

黒緑豆 (*Vigna mungo*) 実生の成長に伴う 器官別ポリフェノールオキシダーゼの変動

竹内若子・高橋平八郎

Distribution and Activity Change of Polyphenol Oxidase Isozymes in Various Organs of Mung Bean Seedlings.

Wakako TAKEUCHI and Heihachiro TAKAHASHI

緒 言

植物性食品材料には、広くポリフェノールオキシダーゼ（以下 PPO と略す）が存在する。また食品材料中に多量に存在する、クロロゲン酸やフラボノイド等のポリフェノール類は PPO による酵素的褐変反応の重要な基質となり、食品加工や調理の面からも問題視されている。ポリフェノール類の生合成系には水酸化反応等の酵素活性が存在し、その結果として高等植物に普遍的に存在する最終代謝産物としてのクロロゲン酸やリグニン、あるいは植物性色素としてのフラボノイド類などが生成する。これらの成分のあるものは病傷害等において酸化反応により褐変を引き起こす。また、フェニルプロパノイド代謝系の律速酵素としての Phenylalanine ammonia lyase はポリフェノール化合物生合成に関与する初期の段階で誘導合成され、活性が高まることが認められている。モノフェノールからジフェノールへの水酸化に関連して、Butt ら¹⁾はフダンソウの PPO が L-アスコルビン酸等の電子供与体の存在下で水酸化酵素活性をもつことを示し、本酵素がクロロゲン酸やフラボノイド等に含まれるカフェイン酸成分の生合成に関与すると主張した。これに対し、Duke ら²⁾は tentoxin を用いた実験でポリフェノール成分の生合成に対する PPO の関与を否定し、PPO とは別のヒドロキシラーゼ活性によると強調しているが、一般には PPO はポリフェノールのキノンへの酸化とモノフェノールからジフェノールへの水酸化の両反応を触媒してポリフェノール成分の生成に与るとされている。しかしながら、このポリフェノールの生成と PPO 活性との相関性については、まだ明瞭には解明されていない。我々は、黒緑豆 (mung bean) 実生中の各器官に複数存在する PPO のアイソザイムを等電点電気泳動法により分離し、これらの酵素とポリフェノール成分生成との関係についての知見を得るために器官別、また経時的に両者の変動を追跡し、PPO アイソザイムのうち、ポリフェノール成分の生合成に直接関与するものについて解析することを目的としてこの実験を行った。

実験材料および方法

(1) 実験材料

本実験では、黒緑豆 (*Vigna mungo*, 以下 mung bean と記す) の種子を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で浸漬し、30分間水洗、一夜吸水後の種子をバーミキュライト上に蒔き、27°C で

dark (暗所) または light (光照射) 下で生育させた実生の器官を試料として用いた

(2) 粗酵素の抽出

経時的に mung bean (約10g) の実生を葉・子葉・胚軸・根の4器官に分割し、各々20mM, Tris-HCl buffer (pH7.5, 5 ml) 中で少量の海砂とともに乳鉢を用い磨砕した液を13,000×gで15分間遠心し、この上清画分を各器官の可溶性画分における粗酵素液として用いた

(3) 総ポリフェノール類の抽出および定量

Zuker³⁾の方法によって測定した。なお、mung bean の主要なポリフェノールはルチンとテルフィニシンだとされており、ポリフェノール量はカフェイン酸量に換算して表した

(4) ポリフェノール酸化酵素活性の測定

Duke ら²⁾の方法を一部改良して測定した¹⁾

(5) 等電点ゲル電気泳動法による活性染色³⁾

等電点ゲル電気泳動 (Isoelectric focusing, 以下 IEF と略す) は Ampholine PAG plate pH 3.5~9.5 (Pharmacia) にサンプルを5~20 μ l のせ、フラットヘッド電気泳動装置 (Multiphor II, Pharmacia) を用い、1,500V, 50mA, 30W に設定し90分間通電した。等電点マーカータンパク質として amyloglucosidase (pI 3.5), soybean trypsininhibitor (pI 4.55), β -lactoglobulin 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) を用いた。泳動後、15mM caffeic acid と 0.05% (w/v) *p*-phenylenediamine を含む0.2M Tris-HCl (pH 7.5) に浸し15~20分間振とうした。次に1mM sodium L-ascorbate の溶液でゲルを5~10分間すすぎ、蒸留水で一晩洗浄したのち、30%エタノール中で保存した

(6) IEF 分離後の PPO 活性バンドの測定

活性染色した後のゲルの対照部位の800nm を対照に、活性部位の500nm における吸光度を島津2波長クロマトスキャナー CS-910により測定した

(7) 水酸化酵素活性の測定

小島ら⁴⁾の方法で測定した

結果および考察

(1) PPO の酸化酵素作用における DOPA の光学異性体に対する基質特異性

従来、PPO の酸化酵素活性測定の基質として DL-DOPA を用いているが、DOPA の光学異性体に対する基質特異性を調べるために、葉の粗酵素液を用いて、見かけ上の K_m , V_{max} を Lineweaver-Burk plot より最小自乗法およびこれに Taylor 展開を併用した方法⁶⁾を用いて求

Table 1 Substrate specificity of the enzyme

substrate	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
	mM	$\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$	
DL DOPA	21.7	1.1×10^{-1}	5.1×10^{-1}
D DOPA	26.7	1.7×10^{-1}	6.3×10^{-1}
L DOPA	21.1	1.1×10^{-1}	5.2×10^{-1}

Assays were carried out in the reaction mixture containing various concentrations of the substrate

めた (Table 1) D 型は L 型よりも Km 値が多少高く, また Vmax も多少高い値が得られたが, 両者に顕著な差がないので入手しやすい DL 型を用いることにした.

(2) Mung bean の実生における各器官のポリフェノール含量と PPO 活性の経時的変動

経時的に, 器官別に調製した粗抽出液中にはポリフェノール酸化酵素活性とモノフェノール水酸化酵素活性の両酵素活性が存在するが, 各器官における総ポリフェノール含量と総 PPO 活性との経時的変動を調べた (Fig 1) その結果, 粗抽出液中には複数の PPO 活性が存在することが等電点電気泳動法で確認された (Fig 2). Fig 1 で示される各器官における総 PPO

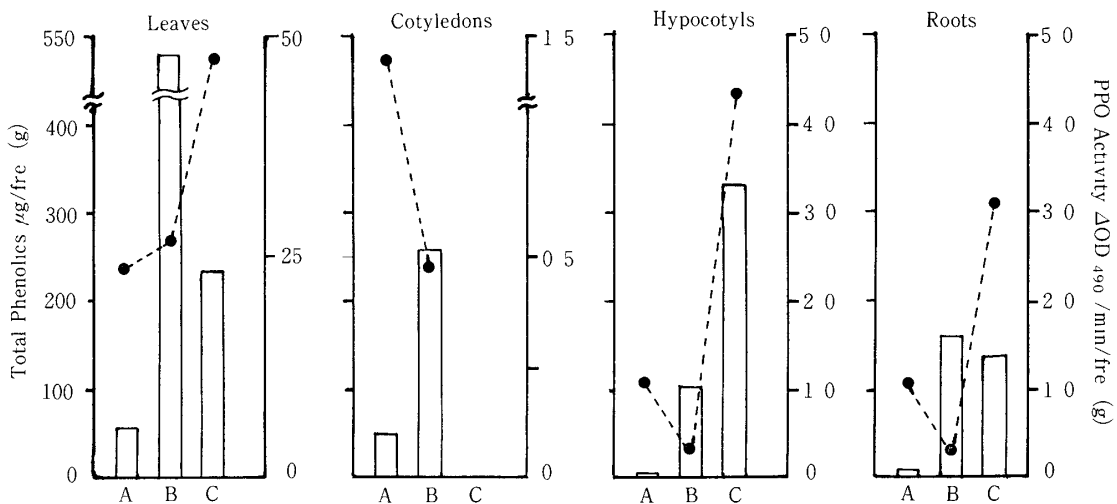


Fig 1 Light induced change in phenolic content and PPO activity in mung bean seedlings
 A, grown in dark for 3 days, B, grown in dark for 3 days and then exposed to light for 3 days, C, grown in dark for 3 days and then exposed to light for 6 days.
 ●, PPO activity □, phenolic content

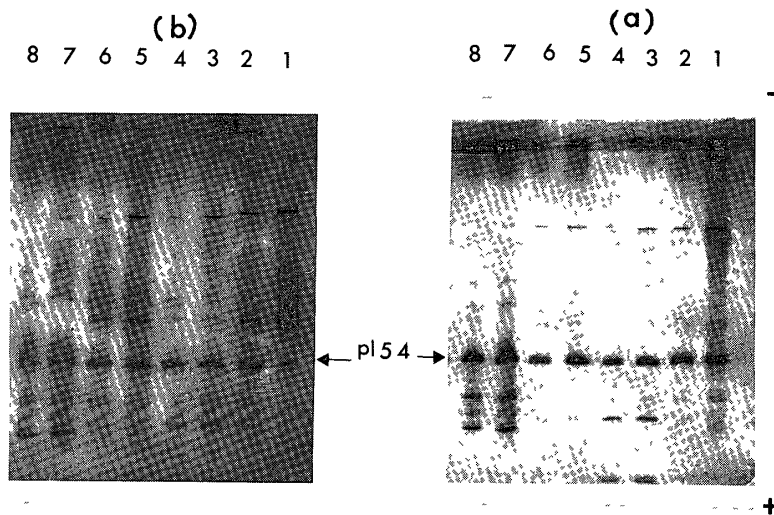


Fig 2 Isoelectric focusing in polyacrylamide gel of the extracts from mung bean seedlings
 Zymogram was prepared using caffeic acid and *p*-phenylendiamine in Tris-HCl (pH 7.5) by the method noted in the text
 (a), grown in dark for 3 days (b), grown in dark for 3 days and then exposed to light for 3 days Lane 1, leaves, lane 2, 5, 6, hypocotyls, lane 3, 4, roots, and lane 7, 8, cotyledons

活性と総ポリフェノール含量の変動は必ずしも一致しなかった。これは実生中の各器官のポリフェノール成分が最終代謝産物でなく、リグニンなどに移行されることやあるいはまた、緊急(病傷害)時における褐変層形成に対応することにもよると考えられた。

(3) 可溶性画分と膜画分における PPO の酸化酵素活性および水酸化酵素活性

Mung bean 実生中の可溶性画分 (13,000×g, 15min の上清) と膜画分 (13,000×g, 15min の沈渣) にはともに、ポリフェノール酸化酵素活性およびモノフェノール水酸化酵素活性の両酵素活性が存在していた (Table 2)。ことに可溶性画分における酸化酵素活性は、膜画分の約4倍も高い活性を示した。

Table 2 activity ratio of between hydroxylase and PPO in seedlings

	Polyphenol oxidase *	<i>p</i> Coumaric acid hydroxylase
	(unit/g fresh weight)	(unit/g fresh weight)
Supernatant	4.1	8.7
Precipitate	1.2	3.3

*Substrate, DL DOPA

(4) 至適 pH

可溶性画分におけるモノフェノール水酸化酵素活性 (基質は *p*-coumaric acid) の至適 pH は葉以外の器官では pH 5.0~5.5 内外であり、葉では pH 7.5 であった。また、ポリフェノール酸化酵素活性 (基質は DL-DOPA) では pH 5.0~8.5 に広く分布し、はっきりとした至適 pH のピークは示さなかった。

(5) 実生中の各器官における PPO アイソサイムパターンの経時的変動

器官ごとに、PPO 活性染色法によるサイモグラムパターンは異なっていた (Fig. 3 a~d)。Fig. 3 a にみられるように、葉では光照射下での生育に伴い pI 6~7 に位置するアイソサイムの増大が顕著であり、子葉では dark 時より器官特異的な活性バンドがみられた (Fig. 3 b)。胚軸や根も同様に生育とともにアイソサイムの数およびその酵素活性は増大し、根には最も酸性側 (pI 3.5 内外) に特異的な活性バンドも出現した (Fig. 3 c, d)。以上のようにいずれの器官にも複数の PPO 活性が認められ、さらに pI 5.4 に位置する活性バンド (矢印) は、全ての器官で生育の早期段階から存在し、なおかつ複数存在する PPO 活性バンドの中では最も強い活性を示した。さらにこの酵素と器官別のポリフェノール量の変動をみた結果、Fig. 4 に示したとおり胚軸と根についてはポリフェノール量がこれとほぼ比例的に増大することから、これらの器官ではこのアイソサイムがポリフェノール生合成に関与しているものと考えられたが、一方において葉や子葉では逆の変動を示すことから、これらの器官ではこれ以外のアイソサイムがポリフェノール生成に関わっていると考えられた。

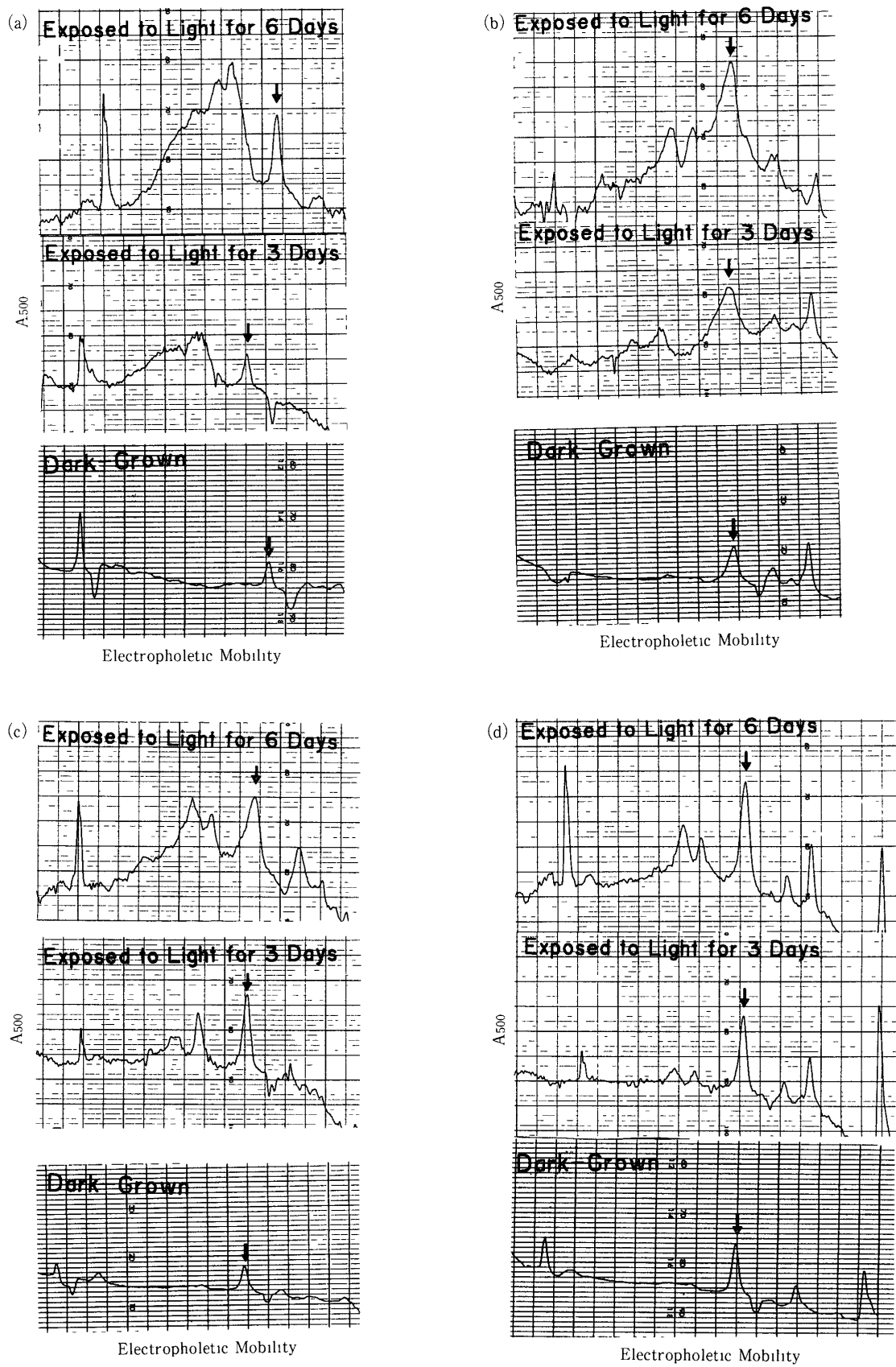


Fig 3 Light induced change of isozyme patterns in various organs during the growth stage. Arrow indicates the position of PPO isozyme with pI 5.4 (a), leaves (b), cotyledons (c), hypocotyls and (d), roots

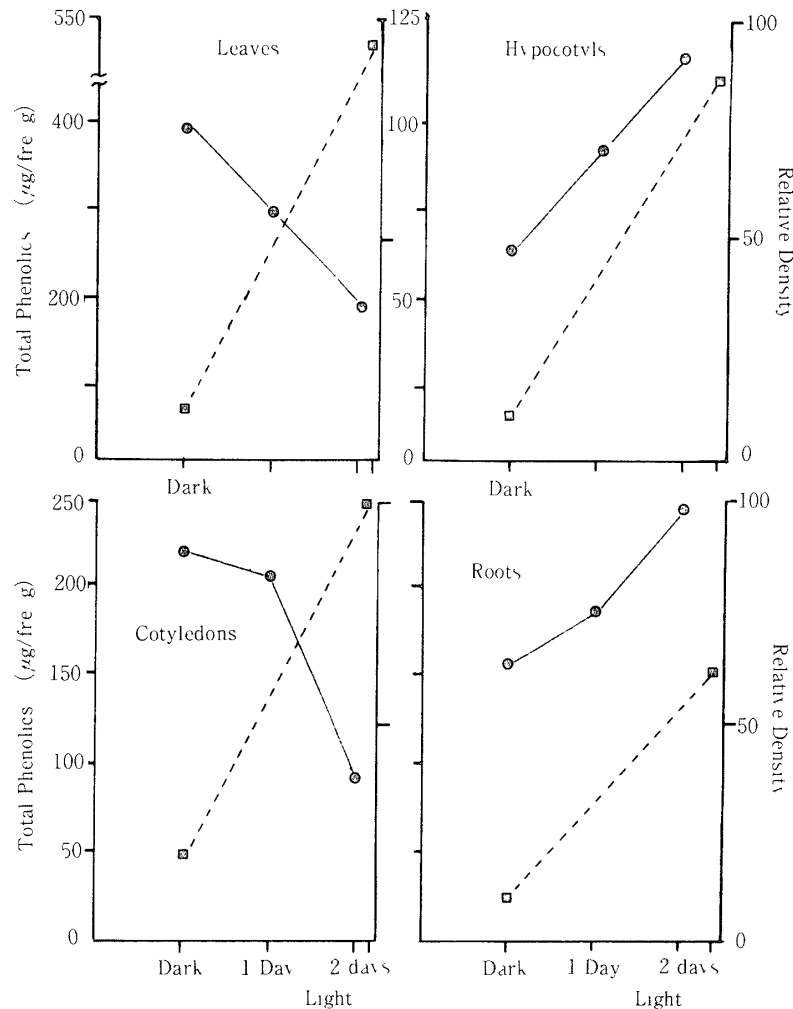


Fig 4 Light induced change of total phenolic content and PPO isozyme with pI 5.4
 ■, total phenolic content —●— PPO isozyme activity with pI 5.4

要 約

Mung bean 実生の各器官の可溶性画分について等電点ゲル電気泳動を行った後、活性染色法により PPO のアイソサームパターンを調べた。それによると、いずれの器官にも複数の PPO 活性バンドが確認され、光照射下の生育に伴いこの活性バンドの数および活性は増大し、また器官によって異なったサイモグラムパターンを示した。各器官の総 PPO 活性と総ポリフェノール量の両者の変動は必ずしも一致しなかったが、胚軸と根については pI 5.4 に位置する一つの主要アイソサームの活性が増大するとともに、総ポリフェノール量が増大するのが認められた。このアイソサームは全ての器官に生育早期から存在し、複数存在する PPO アイソサームの中で最も強いポリフェノール酸化酵素活性を示し、さらにモノフェノール水酸化酵素活性も認められた。このことからアイソサームが胚軸や根においては、ポリフェノール成分の生合成と関連が強いと考える。ただし、葉や子葉ではこのアイソサームがポリフェノール量と逆の変動を示すことから別のアイソサームがポリフェノール生成に関与しているように思われる。

本研究を進めるにあたり、御助言、御鞭撻をいただきました名古屋女子大学瓜谷郁三教授に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Butt, V S Recent Adv Phytochem, **12**, 433~456 (1979)
- 2) Duke, S O & Vaughn, K C Physiol Plant, **54**, 381~385 (1982)
- 3) Zuker, M & Ahrens, F J Plant Physiol, **33**, 246~249 (1958)
- 4) M Kojima & W Takeuchi J Biochem, **105**, 265~270 (1989)
- 5) Benjamin, N D & Montgomery, M W J Food Sci, **38**, 799 (1973)
- 6) M Sakoda & K Hiromi J Biochem, **80**, 547~555 (1976)

Summary

Isoelectric focusing in polyacrylamide gel demonstrated the existence of several isozymes of polyphenol oxidase (PPO) in various organs (leaves, cotyledons, hypocotyls and roots) of mung bean seedlings. The isozyme patterns of the enzyme showed so difference among various organs, and were changed during the growth in light. One main isozyme with pI 5.4 was detected in all organs at all growth stages and showed the highest in the activities of both polyphenol oxidase and monophenol hydroxylase. Increment of the isozyme activity during the growth was in parallel with the increase in polyphenols in the hypocotyls and roots, but not in leaves and cotyledons.

These results suggest that polyphenol oxidase isozyme with pI 5.4 is involved in the synthesis of phenolic compounds in hypocotyls and roots. On the other hand, leaves and cotyledons some other PPO isozyme may be relation to the production of polyphenols.