

## 1Cp-2

## 茶葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの精製と性質

陳 功祥° 浅田 浩二 (京大 食研)

Ascorbate (AsA) を特異的な電子供与体とする peroxidase は葉緑体の  $H_2O_2$  消去に関与している。さらにこの葉緑体 AsA peroxidase は従来植物から単離されてきた peroxidase とは種々の性質が異なるが、葉ではむしろ peroxidase 活性の大部分を占めている。我々は AsA peroxidase がホウレンソウに比べ豊富に含まれている茶の葉を用いて精製を試み、部分精製された酵素についてその性質を明らかにした。また、AsA peroxidase の活性染色法を開発したので、ここで報告する。

(方法) 茶葉 (1kg) を 1 mM AsA、20% sorbitol、1 mM EDTA、0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride、2% (w/v) polyvinylpyrrolidone を含む 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) で homogenize し、硫酸分画のあと、Table に示すクロマトグラフィによって精製した。

AsA peroxidase の活性染色は次のようにして行った。試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルを 4 mM AsA と 4 mM  $H_2O_2$  で 15 分間 incubate し、ゲルを水洗後、0.1%  $K_3Fe(CN)_6$ 、0.1%  $FeCl_3$  に浸し、AsA によって生ずる Prussian Blue の発色が見られない band を AsA peroxidase とした。

(結果) 部分精製された AsA peroxidase の purity は 80% で、A、B、C 三種の isozyme の内の C type であった。この酵素の電子供与体について調べたところ、pyrocatechol、glutathione、guaiacol に対し、ほとんど活性を示さなかった。また、この酵素は AsA が存在しないと速やかに失活する。以上の諸性質からここで部分精製した酵素は AsA を特異的な電子供与体とする peroxidase である。

この AsA peroxidase は dithiothreitol (DTT) に対し、oxidase 活性を示した。DTT は AsA peroxidase の AsA の peroxidase 反応に competitive な阻害を示し、この酵素は DTT も電子供与体とすることが明らかとなった。また、AsA が存在しないときの AsA peroxidase の失活は DTT によって防ぐことができる。glutathione ( $I_{50}=16.7$  mM)、cysteine ( $I_{50}=2.6$  mM) は高濃度でのみ AsA peroxidase を阻害し、AsA が存在しないときの peroxidase の失活をも防ぐ。以上のようにこの酵素はチオールをも電子供与体とすることが明らかとなった。

この他、 $O_2^-$  による AsA peroxidase の失活、AsA peroxidase の AsA 濃度低下による失活の機構について報告する。

Summary of purification of ascorbate peroxidase from tea leaves (1 kg)

Step	Protein (mg)	Total activity ( $\mu\text{mol ascorbate oxidized min}^{-1}$ )	Specific activity ( $\mu\text{mol ascorbate oxidized min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ )	Yield (%)
Extract	10238	20272	1.98	100
Ammonium sulfate(35%)	3060	14333	4.68	70
Butyl-Toyo pearl	453	6533	17.6	32.6
Sephadex G-100	22	1273	57.8	6.3
DEAE-Sephadex	6	870	145	4.3
Sephadex G-100	0.74	430	581	2.1