

# マッシュルームチロシナ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

竹内若子・高橋平八郎

## Differential Electron Donor Requirement of Mushroom Tyrosinase in Hydroxylation of Monophenolic Compounds

Wakako TAKEUCHI and Heihachiro TAKAHASHI

### 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（ヒドロキシラーゼ）だけでなく電子供与体にも注目する必要があるが生体内の電子供与体としては NADPH や L-アスコルビン酸などがよく知られている。

ポリフェノールオキシダーゼ (Polyphenol Oxidase ; 以下 PPO と略す) の1つであるマッシュルームチロシナーゼを用いて *in vitro* での水酸化反応を解析中に、L-チロシンを基質とした時には、電子供与体を添加しなくても水酸化反応が進行することを観察した。著者らは、市販のマッシュルームチロシナーゼによる *p*-クマル酸の水酸化がアスコルビン酸などのほかに Cu<sup>+</sup> などの金属イオンによっても促進されることを前報<sup>1)</sup> で報告したが、今回はマッシュルームチロシナーゼによる水酸化反応における電子供与体の要求性についての解析を目的に実験を行った。

### 実験材料および方法

#### 1) 実験材料および試薬

マッシュルームチロシナーゼ (8,300units/mg) は Sigma 社より購入したものを使用し、黒緑豆もやしの PPO は既報<sup>2)</sup> の方法で分離・調製したものを用いた。メタノール、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸、L-β-(3,4-dihydroxyphenyl) alanine (以下、L-DOPA と略記)、L-フェニルアラニンおよびその関連化合物やその他の試薬についてもすべて市販特級品を用いた。

#### 2) 水酸化酵素活性の測定

チロシナーゼ (120units/ml), 各種モノフェノール基質 (625 μM) および各種電子供与体 (50~250 μM) を含む 0.2M, トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 400 μl 中で振とうしながら、30℃で反応させた。塩酸 (12N) 70 μl を加え反応を止めた後、メンブレンフィルター (Advantec Toyo, 0.45 μm) で濾過し、濾液を高速液体クロマトグラフ (日立, 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 のカラムは東ソー ODS-80TM を使い、L-チロシンを基

質としたときには、溶出溶媒は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<sup>3)</sup>を用い、*p*-クマル酸の場合には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280nm (L-チロシン)と320nm (*p*-クマル酸)を用いた。

### 3) 水酸化反応に伴う生成アンモニアの定量

モノフェノール基質の水酸化反応に伴うアンモニアの生成量を微量拡散法<sup>4)</sup>とネスラー法との併用法<sup>5)</sup>を一部改良して測定した。即ち0.2M, リン酸緩衝液 (pH6.5) を用いてプレインキュベーションおよび反応液中への酸素供給を目的に35℃で5分間激しく振とう混和した後、チロシンを加えて反応を開始した。但し、反応開始後はアンモニアの拡散を防止する意味から振とうせずに反応させた。各時間 (0, 2, 4, 6, 8, 10分) における反応液の一定量 (1.0ml) を、予め内室に0.1N 硫酸溶液をアンモニアのトラップ剤として準備した微量拡散ユニットの外室に採り、密封したのち飽和炭酸カリウムを加えて38℃で2時間放置して生成アンモニアを気化させこれを硫酸にトラップさせた。放置後、内室内容の全量をパスツールピペットで試験管に移し、これにネスラー試薬5.0mlを加えて直ちに混和し、暗所 (室温) で30分放置後、420nm における吸光度を測定した。これとは別にアンモニアの標準品として硫酸アンモニウム (窒素として10mg/ml, 和光純薬製) を用いて同様に測定し、検量線を作成し、これより反応液中のアンモニア量を求めた。

### 4) *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の分離・検出

L-チロシンを含む上記反応液中でマッシュルームチロシナーゼを5分~10分間作用させた後、濃塩酸 (70  $\mu$ l) で反応を止めた。5ml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、0.1%のトリフルオロ酢酸を加えた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。

## 結果および考察

### 1. 電子供与体非存在下でのチロシナーゼによる水酸化反応における L-チロシンと *p*-クマル酸の違い

電子供与体非存在下で、L-チロシンにチロシナーゼ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 がさらにチロシナーゼ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*-クマル酸にチロシナーゼを作用させた時には、水酸化反応はほとんど進行せず、反応液の着色もほとんど認められなかった (Fig.1)。

### 2. チロシナーゼによる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チロシナーゼの反応溶液に加え、水酸化反応に対する効果を調べた (Fig.2-a, b)。L-チロシンを基質とした時には、水酸化反応の促進効果は用いたすべての電子供与体において観察されずコントロールとの差はみられなかった (Fig.2-a)。一方、*p*-クマル酸を基質とした時には、アスコルビン酸やジフェノール (この場合はカフェイン酸) は言うまでもなく L-グルタミン酸、塩酸モノメチルアミン等のアミノ化合物の添加により効果的に水酸化反応が進行した (Fig.2-b)。

*p*-クマル酸のチロシナーゼによる水酸化反応が L-グルタミン酸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-チロシン中にはアミノ基が含まれ、*p*-クマル酸にはアミノ基が含まれないことから、L-チロシン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., 4.の実験を行った。

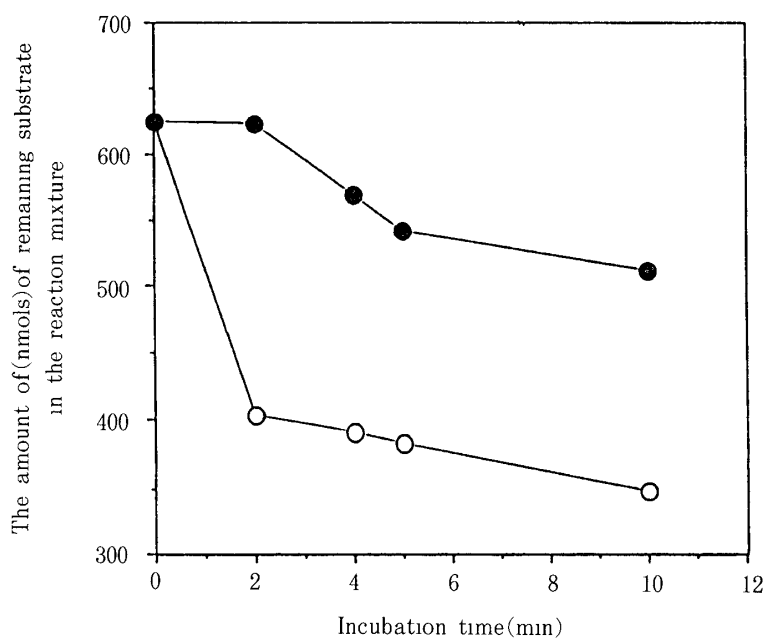


Fig.1 Hydroxylation of L-Tyrosine and *p*-Coumaric Acid by Tyrosinase in the Absence of Electron Donor

○ L-tyrosine  
● *p*-coumaric acid

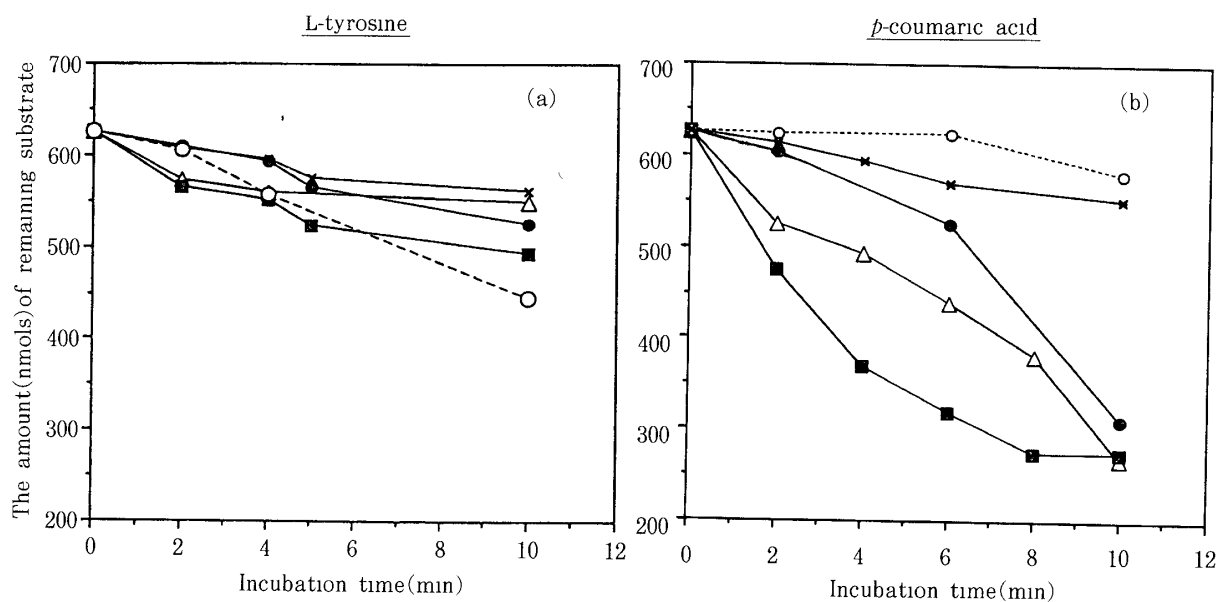


Fig.2(a)(b) Effect of Some Electron Donors on Hydroxylation of *p*-Coumaric Acid or L-Tyrosine

Experimental conditions are given in the text.

× ; (+) 5 mM CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>

● ; (+) 5 mM L-Glu

△ ; (+) 1 mM L-AaA

■ ; (+) 20 μM L-DOPA(a) or caffeic acid(b)

○ ; Control(no electron donor)

### 3. L-チロシンと類似構造のモノフェノール化合物における水酸化反応

基質中の一部のチロシンが電子供与体として作用している可能性を追求する目的でL-チロシンと類似構造をもつ、モノフェノール化合物であるがアミノ基がアセチル化された形のN-アセチルL-チロシンおよび脱アミノされた形の構造をもつ *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸

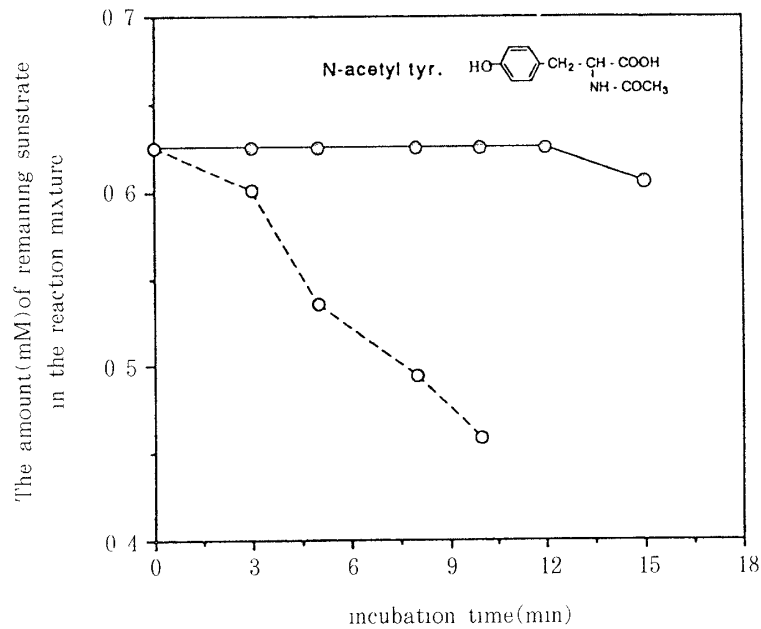


Fig.3 Hydroxylation of N-Acetyl L-Tyrosine by Tyrosinase

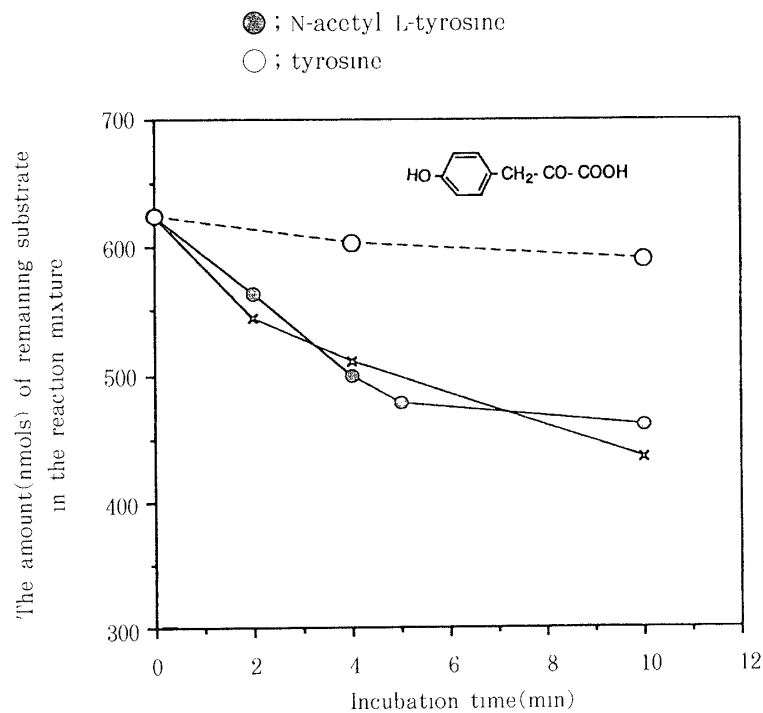


Fig.4 Effect of Amino Group on Hydroxylation of *p*-Hydroxyphenylpyruvic acid by Tyrosinase

- × ; (+) 5 mM CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>
- ; (+) 5 mM L-Glu
- ; Control (no electron donor)

を基質にしたときの水酸化反応をみた (Fig.3, Fig.4). L-チロシンの場合と異なり, N-アセチルL-チロシンの場合はアミノ基がアセチル化されていることでアミノ基のもつ還元性を示さないことから水酸化はほとんど進行しなかった (Fig.3). *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の場合も電子供与体を無添加のコントロールに比較して, メチルアミンやL-グルタミン酸などを添加することで効率よく水酸化が進行した (Fig.4). これらの結果は水酸化反応の電子供与体としてアミノ基が作用している可能性を支持した.

#### 4. 電子供与体非存在下でL-チロシンにチロシナーゼを作用させた反応液中から *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の分離と検出

もし, 上記のようにL-チロシン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, アミノ基がイミノ基を経由してアンモニアとなり, 脱アミノされた結果 *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸が生成することが予想される (Fig.5). そこで反応液より生成物を酢酸エチルで抽出し, HPLCで分析した. *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の標品と同じクロマトグラムを示し (Fig.6), 同じUV-吸収スペクトルを示す物質が検出された.

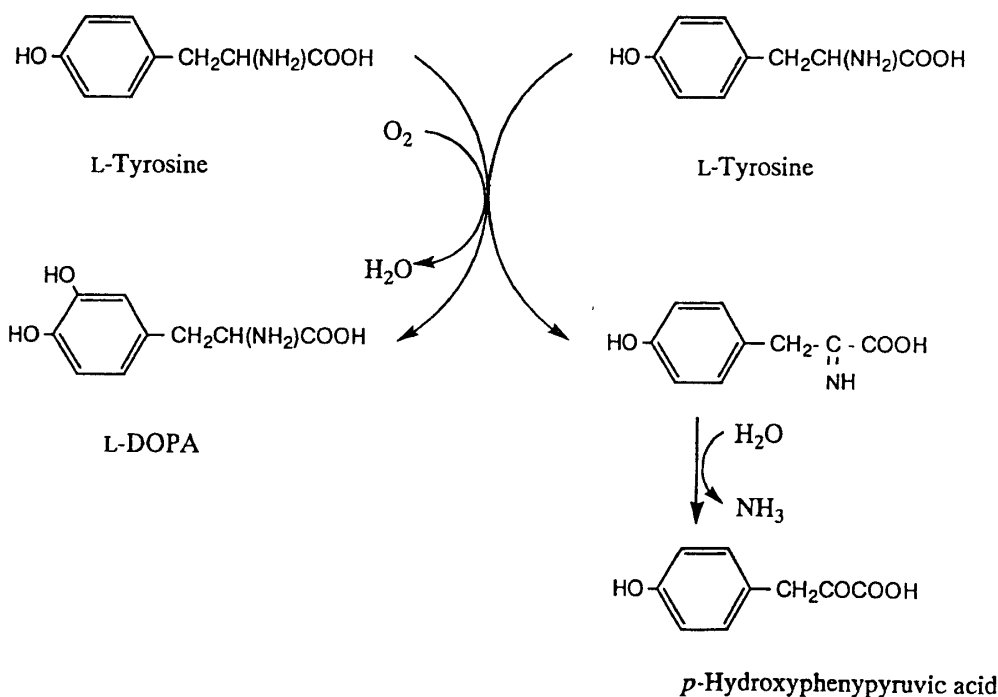


Fig.5 Hydroxylation Mechanism of L-Tyrosine by Tyrosinase

#### 5. チロシナーゼによる *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸の水酸化反応における電子供与体の要求性

L-チロシン中のアミノ基が, 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-チロシンが脱アミノされた *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸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. 予想通り, チロシナーゼによる *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸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-グルタミン酸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.4).

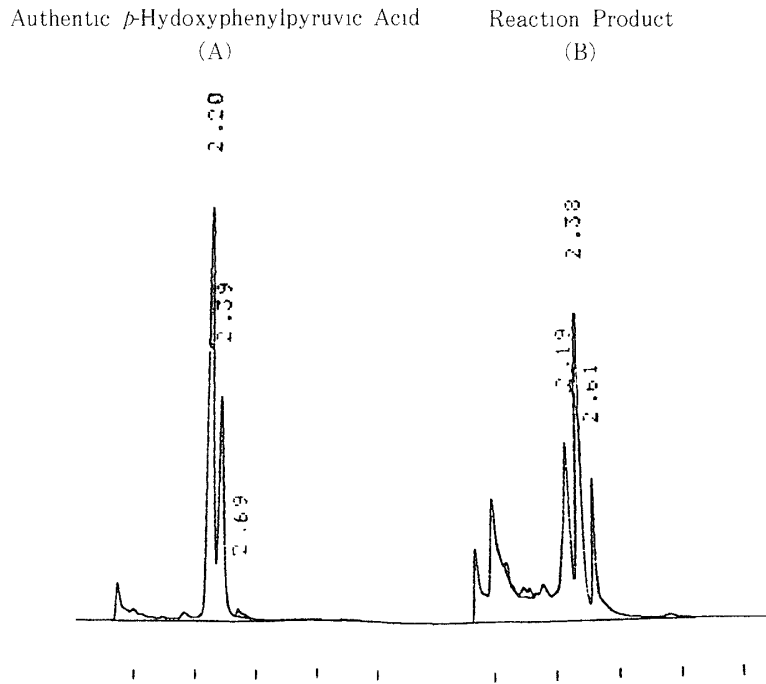


Fig.6 HPLC Chromatogram

HPLC chromatograms of authentic *p*-hydroxyphenylpyruvic acid(A) and reaction product(B)

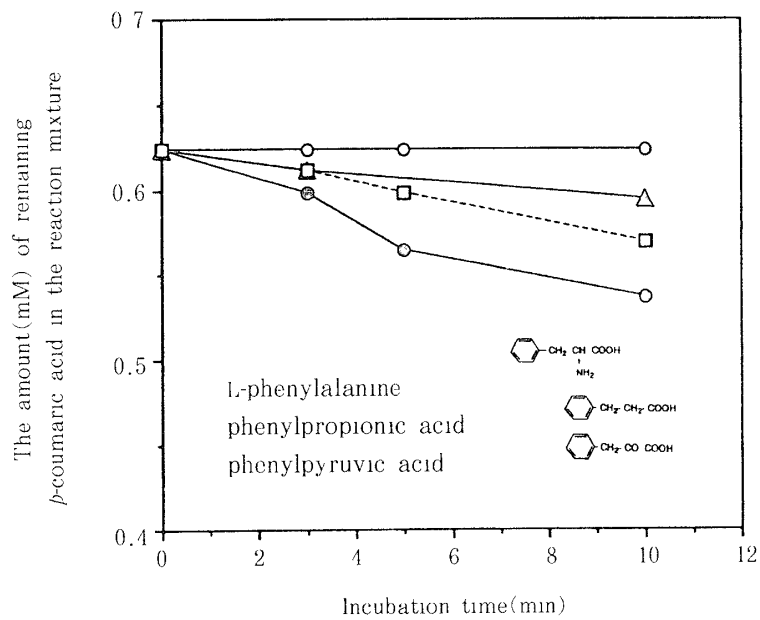


Fig.7 Effect of L-Phenylalanine on Hydroxylation of *p*-Coumaric Acid by Tyrosinase

- ; L-phenylalanine
- ; phenylpropionic acid
- △ ; phenylpyruvic acid
- ; Control(none)

## 6. 電子供与体としてのアミノ基の作用とアンモニアの生成

L-グルタミン酸同様にアミノ酸でアミノ基をもつ L-フェニルアラニンおよびその関連化合物でアミノ基を有しない構造のフェニルピルビン酸やフェニルプロピオン酸の *p*-クマル酸の水酸化反応に及ぼす効果をみた。Fig.7に示したように L-フェニルアラニンと異なり、フェニルピルビン酸やフェニルプロピオン酸の添加は水酸化をほとんど進行させないことからアミノ基が重要な効果を示すことが判明した。以上のような結果から実際にアミノ基が電子を放つことでイミノ基となり、これよりアンモニアが生成されると考えられることから (Fig.5) 両基質の水酸化反応に伴うアンモニアの生成を追跡した結果 (Fig.8a, b) チロシンを基質としたときには反応直後からアンモニアの生成が観察されたのに対し、*p*-クマル酸のみの場合には当然のことながらそれは認められず、これに L-フェニアラニンを添加することで水酸化が促進され、それに伴ってアンモニアの生成も観察された。なお本来アンモニアの生成は反応時間の経過とともに増大もしくは平衡化するものと考えられることから、この点については今後ツンベルグ管を用いた密閉方式で再度検討すべきだと考えている。

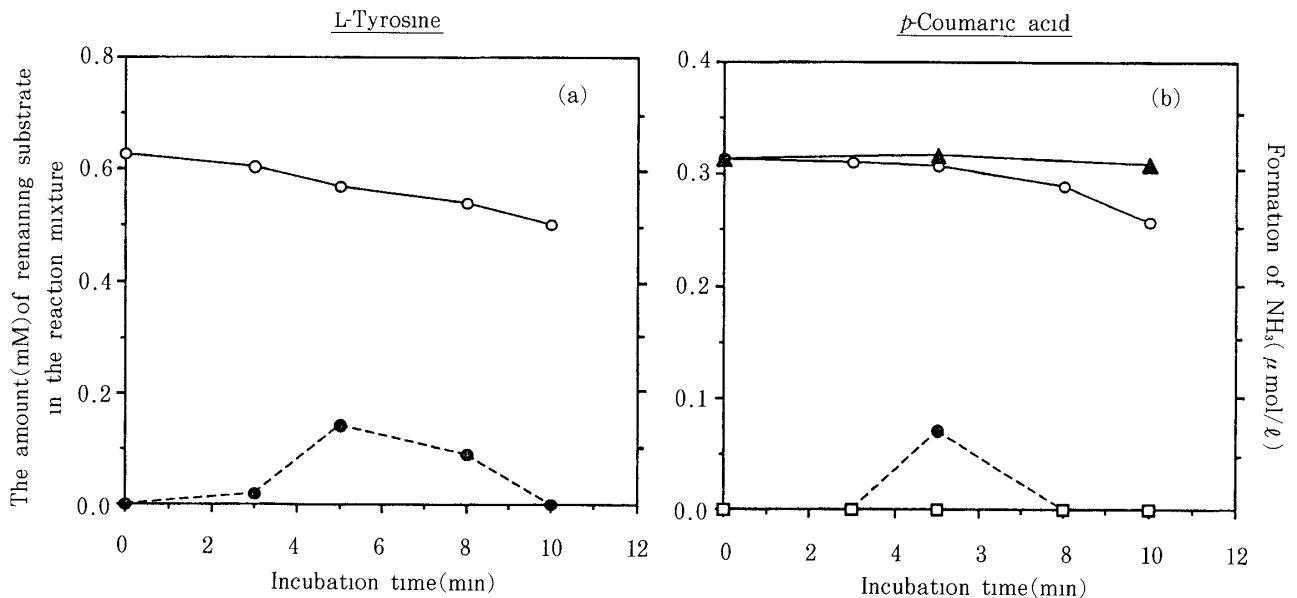


Fig.8 Remaining of Substrate and Formation of NH<sub>3</sub> in the Reaction Mixture

- ; NH<sub>3</sub> formation(a)
- ; remaining of tyrosine(mM)(a)
- ; (+)L-Phe.: NH<sub>3</sub> formation(b)
- ; *p*-coumaric acid only: NH<sub>3</sub> formation(b)
- ; (+)L-Phe.: remaining of *p*-coumaric acid(b)
- ▲; *p*-coumaric acid only: remaining of *p*-coumaric acid(b)

## 7. 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マッシュルームチロシナーゼの場合と同様な現象が観察されるかどうか調べた。

本酵素の場合にも、電子供与体非存在下で L-チロシンを基質とした時には水酸化反応が進行し、その結果生成した L-DOPA の酸化による反応液の褐変化が観察された (Fig.6)。一方、アミノ基をもたない *p*-クマル酸を基質として用いた場合には電子供与体非存在下では水酸化

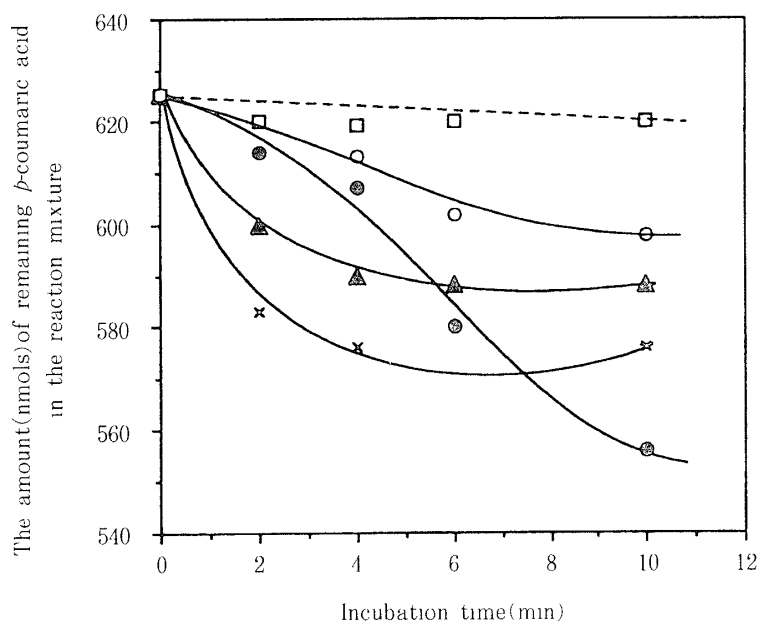


Fig.9 Effect of Some Electron Donors on Hydroxylation of *p*-Coumaric Acid by PPO from Mung Bean Seedlings

- ⊗ (+) 5 mM L-Glu
- × (+) 5 mM CH<sub>3</sub>CHO
- (+) 1 mM Caffeic acid
- △ (+) 1 mM AsA
- Control (None)

反応は全く進行せず、L-アスコルビン酸やジフェノール（コーヒー酸）をはじめ、L-グルタミン酸、塩酸モノメチルアミン、アセトアミド等で促進された (Fig.9). これらの結果より、モノフェノールの水酸化反応におけるアミノ基の効果はマッシュルームチロシナーゼにのみ特異的な現象ではなく、黒緑豆実生の PPO においても認められたことから PPO 一般に共通するものと考えられる。

チロシナーゼによる L-チロシン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、反応液中の水酸化される L-チロシンとは別の L-チロシン分子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た。

## 要 約

マッシュルームチロシナーゼによるモノフェノール化合物の水酸化反応における電子供与体の要求性の解析を目的に *in vitro* で実験を行った。その結果、L-チロシンを基質としたときには、電子供与体無添加で反応が進行することが認められた。これに対し、*p*-クマル酸を基質とした場合は電子供与体を必要とし、アスコルビン酸やジフェノール（コーヒー酸）の他に、種々のアミノ化合物が促進効果を示した。また、L-チロシンと類似の骨格を持ち、アミノ基を有しない N-アセチル L-チロシンおよび *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質とした場合も *p*-クマル酸のときと同様の結果が得られた。さらに、L-チロシンを基質とした反応液中に *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸およびアンモニアが検出された。これらのことから、チロシナーゼ



による水酸化反応の電子供与体として有効であり、L-チロシンを基質とした場合、電子供与体そのものが不必要ということではなく、反応液中の一部のL-チロシンのアミノ基が電子供与体として機能するために反応系が成立すると推定された。

### 参 考 文 献

- 1) 竹内若子, 高橋平八郎: 名古屋女子大学紀要, **40**, 33-37(1994)
- 2) Takeuchi W., Takahashi H. and Kojima M.: *Boisci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1134-1135(1995)
- 3) Marumo, K. and Waite J. H.: *Biochem. Biophysica. Acta.*, **872**, 98-103(1986)
- 4) Conway, E. J.: "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error", 5th ed.(1962)
- 5) Lang, C. A.: *Anal. Chem.*, **30**(1962)

### Summary

Polyphenol Oxidase(PPO) shows two different enzyme activities *in vitro*, oxidase and hydroxylase activities. In the presence of electron donors, they hydroxylated various monophenols to diphenols. PPO required electron donor for the hydroxylation of *p*-coumaric acid but not for the hydroxylation of L-tyrosine.

Hydroxylation of L-tyrosine was not stimulated by the addition of electron donors such as methylammonium chloride, acetoamide and L-glutamic acid. However, in the case of *p*-coumaric acid was stimulated. In consideration of difference in structure between L-tyrosine and *p*-coumaric acid, we assumed that an amino group in L-tyrosine functioned as an electron donor. This assumption was supported by the two kinds of experimental results. First, hydroxylation of *p*-coumaric acid was stimulated by addition of amino group-containing compounds. Secondary, *p*-hydroxyphenylpyruvic acid which has a structure of amino group-eliminated L-tyrosine, behaved as *p*-coumaric acid in the hydroxylation by tyrosinase.