

野菜によるChl *a* → Chl *d* 変換

¹筑波大学 物質工学系

²京都大学 大学院 人間・環境学研究科

伊藤慎吾¹、青木啓輔¹、藤田紘一¹、宮下英明²、小林正美^{1,*}

1. はじめに

これまで、酸素発生型光合成生物は Chl *a* (図1A、挿入図) を主要色素としていたと考えられていたが、1996年に宮下らはパラオに生息している群体ホヤに共生する原核海洋藻中に、Chl *a* ではなく Chl *d* を主要色素とする *Acaryochloris marina* を発見した^{1,2)}。Chl *d* は Chl *a* のリング I のビニル基がフォルミル基に置換されたクロロフィルである (図1B、挿入図)。Chl *d* は 1943年にManningとStrain³⁾ によって紅藻から発見された葉緑素で、Holtらによって構造が決定された^{4,5)}。

ところで、Chl *a* は長鎖フィトールが存在するため水に不溶だが、クロロフィラーゼを作用させると、エステル結合が加水分解されて、水溶性の Chlide *a* (図1C、挿入図) になる。小林らはエステラーゼ (エステラーゼ、コレステロールエステラーゼ、フォスファターゼ) によってこの反応が触媒されるのではないかと期待して実験を行ったが、Chlide *a* は生成しなかった^{6,7)}。

蛋白質分解酵素プロテアーゼは弱いエステラーゼ活性を有する。そこで、種々のプロテアーゼ (パパイイン、 α -キモトリプシン、スブチリシンカルスバグ、フィチン、プロメライン) を、Chl *a* を含む含水アセトン中、30°Cで保温したところ、パパイインのみが Chlide *a* 生成を示した (図1A) ⁶⁻⁸⁾。その際、Chlide *a* 以外のピークがもう一つ観察された。この成分は、HPLCでの保持時間、吸収スペクトル、マススペクトルから、Chl *d* だと結論された^{6,8)}。Chl *b* や Phe *a* を基質とした場合も、効率はかなり低いものの、環Iのビニル基がフォルミル化されることから、この反応に関するパパイインの基質特異性は低いと思われる。

現在のところ、Chl *a* → Chl *d* 変換を起こす酵素

は、加水分解酵素パパイインと酸化酵素ペルオキシダーゼ⁹⁾のみである。Chl *a* → *d* 変換は酸化反応なので、ペルオキシダーゼによって進行することは比較的受け入れ易いが、何故パパイインがこの酸化反応を触媒するの

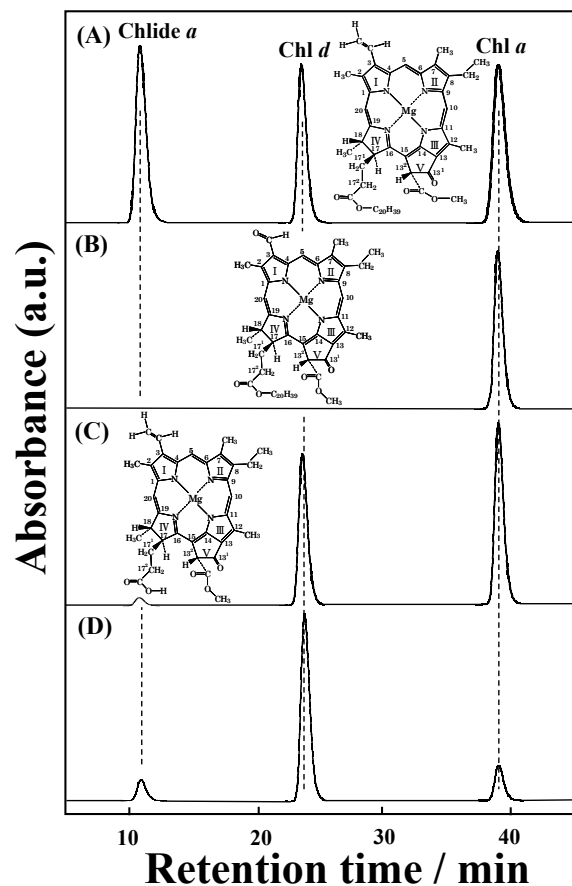


図1 アセトン/水 (10/1, v/v) 中での (A) パパイイン、(B) 完熟パパイアの実 (皮)、(C) 青パパイアの実 (皮)、(D) 大根 (茎根) による Chl *a* → Chlide *a* および Chl *d* 変換を示す逆相HPLCチャート。

反応温度: 30 °C、反応時間: 48 h、 $\lambda = 700$ nm。

* 連絡先 E-mail: masami@ims.tsukuba.ac.jp

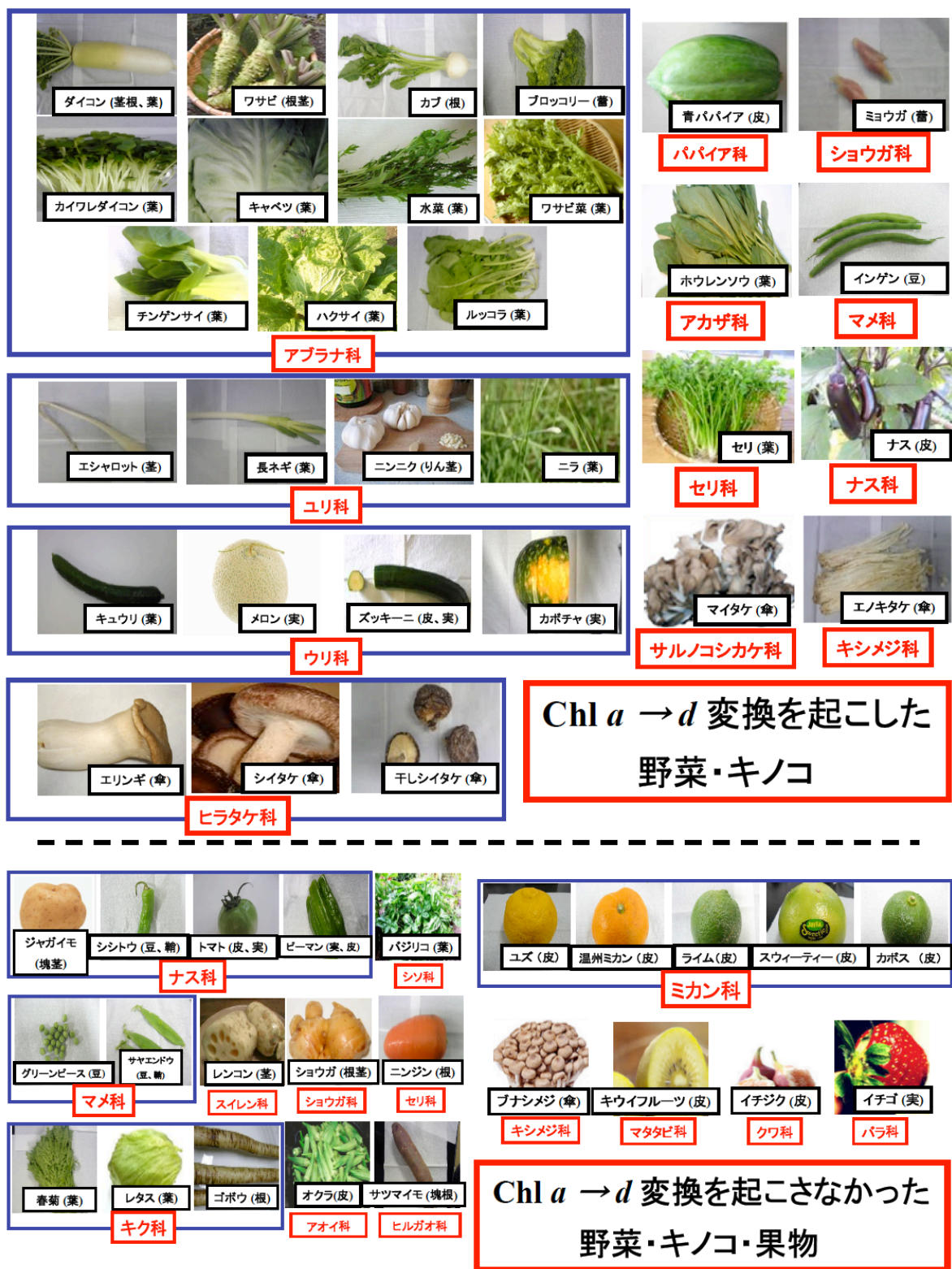


図2 使用した野菜、果物およびキノコ

かは理解に苦しむ。ただ、ペルオキシダーゼよりもパインの方が $\text{Chl } a \rightarrow d$ 変換効率が遙かに高いことは注目に値する。

2. パパイアによる $\text{Chl } a \rightarrow \text{Chl } d$ 変換

酵素パパイアによる $\text{Chl } a \rightarrow d$ 変換を学会で発表したところ、パパイアからパパインを抽出・精製する際に使用した化学薬品が残存し、それがこの反応を起こ

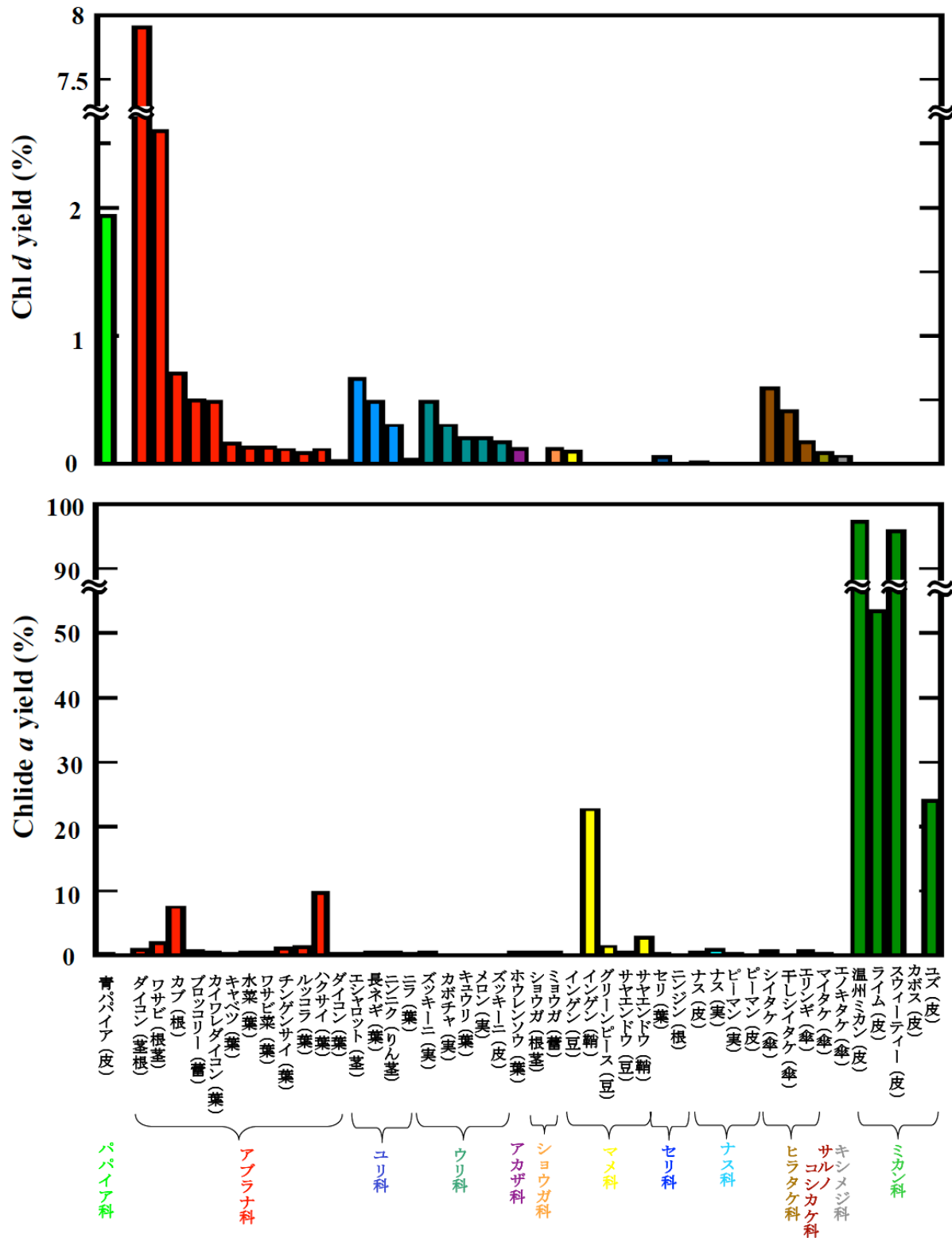


図3 野菜、果物、キノコによる Chl a → Chl d (上) および Chlide a (下) 変換率。
 反応溶媒: 含水アセトン、反応温度: 30 °C、反応時間: 48 h。

しているのではないかと指摘を受けた。そこで酵素パパインではなく、果実パパイアで Chl a → d 変換が起ることを証明することにした。パパインは未熟果(青パパイア)に豊富で、熟したパパイアの実にはほ

とんど含まれていない。そのため、熟したパパイアでは Chl d は生成しなかったが(図1B)、未熟果ではパパイアと同様に Chl d が生成した(図1C)。ちなみに、沖縄ではパパイアを果物(適熟果)ではなく、野菜(未

表1 野菜、果物およびキノコによる Chl *a* → Chl *d* および Chlide *a* 変換率。
 反応溶媒: 含水アセトン、反応温度: 30 °C、反応時間: 48 h。

Family	Vegetables	Yield (%)		Family	Vegetables	Yield (%)	
		Chl <i>d</i>	Chlide <i>a</i>			Chl <i>d</i>	Chlide <i>a</i>
アブラナ科	ダイコン (茎根)	7.90	0.89	セリ科	セリ (葉)	0.05	0.20
	" (葉)	0.02	0.16		ニンジン (根)	0.00	0.11
	ワサビ (根茎)	2.60	1.84	マメ科	インゲン (豆)	0.10	0.10
	カブ (根)	0.70	7.50		" (鞘)	0.00	22.64
	ブロッコリー (蕾)	0.50	0.61		グリーンピース (豆)	0.00	1.35
	カイワレダイコン (葉)	0.48	0.38		サヤエンドウ (豆)	0.00	0.49
	" (葉)	0.16	0.22	" (鞘)	0.00	2.70	
	水菜 (葉)	0.13	0.36	キク科	春菊 (葉)	0.00	1.90
	ワサビ菜 (葉)	0.13	0.38		レタス (葉)	0.00	0.06
	チンゲンサイ (葉)	0.11	1.03		ゴボウ (根)	0.00	0.16
" (葉)	0.11	9.70	スイレン科	レンコン (茎)	0.00	0.65	
ルッコラ (葉)	0.08	1.30		シソ科	バジリコ (葉)	0.00	0.12
ユリ科	エシャロット (茎)	0.66	0.33	ショウガ科	ショウガ (根茎)	0.00	0.45
	長ネギ (葉)	0.48	0.40		" (蕾)	0.12	0.37
	" (茎)	0.00	0.00	アオイ科	オクラ (皮)	0.00	0.97
	ニンニク (りん茎)	0.30	0.45	バラ科	イチゴ (実)	0.00	0.68
ニラ (葉)	0.03	0.19	パパイヤ科	青パパイヤ (皮)	1.93	0.23	
ズッキーニ (実)	0.48	0.48		" (実)	0.00	0.85	
ウリ科	" (皮)	0.17	0.12	ミカン科	温州ミカン (皮)	0.00	96.35
	キュウリ (葉)	0.20	0.13		" (皮)	0.00	53.44
	" (実)	0.00	0.00		スウィーティー (皮)	0.00	94.43
	メロン (実)	0.20	0.08		カボス (皮)	0.00	0.00
	" (皮)	0.00	0.20	" (実)	0.00	23.91	
	カボチャ (皮)	0.00	0.24	マタタビ科	キウイフルーツ (皮)	0.00	0.00
" (実)	0.30	0.08	クワ科	イチジク (皮)	0.00	3.11	
ナス科	ナス (皮)	0.01	0.43	ヒラタケ科	シイタケ (傘)	0.59	0.59
	" (実)	0.00	0.82		干しシイタケ (傘)	0.41	0.14
	ピーマン (実)	0.00	0.22		" (傘)	0.17	0.59
	" (皮)	0.00	0.13	サルノコシカケ科	マイタケ (傘)	0.08	0.17
	シシトウ (豆)	0.00	33.19		キノシタケ (傘)	0.06	0.07
	シシトウ (鞘)	0.00	—	" (傘)	0.00	0.00	
	トマト (皮)	0.00	0.00	キシメジ科	エノキタケ (傘)	0.06	0.07
" (実)	0.00	0.00	" (傘)	0.00	0.00		
ジャガイモ (塊茎)	0.00	0.00					
アカザ科	ハウレンソウ (葉)	0.12	0.42				

熟果、青パパイヤ) として扱うことが多いと聞く。同じく南洋の果実であるパイナップルにはプロメラインが含まれているが、1.で述べたように Chl *a* → *d* 変換は起こさなかった。

3. 果物による Chl *a* → Chl *d* 変換

酵素パパインは基質特異性が低い加水分解酵素なので、Chl *a* → Chlide *a* なる加水分解反応を触媒したと考えられる。自然界でこの反応を触媒するのがクロロフィラーゼで、柑橘類の皮に多く含まれる。興味深いことに、上記のパパインと同様に、「完熟果」よりも「未熟果」の皮に多く含まれている。

そこで柑橘類 (温州みかん、ゆず、ライム、カボス、スウィーティ) (図2) の果実 (皮) をすり潰して含水アセトン中で Chl *a* と一緒に 30°C で保温し

たが、Chl *d* の生成は確認できなかった (図3、表1)。しかし、カボスを除く4種ではクロロフィラーゼによる Chlide *a* 生成が高い収率で観察された。その他の果実 (キウイフルーツ、イチジク) でも Chl *d* は検出されず、また Chlide *a* 生成率も低かった (図3、表1)。

4. 野菜・キノコによる Chl *a* → Chl *d* 変換

果実とは異なり、ほとんどの野菜 (図2) で Chl *a* → *d* 変換が観察された (図3、表1)。中でも大根による変換率は約8%と群を抜いており、パパインやパパイヤ (変換率: 2.0%) を凌いだ。図3を眺めると、アブラナ科の野菜による Chl *a* → Chl *d* 変換率が高いことが分かる。アブラナ科の野菜には、多種多様な酵素が豊富に含まれているが、どの酵素によって Chl *a* → Chl *d* 変換が起きるのは現在検討中である。ペルオ

キシダーゼによる Chl *a* → *d* 変換効率は 0.1% と、パパインよりもかなり低いことから、変換効率が極めて高い大根では、ペルオキシダーゼ以外の何らかの酵素がこの反応を触媒していると推定される。驚いたことに、葉緑素を持たないシイタケが割と高い Chl *a* → *d* 変換を示す (図3)。

以上の結果は、含水アセトン中のものだが、アセトンは自然界ではありふれた物質ではない。そこで、アセトンの代わりにエタノールを使用してカイワレダイコン (葉) で実験を試みたところ、変換効率は約半分に低下するものの、Chl *d* が生成した。また、カイワレダイコン (葉) には Chl *a* が含まれるため、Chl *a* を添加せずにすり潰し、含水エタノール中で保温しても、やはり Chl *d* が生成した。自然界ではエタノール発酵はありふれた反応だから、Chl *a* → *d* 変換は割と頻りに身の回りで起きているのかもしれない。さらに、有機溶媒を一切使用せずに、カイワレダイコンをすり潰し、放置しただけでも Chl *d* が生成することは特筆すべきであろう。

5. おわりに

酵素 (パパインやペルオキシダーゼ) や野菜によって、Chl *a* が割と簡単に Chl *d* になることが分かった。この変性はクロロフィルの「化学進化」のひとつとも言える。この「化学進化」が引き金になって、Chl *d* を有する *A. marina* が太古の地球に出現したのかもしれない。ごく最近、Chl *a* → *d* 変換が希 H₂O₂ のみでも誘起されることを見出した (変換率: 0.4%)¹⁰⁾。ペルオキシダーゼに H₂O₂ を添加すると効率は向上するが (0.1% → 1%)、パパインでは逆に低下する (2% → 0.2%) ことも分かってきた^{9,10)}。今後、Chl *a* → *d* 変換の仕組みを分子レベルで解明していきたい。

Received July 19 2011 Accepted July 28 2011 Published

August 31, 2011

参考文献

1. Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M., and Miyachi, S. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment, *Nature* 383, 402.
2. Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T., and Kobayashi, M. (2008) Unique photosystems in *Acaryochloris marina*, *Photosynth. Res.* 98, 141-149.
3. Manning, W. M., and Strain, H. H. (1943) Chlorophyll *d*, a green pigment of the red algae, *J. Biol. Chem.* 151, 1-19.
4. Holt, A. S., and Morley, H. V. (1959) A proposed structure for Chlorophyll *d*, *Can. J. Chem.* 37, 507-514.
5. Holt, A. S. (1961) Further evidence of the relation between 2-desvinyl-2-formyl-chlorophyll *a* and chlorophyll *d*, *Can. J. Botany.* 39, 327-331.
6. Koizumi, H., Itoh, Y., Hosoda, S., Akiyama, M., Hoshino, T., Shiraiwa, Y., Kobayashi, M. (2005) Serendipitous discovery of Chl *d* formation from Chl *a* with papain, *Sci. Tech. Advanced Material* 6, 551-557.
7. Okada, N., Itoh, S., Nakazato, M., Miyashita, H., Ohashi, S., and Kobayashi, M. (2009) Effective hydrolysis of chlorophyll *a* to yield chlorophyllide *a* by papain in aqueous acetone, *Curr. Topics in Plant Biol.* 10, 47-52.
8. Kobayashi, M., Watanabe, S., Gotoh, T., Koizumi, H., Itoh, Y., Akiyama, M., Shiraiwa, Y., Tsuchiya, T., Miyashita, H., Mimuro, M., Yamashita, T., and Watanabe, T. (2005) Minor but key chlorophylls in Photosystem II, *Photosynth. Res.* 84, 201-207.
9. Furukawa, H., Aoki, K., Itoh, S., Abe, Y., Nakazato, M., Iwamoto, K., Shiraiwa, Y., Miyashita, H., Okuda, M., and Kobayashi, M. (2011) Conversion of Chl *a* into Chl *d* by peroxidase, *Proc. 15th Int. Congress Photosynth. Beijing* in press.
10. Aoki, K., Itoh, S., Furukawa, H., Nakazato, M., Iwamoto, K., Shiraiwa, Y., Miyashita, H., Okuda, M., and Kobayashi, M. (2011) Nonenzymatic formation of Chl *d* from Chl *a* with hydrogen peroxide, *Proc. 15th Int. Congress Photosynth. Beijing* in press.

Conversion of Chl *a* into Chl *d* catalyzed by extract of vegetables

Shingo Itoh¹, Keisuke Aoki¹, Koichi Fujita¹, Hideaki Miyashita², and Masami Kobayashi^{1,*}

¹Institute of Materials Science, University of Tsukuba

²Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University