約  $60 \mu\text{M}$  と約  $2 \mu\text{M}$  である。同じ切断傷害サツマイモ塊根組織における *cinnamic acid 4-hydroxylase* の NADPH に対する  $K_m$  値は  $1.8 \mu\text{M}$  と報告されている<sup>25)</sup>。この値は本酵素のそれにかかり近い値である。したがって、両水酸化酵素に同じまたはかなり性質の類似した NADPH-cytochrome P-450 reductase が関与しているものと推察される。動物肝における基質の水酸化の多様性はチトクロム P-450 の分子種の多様性によるものである。NADPH-cytochrome P-450 reductase には多様性はなく、単一種の酵素であるということが一般的見解となっている。

重要なことに、*ipomeamarone 15-hydroxylase* においても *cinnamic acid 4-hydroxylase* においても、イポメアマロシと桂皮酸は互いに拮抗し合わなかつた。このことは、両水酸化酵素は互いに独立したものであることを示している。すなわち、両水酸化酵素には、互いに

異なるチトクロム P-450 が関与しているものと決論できよう。チトクロム P-450 関与の水酸化酵素の基質特異性に関しては、動物や微生物を材料として極めて数多くの実験的事実が示されている。一般的傾向として、ステロイドホルモンの生合成をはじめとする生物本来の生合成に関与する酵素は基質特異性が狭く、薬物代謝をはじめとする生体外物質の代謝に関与する酵素は比較的それが広い。

<sup>10</sup> Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase はいわば前者に属しているものであり、このことからみてもこの実験結果は妥当なものであると考えられる。Burka と <sup>43)</sup> Thorsen によれば、イポメアマロンが合成されるためには少なくとも3段階の酸素添加反応を経なければならぬし、また Burka と <sup>55)</sup> Kuhnert によつて示唆されたイポメアマロンから 4-ヒドロキシマイオポロンへの反応もチトクロム P-450 関与の一原子酸素添加反応である可能性が強い。その他にも、病傷害サツ

マイモ塊根組織において生合成される酸素含有化合物は極めて多彩であり、それだけにこれらの生合成に関与する酸素添加反応、特にチトクロム P-450 が関与する反応は多様に存在するものと推論できる。従って、病傷害サツマイモ塊根組織においては分子多様な数多くのチトクロム P-450 の存在が十分期待できるといえよう。近年、チトクロム P-450 の精製方法が進歩し、種々の動物の種々の臓器より複数個のチトクロム P-450 が単離されている。特に、ウサギをはじめとする哺乳動物の肝臓においては、20種を越えるチトクロム P-450 の存在が示唆されるまでに<sup>38)</sup>なった。高等植物においては、チューリップ球根で単離されたチトクロム P-450 以外は<sup>39)</sup>その存在が示唆されていないに<sup>40)</sup>すぎず、チトクロム P-450 の分子多様性に関する正確な情報は今後の研究に委ねざるを得ないのが現状である。ただ、基質特異性や補酵素の要求性の違いによ<sup>70)</sup>り、Benvenisteら<sup>70)</sup>はエンドウ幼苗の lauric acid

$\omega$ -hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase、Hagmannら<sup>71)</sup> はパセリの培養細胞の flavonoid 3'-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase がそれぞれ独立した酵素であることを報告している。

〔病傷害刺激による ipomeamarone 15-hydroxylase の誘導〕

Ipomeamarone 15-hydroxylase 活性は新鮮ワツマイモ塊根組織では検出されなかった。組織が切断傷害または黒斑病菌の感染を受けると、この活性が出現し、かつ著しく増大した。病傷害両組織とも、1.0~1.5 日で最大に達しその後減少した。病害組織での活性は傷害組織での活性を常に上まわり、なお、前者の最大活性に対して後者の最大活性は約5倍であった。

イポメアマロン等のテルペンが全く合成されない傷害組織でも、テルペン代謝に関与する酵素の活性が誘導的に出現することは興味深い。イポメアマロンの合成の最終反応を触

23)

媒する *dehydroipomeamarone reductase* の活性も、同じように傷害組織で出現増大することがわかっている。傷害組織では、このようないくつかのテルペン合成系の酵素がある程度誘導されていて、病原菌の感染や  $HgCl_2$  での処理のようなより過酷な刺激に対する準備態勢がとられているのかも知れない。つまり、こうしたにより過酷な刺激に直ちに反応して、すみやかにイポメアマロンなどを合成蓄積できるようにしているのかも知れない。言い換えれば、テルペンの合成蓄積は、上述のようなより過酷な刺激によ、て誘導される限られた種類の酵素（例えば、 $3\text{-hydroxy-3-}$   
 $\text{methylglutaryl CoA reductase}$ ）によ、て制御されているのであろう。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* は、ポリフェノール化合物の合成系の酵素や *dehydro-*  
*ipomeamarone reductase* のように、切断傷害刺激によ、て誘導的にその活性が出現増大し、病原菌感染のようなより過酷な刺激によ、て

その増大が助長される酵素である。ただし、他のテルペン合成系の酵素の傷害組織での誘導と比べてみると、ipomeamarone 15-hydroxylase はほとんど遅延時間を待たずして活性が出現し増加する点で特徴がある。これはチトクロム P-450 系の酵素に特徴的なことなのかも知れない。というのは、同じ傾向の誘導が cinnamic acid 4-hydroxylase や NADPH-cytochrome P-450 reductase などの活性でもみられるからである。

大羽らは、黒斑病菌を感染させるか  $HgCl_2$  で処理したサツマイモ塊根組織でのイポメアマロンのイポメアマロノールへの *in vivo* 転換速度は、傷害組織での速度よりも遅いと報告している。そしてその結果から、イポメアマロンの水酸化反応は、テルペンの分解に重要な役割を担っているのではないかと結論している。黒斑病菌を感染させたサツマイモ塊根組織においては、最も多量に蓄積されるテルペンはイポメアマロンであるが、イポメア



マロノールも相当量蓄積される。イポメアマ  
ロンは黒斑病菌に対してだけでなく、サツマ  
イモ塊根組織<sup>15)</sup>それ自身にも毒性があるとされ  
ている。一方、イポメアマロノール<sup>47)</sup>もまたフ  
イトアレキシンである。本実験での

*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性が傷害組織より  
も病害組織の方が高いという結果を考えあわ  
せると、イポメアマロンからイポメアマロノ  
ールへの反応は、テルペンの分解に関与して  
いるというよりは、イポメアマロンと同時に  
イポメアマロノールも積極的に蓄積させるこ  
とに関与していると考えた方がよいように思  
われる。

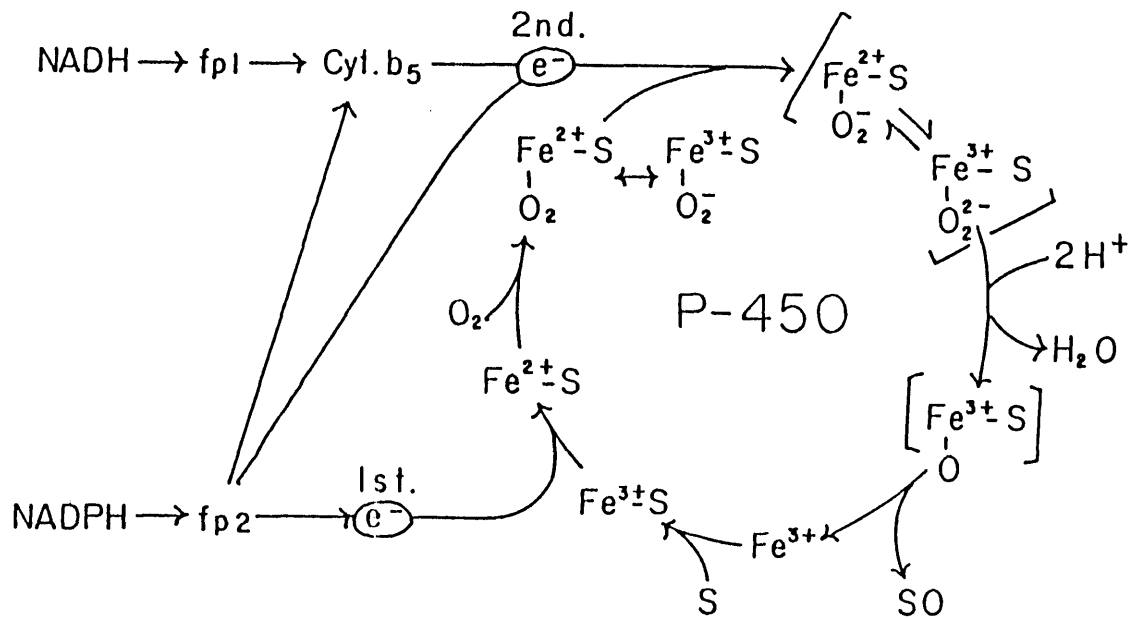


Fig. 10. Model of electron transport reactions associated with mixed function oxidase in mammalian liver microsomes. S: oxygenatable substrate;  $fp_1$ : NADH-cytochrome  $b_5$  reductase;  $fp_2$ : NADPH-cytochrome P-450 reductase.

### 第 3 章

サツマイモ塊根組織におけるチトクロム  
P-450 の外的刺激による誘導

#### 第 1 節 序論

サツマイモ塊根組織は黒斑病菌の感染<sup>3,4)</sup> やアリモドキゾウムシによる食害等の生物的刺<sup>72)</sup>激<sup>6)</sup> や  $\text{HgCl}_2$  処理をはじめとする化学的刺<sup>72)</sup>激を受けると、フラノセスキテルペン合成が誘発され、その被害部にイポメアマロンやイポメアマロノール等のサツマイモに特有なフィトアレキシンを蓄積する。このサツマイモ塊根組織に特有な、外的刺激により誘発的に出現し増大する二次代謝系を、酵素レベルで研究を進めるうえで  $\text{HgCl}_2$  処理は黒斑病菌の感染等のような生物間相互の作用からなる刺激に比べてはるかに単純でかつ簡便な、しかも定量性のある実験系として頻繁に用いられて

きた。というのも、 $\text{HgCl}_2$  処理は、切断傷害を与えた後1日間インキュベートした組織で行うと、潜伏期を経ずにフラノセスキテルペンを蓄積するからである。<sup>72)</sup>

$\text{HgCl}_2$  で処理したサツマイモ塊根組織を用いて Burka と Thorsen<sup>43)</sup> はイポメアマロン中の3個の酸素原子は分子状酸素由来であると報告した。また前章で述べたように、病傷害サツマイモ塊根組織でおこるイポメアマロンの15位の水酸化はチトクロム P-450 が関与していることが証明された。従って、イポメアマロノール中の4個の酸素原子は全てチトクロム P-450 により分子状酸素より導入されることが想定される。一方、ipomeamarone 15-hydroxylase<sup>23)</sup> は、dehydroipomeamarone reductase をはじめとするテルペン合成系に属し、多くの酵素と同様に、切断傷害や黒斑病菌の感染によって誘導される。これらのことを考えると、チトクロム P-450 も同様な刺激によって誘導される可能性が強い。

73~77)

動物では 3-メチルコラントレン<sup>75~81)</sup>、フェノバルビタール、 $\beta$ -ナフトフラボン<sup>82,83)</sup>をはじめとする薬物処理でチトクロム P-450 が顕著に誘導され、それゆえにチトクロム P-450 は誘導酵素として数多くの研究がなされている。最近には、また新たに抗生物質であるトリアセチルオレアンドマイシン<sup>84~86)</sup> がチトクロム P-450 の強力な誘導剤として脚光を集めつつある。しかし、高等植物では、その二次代謝系でチトクロム P-450 が重要な役割を演じていることが示唆されているにもかかわらず、チトクロム P-450 の誘導に関する研究例は極めて数少ない。高等植物の二次代謝系は必要に応じて出現し増大する場合が多いが、動物におけるチトクロム P-450 のように、果してそれに獲さわる高等植物のチトクロム P-450 も必要に応じて誘導されるのかどうかを検討することは極めて重要であると思われる。このことは、動植物間でのチトクロム P-450 の一般的性状の比較のみならず、高等植物自身

の生理学的立場に立、たチトクロム P-450 の存在意義を知るうえでも興味深いものである。

本章では、サツマイモ塊根組織を用い、外的刺激によ、チトクロム P-450 が誘導されることを述べる。外的刺激として、切断傷害、黒斑病菌感染および薬物処理を用いた。また、このチトクロム P-450 の誘導とフラノセスキテルペンの合成誘導の関連を解析した結果についても記述する。

## 第2節 材料および実験方法

## 〔植物材料〕

香川大学農学部附属農場で収穫されたサツマイモ塊根 (*Ipomoea batatas*、品種、高系14号) を使用した。使用直前まで  $12 \sim 15^{\circ}\text{C}$  で貯蔵しておいた。

サツマイモ塊根を流水で十分洗い、 $0.05\%$  の次亜塩素酸ナトリウムで15分間消毒した後、再度流水で十分洗浄した。その柔組織から厚さ  $1.0 \sim 1.5 \text{ cm}$  の輪切り切片を調製し、黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ell and Halst) の内生分生子を接種し、湿润条件下で  $29^{\circ}\text{C}$  にて1日間インキュベートした。インキュベーション後、罹病部に隣接した健全組織を  $1.0 \sim 1.5 \text{ mm}$  の厚さで切り取り、これを病害組織とした。黒斑病菌を接種せず、同様にインキュベーション後、厚さ  $1.0 \sim 1.5 \text{ mm}$  で切り取り、表面組織を傷害組織とした。また、インキュベートする前の柔組織を新鮮組織と称した。

薬物処理は以下のようにして行った。サツマイモ塊根柔組織から調製したディスク (16 × 3 mm) を 30°C の湿潤条件下で 24 時間、プラスチックの密封容器の中でインキュベートした。次に、40  $\mu$ l の 29 mM フェニルイソシアニドまたは蒸留水をディスクに施し、30°C の湿潤条件下で 1 時間インキュベートした。その後、種々の濃度に調製された 50  $\mu$ l の  $\text{HgCl}_2$  または  $\text{CdSO}_4$  水溶液を付与し、さらに同じ条件下で 24 時間インキュベートした。

### 〔ミクロソーム画分の調製〕

粗ミクロソーム画分の調製は第 2 章で述べたように行い、精製ミクロソーム画分の調製は以下のように行った。上記の方法で薬物処理した 40 個のディスクを蒸留水で表面を十分洗い、0.4 M スクロース、1 mM EDTA、10 mM KCl、1% (w/v) アスコルビン酸および 2 g ポリクラーラル AT を含む 80 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 中でおろし金を用いてま砕した。次に、それを 2 重のナイロンが



ーゼでこし、 $300 \times g$  で10分間遠心した。その上清を  $100,000 \times g$  で1.5 時間遠心にかけて、生じた沈殿を  $1 \text{ mM EDTA (pH 8.5)}$  を含んだ  $7 \text{ ml}$  の  $14\%$  ( $\text{w/v}$ ) スクロース溶液に懸濁した。その懸濁液を  $1 \text{ mM EDTA (pH 8.5)}$  を含んだ  $6 \text{ ml}$  の  $40\%$  ( $\text{w/v}$ ) スクロース溶液の上に載せ、日立 RPS 40-T ローターで  $25,000 \text{ rpm}$ 、1 時間遠心した。  $14\%$  と  $40\%$  ( $\text{w/v}$ ) スクロースの間の膜画分を分取し、これをミクロソーム画分とした。以上の操作は  $0-4^\circ \text{C}$  で行った。

#### [ ナトリウム P-450 の定量 ]

ミクロソーム懸濁液に少量のジテオナイトを添加して還元し、対照セルと試料セルに分注した。  $500 \sim 400 \text{ nm}$  間を自記分光光度計 (日立 556 型) で走査することにより基本線を決めた。次に、試料セル内溶液に2分間  $\text{CO}$  ガスを通気した後、同様に  $500 \sim 400 \text{ nm}$  間で差スペクトルを記録した。以上の操作は室温で行った。

差スペクトルからのチトクロム P-450 量の決定は大村と佐藤<sup>87)</sup>の方法に従い、モル吸光係数を  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  として算出した。

### 〔粗テルペン画分の調製〕

上述の方法で薬物処理した10個のディスクを20 mlのクロロホルム-メタノール(1:1、v/v)中で乳鉢と乳棒でまぜ砕し、ろ紙で自然ろ過した。残さは10 mlの上記のクロロホルム-メタノールで洗った。ろ液を合わせ、それに10 mlの蒸留水を加えて激しく振とうした。その後、クロロホルム層を分取し、それを減圧蒸留して粗テルペン画分を得た。

### 〔テルペンの定量〕

テルペン量は大羽<sup>72)</sup>らの方法に従い、イポアマロンを標準物質として測定した。粗テルペン画分を2 mlのエタノールに溶かし、それに1 mlの10% p-ジメチルアミノベンズアルデヒドのエタノール溶液と2 mlの40% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を添加した。30°Cで15分間インキ=ベーションした後、527 nmの吸収を測

定した。

〔タンパク質の定量〕

Lowry<sup>52)</sup>らの方法に従い、BSAを標準タンパク質として定量した。

## 第3節 実験結果

〔ミクロソーム画分のCO-差スペクトル〕

まず、サツマイモ塊根組織から抽出した粗ミクロソーム画分にCO結合性の色素が存在するかどうかを検討した。すなわち、健全な組織（新鮮組織）、切断傷害を加えた組織（傷害組織）および切断直後その表面に黒斑病菌を感染させた組織の罹病部に隣接する健全部位（病害組織）より粗ミクロソーム画分を調製し、これに還元剤（NADPHまたはジテオナイト）を加え、この還元型とこれにCOを結合させたものの間の400～500 nm 間の差スペクトルを測定した。図11に病害組織のCO-差スペクトルを示した。NADPHで還元した試料にCOを通したのちただちにCO-差スペクトルを測定したところ、453 nm へのみ吸収極大が検出された。同じ試料について、COを通してから数分後もう一度CO-差スペクトルを測定したところ、453 nm の外に、423 nm に

もう一つの吸収極大が検出され、この吸収極大の吸光度はCOを通してから時間が経つにつれて増大した。図11はCOを試料液に通してから約5分後に測定したものである。423 nmの吸収極大は453 nmの吸収極大の1.5倍に達している。ジチオナイトを還元剤として使用した場合には、453 nmの吸収極大の吸光度はNADPHを還元剤として使用した場合とあまり変わらなかつたが、423 nmの吸収極大はCO処理後ただちに出現し、その吸光度はNADPHを還元剤として加えた場合に比べ著しく大きかつた。また、500 nm以上の長波長領域を調べたところ、540と573 nmに弱い吸収極大が検出された(データ省略)。423 nmでの高い吸収極大と540と573 nmでの低い吸収極大は、他の植物種からの peroxidase のCO-差スペクトルでみられる吸収極大と非常によく対応している。<sup>88,89)</sup> サツマイモ塊根組織に peroxidase が存在することは、川島と瓜谷<sup>90,91)</sup> によつて既に報告されている。いずれにせよ、

CO-差スペクトルにおける453 nmの吸収極大はチトクロム P-450の Soret 帯によるものと結論される。すなわち病傷害サツマイモ塊根組織にチトクロム P-450が存在することが確認された。

上述のように測定したCO-差スペクトルでの453 nmの吸収極大の高さ<sup>87)</sup>から、チトクロム P-450の含量を大村と佐藤の方法に従い算出したところ、新鮮組織、傷害組織、病害組織で1 g新鮮重当りそれぞれ1.2、7.8、16 pmolであった。ただし、これらのチトクロム P-450含量の絶対値には多少向題があり、やや低めの値とは、<sup>88)</sup>こいるものと考えられる。というのは、これらの粗ミクロソーム画分のCO-差スペクトルには、440 nmに極小が存在するからである。この極小は、peroxidaseや混入して<sup>88)</sup>いるミトコンドリア破片中のチトクロムに由来して<sup>88)</sup>いるものと考えられる。しかし、新鮮組織、傷害組織、病害組織の順でチトクロム P-450含量が大きくな<sup>88)</sup>る、こ

とは間違いないようである。

以上のように粗ミクロソーム画分を用いてチトクロム P-450 を定量することには多少問題があつたので、粗ミクロソーム画分を不連続スクロース密度勾配遠心にかけて、ミトコンドリア破片などを含まない精製ミクロソーム画分を調製し、これを用いることにした。図18は病害組織の場合の CO-差スペクトルを示したもので、粗ミクロソーム画分で観察された 420 nm での吸収極大や 440 nm での吸収極小はほとんどみられなくなった。また、453 nm の吸収極大波長は 450 nm にかわつていた。以上のことから、精製ミクロソーム画分の CO-差スペクトルから計算した方が、より正確なチトクロム P-450 含量を求め得ると判断した。

### 〔薬物処理によるテルペンの誘導蓄積〕

生物全般に強い毒性を示すことが知られている  $\text{HgCl}_2$  と  $\text{CdSO}_4$  を、種々の濃度で、切断後1日間  $30^\circ\text{C}$  でインキュベートしたサツマイ

主塊根組織切片に与え、こうした薬物処理によ、どの程度テルペンが蓄積するかを調べた(図12、実線)。また、これらの薬物にフェニルイソシアニド<sup>92)</sup>を併用した場合についてもテルペン蓄積量を調べてみた(図12、点線)。

$HgCl_2$  または  $CdSO_4$  を単独で与えた場合には、同じ濃度では、常に  $CdSO_4$  よりも  $HgCl_2$  処理の方でテルペン蓄積量が大きかった。

$HgCl_2$  の場合には、 $1\text{ mM}$  ではほとんど未処理の場合と変わらなかつたが、それを臨界点として濃度を大きくしていくと著しいテルペンの蓄積が起こることが観察された。しかし、 $38\text{ mM}$  では、 $19\text{ mM}$  の場合よりもテルペンの蓄積量が少なかつた。これは  $HgCl_2$  の濃度があまりにも高いために組織の生命力自体が弱まったためであろう。 $CdSO_4$  の場合には、約  $5\text{ mM}$  までは未処理とほとんど変わらず、それを境としてテルペンの蓄積が増加していた。

$CdSO_4$  処理に際してフェニルイソシアニド



を併用しても、併用の効果は全くなかった。しかしながら、 $\text{HgCl}_2$  の場合には、フェニルイソシアニドの併用は、 $\text{HgCl}_2$  が低濃度の時にテルペンの蓄積量を著しく高める効果があった。  $\text{HgCl}_2$  の濃度が約 3 mM の時には、フェニルイソシアニドを併用すると、併用しない場合と比べて約 4 倍のテルペンが蓄積した。そして、フェニルイソシアニドを併用しなかった場合と同様に、約 20 mM の  $\text{HgCl}_2$  処理でテルペンの蓄積量は最大に達したが、その量はフェニルイソシアニドを併用しなかった場合と比べてはるかに多かった。なお、フェニルイソシアニドのみで処理した組織切片にはテルペンは集積しなかった。

次に、こうした薬物処理で誘導形成されたテルペン組成を TLC により調べた (図 13)。比較のため、病害組織からの粗テルペン画分も TLC にかけて (図 13、G)。この場合には、既に報告されているように、イポメアマロンとイポメアマロノールをはじめとする多数の

フラノセスキテルペンのスポットが検出された。また傷害組織では、全くフラノセスキテルペンが検出されなかつた(図13、A)。前にフェニルイソシアニドだけで処理した組織ではテルペンが蓄積しないことを述べたが、TLCでもテルペンが全く検出されなかつた(図13、B)。1% (w/v) の  $\text{HgCl}_2$  で処理した組織の場合には、病害組織の場合に比べてスポットの数が極めて少なかつた(図13、C)。相当量のイポメアマロノールが蓄積しているのに対して、イポメアマロンの蓄積が極めて少ないことは注目に値する。1% (w/v)  $\text{CdSO}_4$ 、1% (w/v)  $\text{CdSO}_4$  とフェニルイソシアニドの場合には、この傾向が顕著であり、イポメアマロンはほとんど検出されなかつた(図13、EとF)。一方、1% (w/v)  $\text{HgCl}_2$  にフェニルイソシアニドを併用して処理した組織では、病害組織の場合とよく似ていた(図13、D)。すなわち、イポメアマロンなどの比較的疎水性の高いテルペン成分も

顕著に蓄積していた。

〔薬物処理によるミクロソームタンパク質およびテトクロム P-450 の誘導増加〕

種々の外的刺激を加えたサツマイモ塊根組織からの精製ミクロソーム画分におけるタンパク質量、テトクロム P-450 含量およびその比含量について調べた結果を表りにまとめ示した。病害組織については、その被害部（この部分でテルペンを定量）と隣接健全部（この部分から精製ミクロソーム画分を調製）を適切に区別することが困難で、テルペン蓄積量とテトクロム P-450 含量の関係を調べるには不適當な組織であると考え、これを除いた。すなわちこの組織では、病菌がインキュベーションの日時とともにより内部に侵入してゆき、再現性ある確実なデータを得るためには、顕微鏡観察を伴う微細な検討を必要とするためである。

新鮮組織からの精製ミクロソーム画分のタンパク質量は、1g 新鮮組織重当り 0.213 mg

であつた。切断後2日間インキュベートした傷害組織では、このタンパク質量が2.3倍に増加してゐた。切断後のインキュベーションの途中でフェニルイソシアニドで処理した組織では、そのミクロソームタンパク質はこの薬物処理をしなかつた組織、つまり上記傷害組織のそれよりも僅かに高かつた。同様の傾向が $\text{HgCl}_2$ や $\text{CdSO}_4$ で処理した組織でも観察された。

新鮮組織のチトクロムP-450含量は、1g新鮮組織重当り2.74 pmolと極めて少なかつた(表7)。そして、切断傷害刺激により極めて顕著に増加し約13倍になつた(表7)。薬物処理組織では、その含量はさらに大きくなり、特に $\text{HgCl}_2$ にフェニルイソシアニドを併用した場合には、新鮮組織の含量の約43倍に達してゐた(表7)。ただし、フェニルイソシアニドのみで処理した組織の含量は傷害組織のそれとほぼ同じであつた。また $\text{HgCl}_2$ で処理した組織では、フェニルイソシアニド

を併用しようとしまいと、 $\text{CdSO}_4$  で処理した組織よりも高い値を示した。これらの傾向は上述したテルペン蓄積量に関する傾向と非常に類似していた。精製ミクロソーム画分のナトクロム P-450 の比含量に關してもまた、テルペン蓄積量との間に有意な相関性がみられ、フェニルイソシアニドの単独処理を除いては、薬物処理によって顕著に高くなった。

Table 7. Effects of treatments of tissue discs with chemicals on increases in cytochrome P-450 and microsomal protein during incubation of sweet potato root tissue discs

Discs	Microsomal protein (mg/g fr wt)	Cytochrome P-450 (pmol/g fr wt)	Specific cytochrome P-450 content <sup>d</sup> (pmol/mg protein)
Freshly prepared discs	0.213	2.74	12.9
Incubated discs <sup>a</sup>	0.500	37.0	74.1
Discs treated with <sup>b</sup>			
phenyl isocyanide	0.541	42.9	79.2
HgCl <sub>2</sub> <sup>c</sup>	0.538	88.6	165
HgCl <sub>2</sub> <sup>c</sup> and phenyl isocyanide	0.597	118.0	198
CdSO <sub>4</sub> <sup>c</sup>	0.481	57.1	119
CdSO <sub>4</sub> <sup>c</sup> and phenyl isocyanide	0.565	60.4	107

<sup>a</sup>The discs were incubated for 2 days without treatments.

<sup>b</sup>The discs pre-incubated for 1 day were applied by the chemicals indicated and further incubated for 1 day as described in the text.

<sup>c</sup>The concentration was 3.68 mM.

<sup>d</sup>The specific contents in the microsomes.

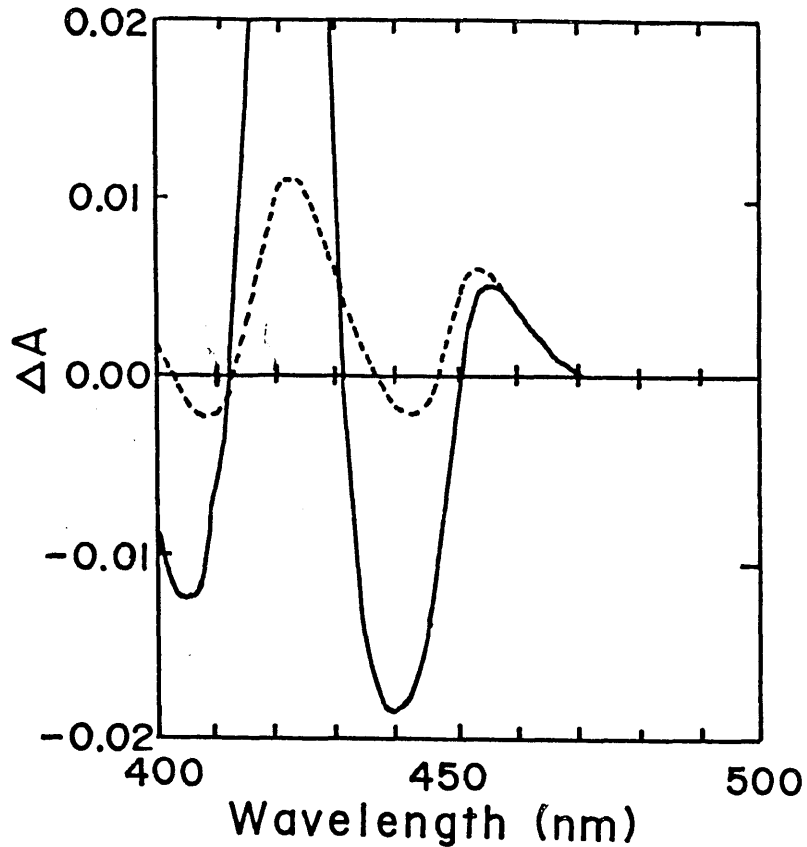


Fig. 11. CO difference spectra of a reduced microsomal fraction from diseased sweet potato root tissue. A crude microsomal fraction (10,000xg for 15 min; 100,000xg for 2 h) was prepared from diseased tissue taken from noninfected regions (1.0-1.5 mm thick) adjacent to infected regions of tissue blocks (1.0-1.5 cm thick) which had been inoculated with Ceratocystis fimbriata and incubated for 24 h at 29°C. The microsomal fraction (3.6 g tissue/ml, 2.4 mg microsomal protein/ml) added by NADPH-regenerating system (1 mM NADP<sup>+</sup>) was divided equally into two cells. Base line of equal light absorbance was first plotted, then CO was bubbled into sample cell for 2 min and difference spectrum (---) was recorded. After recording difference spectrum, a small amount of solid dithionite was added to both cells and difference spectrum (—) was again recorded.

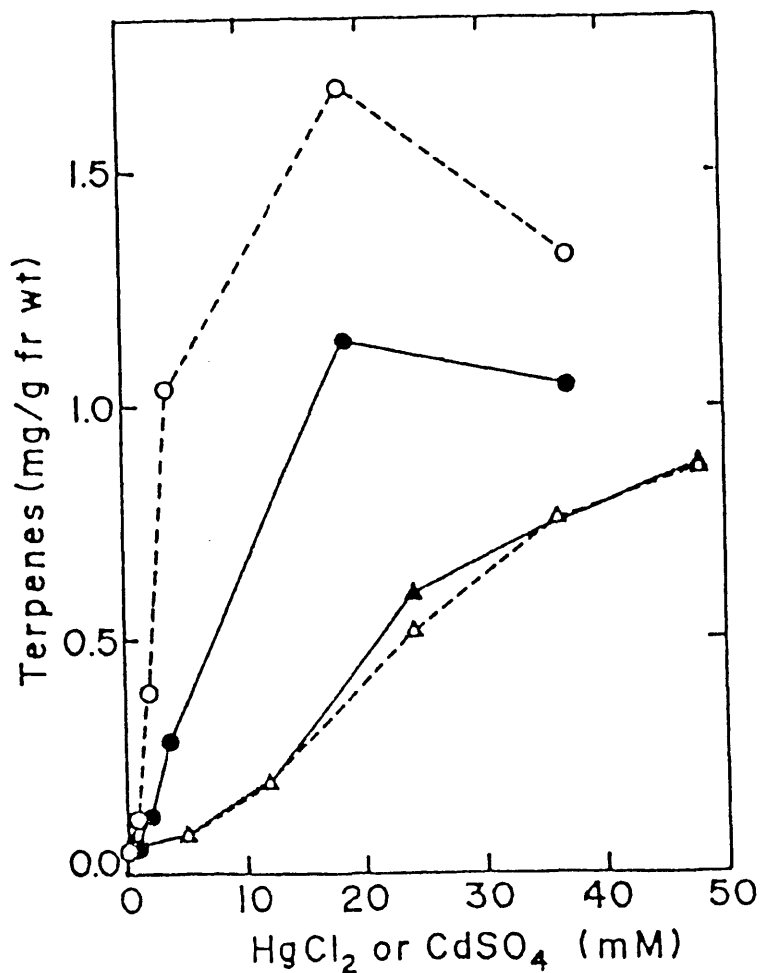


Fig. 12. Terpene accumulation in sweet potato root tissue discs treated with HgCl<sub>2</sub> or CdSO<sub>4</sub> together with or without phenyl isocyanide. One day-incubated discs treated with or without phenyl isocyanide were applied by HgCl<sub>2</sub> or CdSO<sub>4</sub> at the indicated concentrations as described in the text. (●), HgCl<sub>2</sub>; (○), HgCl<sub>2</sub> + phenyl isocyanide; (▲), CdSO<sub>4</sub>; (△), CdSO<sub>4</sub> + phenyl isocyanide.



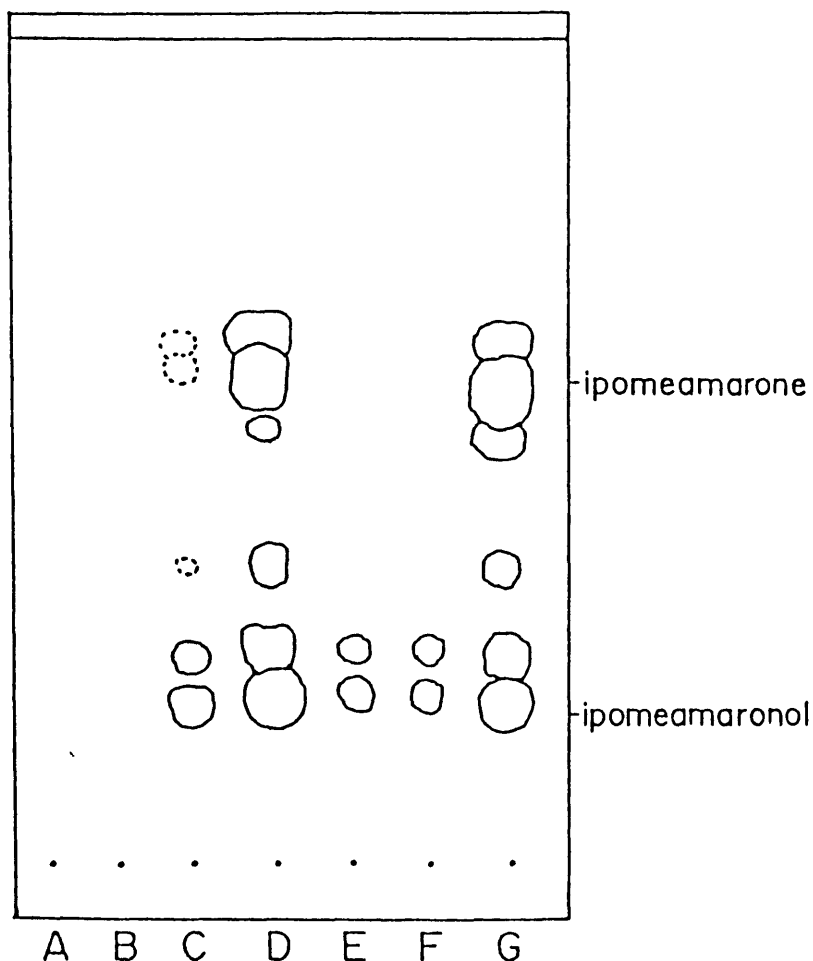


Fig. 13. Thin-layer chromatography of furano-terpenes in sweet potato root tissue discs received different treatments. A, control discs which were incubated for 2 days without treatment; B, discs applied by phenyl isocyanide; C, discs applied by  $\text{HgCl}_2$  (3.7 mM); D, discs applied by both  $\text{HgCl}_2$  (3.7 mM) and phenyl isocyanide; E, discs applied by  $\text{CdSO}_4$  (4.4 mM); F, discs applied by both  $\text{CdSO}_4$  (4.4 mM) and phenyl isocyanide; G, *Ceratomyces fimbriata*-infected tissue. The crude terpene oils obtained from 1 g discs were applied to the TLC plate for A-F, and 0.15 mg of the oil was for G. The plate was developed with *n*-hexane-ethyl acetate (8:2, v/v) and sprayed with Ehrlich's reagent. ○, spots colored strongly; ⊙, spots colored weakly.

## 第4節 考察

〔薬物処理によるテルペンの誘導蓄積について〕

種々の高等植物においてフィトアレキシシンの合成の誘導に  $HgCl_2$  がエリシターとして用いられている。例えば、ジャガイモ塊茎のリシテン<sup>93)</sup>、大豆子葉のグリセロリン<sup>94)</sup>、インゲン子葉のファゼオリン<sup>95)</sup>、エンドウ子葉のピサチン<sup>95,96)</sup> が  $HgCl_2$  で誘導されることが報告されている。サツマイモ塊根においても  $HgCl_2$  処理により、イポメアマロンをはじめとするフラノセスキテルペンに分類される種々のフィトアレキシシンの形成が誘導されるが<sup>44)</sup>、この処理は本実験における有力な *strategy* となった。さらに周期表において  $Hg$  と同じ族に位置し、生物学的に強い毒性を持つ、重金属である  $Cd$  の塩も、テトクロム P-450 の阻害剤であるフェニルイソシアニドを併用し、 $HgCl_2$  や  $CdSO_4$  を用いると両者のテルペン形成の誘導におよ

ばす影響に明らかに差がみられ、前者の場合には著しいテルペン形成の誘導が観察された。薬物を複数併用させる処理は一般には実験結果の解析を複雑にしがちであるが、本実験で併用させたフェニルイソシアニドは単独ではテルペンの形成を誘導しなかつたので、比較的解析しやすい実験系となつた。以上のよう  
に、これらの3種の薬物を組み合わせた処理はサツマイモ塊根組織に種々の程度のテルペン形成の誘導を起こしえた。

$\text{HgCl}_2$  および  $\text{CdSO}_4$  によつて誘導蓄積するのはイポメアマロノールを主とする比較的極性の大きいテルペンであつた。ところが、 $\text{HgCl}_2$  処理にフェニルイソシアニドを併用してテルペンの誘導蓄積量を増加させると、イポメアマロンをはじめとする比較的極性の小さいテルペンの蓄積が顕著になり、黒斑病菌の感染により蓄積したテルペンの組成と類似するようになった。おそらくこれらの処理の違いからくる蓄積テルペンの組成の違いは、

アセチル CoA からイポメアマロンまでの合成速度とイポメアマロンからイポメアマロノールへの代謝速度のバランスの違いによるのであろう。つまり、 $\text{HgCl}_2$  または  $\text{CdSO}_4$  単独で処理した組織では前者の速度が律速になっているが、 $\text{HgCl}_2$  にフェニルイソシアニドを併用して処理した組織や病害組織では前者の速度が後者の速度を僅かに上さわるのであろう。

これらの薬物による種々の程度のテルペン形成の誘導の差および蓄積するテルペンの組成の違いがいかなる理由によるかについては、それらの誘導機構に関する知見があまりにも乏しいために解説が極めて困難である。今後これらの誘導の程度の差および生合成産物の組成の違いを考慮しつつ、テルペン合成に係わる酵素の誘導の度合を調べてゆけば、テルペンの合成と蓄積の調節機作を酵素レベルで理解することが可能になるであろう。

〔チトクロム P-450 の CO-差スペクトル〕

動物肝ミクロソームから単離されたチトク

ロム P-450 の CO-差スペクトルでの Soret 帯の吸収極大は  $447 \sim 451 \text{ nm}$  であることが示されている。サツマイモ塊根組織からの粗ミクロソーム画分を用いた実験においては  $453 \text{ nm}$  で吸収極大が観察された。しかも、その吸収スペクトルは対称性を欠き、ジチオナイトで還元した時には  $440 \text{ nm}$  に強い負の吸収がみられた。これは先にも述べたように、試料中にミトコンドリア破片が混入していたためと思われる。スクロース密度勾配遠心で精製したミクロソーム画分を用いると、 $450 \text{ nm}$  付近に吸収極大をもち、しかもその吸収スペクトルは大体対称で、 $440 \text{ nm}$  での負の吸収も無視できる程度となった。従って、チトクロム P-450 を正確に定量するためには、こうした精製ミクロソーム画分を用いる必要があると結論できる。

粗ミクロソーム画分を NADPH で還元して CO-差スペクトルをとってみたところ、 $423 \text{ nm}$  に吸収極大が出現し、その強度は時間が

経つにつれて徐々に大きくなり、ていつた。一方、ジチオナイトを還元剤として用いた場合には、NADPHの場合に比べて極めて高い吸収極大が観察された。また、540と573 nmにも小さな吸収極大が検出できた。これらの吸収極大は他の生物で報告された peroxidase の吸収極大に相当する。以上の結果は、NADPHで還元される peroxidase が存在する可能性を示唆している。<sup>88,89)</sup> サツマイモ塊根組織の peroxidase については川島と瓜谷<sup>90,91)</sup> が詳しく研究し、その存在は疑う余地がない。また、Murphy と West<sup>32)</sup> は、上記とよく似た結果を報告している。CO-差スペクトルでのこうした peroxidase の関与も、精製ミクロソーム画分を用いると無視できるようになった。

〔外的刺激によるチトクロム P-450 の誘導〕  
 粗ミクロソーム画分を用いてチトクロム P-450 含量を調べたところ、病害組織が最も高く、次いで傷害組織が高く、新鮮組織が最も低かった。これは ipomeamarone 15-hydroxylase

の各組織における活性と高い相関性を示した。しかし、これらの組織におけるチトクロム P-450 含量は ipomeamarone 15-hydroxylase に関与したチトクロム P-450 を直接反映している<sup>43)</sup>とは言い難く、Burka と Thorsen の報告から推測されるイポメアロン合成に関与する三つの酸素添加酵素やポリフェノール合成系に含まれている cinnamic acid 4-hydroxylase に関与するチトクロム P-450 の総和を反映しているものと考えられる。ただし、次章で述べるが cinnamic acid 4-hydroxylase は endoplasmic reticulum には局在しておらず、粗ミクロソーム画分で占める割合は小さいと考えられる。

サツマイモ塊根組織におけるテルペンの合成とチトクロム P-450 の関係を見る場合、黒斑病菌の感染後の経時的変化を見る方法を用いるのは必ずしも適切ではないと考えた。なぜならば、黒斑病菌の菌糸は随時内部組織に伸長していくのをご長期間の経時的変化を見る場合には罹病部とそれに隣接する健全組織の

区別が困難になるからである。そこでそれに代わる方法として  $\text{HgCl}_2$  をはじめとする薬物処理を用いた。

テルペンの合成を伴わない切断傷害処理によってもチトクロム P-450 は有意に増加したが、 $\text{HgCl}_2$  および  $\text{CdSO}_4$  による処理、さらにそれらにフェニルイソシアニドを併用させた処理は著しくチトクロム P-450 を誘導した。薬物処理による高等植物チトクロム P-450 の誘導に關しては、*Jerusalem artichoke* 塊茎でマンガン、エタノール、フェノバルビタールおよび除草剤がミクロソーム画分のチトクロム P-450 量を増加させるという報告がある<sup>41,42)</sup>。特に、 $25 \text{ mM MnCl}_2$  と  $10 \mu\text{M FeCl}_2$  で処理すると、 $268 \text{ pmol/mg protein}$  によりチトクロム P-450 の比含量が増加しており、これは水処理の約 7 倍の値で、極めて顕著な誘導であるといえよう。サツマイモ塊根組織を用いた本実験においては、 $\text{HgCl}_2$  にフェニルイソシアニドを併用させて処理した場合がも、と



もチトクロム P-450 含量が高くな、たが、そのミクロソームタンパク質 / mg 当りの含量は約 200 pmol であ、た。これは高等植物で<sup>97)</sup>最高値を与えているチューリップ球根の 200 ~ 400 pmol / <sub>41)</sub>mg protein と上述した Jerusalem artichoke<sup>塊茎</sup> の 268 pmol / mg protein に次ぐ値であ、た。

新鮮組織において僅かではあるがチトクロム P-450 が検出され、テルペン合成を伴わない傷害組織においても有意なチトクロム P-450 が確認されたが、薬物処理によ、てより顕著に誘導されたチトクロム P-450 量は、それぞれの組織に蓄積するテルペン量と極めて高い相関性を示した。このことはテルペン合成にチトクロム P-450 が密接に関与していることを物語るものである。そして、動物のみならず植物においてもチトクロム P-450 の誘導性は共通な特質であると考えられる。そしてこの誘導性がその関与する代謝系の調節で一役を担、ていることを想像させるもので

ある。

チトクロム P-450<sup>92)</sup>の特異的阻害剤であるフェニルイソシアニドの  $\text{HgCl}_2$  との併用がチトクロム P-450 量だけでなく、テルペンの蓄積量を著しく増加させたことについてはまだ正確な解釈ができない。しかし一つの可能性として、フェニルイソシアニドによ、 $\text{Hg}^{2+}$  が  $\text{Hg}$  に還元され、この  $\text{Hg}$  が  $\text{Hg}^{2+}$  よりもより強い誘導性を示したためとも考えられる。なぜならば、フェニルイソシアニドは  $\text{CdSO}_4$  に関してはなんら影響を示さなかつたためである。一方、フェニルイソシアニド処理によ、ミクロソームのチトクロム P-450 の CO-差スペクトルのパターンになんらの変化ももたらさなかつた。このことを考えると、フェニルイソシアニドが細胞内に取り込まれたとは考えにくい。従、<sup>72)</sup> また、大羽らが報告したシクロヘキシミドの効果のようにテルペンの分解系の抑制も考えがたい。もし、フェニルイソシアニドの影響が  $\text{Hg}^{2+}$  を  $\text{Hg}$  に還元することに

よるののであれば、 $Hg^{2+}$  と  $Hg$  の間にはテルペン  
およびナトクロム P-450 の誘導機構において  
いかなる違いがあるのか、今後の興味深い課  
題となるであろう。

## 第 4 章

病傷害サツマイモ塊根組織における 2 種のチトクロム P-450 依存水酸化酵素 — ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase — 間の細胞内局在性の相違

## 第 1 節 序論

チトクロム P-450 とそれが関与する水酸化反応などを触媒する酵素活性が、哺乳動物、魚類、甲殻類、細菌類、カビ類、高等植物等広く生物界全般にわたって検出されてきている。哺乳動物などでの研究から、チトクロム P-450 のほとんどは endoplasmic reticulum に存在することがわかっているが、より詳細な臓器特異性や細胞内局在性に関する研究によつて、この外にも原形質膜（小腸の微絨毛膜）、核膜、ゴルジ装置膜、ミトコンドリア内

膜、ペルオキシゾーム膜など種々の細胞オルガネラの膜に存在することも判明してきている<sup>98,99)</sup>。高等植物においては、チトクロム P-450 の含量が動物に比べてかなり低いこともあって、その細胞内局在性についての精密な研究は少なく、ほとんどの研究は粗雑な細胞分画による実験からそれがミクロソーム画分に存在することを示唆している程度にとどまっていた。しかも、こうした研究でのミクロソーム画分とは、必ずしもミクロソームのみを含む画分を意味するものではなく、むしろその他のオルガネラ膜も含むものである。従って、高等植物細胞内におけるチトクロム P-450 の局在性については、より精密な研究が必要であるといえる。

切断傷害サツマイモ塊根組織の *cinnamic acid 4-hydroxylase* もやはり上で述べた意味<sup>25)</sup>でのミクロソーム画分に存在する。田中らは、このミクロソーム画分のスクロース密度勾配遠心後のこの活性の分布が NADPH-cytochrome

*c* reductase 活性のそれと必ずしも一致しないことを見出し、この水酸化酵素は *endoplasmic reticulum* とは違、たオルガネラに存在するものと想定した。一方、その他の高等植物を用いた研究では、*cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性を含め、チトクロム P-450 関与と考えられている酵素活性のほとんどは、種々の細胞画分で NADPH-cytochrome *c* reductase 活性の分布と類似していることが示されてきた。<sup>35, 68, 100~103)</sup>

こうした研究結果および動物肝のチトクロム P-450 およびその諸関連酵素活性が一般に *endoplasmic reticulum* に局在していることが考えあわされて、田中ら<sup>25)</sup>の結果はその信ぴょう性に大きな疑問がもたれたままになり、ていた。最近にな、る *Catharanthus roseus* のチトクロム P-450 関与の酵素であるモノテルペン水酸化酵素は *endoplasmic reticulum* 以外の細胞内オルガネラの膜に局在することが示された。<sup>104)</sup> 田中らがオルガネラの標識酵素として NADPH-cytochrome *c*

reductase と cytochrome c oxidase のみを調べているのに対し、Catharanthus roseus の場合には9種のオルガネラの標識酵素が参照されており、かつまた細胞分画後の活性画分のオルガネラの形態が電子顕微鏡により観察されている、その信ぴょう性は極めて高いものである。ただ、Catharanthus roseus のモノテルペン水酸化酵素はプロバキューオールに局在していると報告されているが、この点に関してには確実だとは言いきれない。

第2章において、病傷害サツマイモ塊根組織には、チトクロム P-450 関与の水酸化酵素である ipomeamarone 15-hydroxylase が存在することを述べた。この章では、本酵素と同じ組織に存在するもう一つのチトクロム P-450 関与の水酸化酵素である cinnamic acid 4-hydroxylase の細胞内局在性について調べた結果について述べる。

## 第2節 材料および実験方法

### 〔植物材料〕

名古屋大学附属農場で秋収穫されたサツマイモ塊根 (*Ipomoea batatas*、品種、高系14号) を使用直前まで13~16℃で貯蔵しておく。使用に際して、サツマイモ塊根を水で十分洗い、その柔組織から輪切り切片(厚さ5mm)を調製した。その切断面に第2章で述べたように黒斑病菌の内生分生子懸濁液を塗布し、湿潤条件下30℃にて目的時間インキュベートした。輪切り切片より罹病表面を除去し、残りを病害組織として使用した。黒斑病菌を接種しないと同様に調製した組織を傷害組織として使用した。

### 〔細胞分画〕

100gの輪切り切片を0.5M スクロース、1mM EDTA、10mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、1% (w/v) イソアスコルビン酸と7gのポリクラールATを含む130mlの50mM Tris-



HCl 緩衝液 (pH 8.5) 中でプラスチック製のおとし金により擦り下ろした。そのまま碎液を2重のナイロンガーゼでこし、ろ液を  $300 \times g$ 、10分間遠心した。上清を 0.5 M スクロース、1 mM EDTA、10 mM KCl、3 mM  $MgCl_2$  と 1 mM メルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で前もって平衡化させるおいたセファデックス G-25 カラム (全ベッド容: 500 ml) にかけて、同じ緩衝液で溶出した。溶出したタンパク質画分を粗抽出液とした。

病害組織からの粗抽出液を  $10,000 \times g$  で10分間遠心し、沈殿を先に述べたセファデックス G-25 の平衡化緩衝液で 5 ml に懸濁した (10 K 沈殿画分)。上清はさらに  $100,000 \times g$  で2時間遠心し、その沈殿を同様に懸濁した (10 K - 100 K 沈殿画分)。

スクロース密度勾配遠心で分画する場合には、傷害または病害組織からの粗抽出液を  $100,000 \times g$  で2時間遠心し、その沈殿を1

mM EDTAを含む 5 ml の 16% (w/v) スクロース液に懸濁した (100 K 沈殿画分)。この 100 K 沈殿画分を 1 mM EDTA (pH 8.5) を含む 3 ml の 70% (w/v) スクロース液 (クッション) の上に、1 mM EDTA (pH 8.5) を含む 28 ml の 16 から 60% (w/v) 直線密度勾配 スクロース液をのせた遠心溶液上へのせ、日立 RPS 27-2 ローターを用いて 24,000 rpm で 5 時間遠心した。その後この遠心溶液を等量に分画した。

以上の操作は 0 から 4 °C で行った。

[ 酵素活性の測定 ]

Cinnamic acid 4-hydroxylase 活性—— 第 2 章で述べた方法に従って測定した。ただし、反応生成物の分離にはペーパークロマトグラフィーの代わりに ITLC-SA 板によるクロマトグラフィーを行った。その展開にはベンゼン-酢酸 (1:4、v/v) を用いた。

Ipomeamarone 15-hydroxylase と NADPH-cytochrome c reductase 活性—— それぞれ第 2

章で述べた方法に従って測定した。NADPH-cytochrome *c* reductase は endoplasmic reticulum の標識酵素とした。

Cytochrome *c* oxidase 活性——前島と旭<sup>105)</sup>の方法により測定した。0.1% (w/v) トリトン X-100 を含む 30 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 150  $\mu$ l に 1 mg/ml の還元型テトクロム *c* 100  $\mu$ l と酵素液 50  $\mu$ l を添加し、25 $^{\circ}$ C で反応させた。活性は還元型テトクロム *c* の酸化による 550 nm の吸収の減少により測定した。本酵素はミトコンドリアの標識酵素とした。

Phosphorylcholine-glyceride transferase ——<sup>106)</sup> Londらの方法に従い測定した。100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0)、20 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM 1,2-ジパルミチンおよび 0.1  $\mu$ Ci [メチル-<sup>14</sup>C] CDP コリン (40 Ci/mol) を含む反応液に酵素液を加え、最終容量を 0.5 ml とし、30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。2 ml のエタノールを加えて反応を停止させ、エタノール可溶物を回

収した。不溶物をエタノールで2回洗浄し、完全にエタノール可溶物を回収した。このエタノール溶液に3mlのクロロホルムを添加し、5mlの2M KClと5mlの蒸留水でそれぞれ2回ずつ洗浄した。減圧蒸留によりクロロホルムを除去し、残留物における放射活性を<sup>49)</sup> Bray's solution 中で測定した。本酵素は endoplasmic reticulum の標識酵素<sup>107)</sup> とした。

Glucan synthetase I — Ray の方法に従い<sup>107)</sup> 測定した。200 mM  $MgCl_2$  と 17.5 Ci [ $^{14}C$ ] UDPG (260 Ci/mol) を含んだ 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 40  $\mu$ l に 100  $\mu$ l の酵素液を添加し、25°C で15分間反応させた。1mlの70%エタノールを加えて反応を停止させた後、50 mM  $MgCl_2$  を 50  $\mu$ l、熱処理した10-100 K 沈殿画分 150  $\mu$ l (4g の組織からの画分に相当) を添加し、激しく攪拌し、ついで1分間煮沸した。一昼夜4°Cで静置後、1,000 $\times$ g で5分間遠心した。沈殿を1mlの70%エタノール<sup>49)</sup> で4回洗い、その沈殿を Bray's solution に懸濁し

て放射活性を測定した。本酵素をゴルジ装置の標識酵素とした。

Glucan synthetase II ——— <sup>107)</sup> Ray の方法に従い測定した。1.75 mM の放射性を持たない UDPG と 17.5 nCi [<sup>14</sup>C] UDPG (260 Ci/mol) を含んだ 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 40  $\mu$ l に 100  $\mu$ l の酵素液を添加し、25°C で 15 分間反応させた。その後 glucan synthetase I の場合と同様にして反応生成物を抽出し、その放射活性を測定した。本酵素は原形質膜の標識酵素とした。

Catalase ——— <sup>108)</sup> Lücke の方法に従い測定した。67 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 2.48 ml に 20  $\mu$ l の酵素液と 62.5 倍に希釈した特級の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 500  $\mu$ l 添加し 25°C で反応させた。活性は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の分解による 240 nm の吸収の減少により測定した。本酵素はミクロボデーの標識酵素とした。

〔チトクロム P-450 の定量〕

チトクロム P-450 は、<sup>87)</sup> 大村と佐藤の方法に

従、第3章で述べたようにして定量した。

### 〔タンパク質の定量〕

タンパク質は Lowry<sup>52)</sup>らの方法に従い、BSAを標準タンパク質として定量した。

### 〔RNAの定量〕

RNA量は、以下のように調製したRNA抽出液の260 nmの吸光度から算出した。蒸留水で容量を1 mlにした試料に1 mlのフェノールを添加し、攪拌後3,000 rpmで2.5時間遠心し、水層を分取した。これに蒸留水を加えて2 mlにし、5 mlのエタノールを添加して1昼夜4℃で静置した。60 mgのNaClを添加し、-20℃で4時間放置後3,000 rpmで15分間遠心して沈殿を得た。この沈殿を風乾し、さらにN<sub>2</sub>気流にて完全に乾固させた。この乾固物を2 mlのSSC (0.15 M NaCl, 0.015 M グエン酸ナトリウム)に溶解し、そのうちの1 mlをとり、これに2.5 mlのエタノールを加えた。-20℃で一晩放置後、沈殿を上述のように遠心で集め、N<sub>2</sub>気流にて乾固

した。この最終沈殿を 1 ml の SSC に溶解し、この溶液の 260 nm での吸光度を測定した。RNA の濃度は Fleck と Munro<sup>109)</sup> らの方法に従い  $\text{RNA} (\mu\text{g}/\text{ml}) = 132 A_{260}$  により算出した。

〔電子顕微鏡による観察〕<sup>110)</sup>

まず、Karnovsky の方法に従って固定した試料の薄片を 2% ウラニル酢酸<sup>111)</sup> で染色した。その後 Reynolds のクエン酸鉛液で 2 重染色を行い、日立 HU-12A 電子顕微鏡により観察した。

### 第3節 実験結果

#### 〔細胞分画の条件決定〕

まず、病害サツマイモ塊根組織からミクロソームを分離するための細胞分画法について検討した。この組織を、pHが8.5と7.5の2種のま碎液（“材料および実験方法”参照）を用い、ウォーリングブレンダーにて最高速度で30秒間、2回ま碎し、 $300 \times g$  10分間の遠心上清を $100,000 \times g$ で2時間遠心し、膜画分を調製した。そしてこの膜画分を直線スクロース密度勾配遠心（“材料および実験方法”参照）にかけた。いずれのpHのま碎液を用いても、70%（w/v）スクロースクッション上に茶褐色の凝集体（おそらく膜の凝集物）が沈降していた。Endoplasmic reticulumの標識酵素としてNADPH-cytochrome c reductase、ミトコンドリアの標識酵素としてcytochrome c oxidaseの両活性分布を調べたところ、前者の活性は35%（w/v）以上の濃度のスクロ



一ス画分に、後者の活性は40-50% (w/v) のスクロース濃度の画分に、それぞれ比較的に広く分布していた。すなわち、こうした条件ではミクロソームなどのオルガネラは相当破損されるようであった。そこでこうした破損を極力抑えるために、江坂と旭<sup>112)</sup>がミクロボディ-の分離に際して使用した組織マ碎法(おろし金によるマ碎法)を適用してみた。この方法で調製した膜画分を前述のようなスクロース密度勾配遠心にかけてところ、褐色の凝集体は観察されず、また NADPH-cytochrome c reductase と cytochrome c oxidase の両活性は、それぞれ20-35%および45-50% (w/v) のスクロース濃度の画分に集在していた。すなわち、この組織からミクロソームを分離するに当っては、組織をウォーリングブレンダーよりもおろし金でマ碎する方がよいことがわかった。

一方、ミクロソームから結合型ポリソームが脱落するのを防ぐ目的で、スクロース密度

勾配中に 3 mM の  $Mg^{2+}$  を存在させしてみた。しかし、こうした  $Mg^{2+}$  添加はかえって非特異的なオルガネラ向の凝集をひきおこし、不適當であることがわかった。そこで以下の実験では、 $Mg^{2+}$  を含まず、1 mM EDTAのみを含むスクロース密度勾配を用いることにした。後述するが、少なくともこの材料の場合には、スクロース密度勾配中に  $Mg^{2+}$  が存在していなくても、ミクロソームからのポリソームの離脱はほとんど起こらないようであった。

[病害組織の 10 K と 10 K - 100 K 沈殿画分における ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase 活性の分布における違い]

病害組織のすり碎物の 300 × g 10 分間の遠心上清を、分画遠心によつて、10 K と 10 K - 100 K 沈殿画分に分画した。そして ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase 活性の両画分への回収状況を調べた(表 8)。Ipomeamarone 15-hydroxylase

活性は 10 K と 10 K - 100 K 沈殿画分に 1:1.6 の割合で分布していた。これに対し、*cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性は 1:0.37 で分布していた。こうした分布の違いから、両水酸化酵素は細胞内局在性を異にしているものと考えられた。

〔病害組織の 100 K 沈殿画分の直線スクロース密度勾配遠心後の *ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性の分布の違い〕

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* が互いに細胞内局在性を異にしていることを立証するために、病害組織から得た 100 K 沈殿画分を直線スクロース密度勾配遠心にかけて分画し、両酵素活性の分布を比較検討した。

まず、タンパク質に関しては、スクロース密度勾配遠心後二つの主要なピークが存在していた(図14)。その一つは密度が  $1.09$  から  $1.14 \text{ g/cm}^3$  にかけてかなり広い画分に分布し

ており、もう一方は密度が  $1.19 \text{ g/cm}^3$  の所に鋭いピークとして分布していた。RNAは軽い方のタンパク質のピークとほぼ同様な分布をしていた(図14)。また、NADPH-cytochrome *c* reductase 活性も軽い方のタンパク質ピーク、つまりRNAピークと非常によく似た分布をしていた(図15)。これらの結果から、軽い方のタンパク質ピークはリボソームが結合したミクロソーム(粗面ミクロソーム)の画分であると考えられた。興味深いことに、典型的なミクロソームの標識酵素と考えられている phosphorylcholine-glyceride transferase 活性のピークは、軽い方のタンパク質ピークとは一致せず、このタンパク質ピークの軽い方の半分(密度が  $1.09 - 1.11 \text{ g/cm}^3$ )にかたよって存在していた(図15)。このように、phosphorylcholine-glyceride transferase 活性がかたよって分布をしているのは、タンパク質ピークの重い方半分にこの酵素の阻害物質が存在しているためとも考えられる。そこで、

このタンパク質ピークの軽い方と重い方の両画分を混合し、その活性を測定してみたところ、両画分のそれぞれの活性の和に等しかつた(表9)。つまり、阻害物質が存在するという可能性は否定された。これらの結果から、病害サツマイモ塊根組織の *rough-surfaced endoplasmic reticulum* は不均一で、少なくとも二種類が存在するものと推定した。一方、重い方のタンパク質ピークは *cytochrome c oxidase* の活性分布と一致しており、ミトコンドリア画分であると判断した。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性は密度が  $1.10$  から  $1.14 \text{ g/cm}^3$  の位置にピークを形成していた(図15)。つまり、軽い方のタンパク質のピークの重い方半分に偏在していた。このことから、*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性に関するチトクロム P-450 は、*phosphorylcholine-glyceride transferase* をもっていない *rough-surfaced endoplasmic reticulum* に局在しているものと考えた。一方、

cinnamic acid 4-hydroxylase 活性は、密度が  
 1.17 から 1.19  $g/cm^3$  の位置に大きなピーク、  
 1.12 から 1.14  $g/cm^3$  に小さなピークとして検  
 出された (図15)。小さい方の活性ピークは  
 ipomeamarone 15-hydroxylase 活性ピークとほぼ  
 一致していた。一方、大きな活性ピークは、  
 phosphorylcholine-glyceride transferase、  
 cytochrome c oxidase、glucan synthetase  
 I と II、catalase のいずれの活性分布とも一  
 致していなかった。ただし、この活性ピーク  
 は、NADPH-cytochrome c reductase 活性の分  
 布での肩に相当しているように見えた。

[ 傷害および病害組織の 100 k 沈殿画分の直  
 線スクロース密度勾配遠心後の cinnamic  
 acid 4-hydroxylase 活性の分布 ]

Cinnamic acid 4-hydroxylase は、黒斑病菌  
 の感染だけでなく、切断傷害によっても誘  
 導されることが知られている。そこで、病傷  
 害両組織でこの酵素の細胞内局在性に相違が  
 あるかどうかを検討した (図16)。傷害組織

からの 100 k 沈殿画分をスクロース密度勾配遠心にかけてところ、cinnamic acid 4-hydroxylase 活性は、病害組織の場合の主要活性ピークの部分にのみ存在していた。すなわち、病害組織の場合の小さい方の活性ピークは病害刺激によ、てのみ出現する活性ピークであることが示唆された。そこで感染後 0.5 日目と 1 日目の病害組織について、cinnamic acid 4-hydroxylase の細胞内局在性を比較検討した。その結果、主要な活性ピークの総活性は両病害組織でほとんど変わらないのに対し、小さい方の活性ピークの総活性は感染後 1 日目の組織の方が 0.5 日目の組織よりも 2 倍以上に大きかった。このことは、小さい方の活性ピークが病害刺激によ、て誘導されるものであるという想定をますます強めさせた。

〔Ipomeamarone 15-hydroxylase および cinnamic acid 4-hydroxylase の両活性画分の電子顕微鏡による観察〕

直線スクロース密度勾配遠心後の cinnamic

acid 4-hydroxylase 活性の主要なポーグ画分を蒸留水にて約4倍に稀釈し、遠心により、膜を回収したところ、その沈殿は茶褐色と白色の二つの部分に分かれていた。そこでそれぞれを分取し、電子顕微鏡で膜の形態を観察した。茶褐色の沈殿の場合には、発達したクリステ構造をもつミトコンドリアが多数混在していた(図17B)。一方、白色沈殿部においては、1重膜で、大きさが不均一な顆粒が観察できた(図17C)。

スクロース密度勾配遠心後の ipomeamarone 15-hydroxylase の活性画分を同じように電子顕微鏡で観察したところ、表面にリボソームが多数付着している顆粒が多数認められた。従って、この画分は rough-surfaced endoplasmic reticulum 由来の粒子画分であると判断した(図17A)。

以上の結果は ipomeamarone 15-hydroxylase 活性画分と cinnamic acid 4-hydroxylase 活性の主要活性画分に存在する膜は、互いに形態



を異にしていることを示している。すなわち、この形態観察によ、て両酵素が互いに細胞内局在性を異にしていることが確認された。

〔直線スクロース密度勾配遠心後のテトクロム P-450 の分布〕

直線スクロース密度勾配遠心によ、て得られた粗面ミクロソーム画分は、典型的なテトクロム P-450 の CO-差スペクトルを示した(図18)。450 nm での吸収極大は対称的な形を示し、かつ 420 nm における吸収は 450 nm の吸収に比べて僅かであった。このテトクロム P-450 による吸収は粗面ミクロソーム画分に相当するタンパク質ピーク領域全般にわた、て存在していた(図19)。一方、

*cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性の主要ピーク画分においては、その存在を確認することができなかつた(図19)。このことは、テトクロム P-450 含量が極めて少ないことにも起因しているが、同時に混在するミトコンドリアによ、て CO-差スペクトルからのテトクロ

△ P-450 の定量を不確実にさせているためとも考えられた。

5

10

15

5

10

15

Table 8. Distributions of ipomeamarone 15-hydroxylase and cinnamic acid 4-hydroxylase activities between the 10K and 10K-100K pellet fractions from diseased tissue

Fraction	Ipomeamarone 15-hydroxylase (pmol/h/g fr wt)	Cinnamic acid 4-hydroxylase (pmol/h/g fr wt)	Cytochrome <u>c</u> oxidase (nmol/min/g fr wt)	Protein (mg/g fr wt)
10K pellet	103	770	1.01	0.72
10K-100K pellet	167	283	0.22	1.12

Table 9. Phosphorylcholine-glyceride transferase activity in a mixture of the light and heavy microsomal fractions

Fraction <sup>a</sup>	Activity	
	Experiment 1 (pmol/h)	Experiment 2 (pmol/h)
Fraction 8 (10 $\mu$ l)	370	388
Fraction 12 (10 $\mu$ l)	127	142
Fraction 8 (10 $\mu$ l) + Fraction 12 (10 $\mu$ l)	527	535

<sup>a</sup>Fractions after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction from diseased tissue (cf. Fig. 15).

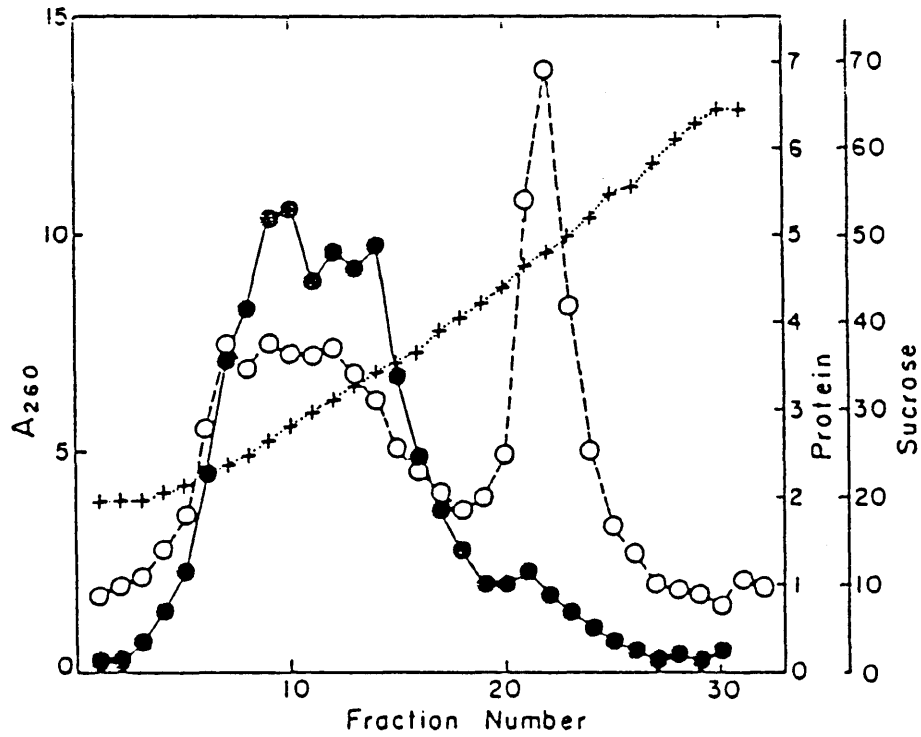


Fig. 14. Distributions of protein and RNA after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction from diseased tissue. ( O ), protein in mg/ml; ( ● ),  $A_{260}$ ; ( + ), sucrose in w/v.

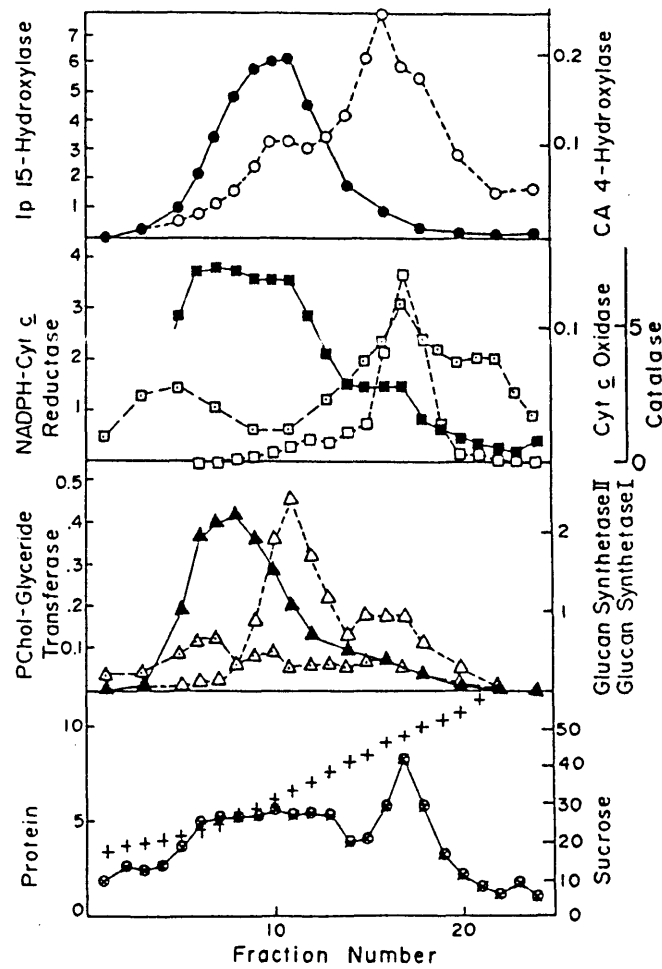


Fig. 15. Distributions of enzyme activities after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction from diseased tissue. (O), cinnamic acid 4-hydroxylase activity in nmol/h/0.5 ml; (●), ipomeamarone 15-hydroxylase activity in nmol/h/0.5 ml; (□), cytochrome c oxidase activity in  $\mu\text{mol}/\text{min}/10 \mu\text{l}$ ; (◻), catalase activity in  $\mu\text{mol}/\text{min}/20 \mu\text{l}$ ; (■), NADPH-cytochrome c reductase activity in nmol/min/10  $\mu\text{l}$ ; ( $\Delta$ ) and ( $\triangle$ ), glucan synthetase I and II activities, respectively, in pmol/min/50  $\mu\text{l}$ ; ( $\otimes$ ), protein in mg/ml; (+), sucrose in w/v.

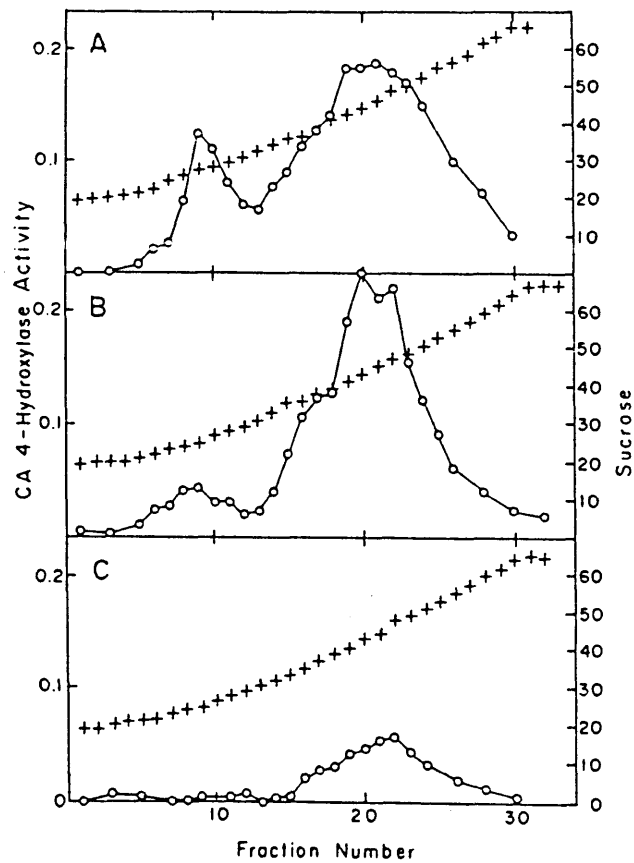


Fig. 16. Distribution of cinnamic acid 4-hydroxylase activity after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fractions from diseased tissues incubated for 1 day (A) and 0.5 day (B) after inoculation with Ceratocystis fimbriata and wounded tissue (C). (O), activity in nmol/h/0.1 ml; (+), sucrose in w/v.

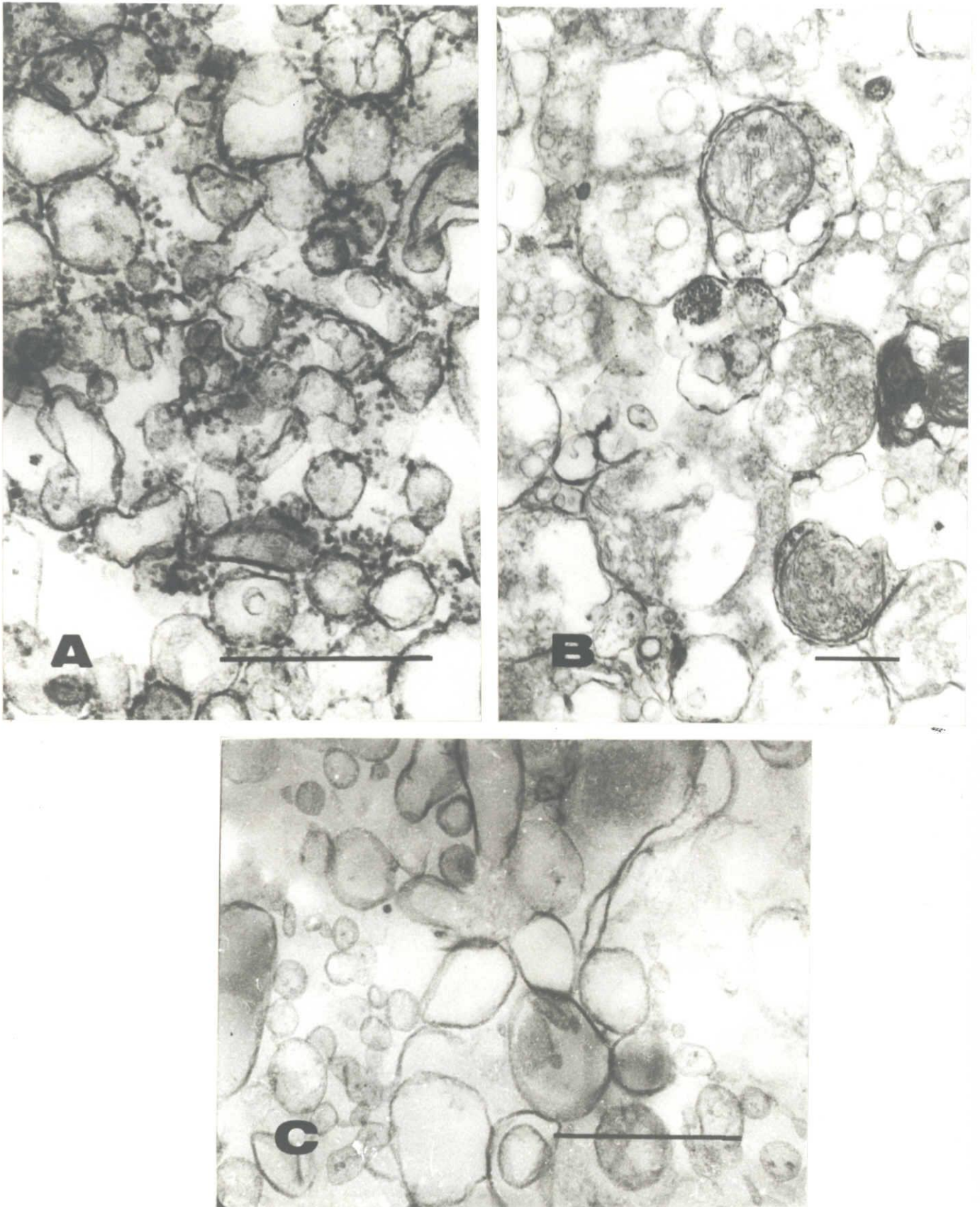


Fig. 17. Electron microscopic pictures of the peak fractions of ipomeamarone 15-hydroxylase (A) and cinnamic acid 4-hydroxylase (B and C) activities after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction from diseased tissue. Bars show 0.5  $\mu\text{m}$ .



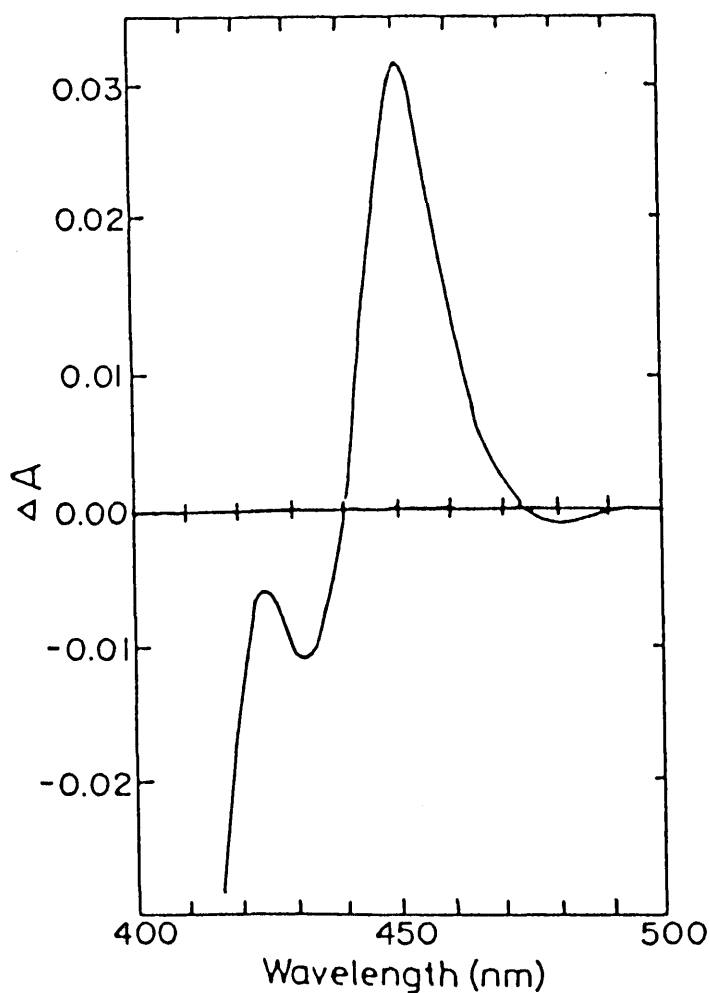


Fig. 18. Difference spectrum of CO-bound minus CO-unbound forms of dithionite-reduced microsomal fraction from diseased tissue. The microsomal fraction was prepared by centrifugation at 24,000 rpm for 1 h of the 10K-100K pellet fraction on a discontinuous sucrose density gradient composed of 14 ml each of 16 and 40% (w/v) sucrose solutions containing 1 mM EDTA (pH 8.5) in a Hitachi RPS 27-2 rotor. The fraction used for taking the spectrum contained 8.2 mg protein/ml.

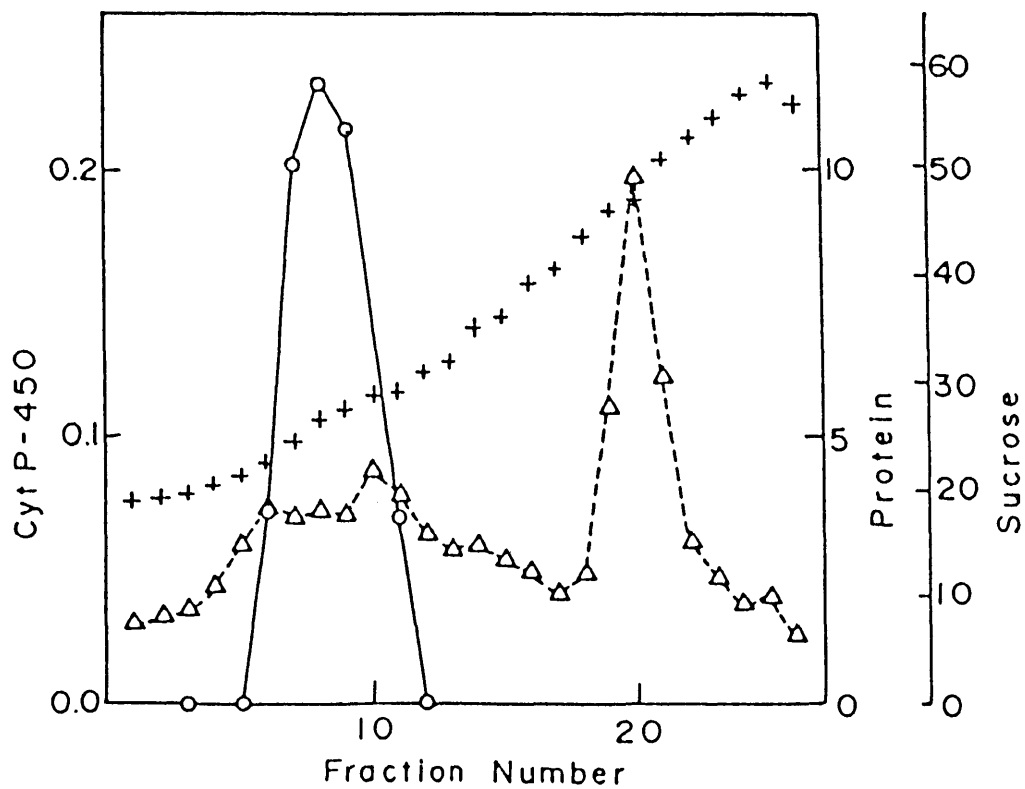


Fig. 19. Distribution of cytochrome P-450 after sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction from diseased tissue. (O), cytochrome P-450 in nmol/ml; (Δ), protein in mg/ml; (+), sucrose in w/v.

## 第4節 考察

〔サツマイモ塊根組織からのミクロソームの分離とその特性〕

ある酵素の細胞内局在性を検討するに当り、  
ては、第1に、組織からの細胞オルガネラの抽出および分画法が妥当なものかどうか  
かが問題となる。本研究では、まず病害サツマイモ塊根組織 — 新鮮組織よりも細胞オル  
ガネラの抽出・分離が困難な組織 — からミクロソームを分離する方法を確立した。この  
方法の最大の特徴は、他の植物材料の場合と違、て、スクロース密度勾配中に  $Mg^{2+}$  を加え  
た点にある。他の植物材料の場合には、スクロース密度勾配中の  $Mg^{2+}$  の存否<sup>103, 106, 113)</sup>  
はミクロソームの密度変化をもたらし。

すなわち、 $Mg^{2+}$  が存在しない場合には、リボソームの離脱が起こり、ミクロソームの密度が減少する。しかし、病害サツマイモ塊根組織の場合には、スクロース密度勾配中に  $Mg^{2+}$

を存在させるとミクロソームを含むオルガネラ間の凝集が起こり、かつまた、 $Mg^{2+}$  を存在させない場合にもリボソームの離脱——ミクロソームの密度変化——は観察されなかった。この理由については、今のところ不明のままになっている。

病害サツマイモ塊根組織からの粗面ミクロソームは、スクロース密度勾配遠心後、タンパク質、RNAおよび NADPH-cytochrome *c* reductase 活性の分布から判断して、密度が 1.09 から 1.14 g/cm<sup>3</sup> にかけてかなり広く分布していた。この粗面ミクロソームの軽い方（密度が 1.09 - 1.11 g/cm<sup>3</sup>）は phosphorylcholine-glyceride transferase を、重い方（密度が 1.10 - 1.14 g/cm<sup>3</sup>）は ipomeamarone 15-hydroxylase をもっていた。こうした結果からみて、この組織の rough-surfaced endoplasmic reticulum は不均一で、少なくとも2種存在するものと想定できる。Endoplasmic reticulum は、核膜、原形質膜、液胞膜等の種々のオルガネラ膜の

前駆体であり、またタンパク質の細胞内輸送  
 においても重要な役割を演じている。従、  
 必ずしも均一なオルガネラであるとは断定  
 しえず、細胞内の位置によ、かなりの相違  
 がある可能性がある。現在までのところ、  
 endoplasmic reticulum の不均一性を立証した  
 論文は見あたらないが、これを示唆する論文  
 はいくつか存在する。例えば、Shore と Tata<sup>114, 115)</sup>  
 は、ラット肝からの粗面ミクロソームを、ミ  
 トコンドリアに親和性をもった粗面ミクロソ  
 ームとポストミトコンドリア上清から得られ  
 る粗面ミクロソームに分けて考えている。こ  
 の両者に含まれる m-RNA を *in vitro* タンパク  
 質合成系で読みせ、ミトコンドリアタンパク  
 質をコードした mRNA は後者の粗面ミクロソ  
 ームにかたよ、分布していることを見出し  
 ている。また、植物においては、Londら<sup>106)</sup>はヒ  
 マ種子の胚乳よりスクロース密度勾配遠心を用  
 いて  $1.08$  と  $1.12 \text{ g/cm}^3$  の2種のミクロソ  
 ームを分離し、前者に phosphorylcholine-cytidyl

transferase、後者に phosphorylcholine-glyceride transferase がそれぞれ局在することを報告している。病害サツマイモ塊根組織の場合には、その2種の粗面ミクロソームがその密度を異にしているため、このようにスクロース密度勾配遠心で互いに分離されたに違いない。この2種の粗面ミクロソームは、機能の面からみると、少なくとも脂質代謝で異なっているのであろう。すなわち、密度の軽い方はリン脂質の合成を、重い方はテルペン代謝をつかさどっているのかも知れない。

[サツマイモ塊根組織での cinnamic acid 4-hydroxylase の細胞内局在性について]

前に述べたように、田中ら<sup>25)</sup>は、傷害サツマイモ塊根組織を用いた結果から、cinnamic acid 4-hydroxylase が endoplasmic reticulum 以外のオルガネラ膜に局在するものと想定したが、この考えは一般には受け入れられないままになつていった。Saundersら<sup>103)</sup>は、田中らのスクロース密度勾配遠心後の NADPH-

cytochrome *c* reductase 活性の分布が非常に幅広いことを指摘し、その遠心条件が不適当であらうために cinnamic acid 4-hydroxylase の局在性について誤った判断がなされたのではないかと考察している。彼らは、Sorghum 幼苗の cinnamic acid 4-hydroxylase が細胞分画で NADPH-cytochrome *c* reductase と挙動を共にすることを示した。例えば、この両酵素活性は共に、スクロース密度勾配中に 10 mM の  $Mg^{2+}$  が存在するときは密度が  $1.17 \text{ g/cm}^3$  の位置に、存在しないときには  $1.12 \text{ g/cm}^3$  の位置にピークを形成することを示し、cinnamic acid 4-hydroxylase が endoplasmic reticulum に局在するものと結論した。

本研究によらば、病傷害サツマイモ塊根組織の cinnamic acid 4-hydroxylase、少なくともその大部分は endoplasmic reticulum 以外のオルガネラに局在していることが明らかにされた。電子顕微鏡による観察から、cinnamic acid 4-hydroxylase が局在するオルガネラは

単一膜で囲まれた不均一な大きさの顆粒であることが示唆された。この顆粒は、その密度から判断して、滑面ミクロソームであるとは考えられない。今のところこのオルガネラが何であるかは不明のままになっている。

Madyastha<sup>104)</sup>らは、Catharanthus roseusの黄化幼苗を用い、チトクロム P-450 関与のモノテルペンの水酸化酵素がプロバキエオール膜に存在することを示唆している。サツマイモ塊根組織の cinnamic acid 4-hydroxylase もプロバキエオール<sup>105)</sup>ないし液胞膜(トノプラスト)に局在している可能性が十分考えられる。この可能性を検討するために、cinnamic acid 4-hydroxylase 活性を有するカルスからセルラーゼオノツカ RSI によりプロトプラストを調製し、それより液胞を単離することを試みた。このようにカルスを用いたのは、塊根組織とは違、マデンプン顆粒が存在しないことから、より液胞の分離に適していると考えたからである。しかし、液胞の単離は遂に成功しな<sup>106)</sup>か



った。また、病傷害サツマイモ塊根組織の細胞分画で、液胞の標識酵素である acid phosphatase 活性がどのように挙動するかについても検討してみた。しかし、その活性は、ほとんど100K 沈殿画分に回収された。ただし、スクロース密度勾配遠心後、cinnamic acid 4-hydroxylase の活性画分に僅かではあるが検出された。従って、現在までのところ、cinnamic acid 4-hydroxylase がプロバキエオールないし液胞の膜に存在するという考えは否定もできないし、肯定もできない。もし、プロバキエオールないし液胞の膜に局在するとすれば、細胞生物学的にみて極めて興味深いことである。というのは、一般にポリフェノール化合物は液胞中に集在しているからである。<sup>116)</sup> すなわち、cinnamic acid 4-hydroxylase によつて、桂皮酸が p-クマール酸に代謝されると同時に、その代謝産物が細胞質側から液胞へと移行されるという可能性が生まれるからである。こうした意味で、

*cinnamic acid 4-hydroxylase* が局在するオルガネラの同定および *p*-クマール酸やその後の代謝系の細胞内局在性についての今後の研究が注目される。

サツマイモ塊根組織の *cinnamic acid 4-hydroxylase* の局在性について興味深いもう一つの事実は、病害組織では少量の活性が粗面ミクロソーム画分にも存在するということがある。このことについては、まずこの少量の活性と主要な活性が存在する2種のオルガネラ間になんらかの関係があるのかどうか問題となる。黒斑病菌感染後0.5日目と1.0日目の組織を比較してみると、0.5日目の組織よりも1.0日目の組織の方がこの少量画分の活性が大きい。このことからみて、少なくとも、*endoplasmic reticulum* で合成された *cinnamic acid 4-hydroxylase* が膜とともに主要な活性が存在するオルガネラに移行していくことの反映とは考えにくい。むしろ、この少量活性画分は病害刺激によって特異的に

出現するものだと考えた方が妥当のように思われる。この少量活性画分の *cinnamic acid 4-hydroxylase* は、主要活性画分のそれとは細胞内局在性の上でも機能の上でも異なっているのかもしれない。例えば、同じ桂皮酸を材料とする別々の種類のポリフェノール合成系（例えば、クロロゲン酸合成系とリグニン合成系）が細胞内局在性を異にしているという可能性も考えられよう。

10 [ サツマイモ塊根組織におけるチトクロム P-450 の機能と細胞内局在性の多様性について ]

本研究で *ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* が細胞内局在性で異なることが明確となり、た。このことはまた、両酵素活性に関与しているチトクロム P-450 が互いに異なるものであることも示している。さらに、*ipomeamarone 15-hydroxylase* は、粗面ミクロソームの一部のみに存在しているのに対し、チトクロム P-450 は粗面ミクロソ-

ム全体にわたって、ほぼ等しい比含量（タンパク質当りの含量）を示した。これらの事実は、病傷害サツマイモ塊根組織には、多種多様なチトクロム P-450 が、細胞内局在性も異にしながら存在していることを示している。ちなみに、*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性画分のチトクロム P-450 が全てこの活性に関与しているものとする、その回転回数は毎分1以下となる。チトクロム P-450 の反応回転数は、その種類によつて異なるが、およそ毎分1~600回で、上の回転回数が例外的に小さすぎるとはいいきれない。しかし、高等植物におけるチトクロム P-450 関与の水酸化酵素を例にとると、切断後96時間 25 mM  $MnCl_2$  で処理した *Jerusalem artichoke* 塊茎<sup>42)</sup> の *cinnamic acid 4-hydroxylase* は約19、切断傷害後32時間目のジャガイモ塊茎<sup>40)</sup> の *cinnamic acid 4-hydroxylase* は約20、*Catharanthus roseus* 幼苗の  $10,000 \times g$ 、15分から  $15,000 \times g$ 、15分の沈殿画分<sup>39)</sup> の *geraniol hydroxylase* は17.4 である。こ

これらのことからみて、毎分1以下という回転回数は小さすぎるといえよう。従って、*ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性画分のチトクロム P-450 も極めて多様なものだと考えに方が妥当であるといえる。

## 第 5 章

サツマイモ塊根組織のチトクロム P-450  
系酵素の酵素化学的性質

## 第 1 節 序論

1975年、RichとBendall<sup>97)</sup>は、分光学的および磁気学的実験手法を用い、種々の高等植物組織においても、哺乳動物肝等で詳しく研究されていゝるチトクロム P-450 をはじめとするミクロソーム電子伝達系の成分が広範に存在することを示した。一方これと相前後して、高等植物の二次代謝系には、チトクロム P-450 が関与してゐる反応が存在することが示唆された。そしてその後、つぎつぎと類似した数多くの研究結果が報告され、高等植物におけるチトクロム P-450 の存在意義が日増しに強くなつてゐる。しかし、これらの研究はミクロソームを用いてチトクロム P-450

の存在「はいしその関与を示唆する程度にとどま、る。そして、これらのチトクロム P-450 が関与していると思われる反応が、哺乳動物肝と同じような電子伝達系によ、て起こっている」と直接的に確認づけるまでにはいたっていない。

39)

1979年、Madyastha と Coscia は、Catharanthus roseus 幼苗のチトクロム P-450 関与の *geraniol hydroxylase* に着目し、まず高等植物としては初めて、NADPH-cytochrome *c* reductase を、その粗ミクロソーム画分より界面活性剤で可溶化し、部分精製した。一方、チトクロム P-450 も同じ粗ミクロソーム画分より可溶化し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画した（ただし、この画分は *geraniol hydroxylase* 活性を僅かながら呈している）。さらに、クロロホルム-メタノール（2:1, v/v）で粗ミクロソーム画分より脂質を抽出し、これら二者を混合することにより、有意な *geraniol hydroxylase*

活性の出現を観察している。これは、高等植物におけるチトクロム P-450 に関する研究としては画期的な再構成実験として注目に値する。しかし、理想的にはそれぞれ完全に精製した酵素標品が用いられるべきである。最近、東らはチューリップの球根より、電気泳動的に単一な条帯にチトクロム P-450 を精製した。また、Bonnerotらはジャガイモより、ミクロソームの電子伝達系の構成成分の一つであるチトクロム  $b_5$  を電気泳動的に主要なバンドを呈する条帯に精製した。

前章までに述べたように、病傷害サツマイモ塊根組織には、基質特異性を異にする2種のチトクロム P-450 関与の水酸化酵素——

*ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* —— が存在し、それらは細胞内局在性においても明白な違いを示し、前者は *endoplasmic reticulum* に、後者は未知のオルガネラ膜に局在していることが示された。高等植物の同一組織において、複数種



の区別されるチトクロム P-450 関与の水酸化酵素が同時に検出されている例はまだ少なく、しかも局在性において相互に異なっている例はまだ多い。そこで、これらの水酸化反応の分子機構を明らかにし、ひいては両水酸化反応に関与している電子伝達系の相同相違性を明らかにすることは高等植物におけるチトクロム P-450 関与の水酸化酵素の研究に新しい方向性を与えるものと考えられる。そこで、

10) NADPH-cytochrome *c* reductase とチトクロム P-450 を分離精製し、その性質を明らかにすることを試みた。チトクロム P-450 の精製については成功しなかつたが、NADPH-cytochrome *c* reductase は電気泳動的に均一なまでに精製することができた。本研究によつて、サツマイモ NADPH-cytochrome *c* reductase は、哺乳動物において詳しく研究されている NADPH-cytochrome P-450 reductase と酷似していることが示された。例えば、この酵素は分子量が約 6,000 の膜結合ドメインと分子量が約

75,000の親水性ドメインからなることが示唆された。こうしたことから、本酵素は本来チトクロム P-450 を還元する酵素であると判断され、高等植物としては初めて、NADPH-cytochrome P-450 reductase を完全精製したとみることができるといえる。

## 第2節 材料および実験方法

## 〔植物材料〕

名古屋大学附属農場で秋収穫されたサツマイモ塊根 (*Ipomoea batatas*, 品種・農林1号) を使用直前まで  $13 \sim 15^{\circ}\text{C}$  で貯蔵しておいた。使用に際して、サツマイモ塊根を水で十分洗い、その柔組織から輪切り切片 (厚さ  $5\text{mm}$ ) を調製した。その切断面に第2章で述べたように黒斑病菌の内生分生子懸濁液を塗抹し、湿潤条件下  $30^{\circ}\text{C}$  で1日間インキュベートした。この輪切り切片より感染部を除去し、残りの非感染部を病害組織として使用した。

## 〔ミクロソーム画分の調製〕

病害組織 ( $1.2\text{kg}$ ) を  $0.4\text{M}$  スクロース、 $1\text{mM}$  EDTA、 $10\text{mM}$  KCl、 $1\%$  (w/v) アスコルビン酸および  $80\text{g}$  のポリクラール AT を含んだ  $1.6\text{l}$  の  $50\text{mM}$  Tris-HCl 緩衝液 ( $\text{pH}$   $8.5$ ) 中でプラスチック製のおろし金を用いてすり碎した。このすり碎液を2重のナイロンガ

—ゼでこし、ろ液を  $300 \times g$  で 10 分間遠心した。  
その上清を  $100,000 \times g$  で 1 時間遠心し、沈殿  
を  $1 \text{ mM EDTA (pH 8.5)}$  を含んだ  $0.4 \text{ M}$  スク  
ロース溶液  $72 \text{ ml}$  に懸濁した ( $100 \text{ K}$  沈殿画  
分)。  $5 \text{ ml}$  の  $100 \text{ K}$  沈殿画分を  $1 \text{ mM EDTA (}$   
 $\text{pH 8.5)}$  を含んだ  $3 \text{ ml}$  の  $70\%$ 、 $14 \text{ ml}$  の  $40$   
 $\%$ 、 $14 \text{ ml}$  の  $60\%$  ( $\text{w/v}$ ) スクロース溶液から  
成る不連続スクロース密度勾配にのせ、日立  
 $\text{RPS 27-2}$  ローターにて  $24,000 \text{ rpm}$ 、1 時間  
遠心した。  $16\%$  と  $40\%$  のスクロース溶液の境  
界領域の画分をミクロソーム画分として分取  
した。以上の操作は  $2 \sim 4^\circ \text{C}$  で行った。

[チトクロム P-450 の可溶化]

$0.8 \text{ ml}$  のミクロソーム画分 ( $11.5 \text{ mg protein}$   
 $/\text{ml}$ ) に、最終的にリン酸カリウム ( $\text{pH 7.5}$   
) が  $50 \text{ mM}$ 、 $\text{DTT}$  が  $1 \text{ mM}$ 、 $\text{EDTA}$  が  $1 \text{ mM}$ 、  
グリセロールが  $40\%$  ( $\text{v/v}$ )、コール酸カリ  
ウムが目的とする濃度になるよう加え、その  
容量を  $2.0 \text{ ml}$  に調整した。そして、 $4^\circ \text{C}$  で  $60$   
分間放置した。その後、 $1 \text{ mM DTT}$  と  $1 \text{ mM}$

EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で 2 倍に希釈し、 $100,000 \times g$  で 2 時間遠心した。この上清を可溶化画分とし、沈殿は 1 mM DTT、1 mM EDTA および 20% (v/v) グリセロールを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 4 ml に懸濁して不溶画分とした。

[ NADPH-cytochrome *c* reductase の精製 ]

ミクロソーム画分を 3 倍に希釈し、最終的に Tris-HCl (pH 7.7) が 50 mM、EDTA が 1 mM、DTT が 1 mM、グリセロールが 20% (v/v)、タンパク質が  $3.5 \text{ mg/ml}$  になるように調整した。その後、最終濃度が 2% (v/v) になるようにエマルゲン 913 を添加し、15 分間マグネチックスターラーで攪拌した。そして、 $100,000 \times g$  で 1 時間遠心し、上清を可溶化画分とした。

上清画分を、20% (v/v) グリセロール、1 mM EDTA、0.1 mM DTT と 0.5% (v/v) エマルゲン 913 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝



5 mM 2'-AMPを含んだ平衡化緩衝液で酵素を溶出した(アフィニティーカラムからの溶出画分)。

このアフィニティーカラムからの溶出画分を、20% (v/v) グリセロール、0.02 mM EDTA、0.1 mM DTT、0.1 M KCl および 0.2% (v/v) エマルゲン 913 を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.7) で前も、平衡化させておいたセファデックス G-100 カラム (0.9 × 53 cm) にかけて、同じ緩衝液で酵素を溶出させた。

以上の操作は 2 ~ 4 °C で行、た。

[ 100K 沈殿画分の直線スクロース密度勾配遠心 ]

100 g の病害組織より調製した 5 ml の 100K 沈殿画分を 1 mM EDTA (pH 8.5) を含んだ、3 ml の 70% (w/v) スクロースクッションと 16 ~ 60% (w/v) までの直線スクロース密度勾配よりなる溶液上へのせ、日立 RPS 27-ローター中で 24,000 rpm、4 時間遠心した。

遠心後その密度勾配を等量に分画した。

以上の操作は $2 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った。

〔ポリアクリルアミドゲル電気泳動〕

非変性条件下での電気泳動は、Davis<sup>119)</sup>の方法に従い、 $0.1\%$  (w/v) トリトン X-100 を含んだ $5.6\%$  (w/v) ポリアクリルアミドスラブゲル中で $4^{\circ}\text{C}$ にて行った。電気泳動後、ゲルはクマシーブリリアントブルー R<sub>120)</sub> によるタンパク質染色または Fan と Masters の方法<sup>120)</sup> によ、て活性染色した。すなわち、 $0.28\text{ mM}$  NADPH と飽和濃度の塩化ネオテトラゾリウムを含む $56\text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH 7.7) 中で室温にてインキュベートし、活性染色した。

$0.1\%$  (w/v) の SDS の存在下での電気泳動<sup>121)</sup> は、Laemmli の方法に従い、 $10\%$  (w/v) ポリアクリルアミドスラブゲル中で行った。電気泳動の前に、試料を $2\%$  (w/v) SDS、 $5\%$  (w/v) メルカプトエタノールと $10\%$  (w/v) スクロースを含んだ $65\text{ mM}$  Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 中で $100^{\circ}\text{C}$ 、2分間加熱し



た。電気泳動後、ゲルは上述のようにタンパク質染色した。

〔NADPH-cytochrome *c* reductase 活性の測定〕

NADPH-cytochrome *c* reductase 活性は 2 章で述べたように測定した。

〔タンパク質の定量〕

タンパク質は Lowry<sup>52)</sup>らの方法に従い、BSA を標準タンパク質として定量した。タンパク質定量時生じるエマルゲン 913 による白濁を

抑えるために、SDS を最終濃度が 0.5% (w/v) になるように添加して測定した。

〔チトクロム P-450 の定量〕

3 章で述べた方法により定量した。

### 第3節 実験結果

〔ミクロソーム画分からのチトクロム P-450  
の可溶化〕

病害サツマイモ塊根からのミクロソーム画分を用い、pH 8.0 での各種界面活性剤（コール酸、デオキシコール酸、ルブロール PX、エマルゲン 108、810、950、トリトン X-100、N-101）によるチトクロム P-450 の可溶化状況を比較検討した。非イオン性界面活性剤であるルブロール PX とトリトン X-100 は、デオキシコール酸などのイオン性界面活性剤に比べ、可溶化率がややよい結果をもたらした。しかし、哺乳動物ではチトクロム P-450 の可溶化によくコール酸が用いられており、高等植物でもデオキシコール酸やコール酸が用いられていること、またコール酸のミセルは他にくらべて小さいことを考慮し、コール酸によって可溶化することとし、さらにその詳しい条件について検討した。

コール酸による可溶化は、40% (v/v) グリセロール、1 mM DTT、1 mM EDTAを含んだ50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で行うと可溶化率、可溶化後のチトクロム P-450 の安定度に関して共によい結果をもたらした。この条件下で、種々の濃度のコール酸による可溶化率を調べた (図 20)。1% (v/v) のコール酸によ、ミクロソーム画分に存在していたチトクロム P-450 の 60% 以上を可溶化することができた。ただし、他の膜タンパク質もチトクロム P-450 と同じように可溶化され、いわゆる選択的可溶化はできなかつた。可溶化画分の CD-差スペクトルは典型的なチトクロム P-450 のそれを示し、450 nm での吸収極大ピークは左右対称性を示した。また、420 nm での吸収極大は極めて小さかつたので、可溶化の過程で、チトクロム P-450 の変性はほとんど起こらなかつたものと判断した。

可溶化画分を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけてみたが、チトクロム

P-450 は変性のためか回収率が極めて悪か、  
た。また、チトクロム P-450 は CM-セルロー  
スには吸着しなかつた。さらに、哺乳動物の  
チトクロム P-450 の精製でよく使用されるア  
ミノヘキシル-セファロース 4B<sup>122)</sup> についても  
検討してみたが、僅かにしか吸着されず、大  
半はカラムを素通りした。

### 〔NADPH-cytochrome c reductase の可溶化〕

NADPH-cytochrome c reductase 活性は、新鮮  
および傷害両サツマイモ塊根組織に比べ、病  
害組織の方が高いので、病害組織を抽出材料  
として用いた。

ミクロソームからの NADPH-cytochrome c  
reductase の可溶化のための界面活性剤とし  
ては、非イオン性界面活性剤であるエマルゲ  
ン 913 を用いた。病害組織からのミクロソ  
ーム画分を 2% (v/v) のエマルゲン 913 で処  
理すると、ミクロソーム画分の全々の NADPH-  
cytochrome c reductase 活性が可溶性画分に回  
収された。Madhyastha と Cosia<sup>39)</sup> は、

Catharanthus roseus の場合に、コール酸によ  
 り可溶化している。しかし、コール酸によ  
 り可溶化した酵素は著しく不安定であつた。  
 特に、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル  
 透過に際しては著しい活性減少がみられ、そ  
 の活性減少は FMN の共存によつて抑えられた。  
 このことはコール酸によつて可溶化した  
 NADPH-cytochrome  $c$  reductase は補欠分子族  
 と考えられる FMN が遊離しやすくなることを  
 示唆している。

### 〔 NADPH-cytochrome $c$ reductase の精製 〕

NADPH-cytochrome  $c$  reductase の精製法を検  
 討する目的で、まず可溶化した画分を DEAE-  
 セルロースカラムにかけ、直線 KCl 濃度勾配  
 によつて酵素を溶出してみた。0.15 M KCl に  
 相当する領域に NADPH-cytochrome  $c$   
 reductase 活性の大きなピークが検出された  
 が、同時に少量の活性が主要ピークの前後に  
 幅広く存在していた(図 21)。主要活性ピー  
 ク画分 (No. 116 画分) をポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動にかけ、活性染色したところ、  
三つの活性バンドが検出された(図22)。主  
要活性ピーク画分よりも低い濃度のKClで溶  
出される活性画分(No. 95画分)は、主と  
して、移動度の最も小さい成分を含んでいた  
(図22)。これに対し、主要活性ピーク画分  
よりも高い濃度のKClで溶出される活性画分  
(No. 137画分)は、主に、移動度の最も大  
きい成分を含んでいた(図22)。三つの成分  
のうち、中間の移動度を示す酵素成分は常に  
検出されるとは限らなかつた。また、検出さ  
れた場合にも、図22に示すように、その活性  
バンドは非常に薄いものであつた。

このように、可溶化画分にはポリアクリル  
アミドゲル電気泳動で互に区別しうる3種の  
NADPH-cytochrome  $c$  reductase が存在してい  
たが、この3種の成分を区別することなしに、  
材料および実験方法で述べたように可溶化、  
精製した。精製の最終段階であるセファデッ  
クス G-100カラムクロマトグラフィーにおい

ては、ニつの活性ピークが得られた(図23)。早く溶出される活性のピーク画分(No. 11とNo. 12画分)は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度が最も小さい活性画分のみを含んでいた。一方、後の方で溶出されるピーク画分(No. 17とNo. 18画分)は、主として、移動度の最も大きい活性画分を含んでいた(図24)。前者の画分については、タンパク質に関しても、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後1本のバンドしか存在せず、そのバンドの位置は活性染色バンドの位置と一致していた(図23、24)。このことから、この画分は、移動度が最も小さい NADPH-cytochrome *c* reductase の均一精製標品であるとみなした。

表10は精製の結果をまとめたものである。セファデックス G-100カラムクロマトグラフィー後の両方の活性ピーク画分とも、その NADPH-cytochrome *c* reductase の比活性は約 29 units/mg protein であつた。

〔3種の NADPH-cytochrome c reductase の性質〕

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で互いに移動度が異なる3種の NADPH-cytochrome c reductase について、それらの性質を比較すると共に、それらの相互関係について調べた。

まず、これらの3分子種の比活性が同じであるかどうかを検討してみた。2',5'-ADP-セファロース 4B カラムを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー後の活性画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、タンパク質と活性の両染色を行なった(図 26)。この画分は、これら3種の NADPH-cytochrome c reductase 以外のタンパク質は含まず、極めて高度に精製されていた。中間の移動度を示す分子種は、タンパク質染色でははっきりと現われているのに対し、活性染色では極めて薄いバンドを示した。このことから、この分子種は比活性が極めて小さいものと判断した。一方、セファデックス G-100 カラムクロ



マトグラフィー後の遅く溶出される活性ピーク画分は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度が最も大きい NADPH-cytochrome *c* reductase の外に、比活性が極めて小さいと思われる中間の移動度を示す分子種も含んでいる。それにもかかわらず、この遅く溶出される活性ピーク画分の比活性は、早く溶出される画分のそれとほぼ同じである。このことから、移動度が最も大きい分子種が一番比活性が高く、ついで移動度が最も小さい分子種が高いものと推論される。

ついで、これら3種の NADPH-cytochrome *c* reductase の分子量について検討した。精製の最終段階であるセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンから、それぞれの分子量を求めようと考えた。しかし、このカラムクロマトグラフィーでの分子量標準タンパク質の溶出速度は、通常のゲルろ過での規則性を示さなかった。これは、おそらく緩衝液中に存在していたエマルゲン

913 によるのであろうと推定した。そこで、2',5'-ADP-セファロース4B カラムクロマトグラフィー後の活性画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、三つの活性バンドを切り出して、それぞれ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、変性条件下での分子量を求めた(図27)。その結果、非変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動で最も早く移動する分子種は75,000、中間の移動度を示す分子種は72,000、最も遅く移動する分子種は81,000の分子量であることがわかった。

3種の NADPH-cytochrome *c* reductase のうち、分子量の小さい方の2種が、分子量の最も大きい分子種のプロテアーゼによる部分分解産物でないかどうかを検討した。2',5'-ADP-セファロース4B カラムクロマトグラフィー後の活性画分をトリプシンで処理したのち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたところ、この画分はもとより3種の NADPH-

cytochrome *c* reductase を含んでいたにもかかわらず (図26および図28、レーン1; 図28で用いた試料では、中間の移動度を示す分子種は検出されなかった)、分子量が75,000のポリペプチドのみが検出された (図28、レーン2)。また、セファデックス G-100カラムクロマトグラフィーで早く溶出される画分、すなわち分子量が81,000の分子量のみを含む画分 (図28、レーン3) をトリプシンで処理したところ、分子量が75,000のポリペプチドが生成された (図28、レーン4)。これらの結果は、少なくとも分子量75,000の分子種は、分子量81,000の分子種が組織中に存在していたにプロテアーゼの作用を受けた結果生成されたものであることを示唆している。このことは、病害組織からの100K沈殿画分の直線スクロス密度勾配遠心後の3種のNADPH-cytochrome *c* reductase の分布状態を調べた実験でも示唆された (図29)。このスクロス密度勾配遠心後、NADPH-

cytochrome *c* reductase 活性は、遠心管の最上部層から下層にかけて広く分布していた(図 29A)。可溶性タンパク質が存在していると想定される最上層部には、分子量が 75,000 の分子種が存在していた(図 29B)。一方、分子量が 81,000 の分子種は、密度勾配中に広く分布し、オルガネラ膜に結合した状態にあることが示された(図 29B)。なお、これらの実験では分子量が 72,000 の分子種が検出されなかったため、この分子種は分子量 75,000 の分子種がさらにプロテアーゼの作用を受けて生成されたものであるという想定については検討することができなかった。

以上の結果から、分子量 81,000 の分子種が intact の NADPH-cytochrome *c* reductase であり、他の分子種はプロテアーゼによる分解産物であることがわかったため、分子量が 81,000 の分子種についてのみ基質に対する Michaelis 定数 ( $K_m$ ) を求めた。NADPH およびチトクロム *c* の両基質に対して、

Lineweaver - Burk プロットはともに直線性を示し、この酵素が Michaelis 型の酵素であることを示した (図 30)。このプロットより、NADPH および ナトリウムクロム C に対する  $K_m$  は、それぞれ 7.7、2.3  $\mu\text{M}$  であると算出された。

Table 10. Purification of NADPH-cytochrome c reductase from sweet potato root microsomes

Preparation step	Total protein <sup>a</sup> (mg)	Total activity <sup>a</sup> (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Microsomal fraction	1,672	56.8	0.034	100
Solubilized fraction	1,460	71.5	0.049	125
Eluate from DEAE-cellulose column	370	64.8	0.175	113
Eluate from affinity column	0.242	6.73	27.8	7.5
Eluate from Sephadex G-100 column				
Fraction No. 11 <sup>b</sup>	0.014	0.40	28.6	0.69
Fraction No. 18 <sup>b</sup>	0.018	0.52	29.0	0.93

<sup>a</sup>The amount or activity from 1.6 kg of tissue.

<sup>b</sup>The fractions indicated in Fig. 23.

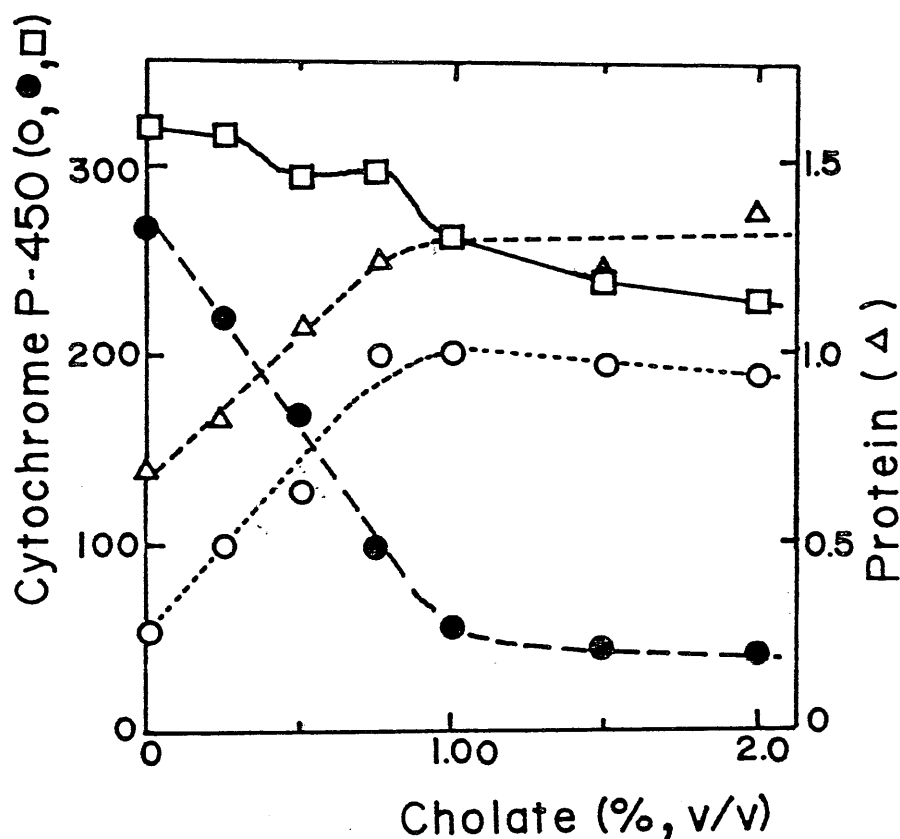


Fig. 20. Solubilization of cytochrome P-450 from sweet potato root microsomes. Four milliliters of the microsomal fraction at a protein concentration of 11.5 mg/ml from diseased tissue was treated with the indicated concentrations of potassium cholate in the presence of 40% (v/v) glycerol as described in "Materials and Methods," then centrifuged at  $100,000\times g$  for 2 h. ( $\Delta$ ), protein in the supernatant in mg/ml; (O), cytochrome P-450 in the supernatant in pmol/ml; ( $\bullet$ ), cytochrome P-450 in a 4-ml suspension of the precipitate in pmol/ml; ( $\square$ ), sum of cytochrome P-450 contents in the supernatant and precipitate.

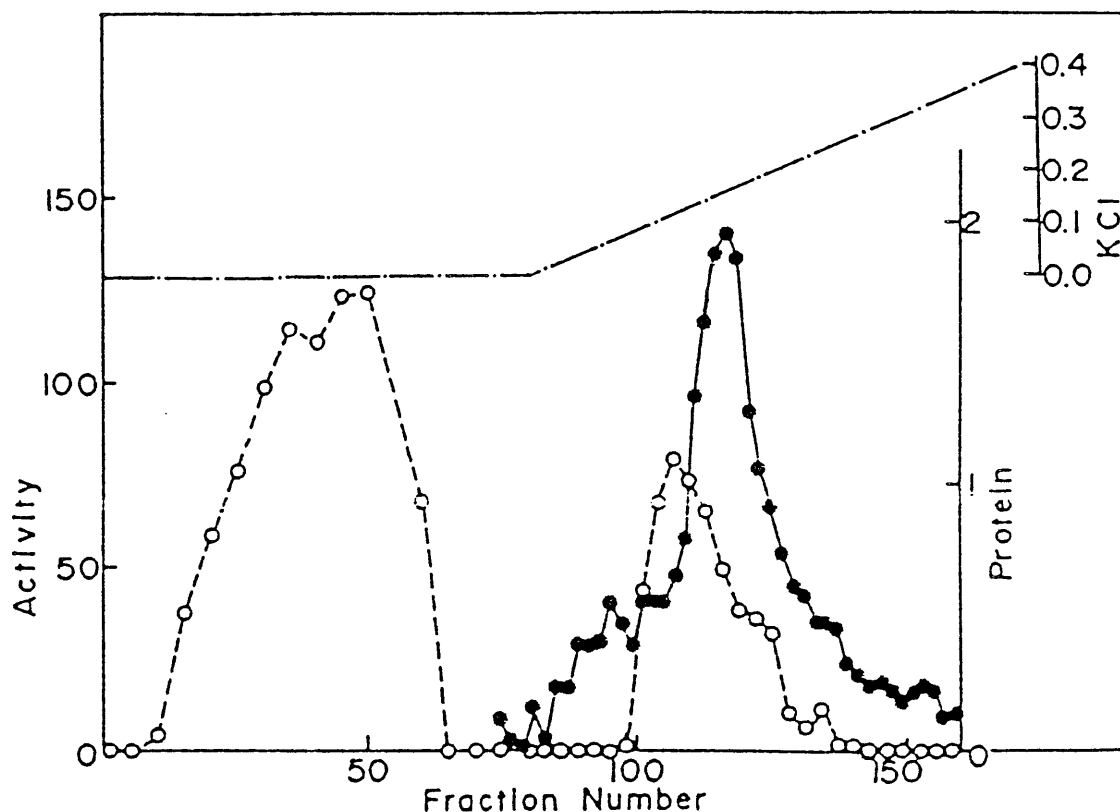


Fig. 21. DEAE-cellulose column chromatography of the solubilized fraction. The fraction (0.53 mg protein) was applied to a DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) column (2 x 6.7 cm) preequilibrated as described for the enzyme purification in "Materials and Methods," then the proteins were eluted with a linear KCl concentration gradient from 0 to 0.4 M in 200 ml of the buffer used for preequilibrating the column. Fractions of 2 ml each were collected. (●), NADPH-cytochrome c reductase activity in units/ml; (○), protein in mg/5 ml; (---), KCl in M.





Fig. 22. Electrophoresis of elute fractions from the DEAE-cellulose column (cf. Fig. 21.) in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. The gel was stained for activity. Lanes 1, 2 and 3 had 50  $\mu$ l each of fractions No. 95, 116 and 137 in Fig. 21, respectively.

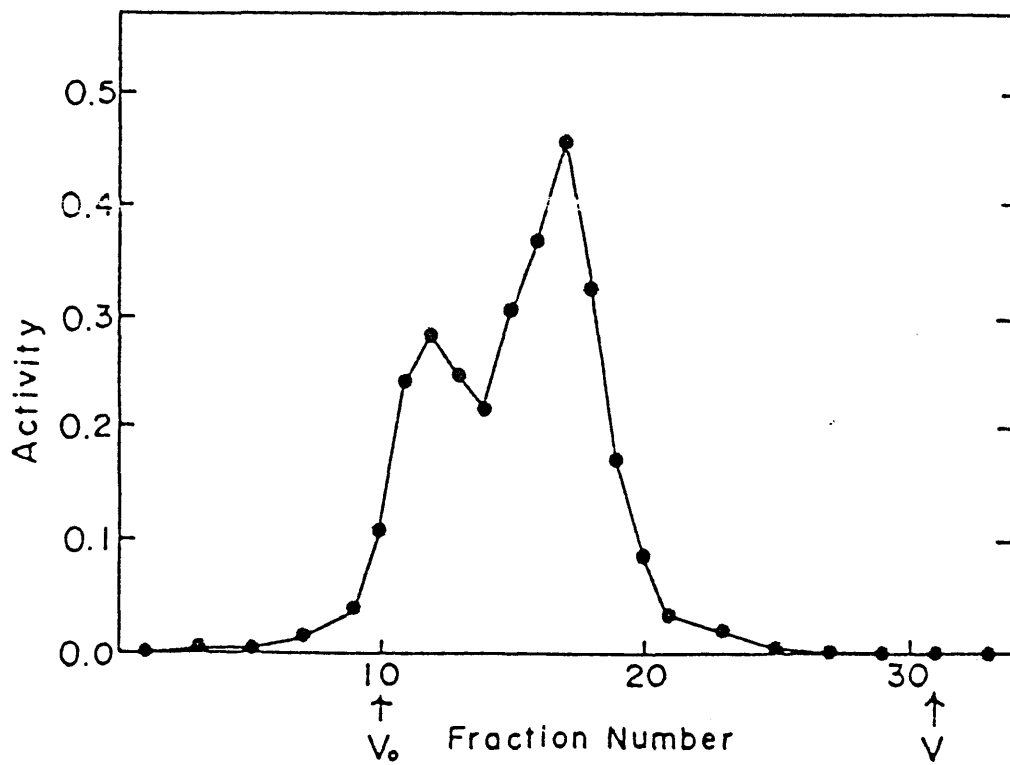


Fig. 23. Sephadex G-100 gel filtration of the eluate from the affinity column. NADPH-cytochrome c reductase activity is expressed as units/ml.  $V_0$ , the void volume fraction;  $V$ , the total bed volume fraction.

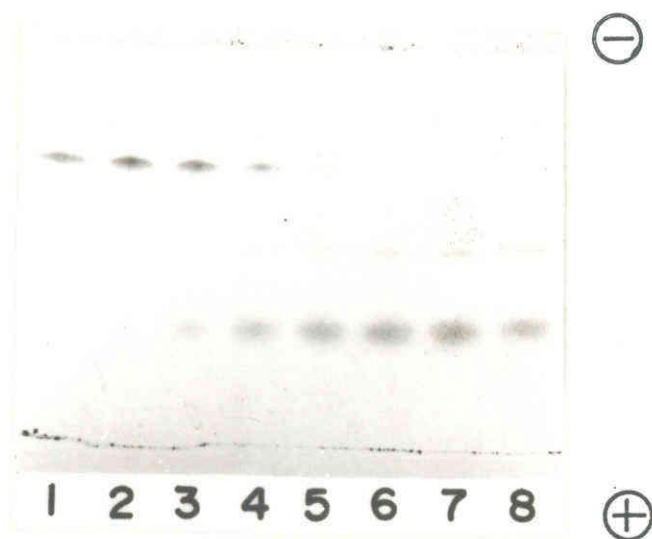


Fig. 24. Electrophoresis of elute fractions from the Sephadex G-100 column (cf. Fig. 23.) in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. A 20- $\mu$ l portion of each fraction was applied to the gel, which was subjected to electrophoresis and then stained for activity. Lanes 1-8; fractions No. 11-18 in Fig. 23., respectively.

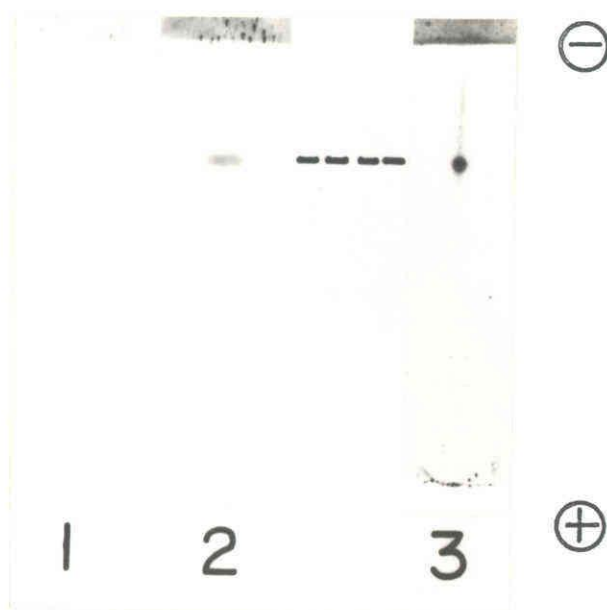


Fig. 25. Electrophoresis of the most purified preparation (fraction No. 11 in Fig. 23.) in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. The amount of protein applied to the gel was  $0.76 \mu\text{g}$  each for lanes 1 and 2 and  $5.0 \mu\text{g}$  for lane 3. Lane 1, stained for activity without NADPH; lane 2, stained for activity; lane 3, stained for protein.



Fig. 26. Electrophoresis of the elute from the affinity column in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. Lane 1, applied with the eluate containing 1.6  $\mu\text{g}$  protein and stained for activity; lane 2, applied with the eluate containing 9.6  $\mu\text{g}$  protein and stained for protein.

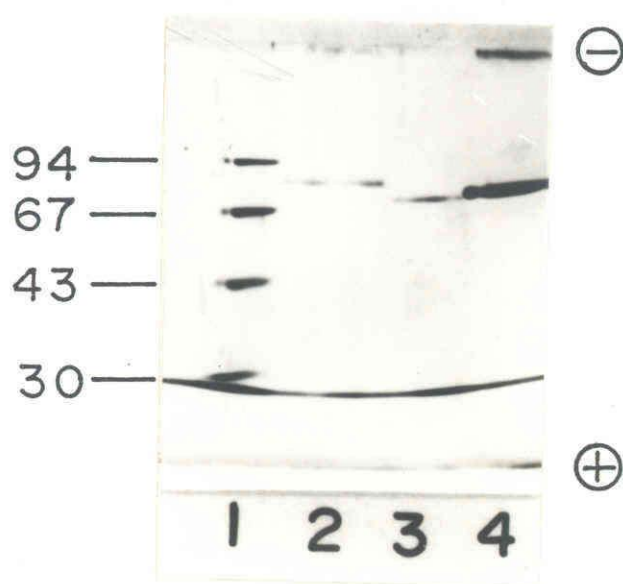


Fig. 27. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the three NADPH-cytochrome c reductase species. The eluate from the affinity column was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions. The three active bands were separately cut out, heated at 100°C in the presence of SDS and mercaptoethanol as described under "Materials and Methods," and applied to the SDS-polyacrylamide gel. Lane 1, molecular weight markers (mol wt x 10<sup>-3</sup> values are indicated on the left side of the photograph); lane 2, the most slowly migrating band for Fig. 22.; lane 3, the middle band for Fig. 22.; lane 4, the most rapidly migrating band for Fig. 22.

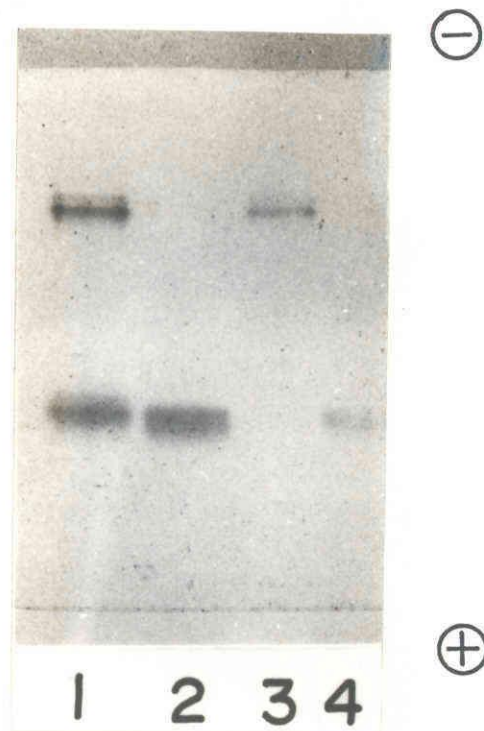


Fig. 28. Electrophoresis of trypsin-digested NADPH-cytochrome c reductase in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. The eluate from the affinity column (lanes 1 and 2) and the most purified preparation (fraction No. 11 in Fig. 23.; lane 3 and 4) were digested with trypsin at a final concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  at  $0^\circ\text{C}$ , and the digestion was stopped by adding of trypsin inhibitor to a final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Samples of 100  $\mu\text{l}$  each were applied to the gel which was subjected to electrophoresis and then stained for enzyme activity. Lanes 1 and 3, digested for 0 min; lanes 2 and 4, digested for 30 min.

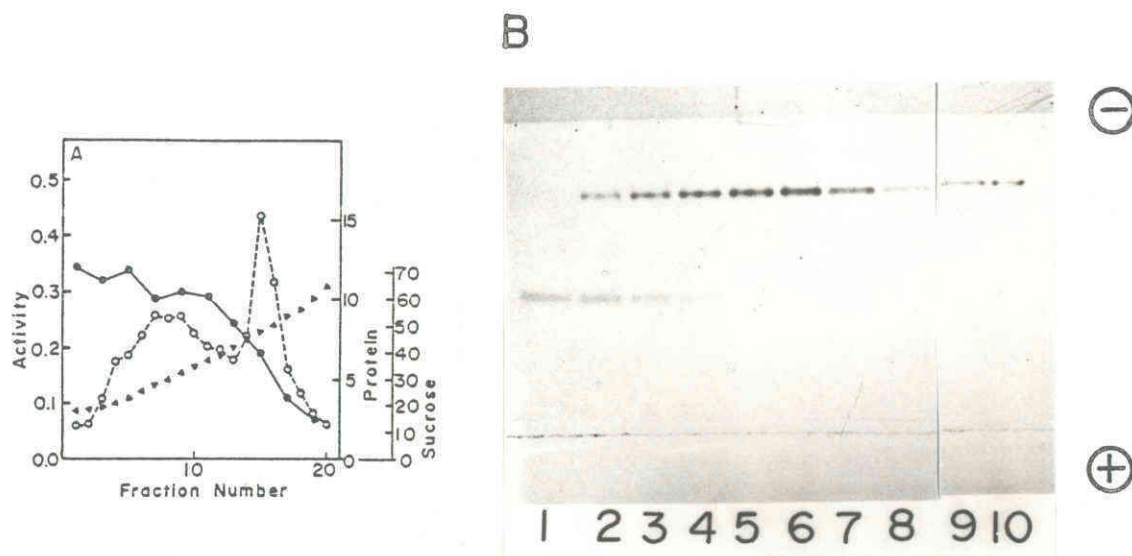


Fig. 29. Distributions of the different NADPH-cytochrome c reductase species after linear sucrose density gradient centrifugation of the 100K pellet fraction. A: distributions of NADPH-cytochrome c reductase activity (●, units/ml) and protein (○, mg/ml) after centrifugation. (Δ), sucrose concentration in % (w/v). B: Electrophoresis of fractions after centrifugation in the nondenaturing buffer on the polyacrylamide gel. Each fraction (0.5 ml) was treated with Emulgen 913 as described for solubilization of the enzyme in "Materials and Methods," then 50- $\mu$ l solubilized fractions were applied to the polyacrylamide gel. The gel was stained for activity. Lanes 1-10, fractions No. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16, respectively.



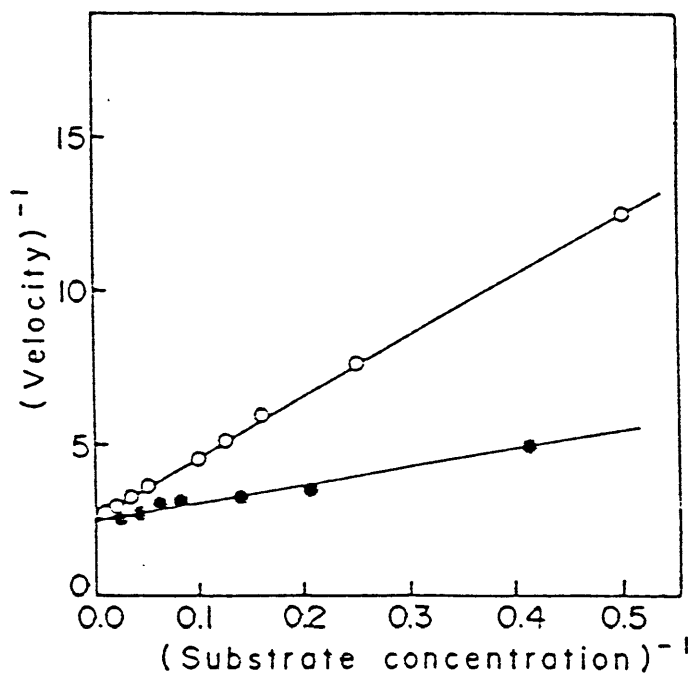


Fig. 30. Lineweaver-Burk plots of the activity of the most purified preparation (fraction No. 11 in Fig. 23.). The initial velocity and substrate concentration are expressed as units/ml enzyme preparation and  $\mu\text{M}$ , respectively. (O) and (●), NADPH and cytochrome c as the variable concentrations of substrate, respectively.

## 第4節 考察

〔チトクロム P-450 の可溶化〕

高等植物のチトクロム P-450 の可溶化に関する報告例は極めて数少なく、チューリップ<sup>38)</sup>球根、Catharanthus roseus 幼苗<sup>39)</sup>、Jerusalem artichoke 塊茎<sup>41)</sup>など数例にすぎない。これらの可溶化には界面活性剤としてデオキシコール酸、リネックス 690、エマルホゲン BC がそれぞれ用いられているが、本研究では、哺乳動物のチトクロム P-450 の可溶化で最も頻繁に用いられているコール酸を用い、病害サツマイモ塊根ミクロソームからチトクロム P-450 を可溶化した。チトクロム P-450 を変性なく可溶化することは、単にその精製のための第1段階となるばかりではなく、その Co-差スペクトルを解析する上で試料の濁りによる影響を解消できる面でも重要であると考えられている。哺乳動物に比べてチトクロム P-450 含量が極端に低い高等植物においては、

変性なくチトクロム P-450 を可溶化することは、後者の理由で極めて意義深い。本研究では、可溶化チトクロム P-450 標品の CO-差スペクトルは、精製ミクロソーム標品のそれと同じであることが確認された。

可溶化したチトクロム P-450 の精製には成功しなかった。チトクロム P-450 の多様性を考慮し、今井と佐藤<sup>80)</sup>がウサギ肝チトクロム P-450 の精製に用いたアミノオクチル-セファロースのようなアフィニティーカラムを用いるのも、一案かもしれない。

[ NADPH-cytochrome  $c$  reductase の精製と性質 ]

Madyastha と Coscia<sup>39)</sup>は、Catharanthus roseus の NADPH-cytochrome  $c$  reductase の可溶化にコール酸を用い、2通りの方法によりその精製を試みている。その結果、精製に用いる全々の緩衝液中に  $1 \mu\text{M}$  FMN、 $1 \mu\text{M}$  FAD を添加することと、2',5'-ADP-セファロース 4B カラムクロマトグラフィーを行うことがより高

い比活性の NADPH-cytochrome  $c$  reductase の部分精製標品を得るのによいと報告している。本研究ではコール酸の代わりに非イオン性界面活性剤であるエマルゲン 913 を用い、2,5-ADP-セファロース 4B カラムクロマトグラフィーを精製の1段階として採用し、電気泳動的に単一の NADPH-cytochrome  $c$  reductase を得ることができた。エマルゲン 913 の使用は、 $1 \mu\text{M}$  FMN、 $1 \mu\text{M}$  FAD を精製中に常時存在させておく必要性をなくすだけでなく、より高い回収率を与えた。また、精製過程で終始グリセロールを存在させることによ、 $c$  reductase の失活を大いに防止することができた。本研究で得られた精製標品の比活性は  $28.6 \text{ units} / \text{mg protein}$  <sup>39)</sup> であり、*Madyastha* と *Coscia* の部分精製標品の比活性は  $17.1 \text{ units} / \text{mg protein}$  であり、本精製標品は有意に高かったが、精製度から考えると両者の NADPH-cytochrome  $c$  reductase 本来の比活性は近いものと推定できる。しかし、

ラット肝 (58 - 70 units / mg protein)<sup>118, 123~125)</sup>  
<sub>126)</sub>  
や酵母 (132 units / mg protein) などの場合に比  
べると、本精製標品の比活性は明らかに低か  
った。このことが、精製中の酵素の失活によ  
るのか、それとも高等植物酵素の比活性がも  
ともと低いのかについては、未解決のままに  
なっている。

本研究での可溶化標品には、ポリアクリル  
アミドゲル電気泳動で互いに移動度が異なる  
3種の NADPH-cytochrome c reductase が存在  
していた。これらは互いに、その比活性にお  
いても異なるようであった。SDS-ポリアクリ  
ルアミドゲル電気泳動によつて、これらの3  
種の分子種の分子量は、それぞれ 81,000、  
75,000 および 72,000 であると決定された。  
ただし、これらの NADPH-cytochrome c  
reductase が非変性条件下においてそれぞれ  
のポリペプチドの単量体として存在するか否  
かについては決定できないうい。

トリプシン処理実験 (図 28) および 100K

沈殿画分のスクロース密度勾配遠心後の3種の分子種の分布を調べた実験(図29)から、分子量が81,000の分子種が intact な NADPH-cytochrome  $c$  reductase (つまり NADPH-cytochrome P-450 reductase) であり、分子量が75,000の分子種は(おそらく分子量が72,000の分子種も)組織中に存在していたプロテアーゼの作用により、もろきに分解産物<sup>39)</sup>であると判断した。Madagascar と Coscia の Catharanthus roseus からの NADPH-cytochrome  $c$  reductase の部分精製標品は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で78,000と63,000の2分子種の NADPH-cytochrome  $c$  reductase を示しているが、これらはそれぞれ、本研究における81,000と75,000の NADPH-cytochrome  $c$  reductase に相当するものと思われる。図31は、分子量が81,000と75,000の両分子種の関係についての考えを模式的に示したものである。すなわち分子量81,000の分子種は75,000の親水性領域と6,000の

疎水性領域からなる両親媒性な分子形態をとっており、両領域間はプロテアーゼの作用を受けやすく容易に切断されるフレキシブルな構造になっていると考えられる。両領域は機能的に分業がなされていて、前者は活性ドメインとして、後者は膜結合ドメインとして機能している。すなわち、プロテアーゼの切断によって生じる75,000の分子種は膜には結合できないが可溶性である非生理的な基質のチトクロムcを還元できるものと考えられる。しかし、生理的には膜結合ドメインも極めて重要であり、この酵素本来の基質であり、かつまた膜内在性タンパク質であるチトクロムP-450を還元するためには、膜結合ドメインは必須なものであると考えられる。そういう意味で、分子量81,000のintactなNADPH-cytochrome c reductaseを精製したということは、NADPH-cytochrome P-450 reductaseを精製したと言い直すことができる。以上の考えは動物肝のNADPH-cytochrome P-450

reductaseの研究結果から考察したもので、以下に<sup>124)</sup>具体的にその対比を試みる。VermilionとCoon はラット肝より76,000のNADPH-cytochrome P-450 reductaseを精製し、これをトリプシン処理するとチトクロムcの還元活性にして25%高い69,000のreductaseに変換すると報告している。また、この処理により得られたNADPH-cytochrome c reductaseの分子量は、トリプシンまたはブロメラインで<sup>127)</sup>処理後ミクロソームより可溶化したこの<sup>128)</sup>reductaseの分子量(それぞれ68,000と71,000)に近い値となつてゐる。以上の結果は、本研究における81,000のNADPH-cytochrome c reductaseのトリプシン処理がより比活性が高いと考えられる75,000の膜結合部位を欠損した酵素を与えたとする推論<sup>129)</sup>を支持するものと言へる。GunnとStrobelはNADPH-cytochrome P-450 reductaseの膜結合ドメンを単離し、その分子量を6,400と報告している。本実験より推定されるサツマイモ



塊根組織の NADPH-cytochrome P-450 reductase の膜結合ドメインは上述したように 6,000 であり、非常に近い値である。Catharanthus roseus の場合のこのドメインの推定分子量は 15,000<sup>(39)</sup> となり、有意に大きい値となる。ミクロソームの電子伝達系の構成成分において、両親媒性な分子形態をとる酵素は NADPH-cytochrome P-450 reductase<sup>(130,131)</sup> だけでなく NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase、cytochrome b<sub>5</sub><sup>(132,133)</sup> もそうであると報告されている。言い換えば、電子伝達系の末端酵素以外は全て両親媒性酵素である。これは、電子伝達系が直接膜電位の形成につながるミトコンドリア内膜や葉緑体のチラコイド膜とは明らかに区別できる特徴であり、原形質側だけで電子伝達がまかなえるミクロソーム電子伝達系の合目的特性であるといえよう。

分子量 81,000 の NADPH-cytochrome P-450 reductase に対して、サツマイモ塊根に存在するプロテアーゼが組織の破碎時および破碎

後のみに作用したのか、それともマ碎以前に *in situ* で作用したのかについては、決定的な証拠はまだ得られていない。セリンプロテアーゼの特異的阻害剤であるフェニルメチルスルホニルフルオリドが  $0.1 \text{ mM}$  存在した状態でマ碎および精製を行、たが顕著な違いはみられなかつた。本研究に使用したフェニルメチルスルホニルフルオリドの濃度がプロテアーゼの阻害に十分であつたかどうか、また  $81,000 \text{ reductase}$  の切断にはセリンプロテアーゼ以外の、例えば金属依存プロテアーゼが作用しているかもしれないという疑問は残るが、酵素の合成・分解活性の高い病害サツマイモ塊根組織においては *de novo* に合成される *reductase* とともに分解されてゆく *reductase* も多いものと考えられる。NADPH-cytochrome P-450 *reductase* の活性ドメインと膜結合ドメインを継ぐ領域はフレキシブルになつていて、特にプロテアーゼの影響を受けやすいことが想像される。田中ら<sup>25)</sup>は、サツマイ

芋塊根組織に切断傷害を与えると、粗ミクロソーム画分の NADPH-cytochrome *c* reductase 活性は一度急増し、切断後 2~3 日を境にして減少していくことを示した。しかも、この活性減少と平行して、可溶性画分の NADPH-cytochrome *c* reductase 活性が増大することも示した。この組織切断後 2~3 日以降に起こる現象は、おそらく組織中のプロテアーゼ量の増加に伴い起こる現象と考えられ、分子量 81,000 の分子種が 75,000 の分子種に変化していくことを意味しているものと思われる。一方、cinnamic acid 4-hydroxylase と ipomeamarone 15-hydroxylase は 1~1.5 日で減少しはじめるわけであり、NADPH-cytochrome P-450 reductase のプロテアーゼによる切断が組織のま碎以前に起こるにせよ以後で起こるにせよ、両水酸化酵素の減少に直接関係しているとは考え難い。

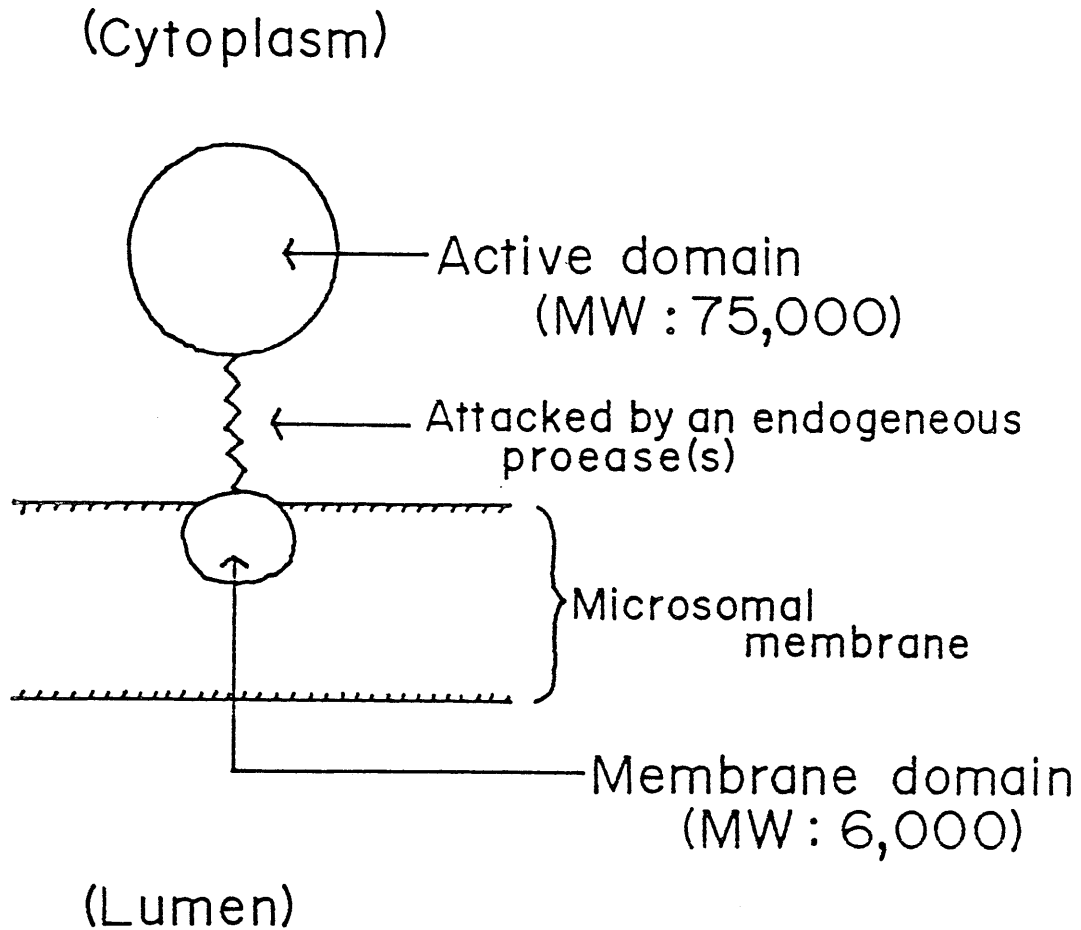


Fig. 31. Schematic illustration of a possible structure of sweet potato NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. MW; molecular weight.

## 第 6 章

## 総合討論

病害サツマイモ塊根組織における抗菌性セスキテルペンの生合成に関する研究は、今日まで活発になされてきたが、その中で頻繁に存在すると考えられる酸素添加反応に関する知見はなにも得られていなか、た。この代謝経路において非常に近い位置関係にあると推定でき、しかもその間には酸素添加反応が関係していると考えられる、二つの主要蓄積テルペンのイポメアマロンとイポメアマロノールに参与する酵素を検出し、その酵素学的研究を行うことは、サツマイモ塊根組織のテルペノイド代謝のみならず、高等植物の二次代謝全般に存在する酸素添加反応に関する知見を得るうえで最もよい研究対象となりえた。そういう意味でイポメアマロンからイポメアマロノールへの転換が1段階で起こり、それ

が ipomeamarone 15-hydroxylase (本研究により命名) により、 $\alpha$  酵素的に触媒されることを証明できたことは、本研究の目的遂行の確かな礎となった。

Ipomeamarone 15-hydroxylase は、その酵素学的諸性質により、チトクロム P-450 関与の水酸化酵素であることが判明した。これは、サツマイモ塊根組織のテルペン代謝におけるその他の酸素添加反応にも、哺乳動物肝と同じ性質をもつ、チトクロム P-450 が関与している可能性を高くする事実である。特に、NADH による本酵素の活性化は、サツマイモ塊根組織のミクロソームにおいても、哺乳動物肝のミクロソームと同じような2種の電子伝達系が両立していることを示すものであり、両者間で synergistic な相互作用があることとして興味深い。高等植物のテルペノイド代謝において、モノテルペンおよびジテルペンの水酸化にチトクロム P-450 が関与していることが確かめられているが、セスキテルペン代謝に

チトクロム P-450 が関与しているとの報告はなかつた。高等植物のテルペノイド代謝における酸素添加反応に幅広くチトクロム P-450 が関与していることを支持する事例として、*ipomeamarone 15-hydroxylase* がチトクロム P-450 関与の水酸化酵素であると証明できたことは意義深い。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* は新鮮組織には存在しないが、切断傷害、黒斑病菌の感染を受けると出現し、著しい活性上昇がみられた。またこれに伴い、チトクロム P-450 含量も増加することが立証できた。高等植物におけるチトクロム P-450 に関する研究で、その誘導に関する研究は少なく、動物と同じようにサツマイモ塊根組織においてもチトクロム P-450 が誘導性タンパク質であると証明できたことは重要である。その誘導効果がその関与する水酸化酵素活性、ひいてはその関与する代謝系の速度の増大に大きな影響をおよぼすことが証

明できたことは、高等植物の二次代謝系の速度調節機構に関する新しい知見を与えたといえよう。

*Ipomeamarone 15-hydroxylase* と *cinnamic acid 4-hydroxylase* は細胞内局在性、基質特異性について厳密に区別できた。このことは両水酸化酵素に関与しているチトクロム P-450 が相互に独立したヘムタンパク質であることを意味し、さらには分子的に多様なチトクロム P-450 が病傷害サツマイモ塊根組織に複数個同時に存在していることを意味する。哺乳動物においては同一種の同一組織から複数個の分子多様なチトクロム P-450 が単離、精製されるまでに「たが、高等植物においては単離はおろかチトクロム P-450 の分子多様性に関する知見もほとんど得られていない。まして、同一種の同一組織において、細胞内局在性を異にする2種のチトクロム P-450 関与の水酸化酵素が確認されたことは、チトクロム P-450 の細胞生化学からみても重要な意



義があるといえよう。Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase の基質特異性は狭いように思われた。動物において考えられているように、生体成分の合成に関与するチトクロム P-450 は基質特異性が概して狭いという傾向が、植物においても共通して存在することが推測される。

チトクロム P-450 の精製は成功しなかつたが、分光学的に変性なくミクロソームから可溶化できたことは意義あるといえよう。なぜならば、高等植物において、精製の第1段階である可溶化の研究はほとんどなく、またチトクロム P-450 の分光学的研究においても、濁度の大きいミクロソームの状態で比含量が極めて低いチトクロム P-450 を測定するのが現状であるからである。サツマイモ塊根組織におけるチトクロム P-450 の CO-差スペクトルは、動物肝のそれと極めて類似した吸収スペクトルを示した。一方、病害サツマイモ塊根組織には、分子量、極性を異にする分子

種の NADPH-cytochrome *c* reductase が存在していたが、そのうち分子量が 81,000 の酵素を電気泳動的に単一なまでに精製することができた。これは高等植物では初めてのことであり、意義深い。その酵素は分子多形体であると推定でき、哺乳動物の NADPH-cytochrome P-450 reductase (intact な NADPH-cytochrome *c* reductase) に関する研究で報告されているように、親水性の活性ドメインと疎水性な膜結合ドメインからなる両親媒性酵素であると判断できた。両親媒性であることはとりもなおさず、NADPH-cytochrome *c* reductase が細胞内において、ミクロソームの電子伝達系の構成成分として、言い換えれば本来の NADPH-cytochrome P-450 reductase として機能するための必須条件である。すなわち、本研究によつて精製した両親媒性な NADPH-cytochrome *c* reductase は NADPH-cytochrome P-450 reductase であると言い直すことができる。それゆえに本酵素の精製は高等植物における

テトクロム P-450 関与の水酸化酵素系の分子レベルでの解明の一助としてさらに意義が深まるものといえよう。

## 第 7 章

## 要 約

1. サツマイモ塊根組織におけるイポメアマロニからイポメアマロノールへの転換が酵素的に起こることを立証し、この転換に関与する酵素を *ipomeamarone 15-hydroxylase* と命名した。

2. 病害サツマイモ塊根組織からのミクロソーム画分を用い、*ipomeamarone 15-hydroxylase* の性質を検討した。本酵素は補酵素として NADPH を要求した。NADPH の濃度が低い時には NADH による活性化がみられた。また、本酵素活性は KCN では阻害されず、*p*-クロロマーキュリー安息香酸をはじめとする SH 酵素阻害剤によ、<sup>2</sup> 顕著に阻害された。さらに、チトクロム *c* や *p*-ベンゾキノンも活性を顕著に阻害した。また、*ipomeamarone 15-hydroxylase* は分子状酸素を要求し、CO によ、<sup>2</sup> 顕著に阻

害された。このCO阻害は光によ、て抑えられた。以上の結果により、ipomeamarone 15-hydroxylaseはチトクロム P-450 関与の1原子酸素添加酵素であると判断した。

3. 還元したミクロソーム画分のCO差スペクトルは、哺乳動物肝のチトクロム P-450 と同じスペクトルを示し、Soret 帯の極大は450 nm に位置していた。ミクロソーム画分のチトクロム P-450 含量は、新鮮サツマイモ塊根組織の場合には非常に少なか、たが、傷害組織でやや多く、病害組織では非常に多か、た。また、組織を  $HgCl_2$  や  $CdSO_4$  などて処理すると、ミクロソーム画分のチトクロム P-450 の含量が増大した。 $HgCl_2$  とフェニルイソシアニドの両方て処理した組織においては、その含量が顕著に多くなり、 $198 \text{ pmol/mg}$  microsomal protein であ、た。この値は高等植物において最も高い比含量であると報告されているチューリップ球根におけるそれに匹敵する値であ、た。

4. サツマイモ塊根組織を種々の条件で"処理" (切断傷害を与えたり、種々の薬剤で"処理") し、その際蓄積するテルペン量とチトクロム P-450 含量を比較した。その結果、蓄積テルペン量とチトクロム P-450 含量の間には正の相関関係がみられた。なお、イポメアマロンの水酸化に關して、その活性画分におけるチトクロム P-450 の回轉回数を求めたところ、その値は 1 に満たなかつた。このことは分子的に多様なチトクロム P-450 がこの画分に存在していることを示唆している。

5. Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic acid 4-hydroxylase の間では、両者の基質の間で拮抗関係はみられなかつた。黒斑病菌感染後の両者の経時的活性変化をみたところ、前者は 1.5 日で最大になるのに対し、後者は 1.0 日で最大になつた。また、傷害組織における活性に対する病害組織の活性の比は、前者が 1:4~5、後者が 1:2.5~3.5 であつた。

6. Ipomeamarone 15-hydroxylase と cinnamic

*acid 4-hydroxylase* の細胞内局在性は明らかに異なり、ついでに。直線スクロース密度勾配遠心と電子顕微鏡による観察の結果より、前者は *rough-surfaced endoplasmic reticulum* に局在し、後者は単一膜からなる不均一な大きさの小胞に局在していることが確認された。病害組織の *rough-surfaced endoplasmic reticulum* には、密度および局在化する酵素が異なる2種があり、*ipomeamarone 15-hydroxylase* はその一方のみに局在しているようであった。また、*cinnamic acid 4-hydroxylase* が存在する小胞は、少なくとも、*endoplasmic reticulum*、ミトコンドリア、原形質膜、ゴルジ装置およびミクロボディ由来のものではなかつた。なお、病害組織においては、僅かでは *cinnamic acid 4-hydroxylase* 活性が *ipomeamarone 15-hydroxylase* 活性画分にも検出された。

7. 病害サツマイモ塊根組織のミクロソーム画分より *NADPH-cytochrome c reductase* を電

気泳動的に均一な状態にまで精製した。その分子量は81,000であり、比活性は28.6 units / mg proteinであった。哺乳動物の NADPH-cytochrome c reductase と比べるとその比活性はやや低かった。一方、分子量はほぼ同じであった。ミクロソームからの可溶化画分には、分子量が81,000の酵素タンパク質以外にも、分子量がそれぞれ75,000と72,000の2種の酵素タンパク質が存在していた。これら3種の酵素タンパク質は、互いに比活性においても異なるようであった。分子量が75,000の酵素タンパク質は、分子量が81,000の酵素タンパク質がプロテアーゼにより切断され、その膜結合ドメンを欠落した親水性の活性ドメンであると考えられた。すなわち、本酵素の膜結合ドメンは分子量が約6,000であると推定された。分子量が72,000の酵素タンパク質も、おそらく分子量が81,000の intact NADPH-cytochrome c reductase (NADPH-cytochrome P-450



reductase)が「プロテアーゼ」による切断を受けて生じたものであると考えられる。しかし、これに関しては、決定的証拠が得られなかった。

## REFERENCES

1. 吉田精一、南川隆雄 (1978) 高等植物の二次代謝、東京大学出版会.
2. Bell, E. A. and B. V. Charlwood, eds. (1980) *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Volume 8, Secondary Plant Products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
3. Uritani, I., K. Ôba, A. Takeuchi, K. Sato, H. Inoue, R. Ito and I. Ito (1981) *In Antinutrients and Natural Toxicants in Foods*. (R. L. Ory, ed.) pp. 1-16, Food and Nutrition Press Inc., Connecticut.
4. Ôba, K., R. Yu, M. Fujita and I. Uritani (1982) *In Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis*. (Y. Asada, W. R. Bushnell, S. Ouchi and C. P. Vance, eds.) pp. 157-173, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
5. Fujita, M. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 3045.
6. Akazawa, T., I. Uritani and H. Kubota (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 150.
7. Hiura, M. (1943) *Gifu Agr. Coll. Japan Research Bull.* 51, 1.
8. Kuć, J. A. (1976) *In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Volume 4, Physiological Plant Pathology*, (R. Heitefuss and P. H. Williams, eds.) pp. 632-652, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
9. Tomiyama, K., T. Sakuma, N. Ishizaka, N. Sato, N. Katsui, M. Takasugi and T. Masamune (1968) *Phytochemistry* 58, 115.
10. Katsui, N., A. Murai, M. Takasugi, K. Imaizumi and T. Masamune (1968) *Chem. Commun.*
11. Cruickshank, I. and D. Perrin (1960) *Nature* 187, 799.
12. Perrin, D. and W. Bottomley (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1919.
13. Stoessl, A., C. Unwin and W. Ward (1972) *Phytopathol. Z.* 74, 141.
14. Stoessl, A., C. Unwin and W. Ward (1973) *Phytopathology* 63, 1225.
15. Uritani, I. and K. Ôshima (1965) *Agric. Biol. Chem.* 29, 641.
16. Ôba, K. and I. Uritani (1975) *J. Biochem.* 77, 1205.

17. Takeuchi, A., K. Ôba and I. Uritani (1977) Agric. Biol. Chem. 41, 1141.
18. Takeuchi, A. and I. Uritani (1981) Agric. Biol. Chem. 45, 1753.
19. Takeuchi, A., M. Yamaguchi and I. Uritani (1981) Phytochemistry 20, 1235.
20. Ôshima, K. and I. Uritani (1968) J. Biochem. 63, 617.
21. Suzuki, H., K. Ôba and I. Uritani (1975) Physiol. Plant Pathol. 7, 265.
22. Ôshima-Ôba, K. and I. Uritani (1969) Plant Cell Physiol. 10, 827.
23. Inoue, H. and I. Uritani (1980) Agric. Biol. Chem. 44, 2245.
24. Tanaka, Y. and I. Uritani (1977) Plant Physiol. 60, 563.
25. Tanaka, Y., M. Kojima and I. Uritani (1974) Plant Cell Physiol. 15, 843.
26. Tanaka, Y. and I. Uritani (1977) J. Biochem. 81, 963.
27. Tanaka, Y. and I. Uritani (1977) Eur. J. Biochem. 73, 255.
28. Garfinkel, D. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 77, 493.
29. Klingenberg, M. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 75, 376.
30. Omura, T. and R. Sato (1964) J. Biol. Chem. 239, 2370.
31. Omura, T. and R. Sato (1964) J. Biol. Chem. 239, 2379.
32. Murphy, P. J. and C. A. West (1969) Arch. Biochem. Biophys. 133, 395.
33. Russell, D. W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3870.
34. Potts, J. R. M., R. Weklych and E. E. Conn (1974) J. Biol. Chem. 249, 5019.
35. Benveniste, I., J. P. Salaün and F. Durst (1977) Phytochemistry 16, 69.
36. Meehan, T. D. and C. J. Coscia (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1043.
37. Madyastha, K. M., T. D. Meehan and C. J. Coscia (1976) Biochemistry 15, 1097.

38. Higashi, K., K. Ikeuchi, Y. Karasaki and M. Obara (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 46.
39. Madyastha, K. M. and C. J. Coscia (1979) J. Biol. Chem. 254, 2419.
40. Rich, P. R. and C. J. Ramb (1977) Eur. J. Biochem. 72, 353.
41. Reichhart, D., J. P. Salaün, I. Benveniste and F. Durst (1979) Arch. Biochem. Biophys. 196, 301.
42. Reichhart, D., J. P. Salaun, I. Benveniste and F. Durst (1980) Plant Physiol. 66, 600.
43. Burka, L.T. and A. Thorsen (1982) Phytochemistry 21, 869.
44. Schneider, J. A., J. Lee, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Oba and I. Uritani (1984) Phytochemistry 23, 759.
45. Ôba, K., K. Ôga and I. Uritani (1982) Phytochemistry 21, 1921.
46. Oguni, I. and I. Uritani (1974) Plant Physiol. 53, 649.
47. Kato, N., H. Imaseki, N. Nakashima, T. Akazawa and I. Uritani (1973) Plant Cell Physiol. 14, 597.
48. Suzuki, N. and I. Uritani (1951) Ann. Phytopathol. Soc. Japan 16, 54.
49. Bray, G. (1960) Anal. Biochem. 1, 279.
50. Masters, B. S. S., C. H. Williams, Jr. and H. Kamin (1976) Methods Enzymol. 10, 565.
51. Mackler, B. (1976) Methods Enzymol. 10, 551.
52. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
53. Hasson, E. P. and C. A. West (1976) Plant Physiol. 58, 473.
54. Hasson, E. P. and C. A. West (1976) Plant Physiol. 58, 479.
55. Burka, L. T. and L. Kuhnert (1977) Phytochemistry 16, 2022.
56. Cohen, B. S. and R. W. Estabrook (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 37.
57. Cohen, B. S. and R. W. Estabrook (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 46.
58. Cohen, B. S. and R. W. Estabrook (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 54.

59. Hildebrandt, A. and R. W. Estabrook (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 66.
60. Estabrook, R. W., A. G. Hildebrandt, J. Baron, K. J. Netter and K. Leibman (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 132.
61. Nisimoto, Y. and Y. Shibata (1982) J. Biol. Chem. 257, 12532.
62. Haniu, M., T. Iyanagi, K. Legesse and J. E. Shively (1984) J. Biol. Chem. 259, 13703.
63. Stern, J. O. and J. Peisach (1975) J. Biol. Chem. 249, 7495.
64. Shimizu, T., T. Nozawa, M. Hatano, Y. Imai and R. Sato (1975) Biochemistry 14, 4172.
65. Jung, C. (1980) Doctoral Thesis, Acad. Sci. GDR, Berlin.
66. Ruckpaul, K. and H. Rein eds. (1984) Cytochrome P-450, Akademie-Verlag Berlin.
67. Hill, A. C. and M. J. C. Rhodes (1975) Phytochemistry 14, 2387.
68. Soliday, C. L. and P. E. Kolattukudy (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 338.
69. Soliday, C. L. and P. E. Kolattukudy (1977) Plant Physiol. 59, 1116.
70. Benveniste, I., J. P. Salaün, A. Simon, D. Reichhart and F. Durst (1982) Plant Physiol. 70, 122.
71. Hagmann, M. L., W. Heller and H. Grisebach (1983) Eur. J. Biochem. 134, 547.
72. Oba, K., H. Tatematsu, K. Yamashita and I. Uritani (1976) Plant Physiol. 58, 51.
73. Hashimoto, C. and Y. Imai (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 821.
74. Lu, A. Y. H. and W. Levin (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1334.
75. Guengerich, F. P. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7931.

76. Ryan, D. E., P. E. Thomas, D. Korzeniowski and W. Levin (1979) J. Biol. Chem. 254, 1365.
77. Masuda-Mikawa, R., Y. Fujii-Kuriyama, M. Negishi and Y. Tashiro (1979) J. Biochem. 86, 1383.
78. Lu, A. Y. H. and M. J. Coon (1968) J. Biol. Chem. 243, 1331.
79. van der Hoeven, T. A., D. A. Haugen and M. J. Coon (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 569.
80. Imai, Y. and R. Sato (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 8.
81. Leprovost, E., J. P. Flinois, P. H. Beaune and J. P. Lerouk (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 547.
82. Saito, T. and H. W. Strobel (1981) J. Biol. Chem. 256, 984.
83. Haugen, D. A., T. A. van der Hoeven and M. J. Coon (1975) J. Biol. Chem. 250, 3567.
84. Ozols, J., F. S. Heinemann and E. F. Johnson (1985) J. Biol. Chem. 260, 5427.
85. Wrighton, S. A., P. Maurel, E. G. Schuetz, P. B. Watkins, B. Young and P. S. Guzelian (1985) Biochemistry 24, 2171.
86. Bonfils, C., I. D. Beluche and P. Maurel (1985) Biochem. Pharmacol. 34, 2445.
87. Omura, T. and R. Sato (1967) Methods Enzymol. 10, 556.
88. Horie, S. (1964) J. Biochem. 56, 113.
89. Keilin, D. and E. F. Hartree (1951) Biochem. J. 49, 88.
90. Kawashima, N. and I. Uritani (1963) Agric. Biol. Chem. 27, 409.
91. Kawashima, N. and I. Uritani (1965) Plant Cell Physiol. 6, 247.
92. Ichikawa, Y. and T. Yamano (1968) Biochim. Biophys. Acta. 153, 753.
93. Tomiyama, K. and M. Fukaya (1975) Ann. Phytopathol. Soc. Japan 41, 418.

94. Yoshikawa, M. (1978) Nature 275, 546.
95. Hargreaves, J. A. (1979) Physiol. Plant Pathol. 15, 279.
96. Cruickshank, I. A. M. and D. R. Perrin (1963) Aust. J. Biol. Sci. 16, 111.
97. Rich, P. R. and D. S. Bendall (1975) Eur. J. Biochem. 55, 333.
98. 市川佳幸、山野俊雄 (1978) 生化学, 50, 77.
99. Ichikawa, Y. and H. S. Mason (1973) In Oxidases and Related Redox Systems. (T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, eds.) Vol. 2, pp. 605-625, University Press, Baltimore.
100. Frear, D. S., H. R. Swanson and F. S. Tanaka (1969) Phytochemistry 8, 2157.
101. Young, O. and H. Beevers (1976) Phytochemistry 15, 379.
102. Benveniste, I., J. P. Salaün and F. Durst (1978) Phytochemistry 17, 359.
103. Saunders, J. A., E. E. Conn, C. H. Lin and M. Shimada (1977) Plant Physiol. 60, 629.
104. Madyastha, K. M., J. E. Ridgway, J. G. Dwyer and C. J. Coscia (1977) J. Cell Biol. 72, 302.
105. Maeshima, M. and T. Asahi (1978) Arch. Biochem. Biophys. 187, 423.
106. Lord, J. M., T. Kagawa and H. Beevers (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2429.
107. Ray, P. M. (1977) Plant Physiol. 59, 594.
108. Lück, H. (1965) In Methods of Enzymatic Analysis. (H. U. Bergmeyer, ed.) pp. 885-894, Academic Press, New York.
109. Fleck, A. and H. N. Munro (1962) Biochim. Biophys. Acta. 55, 571.
110. Karnovsky, M. J. (1965) J. Cell Biol. 27, 137.
111. Reynolds, E. S. (1963) J. Cell Biol. 17, 208.

112. Esaka, M. and T. Asahi (1979) Plant Cell Physiol. 20, 1433.
113. Montague, M. J. and P. M. Ray (1977) Plant Physiol. 59, 225.
114. Shore, G. C. and J. R. Tata (1977) J. Cell Biol. 72, 714.
115. Shore, G. C. and J. R. Tata (1977) J. Cell Biol. 72, 726.
116. Yamaki, S. (1984) Plant Cell Physiol. 25, 151.
117. Bonnerrot, C., A. M. Galle, A. Jolliot and J. C. Kader (1985) Biochem. J. 226, 331.
118. Yasukochi, Y. and B. S. S. Masters (1976) J. Biol. Chem. 251, 5337.
119. Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404.
120. Fan, L. L. and B. S. S. Masters (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165, 665.
121. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680.
122. Ogita, K., E. Kusunose, K. Ichihara and M. Kusunose (1982) J. Biochem. 92, 921.
123. Dignam, J. D. and H. W. Strobel (1977) Biochemistry 16, 1116.
124. Vermilion, J. L. and M. J. Conn (1978) J. Biol. Chem. 253, 2694.
125. Guengerich, F. P. and M. V. Martin (1980) Arch. Biochem. Biophys. 205, 365.
126. Aoyama, Y., Y. Yoshida, S. Kubota, H. Kumaoka and A. Furumichi (1978) Arch. Biochem. Biophys. 185, 362.
127. Iyanagi, T. and H. S. Mason (1973) Biochemistry 12, 2297.
128. Welton, A. F., T. C. Pederson, J. A. Buege and S. D. Aust (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 161.



129. Gum, J. R. and H. W. Strobel (1981) J. Biol. Chem. 256, 7478.
130. Spatz, L. and P. Strittmatter (1974) J. Biol. Chem. 284, 5565.
131. Mihara, K. and R. Sato (1975) J. Biochem. 78, 1057.
132. Spatz, L. and P. Strittmatter (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1042.
133. Tajima, S., K. Enomoto and R. Sato (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 90.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導と励ましを賜りました旭正教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の発端であるところのイポメアマロンからイポメアマロノールへの転換に関する重要性を説かれ、当初より絶えず有益な御指導と御激励を頂戴しました瓜谷郁三名誉教授に深く感謝の意を表します。随時研究に対する明解なる批評をお与え下さり、問題点打削のための討論に参加いただきました名古屋女子大学の久羽和子助教授、名古屋商科大学の岩槻紀夫教授、農林省農業環境技術研究所の田中喜之博士、生物化学研究室の中村研三助教授、前島正義先生、服部東禎先生に厚く御礼申し上げます。

# 報 文 目 録

1. Masayuki Fujita, Kazuko Ôba and Ikuzo Uritani (1981)  
Ipomeamarone 15-Hydroxylase from Cut-Injured and  
Ceratocystis fimbriata-Infected Sweet Potato Root Tissues.  
Agric. Biol. Chem. 45, 1911-1913.
2. Masayuki Fujita, Kazuko Ôba and Ikuzo Uritani (1982)  
Properties of a Mixed Function Oxygenase Catalyzing  
Ipomeamarone 15-Hydroxylation in Microsomes from Cut-Injured  
and Ceratocystis fimbriata-Infected Sweet Potato Root Tissues.  
Plant Physiol. 70, 573-578.
3. Masayuki Fujita and Tadashi Asahi (1985) Different Intracellular  
Localization of Two Cytochrome P-450 Systems, Ipomeamarone  
15-Hydroxylase and Cinnamic Acid 4-Hydroxylase, in Sweet  
Potato Root Tissue Infected with Ceratocystis fimbriata.  
Plant Cell Physiol. 26, 389-395.
4. Masayuki Fujita and Tadashi Asahi (1985) Purification and  
Properties of Sweet Potato NADPH-Cytochrome c (P-450)  
Reductase. Plant Cell Physiol. 26, 397-405.
5. Masayuki Fujita (1985) Stimulation of Cytochrome P-450  
Synthesis in Sliced Sweet Potato Root Tissue by Chemicals  
Applied to Surface. Agric. Biol. Chem. 49, 3045-3047.