

チロシナーゼによる *p*-クマル酸の水酸化反応に及ぼす各種因子の効果

竹内若子・高橋平八郎

Effect of Various Factors on Hydroxylation of *p*-Coumaric acid  
(4-Hydroxy Cinnamic Acid) by Mushroom Tyrosinase.

Wakako TAKEUCHI and Heihachiro TAKAHASHI

## 緒 言

植物性の食品中にもっとも広く分布しているクロロゲン酸 (3-caffeoyl-D-quinic acid) やフラボノイド (flavonoid) 類は、植物界における二次代謝産物としてのポリフェノール化合物であり、カフェイン酸 (3, 4-dihydroxycinnamic acid) より合成され、このカフェイン酸は *p*-クマル酸を基質とする水酸化酵素により電子供与体の存在下で生成される (Fig.1). 食品中の多くのポリフェノール化合物がこのようなカフェイン酸を構成成分として存在しており、*p*-クマル酸からカフェイン酸生成へのこの水酸化反応はフェニルプロパノイド代謝系の中でも主要な反応ステップとなる。しかしながら、これに関与する水酸化酵素やその反応の際必要とされている電子供与体の有効性についてはまだ明確にされていない。そこで我々はポリフェノールオキシダーゼ (monophenol dihydroxyphenylalanine : oxygen oxidoreductase : EC 1.14.18.1, PPO) として、精製されたマッシュルームチロシナーゼを用いてモノフェノールの水酸化反応に及ぼす因子について実験し、検討した。

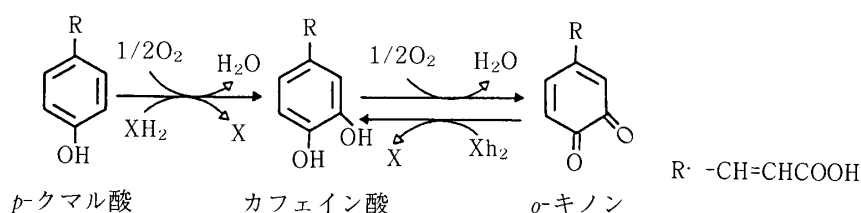


Fig.1

## 実験材料および方法

## 1. 実験材料

チロシナーゼはマッシュルームより精製されたもの (Sigma 社製) を用いた。キサンチン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール [Tris(Hydroxymethyl)aminomethane : 以下 Tris と略す]、アスコルビン酸ナトリウム、L-チロシン、L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) は和光純薬製の特級品を、キサンチンオキシダーゼはベーリンガー・マンハイム社製、スーパーオキシドジスムターゼは牛血球製 (和光純薬製)、*p*-クマル酸は東京化成工業製を使用した。これら以外の試薬もすべて市販特級品を使用した。

## 2. 実験方法

### 1) ヒドロキシル化に及ぼす各種因子に関する実験

- ① アスコルビン酸
- ② スーパーオキシドアニオン (キサンチン, キサンチンオキシダーゼ系)
- ③ 過酸化水素
- ④ ジフェノール
- ⑤ 金属イオン ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ )

以上①～⑤の因子についての影響を調べるための各反応液の組成を Table 1 に示した. いずれも30℃で、酸素の補給のため試験管を振とうさせながら反応させた. 濃塩酸100 $\mu\text{l}$ を加えて反応停止させ以下の定量に供した. ただし, アスコルビン酸 (以下 AsA と略記) 定量のためには濃塩酸を添加せずに, 直ちに反応液の一部 (100 $\mu\text{l}$ ) を分取して用いた.

### 2) 還元型アスコルビン酸の定量

東野らの方法<sup>1)</sup>に準じ, きゅうりから調製したアスコルビン酸オキシダーゼを用いて243nmにおける還元型と酸化型における差スペクトル法で定量した.

### 3) 酵素活性の測定

#### ①水酸化酵素活性の測定

日立高速液体クロマトグラフ (L-6000), 充填カラム TSK ODS-80TM CTR (Toso) を使用して反応生成物 (L-DOPA, caffeic acid) の分離を行い, 各々280nm および320nm の吸光度により測定した. なお移動相として L-DOPA には0.1% トリフロロ酢酸を含む10%酢酸溶液<sup>2)</sup>をカフェイン酸には2%酢酸を含む45%メタノール溶液を用い, 各々の標準品で作成した検量線を用いて定量した. 還元剤の共存しない反応系では基質の減少を測定し反応量とした.

#### ②酸化酵素活性の測定

既報<sup>3)</sup>の方法を改変し, 分光光度計 (日本分光, UVIDEC-610B) により475nmにおける吸光度の増加を追跡, 分子吸光係数 ( $\epsilon$ ) = 3.600<sup>4)</sup>より *o*-キノンの生成量を算出しこれを酵素活性とした. ただし, 試料キュベットの内容は上記の水酸化酵素活性測定溶液と同一にし, 酵素溶液を加えないものを対照として用い, 酵素反応は25℃で進行させた.

Table 1 System of reaction mixture

① Ascorbate	
1) 0.2M, pH7.5 Tris-HCl buffer	250 $\mu\text{l}$
2) <i>p</i> -coumaric acid (5mM)	50
3) ascorbic acid (20mM)	50
4) tyrosinase (120U/ml)	50
② superoxid anion	
1) 0.2M, pH7.5 Tris-HCl buffer	200 $\mu\text{l}$
2) <i>p</i> -coumaric acid (5mM)	50
3) xanthine (0.332mM)	100
4) xanthine oxidase (20U/ml)	50
③ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
1) 0.2M, pH7.5 Tris-HCl buffer	250 $\mu\text{l}$
2) <i>p</i> -coumaric acid (5mM)	50
3) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20
4) H <sub>2</sub> O	80
④ diphenol	
1) 0.2M, pH7.5 Tris-HCl buffer	280 $\mu\text{l}$
2) <i>p</i> -coumaric acid (5mM)	50
3) diphenol	20
4) tyrosinase (120U/ml)	50
⑤ metal ion	
1) 0.2M, pH7.5 Tris-HCl buffer	280 $\mu\text{l}$
2) <i>p</i> -coumaric acid (5mM)	50
3) metal ion	20
4) tyrosinase (120U/ml)	50

Assays were carried out in the reaction mixture at 30℃ for 30 min

## 結果および考察

### 1. チロシナーゼによる水酸化反応と酸化反応におけるアスコルビン酸の消費

モノフェノール (チロシン) からジフェノール (L-DOPA) への水酸化反応におけるアスコルビン酸消費量と, ジフェノールから酸化反応により生成した *o*-キノンの生成量がアスコルビン酸によ

り直ちに還元されて再びジフェノールへ戻る場合のアスコルビン酸の消費量を求め、両者の比率をみた (Fig.2). その結果、アスコルビン酸の消費は後者に対する方が圧倒的に大きく、これは PPO のもつ両酵素活性における turnover rate の違いを示すものと思われる。

## 2. ヒドロキシル化に及ぼす活性酸素種 ( $O_2^-$ , $H_2O_2$ ) の効果

芳香族化合物のヒドロキシル化反応には一連の活性酸素種によるラジカル反応が関与するという報告<sup>5-6)</sup>、また *p*-クマル酸のヒドロキシル化にスーパーオキシドアニオンが関与するという報告<sup>7)</sup> もあることから、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素を用いた実験を試みたところ、*p*-クマル酸からカフェイン酸への水酸化反応を確認することはできなかったが、過酸化水素の添加によりカフェイン酸以外の反応生成物が TLC 上や HPLC で確認された。しかしそれが何であるかを同定するには至らなかった。また、SOD (スーパーオキシドジスムターゼ) やカタラーゼの添加の影響をみた結果、SOD の添加では水酸化反応は阻害されたが、カタラーゼではかえってこれを促進するような結果を得た。カタラーゼのもつ  $Fe^{2+}$  がこの反応の促進に関与しているのではないかと考えられた。

## 3. ヒドロキシル化に及ぼすジフェノールの効果

*p*-クマル酸にごく僅かなジフェノール (カフェイン酸) を共存させることでチロシナーゼによる水酸化反応が促進され、この反応のスパーク剤としての有効性が確認された (Fig.3).

## 4. 金属イオンのヒドロキシル化に及ぼす効果

金属イオンとして  $Cu^+$  ( $CuCl$ ),  $Cu^{2+}$  ( $CuCl_2$ ),  $Co^{2+}$  ( $CoCl_2$ ),  $Fe^{2+}$  ( $FeCl_2$ ),  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) の各水溶液を終濃度で 50, 100, 250, 500  $\mu$ mol 添加して検討した結果、 $Cu^+$  が水酸化に対してもっとも効果的であった (Fig.4). ただし、この場合用いる緩衝液の影響が大きく、金属イオンとキレートを形成するようなリン酸緩衝液はいずれの金属イオンの場合も効果はみられなかった。ほかに同じ pH で HEPS (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) と Tris について検討したが Tris の場合が最も効果的であったためこの実験ではすべて Tris-HCl 緩衝液を

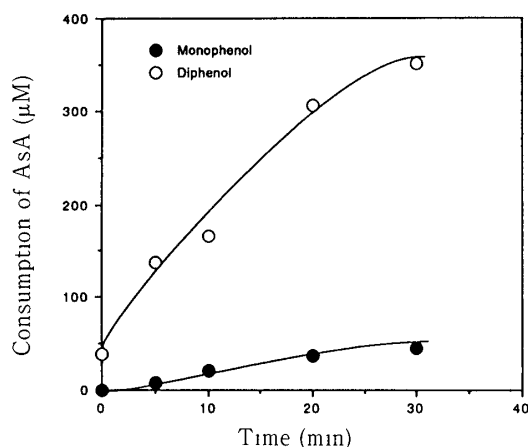


Fig.2 Consumption of ascorbate for monophenol and diphenol.

●, monophenol (L-tyrosine, 62.5  $\mu$ M)

○; diphenol (L-DOPA, 62.5  $\mu$ M)

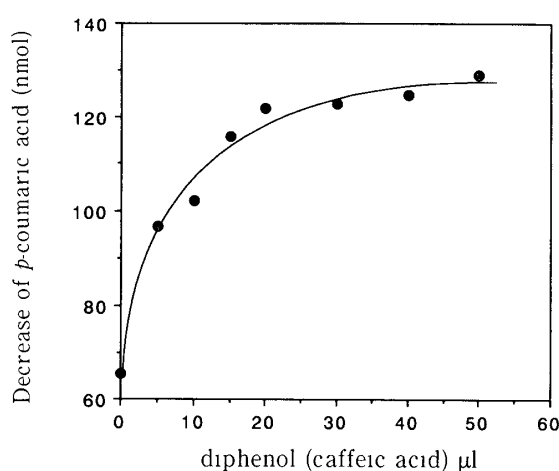


Fig 3 Effect of diphenol (caffeic acid) on the hydroxylation of *p*-coumaric acid

用いた。また、 $\text{Fe}^{2+}$ は既報<sup>8)</sup>のように一定の条件下では非酵素的な水酸化反応を示すが、本実験の条件下ではそれはみられなかった

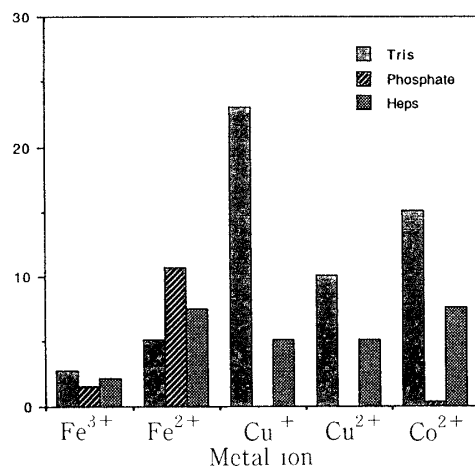


Fig 4 Effect of various metal ions on the hydroxylation of *p*-coumaric acid

The reaction was carried out in 400 $\mu$ l of 100mM, pH 7.5 buffers containing *p*-coumaric acid (62.5 $\mu$ M) and various metal ions (50 $\mu$ M)

### 5. *p*-クマル酸による基質阻害

*p*-クマル酸の初濃度が 5, 10, 30mM と異なるものについて水酸化反応をみてみたが, 10, 30mM ではジフェノール (カフェイン酸) の生成はみられなかった。これは基質阻害によるものであった (Fig 5)。ジフェノール生成に関して, *p*-クマル酸がこのような阻害を示すことについては他の研究者らによっても報告<sup>9-10)</sup>されているが, こうした現象は正常な植物生体内においてジフェノールから先の反応 (diphenol  $\longrightarrow$  quinone  $\longrightarrow$   $\longrightarrow$ ) の進行を阻止するための inhibition であり, 生体内のフェノール代謝におけるコントロールの一つであるとも考えられた。

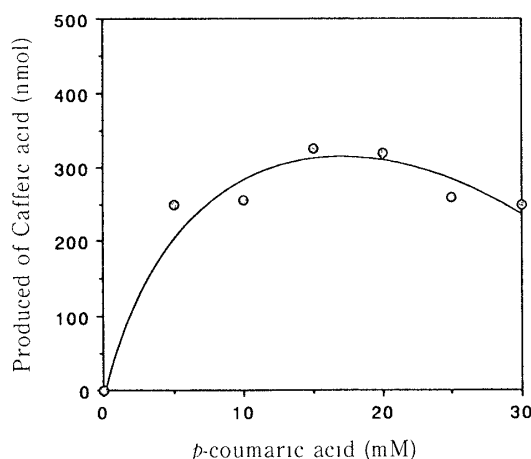


Fig 5 Effect of *p*-coumaric acid concentration on the hydroxylation. The reaction was carried out in 400 $\mu$ l of 100mM, pH 7.5 Tris-HCl buffer containing *p*-coumaric acid and ascorbate

## 要 約

*p*-クマール酸はアスコルビン酸のような電子供与体の存在下でチロシナーゼにより水酸化されカフェイン酸になるが、この水酸化反応はアスコルビン酸の代わりに  $\text{Cu}^+$  や  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  によっても進行し、SOD により阻害された。また、カタラーゼの添加は逆にこの反応を促進させた。この反応には種々の活性酸素やラジカルの関与が示唆されたが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した系やスーパーオキシドアニオン（キサンチン-キサンチンオキシダーゼによる）の系を用いた実験からはこの確証を得るには至らなかった。

## 文 献

- 1) Tono, T and S Fujita . Agri. Biol. Chem., **45**, 2947-2949 (1981)
- 2) Marumo, K. and J. H Waite · Biochem. Biophysica. Acta , **872**, 98-103 (1986)
- 3) Kojima, M. and W Takeuchi . J. Biochem , **105**, 265-270 (1989)
- 4) Mason, H.S : J Biol. Chem **172**, 83-99 (1948)
- 5) Breslow, R. and L N Lukens · J Biol. Chem · **235**, 292-296 (1960)
- 6) Richmond, R, B. Halliwell, J. Chauhan and A Darbre : Anal Biochem., **118**, 328-335 (1981)
- 7) Halliwell, B. Eur J Biochem., **55**, 355-360 (1975)
- 8) Takeuchi, W., H. Takahashi and M Kojima · Agric. Biol. Chem , **53**, 2267-2268 (1989)
- 9) Hyoudo, H and I Uritani . Arch Biochem. Biophys : **122**, 299-309 (1967)
- 10) Tanaka, M and M. Kojima · Arch. Biochem Biophys , **284**, 151-157 (1991)

## Summary

The effects of various factors such as metal ions, diphenol and active oxygen on the hydroxylation of *p*-coumaric acid by mushroom tyrosinase were studied. The hydroxylation was stimulated with the addition of various metal ions, and also with a little diphenol.  $\text{Cu}^+$  was the most active.  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  were less active. A very small amount of diphenol (0.25 $\mu\text{M}$ ) confirmed that it worked as an effective sparker for the hydroxylation. The hydroxylation was strongly inhibited by SOD ( $\text{O}_2^-$  scavenger) in this system. It was, however, stimulated with addition of catalase.