

## 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

ポリフェノール生合成のベンゼン環に水酸基を導入する生体内の反応においては電子供与体が必要である。従ってポリフェノール生合成の制御因子として、水酸化酵素だけでなく電子供与体にも注目する必要がある。生体内の電子供与体としては NADPH や L-ascorbic acid などが知られている。

PP0 の 1 つである mushroom tyrosinase を用いて *in vitro* での水酸化反応を解析中に、L-tyrosine を用いた時には電子供与体を加えなくても水酸化反応が進行する (Fig. 8) という予想外の現象を観察した。そこで PP0 によ

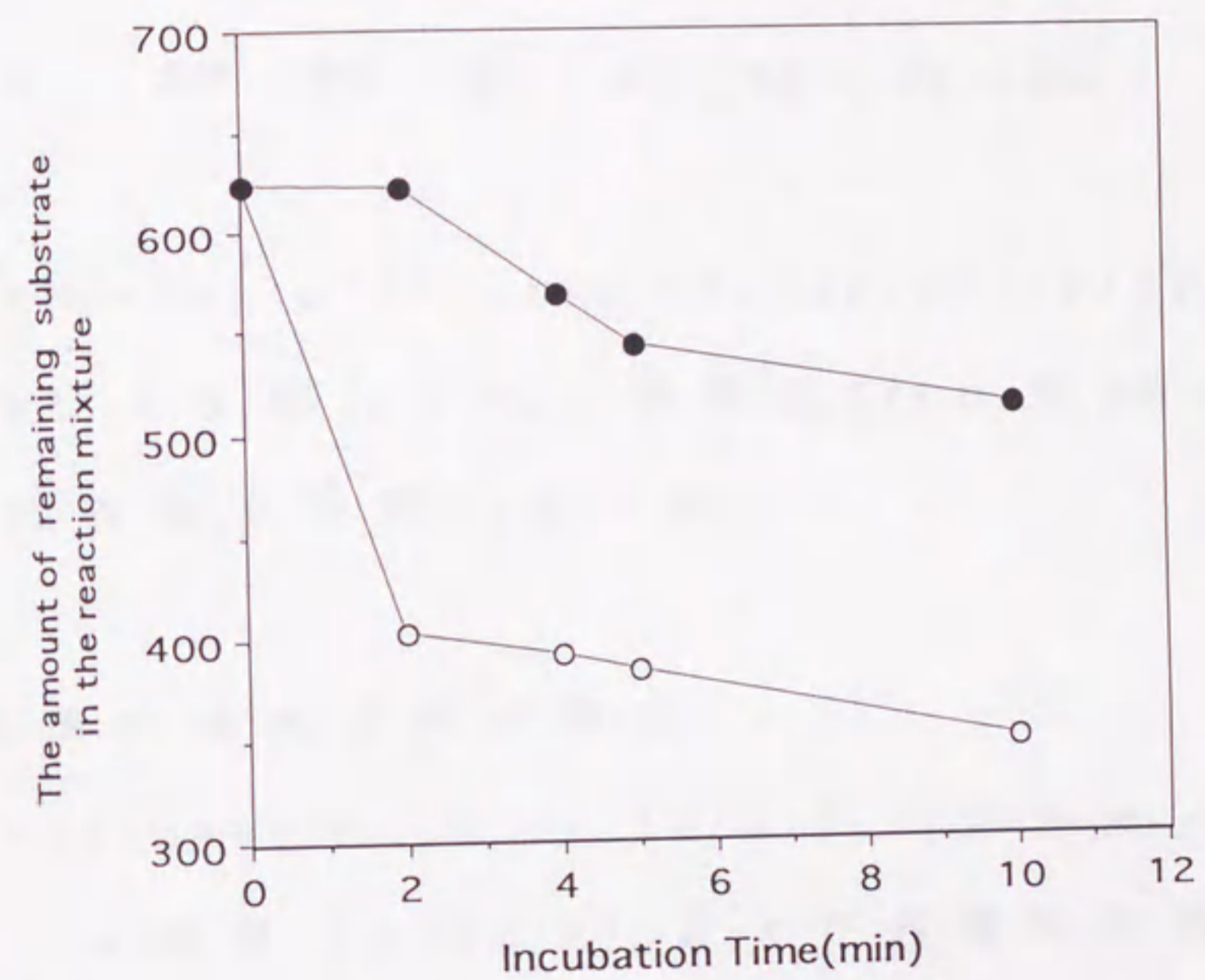


Fig.8 Hydroxylation of L-Tyrosine and p-Coumaric Acid by Tyrosinase in the Absence of Electron Donor.

● ; p-coumaric acid  
○ ; L-tyrosine

る水酸化反応における電子供与体の要求性について解析した。

## 2. 材料および方法

Mushroom tyrosinase (8,300 units/mg) は Sigma社より購入した。黒緑豆 PPO は第2章に記述した方法で精製し用いた。

### 1) 水酸化酵素活性の測定

Tyrosinase (120 units/ml), 各種モノフェノール基質 (625  $\mu$ M) および各種電子供与体 (50 ~ 250  $\mu$ M) を含む 0.2M Tris-HCl buffer, pH7.5 (400  $\mu$ l) を 30°C で、振とうしながら反応させた。HCl (12N) 70  $\mu$ l を加え、反応を止めた後、フィルター (Advantec Toyo, 0.45  $\mu$ m) で濾過し、濾液を高速液体クロマトグラフ (Hitachi, L-2000) にかけて、残存基質と生成物を分離した。反応開始前の基質量と反応後の残存基質量の差から水酸化された基

質量を算出した。HPLCのカラムはTosoh ODS-80TMを用い、溶出溶媒はL-tyrosineを基質としたときには、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル溶液を用い、p-coumaric acidの場合には2%酢酸を含む45%メタノール溶液を用いた。流速は0.9ml/minとし、検出波長は280 nm (L-tyrosine) と320 nm (p-coumaric acid) を用いた。

## 2) p-Hydroxyphenylpyruvic acidの同定

L-tyrosineを含む上記反応液中でmushroom tyrosinaseを5分間作用させた後、HClで反応を止めた。5 mlの酢酸エチルで3回生成物を抽出し、抽出液を減圧下で濃縮し、40% (V/V) アセトニトリル溶液を溶出液として用い、HPLCで分析した。

### 3. 結 果

#### 1) 電子供与体非存在下での tyrosinase による水酸化反応における L-tyrosine と p-coumaric acid の違い

電子供与体非存在下で, L-tyrosine に tyrosinase を作用させると水酸化反応が迅速に進み, L-dopa が生じ, その L-dopa が tyrosinase によって酸化されるために, 反応開始約 10 分後に反応液が褐変し始めた. 一方, 同じ条件下で p-coumaric acid に tyrosinase を作用させた時には, 水酸化反応はほとんど進行せず, 反応液の着色も認められなかった.

#### 2) Tyrosinase の水酸化反応に対する各種電子供与体の効果

種々の電子供与体を tyrosinase の反応溶液に加え, 水酸化反応に対する効果を調べた (

Fig. 9). L-tyrosineを基質とした時には、水酸化反応の促進効果はすべての電子供与体において観察されなかった (Fig. 9-a). 一方, p-coumaric acidを基質とした時には, L-グルタミン酸, 塩酸モノメチルアミン, アセトアミド, アセトアルデヒド等のアミノ化合物や L-asc-orbic acid, caffeic acid等を加えた時に, 水酸化反応が観察された (Fig. 9-b).

p-Coumaric acidの tyrosinaseによる水酸化反応が L-glutamic acidのようなアミノ基をもつ物質の添加によって促進されることと, L-tyrosine中にはアミノ基が含まれ, p-coumaric acidにはアミノ基が含まれない事実から, L-tyrosineの水酸化反応ではアミノ基が電子供与体として機能している可能性が推定された. そこで下記の3)と4)の実験を行った.

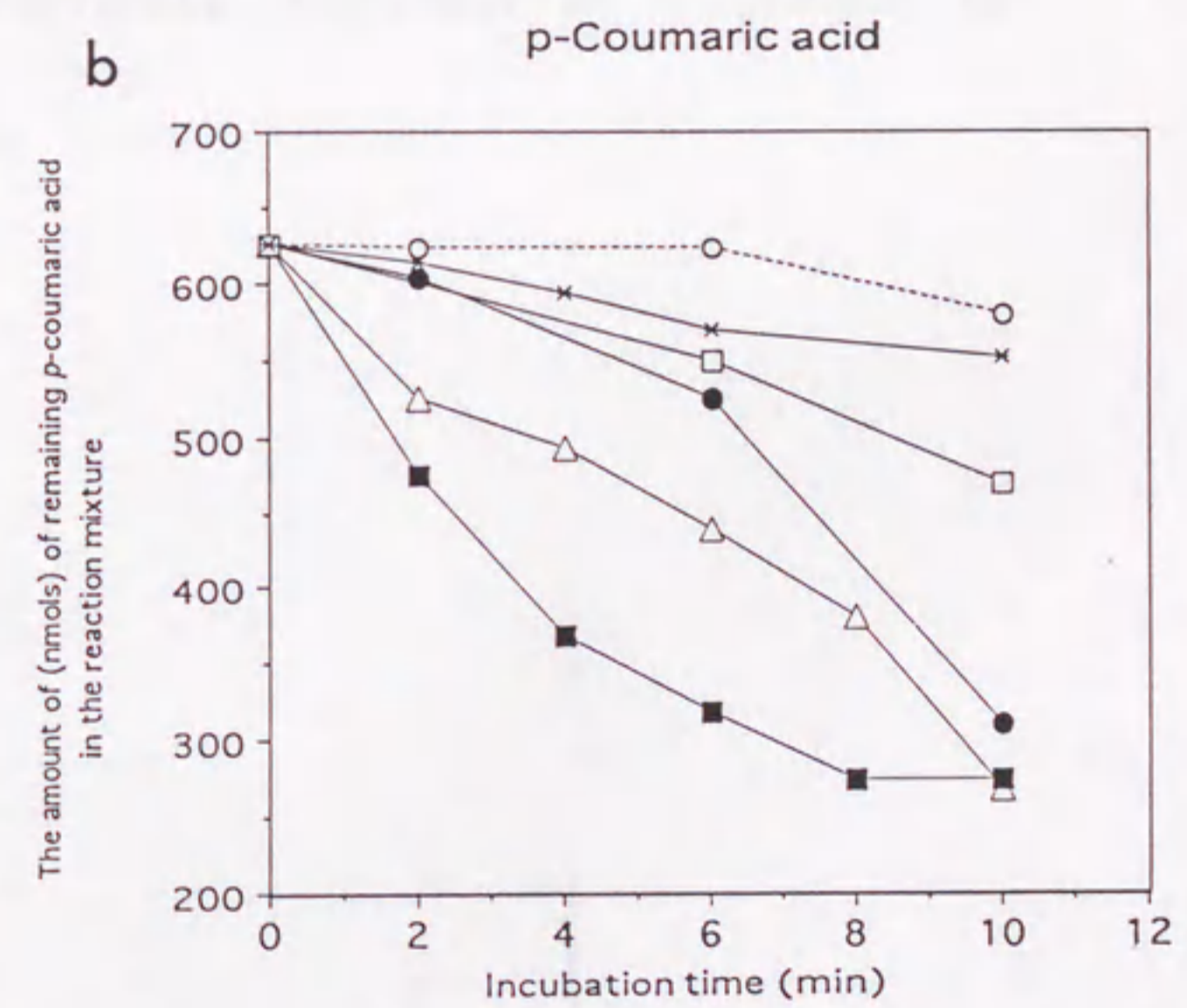
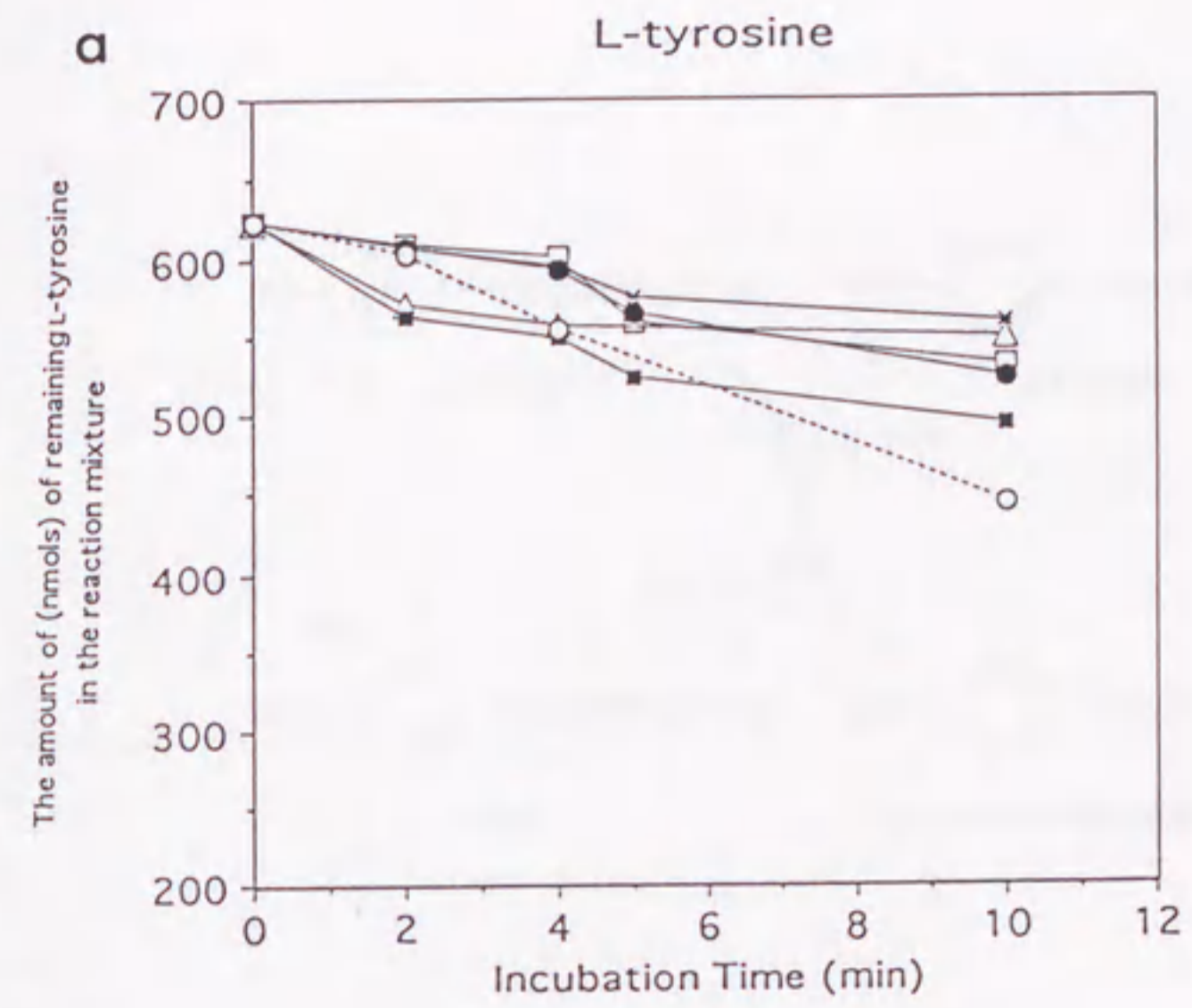
3)電子供与体非存在下で L-tyrosineと tyrosinaseを反応させた反応液中から p-hydroxyphenylpyruvic acidの分離と同定

もし、上記のように L-tyrosine 中のアミノ基が電子供与体として機能しているなら、水酸化反応に伴い p-hydroxyphenylpyruvic acid が生成することが予想される (Fig. 10)。そこで反応後の反応液より生成物を抽出し、HPLCで分析した (Fig. 11)。

p-Hydroxyphenylpyruvic acid の標品と同じ保持時間 (2.38分) を示し、同じ UV-吸収スペクトルを示す物質が検出された。

#### 4) Tyrosinase による p-hydroxyphenylpyruvic acid の水酸化反応における電子供与体の要求性

上記の推定のように L-tyrosine 中のアミノ基が、水酸化反応における電子供与体として機能しているならば、L-tyrosine よりアミノ基を取り除いた構造をもつ p-hydroxyphenylpyruvic acid の水酸化反応では電子供与体を外部より加える必要があることが予想される。



**Fig.9** Effect of Various Electron Donors on Hydroxylations of L-Tyrosine and p-Coumaric Acid by Tyrosinase.

- ; acetamide
- \* ; methylammonium chloride
- ; L-glutamic acid
- △ ; Na-L-ascorbate
- ; diphenol
- ; control (no electron donor)



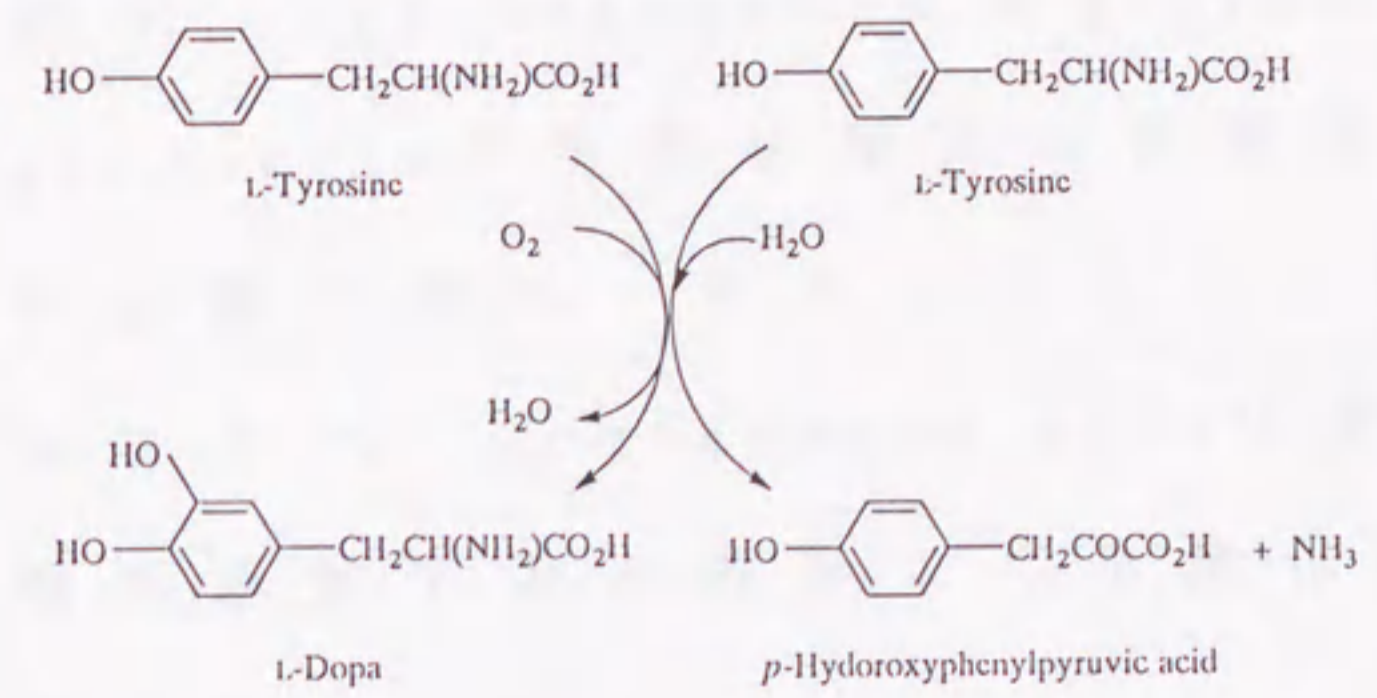


Fig. 10 Hydroxylation Mechanism of L-Tyrosine by Tyrosinase

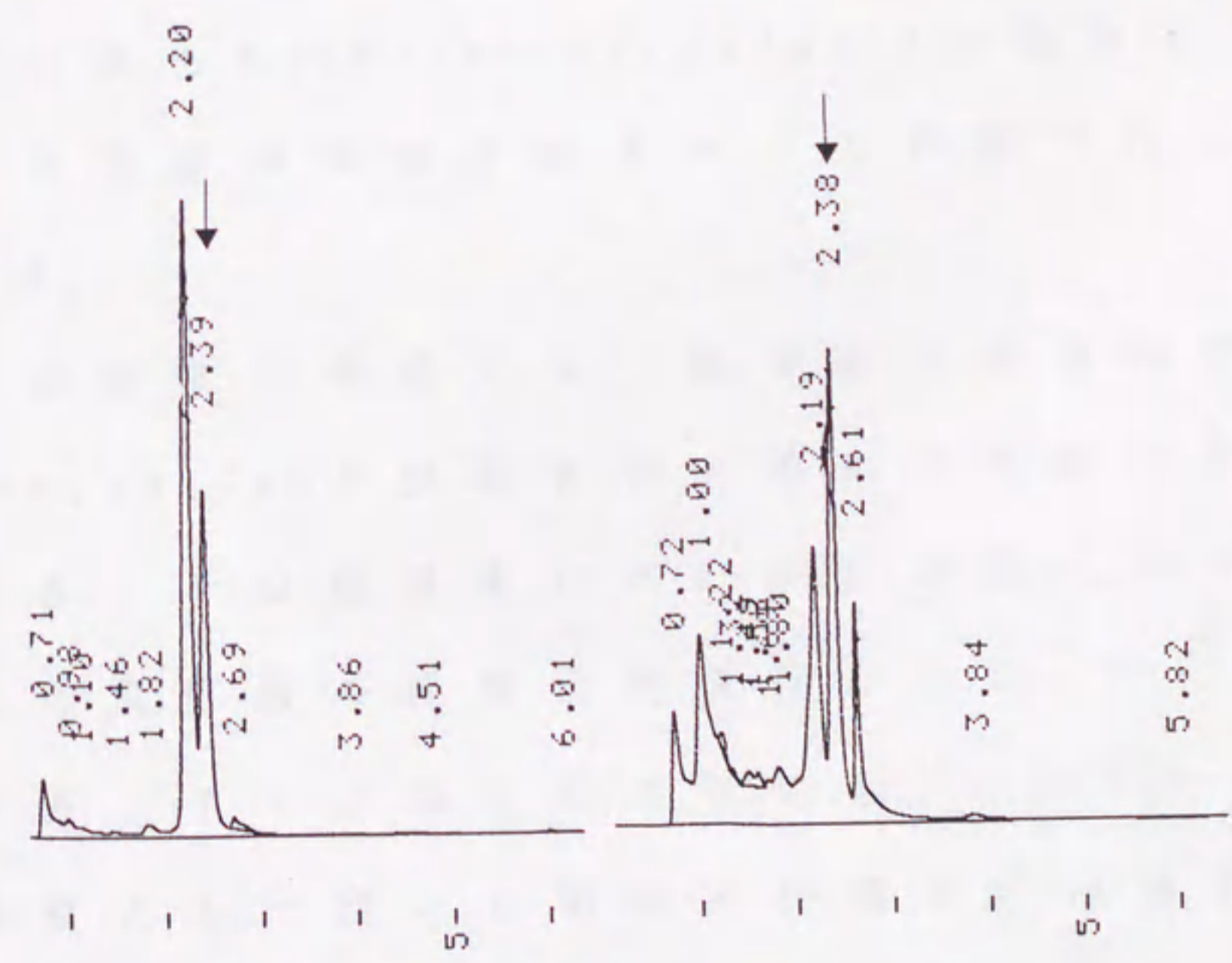


Fig. 11 HPLC Chromatogram

予想通り, tyrosinaseによる *p*-hydroxyphenylpyruvic acidの水酸化反応には電子供与体の添加が必要であり, アセトアミド, 塩酸モノメチルアミン, L-glutamic acidなどのアミノ化合物を添加すると効率よく水酸化反応が進行した (Fig. 12).

#### 5) 黒緑豆実生中のPPOによる水酸化反応における電子供与体の要求性

黒緑豆より分離したPPOによる水酸化反応の場合にも mushroom tyrosinaseの場合と同じような現象が観察されるかどうか調べた (Fig. 13).

本酵素の場合にも, 電子供与体非存在下で L-tyrosineと反応させた時には水酸化反応が起き, その結果生じた L-dopaが酸化されるために反応液の褐変化が観察された.

一方, アミノ基をもたない *p*-coumaric acidを基質として用いた場合には電子供与体非存在

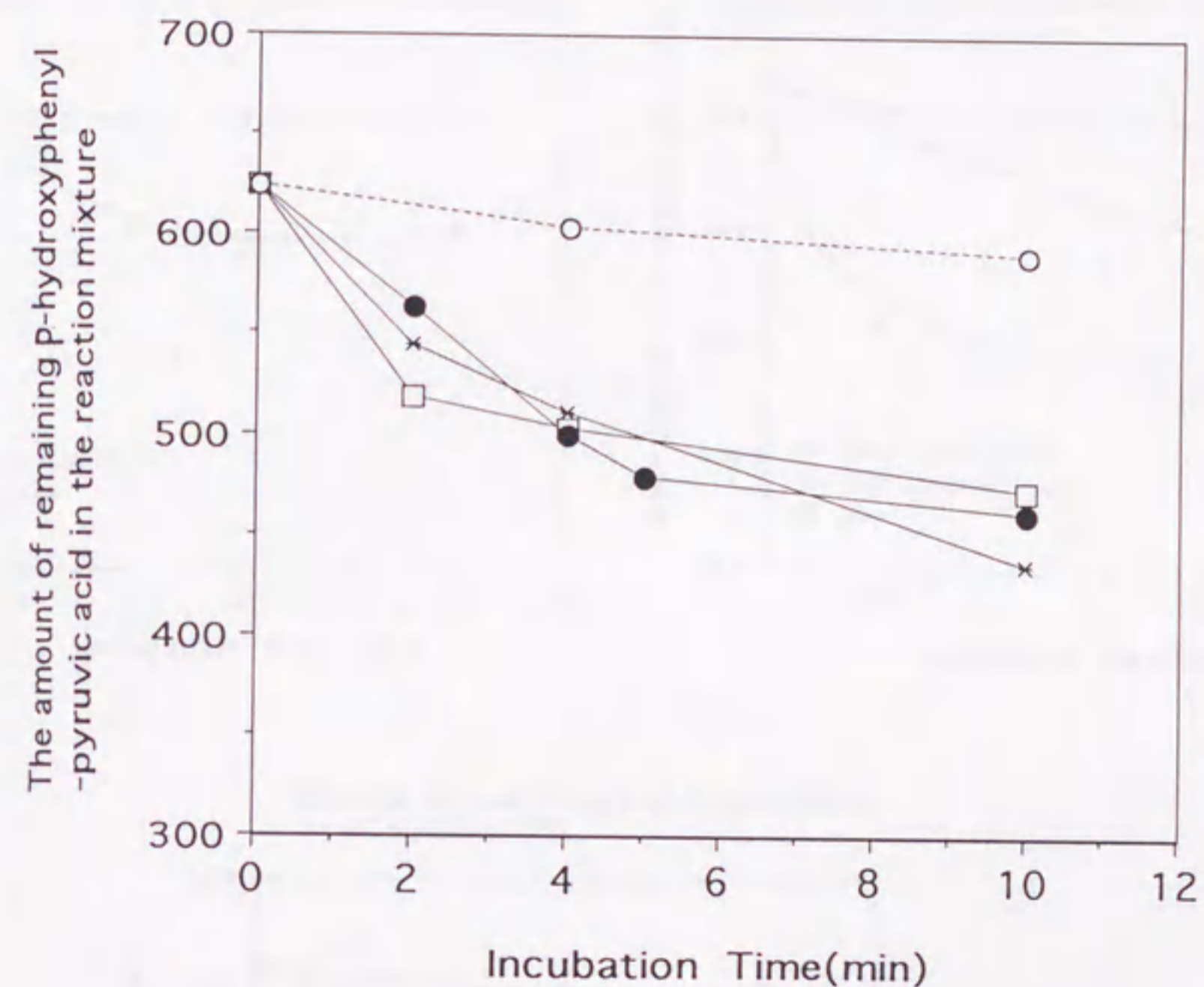


Fig. 12 Effect of Various Electron Donors on Hydroxylation of *p*-Hydroxyphenylpyruvic Acid by Tyrosinase.

- ; acetamide
- ; L-glutamic acid
- ×; L-dopa
- ; control (no electron donor)

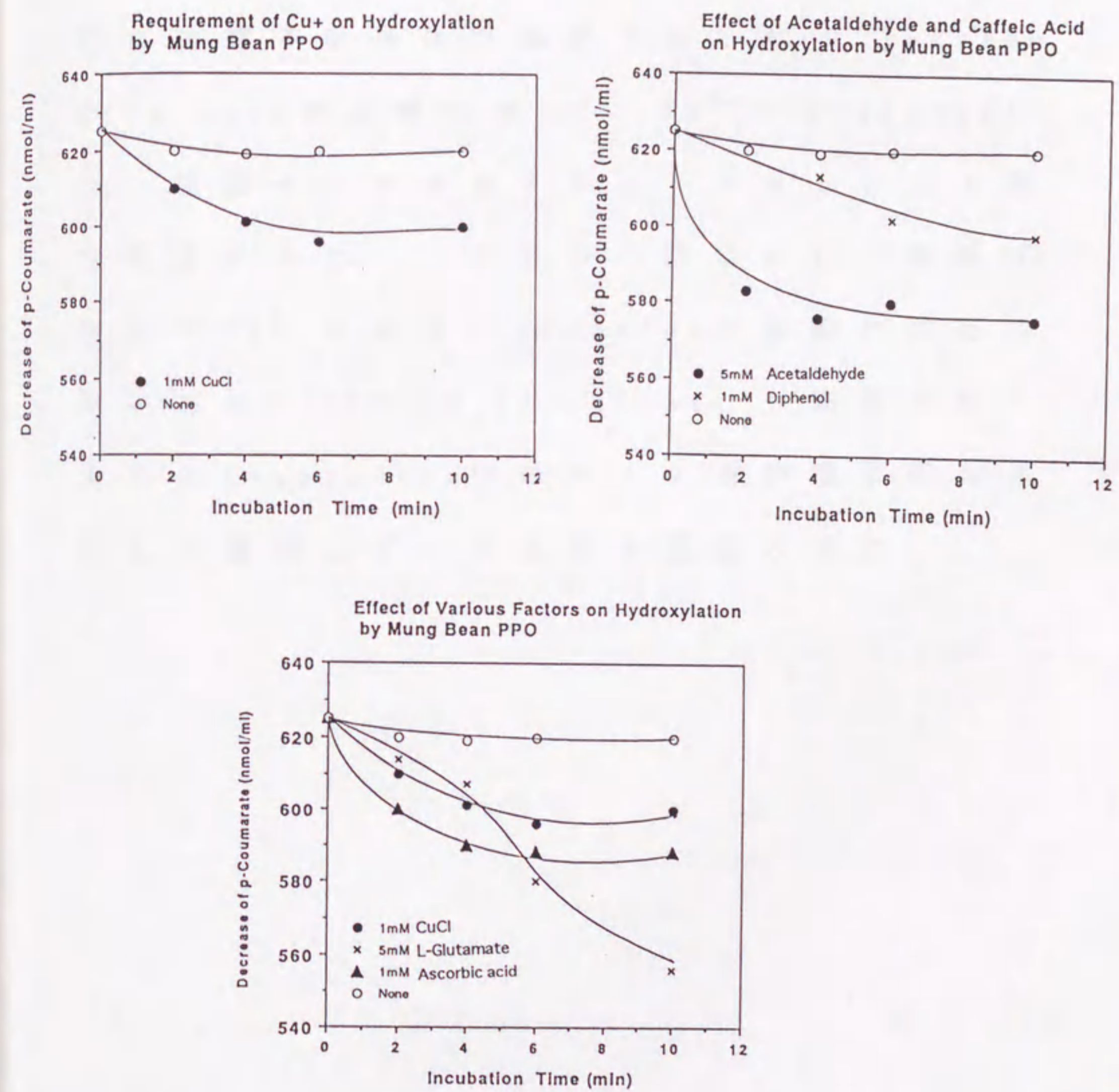


Fig. 13 Effect of Various Electron Donors on Hydroxylation of *p*-Coumaric Acid by Mung Bean PPO.

下では水酸化反応は全く進行せず、水酸化反応には電子供与体が必要であった。p-Coumaric acidの水酸化は $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、L-glutamate、塩酸モノメチルアミン、アセトアミド等で促進された。これらの結果より、黒緑豆実生のPP0によるL-tyrosineの水酸化反応においてもmushroom tyrosinaseの場合と同じようにL-tyrosine中のアミノ基が電子供与体として機能しているものと推定された。

## 5. 考 察

TyrosinaseによるL-tyrosineの水酸化反応では外から電子供与体を添加する必要がなかった。これは電子供与体が不必要ということではなく、L-tyrosine中のアミノ基が電子供与体として機能しているためであると考えられる。

生体内のmonophenolの水酸化反応にはNADPHやL-ascorbic acidが電子供与体として働いていることが示されている。NADPHやL-ascorbic acidは電子供与体として作用したあと、再還元される系が存在する。同じように、L-tyrosineのアミノ基の場合には再還元の系が存在するのだろうか？ もし、存在しなければ、生体内の水酸化反応で、真の電子供与体として働いているとは考えにくい。

しかし、本研究の成果から生体内の電子供与体として、従来考えられた以上に色々な物質が働いている可能性が考えられる。

## 第 5 章

### p-Coumaric acid の非酵素的水酸化

#### 1. 緒 言

第 2 章で述べた黒緑豆実生中の膜結合型 p-coumaric acid hydroxylase の補因子要求性の研究の過程で, p-coumaric acid が酵素を含まず,  $Fe^{2+}$  だけを含む緩衝液中で効率よく caffeic acid に水酸化されることを見出した<sup>34)</sup>.

芳香族化合物の非酵素的水酸化反応については過去に数例が報告されていた<sup>35), 36)</sup>. これらの系は L-ascorbic acid,  $Fe^{2+}$ <sup>37)</sup> および EDTA<sup>35), 36)</sup>,  $H_2O_2$ <sup>38)</sup>, EDTA と  $Fe^{2+}$ <sup>39)</sup>, EDTA と  $H_2O_2$ <sup>40), 41), 42)</sup> を含む系であった. 上記の p-coumaric acid の非酵素的水酸化反応は既報の水酸化反応と異なるように見え

た. そこで本系について解析を行った.

## 2. 方法

1) p-Coumaric acidの水酸化反応および反応生成物の定量

p-Coumaric acid (1.5  $\mu$  mol) と FeSO<sub>4</sub> (4  $\mu$  mol) を含む 0.2M citric acid-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (400  $\mu$  l) 溶液を 30°C で 1 時間振とうした. 反応後, HCl (12N) を 80  $\mu$  l 加えて反応を止め, 3 ml の酢酸エチルで 2 回抽出した. 抽出液を濃縮し, ペーパー (Whatman No.1, 3  $\times$  30 cm) にスポットし, benzene : acetic acid : water (40 : 10 : 1, v/v) で展開した. 展開後のペーパーから, UV-照射下で蛍光を発する R<sub>f</sub> 0.3 のバンドを切り取り, エタノールと水 (1 : 1, v/v) の混液で溶出した. 溶出液の 320 nm での吸光度を測定し, caffeic acid の分子吸光係数 ( $\epsilon = 18,600$ ) を用い生成した caffeic acid の量を算出した.



## 2. 結 果

### 1) *p*-Coumaric acid の水酸化反応生成物の同定

*p*-Coumaric acid の水酸化反応生成物は下記の3つの実験結果に基づいて caffeic acid と同定された。(1) 反応生成物は caffeic acid と同一の UV-スペクトルを示した (Fig. 14).

(2) 生成物は3種の展開溶媒を用いた Avicel 薄層クロマトグラフィーにおいて caffeic acid と同一の R<sub>f</sub> 値を示した。

benzen : acetic acid : water (40 : 10 : 1, v/v) R<sub>f</sub> 0.24; 5% acetic acid, R<sub>f</sub> 0.22 (trans), R<sub>f</sub> 0.64 (cis); n-butylalcohol : acetic acid : water (20 : 5 : 11, V/V) R<sub>f</sub> 0.8

(3) 生成物のメチル化産物は caffeic acid のメチル化産物と同一の EI-Mass スペクトルを示した (Fig. 15).

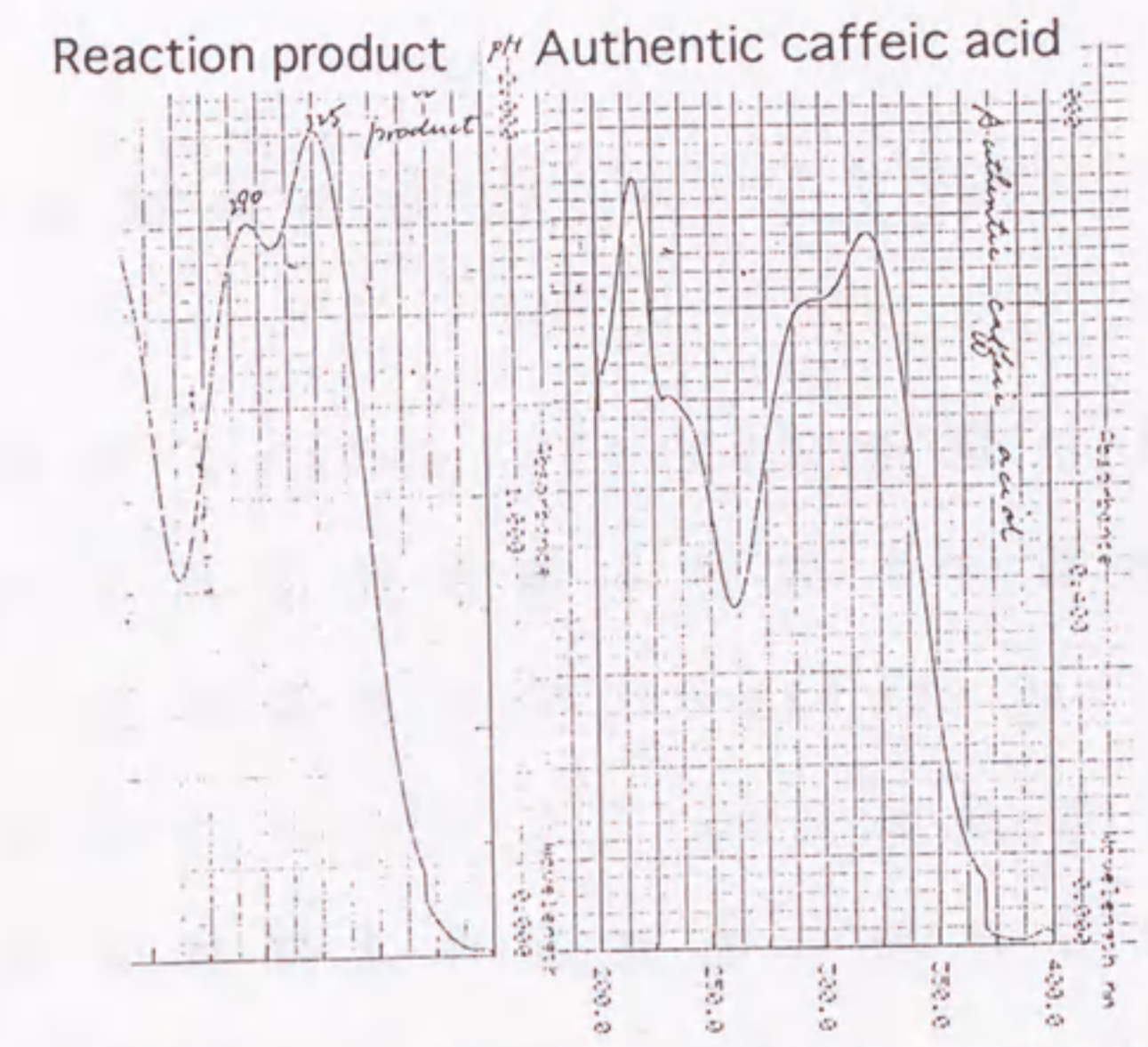


Fig.14 UV-Spectra of Non-Enzymatic Hydroxylation Product of *p*-Coumaric Acid and Authentic Caffeic Acid

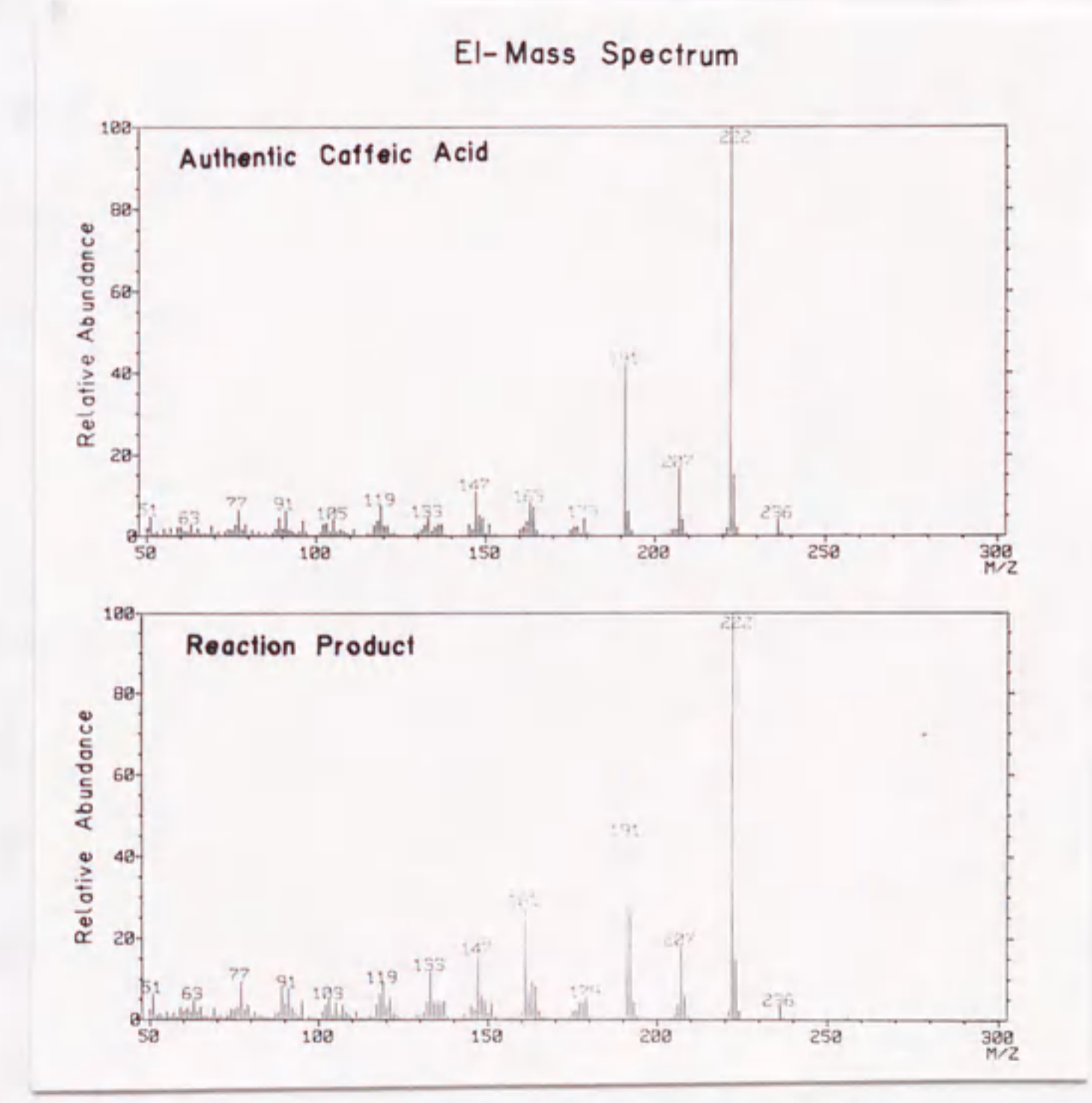


Fig. 15 Identification of Non-enzymatic Hydroxylation Product of *p*-Coumaric Acid by EI-Mass Spectroscopy

## 2) 水酸化反応の特性

反応生成物 (caffeic acid) の量は上記の反応条件下で反応開始後 1 時間まで直線的に増加した。窒素気流中では caffeic acid の生成は全くみられなかった。この結果より、本水酸化反応には空気中の酸素が関与していることが示唆された。pH を 3.0 から 7.0 まで変化させた acetate buffer, Tris-HCl buffer 液中や水中では全く caffeic acid は生成しなかった。p-Coumaric acid の水酸化生成物 (caffeic acid) の生成量は citric acid- $K_2HPO_4$  buffer 中では pH 5.0 で最も多かったが、phosphate buffer 中では pH 4.0 で最も生成量が多かった。Citric acid- $K_2HPO_4$  buffer や phosphate buffer 中では  $Fe^{2+}$  は遊離の形ではなく錯イオンの形で存在していると推定される。従って、 $Fe^{2+}$  の錯イオンが本系の水酸化反応の触媒として働いていると推定された。この推定は EDTA (25mM) を水や acetate buffer に

添加すると, citrate buffer中と同程度の caffeic acidが生成するという実験結果によって支持された.

水酸化反応に対する種々の金属イオンの効果を調べた (Table. 8).  $Fe^{2+}$ が最も強く反応を促進し,  $Cu^+$ が弱い活性を示した. それ以外の  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ は全く活性を示さなかった.

### 3) 水酸化反応に関与する活性酸素種の同定

水酸化反応に関与する活性酸素種についての情報を得るために, 種々の化合物や酵素の水酸化反応に対する影響を調べた

(Table. 9). L-Ascorbic acidの添加は本系の水酸化反応を促進しなかった. 水酸化反応は一般的ラジカルの捕捉剤である 2-mercaptoethylamine hydrochlorideや  $\cdot OH$ ラジカル捕捉剤である D-mannitol, D-sorbitolおよび KBrによって強く阻害された. 水酸化反応は

Table. 8 Effects of Various Metal Ions on the Hydroxylation of *p*-Coumaric Acid.

The reaction was carried out in 200 mM citric acid-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.0.

| Metals            | Concentration tested (mM) | Amount (nmol) of caffeic acid produced/hr | Relative amount of caffeic acid produced (%) |
|-------------------|---------------------------|---|--|
| FeSO <sub>4</sub> | 1                         | 20  | 8  |
|                   | 10                        | 134                                       | 56   |
|                   | 100                       | 241                                       | 100  |
| FeCl <sub>2</sub> | 1                         | 11  | 5  |
|                   | 10                        | 118                                       | 49   |
|                   | 100                       | 221                                       | 92   |
| FeCl <sub>3</sub> | 1                         | 0   | 0  |
|                   | 10                        | 0   | 0  |
|                   | 100                       | 0   | 0  |
| CuCl              | 1                         | 4   | 2  |
|                   | 10                        | 6   | 3  |
|                   | 100                       | 36  | 15   |
| CuCl <sub>2</sub> | 1                         | 0   | 0  |
|                   | 10                        | 0   | 0  |
|                   | 100                       | 0   | 0  |
| CoCl <sub>2</sub> | 1                         | 0   | 0  |
|                   | 10                        | 0   | 0  |
|                   | 100                       | 0   | 0  |

Table 9. Effects of Various Compounds and Enzymes on the Hydroxylation

| Scavenger           | nmol of Caffeic acid Produced / hr | Inhibition (%) |
|---------------------|------------------------------------|----------------|
| None                | 262                                | —              |
| D-Mannitol          | 77                                 | 71             |
| D-Sorbitol          | 92                                 | 65             |
| MEA <sup>1)</sup>   | 225                                | 14             |
| DABCO <sup>2)</sup> | 136                                | 49             |
| KBr                 | 81                                 | 69             |
| KsCN                | 190                                | 27             |
| KI                  | 186                                | 29             |
| Tiron               | 129                                | 51             |

1) 2-Mercaptoethylamine Hydrochloride

2) 1,4-Diazobicyclo (2,2,2) octane

| Enzyme tested | Conc. tested | Caffeic acid produced (nmol/hr) |
|---------------|--------------|---------------------------------|
| Catalase      | 350unit/ml   | 54 (79%)                        |
| SOD*          | 375unit/ml   | 57 (78%)                        |

\* : Superoxide dismutase      ( ) : Inhibition

また  $^1O_2$  消去剤である 1,4-DABCO や  $O_2^-$  捕捉剤である Tiron によっても阻害された。さらに, caffeic acid の生成は反応液に catalase や superoxide dismutase を加えた時にも減少した。これらの結果より Fig. 16 に示すような機構で  $Fe^{2+} - O_2$  複合体より superoxide anion ( $O_2^-$ ) が生じ, それが  $\cdot OH$  ラジカルに変化し, この  $\cdot OH$  ラジカルが水酸化反応に関与していると推定された。

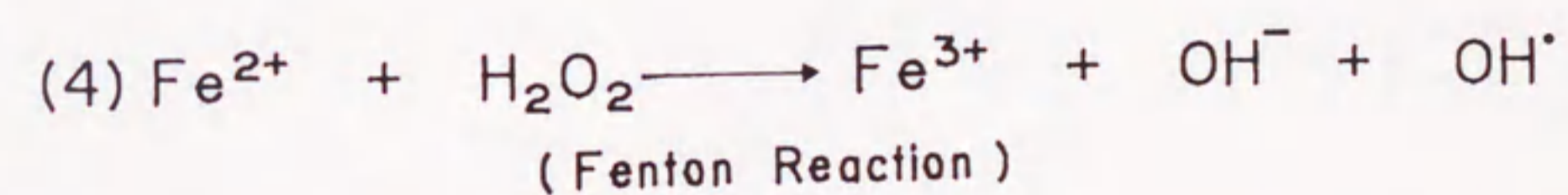
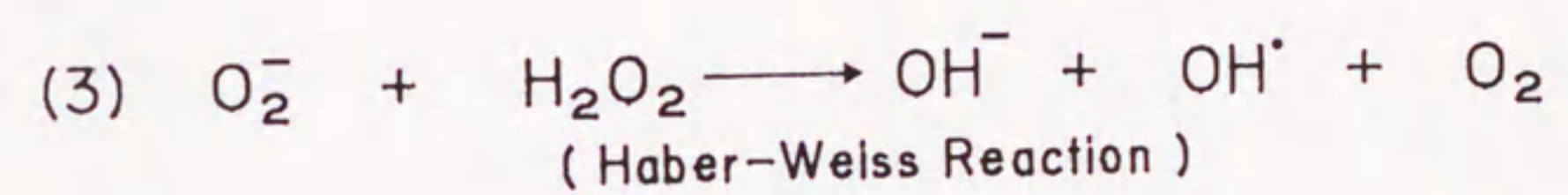
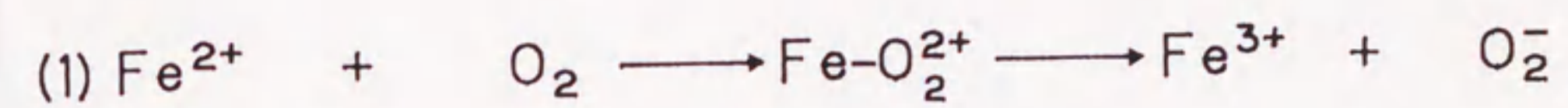


Fig. 16 The Proposed Mechanism of Formation of  $\cdot\text{OH}$  Radical which is Assumed to Be Involved Non-enzymatic Hydroxylation of *p*-Coumaric acid



## 3. 考 察

フェノール物質の水酸化反応に関与するマイクロゾームの monophenol 水酸化酵素は、P-450チトクロム酵素でFeを含み、PPOにはCuが含まれている。本章で述べた非酵素的な水酸化反応では $Fe^{2+}$ が最も活性が強く、 $Cu^+$ や $Cu^{2+}$ も弱いながらも活性を示した。このように非酵素的な水酸化反応と酵素による水酸化反応の間には類似性が想定される。従って本章で述べた非酵素的な水酸化反応の系で得られた知見は酵素による生体内のフェノール水酸化反応の機構を考える上で参考になるであろう。

しかし、本系における非酵素的な水酸化反応と酵素による水酸化反応には差異もある。酵素による水酸化反応ではL-ascorbic acidやNADPHなどの電子供与体が必要であるが、本系の水酸化反応ではL-ascorbic acidは反応を促進しなかった。

本章で得られた結果から、 $Fe^{2+}$ -錯イオン

が共存すれば, monophenolは容易にdiphenol  
に水酸化されることが判明した. この知見は  
食品の貯蔵や加工に際しても役立つであろう.

## 第 6 章

### 総 合 考 察

本研究の主目的は黒緑豆実生中の mono-phenol を diphenol へ水酸化するのに関与している酵素の解明であった。2つの可能性のある酵素が検出された。1つは第2章で述べた膜結合型の p-coumaric acid hydroxylase で、1つは第3章で述べた可溶性の polyphenol oxidase である。両酵素とも *in vitro* で NADPH や L-ascorbic acid の共存下で効率よく p-coumaric acid を caffeic acid に水酸化した。

第2章で述べた p-coumaric acid hydroxylase は水酸化活性だけを示し、酸化酵素活性を示さないことから一見 polyphenol oxidase ではないように見える。膜結合型であることから P-450 チトクロム酵素との類似性<sup>43), 44)</sup>

が予想されたが, Table 5 に示したように種々の化合物に対する反応から P-450 チトクロム酵素である可能性は否定された. 一方, 本酵素が diethyldithiocarbamate で阻害されることから銅酵素であると推定され, 本酵素は polyphenol oxidase に類似した酵素である可能性も高い.

第3章で述べた酵素は典型的な polyphenol oxidase の性質を示した.

Polyphenol oxidase は植物, 茸やカビ類に広く分布している. しかし, その生体内の役割についてはまだ確定していない. 現在, 下記のような生体内の役割が提唱されている.

1) 傷害組織における防御壁の形成<sup>45)</sup>, 2) 種子の外殻形成<sup>46)</sup>, 3) 病原菌が生成する phyto toxin の解毒<sup>47)</sup>, 4) 光化学系による分子状酸素の光還元<sup>45)</sup>, 5) 二次代謝系における monophenol の水酸化反応<sup>48)</sup>. このような多種の機能を一つの酵素タンパク質が担っていると考えるのは無理であろう. Poly-

phenol oxidaseには多数のアイソザイムがあり、それらのアイソザイムの細胞内の局在部位も異なっている。膜結合のアイソザイムもあるし、可溶性アイソザイムもある。これらのアイソザイムはそれぞれ異なった機能をもつはずであり、上記の多数の機能は別々のアイソザイムによって担われていると考えるのが妥当のように思われる。従って、多数あるアイソザイムの中に、monophenolの水酸化反応に関与しているpolyphenol oxidase アイソザイムがある可能性は十分ある。

しかし、polyphenol oxidaseが生体内でポリフェノールの生合成に関与していることに疑問をもつ研究者もいる。彼らは下記の論拠を挙げる。

- ① Polyphenol oxidaseは一般的に特異性が低い<sup>49)</sup>。
- ② Polyphenol oxidaseは水酸化活性と共に、酸化活性も示す。水酸化反応には電子供与体が必要であり、そのうえ酸化反応で生じる反応性の高いquinonesを還元して反応

性がより低い quinols に戻すためにも多量の電子供与体が必要となる。これほど多量の電子供与体を植物が供給するのは難しい<sup>50)</sup>。

しかし、これらの論拠は polyphenol oxidase のある種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ことを否定するのに十分でない。ある種の polyphenol oxidase の基質特異性は低くない。現に第2章で述べた酵素（本酵素が polyphenol oxidase である確証はないが）の基質特異性は広くなかった<sup>51)</sup>。また、二次代謝関連酵素の基質特異性は一般的に広く、他にも基質特異性の広い二次代謝酵素はいくらでもある<sup>52), 53)</sup>。かえって、この基質特異性の広さが二次代謝系の網目状経路の原因であると考えられている。2番目の論拠については推測に基づくもので、実際の実験データはない。

一方、polyphenol oxidase がポリフェノールの生合成に関与していることを支持する下記のような結果もある。(1)本研究でも示され

たように、いくつかの系で polyphenol oxidase 活性の変動とポリフェノール生合成の変動が一致する<sup>51)</sup>。(2) Polyphenol oxidase 活性が低く、水酸化酵素活性の高い polyphenol oxidase のアイソザイムが植物中に存在している<sup>54)</sup>。(3) 田中と小島は、最近 polyphenol oxidase が monophenol を水酸化する時に電子供与体として使われる L-ascorbic acid がサツマイモ中で、ポリフェノールの生合成と連動して増加することをみつけた<sup>54), 55), 56)</sup>。

本論文の2章と3章で述べた2つの酵素のうち、どちらの酵素が黒緑豆の実生中のポリフェノールの生合成に関与しているかを明らかにする必要がある。このためには種々の実験が考えられるが、一番有効な実験は2つの酵素の c-DNA をクローニングして、それらを用いて anti-sense RNA 阻害や、遺伝子破壊の実験を行い、どちらの酵素の c-DNA の場合にポリフェノール生合成がより強く阻害されるかを決める実験であろう。

植物体中のポリフェノール生合成の制御において、水酸化酵素活性の変動だけでなく、水酸化反応に必須である電子供与体の変動も重要な因子である。水酸化酵素の生体内電子供与体としてはNADPHやL-ascorbic acid等が考えられている。予想外にも、tyrosinaseによるL-tyrosineの *in vitro* の水酸化反応においては電子供与体を加える必要がなかった(第4章)。この反応において、電子供与体を加える必要がないのはL-tyrosine中のアミノ基が電子供与体として機能していることを明らかにした。この結果から、直ちに生体内のmonophenolの水酸化反応の電子供与体として、アミノ基が関与しているとは考えられないが、monophenolの生体内の水酸化反応の反応機構を考える上で参考になるであろう。

上下にドーナツ状の $\pi$ -電子雲によって被われているベンゼン環に負の電荷をもった水酸基を有機化学的に導入することは容易なことではないように見える。ところが、第5章で述



べたように、 $Fe^{2+}$ の錯イオンが存在すると、室温で非常に効率よく、*p*-coumaric acid が caffeic acid に非酵素的に水酸化された。この結果からまたすぐに生体内で非酵素的な monophenol の水酸化反応が起こっているとは考えられないが、monophenol の生体内水酸化反応の機構を考える上で参考になるであろう。

第4章と第5章で得られた研究成果は植物性食品の加工や貯蔵に対しても重要な知見を提供するものと考えられる。本研究から野菜類の貯蔵中にフェノール成分の増加に対応してアミノ酸などの減少が起きる可能性も示唆される。また従来、鉄や銅イオンが共存すると食品加工中に褐変が生じやすくなることはよく知られていた。これらの現象では食品中にすでに存在しているフェノール成分が酸化される反応にこれらの金属イオンが触媒として作用するものと理解されていた。しかし、第5章の成果から、 $Fe^{2+}$ は食品中に存在している monophenol 成分を酸化されやすい *o*-di-

phenolに水酸化し、さらにそれが酸化される際にも触媒として機能している可能性が指摘される。

## 要 旨

黒緑豆 (*Vigna mungo*) 実生中の monophenol の diphenol への水酸化反応に関与する酵素の解明をめざし本研究を行い、下記の結果を得た。

(1) Tentoxin 処理した実生中に、膜結合型の p-coumaric acid hydroxylase を検出した。本酵素は PPO 活性を示さなかった。本酵素は分子状酸素を反応に要求し、至適 pH は 5.0 であった。本酵素は p-coumaric acid だけを水酸化し、その  $K_m$  値は  $3.0 \times 10^{-5} M$  であった。一方、本酵素の電子供与体に対する特異性は広く、NADPH に対する  $K_m$  値は  $1.5 \times 10^{-4} M$  で、L-ascorbic acid に対する  $K_m$  値は  $1.0 \times 10^{-2}$  であった。本酵素反応は銅のキレート剤である diethyldithiocarbamate ( $K_i, 2.3 \times 10^{-4} M$ ) や  $\beta$ -mercaptoethanol ( $K_i, 3.5 \times 10^{-6} M$ ) で強く阻害されたが、p-chloromercuribenzoate によ

って は 阻 害 さ れ な か っ た。 シ ョ 糖 密 度 勾 配 遠 心 に よ る 分 析 の 結 果, 本 酵 素 は ミ ト コ ン ド リ ア と 小 胞 体 膜 の 間 に 沈 降 す る 細 胞 内 小 器 官 に 局 在 し て い た。 実 生 に 光 を 照 射 す る と, 本 酵 素 活 性 は フ ェ ノ ール 成 分 の 生 合 成 と 同 調 し て 変 動 し た。

(2) 実 生 中 の 主 要 可 溶 性 PPO ア イ ソ ザ イ ム の 1 つ を 精 製 し, そ の 性 質 を 調 べ た。 本 酵 素 は 実 生 中 の 全 て の 器 官 ( 葉, 子 葉, 胚 軸, 根 ) 中 に 全 て の 生 育 期 間 に 存 在 し た。 本 酵 素 の 等 電 点 ( pI ) は 5.4 で あ っ た。 本 酵 素 は PPO 活 性 だ け で な く, L-ascorbic acid 共 存 下 で p-coumaric acid hydroxylase 活 性 も 示 し た。 水 酸 化 反 応 の 至 適 pH は 7.0 で, p-coumaric acid に 対 す る  $K_m$  値 は 1.1 mM で,  $V_{max}$  は 330 nmol / min / mg protein で あ っ た。 一 方, L-dopa の 酸 化 反 応 に お い て は pH 6.0 ~ 8.0 で 最 高 活 性 を 示 し,  $K_m$  値 は 31 mM で,  $V_{max}$  は 196 nmol / min / mg protein で あ っ た。 本 酵 素 活 性 は 胚 軸 と 根 で は ポ リ フ ェ ノ ール 成 分 の 生 合 成 と 同 調 し て 変 動

したが、葉と子葉ではポリフェノール成分の生合成と反対の関係で変動した。

(3) Mushroomと黒緑豆実生より分離したPPOを用い、in vitroでL-tyrosineと p-coumaric acidを水酸化した時に、L-tyrosineの場合には電子供与体を要求しなかったが、p-coumaric acidの場合には電子供与体を要求することを見つけ、この原因を究明した。p-Coumaric acidの水酸化は glutamic acidのようなアミノ基をもつ化合物の添加によって促進された。L-Tyrosineを電子供与体非存在下で反応させたあとの反応液中に p-hydroxyphenylpyruvic acidとみなされる物質が検出された。L-Tyrosineよりアミノ基が除かれた物質である p-hydroxyphenylpyruvic acidの水酸化反応には電子供与体を加える必要があった。以上の結果より、L-tyrosineのPPOによる水酸化反応では分子中のアミノ基が電子供与体として機能していると推定した。

(4) p-Coumaric acid が  $Fe^{2+}$  の共存下で効率

よく caffeic acid に非酵素的に水酸化されることを見つけ、この反応を解析した。本反応は  $N_2$  気相中では進行しないことから、分子状酸素が反応に関与していると推定される。本反応の至適 pH は citric acid- $K_2HPO_4$  buffer 中では 5.0 であった。

水酸化反応に関与しているのは遊離の  $Fe^{2+}$  イオンでなく、 $Fe^{2+}$  の錯イオンが触媒として働いていることが推定された。 $Fe^{2+}$  以外の金属イオンでは  $Cu^+$  だけが弱い活性を示し、 $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  などは全く活性を示さなかった。本水酸化反応は L-ascorbic acid の添加によって促進されなかった。本水酸化反応は、2-mercaptoethylamine hydrochloride (一般的なラジカル捕捉剤), D-mannitol (OH ラジカル捕捉剤), 1,4-DABCO ( $^1O_2$  除去剤), Tiron ( $O_2^-$  捕捉剤), catalase, superoxide dismutase の添加によって阻害された。これらの結果より、 $\cdot OH$  ラジカルが水酸化反応に関与していると推定された。

References

1. Rice, E. L., : Allelopathy, Academic Press, New York (1974)
2. "Secondary Plant Products" ed. by E. A. Bell and B. V. Chrlwood, Springer-Verlag Press, New York (1980)
3. Gorham, J. : Phytochemistry., 16, 249 (1977)
4. Harborne, J. B. : Introduction to ecological Biochemistry, Academic press, London (1977)
5. Kokoul, J. and Conn, E. E. : J. Biol. Chem., 236, 2962 (1961)
6. Boudet, A. M., Rarieva, R. and Gadai, P., : Phytochemistry, 10, 997 (1971)
7. Russell, D. W. and Conn, E. E. : Arch. Biochem. Biophys., 122, 256, (1967)
8. Garfinkel, D. : Arch. Biochem. Biophys., 77, 493 (1958)
9. Klingenberg, M. : Arch. Biochem. Biophys., 75, 376 (1958)
10. Omura, T. and Sato, R. : J. Biol. Chem., 239, 2370 (1964)
11. Omura, T. and Sato, R. : J. Biol. Chem. 239, 2379 (1964)
12. Duke, S. O. and Vaughn, K. C. : Physiol. Plant, 54, 381 (1982)
13. McCalla, D. R. and Neish, A. C., : Can. J. Biochem. Physiol., 37, 537 (1959)
14. Gross, G. G. : in Biosynthesis & Biodegradation of Wood Components , (Higuchi, T., ed) pp 229, Academic Press, New York (1985)
15. Kamsteeg, J., Brederode, J. V., Verschuren, P. M., and Nigtevecht, G. V., : Z. Pflanzenphysiol. 102, 435 (1981)

16. Boniwell, J. M. and Butt, V. S., : *Z. Naturforsch.* 41c, 56 (1986)
17. Butt, V. S. : in "The Biochemistry of Plants", 2 ed., D. D. Davies, Academic Press, New York, pp 81 (1980)
18. Vaughn, K. C. and Duke, S. O., : *Physiol. Plant.* 60, 106 (1984)
19. Lamb, C. J. and Rubery, P. H. : *Anal. Biochem.*, 68, 554 (1975)
20. Rao, P. V. S. and Towers, G. H. N., : *Method Enzymol.* 17, 581 (1970)
21. Zuker, M. and Ahrens, F. J. : *Plant Physiol.*, 33, 246 (1958)
22. Maeshima, M. and Asahi, T. : *Plant cell Physiol.*, 187, 423 (1978)
23. Fujita, M. and Asahi, T. : *Plant cell Physiol.*, 26, 397 (1985)
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
25. Vaughan, P. F. T. and Butt, V. S. : *Biochem. J.*, 113, 109 (1969)
26. Hayaishi, O. : *Annu. Rev. Biochem.*, 38, 21 (1969)
27. Dawson, C. R. and Magee, R. J. : *Methods Enzymol.*, 2, 817 (1955)
28. Stafford, H. A. and Dresler, S. : *Plant Physiol.*, 49, 590 (1972) (1973)
29. Laemmli, U. K. : *Nature (London)*, 227, 680 (1970)65 (1989)
30. Bradford, M. : *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
31. Benjamin, N. D. and Montgomery, M. W., : *J. Food Sci.*, 38, 799 (1973)
32. Kojima, M. and Takeuchi, W. : *J. Biochem.*, 105, 265 (1989)



33. Marumo, K. and Waite, J. H. : Biochem. Biophysica. Acta., 872, 98 (1986)
34. Takeuchi, W., Takahashi, H. and Kojima, M. : Agric. Biol. Chem. 53(8), 2267 (1989)
35. Udenfriend, S., Clark, C. T., Axelrod, J. and Brodie, B. B. : J. Biol. Chem., 208, 731 (1954)
36. Brodie, B. B., Axelrod, J., Shore, P. A. and Udenfriend, S. : J. Biol. Chem. 208, 741 (1954)
37. Tadera, K., Arima, M. and Yagi, F. and Kobayashi, A. : Agric. Biol. Chem., 52, 2359 (1988)
38. Richmond, R., Halliwell, B., Chauhan, J. and Darbre, A., : Anal. Biochem., 118, 328 (1981)
39. Gutteridge, J. M. C. : Biochem. J., 243, 709 (1987)
40. Tadera, K., Arima, M., Yoshino, S. Yagi, F. and Kobayashi, A., : J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32, 262 (1986)
41. Murata, A. Suenaga, H., Inoue, M., Tanaka, Y. and Kato, F., : Vitamins, 57, 515 (1983)
42. Murata, A., Suenaga, H. Inoue, M., Hideshima, S., Tanaka, Y. and Kato, F. : Agric. Biol. Chem., 50, 1481 (1986)
43. Potts, J. R. M., Weklych, R. and Conn, E. E. : J. Biol. Chem., 249, 5019 (1974)
44. Tanaka, Y., Kojima, M. and Uritani, I. : Plant cell Physiol., 15, 843 (1974)
45. Vaughn, K. C., Lax, A. R. and Duke, S. O. : Physiol. Plant, 72, 659, (1988)
46. Marbach, I. and Mayer, A. M. : Plant Physiol., 56, 93 (1975)

47. Zinkernagel, V. : J. Phytopathol., 115, 257 (1986)
48. Larson, R. L. and Robels, R. P. : Maydica, 26, 199 (1981)
49. Mayer, A. M. and Harel, E. : Phytochem., 18, 193 (1979)
50. West, C. W. : in " The Biochemistry of Plants", 2, ed. D. D. Davies, p317-364, Academic Press, New York, (1980)
51. Takeuchi, W., Takahashi, H. and Kojima, M. : Biosci. Biotech. Biochem., 56(7), 1134 (1992)
52. Knobloch, K. H. and Hahlbrock, K. : Arch. Biochem. Biophys., 184, 237 (1977)
53. Villegas, R. J. A. and Kojima, M. : J. Biol. Chem., 261, 8729 (1986)
54. Tanaka, M. and Kojima, M. : Arch. Biochem. Biophys., 381, 151 (1991)
55. Kojima, M. and Conn, E. E. : Plant Physiol., 70, 922 (1982)
56. Bajaj, K. L., Singh, P. P. and Kaue, G. : Biochem. Physiol. Planz., 180, 621 (1985)

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇切なる御指導、御鞭達を賜りました小島峯雄先生に深く感謝の意を表します。また、名古屋大学名誉教授瓜谷郁三先生をはじめとし、川岸舜朗先生、ならびに高橋平八郎先生には貴重な御教示や励ましのお言葉を賜りました。近藤忠雄先生にはEI-Massスペクトルの測定に際して御便宜をはかって頂くとともに御指導を頂き、また北川泰雄先生にはザイモグラムデータのデータを扱う上での貴重な文献を頂き、御指導を賜りました。諸先生方に厚く御礼を申し上げます。

さらに、代謝制御研究室の山口淳二先生をはじめとする多くの皆様にも有益な御助言を頂くとともに、多岐にわたり大変お世話になり、ここに厚く御礼を申し上げます。

## 報文目録

1. Kojima, M. and Takeuchi, W. (1989) Detection and Characterization of p-Coumaric Acid Hydroxylase in Mung Bean, *Vigna mungo*, Seedlings J. Biochem., 105, 265-270.
2. Takeuchi, W., Takahashi, H. and Kojima, M. (1989) Non-enzymatic Hydroxylation of (E)-p-Coumaric Acid to (E)-Caffeic Acid. Agric. Biol. Chem., 53, 2267-2268.
3. Takeuchi, W., Takahashi, H. and Kojima, M. (1992) Purification and Characterization of the Main Isozyme of Polyphenol Oxidase in Mung bean(*Vigna mungo*)Seedlings. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1134-1135.
4. Takeuchi, W., Takahashi, H. and Kojima, M.  
植物内ポリフェノール生成におけるポリフェノールオキシダーゼの関与  
日本食品工業学会誌 投稿中