

報告番号 [※]乙 第 2990号

主論文の要旨

題名 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

氏名 藤田政之

主論文の要旨

報告番号

※²甲第

号

氏名

藤田政之

1. サツマイモ塊根組織におけるイポメアロンからイポメアロノールへの転換が酵素的に起こることを立証し、この転換に参与する酵素を *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*-クロロマーキュリ安息香酸をはじめとする SH 酵素阻害剤により、顕著に阻害された。さらに、チクロム c や *p*-ベンゾキノ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 により、顕著に阻害された。この CO 阻害は光により抑えられた。以上の結果により、*ipomeamarone 15-hydroxylase* はチクロム P-450 関与の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ったが、傷害組織ではやや多く、病害組織では非常に多かった。また組織を $HgCl_2$ や $CdSO_4$ などにより処理すると、ミクロソーム画分のチクロム

P-450の含量が増大した。HgCl₂とフェニルイソシアニドの両方で処理した組織においては、その含量が顕著に多くなり、198 pmol/mg microsomal proteinであった。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った。

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の回転回数を求めたところ、その値は1に満たなかった。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った。黒斑病菌の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日で最大になった。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であった。

6. Ipomeamarone 15-hydroxylaseと cinnamic acid 4-hydroxylaseの細胞内局在性は明らかに異なっていた。直線スクロ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。病傷害組織の 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、ゴルジ装置およびマイクロボディ由来のものではないかと。なお、病傷害組織においては、僅かな cinnamic acid 4-hydroxylase 活性が ipomeamarone 15-hydroxylase 活性画分にも検出された。

7. 病傷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、その膜結合ドメインを欠落した親水性の活性ドメインであ

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。