ウンシュウミカン (*Citrus unshiu*) 果実における エチレン処理後のクロロフィル分解の経路について

柳 迫 睦・前田義志・下川敬之

宮崎大学農学部 889-21 宮崎市学園木花台西1丁目1番地

Fate of Chlorophyll a during its Ethylene-Enhanced Chlorophyll Degradation in *Citrus unshiu* Fruits.

Atsushi Yanagisako, Yoshiyuki Maeda and Keishi Shimokawa

Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-21

Summary

Two enzymatic metabolites from chlorophyll a were detected in crude enzyme extracts prepared from ethylene-treated fruits of *Citrus unshiu*. They were identified as pheophorbide a and pyropheophorbide a using high performance thin layer and liquid chromatographic techniques and fluorescence spectroscopy.

Sodium ascorbate enhanced conversion of chlorophyll a to pheophorbide pigments, whereas p-chloromercuribenzoate strongly inhibited the formation of pyropheophorbide a. These results suggest that the crude enzyme extracts contain the two enzymes, 'Mg-dechelataase' and 'Decarbomethoxylase'.

緒 言

クロロフィルの代謝については、多くの研究者がその研究について報告しているが、その多くは生合成についての報告であり、分解についての報告は比較的少ないのが現状である (Hendry ら, 1987). これは、通常クロロフィル分解産物が脱緑後の組織内に蓄積されないために、それらがほとんど検出されないという点によるところが大きい。しかし、クロロフィル分解についての知識は着実に増加の一步をたどっている。

現在地球上では、年間12億トンものクロロフィルが無色物質に分解されていると言われている (Brown ら, 1991). しかし、このメカニズムについて余りよくわかっていないことは先ほど述べたとおりであるが、クロロフィルが酵素的にどのような物質に変化していくかはある程度知られている。これまでの研究 (Shimokawa ら, 1978; Yamauchi・Hashinaga, 1992) により、エチレン増進クロロフィル分解の初期段階においてクロロフィラーゼ (酵素番号 EC 3.1.1.14.) が重要な役割を担っていることが明らかにされており、

単一タンパク質にまで精製され (Shimokawa, 1982), この酵素を用いたエチレンによる活性化機構の解明がなされているが、現段階ではクロロフィル分解の代謝経路における酵素で明らかにされているものはこれ一つである。著者らはこのようにほとんど明らかにされていないクロロフィル分解の代謝経路を明らかにするため、高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) の手法と代謝阻害剤の利用によりクロロフィル a からの代謝産物を明らかにするためのいくつかの実験を行った。

実験材料および方法

1. 粗酵素液の調製法

粗酵素液は、次のようにして調製した。

全果の状態では12時間エチレン処理 (約500 ppm) し、36時間経過したウンシュウミカン果皮を細切し、2倍容のアセトン (-20℃まで冷やしたもの) とともにミキサーで1分間磨砕した。これをガラスビンに移し、磨砕片の5~6倍容になるようにアセトン (-20℃) を加えた。この磨砕液を冷暗所に6時間放置後、ブフナーロートを用いて濾紙 (TOYO No. 1) で濾過した。残渣の緑色が抜け切るまでアセトン (室温

に置いたもの)で繰り返し濾過した後、残渣のアセトン揮発したものをアセトン粉末とし、使用するまで真空デシケーター中に -20°C で貯蔵した。

アセトン粉末 15 g を粉碎器でさらに細粉化し、 30°C の 0.2% トリトン X-100 を含む 0.02 M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) 250 ml を加え 30 分間攪拌した後、布製フィルターで濾過して得られた懸濁液を 0°C 、12,000 rpm で 20 分間遠心分離した。得られた上澄み液を透析膜 (Size 24/32, 三光純薬) に入れバットに寝かせ、ポリエチレングリコール #4,000 を透析膜が見えなくなる位かぶせた。バットを 5°C の冷蔵庫内に置き、液量が 1/3 になるまで脱水濃縮し、この濃縮液を粗酵素液として実験に用いた。なお、この粗酵素液は使用するまで -20°C で貯蔵し、使用前に解凍した。基質としてのクロロフィル a・アセトン溶液は、市販のクロロフィル a (センシュウ科学工業、純度 99.9%) 2.5 mg をアセトン 5 ml に溶かして使用した。なお、この溶液は -20°C の暗黒下に貯蔵した。

試薬のアスコルビン酸ナトリウム、ヒドロキノンおよび p-クロロマーキュリ安息香酸 (PCMB) は 10^{-2} M 水溶液とした。

2. クロロフィル a 分解酵素活性の測定法

クロロフィル a 分解酵素活性の測定は次のようにして行った。

0.05 M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) 7 ml、粗酵素液 2 ml、各試薬 0.6 ml、chl a 溶液 $40\text{ }\mu\text{l}$ を培養試験管 ($\phi 30 \times 120\text{ mm}$) に入れ、 30°C のウォーターバスにつけ反応させた。混合直後、30 分、60 分、90 分、210 分、360 分後にメンブレンフィルター (Millipore, SJFH 013 NS) を先端につけた注射器で 1 ml サンプルングして、HPLC に $10\text{ }\mu\text{l}$ 注入した。また、サンプルは -20°C 暗所に保存した。なお、対照区には試薬溶液の代わりに蒸留水を用いた。なお、HPLC の設定は次のとおりである。

展開相組成	メタノール、アセトン、水 15, 10, 1 (v/v)
流量	$0.4\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
カラムタイプ	Hiber LiChrosorb RP-18 ($7\text{ }\mu\text{m}$)
温度	室温
検出器	Shimadzu RF-530
レンジ	16
感度	Low
励起波長	430 nm

蛍光波長	670 nm
クロマトパック	Shimadzu C-R 6 A
チャートスピード	$3\text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$

3. クロロフィル a 代謝産物の薄層クロマトグラフィーと蛍光分光光度計によるスペクトル分析

HPLC 分析の際保存しておいたサンプルを材料として使用した。

サンプルを薄層板 (HPTLC RP-8 F 254, Merck) に $40\text{ }\mu\text{l}$ つけて乾燥させ、メタノール、アセトン、水、15:10:1 (v/v) の割合で調製した展開溶媒で展開し、標準物質の蛍光スペクトル、溶出位置と比較した。標準物質にはクロロフィル a (市販品)、クロロフィル d (Shimokawa ら 1990 の方法により調製)、フェオフィorbide a (市販品)、ピロフェオフィorbide a (Shimokawa ら 1990 の方法により調製) のアセトン溶液を用いた。

また、分解産物の量的変化を調査するためにサンプル $750\text{ }\mu\text{l}$ を薄層板につけて乾燥させ、上述の展開溶媒で展開し、現れたバンドを一つずつ丁寧にスパチュラで削り取った。削り取った薄層片を 5 ml の褐色バイアルに入れアセトン 4 ml を加え、一昼夜室温暗所に放置した後 -20°C 冷暗所に保存した。バイアル内の上澄み液のスペクトルを蛍光分光光度計 (Shimadzu RF-540) で測定した。なお、蛍光分光光度計の測定は次のとおりに、各物質の励起波長を固定し 600~700 nm まで走査して行った。

	Excitation wavelength	Emission wavelength
chlorophyll a	430	600~700
chlorophyllide a	430	600~700
pheophorbide a	410	600~700
pyropheophorbide a	410	600~700

なお、上記の操作は色素類の光分解を防ぐためすべて弱い緑色光下で行った。

結果および考察

1. In vitro におけるクロロフィル a 分解に対する阻害剤の影響

この実験は、in vivo での実験においてアスコルビン酸ナトリウムとヒドロキノンがエチレン誘導クロロフィル分解酵素を活性化することが推察されるため (未発表)、エチレン処理を施したウンシュウミカン果皮より抽出した粗酵素による in vitro でのクロロフィル a 分解に対し、アスコルビン酸ナトリウム、ヒドロ

キノンおよびp-クロロマーキュリ安息香酸 (PCMB) がどのように影響するかを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分解産物を追跡することによって検討した。

粗酵素液によるクロロフィル a 分解に対する各試薬の影響について HPLC を用いて経時的に分解産物を調査した結果を第 1 図に示す。この結果のうち一番右に現れるピークがクロロフィル a であることは標準物質により確認されている。しかし、その他のピークについては確認されていない。アスコルビン酸ナトリウムを処理すると反応開始から 30 分でクロロフィル a がほとんどみられなくなるが他の試薬ではまだ残っていることは明らかである。つまり、アスコルビン酸ナトリウムがクロロフィル a 分解を促進していることが推察される。しかし、HPLC ではクロロフィル a 以降の分解産物の同定が困難であるため、HPTLC による分析によりさらに検討が必要である。なお、粗酵素液を 5 分間煮沸後沈殿物を除去した失活粗酵素液を用いて

同様の実験を行ったところ、クロロフィル a 分解はみられず、これらの反応がすべて酵素的に行われていることが確認された。

2. In vitro でクロロフィル a 分解の阻害部位の高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による探索

In vitro で得られた結果をより確実なものにするために、HPTLC を用いて HPLC 分析で得られたピークを示す物質を標準物質との比較により同定を試みた。また、蛍光分光光度計による分解産物の量的変化を調べ、各種阻害剤の阻害部位の探索を行った。

第 2 図は粗酵素液によるクロロフィル a 分解産物の経時変化を HPTLC を用いて追跡したものである。これによりクロロフィル a が次のように酵素反応により変化していることがわかる。

Fig. 1. HPLC tracings showing the effect of inhibitors on in vitro degradation of chlorophyll a. The conditions for high performance liquid chromatography were : mobile phase, methanol, acetone, water = 15 : 10 : 1 (v/v); flow rate, 0.4 ml · min⁻¹; column type, Hiber LiChrosorb RP-18 (7 μm); temperature, room temperature; detector type, Shimadzu RF-530; range, 16; sensitivity, low; excitation wavelength, 430 nm; emission wavelength, 670 nm; data processor, Shimadzu C-R 6 A; chart speed, 3 mm · min⁻¹.

Fig. 2. Thin-layer chromatograms showing metabolites derived from in vitro degradation of chlorophyll a in the peel of *Citrus unshiu* fruits with time (left) compared to the standards (rights). Developed thin-layer plates were placed on UV-generator (transilluminator, Cosmo GSF 20 A). Red fluorescence for tetrapyrroles was photographed with high sensitive films (Fujichrome 400 D, Fuji super FG 1600).

これを参考にして、代謝阻害剤を与えた場合のクロロフィル a 分解産物の経時的な量的変化について第3図に示す。アスコルビン酸ナトリウムを与えた場合の0分でのフェオフォルビド a (以下 phde a) 量が無処理と比較して非常に多く、混合からサンプリングまでの間の反応が速くアスコルビン酸ナトリウムが phde a までの分解過程を促進していることがわかる。また、PCMB を与えた場合ピロフェオフォルビド a (以下 pyrophde a) の生成が著しく抑制され、phde a が蓄積されている。つまり、PCMB が phde a の分解に関与する酵素反応を特異的に阻害しているものと考えられる。したがって、この分解に関与する酵素は SH 酵素であると推察される。また、無処理あるいはアスコルビン酸ナトリウムないしヒドロキノンを与えた場合に pyrophde a が減少することなく蓄積されていることから、本実験で使用した粗酵素液中に pyrophde a の分解に関与する酵素あるいは酵素反応に関与する補助

因子などが含まれていないものと考えられる。このような pheophorbide の蓄積は、シロザの葉の粗酵素液でも著者らによって観察されており (Shioi ら, 1991), エチレン処理に特有の現象ではなさそうである。アスコルビン酸ナトリウムによるクロロフィル a 分解経路の促進は、PCMB による強い阻害と対比して考えると、分解に関与する SH 酵素の SH 保護剤としてアスコルビン酸が作用した結果と考えられる。

以上の結果より、エチレン処理したウンシュウミカン果皮より抽出した粗酵素液中には chlorophyllase (酵素番号 EC 3. 1. 1. 14.) に加えて “Mg-dechelataase”, “decarbomethoxylase” とでも呼べる酵素が存在することが示唆される。このことはウンシュウミカン果皮の粗酵素液が、まったく研究されていないこれらの酵素を研究するのに好材料であることを示しており、今後の研究の進展が期待される。

摘 要

エチレン処理し、脱緑中のウンシュウミカン果実から調製した粗酵素抽出液にクロロフィル a を基質として与えると、酵素反応により、少なくとも2つの生成物 (フェオフォルビド a とピロフェオフォルビド a) が高性能薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、さらに蛍光分光光度計によるスペクトル

Fig. 3. Relative changes in the levels of metabolites as influenced by inhibitors during in vitro degradation of chlorophyll a in the peel of *Citrus unshiu* fruits.

分析により同定された。この酵素反応のうち、クロロフィル a のフェオフォルビド化合物への変換は、アスコルビン酸ナトリウムで促進され、p-クロロマーキユリ安息香酸により強く阻害されることがわかった。これらの結果は、この粗酵素液がクロロフィル代謝に関係する酵素として、クロロフィラーゼ以外に、“Mg-デキレターゼ”、“デカルボメトキシラーゼ”と呼ぶべきものが含まれていることを示唆している。

引用文献

- Brown, S. B., J. D. Houghton and G. A. F. Hendry. 1991. Chlorophyll breakdown, p 466-489. In : Scheer (ed.), Chlorophylls. CRC Press, London.
- Hendry, G. A. F., J. D. Houghton and S. B. Brown. 1987. The degradation of chlorophyll-A biological enigma, New Phytol. 107 : 255-302.
- Shimokawa, K. 1982. Hydrophobic chromatographic purification of ethylene-enhanced chlorophyllase from *Citrus unshiu* fruits. Phytochemistry 21 : 543-545.
- Shimokawa, K., S. Shimada and K. Yaeo. 1978. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of *Citrus unshiu* Marc. Scientia Hort. 8 : 129-135.
- Shimokawa, K., A. Hashizume and Y. Shioi. 1990. Pyropheophorbide a, A catabolite of ethylene-induced chlorophyll a degradation. Phytochemistry 29 : 2105-2106.
- Shioi, Y., Y. Tatsumi and K. Shimokawa. 1991. Enzymatic degradation of chlorophyll in *Cheropodium album*. Plant Cell Physiol. 32 : 87-93.
- Yamauchi, N. and F. Hashinaga. 1992. Chlorophyll degradation by peroxidase in ethylene-treated Satsuma mandarin fruits. 日食低温誌. 18 : 167-171.