

もやし豆 (*Vigna mungo* L.) 実生中の 膜系 *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの諸性質

竹内若子

Characterization of *p*-Coumaric Acid Hydroxylase in Membrane from Mung Bean Seedlings

Wakako TAKEUCHI

緒 言

広く高等植物に配糖体、エステルまたは遊離型として含まれているカフェイン酸 (3,4-dihydroxycinnamic acid) は、L-フェニルアラニンから *p*-クマル酸 (4-hydroxycinnamic acid) を経て生合成されることがトレーサー実験により明らかにされている¹⁾が、*p*-クマル酸からカフェイン酸への水酸化反応に関わる酵素については確定されていない。植物界に広く分布するポリフェノールオキシダーゼ (以下 PPO と略記) が、*in vitro* でオキシダーゼ反応の他にも種々のモノフェノールを水酸化するヒドロキシラーゼ活性を示すことから、カフェイン酸生成における *p*-クマル酸の水酸化反応にも関与しているという説²⁾もあるが、これに対しては反論^{3,4)}も多い。前報⁵⁾において、著者らは植物病菌毒素の tentoxin で処理した黒緑豆実生の膜画分に PPO 活性を示さず pH5.0 に至適 pH をもつ、新たな酵素である *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼを検出したことを報告したが、本報では膜画分中の本酵素の諸性質を検討した結果について報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

黒緑豆 (*Vigna mungo* L.) の種子を 80 μ M tentoxin 水溶液で前報と同様に処理し、3日間暗所で発芽成育させた後、1日光照射した実生全体を酵素液の調製に用いた。

Tentoxin, Catalase (from bovine liver) は、Sigma 社より購入したものを使用し、その他の試薬も市販品特級またはこれに準じたものを用いた。

2. 実験方法

1) *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ酵素液の調製

Duke と Vaughn らの方法³⁾を一部改良し、乳鉢内で磨砕後、遠心分離 (40 \times g, 3 min.) により debris・海砂等を除いたあとの上清をさらに 13,000 \times g, 15min. (4 $^{\circ}$ C) で遠心した。得られた沈澱を、磨砕に用いたものと同じ緩衝液の一定量に再懸濁させ、これを酵素液として以下の実験に用いた。

2) *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性の測定

(反応液組成)

1. 0.2M, pH 5.3 Na ₂ HPO ₄ -Citric acid buffer	100 μ l
2. 飽和硫酸アンモニウム溶液	50
3. 30mM, <i>p</i> -クマル酸 (pH7.0)	50
4. Catalase 溶液 (10mg/ml)	50
5. 6 mM NADPH	50
6. 酵 素 液	200

total 500

上記の反応液を30℃ 1時間反応させ、濃HCl添加で反応を停止させ、前報と同じ方法で反応生成物のカフェイン酸を分離溶出し、320nmでの吸光度測定によって定量した。吸光度測定には日本分光社製 UVDEC-610B 分光光度計を用いた。標準曲線は、カフェイン酸を試料と同様に処理したもので作成し、酵素活性はこの条件下におけるカフェイン酸生成量 (nmol/hr) で表した。

3) 総フェノール量およびアントシアニンの定量

前報の方法によって定量した。

4) PPO の活性測定

前報の方法によって測定した。

5) *t*-桂皮酸 4-ヒドロキシラーゼの抽出および活性測定

黒緑豆実生約 4 g に、氷冷した50mM, tris-HCl buffer (pH 8.5, 0.7M ソルビトール含有) 20mlと海砂および 1 mM, EDTA, 37mM, イソアスコルビン酸ナトリウム, ポリクラール AT 0.5 g を加え、乳鉢内で磨砕したのち3,000×gで10分間遠心分離し、この上清を再び94,000×gで70分間遠心した。得られた沈渣を50mM, tris-HCl buffer (pH 8.0) 2.0mlに懸濁し、これを用いて、Lamb と Rubery らの方法⁶⁾に準じ活性の測定をした。

結果および考察

1. *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性に対する分子状酸素の要求性

Tentoxin 処理した黒緑豆実生の膜酵素反応の活性を空气中と脱気下とで測定、比較したところ、脱気下では空气中での活性の約28%に低下した (Table 1)。これはツンベルグ管法で脱気した場合での活性比であり、N₂ ガス置換等のより厳格な条件下では、その活性がさらに抑制されるものと思われる。しかしながら、脱気下で確実にその活性が抑えられることから本酵素は、分子状酸素を要求するオキシゲナーゼの一つであると考えられる。

Table 1 Requirement of molecular oxygen for enzyme reaction of *p*-coumaric acid hydroxylation from tentoxin-treated seedlings

Reaction Conditions	Relative Enzyme Activity
Air	100 (%)
<i>in vacuo</i>	28

2. *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの基質特異性とその反応生成物

Tentoxin 処理した実生中の膜酵素の基質特異性について調べた結果を Table 2 に示した。モノフェノールおよびその類縁化合物11種を基質として用いたが、本酵素の基質特異性は非常に厳格で、*p*-クマル酸だけを水酸化した。また、その反応生成物の TLC による同定結果を

Table 3 に示したが、5 種類の溶媒系で authentic なカフェイン酸と全く同じ挙動を示した。さらに、その UV スペクトルは、吸収極大を 320nm にもつ authentic なカフェイン酸と同一プロファイルを与えた。これらのことから、*p*-クマル酸を基質とする本酵素による反応生成物はカフェイン酸であると同定された。

3. *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの電子供与体

本酵素の反応活性発現には電子供与体を必要とするが、その有効性についてオキシゲナーゼの電子供与体として広く一般に知られているものを対象に調べた結果、Table 4 で示したように、前報で用いた L-アスコルビン酸よりもイソアスコルビン酸や NADPH 等を用いたときにより高い酵素活性が現れた。このようにイソアスコルビン酸が L-アスコルビン酸よりも 2 倍高い活性を示したのは、アスコルビン酸オキシダーゼの分解作用をうけにくく、そのために electron donor としての有効性が高まるのではないかと考えられるが、イソアスコルビン酸は実際には生体内に存在しないのでこれを除き、L-

Table 2. Substrate specificity of *p*-coumaric acid hydroxylase from tentoxin-treated seedlings

Compound Tested	Reactivity
<i>p</i> -Coumaric acid	reactive
<i>t</i> -Cinnamic acid	non reactive
<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-metoxibenzoic acid	〃
4-Hydroxy-3-metoxycinnamic acid	〃
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	〃
<i>p</i> -Hydroxyacetophenone	〃

※: Unidentified fluorescent product was detected.

Table 3. Identification of enzyme product on TLC

Solvent System	Rf Value
Benzen : Acetic acid : Water (40 : 10 : 1)	0.3
Acetic acid (5%)	0.61 (<i>cis</i> -form) 0.22 (<i>trans</i> -form)
<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water (20 : 5 : 11)	0.8
Methylisobutylketone : Formic acid . Water (125 : 72 : 3)	0.93
Isopropanol NH ₃ : Water (8 : 1 : 1)	0.19

Table 4. Electron donor specificity of *p*-coumaric acid hydroxylase from tentoxin-treated seedlings

Compounds Tested (75 mM)	nmol of Caffeic Acid Produced/hr	Relative Enzyme Activity
None	0.4	8
Ascorbate	5.3	100
Isoascorbate	10.9	206
NADPH	7.7	145
NADP	5.2	98
Dimethyl tetra hydropterine	6.3	119
Glutathione	0.6	11
2-Ketoglutaric acid	0	0

Table 5. Investigation of *p*-coumaric acid hydroxylases from variuos organs of seedlings

Enzyme Sources	Control Seedlings (Water-treated)	Tentoxin-treated Seedlings
Leaves	6.5-7.0	no activity
Supernatant	1.5	
Optimum pH	0.0114 (27.1)	
L-AsA / NADPH	1.5	no activity
PPO / Hydroxylase	0.0114 (27.1)	
Precipitate		
Optimum pH	6.5-7.0	
L-AsA / NADPH	1.9	no activity
PPO / Hydroxylase	0.0029 (6.9)	
Cotyledons		
Supernatant	no activity	no activity
Precipitate		
Optimum pH	5.0-5.5	5.0-5.5
L-AsA / NADPH	1.8	1.0
PPO / Hydroxylase	0.00042 (1)	0
Hypocotyls		
Supernatant		
Optimum pH	5.0-5.5	
L-AsA / NADPH	25.4	no activity
PPO / Hydroxylase	0.088 (209.5)	
Precipitate		
Optimum pH	5.0-5.5	
L-AsA / NADPH	7.4	no activity
PPO / Hydroxylase	0.021 (50)	

Seedlings were separated into leaves, cotyledons and hypocotyls, from which the supernatant and precipitate fractions were prepared as shown in the text

A optimum pH of *p*-coumaric acid hydroxylase was determined by using NADPH as an electron donor. The activity of *p*-coumaric acid hydroxylase was determined using either NADPH of 0.6 mM or L-ascorbic acid at 60 mM. Polyphenol oxidase was assayed by the standard method

アスコルビン酸および NADPH に対する K_m 値を Lineweaver-Burk の plot 法で求めた結果、NADPH に対しては $1.5 \times 10^{-4} M$ であり、L-アスコルビン酸では $1.0 \times 10^{-2} M$ であった。NADPH の K_m 値が、L-アスコルビン酸の K_m 値のおよそ 1/70 の値を示したので、以後の実験では NADPH を電子供与体として用いることにした。

4. Control (水処理) と Tentoxin 処理実生中の各器官における *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの性質の比較

Control (水処理) 実生中には、可溶性画分 (13,000×g, 15min の上清) と膜画分 (13,000×g, 15min の沈渣) の両方に本酵素活性が存在するが、tentoxin 処理実生中には膜画分にしか存在しないことは前報で述べたとおりだが、これら両者における種々の器官での本酵素の性質を比較検討した結果を Table 5 に示した。この結果から、tentoxin 処理の子葉 (cotyledon) の膜画分の酵素と Control 中のそれとは類似する点が多く、僅かに Control では PPO 活性が

存在するものの、tentoxin 処理実生中の酵素と同じ性質のものが潜在する可能性が考えられた。

5. *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼに対する阻害

tentoxin 処理したのち暗所で3日間生育させ、1日光照射した実生の膜画分では、PPOは全く消失し、*p*-クマル酸ヒドロキシラーゼのみ残存する。この画分を用いて本酵素に対する各種阻害剤の K_i 値を求めた結果を

Table 6. Inhibitors of *p*-coumaric acid hydroxylase from tentoxin-treated seedlings

Inhibitors	K_i values
β -Mercaptoethanol	3.5×10^{-6} M
Diethyldithiocarbamate	2.3×10^{-4} M
<i>p</i> -Nitrophenol	1.3×10^{-3} M
KCN	1.4×10^{-2} M
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid (PCMB)	no inhibition

Table 6 に示した。β-メルカプトエタノールやジエチルジチオカーバメイト (以下 DIECA と略記) は Lineweaver-Burk の plot 法で非競争的阻害型を示し、強く本酵素活性を阻害した。また、*p*-ニトロフェノールは競争阻害の型を示した。さらに SH 阻害剤である *p*-塩化第二水銀安息香酸 (PCMB) では阻害されなかった。これらの阻害剤による阻害の傾向は、銅酵素である PPO とよく類似しており、また同一膜画分に存在する *t*-桂皮酸 4-ヒドロキシラーゼは P-450 酵素であることが知られているが^{8,9)}、この酵素は上述の DIECA では全く阻害されなかった。このような点から、本酵素は活性部位に SH 基をもたず、銅酵素である可能性の高いことが示唆された。

6. アントシアニン合成におよぼす DIECA の影響

上述のとおり DIECA は本酵素活性を強く阻害したので、この DIECA 溶液を直接黒緑豆実生に吸わせ、ポリフェノール類合成におよぼす影響について調べてみた。この結果、DIECA 濃度 (終濃度 3~10mM) を高くするにつれアントシアニンの合成が阻害され、胚軸上部にみられる赤色成分 (アントシアニン) が

Table 7. Effect of diethyldithiocarbamate on total phenolics contents in mung bean seedlings¹⁾

Concentration of DIECA (mM)	Water-treated		Tentoxin-treated ²⁾	
	caffeic acid μ g/g*	(%)**	caffeic acid μ g/g	(%)
0	94	(0)	86	(0)
3	61	(35)	56	(35)
7	46	(51)	45	(48)
10	37	(60)	82	(52)

* : μ g as caffeic acid / g fresh weight.

** : % of inhibition

1) : grown in the dark for 2 days and then exposed to for 1 day.

2) : imbibed in 80 μ M tentoxin solution

少なくなるのが肉眼的にもはっきりと観察された。その胚軸中の総フェノール量の定量値は Table 7 に示すような結果となり、終濃度10mMではその60%が阻害された。

7. *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼ活性に対する金属イオンの影響

Table 8 に示すように本酵素活性は、 Na^+ や Mg^{2+} 及び Ca^{2+} ではなんら影響を受けなかったのに対して、 Mn^{2+} や Fe^{3+} 共存下ではやや低下し、また銅酵素としてよく知られているチロシナーゼと同様に、 Cu^{2+} 、 Cu^+ では強く阻害された。 Fe^{2+} は見かけ上その活性を強く促進させるような結果を与えたが、boiled enzyme を用いたり、酵素無添加の場合もほぼ同量のカフェイン酸の生成が見られ、これは *p*-coumaric acid hydroxylase に対する賦活剤としての効果では

なく非酵素的な水酸化反応^{9,10)}によるものと考えられる。

要 約

Tentoxin 処理した黒緑豆実生中に検出した *p*-クマル酸ヒドロキシラーゼの粗酵素標品を用いその性質を検討した結果、(1) オキシゲナーゼ活性を全く示さない膜性の水酸化酵素であり、*p*-クマル酸のみに厳格な基質特異性を示した。また、TLC 法等によってその反応生成物はカフェイン酸であることが同定された。

- (2) 本酵素の活性発現には分子状酸素を要求することからオキシゲナーゼの一種であると考えられ、電子供与体としては、L-アスコルビン酸よりも NADPH に対して有意に低い K_m 値 ($1.5 \times 10^{-4} M$) を与えた。
- (3) 実生中の種々の器官での本酵素活性は、子葉の膜画分以外には検出されず、Control (水処理) でも同じ画分でこれに類似した酵素の潜在の可能性が示唆された。
- (4) 各種阻害剤による阻害傾向からは、銅酵素である可能性の高いことが示唆されたが、 Cu^{2+} , Cu^+ の共存下で、その活性は強く阻害された。

本研究を進めるにあたり、種々御指導を賜りました名古屋大学農学部・生化学制御研究施設小島峯雄助教授、ならびに御助言・御鞭撻をいただきました本学瓜谷郁三教授、高橋平八郎教授に厚く感謝の意を表します。

Table 8 Effect of metals on the activity of *p*-coumaric acid hydroxylase from tentoxin-treated seedlings

Compounds tested (5 mM)	Relative Enzyme Activity (%)
Control (no additive)	100
EDTA	74
NaCl	100
MgCl ₂	108
CaCl ₂	118
MnCl ₂	69
FeCl ₂	255
FeCl ₃	59
CuCl	25
CuCl ₂	20

The enzyme was extracted and assayed using acetate buffer instead of Na₂HPO₄-citric acid buffer. All compounds were neutralized with NaOH prior to addition.

文 献

- 1) McCalla, D R., & Neish, A C. *Can. J. Biochem.*, **37**, 537~547 (1959)
- 2) Butt, V S *Recent. Adv. Phytochem.*, **12**, 433~456 (1979)
- 3) Duke, S O., & Vaughn, K C. *Physiol. Plant*, **54**, 381~385 (1982)
- 4) Boniwell, J M & Butt, BV S *Z Naturforsch.*, **41**, 56~60 (1986)
- 5) 竹内若子, 小島峯雄, 高橋平八郎: 名古屋女子大学紀要, **34**, 85~92 (1988)
- 6) Lamb, C J., & Rubery, P H *Anal Biochem*, **68**, 554~561 (1975)
- 7) Potts, J R M, Weklych, R, & Conn, E E *J. Biol. Chem.*, **289**, 5019~5026 (1974)
- 8) Tanaka, T, Kojima, M. & Uritani, I *Plant Cell Physiol* **15**, 843~854 (1974)

- 9) Breslow, R., & Lukens, L. N.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 292~296 (1960)
- 10) Brodie, B. B., Axelrod, J., Shore, P. A. & Udenfriend, S.: *J. Biol. Chem.*, **208**, 741~750 (1954)