花色発現をつかさどるポリフェノールオキシダーゼの酵素科学

Polyphenol oxidases involved in flower coloration

東北大学大学院工学研究科

中山 亨 Toru NAKAYAMA

Key words: polyphenol oxidase; flower coloration; aurone; betacyanin; *Antirrhinum majus*; *Portulaca grandiflora*

はじめに

切ったリンゴや傷んだバナナを空气中に放置するとそれらはやがて褐変する。この褐変現象はポリフェノールオキシダーゼ (PPO) という酵素がつかさどっている。PPO はフェノールやカテコール (ポリフェノール化合物) の *o*-キノンへの酸化反応 (図 1) を触媒する type 3 型の二核銅タンパク質で、植物ばかりでなく微生物や動物にも幅広く存在する。

PPO の生物学的役割は動物においてはよく理解されている。哺乳動物において本酵素はメラニン色素の生成に関与し、その欠損は眼・皮膚白皮症をもたらす。軟体動物であるタコではスミ (sepia) の生成に関与し、また昆虫においては外殻の硬化に重要な役割を果たしている¹⁾。一方、植物 PPO の生物学的役割には未解明の点が多い²⁾。植物の二次代謝産物にはポリフェノール構造を有するものが多数存在するが、一般に PPO 反応の生成物は重合して高分子化するため、低分子二次代謝化合物の生合成にはこの酵素は関与しないとされてきた。また、これまでに知られている植物 PPO は例外なく細胞中のプラスチド (葉緑体) に存在するが、その基質は通常は液胞にあって酵素とは空間的に分離して存在しているため、細胞が破壊されない正常

な条件下でのこの酵素の生理的意義はよくわかっていなかった。しかしながら最近になって、花色の発現という明確な生物学的役割をもつ PPO が見いだされ、こうした状況は一変した。このミニレビューでは、黄色キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) や赤色ポーチュラカ (*Portulaca grandiflora*) で確認されているそのような PPO の実例を紹介する。

1. キンギョソウの花色発現をつかさどる PPO—オーレウシジン合成酵素

オーロン [aurone, 図 2(A)] は、ダリア、コスモス、キンギョソウなどの花の鮮やかな黄色の原因となる植物フラボノイド化合物の一群である。黄色キンギョソウ花弁に含まれるオーロンの主成分はオーレウシジン (図 2B, 2) のグルコース配糖体である。遺伝子工学による花色調節の中でも黄色系の調節は比較的難しいとされているが、オーロンの生合成をつかさどる酵素遺伝子が明らかになればこうした黄色系の花色調節に有用であることが予想され、以前から注目されていた。

オーロンが発見された 1950 年代から、オーロンの直接の前駆体は、フラボノイド化合物の生合成における共通の中間体であるテトラヒドロキシカルコン (THC; 図 2B, 1) であるとされ⁴⁾、またペルオキシダーゼが関与する生合成経路 (図 2B, 経路 II) が別の植物種について提案されていた⁵⁾。筆者らはオーロンの生合成経路を確立するため、黄色キンギョソウ花弁の抽出液を用いて THC からオーレウシジンへの代謝を検討した。この代謝には、オーロン骨格への酸化的閉環と右側のベンゼン環 (B 環) の水酸化という二つの化学的変換が必要であるが、これらの活性は互いに分離不可能なため経路 II では説明がつかず、単一の酵素が両方の活性を担っている可能性 (経路 I) が強く示唆された⁶⁾。そこで、この新規な反応を触媒する酵素の黄色キンギョソウ花弁からの単離を試みた。この酵素は予想外に微量かつ不安定でその単離精製は困難を極めたが、十分な量の出発材料を確保し、また精製に種々の工夫を凝らし

図 1 PPO 反応
二つのタイプの活性が知られており、異なる酵素番号がつけられている。(1) tyrosinase 活性 (EC 1.14.18.1), (2) catecholase 活性 (EC 1.10.3.1).

図 2 オーロンの一般構造 (A) と生合成経路 (B)

経路 I は黄色キンギョソウにおけるオーレウシジンの生合成反応として解明されたもの^{6)~8)}であり、経路 II は他の植物について従来推定された経路⁹⁾である。ベンゼン環の中に記した A と B は、それぞれフラボノイド構造の A 環と B 環を表す。位置番号の付け方はカルコンとオーロンとで異なる。1, THC; 2, オーレウシジン; 3, 2-hydroxybenzylcoumaranone 中間体。

図 3 近隣結合法により構築した植物 PPO ファミリーの進化系統樹

Genbank データベースの配列番号を植物名とともに示した。AmAS1, キンギョソウのオーレウシジン合成酵素前駆体。

た結果、酵素純品を取得することができた⁷⁾。

オーレウシジン合成酵素と命名されたこの新規酵素は 39 kDa の単量体の糖タンパク質で、銅を含んでいた。基質ならびに生成物特異性の詳細な解析により、カルコンがこの酵素の基質となるためには B 環の 4 位に必ず水酸基がなければならず、オーロンの生成に際して B 環の 3 位

の水酸化を必ず伴うことがわかった。さらにこの B 環の水酸化反応は、オーロン骨格の形成に先行して起こることも明らかになった⁸⁾。

一方、キンギョソウの黄色の花色素発現をつかさどる遺伝子を特定するため、オーロンを蓄積する花卉に特異的に発現している遺伝子がサブトラクション法により検索され

た。その結果選別された遺伝子の一つ (*AmASI*) の推定アミノ酸配列が、精製標品を用いて決定した部分アミノ酸配列と完全に一致した⁷⁾。しかも花の分化に伴うこの遺伝子の発現の経時変化は、アントシアニン色素生成遺伝子群の場合と同様なパターンを示し、この遺伝子の黄色の花色素発現における役割が裏づけられた⁷⁾。*AmASI* 遺伝子の全塩基配列が決定された結果、意外なことに *AmASI* 遺伝子は植物 PPO のホモログであることが判明した。*AmASI*

図4 オーレウシジン合成酵素による THC からオーレウシジンの推定生成機構⁸⁾
四角で囲んだ反応が PPO により触媒される。

は、系統的にはリンゴやパイナップルの PPO と最も近縁であり (図3), それらのアミノ酸配列との同一性は50%以上に達した。

オーレウシジン合成酵素の精製標品には、PPO のアッセイに用いられる各種のフェノール化合物 (図1; チロシンや3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンなど) に対する活性がほとんど検出されず、このことは PPO との類似性を考えると一見奇妙に思われた⁸⁾。しかしながら、オーレウシジン合成酵素と一次構造上の類似性がほとんどないアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の PPO を THC と反応させた場合にもオーレウシジンが生成することが判明し、カルコンからオーロンへの変換が PPO 反応の延長線上で理解しうることが示され (図4)^{7), 8)}、上に述べたこの酵素反応の特徴もこの推定機構により合理的に説明することができた⁸⁾。これらの結果から、オーレウシジン合成酵素は、カルコンに極めて高い特異性を示し、黄色キンギョソウにおいて花色発現 (オーロン合成) という明確な生物学的役割を担う PPO ホモログであると結論された。

オーレウシジン合成酵素の発見により、オーロンの生合成経路が明らかになっただけでなく、植物 PPO ファミリーの中に「花色発現」という明確な生物学的機能を担うメンバーが存在することが明らかになった。この酵素のキンギョソウ花弁細胞内での局在性を明らかにすることが今後の課題である。また本酵素遺伝子が、代謝工学的手法による新しい黄色花卉品種の創出の有力なツールとなることが期待されている。

2. 赤色ポーチュラカの花色素発現

ポーチュラカはマツバボタンに近縁で、赤、ピンク、黄色などの多彩な花をつける観賞用花卉である。赤色ポーチュラカの花色素の主成分はベタシアニン (betacyanin, 図

図5 ポーチュラカにおける L-チロシンからのベタシアニンの推定生合成経路¹⁰⁾
星印を付した反応が PPO により触媒される。

5) と呼ばれる非フラボノイド系含窒素化合物である^{9), 10)}. ベタシアニン⁹⁾は, PPO と dopa 4,5-dioxygenase の作用によりアミノ酸 L-チロシンから生合成されと考えられており (図 5), 実際, ベタシアニンを蓄積するポーチュラカのカルスから L-チロシン特異的 PPO が部分精製され, その性質が調べられている¹⁰⁾. また, ベタシアニンを蓄積する他の植物においても, ベタシアニンの蓄積の高い組織では PPO 遺伝子の転写量が高いことが観察されている.

3. おわりに

植物二次代謝には酵素科学的に興味深い反応や現象が多数存在する. しかしながら植物二次代謝関連酵素の多くは微量かつ不安定で, 単離精製が困難とされ, その詳細が明らかでないものが多く, 花色の発現や調節にかかわる酵素群もその例外ではない. 今後, 酵素タンパク質の単離精製技術や他の各種の解析手段のさらなる進展に伴って, 植物二次代謝は, 生命から学ぶことのできる新しい酵素学的知見の宝庫となるであろう.

- 1) C. Gerdemann, C. Eicken, and B. Krebs: *Acc. Chem. Res.*, **35**, 183-191 (2002).
- 2) K. C. Vaughn, A. R. Lax, and S. O. Duke: *Physiol. Plant.*, **72**, 659 (1988).
- 3) E. C. Bate-Smith and T. A. Geissman: *Nature*, **167**, 688 (1951).
- 4) M. Shimokoriyama and S. Hattori: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2277 (1953).
- 5) W. G. Rathmell and D. S. Bendall: *Biochem. J.*, **127**, 125-132 (1972).
- 6) T. Sato, T. Nakayama, S. Kikuchi, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, T. Ueda, T. Nishino, Y. Tanaka, and T. Kusumi: *Plant Sci.*, **160**, 229-236 (2001).
- 7) T. Nakayama, K. Yonekura-Sakakibara, T. Sato, S. Kikuchi, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, T. Ueda, M. Nakao, Y. Tanaka, T. Kusumi, and T. Nishino: *Science*, **290**, 1163-1166 (2000).
- 8) T. Nakayama, T. Sato, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, H. Hayashi, Y. Tanaka, T. Kusumi, and T. Nishino: *FEBS Lett.*, **499**, 107-111 (2001).
- 9) T. Adachi and M. Nakatsukasa: *Z. Pflanzenphysiol.*, **109**, 155-162 (1983).
- 10) U. Steiner, W. Schliemann, H. Böhm, and D. Strack: *Planta*, **208**, 114-124 (1999).