

# もやし豆 (*Vigna radiata* L. Wilczek) 実生中の 新 *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの検出とその性質

竹内若子・小島峯雄\*・高橋平八郎

## Detection and Characterization of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase in Mung Bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) Seedlings

Wakako TAKEUCHI, Mineo KOJIMA and Heihachiro TAKAHASHI

### 序 論

植物性食品中にはクロロゲン酸やフラボノイド等のカフェイン酸 (3,4-dihydroxy cinnamic acid) を構成成分としてもつポリフェノール類が多量に存在している。これらのポリフェノール類は食品の酵素的褐変反応の重要な基質であり、食品加工・調理の面からも注目されている。

これらのポリフェノール類中のカフェイン酸成分は、L-フェニルアラニンより生成する *t*-桂皮酸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より明らかにされている。更に *t*-桂皮酸のベンゼン環の4位に水酸基を導入し、*p*-クマル酸を生成する反応を触媒する *t*-桂皮酸4-ヒドロキシラーゼは種々の植物より既に分離されている<sup>1)</sup>。しかしながら *p*-クマル酸のベンゼン環の3位に2つ目の水酸基を導入してカフェイン酸を生成する酵素については、まだ確定されていない。

我々は、サツマイモ中のクロロゲン酸生合成経路解明のための研究<sup>2\*)</sup>の一環として、上記の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼをサツマイモ中に検索した。その結果、L-アスコルビン酸を補酵素として加えた時に *p*-クマル酸を水酸化してカフェイン酸を生成する酵素を検出した。一方、Butt ら<sup>3)</sup>は、ポリフェノールオキシダーゼ (フェノラーゼ) が酸化酵素活性 (オキシダーゼ) だけでなく、L-アスコルビン酸の共存下で *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性をもつことを示し、ポリフェノールオキシダーゼがカフェイン酸成分の生合成にも関与していると以前より主張している。これに対して Duke ら<sup>4)</sup>は、tentoxin (fungal toxin の一つ) で処理した緑豆の実生中のポリフェノールオキシダーゼや *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼが完全に消失するにもかかわらず、カフェイン酸成分の含量が全く減少しないという実験結果に基づき、ポリフェノールオキシダーゼはポリフェノールの生合成には関与していないと主張している。我々は Duke ら<sup>4)</sup>の実験を追試し、彼らが測定していなかった tentoxin 処理緑豆実生の膜画分中に、オキシダーゼ活性を全く示さずヒドロキシラーゼ (水酸化) 活性だけをもつ、新しい水酸化酵素がかなりの量残存していることを見出した。本論文では、本酵素の検出とその若干の性質について述べる。

\* 名古屋大学農学部・生化学制御研究施設

## 実験材料および方法

### 1. 実験材料

緑豆 (*Vigna radiata* L. Wilczek) の種子を0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬することにより殺菌し、30分間水洗後、80 $\mu$ Mの tentoxin 水溶液中で一夜吸水させた。吸水後種子を2 mM 硫酸カルシウムを含むパーミキュライト上に蒔き、27 $^{\circ}$ Cで暗黒下または光照射(3,000Lux)で生育させ、実生全体を試料として用いた。なお対照としては、tentoxin 溶液の代わりに水を吸水させた実生を用いた。

Tentoxin [cyclo (N-methyl-L-alanyl-L-leucyl-N-methyl-*trans*-dehydrophenylalanyl-glycyl)]は、Sigma 社より購入し、80 $\mu$ M水溶液として用いた。

### 2. 実験方法

#### 1) 総フェノール類の抽出及び定量法

Zuker の方法<sup>9)</sup>で抽出、定量を行なった。標準曲線はカフェイン酸を用いて作成した。

#### 2) アントシアニンの抽出及び定量法

Duke の方法<sup>10)</sup>で抽出、定量した。アントシアニン量は1 gの試料より抽出した10mlの抽出液の540 nmと600 nmでの吸光度の差をもって表示した。

#### 3) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の抽出及び定量法

Rao らの方法<sup>11)</sup>で抽出し、その活性の測定も彼らの方法に準じて行なった。

#### 4) *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ及びポリフェノールオキシダーゼ活性測定のための抽出液の調整法及びその分画法

緑豆実生(3.8 g)をD-ソルビトール(0.7 M)、EDTA(1 mM)および海砂少量を含む氷冷した10mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Citrate buffer (pH 5.3, 14 ml)中で、乳鉢を用い磨砕した。磨砕液を110 $\times$ gで15分間遠心し、上清と沈澱画分に分けた。沈澱は一定量のD-ソルビトール(0.7 M)を含む10 mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Citrate buffer (pH 5.3, 緩衝液Aと以後略す)に再懸濁し、酵素活性を測定した。上清画分中の酵素活性を可溶性酵素の活性とし、沈澱画分中の酵素活性を膜結合酵素の活性とした。

#### 5) 膜画分の連続的シヨ糖密度勾配超遠心による分画法

少量の緩衝液Aに懸濁した膜画分を10%から50%の直線的密度勾配のシヨ糖溶液(15ml)の上に重層し、Beckman SW-27-1ローターで82,500 $\times$ gで90分間遠心した。遠心後、ISCO社製のdensity gradient fractionatorにかけて0.6mlずつ分画し、各分画中の*p*-クマル酸ヒドロキシラーゼとポリフェノールオキシダーゼを測定した。なお各分画の密度は屈折計を用い測定した。

#### 6) 膜画分の段階的シヨ糖密度勾配超遠心による分画

上記の連続的シヨ糖密度勾配超遠心による対照区の結果、シヨ糖濃度20%と40%の付近の密度に*p*-クマル酸ヒドロキシラーゼとポリフェノールオキシダーゼの2つの重なるピークが検出された。この2つのピークに対応する膜分画を調製するために、少量の緩衝液Aに懸濁した膜分画を20%(5 ml)、30%(5 ml)、60%(5 ml)より成るシヨ糖の段階的密度勾配液の上に重層し、Beckman SW-27-1ローターで82,500 $\times$ gで90分間遠心した。遠心後、20%と30%溶液の境界と30%と60%の境界に沈降した膜成分をピペットで分取し、分析に供した。

#### 7) *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性測定法

酵素溶液(100~300 $\mu$ l)を0.2M、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Citrate buffer (pH5.3)100 $\mu$ l、飽和硫安溶液50 $\mu$ l、カタラーゼ溶液(Sigma社製、10mg/ml水溶液)50 $\mu$ l、L-アスコルビン酸ナトリウム

溶液 (60 mM) 50 $\mu$ l より成る反応混液に加え, 30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた. 濃塩酸60 $\mu$ l を加え反応を停止させ, 0.5mlの飽和硫酸溶液を加えたあと3 mlの酢酸エチルで2回抽出した. 酢酸エチル層を濃縮し, 濾紙 (Whatman No. 1, 3 $\times$ 30cm) に塗布し, ベンゼン:酢酸:水 (40:10:1, v/v) の混液で展開 (下降法) した. 濾紙を乾燥後, UV ランプ下で酵素反応生成物であるカフェイン酸の蛍光バンドを検出して切り取り, 細かく刻んだあとエタノール:水 (1:1, v/v) 混液 (2.5ml) 中に一夜浸漬溶出した. これに 0.25M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer (pH 11.5) を 200  $\mu$ l 加えたあと遠心分離により濾紙片を除き, 蛍光光度計 (日立社製, MPF-2A型) を用い, 励起光は 395 nm でスリット幅 8 nm に設定し, 放射光は 465 nm でスリット幅 8 nm に設定して蛍光強度を測定した. 標準曲線はカフェイン酸を試料と同じ方法で処理して作成した.

#### 8) ポリフェノールオキシダーゼ活性測定法

分光光度計 (日本分光社製, UVIDEC-610B) のキュベット中で酵素反応を行い, 反応の進行を 490 nm の吸光度の増加で追跡し, 1 分間当たりの吸光度の増加で活性を表わした.

試料キュベットには, DL-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) (10mg/ml) 水溶液0.5ml, 0.2M, Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.5ml, カタラーゼ (10mg/ml) 50  $\mu$ l と酵素液 (50~100 $\mu$ l) を入れ, 対照キュベットには DOPA 溶液の代わりに水を加えた. 酵素反応は, 酵素液の添加で開始した.

### 結果および考察

#### 1. 実生中のフェノール成分の蓄積に対する光照射と tentoxin 処理の効果

緑豆の実生を暗黒下で生育させている間は, フェノールもアントシアニンの蓄積もほとんど起こらず, 光を照射すると急速に蓄積が始まり5日目まで直線的に増加し続けた (Fig. 1 (a)・(c)). 一方, 初めから終わりまで暗黒下で生育させた場合には, 全く蓄積が起こらなかった.

Tentoxin で処理した実生は光に照射しても全く緑化せず, 6日目でも黄化したままであった. しかし, 総フェノールとアントシアニンの蓄積は全く阻害されなかった (Fig. 1 (a)・(c)). このことは Duke らの報告<sup>8)</sup>と一致する結果である.

#### 2. Tentoxin 処理のフェニルアラニンアンモニアリアーゼと可溶性画分中のポリフェノールオキシダーゼと *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼに対する効果

Tentoxin 処理によってフェニルプロパノイド代謝の鍵酵素と考えられているフェニルアラニンアンモニアリアーゼの誘導合成は, 僅かしか阻害されなかった (Fig. 2). 一方, Duke らの結果と一致して *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼは完全に消失し, 光照射によっても全く誘導合成されなかった (Fig. 2).

#### 3. Tentoxin 処理の膜画分中のポリフェノールオキシダーゼと *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼに対する効果

Tentoxin 処理をし, 3日間暗黒下で生育させたあと1日間光をあててポリフェノール成分の合成を誘導させた実生の膜画分中のポリフェノールオキシダーゼも可溶性画分中のポリフェノールオキシダーゼと同様に全く消失した. しかし, 同画分には *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性は, かなり残存していた (Table 1). この結果は, tentoxin 処理実生の膜画分中にはポリフェノールオキシターゼ活性をもたない *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼが存在していることを示している. 因みに, tentoxin 処理実生中の膜画分中に残存する *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの活性は, 実生中のポリフェノール成分の生合成を説明するのに十分な活性であった.

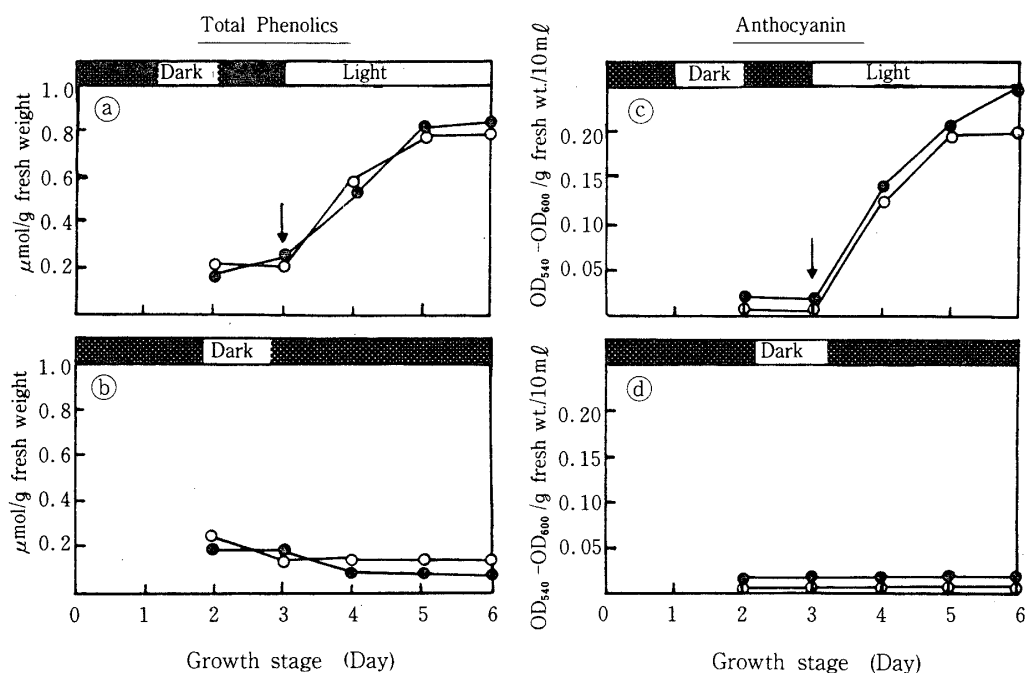


Fig. 1 Effect of treatment by light and tentoxin on total phenolics and anthocyanin accumulation in mung bean seedlings.

Seeds were imbibed in  $80\mu\text{M}$  tentoxin solution (●●) or water (○○) for 12hrs and then grown under the dark. In the experiments of figure (a) and (c), the seedlings were exposed to light after 3 days. On the other hand, in the experiments of figure (b) and (d), the seedlings were grown under the dark until the end of experiment.

Table 1. Effect of tentoxin treatment on polyphenoloxidase and *p*-coumaric acid hydroxylase in the membrane fraction from mung bean seedlings.

	Water-treated (Control)	Tentoxin-treated
Polyphenoloxidase ( $\Delta\text{OD}_{490}/\text{min}$ )	1.6	0
<i>p</i> -coumaric acid hydroxylase (nmol of caffeic acid produced/min)	593.5	109.4

The seeds imbibed in tentoxin solution or water were grown under the dark for the first 3 days and then exposed to light for 1 day. The membrane fractions were prepared according to the method described in the text. The enzyme activity is expressed as activity per gram fresh weight of seedlings.

#### 4. 水処理実生中の膜画分中のポリフェノールオキシダーゼと *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの光照射による変化

水処理後、暗黒下で3日間生育させた実生の膜画分を10%~50%のショ糖密度勾配超遠心分析にかけるとショ糖濃度20%付近にポリフェノールオキシダーゼと *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの重なる単一のピークが検出された (Fig. 3(a)). 本ピークの密度から本分画はエチオプラストのクロロプラスト膜成分であると推測される。また、更にもう1日暗黒下で生育を継続

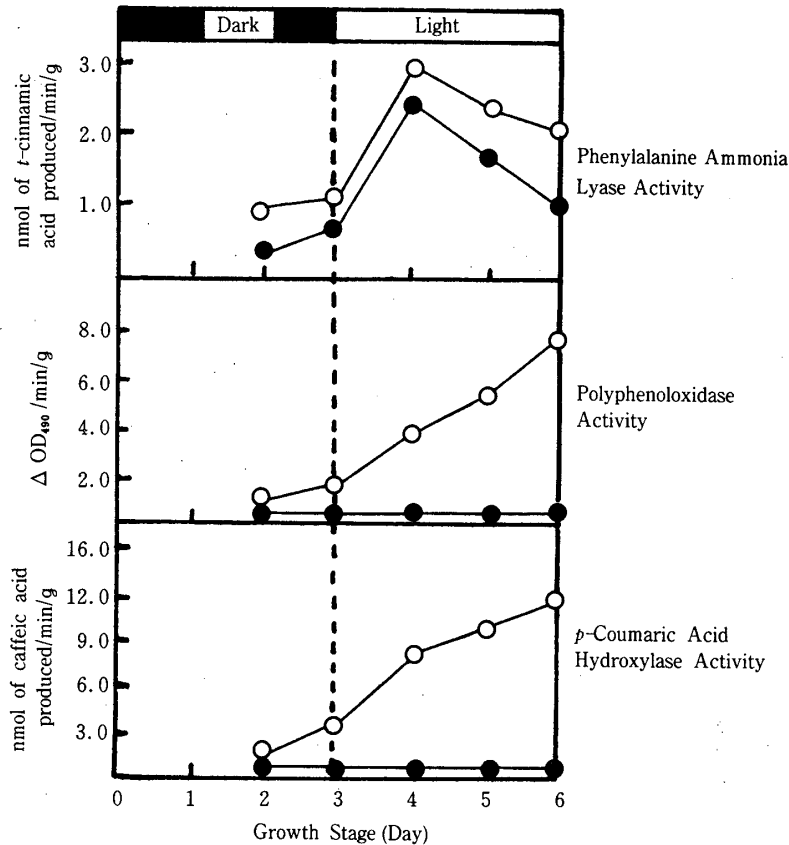


Fig. 2 Effect of tentoxin treatment on phenylalanine ammonia lyase and polyphenoloxidase and *p*-coumaric acid hydroxylase in soluble fraction from mung bean seedlings. Tentoxin treated (●●) or water treated (○○) seeds were grown under the dark for the first 3 days and then exposed to light. The seedlings were harvested at the various growth stages and assayed for the enzyme activities by the methods described in the text.

した実生の膜画分も同じ分析結果を与えた (Fig. 3(c)). 他方, 3日間暗黒下で生育させたあと1日光を照射した実生の膜画分の場合には, 暗黒下で生育させた膜中に存在するピークが減少するとともに, 新たに40%付近のシヨ糖濃度の位置にピークが出現した (Fig. 3(b)). このピーク分画の密度, およびこの分画が緑色を呈していることにより, この分画はクロロプラストのチラコイド膜に由来する分画であると推定される. このピークが実生を光照射した時に出現すること, ポリフェノール成分が光によって誘導合成されることを考えあわせると, このピーク中の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼが水処理実生中のポリフェノール成分の生合成に関与していることが示唆される.

##### 5. Tentoxin 処理実生中の膜画分中のポリフェノールオキシダーゼと *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの光照射による変化

Tentoxin 処理後, 暗黒下で3日間生育させた実生の膜画分を10~50%のシヨ糖密度勾配超遠心分析にかけたところ, シヨ糖濃度20%付近の密度にポリフェノールオキシターゼのピークが現われ, 25~40%の密度のところに幅広い *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼのピークが現われた (Fig. 4(a)). この結果は, 両酵素活性のピークが重なって現われた水処理実生の場合と異

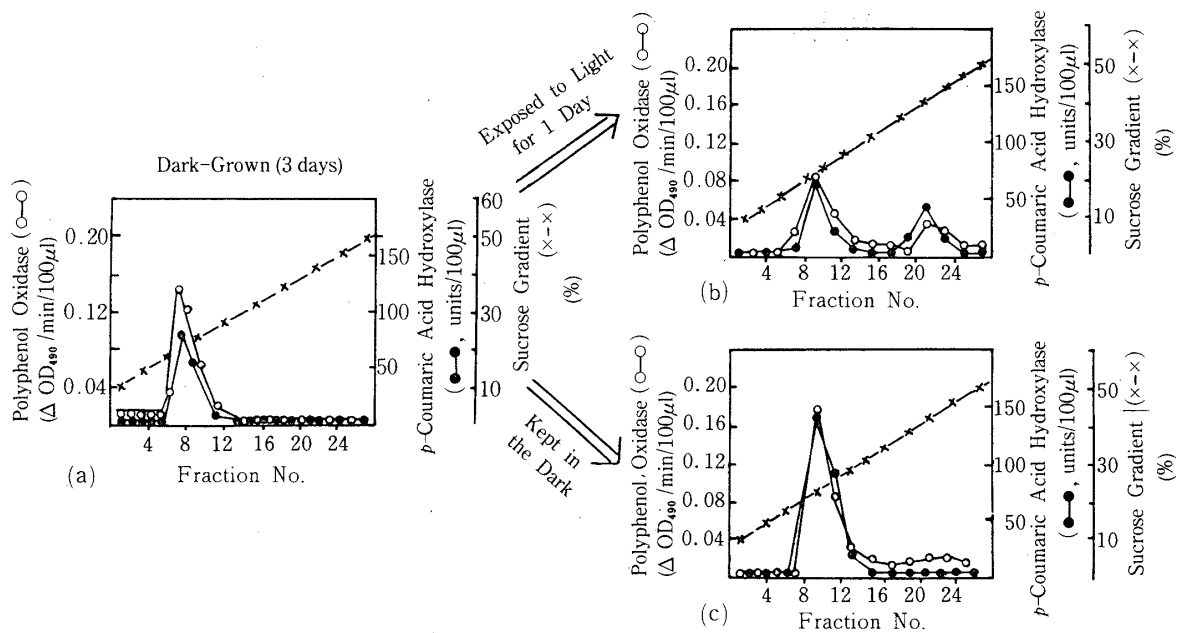


Fig. 3 Light-induced change in sedimentation patterns of polyphenoloxidase and *p*-coumaric acid hydroxylase of membrane fraction from water-treated (control) mung bean seedlings on sucrose density gradient centrifugation.

The membrane fractions from the seedlings grown under the dark for 3 days (a), grown under the dark for the first 3 days and then exposed to light for 1 day (b), or grown under the dark for 4 days (c) were subjected to sucrose density gradient (10-50%) centrifugation. *p*-coumaric acid hydroxylase activity is expressed as unit. Its one unit is defined as the activity producing one pmol of caffeic acid per min. under the standard assay conditions.

なる点である。もう1日暗黒下での生育を続けた実生の膜画分もほぼ同じ結果を与えた。他方、3日間暗黒下で生育させたあと1日間光を照射した実生の膜を同じ条件で分析したところ、ポリフェノールオキシターゼのピークは消失し、*p*-クマル酸ヒドロキシラーゼのピークは光照射前に比べその活性は減少したが、ほぼ同じ密度の位置に幅広いピークとして検出された (Fig. 4 (b)). Tentoxin 処理実生の場合には、光照射後も緑色を呈した膜分画は認められなかった。このことより、tentoxin はエチオプラストのクロロプラストへの変換を阻害しているように見える。

Tentoxin 処理で膜性の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性は、光照射によって増加しなかったが実生中のいかなる画分中にも本 *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ以外に水酸化酵素が検出されないことから、本酵素が tentoxin 処理実生中のポリフェノール生合成に関与しているものと推定される。この場合には、光によって誘導合成される他の酵素 (例えば PAL) がポリフェノール合成の律速酵素になっているかも知れない。

## 6. 実生の種々の画分中の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの至適 pH

水処理と tentoxin 処理実生の可溶性画分、20%/30% ショ糖密度境界に沈降する膜画分 (エチオプラストの膜成分と推定)、30%/60% ショ糖密度境界に沈降する膜画分 (水処理実生の場合には、チラコイド膜と推定) の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの至適 pH を比較した (Table 2).

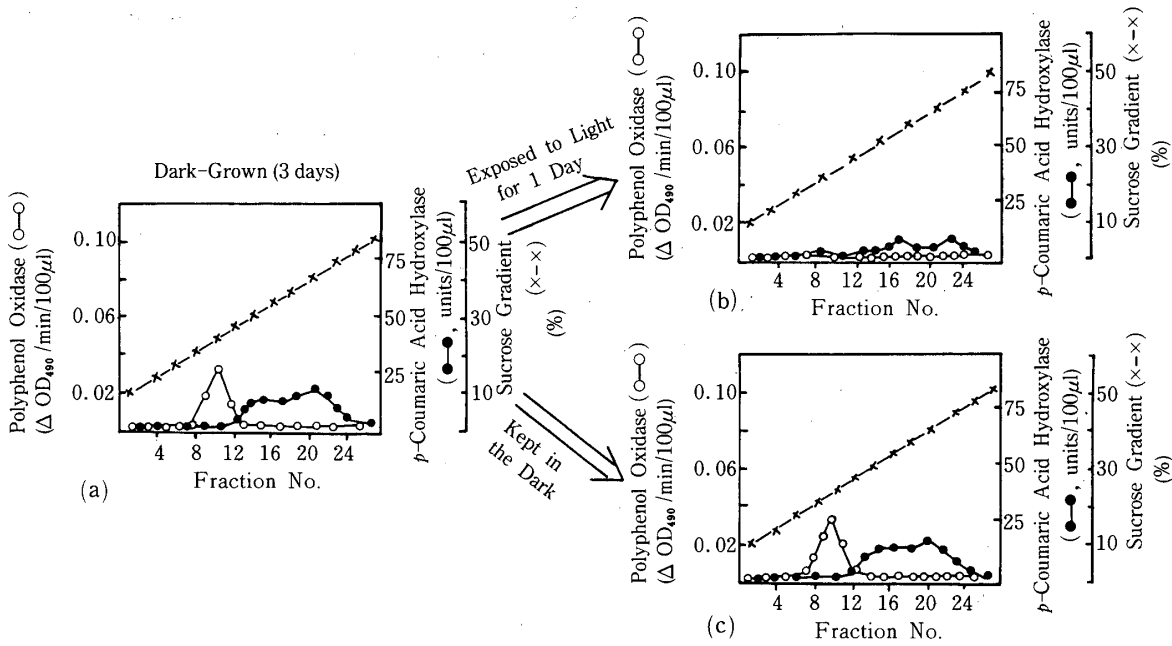


Fig. 4 Light-induced change in sedimentation patterns of polyphenoloxidase and *p*-coumaric acid hydroxylase of membrane fraction from tentoxin-treated mung bean seedlings on sucrose density gradient centrifugation.

The membrane fractions from the seedlings grown under the dark for 3 days (a), grown under the dark for the first 3 days and then exposed to light for 1 day (b), or grown under the dark 4 days (c) were subjected to sucrose density gradient (10-50%) centrifugation. *p*-coumaric acid hydroxylase activity is expressed as unit. Its one unit is defined as the activity producing one pmol of caffeic acid per min. under the standard assay conditions.

Table 2. Optimal pH of *p*-coumaric acid hydroxylase in various fractions from mung bean seedlings.

	Water-treated (Control)	Tentoxin-treated
Soluble fraction	7.5	no activity
Membrane fractions		
20%/30% boundary	6.0	no activity
30%/60% boundary	7.5	5.0

The seedlings were grown under the dark for the first 3 days and exposed to light for 1 day. 20%/30% and 30%/60% boundary fractions were prepared by applying the membrane fractions to stepwise sucrose density gradient centrifugation.

Tentoxin 処理の30%/60%シヨ膜画分の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの至適 pHは、水処理実生中の20%/30%膜画分中の *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼのそれに近似していた。この結果も、tentoxin は緑豆実生中のエチオプラストやクロロプラストの膜の生合成に変調をもたらし、エチオプラストのクロロプラストへの変換を阻害していることを示唆している。

### 要 約

Tentoxin 処理緑豆実生中に、ポリフェノールの生合成に関与していると推定される新しい

p-クマル酸ヒドロキシラーゼを見出した。本酵素は、L-アスコルビン酸を補酵素として要求し、酸化酵素活性は全く示さず、至適 pH が5.0である膜性の水酸化酵素であった。

本研究にあたり、ご助言ご鞭撻をいただきました瓜谷郁三教授に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Russel, D. W. : *J. Biol. Chem.*, **246**, 3870~3878 (1971)
- 2) Kojima, M., Uritani, I. : *Plant Cell Physiol.*, **13**, 311~319 (1972)
- 3) Kojima, M., Uritani, I. : *Plant Physiol.*, **51**, 768~771 (1973)
- 4) Shimizu, T., Kojima, M., : *J. Biochem.*, **95**, 205~212 (1984)
- 5) Villegas, R. J. A., Kojima, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 263~265 (1985)
- 6) Kojima, M., Kondo, T. : *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2467~2469 (1985)
- 7) Butt, V. S. : *Recent. Adv. Phytochem.*, **12**, 433~456 (1979)
- 8) Duke, S. O., Vaughn, K. C. : *Physiol. Plant.*, **54**, 381~385 (1982)
- 9) Zuker, M., Ahrents, F. J. : *Physiol. Plant.*, **33**, 246~247 (1958)
- 10) Duke, S. O., Naylor, A. W. : *Physiol. Plant.*, **37**, 62~68 (1976)
- 11) Rao, P. V. S., Towers, G. H. N. : *Method in Enzymology*, **XVII**, 581~585 (1970)