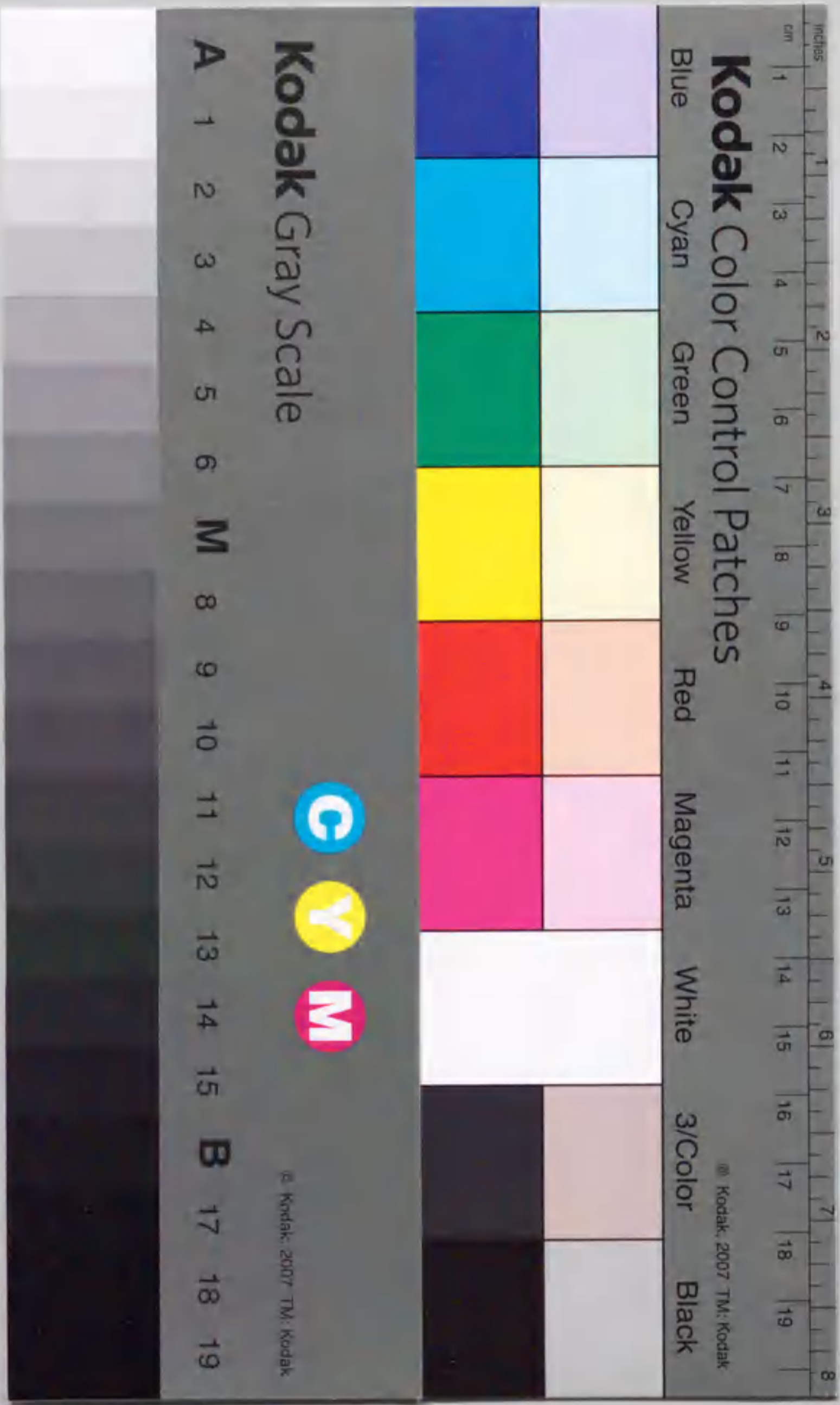


モノフェノール化合物の水酸化反応に
関する生化学的研究

竹内 若子



報告番号 乙 - 4666 号

①

モノフェノール化合物の水酸化反応に
関する生化学的研究

竹内若子

目 次

第1章 序 論	1
---------	---

第2章 黒緑豆 (<i>Vigna mungo</i>) 実生中の 膜結合型p-coumaric acid hydroxylaseの 検出とその性質	
--	--

1. 緒 言	19
2. 材料および方法	22
3. 結 果	33
4. 考 察	50

第3章 黒緑豆実生中の可溶性ポリフェノールオキシダーゼ 主要アイソザイムの精製とその酵素学的諸性質	
--	--

1. 緒 言	53
2. 材料および方法	54
3. 結 果	59
4. 考 察	64

第4章 ポリフェノールオキシダーゼによる水酸化反応における

電子供与体要求性の解析

1. 緒言	66
2. 材料および方法	68
3. 結果	70
4. 考察	79

第5章 p-Coumaric acidの非酵素的な水酸化

1. 緒言	80
2. 方法	81
3. 結果	82
4. 考察	90

第6章 総合考察 92

要旨	100
----	-----

文献	104
----	-----

謝辞	108
----	-----

略号表

D, L-dopa: D, L- β -(3,4-dihydroxyphenyl)
alanine

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FAD : flavin adenine dinucleotide

FMN : flavin mononucleotide

NADH : nicotinamide adenine dinucleo-
tide (reduced form)

NADPH : nicotinamide adenine dinucleo-
tide phosphate (reduced form)

PAGE : polyacrylamide gel electropho-
resis

SDS : sodium dodecyl sulfate

TLC : thin layer chromatography

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

第 1 章

序 論

動物においては二次代謝はほとんど存在しない。これに対し、植物においては二次代謝は非常によく発達している。この二次代謝における動物と植物の間の違いは、動物は動くことができるが、植物は一度芽を出した場所から一生動けないという基本的な差に起因しているようにみえる。

植物は自分が動く代わりに、花の色（アントシアニン）や香りで虫を誘引し、受粉させる。また、草食動物から逃れるためにアルカロイドなどの有毒物質を蓄積する。植物は周囲の植物との競争に打ち勝ち、生育場所を確保するために生育阻害物質を周囲の土中や空中へ放出する。樹木は風によって倒されないよう、*lignin*を細胞壁に沈着させ自身の構造

を強靱にする。

古くより人間は植物がつくる二次代謝物を利用してきた。動物の皮をなめすためにタンニンを、またアルカロイドを医薬として利用してきた。漢方薬や生薬の有効成分のほとんどは二次代謝物である。また、二次代謝物は染料や香料としても利用されてきた。合成化学の進歩した現代においても、植物の二次代謝物は有用物質の宝庫としての位置を保っている。

植物のつくる無数に近い二次代謝物はその生合成経路と化学構造により、次の11のグループに分類される。(1)フェノール化合物、(2)アルカロイド、(3)テルペノイド、(4)ステロイド、(5)カロチノイド、(6)非タンパク性アミノ酸、(7)植物アミン、(8)シアン配糖体、(9)クロマノール(chromanols)、(10)グルコシノレート(glucosinolates)、(11)ベタレイン(betalains)。

上記, 二次代謝物の中でフェノール化合物は植物界に広く分布し, 種類も多く, 且つ含量も高く, 主要な位置を占めている. フェノール化合物とは水酸基置換した芳香環をもつ化合物の総称で Table 1 に示したような化合物が含まれる. Fig. 1 には代表的な植物フェノール化合物の構造を示した.

フェノールは化学的に反応性に富む物質で, 酸性物質である. 水酸基はカルボニル基と水素結合をしばしば形成する. この性質のためにフェノールはタンパク質の peptide 結合とも相互作用をする. Diphenol は特に金属イオンとキレート化合物を形成しやすい. フェノールは容易に酸化されやすい. これらの諸性質はフェノール化合物の機能や役割を考える上で重要な性質である.

Catechol などの単純フェノール (simple phenol) は単独で存在するのは稀であり, 複雑なフェノールの構成成分として存在している. 一方, phenolic acid は単独で植物界中に

Table 1. The major classes of phenolics in plants

Basic skelton	Class	Examples
C ₆	Simple phenols Benzoquinones	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
C ₆ -C ₁	Phenolic acids	<i>p</i> -Hydroxybenzoic, salicylic
C ₆ -C ₂	Acetophenones Pheniacetic acids	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde <i>p</i> -Hydroxyphenylacetic
C ₆ -C ₃	Hydroxycinnamic acid Phenylpropenes Coumarins Chromones Isocoumarins	Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Eugenin Bergenin
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferin
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenes Anthraquinones	Lunularic acid Emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoids Isoflavonoids	Quercetin, cyanidin Genistein
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignans Neolignans	Pinoresinol Eusiderin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoids	Amentoflavone
(C ₆ -C ₃) _n	Lignins	
(C ₆) _n	Catechol melanins	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Flavolans (Condensed tannins)	

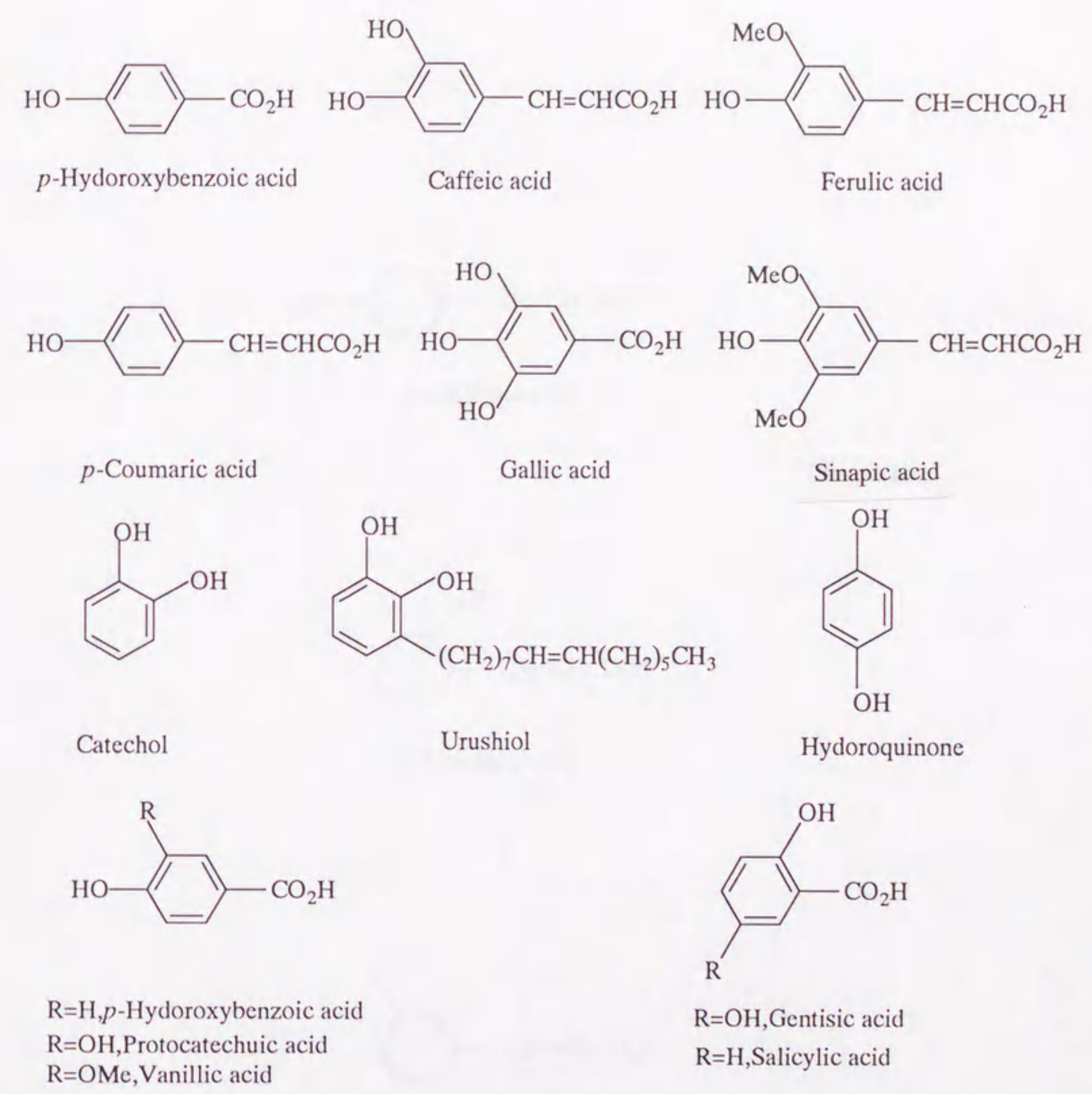
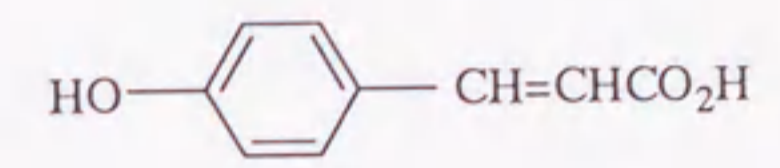
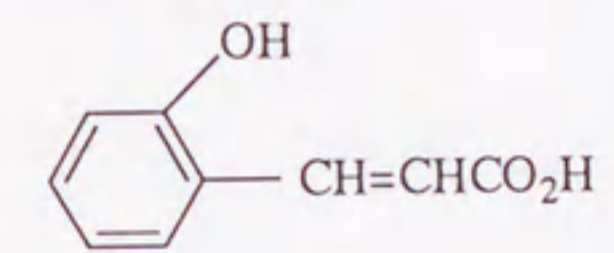


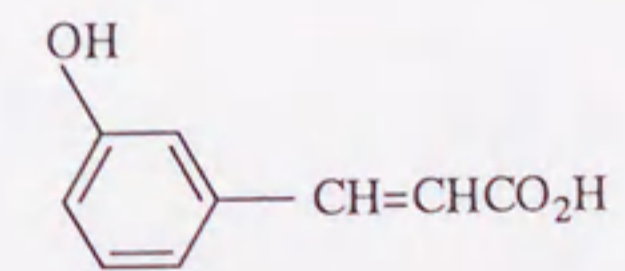
Fig. 1 Structures of Plant Phenolics (1)



p-Coumaric acid

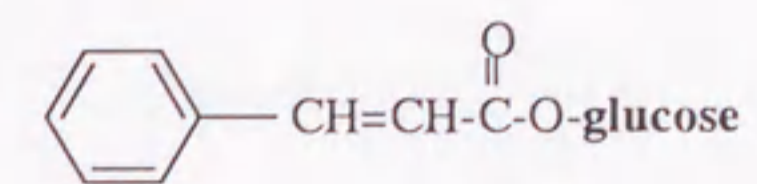


o-Coumaric acid

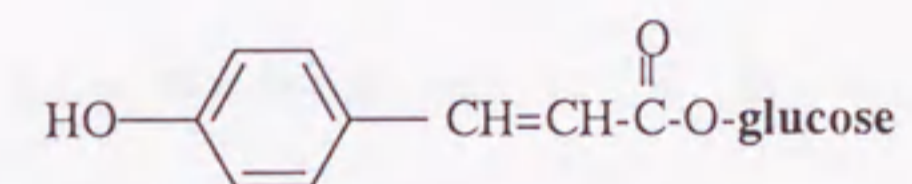


m-Coumaric acid

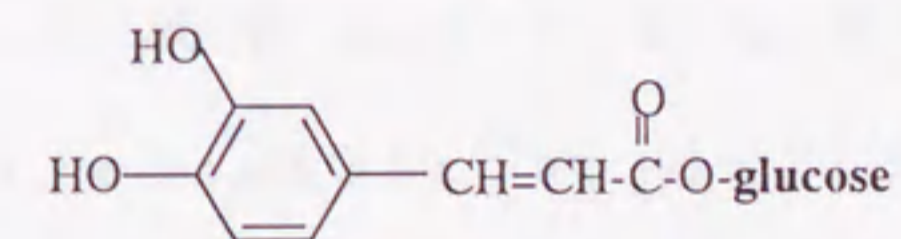
Fig. 1 Structures of Plant Phenolics (2)



t-Cinnamoyl-D-glucose



p-Coumaroyl-D-glucose



Caffeoyl-D-glucose

Fig. 1 Structures of Plant Phenolics (3)

広く分布している。例えば, gentisic acid や salicylic acid は被子植物中に広く存在している。

芳香環に C₃ の脂肪族側鎖をもつ phenyl-propanoids は植物界に普遍的に存在しており, この中の代表的なものは p-coumaric acid や caffeic acid である。p-coumaric acid は coumarin や lignin の前駆体にもなっている。Caffeic acid は depside chlorogenic acid として存在している。Ferulic acid はサトウ大根や穀類の種子中に遊離の形で存在し, 発芽阻害物質として機能していると考えられている。o-Hydroxycinnamic acids のラクトンである coumarins も植物中に広く存在している。これらのクマリンは "乾草臭" の本体である。

現在までに 2,000 種以上の flavonoids が分離されている。これらの flavonoids は中央の pyran ring の酸化程度に基づいて 12 のグループに分類される。このうち, 重要なものは anthocyanins, flavones, flavonols の 3 つ

である。Anthocyanは有色であるが、flavonesは無色の物質である。Chalconesとauro-nesは黄色の色素である。Flavanonesやdihydroflavonolsは植物界に広く存在しているが、これらはその構造から推して、flavonoidsの生合成中間体である可能性が高い。

このグループに属するphloridzinはリンゴなどのMalus属の植物に含まれている。本物質は強い苦みをもち、動物の食害を免れる働きをしている¹⁾。本物質はまた強い植物成長阻害活性も示す。

Dihydroflavonolsに属するcatechinは茶の葉に多く含まれ、茶の味、香り、色に大きく寄与している。殺虫剤として知られているrotenoneはisoflavonesの一種である。

Rotenoneは、呼吸鎖を阻止し、NADH-dehydrogenaseも阻害する²⁾。

Stilbenに属するlunuluric acidは全ての苔類に含まれている。本物質は成長阻害活性をもち、高等植物におけるabscisic acidの代わ

りをしているものと考えられている³⁾。この他, stilbenには phytoalexinsとして生合成され, 強い抗菌活性をもつ物質が含まれている。

Quinonesも植物より分離されているが, quinonesは非常に反応性に富み毒性が強いことから, 生体中では還元された p-quinolsの形で存在しているものと考えられる。植物の葉緑体中には plastoquinonesが存在し, ミトコンドリア(植物だけでなく動物も含めて)には ubiquinonesが存在する。これらの quinonesは電子伝達系において必須の役割を担っている。

フェノール化合物は生体中において遊離の形で存在するものもあるが, 多くの場合結合体の形で存在している。フェノール性水酸基にグルコースが β -D-glucopyranosideの形で結合しているのが一番よくある例である。このように, フェノールが結合型で存在する理由の一つはフェノール性水酸基の反応性が高く, 有害であるからであろう。このような見

解は植物間における allelopathic 反応から得られる知見によっても支持される。

Hydroquinone や salicylic acid は植物中では結合型で存在しているが、それらが葉や根から土中へ放出され、遊離型になると阻害活性が増強され、周りの植物の生育を阻害する⁴⁾。

Flavonoids 中にある多数の水酸基はあらゆる組合せのパターンで糖との結合物をつくっている。このような配糖化の真の理由は複雑であるかも知れないが、その一つの結果としては配糖化することによって vacuole に隔離化されるのに都合よくなることである。

Flavonoids は少量であるが葉緑体中にも存在している。この葉緑体中の flavonoids は常に配糖化されている。Flavonoids の配糖化は色の変化にも関係している。Flavonoids の色調は糖の結合位置によっても変化する。

Hydroxycinnamic acids は他のフェノール化合物よりも広い範囲の物質と生体内で結合物を形成している。最も頻度が高いのは qui-

nic acidとの結合物である。有機酸, 糖, アミノ酸, 脂質, terpenoid とも結合物をつくっている。Ferulic acid はタンパク質, セルロース, ヘミセルロースとも結合している。フェノール化合物の炭素骨格の生合成経路の概略は Fig. 2 に示すように既に明らかにされている。上記のようにフェノール化合物の化学構造は多様であるが, これらのフェノール化合物の全てが L-phenylalanine よりつくられる。L-Phenylalanine はホスホエノールピルビン酸とエリスロース 4-リン酸よりシキミ酸経路で生合成される。

Phenylalanine を下記の反応で脱アミノして, フェノール化合物生合成の共通中間体である *t*-cinnamic acid を生成する酵素, phenylalanine ammonia lyase (PAL) は 1961 年に Koukol と Conn によって発見された⁵⁾ (Fig. 3)。

PAL は多数の植物より分離, 精製されその性質が詳しく調べられている。ほとんどの PAL は product である *t*-cinnamic acid やフェノー

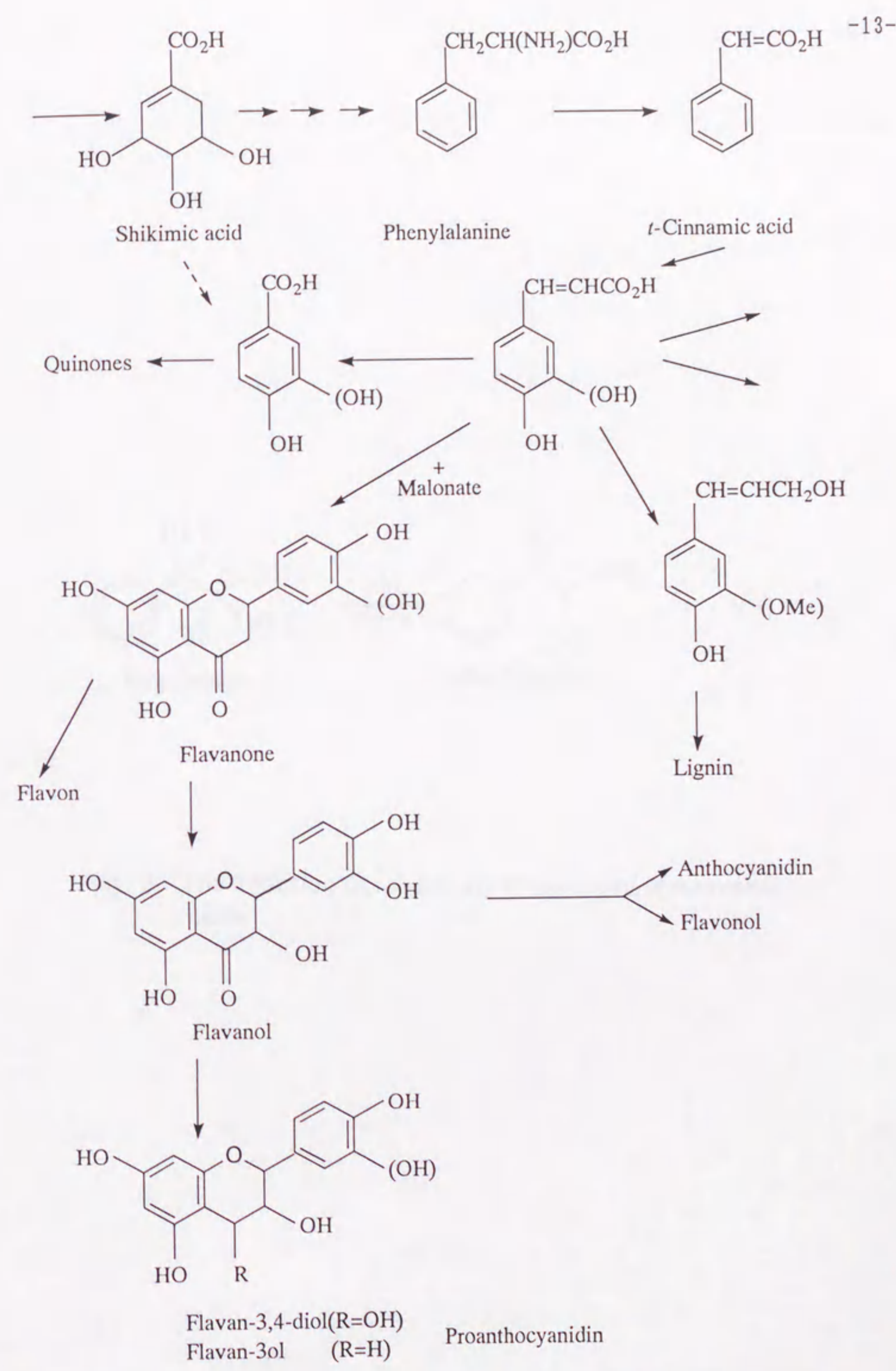


Fig. 2. Biosynthetic Origin of Plant Phenolics from Shikimate and Phenylalanine

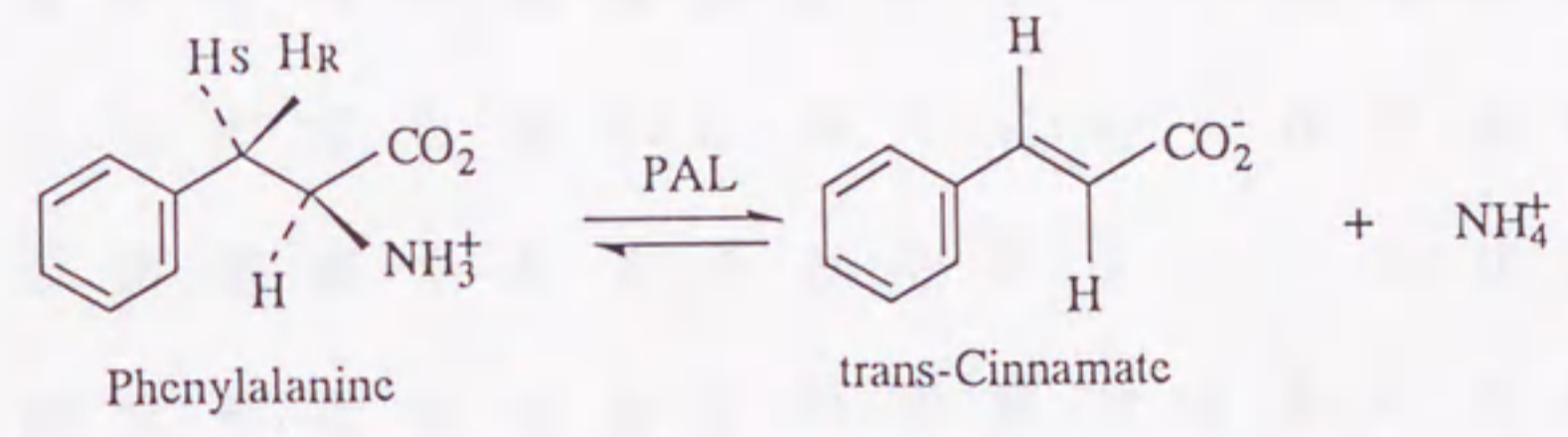


Fig. 3. The Reaction Catalyzed by Phenylalanine Ammonia Lyase

フェノール生合成経路の下流の中間体によって阻害される。Boudetらはカシの葉の中に2つのPALのアイソザイムがあり、一方のアイソザイムはbenzoic acidの生合成に働き、一方のアイソザイムはlignin生合成に関与していると提唱している⁶⁾。PALは光、温度、傷害などの多種の環境刺激によって誘導合成される。このことはPALがフェノール化合物生合成の鍵酵素であることやフェノール化合物の機能を考えると合目的現象であると理解される。

フェノール化合物はフェノール性水酸基を1つもつ monophenol と2つ以上の水酸基をもつ polyphenol に分類される。1番目の水酸基は生合成の初期のL-phenylalanine から生じた *p*-cinnamic acid のレベルで導入されることが明らかにされている。この反応を触媒する酵素 cinnamic acid 4-hydroxylase も Connらによって発見された⁷⁾。

この酵素はチトクロムP-450を含む mixed

function oxidaseである。チトクロム P-450は1958年に, GarfinkelとKlingenbergにより発見され^{8), 9)}1964年大村と佐藤によってヘムタンパク質であることが証明された^{10), 11)}。

P-450は還元状態でCOを結合させると450 nmに特有なSoretバンドを示すことにその名の由来がある。チトクロム P-450は動物においては薬物代謝に関与することから古くから研究が進んでいるが, 高等植物においては含量も低いこともあり, 研究が遅れている。

2番目以降のフェノール性水酸基の導入に関してはまだ確定していない。2番目以降の水酸基が生合成のどの段階で導入されるか確定しているフェノール成分は多くない。結合物をつくる前に導入される水酸基も, 結合物をつくった後に導入される水酸基もある。また, その反応に関与する水酸化酵素についても殆ど解明されていない。

1番目の水酸基を導入する cinnamate-4-hydroxylase が microsomeにある P-450チトク

ロム酵素であることから、2番目以降の水酸基導入に関与する酵素もmicrosomeにあるP-450酵素であることを予想して多くの試みがなされてきた。Diphenolであるchlorogenic acidを多量に合成するサツマイモ塊根のmicrosome画分には強いcinnamate-4-hydroxylase活性が検出される。ところがp-coumaric acid hydroxylase活性は全く検出されない。黒緑豆実生のmicrosome画分にもcinnamate-4-hydroxylase活性が検出される。しかし、この場合にもチトクロムP-450酵素のp-coumaric acid 4-hydroxylaseは検出されない。しかし、サツマイモ塊根や黒緑豆実生の粗抽出液の可溶性タンパク質画分にL-ascorbic acidなどの電子供与体を加えるとp-coumaric acidをcaffeic acidに水酸化する酵素活性が検出される。この酵素の示す諸性質より、この反応にはpolyphenol oxidase (tyrosinaseやphenolaseとも呼ばれる)が関与していることが推定された。

Polyphenol oxidase は植物界に広く分布する酵素であり, *o*-diphenol を *o*-quinone に酸化する活性をもつ。本酵素はこの酸化活性だけでなく, L-ascorbic acid などの電子供与体の存在下で monophenol を水酸化する酵素活性も示す bifunctional enzyme である。しかし, 生体内で酸化酵素として機能しているのか, 水酸化酵素として機能しているのかについてはまだ確定しておらず, 研究者によって意見の分かれるところである。

本研究は黒緑豆実生中での *p*-coumaric acid の caffeic acid への水酸化反応に関与している酵素を特定し, その酵素および反応を解析することを主な目的として行ったものである。さらに, 本研究の過程で見出された tyrosinase の電子供与体要求性の基質による差や, 非酵素的 *p*-coumaric acid の水酸化反応についても解析が行われた。

第 2 章

黒緑豆 (Vigna mungo) の実生中の膜結合型 p-coumaric acid hydroxylase の検出とその性質

1. 緒 言

高等植物には chlorogenic acid (3-o-caffeoyl quinic acid) や flavonoids 等の caffeic acid を構成成分としてもつ各種ポリフェノール類が存在している。黒緑豆 (Vigna mungo) 実生中には flavonoid に属する rutin や anthocyanin が多量含まれている^{1,2)}。これらのポリフェノール成分の caffeic acid 部分は L-phenylalanine より合成される p-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid) に由来することがラジオアイソトープを用いたトレーサー実験によって明らかにされている^{1,3)}。

L-Phenylalanineより p-coumaric acidを生成する反応を触媒する L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と t-cinnamic acid hydroxylaseの2つの酵素は既に様々な植物より分離され、その性質についてもよく調べられている¹⁴⁾。しかし、p-coumaric acidより caffeic acidへの水酸化反応を触媒する酵素についてはいまだ確定されていない。

Kamsteegらは Silene dioica (ナデシコ) 花弁中に p-coumaroyl-CoAから caffeoyl-CoAへの水酸化反応を触媒する酵素を検出した。本酵素は NADPH と FAD の両方を必要とする mixed function oxidase であると報告されている¹⁵⁾。同様の活性を示す酵素が Boniwellと Buttによってジャガイモ塊茎中にも検出されている¹⁶⁾。本酵素は NADHと FADの共存下で p-coumaric acidや L-tyrosineのような4-ヒドロキシフェニルプロパノイドカルボン酸を水酸化する。しかし、上記の酵素と同類の酵素はナデシコとジャガイモ以外の植物では検

出されていない。

多くの植物中に見い出される polyphenol oxidase (phenolase または tyrosinase とも呼ばれる。以下 PPO と略記する) は, in vitro でポリフェノールを酸化するだけでなく, L-ascorbic acid などの電子供与体が共存すると p-coumaric acid のような monophenol を水酸化する活性も示すことが知られている¹⁷⁾。しかし, in vivo で PPO がポリフェノール成分の生合成に関与していることについては反論もある^{14), 18)}。Duke と Vaughn は Alternaria alternata (Fr.) Keissler がつくる tentoxin (環状ペプチド) という phytotoxin で黒緑豆実生を処理した¹⁸⁾。Tentoxin で処理した実生中では PPO 活性が完全に消失していたにも関わらず, caffeic acid 成分は正常に生合成されていた。この結果から, フェノール化合物の生合成に関与しているのは PPO でなく別の酵素であると主張した。そこで tentoxin 処理した黒緑豆実生中の p-coumaric acid を

caffeic acidへ水酸化する反応に関与している酵素を検出すべく本実験を行った。

上記研究において, DukeとVaughnは可溶性画分についてのみ酵素活性を測定し, 沈澱画分(膜画分)については注目しなかった。本章ではTentoxin処理した実生から調製した沈澱画分(膜画分)に新しい *p*-coumaric acid hydroxylaseを見出し, その性質をポリフェノール成分の生合成との関連で調べた。

2. 材料および方法

Tentoxin [cyclo(N-methyl-L-alanyl-L-leucyl-N-methyl-trans-dehydrophenyl-alanyl-glycyl)], catalase(牛肝), および tyrosinase(mushroom)はSigma社より購入した。Miracloth, セルロース薄層プレート(アピセルSF, 10×10cm)はフナコシ薬品K.K.より購入した。

1) 植物材料

黒緑豆 (*Vigna mungo*) 実生は下記のような方法で生育させたものを試料とした。黒緑豆の種子を0.5%次亜塩素酸ナトリウム液に10分間浸漬して殺菌後、30分間水洗した。この種子を80 μ Mのtentoxin溶液(100 μ l/seed)中、27 $^{\circ}$ Cで24時間吸水させた。吸水後、種子を2mM CaSO₄を含むパーミキュライト上に蒔き、27 $^{\circ}$ C、暗所で3日間生育させた後、光照射(4,200 lx)下で1日間生育させた。なお、コントロールには、80 μ Mのtentoxin溶液の代わりに水を用い、同一条件下で生育させた実生を用いた。Tentoxin処理実生は光照射しても全く緑化しなかったが、生育速度はコントロールの実生との間に有意な差はみられなかった。

2) p-Coumaric acid hydroxylaseの抽出および活性測定

酵素溶液の抽出およびその活性測定は Duke

らの方法¹⁸⁾を一部変更して行った。黒緑豆実生(約4g)をD-sorbitol(0.7M), EDTA(1mM)および海砂を少量含む氷冷した10mM Na₂HPO₄-citric acid buffer(pH5.3, 14ml)中で乳鉢を用い磨砕した。磨砕液を40×gで3分間遠心して海砂や残渣を除去し, その後さらに13,000×gで15分間遠心した。得られた上清画分はそのまま活性測定に用い, 沈澱画分は上記抽出buffer(pH5.3)1.5mlに再懸濁し, 膜結合型酵素の活性測定のために用いた。酵素反応液はp-coumaric acid(1.5μmol), NADPH(0.3μmol), catalase(1,400units)および(NH₄)₂SO₄(200μmol)を含む40mM Na₂HPO₄-citric acid buffer(pH5.3)に酵素溶液を加えて最終液量を500μlとした。反応液中の(NH₄)₂SO₄は酵素の活性化剤として, またcatalaseは粗酵素液中に含まれるperoxidaseによるp-coumaric acidの酸化反応を防止するために加えられたものである。また電子供与体には特別な場合を除きNADPHを

用いたが、2~3の実験においては L-ascorbic acid を用いた。反応液を 30 °C で 1 時間振とうしながらインキュベートしたあと、50 μ l の 12N HCl と 0.5 ml の飽和硫安を加えて反応を停止させた。停止後の反応液に 3 ml の酢酸エチルを加えてよく振とう混和後、1.670 \times g で 10 分間遠心し上層の酢酸エチル抽出液を回収した。この操作を 2 回繰り返した後、得られた酢酸エチル層を減圧下で濃縮し、濾紙 (Whatman No1, 3 \times 45 cm) にバンド状に塗布した。展開溶媒としてベンゼン : 酢酸 : 水 (40 : 10 : 1, v/v) 混液の上層を用いて下降法で展開した。展開後、ペーパーを風乾し、波長 302 nm のトランスイルミネーター (TM-15, Ultra-Violet Products) で反応生成物である caffeic acid の蛍光バンド (Rf 0.3) を検出して、そのバンドを切り取り、細かく刻みエタノール : 水 (2 : 1, v/v) 混液 2.5 ml に浸漬し溶出した。溶出液の 320 nm における吸光度を測定し、反応生成物量を算出した。検

量線は caffeic acid をサンプルと同様に処理し作成した。なお、1 時間に 1 nmol の caffeic acid を生成する酵素活性を 1 unit とした。

3) PPO の活性測定

PPO 活性は Duke らの方法¹⁸⁾を一部変更して測定した。即ち DL-(3,4-dihydroxyphenylalanine (DL-dopa, 25 μ mol) と catalase (1,400 units) を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) に酵素溶液を加えて最終液量を 1.25 ml とした反応液を 25°C で反応させ、490 nm における吸光度の経時的変化を追跡した。Catalase は peroxidase による基質の酸化を防止するために添加した。酵素活性は 490 nm における吸光度の変化率で示し、1 分間に OD₄₉₀ を 0.001 増大させる酵素の活性を 1 unit とした。

4) *t*-Cinnamic acid 4-hydroxylase の抽出およびその活性測定

黒緑豆実生 (約 4g) を D-sorbitol (0.7M)

, EDTA (1mM), Na-L-ascorbate (37mM), Polyclar AT (0.5g) および海砂 (約1g) を含む氷冷した50mM Tris-HCl buffer (pH8.5) 20 ml中で乳鉢を用いて磨砕した。磨砕液を3,000×gで10分間遠心し, 得られた上清画分を再び94,000×gで70分間遠心して沈澱を回収した。この沈澱を2 mlの50mM Tris-HCl buffer (pH8.0) に懸濁して酵素溶液とし, Lambらの方法¹⁹⁾に準じ活性を測定した。

5) Phenylalanine ammonia lyase (PAL) の抽出およびその活性測定

黒緑豆実生 (約4g) をβ-mercaptoethanol (0.1μmol) と海砂 (約1g) を含む氷冷した100 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) 10 ml中で乳鉢を用いて磨砕した。磨砕液を20,000×gで15分間遠心後, 上清画分を分取した。得られた上清画分に固形硫酸を加え, 60% 飽和溶液とし, 1時間4℃で放置後, 再び20,000×gで15分間遠心し, 沈澱を回収した。沈澱を2 ml

の 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) に溶解し、これを酵素溶液とした。活性の測定は Raoらの方法によった²⁰⁾。酵素反応液は L-phenylalanine (10 mM) を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) に酵素溶液を加えて最終液量を 1.0 ml とし、30°C で 1 時間インキュベートした。250 μ l の 1 N HCl を添加して反応を停止させた後、3 ml のエチルエーテルを加えてよく振とうし、エーテル層を分取した。分取したエーテル層の一部または全部を蒸発乾固したあと、1 ml の 0.05 N NaOH 溶液を加えて溶解し、268 nm における吸光度を測定し、生成した *l*-cinnamic acid を算出した。1 unit の酵素活性を上記の測定条件で 1 分間当り 1 nmol の *l*-cinnamic acid を生成する活性と定義した。

6) 総フェノール含量の定量

実生 (約 4 g) を 80% エタノール中で煮沸した後、乳鉢に移し磨砕した。磨砕液を遠心 (1,670 \times g, 5 分間) し、得られた上清をエタノ

ール抽出液とした。エタノール抽出液中のポリフェノール含量はZuckerらの方法を用いて定量した²¹⁾。検量線はcaffeic acidを用いて作成した。エタノール抽出液を予め水洗しておいた活性アルミナ (Aluminiumoxid 90, Merck社製) のカラム ($\phi 1 \times 3$ cm) に添加した。その後2 mlの80%エタノールと5 mlの蒸留水でカラムを洗浄した。カラムに吸着したフェノール成分を発色させるために、使用直前に調製した5 mlのHöpfnerの試薬 (0.5%亜硝酸ナトリウム: 5%酢酸 (1:1) 混液) と5 mlの蒸留水をカラムに流した。その後カラムから5 mlの5N NaOH溶液と5 mlの蒸留水で発色色素を溶出し、溶出液の525 nmにおける吸光度を測定した。

7) p-Coumaric acid hydroxylaseの至適pH

本酵素活性を60 mMの下記の各種buffer中で測定した。

pH4.5~6.5; Na_2HPO_4 -citric acid buffer

pH 6.0 ~ 8.0; phosphate buffer

pH 7.0 ~ 8.5; Tris-HCl buffer

8) p-Coumaric acid hydroxylaseの基質特異性

各種化合物 (1.5 μ mol) を上記2)に記した反応液中で30℃で90分間反応させた。反応生成物を反応液より上記の方法で酢酸エチルで抽出し、濃縮後 Avicel 薄層にスポットし、ベンゼン : 酢酸 : 水 (40 : 10 : 1, v/v) の展開溶媒で展開後、UV-ランプ (302 nm, 260 nm) または 塩化鉄 - 赤血塩混液をスプレーし反応生成物の検出をした。Tyrosine を基質とした時には、反応生成物の L-dopa は酢酸エチル層に移行しないと予想されたので 12-HCl (50 μ l) を添加して反応停止後、反応液を直接 Avicel プレートにスポットした。そのプレートをメチルイソブチルケトン : 蟻酸 : 水 (14 : 3 : 2, v/v) の溶媒系で展開後、ninhydrin 試薬をプレート上にスプレーして

反応生成物を検出した。

9) PPOのサツマイモ塊根からの調製

サツマイモを切片(2 mm, 25g)にし, 25℃で24時間インキュベートし, PPOを誘導合成させた後, 50 mlの10 mM phosphate buffer (pH 6.5) 中でNa-iso-ascorbate (0.5 g) と少量の海砂と共に氷冷した乳鉢中で磨砕した。磨砕液を3,000×gで5分間遠心し, 得られた上清を予め10 mM phosphate buffer (pH 6.5) で平衡化したSephadex G-25のカラム(3×60 cm) にかけて, void volume画分を回収した。この画分に70%飽和になるように硫酸を加え, 1時間放置後, 40,000×gで20分間遠心して沈澱を回収した。沈澱を少量の10 mM phosphate buffer (pH 6.5) に溶解し, これを粗酵素液として用いた。

10) ショ糖密度勾配超遠心による細胞分画

Tentoxin処理した黒緑豆実生の子葉(12 g)

を氷冷したペトリ皿上で、D-sorbitol (0.7M) と EDTA (1 mM) を含む 10 mM citrate buffer (pH5.3) 6 ml 中でカミソリの刃を用い chopping した。Miracloth で濾過後、濾液 (2 ml) を 15-50% の直線的密度勾配のショ糖溶液 (15 ml) の上に重層し、Beckman SW 27-1 ローターを用い、82,500 × g で 120 分間遠心した。遠心後、density gradient fractionator (ISCO 社製) にかけて 0.6 ml ずつ分画し、各分画中の p-coumaric acid hydroxylase 活性を上述の方法で測定した。また、cytochrome c oxidase は Maeshima らの方法²²⁾で、antimycin A 感受性 NADPH-cytochrome c reductase は Fujita らの方法²³⁾に準じ測定した。なお、各画分の密度は屈折計を用いて測定した。

3. 結 果

1) Tentoxin処理した黒緑豆実生中の膜結合型 p-coumaric acid hydroxylaseの検出

Fig. 5に示したようにポリフェノール化合物の生成速度は3日間暗所で生育させた後、1日光照射下で生育させると急激に上昇する。そこで3日間暗所で生育させたあと1日光照射した黒緑豆の実生を酵素源として用いた。

DukeとVaughnは、tentoxin処理した黒緑豆実生より調製した13,000×g(15分間)の上清画分にはPPO活性とp-coumaric acid hydroxylase活性は全く検出されないと報告している¹⁸⁾。彼らは13,000×gの沈澱画分のこれら酵素の活性は測定していない。そこで本研究ではtentoxin処理した黒緑豆実生より調製した13,000×gの沈澱画分についてもL-ascorbic acidを電子供与体として用い、p-coumaric acid hydroxylase活性を測定した。沈澱画分にp-coumaric acid hydroxylaseの活性が検出

された。

反応生成物はインキュベーション時間と共に増加し、反応時間零分で反応を止めた反応液中には生成物は検出されなかった。また、沸騰浴中で加熱処理した酵素液を用いた場合や基質の *p*-coumaric acid を加えずに酵素反応させた場合にも反応生成物は検出されなかった。反応液から *L*-ascorbic acid を除いた場合には、微量（完全酵素反応の 8 %）の生成物が検出された。この弱い酵素活性は粗酵素液中に含まれる内在性の電子供与体によって進行したものと考えられる。窒素ガス中では 72 % も活性が低下することから、本酵素は分子状酸素要求性の oxygenase であると考えられる。反応生成物は caffeic acid 標品と全く同じ UV-スペクトルを与え、その吸収ピークは 320 nm であった。アルカリ条件下で吸収ピークは長波長側にシフトした。また反応生成物は Avicel プレートと 5 種類の溶媒系を用いた TLC で caffeic acid 標品と同じ R_f 値を示した。

5 種類 の 溶 媒 系 と そ の Rf 値 は 下 記 の 通 り で あ
る .

1) ベ ン ゼ ン : 酢 酸 : 水 (4 0 : 1 0 : 1 , v/v)

$$R_f = 0.3$$

2) 5% 酢 酸 溶 液 $R_f = 0.61$ (cis)

$$R_f = 0.22$$
 (trans)

3) n-ブ タ ノ ール : 酢 酸 : 水 (2 0 : 5 : 1 1 ,
v/v) $R_f = 0.8$

4) メ チ ル イ ソ プ チ ル ケ ト ン : 蟻 酸 : 水
(1 2 5 : 7 2 : 3 , v/v) $R_f = 0.93$

5) イ ソ プ ロ パ ノ ール : 25% ア ン モ ニ ア 水 : 水
(8 : 1 : 1 , v/v) $R_f = 0.19$

さ ら に , プ レ ー ト 上 の 反 応 生 成 物 の ス ポ ッ
ト は caffeic acid 標 品 と 同 様 に ア ン モ ニ ア 蒸
気 に 曝 す と , 黄 色 を 帯 び た 蛍 光 を 示 し た .
以 上 の 結 果 よ り , 反 応 生 成 物 は caffeic acid
と 同 定 さ れ た .

2) 上 清 画 分 と 沈 澱 画 分 の p-coumaric acid
hydroxylase 活 性 と PPO 活 性

水処理（コントロール）および tentoxin 処理実生から調製した $13,000 \times g$ （15 分間）の上清画分と沈澱画分における p-coumaric acid hydroxylase および PPO の活性を測定した（Table 2）。コントロールのサンプルでは上清画分、沈澱画分ともに両酵素の高い活性が検出された。一方、tentoxin 処理したサンプルの上清画分では Dukeらの報告¹⁸⁾と一致して両酵素活性が全く検出されなかった。しかし、沈澱画分には、PPO 活性（caffeic acid を基質として用いた）は pH 4.5 ~ 8.5 の pH 域で全く検出されなかったが、p-coumaric acid hydroxylase 活性は検出された。種子を過剰量の $80 \mu M$ tentoxin 溶液で 2 日間吸水させたあと、発芽、生育させた実生でも上記沈澱画分中に同じレベルの p-coumaric acid hydroxylase が検出された。この結果は上記の沈澱画分中に検出された p-coumaric acid hydroxylase は tentoxin 処理が不十分のために残存している活性でないことを示している。

Table 2. Activities of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase and Polyphenol Oxidase in Supernatant and Precipitate Fractions at 13,000 ×g from Tentoxin-treated and Control Mung Bean Seedlings.

	<i>p</i> -Coumaric acid hydroxylase (unit/g fresh weight tissue)	Polyphenol oxidase (unit/g fresh weight tissue)
Control seedlings		
Supernatant	8.7	4.1
Precipitate	3.3	1.2
Tentoxin-treated seedlings		
Supernatant	0	0
Precipitate	0.6	0

3) p-Coumaric acid hydroxylaseの電子供与体 特異性

種々の還元剤の p-coumaric acid hydroxylase の電子供与体としての活性を最終濃度 7.5 mMで比較した (Table 3). 活性は L-ascorbic acidを電子供与体として用いた時の活性に対する相対活性で示した. 電子供与体に対する本酵素の特異性は広く, グルタチオンを除く全ての化合物で活性が認められた. Lineweaver-Burk plotを用い, L-ascorbic acidと NADPHに対する K_m 値を測定した. NADPH に対しては $1.5 \times 10^{-4} M$, L-ascorbic acid に対しては $1.0 \times 10^{-2} M$ であった. V_{max} に関しては両者についてほぼ同じであった. この結果より, L-ascorbic acidよりも NADPHの方がより有効な電子供与体とみなされた. 以下の実験では電子供与体として NADPHを用いた.

Table 3. Electron Donor Specificity of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase from Tentoxin-treated Seedlings.

Compounds tested	Relative enzyme activity (%)
L-Ascorbic acid	100
NADPH	145
NADH	98
6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterine	119
Glutathione	11

4) *p*-Coumaric acid hydroxylase の基質特異性

”材料と方法”の項で記したように、本酵素の基質特異性を種々の monophenol に本酵素を作用させ、反応後の反応液から生成物を抽出して TLC にかける、反応生成物が検出されるかどうかによって調べることにした。まず、この方法で monophenol の水酸化物が検出されるかどうかを種々の monophenol を水酸化することが知られているサツマイモの PPO と mushroom tyrosinase を酵素として用い試した。

p-Coumaroyl-D-glucose や *p*-hydroxybenzoic acid などの monophenol の水酸化物がこの方法で検出できた。そこで、tentoxin 処理黒緑豆実生の沈澱画分中の *p*-coumaric acid hydroxylase の基質特異性をこの方法で調べた (Table 4)。本酵素の基質特異性は厳格であり、*p*-coumaric acid を基質とした時にだけ生成物が検出された。*t*-Cinnamic acid, *t*-cinnamoyl-D-glucose, *p*-coumaroyl-D-glucose, *o*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, 4-hyd-

Table 4. Substrate Specificity of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase

Compounds tested	Reactivity	K_m Value
<i>p</i> -Coumaric acid	+	3.0×10^{-5} M
<i>t</i> -Cinnamic acid	-	
<i>t</i> -Cinnamoyl-D-glucose	-	
<i>p</i> -Coumaroyl-D-glucose	-*	
<i>o</i> -Coumaric acid	-*	
<i>m</i> -Coumaric acid	-*	
L-Tyrosine	-	
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	-	
4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	-	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	-	
<i>p</i> -Hydroxyacetophenone	-	

* : Unidentified fluorescent product.

roxy-3-methoxy-cinnamic acid, p-hydroxy-benzoic acid, p-hydroxyacetophenoneからは生成物は生じなかった。一見反応生成物に見える蛍光スポットが p-coumaroyl-D-glucose, o-coumaric acid, および m-coumaric acidを基質とした時に TLCプレート上で検出されたが、これらのスポットは予想される反応生成物の標品の Rf値とは異なっていた。

p-Coumaric acidに対する K_m 値は $3.0 \times 10^{-5} M$ であった。

5) p-Coumaric acid hydroxylaseの至適 pH

本酵素活性は pH5.0で最も高い酵素活性を示した。

6) Tentoxin処理実生中の p-coumaric acid hydroxylaseと t-cinnamic acid 4-hydroxylaseに対する各種化合物の影響

本酵素がチトクロム P-450 酵素であるかどうかを調べるためにチトクロム P-450 酵素である

ことが判明している *t*-cinnamic acid 4-hydroxylase と本酵素に対する各種の化合物の影響を調べた (Table 5). *p*-Coumaric acid hydroxylase は β -mercaptoethanol や diethyldithiocarbamate (Cu-キレート剤) により非常に強く阻害され, K_i 値はそれぞれ $3.5 \times 10^{-6} M$ と $2.3 \times 10^{-4} M$ であった. これに対し, *t*-cinnamic acid 4-hydroxylase は上記の2つの化合物により全く阻害されなかった. *p*-Chloromercuribenzoate に対する両酵素の感受性は上記の2つの化合物に対するものとは正反対であり, *p*-coumaric acid 4-hydroxylase は終濃度 0.1 mM で全く阻害されなかった. 実生中の *t*-cinnamic acid 4-hydroxylase は植物や動物の P-450 酵素の阻害剤であると報告されている metyrapone (1.0 mM) で阻害されたが, *p*-coumaric acid hydroxylase は阻害されなかった. *p*-Coumaric acid hydroxylase は FAD や FMN の添加によりその活性が阻害された. 上記の結果より, 黒緑豆実生中の *p*-coumaric

Table 5. Effect of Various Compounds on the Activities of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase and *t*-Cinnamic Acid 4-Hydroxylase.

p-Coumaric acid hydroxylase was extracted from the tentoxin-treated seedlings and *t*-cinnamic acid 4-hydroxylase from control seedlings.

Compounds tested	Concentration tested (mM)	Relative enzyme activity	
		<i>p</i> -Coumaric acid hydroxylase (%)	<i>t</i> -Cinnamic acid hydroxylase (%)
Control (no additive)	—	100	100
β -Mercaptoethanol	1.0	0	100
Diethyldithiocarbamate	1.8	10	100
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	0.1	100	0
Metyrapone ^a	1.0	100	82
FAD	0.6	66	— ^b
FMN	0.6	60	— ^b

^a3-(2,4-Dichlorophenoxy)-L-propyne. ^bNot tested.

acid hydroxylaseはチトクロムP-450酵素ではないと考えられる。

7) p-Coumaric acid hydroxylaseに対する金属イオンの影響

p-Coumaric acid hydroxylaseの活性に対する各種金属イオン(7.5 mM)の影響を調べた(Table 6)。Na⁺, Mg²⁺やCa²⁺による影響は殆どみられなかった。Mn²⁺やFe³⁺によって30~40%阻害され, Cu⁺, Cu²⁺により強く阻害された。

8) p-Coumaric acid hydroxylaseの細胞内局在性

本酵素の黒緑豆実生細胞内の局在部位をシロ糖密度勾配遠心法で調べた(Fig. 4)。本酵素はミトコンドリア(cytochrome c oxidase活性の測定で決定)と小胞体(antimycin感受性NADPH-cytochrome c reductase活性より決定)との間に沈降する細胞内器官に

局在していた。

9) Tentoxin 処理実生中の *p*-coumaric acid hydroxylase, 総フェノール成分量および phenylalanine ammonia lyase の生育に伴う変化

生体内における *p*-coumaric acid hydroxylase の役割に関する知見を得るために, 生育中の本酵素活性の変化を総フェノール成分量や PAL の活性と併せて調べた (Fig. 5)。

本酵素活性は多くの植物の phenylpropanoids 代謝系の律速酵素とされている PAL と同じような変動を示した。また両酵素活性の変動は総フェノール含量の変動とも一致し, 本酵素がフェノール成分の生合成に関与していることを示唆した。

Table 6. Effect of Metals on the Activity of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase from Tentoxin-Treated Seedlings.

Compounds tested	Relative enzyme activity (%)
Control (no additive)	100
EDTA	74
NaCl	100
MgCl ₂	108
CaCl ₂	118
MnCl ₂	69
FeCl ₃	59
CuCl	25
CuCl ₂	20

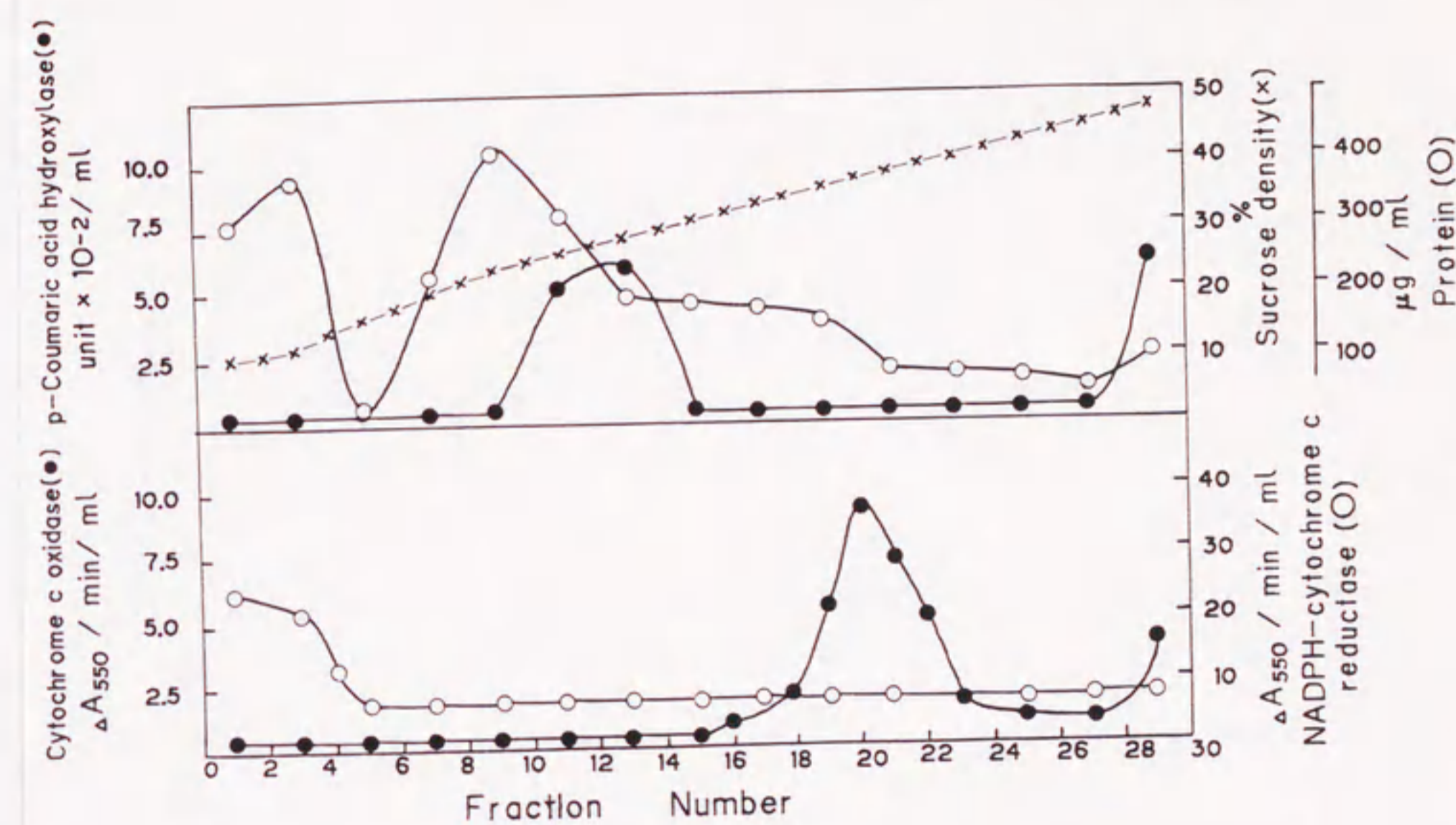


Fig. 4 Cellular Localization of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase in Tentoxin-treated Seedlings by Sucrose Density Gradient Centrifugation

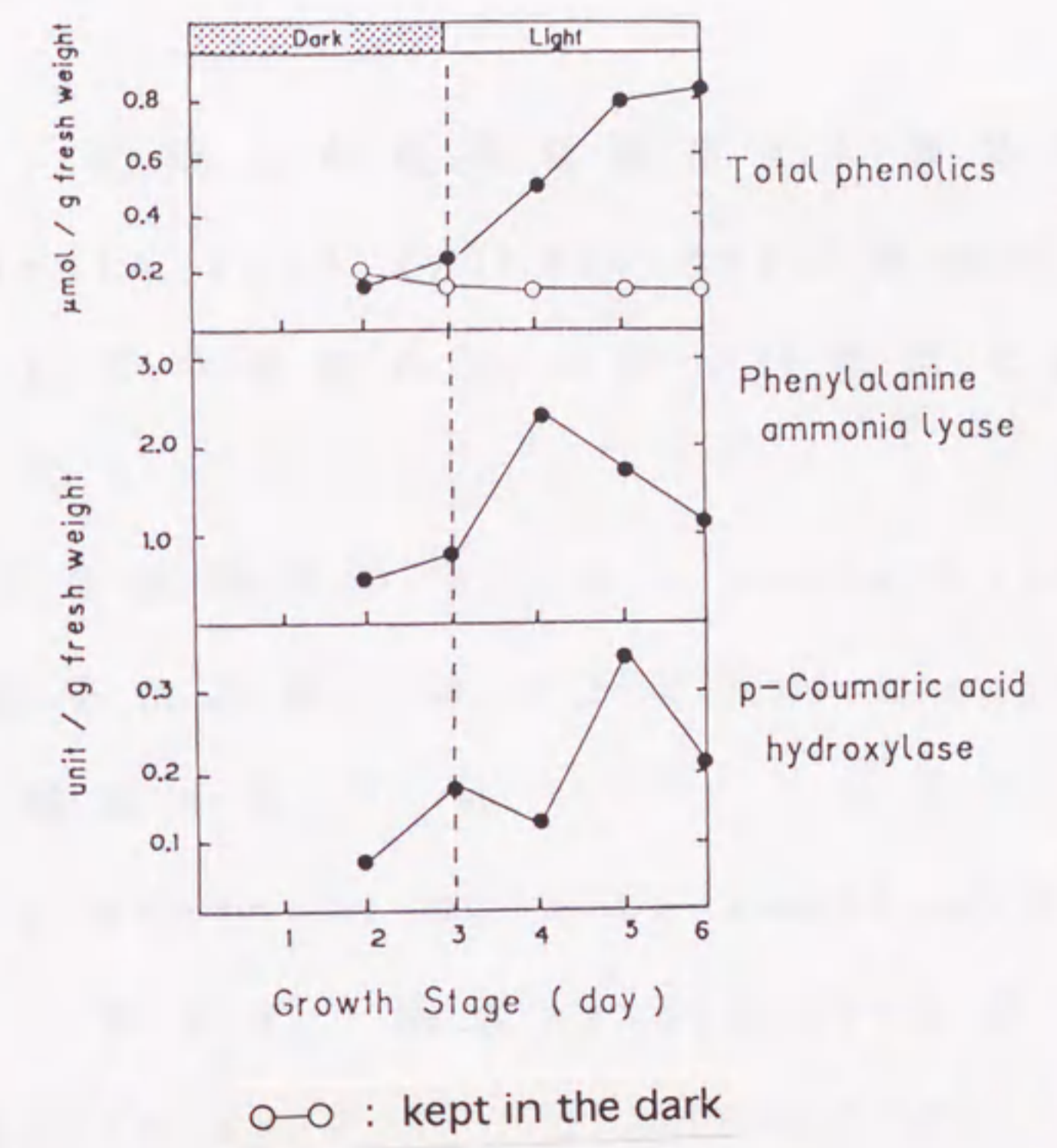


Fig. 5 Time Course of Change in Contents of Total Phenolic Compounds and activities of PAL and *p*-Coumaric Acid Hydroxylase during Growth of Tentoxin-treated Seedlings

4. 考 察

Tentoxin処理した黒緑豆実生中に膜結合型の p-coumaric acid hydroxylaseが検出された。本酵素は以下の根拠から、新しい酵素であると考えられる。

PPOはの基質特異性は広く、L-ascorbic acid等の電子供与体の存在下で種々の monophenolを水酸化する^{14), 24), 25)}。本研究で検出された p-coumaric acid hydroxylaseはPPO活性を全く示さず、関連 monophenol化合物中 p-coumaric acid だけを水酸化した。この結果は本酵素が一般的PPOとは異なる酵素であることを示唆している。

本酵素はFADやFMNにより阻害された。この性質はKamsteegらの見出した水酸化酵素¹⁵⁾およびBoniwellとButtの見出した水酸化酵素¹⁶⁾と異なるものである。これらの酵素はNADPHやFADを要求すると報告されている。

Tentoxin処理した黒緑豆実生中に見い出さ

れた *p*-coumaric acid hydroxylase は酵素反応に分子状酸素を要求することから oxygenase の 1 種と考えられる。ほとんどの oxygenase には補欠分子族として鉄か銅が含まれている²⁶⁾。Table 3 に示した種々の化合物に対する反応から本酵素は銅酵素のように見える。それにも関わらず、本酵素は CuCl や CuCl₂ によって阻害された。これは矛盾する結果のように見えるが、銅酵素であることがわかっている mushroom tyrosinase も CuCl や CuCl₂ によって阻害された。

本研究で検出された *p*-coumaric acid hydroxylase は下記の 3 つの根拠から黒緑豆実生中のフェノール成分の生合成に関与しているように見える。第一に、本酵素活性は高く、実生中の総フェノールの量を賄うのに十分である。第二に、実生に光照射した時に総フェノール含量の変動と同調して本酵素活性が変動する。第三に、多くの系でフェノール成分の生合成の律速酵素であることが明らかになっ

ている phenylalanine ammonia lyase の変動と
本酵素活性の変動がよく類似している (Fig.
5).

第 3 章

黒緑豆 (V i g a n a m u n g o) 実生中の可溶性ポリフェノールオキシダーゼ主要アイソザイムの精製とその酵素学的諸性質

1. 緒 言

第2章において、黒緑豆実生中の膜結合型の p-coumaric acid hydroxylase のポリフェノール生合成への関与について検討した。Tentoxin 処理をしていない健全黒緑豆実生の粗抽出液には L-ascorbic acid 共存下で p-coumaric acid を caffeic acid に水酸化する強い酵素活性が検出される。この活性の本体は PPO であろうと推定した。黒緑豆実生の粗抽出液を等電点電気泳動にかけると、10種以上の PPO のアイソザイムが検出される。この中で、全て

の器官で、全ての生育時期に、最も強い活性を示す等電点 (pI) が 5.4 の PPO アイソザイムを精製し、その性質をポリフェノール生合成との関連で調べた。

2. 材料および方法

1) 植物材料

黒緑豆 (*Vigna mungo*) の種子を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌し、一夜吸水させた後、パーミキュライト上に蒔いた。27°C、暗所で3日間生育させたあと、2日間光照射下で生育させた実生全体を用いた。

2) 可溶性 PPO 主要アイソザイムの精製

黒緑豆実生 (350g) を Na-L-ascorbate (1%) を含む 20mM Tris-HCl buffer (pH7.5) 400 ml と共に、ワーリングブレンダー中で1分間磨砕した。磨砕液をミラクロスを用いて濾過し、濾液を 13,000 × g で15分間遠心した。

得られた上清画分に硫酸アンモニウムを40%飽和になるように加えた。1時間放置後、10,000×gで20分間遠心し、沈澱を回収した。この沈澱を20 mlの20mM Tris-HCl buffer (pH7.5)に溶解した。不溶物を除去するため13,000×gで15分間遠心し、その上清液を硫酸(30%)を含む20mM Tris-HCl buffer (pH7.5)で平衡化したButyl Toyopearl 650Mカラム(φ1.5×10cm, 東ソー)にかけた。カラムを60 mlの同一bufferで洗浄後、30%から0%の硫酸濃度の直線勾配(100 ml)で溶出し、1 mlずつ分画した。PPO活性を示す画分を集め、25mM imidazole buffer (pH7.4)に対して10時間透析し、透析後、限外濾過ユニット(モルカットL, Millipore)で濃縮した。予め25mM imidazole buffer (pH7.4)で平衡化したクロマトフォーカシングカラム(φ1.0×20cm, PBE, Pharmacia)に試料の添加直前に5 mlの25mM Polybuffer 74 (pH4.0, Pharmacia)を通した。これに上記の酵素濃縮液を添加し、

直ちに 25mM Polybuffer 74 (pH4.0) で溶出し、0.5 ml ずつ分画した。活性画分を集め、SDS-PAGE (Laemmliの方法)²⁹⁾によって純度を確認した。なお、SDS-PAGEを除く全ての操作は4°Cで行った。各精製段階における酵素溶液中のタンパク質量はBio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Lab.) を用い定量³⁰⁾し、PPO活性は第2章で述べたDukeらの方法¹⁸⁾に準じて測定した。

3) 酵素の等電点の測定

精製酵素を Ampholine PAG plate (pH3.5-9.5, Pharmacia) 上で等電点電気泳動した。電気泳動はフラットベッド電気泳動装置 (Multiphor II, Pharmacia) を使用し、陽極液にはリン酸 (1 M)、陰極液には NaOH 溶液 (1 M) を用い、1,500V, 50mA, 30W の条件下で 1.5 時間通電した。等電点のマーカータンパク質として amyloglucosidase (pI3.50), soybean trypsin inhibitor (pI4.55), β -lactoglob-

ulin A (pI 5.20), bovine carbonic anhydrase B (pI 5.85), human carbonic anhydrase B (pI 6.55), horse myoglobin (pI 6.85, 7.35), lentil lectin (pI 8.15, 8.45, 8.65), trypsinogen (pI 9.30) を含む Broad pI calibration kit (pH 3-10, Pharmacia) を用いた。

泳動後のゲルは、銀染色か Coomassie 染色または下記のポリフェノール酸化酵素の活性染色法により染色した。

4) 活性染色法によるポリフェノール酸化酵素の検出

Montgomeryらの方法³¹⁾に準じて行った。

泳動後の polyacrylamide ゲルおよび Ampholine ゲルを caffeic acid (15mM) と p-phenylenediamine (0.05%, w/v) を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) に浸し、15分間ゆっくり振とうさせた。染色像が出現したら、1mM Na-L-ascorbate 溶液で5分間濯ぎ、発色を止めた。ゲルを蒸留水で洗浄後、30%エタノール溶液中

で保存した。

5) 黒緑豆実生の各器官中の pI 5.4 の PPO アイソザイムの生育に伴う活性変動

種々の発育時期の実生の各器官より、粗酵素抽出液を調製した。この抽出液を等電点電気泳動にかけ、泳動後のゲルを活性染色した。染色後のゲルを2波長クロマトスキャナー（島津社製、CS-910型）にかけ、pI 5.4のPPOのバンドの500 nmでの吸光度を測定し、相対的酵素活性とした。

6) 黒緑豆実生の各器官中の総ポリフェノール含量の定量

第2章の方法の項に記述した方法と同じ方法で定量した^{3,2)}。

3. 結 果

pI 5.4の PPOアイソザイムは黒緑豆実生の全器官に、多量に発芽初期から存在し、多種存在する PPOアイソザイムの中で最も強い活性を示した。本アイソザイムを“方法”の項で述べた操作で精製した。686倍に精製された本酵素は、SDS-PAGE (10%) で分子量約40KDaの単一タンパク質バンドを示した (Fig. 6)。精製酵素は diphenol酸化活性と monophenol水酸化活性の両活性を示した (Table. 7)。

p-Coumaric acidを基質として用いた水酸化活性の至適 pHは7.0であった。一方、L-dopaを基質として用いた酸化活性においては、pH6.0~8.0でほとんど活性の変化がみられず、明確な至適 pHを示さなかった。また、水酸化反応における K_m 値と V_{max} を p-coumaric acidを基質として用い測定した (K_m , 1.1mM ; V_{max} , 330 nmol/min/mg protein)。一方、酸化反応における K_m 値と V_{max} は L-dopaを基質として

- lane 1 : molecular weight markers
- lane 2 : the precipitated fraction by 40-70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -saturation
- lane 3 : active fraction after Butyl Toyopearl chromatography
- lane 4 : the isozyme with pI 5.4 obtained by chromatofocusing

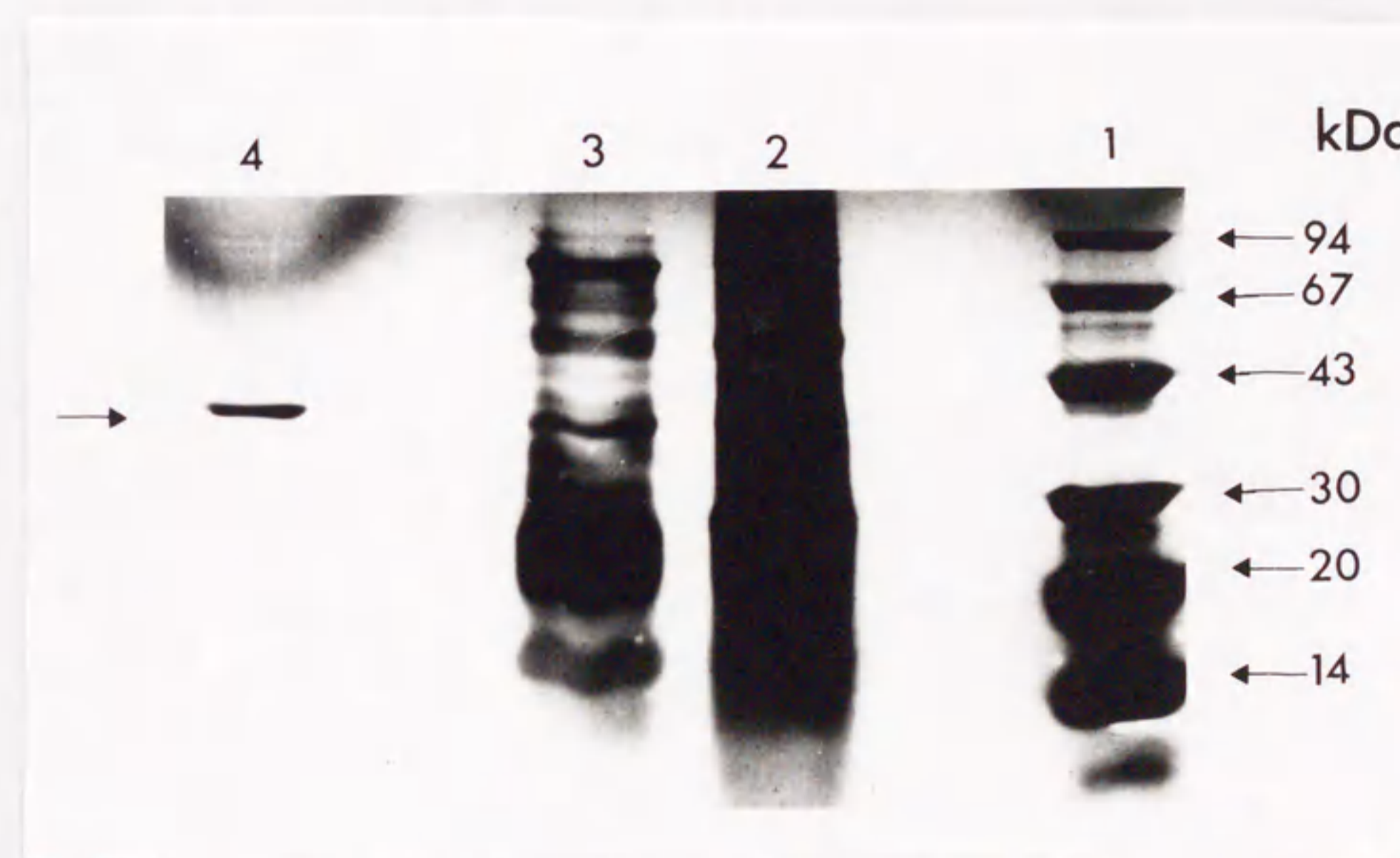


Fig. 6 SDS-PAGE of Enzyme Preparations in Various Purification Steps.

Table 7. Purification of the Main Isozyme with pI 5.4 of Polyphenol Oxidase in Mung Bean Seedlings.

Fraction	Total protein (mg)	Specific activity ^a (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40—70%)	192	0.63	1.0	100
Butyl Toyopearl 650 M	24	3.71	5.9	74
Isoelectric chromatofocusing	0.05	432	686	18

^a One unit is the activity of the enzyme producing 1 mmol of *o*-quinone from L-DOPA per min under the assay conditions.

求めた (K_m , 31mM ; V_{max} , 196 nmol/min/
mg protein).

黒緑豆実生の種々の生育時期における各種器官中のポリフェノール量とpI5.4のPPOアイソザイムの活性の変動を調べた (Fig. 7). 胚軸と根においては, ポリフェノールの生成と本アイソザイムの変動との間に相関性が認められた. 即ち, 本酵素活性の増加とポリフェノール含量の増加が並行した. 一方, 葉や子葉では逆の変動を示した.

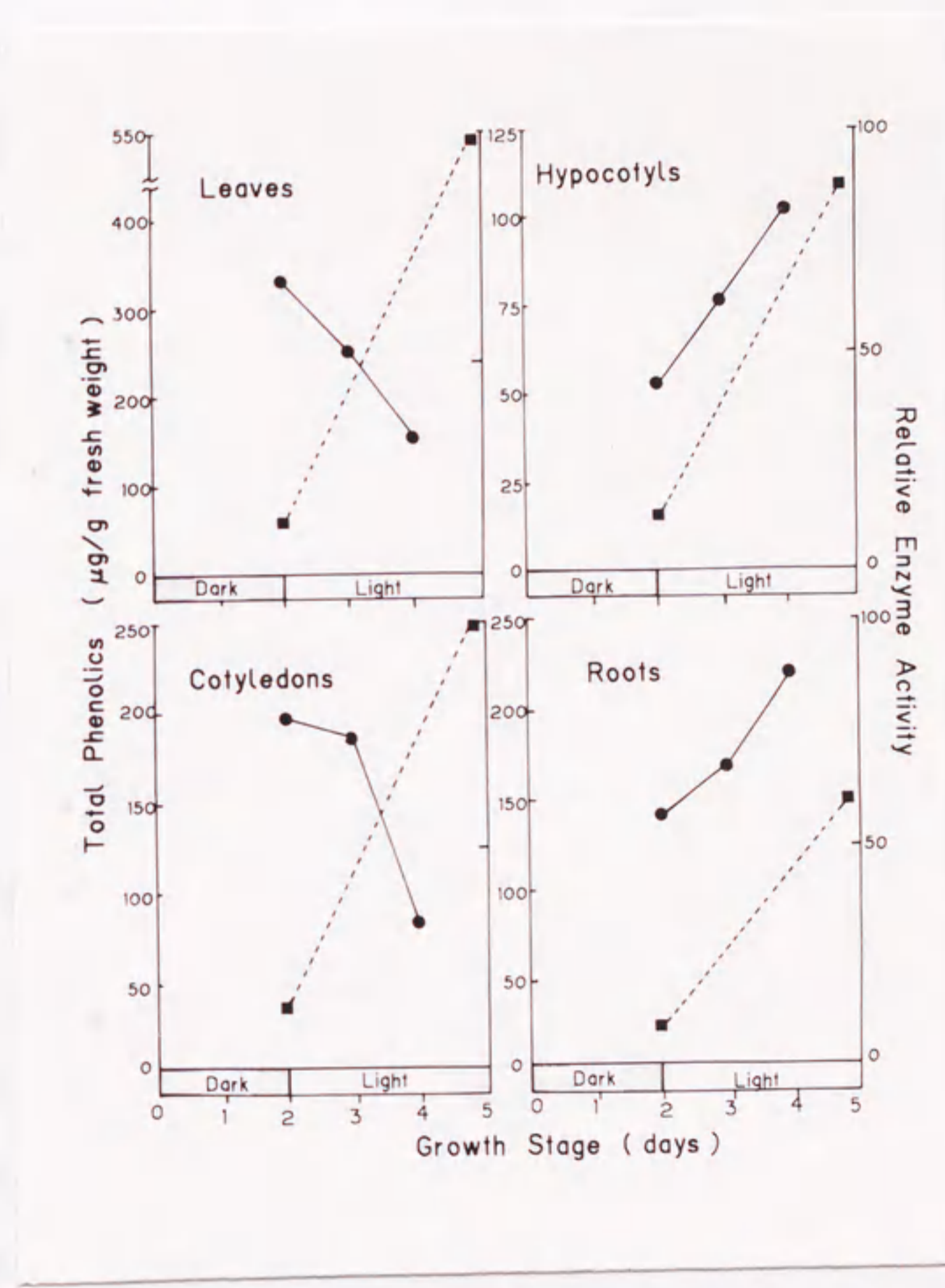


Fig. 7. Changes in Polyphenol Oxidase Activity of the Isozyme with pI 5.4 and in Polyphenol Contents in Various Organs of Mung Bean Seedlings during Growth.

The relative activity of 100 is equivalent to the activity of tyrosinase producing 0.444nmol of o-quinone from L-Dopa

- : relative enzyme activity of the isozyme with pI5.4
- : total content of phenolics(µg/g fresh weight)

4. 考 察

黒緑豆実生中には10種以上のPP0アイソザイムが存在する。この中の1つの主要アイソザイム(可溶性でpI5.4)を電気泳動的に単一バンドまで精製して性質を調べた。生育に伴い、本アイソザイムは胚軸と根ではポリフェノールの合成と並行して増加し、一方葉と子葉では逆の関係を示し、減少した。この結果から、胚軸と根では本アイソザイムはポリフェノールの生合成に関与しているように見える。しかし、同一のアイソザイムが葉や子葉ではポリフェノールの生合成に関与していないように見える。このことは、一見矛盾するように見える。この矛盾に対する解答を得るためには種々の実験が必要であろう。現時点で考えられる可能性は下記の2つである。1つは、本アイソザイムはポリフェノール生合成には全く関与していない可能性である。胚軸と根でポリフェノール生合成と並行して変動した

のは偶然の一致に過ぎないかも知れない。第2は1つのアイソザイムが器官によって異なった機能を示すという可能性である。葉と子葉では p15.4 のアイソザイムでなく、別のアイソザイムがポリフェノールの生合成に関与しているのかも知れない。