総 説

ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御
—最新の研究動向—

村田容常*・本間清一*

Recent Progress in Polyphenol Oxidase and Control of
Enzymatic Browning

Masatsune MURATA* and Seiichi HOMMA*

** Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University,
2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112*

ポリフェノールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) は、植物中のフェノール類を対応するキノン体に酸化する酵素で、食品の酵素的褐変の原因酵素である。その存在は古くより知られており、食品科学、食品工業上重要な酵素で多くの食品学的研究があるが、最近の生化学、分子生物学の発展と相まって本酵素に対する研究が質的に飛躍的に進歩した。ここでは筆者らの研究をまじえ、ポリフェノールオキシダーゼと酵素的褐変、精製と性状、免疫化学的分析、クローニングと構造、酸化の機構、褐変制御とポリフェノールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼの植物生理学的意義の7項目について概説する。植物ポリフェノールオキシダーゼの総説としては、MAYER¹⁾やMAYERとHAREL²⁾の優れた総説があり、また最近の分子生物学的研究の動向についてはMARTINEZとWHITAKER³⁾が概説している。成書としては、WONGが著したFood Enzymesの一章をWHITAKERがポリフェノールオキシダーゼについて記している⁴⁾。これらも参照して頂きたい。

1. ポリフェノールオキシダーゼと酵素的褐変

ポリフェノールオキシダーゼは、1856年にSHOENBEINによりマッシュルーム中に初めて発見された酸化酵素で、植物界に普遍的に存在し、フェノール類をそのキノン体に酸化し、野菜や果物の褐変を引き起こす

酵素として知られている。広義には、モノフェノールモノオキシダーゼ (EC 1.14.18.1)、ジフェノールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1)、ラッカーゼ (*p*-ジフェノールオキシゲンオキシドレダクターゼ, EC 1.10.3.2)を示すが、モノフェノールモノオキシダーゼ (チロシナーゼ、クレゾラーゼ)、ジフェノールオキシダーゼ (カテコールオキシダーゼ、ジフェノールオキシゲンオキシドレダクターゼ、カテコラーゼ)を合わせてポリフェノールオキシダーゼと呼ぶことが多い。これは、モノフェノールモノオキシダーゼとジフェノールオキシダーゼの二つの活性を同一の酵素が示すことがあるためである。動物や昆虫のいわゆるチロシナーゼは、このタイプであるが、高等植物では、モノフェノールモノオキシダーゼ活性をあまり有さず主にジフェノールオキシダーゼを示すことより、ここでは、主にジフェノールオキシダーゼをポリフェノールオキシダーゼとする。

ポリフェノールオキシダーゼは、植物細胞中において、光合成組織では葉緑体に、非光合成組織ではプラスチドに局在していると考えられている⁵⁾。ポリフェノールオキシダーゼの細胞内局在性は、超遠心による細胞分画法⁶⁾、酵素反応により褐変色素が形成されることを利用し、細胞内の色素を検鏡する方法^{7)~10)}、抗ポリフェノールオキシダーゼ抗体を用い、免疫化学的に検鏡する方法^{11)~14)}等で調べられたが、いずれも葉緑体及びプラ

* お茶の水女子大学生活科学部 (〒112 東京都文京区大塚 2-1-1)

スチドに存在することが示されている。成熟・老化した植物体では可溶性画分にポリフェノールオキシダーゼ活性が認められるが、これは葉緑体もしくはプラスチドから酵素が可溶化した結果であると考えられる。例えば、リンゴ果肉は非光合成組織であり、転写翻訳されたポリフェノールオキシダーゼタンパク質（前駆体）は、シグナルペプチドを持ち、プラスチドへ輸送され、シグナルペプチドがはずれる（成熟体）。果実の成熟に伴い、一部のポリフェノールオキシダーゼは可溶化、分解する^{13)~15)}。一方、基質であるポリフェノール類は液胞に存在しており、通常の生理的条件下ではポリフェノールオキシダーゼによる反応は起こらない。しかし、植物が成熟老化してその細胞の構造がこわれるか、また老化なくてもヒトや動物が食べるために植物を切る、つぶす、害虫が進入するといった物理的傷害を受けると、液胞に存在するポリフェノール類と酵素が接触することになる。その結果、酵素反応が起こり、無色のポリフェノールが黄色のキノン体になる。このキノン体は反応性が高く、自身で重合したりアミノ酸やタンパク質と反応して褐変すると考えられている。このポリフェノールオキシダーゼによる褐変反応（酵素的褐変）は、ほとんどの植物で起こるため、植物性食品の品質に大きく関わっている。特にリンゴやバナナなどの果物、レタスやキャベツなどの野菜、イモ類の褐変は商品価値を下げるものと認識されており、その制御が食品加工保蔵上重要なテーマの一つとなる。一方、紅茶やココアの製造過程においてはポリフェノールの酸化の結果生ずる色素が食品の品質上、望ましいと認識され、製造上必要な反応となっている。

2. ポリフェノールオキシダーゼの精製と性状

食品学上重要な酵素であるにも関わらず比較的近年になるまで、ジャガイモ¹⁶⁾¹⁷⁾以外の植物から単一のタンパク質として精製されていなかった²⁾。多くの生化学的情報（Km値、至適pH、分子量、アミノ酸組成、阻害剤に対する感受性など）は、粗酵素で求められていたり、*Neurospora*¹⁸⁾やマッシュルーム¹⁹⁾からの精製酵素の情報に基づいていた。これは、本酵素が膜酵素であること、ポリフェノール類による阻害を受けることなどが原因であったが、可溶化剤や還元剤、ポリフェノール吸着剤の使用により、1980年頃からナシ²⁰⁾²¹⁾、ブドウ²²⁾、モモ²³⁾、バナナ²⁴⁾、ハウレンソウ²⁵⁾、ソラマメ²⁶⁾²⁷⁾、アーティチョーク（チョウセンアザミ）²⁸⁾、ベルベットピーン（ハッシュウマメ）²⁹⁾、ニホンナシ³⁰⁾、ニンジン³¹⁾、野生ジャガイモ³²⁾の精製ポリフェノールオキシダーゼが、単

一のタンパク質として報告され、植物の精製酵素の性状が明らかとなってきた。我々は、1990年当時酵素的褐変が広く知られておりかつその制御が食品工業上重要であるにも関わらず、リンゴのポリフェノールオキシダーゼが単一のタンパク質として単離されないことに驚き、まず単離を試みた。HARELらの1960年代の優れた先行研究³³⁾³⁴⁾を参考にし、リンゴ果肉40kgを出発材料としアスコルビン酸の存在下粗プラスチド画分を調製後、酵素をTritonで可溶化し、各種クロマトグラフィーにより単一のタンパク質7mgを得た³⁵⁾。粗抽出液と精製酵素を同時にPAGEで分析後、ゲルをクロロゲン酸、カテキンなどのポリフェノールで処理すると、主に本酵素の存在する場所が褐変し、本酵素がリンゴ果肉の褐変に関与する主酵素であることを証明している。本酵素は、SDS-PAGE上単一のバンドを示し、分子量は約65kDaであった。ゲルろ過クロマトグラフィーとの比較により単量体であった。マッシュルームのポリフェノールオキシダーゼ（4量体、128kDa）と異なり、植物から精製された酵素は、いずれも単量体で活性を示す。至適pHは4、安定なpHは6-8付近であり、液胞すなわち果肉のpHが4付近であるので、傷害を受けて至適条件で反応が開始し、その後失活する。基質特異性は褐変反応の重要な要因となるが、精製酵素ではクロロゲン酸に対するKm値が120μMで、最も親和性の高いフェノールであった。リンゴ成熟果実中には、クロロゲン酸が約20mg/100g存在し、フェノール中最大量を示す³⁶⁾ことと対応している。多くの植物ポリフェノールオキシダーゼのKm値が1mM程度であることを考えると、この100μMという値はかなり小さく、リンゴ酵素に対してクロロゲン酸が非常によい基質であることがわかる。コヒー酸、カテキン類、ピロカテコールなどに対する反応性は10分の1程度であり、また、クマール酸やヒドロキノンを全く酸化せずモノオキシゲナーゼ（チロシナーゼ）活性は認められなかった。基質濃度を上げていくと酵素活性が失われ、基質阻害が観察され、170μM以上では活性がほとんど認められなかった。ポリフェノールオキシダーゼは、後に述べるように銅酵素であり、1モルあたり2分子の銅を含んでいる。o-フェナンスロリン、アジ化ナトリウム、フッ化ナトリウム、ジエチルジチオカルバメートにより活性が著しく阻害されたことは銅の配位とチオール基が活性に重要であることを示している。

3. ポリフェノールオキシダーゼの免疫化学的分析

特異抗体を用いた免疫化学的分析は、極めて感度が高

く、特異的であり、精製せず迅速簡便な測定が可能で、必要な機器も安価であり、酵素などの高分子はもちろんハプテンとなる低分子の分析にも非常に便利である。また、エンザイムイムノアッセイの普及により、高感度であるにも関わらず放射性同位体を用いる必要がなくなったことも大きな利点である。例えば、同一のポリフェノールオキシダーゼが品種ごとに存在するか否かを調べる、ポリフェノールオキシダーゼの（活性でなく）量を調べる、酵素の前駆体や分解産物を調べる、酵素の局在性を免疫化学的に検出するといった研究には、特異抗体を用いた免疫化学的分析は必須となる。しかし、ポリフェノールオキシダーゼの分析に特異抗体を用いた例は最近までほとんどなかった。

FLURKEY³⁷⁾ や LANKER ら³⁸⁾ が、ソラマメよりポリフェノールオキシダーゼを精製し、ポリクローナル及びモノクローナルの抗ポリフェノールオキシダーゼ抗体を作成した。作成したポリクローナル抗体は、ソラマメ、マングビーン、エンドウ豆、ダイズのポリフェノールオキシダーゼを認識した。変性させない条件下で各種豆類の粗抽出物を SDS-PAGE で分離した後、この抗体を用いウエスタンブロッティング分析したところ、活性型と非活性型の二つの型の酵素を検出した。また、完全変性条件下でホウレンソウ、タバコ、トマト、レタス及び豆類を SDS-PAGE を行った後、ウエスタンブロッティング分析したところ、分子量が 60-63 kDa, 43-45 kDa, 34-36 kDa の 3 種のバンドを認めた。60-63 kDa のバンドは、濃い薄いはあるがいずれの抽出物にも検出されたことより、植物ポリフェノールオキシダーゼはほぼ分子量が同じタンパク質として合成された後、プロテアーゼの作用を受け断片化が起こると考察している。

筆者らは抗リンゴポリフェノールオキシダーゼ抗体をマウスで作成し、リンゴポリフェノールオキシダーゼの分析に利用している^{39) 40)}。抗血清作成にあたっては、通常使用するウサギなどの比較的大きな動物でなく、動物実験に不慣れな者でも比較的扱いやすいマウスを用いた。得られる血清の量がマウスでは少なく問題となるが、最終のブスター（追加免疫）後、Ehrlich の腹水ガン細胞を接種することで多量の腹水（抗血清と同等）を得ることができた。作成した抗体を二重拡散法（Ouchterlony 法）⁴¹⁾ で分析したところ、精製酵素及び粗抽出物いずれも沈降線を形成し、その 2 本の線は融合した。このことは、本抗血清は精製酵素に特異的であり、かつ精製酵素と同一の抗原以外を認識する抗体は存在しないことを示している。また、この沈降線をクロゲン

酸、カテキンなどのポリフェノールで処理すると褐変し、本酵素が褐変に関与することも確認できた³⁹⁾。

様々なリンゴ品種に同じポリフェノールオキシダーゼが存在するかどうかを通常の生化学的分析法と比較するのはなかなか困難であるが、ウエスタンブロッティング分析を用いればたやすい。ふじ、紅玉、陸奥、ジョナゴールドの粗抽出物をウエスタンブロッティング分析したところ、いずれもふじの精製酵素と同じ 65 kDa の位置に単一のバンドが検出された。これより、リンゴでは品種の違いに関わらず同一のポリフェノールオキシダーゼが褐変に関与していることがわかる。本抗体はレタス、ナス、ソラマメのポリフェノールオキシダーゼを認識せず、リンゴと分類学上近縁のニホンナシとわずかに交差性を示し、リンゴポリフェノールオキシダーゼに特異的であった³⁹⁾。

リンゴ果肉のどこに本酵素が局在しているかも抗体を使えばわかる。1990 年頃に組織プリント法⁴²⁾ という免疫化学を利用したタンパク質の組織局在性を調べる簡便な方法が植物生理学分野で利用された。リンゴの断面をニトロセルロース膜に押しつけるとタンパク質が膜に転写される。この膜上のポリフェノールオキシダーゼを免疫化学的に検出、すなわち抗ポリフェノールオキシダーゼ抗体で処理後パーオキシダーゼなどの酵素が結合した 2 次抗体で処理し酵素の発色基質（発色後沈殿する基質）を反応させると、ポリフェノールオキシダーゼの存在した部位が着色しその局在性が簡単にわかる。その結果ポリフェノールオキシダーゼは主に芯のまわりに局在し、果皮の下に少々存在し果肉の中心にはあまり存在しないことがわかった。これは、リンゴを切っておくと芯のまわりが一番褐変することによく対応する（図 1）³⁹⁾。

植物の成熟に伴うポリフェノールオキシダーゼの変化を、酵素活性の変化以外で詳細に調べた例はなかったためリンゴ果実が成熟するに伴いポリフェノールオキシダーゼと基質ポリフェノール類がどのように変化するかを調べた⁴⁰⁾。総活性は果実の生長に伴い増加したが、タンパク質当たりの比活性は減少した。未熟果の比活性は成熟果の数倍高く、ウエスタンブロッティング分析では、成熟に伴い新たなアイソザイムは出現しなかった。また、未熟果で組織分布を調べると成熟果と異なり一様に酵素が存在しており、褐変も一様に起こった（図 1）。ELISA 法でポリフェノールオキシダーゼ量を測り酵素量当たりの活性を調べたところ、開花後 4.5 カ月以降量は減少せずに比活性が下がることより、酵素の失活が細

図1 ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) の組織内分布と褐変

胞内で起こっていることが判明した。未熟な果実は高い活性を保ちかつポリフェノール類も多いことは、酵素的褐変により病害虫の進入を防いでいると考えられる。成熟果で低い活性を示しポリフェノール類も減ることは、成熟果の果肉がトリなどに食べられやすくなり、種子が伝播しやすくなるということで、これらの変化は、植物側からは合理的であると考えられる。

FRIGNIER らは⁴³⁾, *Prunus* (ナシ, アズキ, サクラソバなど) の, MARQUES らは⁴⁴⁾, リンゴのポリフェノールオキシダーゼを, それぞれウエスタンブロッティング分析し, ポリフェノールオキシダーゼのプロテアーゼ分解の様子を調べている。

SHAHAR らは¹²⁾, トマトの花のポリフェノールオキシダーゼを免疫組織化学的に調べ, 花の生長と発現の関係を示し, THIPYAPONG らは⁴⁵⁾, トマトの茎, 葉, 果実の特異的異形細胞にポリフェノールオキシダーゼが蓄積されることを免疫金染色により示している。

4. ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子のクローニングと構造

1990年代に入り植物ポリフェノールオキシダーゼの遺伝子が続々とクローニングされ始めた。ポリフェノールオキシダーゼをコードする cDNA は, トマト¹²⁾, ジャガイモ⁴⁶⁾, ソラマメ⁴⁷⁾, ブドウ⁴⁸⁾, ホウレンソウ⁴⁹⁾, ヨウシュヤマゴボウ⁵⁰⁾, リンゴ⁵¹⁾ からクローニングされており, その大きさは 1.8-2.0 kb である。ゲノム DNA は, トマト⁵²⁾ とリンゴ⁵³⁾ からのみクローニングされている。リンゴは, 我が方がクローニングしたものであるが, Boss らが 1995 年にクローニングした cDNA⁵¹⁾ に基づき, ふじの DNA から PCR 法により得たものである。ゲノム DNA と cDNA を比べるとトマト, リンゴいずれもイン

トロンがなく, 植物ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子にはイントロンはないと考えられる。また, ブドウにおいてもイントロンがないことが示されている⁴⁸⁾。

クローニングされた塩基配列がコードするペプチドを比較すると相同性が認められる。例えば, リンゴ (ふじ) のポリフェノールオキシダーゼ遺伝子 PPO 7 と他の遺伝子の相同性は, 95.4% (リンゴ APO)⁵¹⁾, 55.7% (ソラマメ)⁴⁷⁾, 55.2% (ヨウシュヤマゴボウ)⁵⁰⁾, 55.1% (ブドウ)⁴⁸⁾, 46.0% (ジャガイモ)⁴⁶⁾ と高い。また, ポリフェノールオキシダーゼの活性中心 (銅結合領域) と考えられる二つの領域 (Cu A 及び Cu B) は, 特に似通っている (図 2)。疎水的な Cu A 領域の 2 個のヒスチジン (リンゴでは, 196 と 205), グルタミン酸に富んだ Cu B 領域の 3 個のヒスチジン (リンゴでは, 196, 331, 361) が特に重要で, 銅結合部位と考えられている。Cu A 領域の相同性を比べると, 94.6% (リンゴ APO), 83.8% (ヨウシュヤマゴボウ), 80.6% (ソラマメ), 78.4% (ジャガイモ), 73.0% (ブドウ), Cu B の相同性を比べると 98.1% (リンゴ APO), 79.6% (ソラマメ), 72.2% (ブドウ), 68.5% (ヨウシュヤマゴボウ), 67.3% (ジャガイモ) となり, いずれも著しい相同性が認められた。

ポリフェノールオキシダーゼは, 葉緑体もしくはプラ

図2 ポリフェノールオキシダーゼの活性中心のアミノ酸配列

ドットは Cu^{2+} -結合ヒスチジンを, アステリクスは 12 の配列において保存されているアミノ酸を示す。番号 1 は, DNA 配列より決定した前駆体ポリフェノールオキシダーゼの N 末端メチオン残基を示す。PPO3, PPO7, APO (リンゴ), POT (ジャガイモ), tomE (トマト), GP01 (ブドウ), BEAN A1 (ソラマメ), PAP1 (ヨウシュヤマゴボウ), tp64 (ホウレンソウ), A.b (*Agriculus bisporus*), N.c (*Neurospora crassa*)。

スチドに局在すると先に述べたが、これはN-末端のアミノ酸配列からも支持されている(図3)。ポリフェノールオキシダーゼは前駆体の形で合成され、葉緑体もしくはプラスチドにチラコイドに輸送され、プロテアーゼの作用により成熟体になる。N末端から数十個のアミノ酸(リングでは89アミノ酸, 9.6 kDa)は、葉緑体の23 kDaの酸素発生複合体(OEC)に類似した典型的なクロロプラストへのトランジットペプチドである⁵⁴⁾。SOMMERらは、トマトのポリフェノールオキシダーゼ遺伝子を*in vitro*で転写翻訳させ後、その前駆体タンパク質と葉緑体をまぜると、前駆体タンパク質が葉緑体に取り込まれプロテアーゼ分解を受け、チラコイドのルーメンへ移動することを示している⁵⁵⁾。

遺伝子から求めた成熟ポリフェノールオキシダーゼの分子量は、50-57 kDaで、タンパク質から求められた値よりやや小さい。例えばGANESAらがSDS-PAGEから求めたソラマメのポリフェノールオキシダーゼは、65及び68 kDaであり⁵⁶⁾、我々が求めたリングのポリフェノールオキシダーゼは、65 kDaであったが³⁵⁾、遺伝子からはそれぞれ56.5と57 kDaとなった。そこで、成熟型のリングポリフェノールオキシダーゼ遺伝子(57 kDa)を大腸菌を用い発現させ、遺伝子産物の分子量をリングの酵素と比較した。その結果、SDS-PAGE上同じ位置(65 kDa相当)に検出された⁵³⁾。このことは、ポリフェノールオキシダーゼの分子量は通常の電気泳動の移動度

では、正しく見積もれないことを示している。同じ植物のポリフェノールオキシダーゼの分子量がかなり異なっており報告される場合があるが、この現象がその原因を示しているかもしれない。

5. ポリフェノールオキシダーゼ酸化の機構

ポリフェノールオキシダーゼは1分子に2分子の銅を含有する銅酵素(2核銅錯体タンパク質)である。同様の銅タンパク質であるヘモシアニンの3次構造がX線結晶解析により決定されていて、銅の結合部位もわかっている⁵⁷⁾。Neurospora crassaのチロシナーゼの銅結合部位も決定されていて⁵⁸⁾、植物ポリフェノールオキシダーゼも同様であろうと想定されている。ポリフェノールオキシダーゼの活性中心は2核銅錯体を形成していて、活性部位に1分子の酸素が結合する。通常の無機銅錯体とは非常に異なっていて、銅が2価であるにもかかわらずESRシグナルが観察されず、銅原子どうしが反磁性共鳴を示している。銅原子は、Cu AとCu B領域の5分子のヒスチジン残基とあと1分子のアミノ酸と結合していると考えられている。その詳細な酸化触媒機構もヘモシアニンとの比較によりNeurospora crassaのチロシナーゼで調べられている^{59)~62)}。精製植物ポリフェノールオキシダーゼを多量に実験に供する事は現在のところ困難で、同様の機構が類推されている。提唱されている酸化機構を図4⁴⁾^{63) 64)}に示した。ポリフェノールオキシダーゼは、3つの異なった状態Met, Oxy, Deoxyで存在する。Deoxy型は、酸素の結合していない状態で、銅は1価である。Deoxy型に酸素1分子を結合すると銅は2価になりOxy型になる。このOxy型では酸素は過酸化物様になっている。Oxy型にジフェノールが反応し、酸素・ジフェノール・ポリフェノールオキシダーゼ複合体を形成する。ジフェノールはキノンに酸化され、ポリフェノールオキシダーゼは還元されMet型(銅は2価のまま)になる。生じたMet型はさらにジフェノールと反応しキノンに酸化し、自身はDeoxy(銅は1価)型に還元される。この反応サイクルを1周すると酸素1分子で2分子のジフェノールが酸化されることになる。

モノオキシゲナーゼの場合は、図4の下経路に示した様にまずOxy型の1分子の銅にモノフェノールが結合する。ベンゼン環が回転してオルソ位が第2の銅に近づき結合した酸素により水酸化され、2価の銅2分子にジフェノールが結合した中間体を生ずる。これがキノン体とDeoxy型を生じると考えられている。

ここに示した反応機構ではラジカル中間体は生じな

PP03	1	MTSLSPVIV-TTTFVFN-P-DTK--PLSP-FSQNHSQVSLTKP-----KRSLGREVC 48
PP07	1	MTSLSPVIV-TTTFVFN-P-DTK--PLSP-FSQNHSQVSLTKP-----KRSFGREVC 48
AP0	1	MTSLSPVIV-TTTFVFN-P-ATK--PLSP-FSQNHSQVSLTKP-----KRSFARRVC 48
POTF1	1	-----TTLPLCNKSLSSSFTTNSSL--SKPSQLFLH--GRNHQSFVC 43
TomE	1	MSSSSI--TTLPLCNKSLSSSFTTNSSL--SKPSQLFLH--GRNHQSFVC 51
GPO1	1	MASLPMGL--TTTAIAITNTISAFPPSP-LFQ-RASHVFPARN--RSRPFAPSKVC 52
BEAN A1	1	MTSIALFISTIVSSNKSISHSVYFPLQKHQ--SSK--LR--KPKR-Q-VTCSS 50
PAP1	1	MASLESPTSTTTSATLATHIS--NPLFKPTSPQLPG--CRNRHVNPKISCKVDK 54
tp64	1	MATLSSPTIITTTISILLNN--PFLPKTPQLSAHH--RGVSVNMGREVC 45
OEC23	1	MASTAC-----PFL-----HHAAISSPAAGRSAAQRYQAVSI 33

PP03	49	KATHNDQF---DQAQ-----SKLDRRHVLLGLGLYQVAGH--VTDPRGFG 89
PP07	49	KOTNDEI---DQAQ-----SNLEARNVLLGLGLYQVAGH--DTDPGRHG 89
AP0	49	KATHNDQH---DQAQ-----SKLDRRHVLLGLGLYQVAGH--GTDPFAPA 89
POTF1	45	HANNVGEH-DK-----NLDVDRRHVLLGLGLYQVAGH-L-AP--LASA 83
TomE	52	NA-BMV-----NPDVDRRHVLLGLGLYQVAGH-L-AP--LATA 87
GPO1	53	NSANGDPHSDSTSDVRETS-----SGKLDNRHVLLGLGLYGAAGLGATKPLAFG 103
BEAN A1	51	NHNGNPKKE--QEL-----SNVIGRRHVLLGLGLYQVTLA----TNPSALA 92
PAP1	55	DELYTKTTDDGHTN-----KLDNRHVLGLGLYQVAGTTLGGG-PATLA 98
tp64	46	QTKRHHNGHNNQFQLQNPNTPTPYLLDRRHVLLGLGLYGAAGLGATKPLA 101
OEC23	34	KP-HQIVCKAQKQDDNANVLL--NSGVSRRLALTVLIG--AAVGSFVSP---ADA 82

図3 ポリフェノールオキシダーゼのクロロフィルへのトランジットペプチドのアミノ酸配列
影の部分は類似のアミノ酸を、アステリスクは同一のアミノ酸を示す。チラコイドのルーメンへの輸送を示す部分を下線で示す。植物の記号は図2と同じ。

図4 ポリフェノールのポリフェノールオキシダーゼによる酸化機構

い。一方、ポリフェノールオキシダーゼでは不可逆的阻害が生ずることが観察されている。これは、フリーラジカルによるヒスチジン残基の破壊と銅の遊離によるものだと考えられている。セミキノラジカルは瞬時にキノンになるため検出は困難であったが、スピン共鳴安定ESRにより反応液中にフリーラジカルが検出された⁶⁵⁾。生成したキノンとジフェノールからセミキノンが生ずると推測される。

6. 褐変制御とポリフェノールオキシダーゼ

ポリフェノールオキシダーゼ活性の制御すなわち酵素的褐変の制御は、食品加工・貯蔵上重要な課題である。酵素的褐変に関与する要因は、活性なポリフェノールオキシダーゼの濃度、基質ポリフェノールの種類と濃度、pH、温度、酸素、還元剤の濃度などが考えられる。ポリフェノールオキシダーゼは60-70℃程度で失活するが、食品の性質上加熱が望ましくない場合もあり、また加熱中に反応が進行することもある。pHと酸素を制御することも重要である。果汁やスライスした果物や野菜をクエン酸、リンゴ酸などでpH4以下にすると褐変を防止できる。これはポリフェノールオキシダーゼの活性中心の銅が除かれるためである。リンゴを塩水につけると褐変しないが、これはClイオンが銅に配位し、酵素活性を抑えるためである。ポリフェノールオキシダーゼの反応は酸素がなければ進行しない。機械的損傷を防止する、液体につける、果汁充填に窒素置換をするなど酸素との接触をさけることは重要である。還元剤を使用すること

表1 酵素的褐変の阻害剤

阻害剤のタイプ	例
還元剤	アスコルビン酸, SO_2 , ピロ亜硫酸ナトリウム
キノンカップラー	L-システイン, グルタチオン
銅キレート剤	NaCl, EDTA, トロポロン, CO, ジエチルジチオカーバメート
基質アナログ	シナム酸, p-クマール酸, フェラ酸
その他	PVP, 4-ヘキシルレゾルシノール, コージ酸

でも変色は防止できる。これは、生成したキノンを還元する、キノンと付加物を作る、直接酵素を不活化するためと考えられている。表1にPPOもしくは酵素的褐変の阻害剤を示した⁶⁶⁾。二酸化硫黄や亜硫酸塩はその還元作用により古くから褐変防止に使用されてきたが、その使用に対しては健康上の問題が指摘されており、それに変わる褐変防止剤の開発が求められている⁶⁷⁾。一般的にはアスコルビン酸が最良の代替品であろうと思われ、褐変防止のためにリンゴのスライスをアスコルビン酸(10 g/l)とクエン酸(2 g/l)の混液に5分間つける⁶⁸⁾、ジャガイモをアスコルビン酸(25 g/l)、クエン酸(10 g/l)、ピロリン酸ナトリウム(10 g/l)、塩化カルシウム(2 g/l)、アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム(16 g/l)、アスコルビン酸トリリン酸エステルマグネシウム(15 g/l)の混液で処理する⁶⁹⁾などの例が報告されている。アスコルビン酸エステルはアスコルビン酸の安定性を増

すための誘導体で、細胞内のフォスファターゼにより分解され、徐々にアスコルビン酸になる。L-システインも有効な褐変阻害剤であり、キノンと反応しキノンと付加物を作る。アボガドやバナナをL-システイン (0.5-5 mM) で処理すると褐変が完全に阻害される⁷⁰⁾。

最近分子生物学の発展と相まって新たな褐変制御法が提案されている。先に、次々とポリフェノールオキシダーゼの遺伝子がクローニングされていることを示したが、原理的にはアンチセンス DNA や遺伝子サイレンシングといった遺伝子工学を利用すれば、ポリフェノールオキシダーゼの発現を制御できるからである。ある酵素タンパク質をコードする DNA を考えた時、転写されるべき mRNA をセンス RNA と呼び、それに対し相補的な DNA 配列を持つ RNA をアンチセンス RNA と呼ぶ。アンチセンス DNA はアンチセンス RNA をコードする DNA 断片をさす。標的の遺伝子を制限酵素で切り出し、180 度回転させ、プロモーターの下流につなぐと、元の遺伝子と裏側の配列を有した遺伝子 DNA になる。これが発現されるとセンス RNA と相補的なアンチセンス RNA が発現されることになり、RNA-RNA ハイブリッドが形成されるなどの原因で標的タンパク質の発現が抑制されることになる。食品分野では、ポリガラクトクロナーゼの発現をアンチセンス技術で抑え、ポリガラクトクロナーゼによる軟化を抑制することで貯蔵性を向上させたトマト^{71) 72)} の例が有名である。従来法による育種したトマトと実質的に同等か、主要な栄養成分や天然毒素のレベルに変化はないか、環境に対して危険はないかといった安全性も認められ⁷³⁾ て、上市されている。ポリフェノールオキシダーゼについては、1994 年に BACHEM らがそのアンチセンス DNA を組み込んだ組み換えジャガイモを作った。そのジャガイモでは、ポリフェノールオキシダーゼの活性が下がり、褐変が抑えられていた⁷⁴⁾。このような組み換え作物は、食品加工貯蔵上有利な性質を有するので今後の開発が期待される。

7. ポリフェノールオキシダーゼの植物生理学的意義

ポリフェノールオキシダーゼの正確な植物生理学的意義は不明であるが、昔から生体防御機構と関係が深いと考えられている。最近、傷害とポリフェノールオキシダーゼの発現の関係が詳細に検討されはじめ、生体防御機構との関係が強く示唆されている。

10 枚の葉をつけたジャガイモの上から 6 から 7 番目の葉を傷つけると傷つけた葉より新しい葉 (上から 1 から 3 番目) においてポリフェノールオキシダーゼの活性

が数倍上昇し、傷害のシグナルが伝達されることが示された⁷⁵⁾。システミンというペプチドが傷害や感染に対するシグナル物質として最近報告されたが^{76) 77)}、システミンを強制発現させたトランスジェニック植物では、プロテアーゼインヒビターと同時にポリフェノールオキシダーゼの発現が誘導され、その葉を破碎すると強く褐変した⁷⁸⁾。また、傷害のシグナル伝達に関与するジャスモン酸メチルによってもポリフェノールオキシダーゼの発現が誘導された⁷⁸⁾。植物が傷害を受けるとシステミンが合成され、傷害を受けたことをシステミンが標的細胞に伝達し、膜のリパーゼが活性化し、ジャスモン酸が合成される。ジャスモン酸が標的遺伝子の発現を誘導し、ポリフェノールオキシダーゼやプロテアーゼインヒビターが合成され、傷害に反応すると考えられる。

我々は、リンゴ培養細胞を用い、マッセロザイム処理することでポリフェノールオキシダーゼ活性が誘導され、またそれが新たなアイソザイムであることを示した⁷⁹⁾。果実で発現されているポリフェノールオキシダーゼのアイソザイムのみが抑制された果実ができれば、耐病性を落とすことなく貯蔵性の向上した果実ができると考えられる。

野生のジャガイモの葉には腺毛状突起という突起が存在し、そこにはポリフェノールオキシダーゼとポリフェノールが高度に濃縮して存在している。虫により破壊されるとポリフェノールオキシダーゼによる褐変反応が起こり、形成された重合物が虫の口をおおうことで摂食阻害が起こるという^{80) 81)}。

このように植物生体防御との関連が強く示されているが、一方ポリフェノールオキシダーゼが植物のチラコイド膜に普遍的に存在することから光合成との関係を指摘するグループもいる^{5) 82) 83)}。そこではポリフェノールオキシダーゼの酸素消費能に注目し、Mehler 様反応を行うとしている。光合成の光化学系 II において発生する分子状酸素をポリフェノールオキシダーゼと光化学系 I で生ずる還元型キノンが処理し、酸化型キノンとスーパーオキシドアニオンを生ずるというものであるが、定説となっていない。

以上最近のポリフェノールオキシダーゼ研究について概説したが、これらの基礎的知見に基づいた新たな褐変制御法 (ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子の発現を抑えた組み換え植物など) の開発が今後興味深い。

文 献

- 1) MAYER, A.M. : *Phytochemistry*, **26**, 11 (1987).
- 2) MAYER, A.M. and HAREL, E. : *Phytochemistry*, **18**, 193 (1979).
- 3) MARTINEZ, M.V. and WHITAKER, J.R. : *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 195 (1995).
- 4) WHITAKER, J.R. : Food enzymes. Structure and mechanism. WONG, D.W.S., (Chapman and Hall, New York), p. 271 (1995).
- 5) VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. : *Physiol. Plant.*, **60**, 106 (1984).
- 6) HENRY, E.W., DEPOORE, M.J., O'CONNOR, M.N. and DEMORROW, J.M. : *J. Submicrosc. Cytol.*, **13**, 365 (1981).
- 7) PARISH, R.W. : *Eur. J. Biochem.*, **31**, 446 (1972).
- 8) VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. : *Protoplasma*, **108**, 319 (1981).
- 9) OLAH, A.F. and MUELLER, W.C. : *Protoplasma*, **106**, 231 (1981).
- 10) SHERMAN, T.D., VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. : *Phytochemistry*, **30**, 2499 (1991).
- 11) VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. : *Physiol. Planta.*, **60**, 257 (1984).
- 12) SHAHAR, T., HENNING, N., GUTFINGER, T., HAREVEN, D. and LIFSCHITZ, E. : *Plant Cell*, **4**, 135 (1992).
- 13) MURATA, M., TSURUTANI, M., HAGIWARA, S. and HOMMA, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1495 (1997).
- 14) MURATA, M. : Recent Research Development in Agricultural and Biological Chemistry, Vol. 1, (Research Signpost, Trivandrum, India), p. 15 (1997).
- 15) MARQUES, L., FLEURIET, A. and MACHEIX, J.-J. : *Plant Physiol. Biochem.*, **33**,
- 16) PATIL, S.S. and ZUCKER, M. : *J. Boil. Chem.*, **240**, 3938 (1965).
- 17) BALASINGHAM, K. and FERDIMAND, W. : *Bochem. J.*, **118**, 15 (1970).
- 18) FLING, M., HOROWITZ, N.H. and HEINEMANN : *J. Biol. Chem.*, **238**, 2045 (1963).
- 19) DUCKWORTH, H.W. and COLEMAN, J. : *J. Biol. Chem.*, **245**, 1613 (1970).
- 20) RIVAS, N.J. and WHITAKER, J.R. : *Plant Physiol.*, **52**, 501 (1973).
- 21) WISSEMAN, K.W. and MONTGOMERY, M.W. : *Plant Physiol.*, **78**, 256 (1985).
- 22) KIDRON, M., HAREL, E. and MAYER, A.M. : *Phytochemistry*, **16**, 1050 (1977).
- 23) FLURKEY, W. and JEN, J.J. : *J. Food Biochem.*, **4**, 29 (1980).
- 24) GALEAZZI, M. A. M., SGARBIERI, V. C. and CONSTANTINIDES, S. : *J. Food Sci.*, **46**, 150 (1981).
- 25) GOLBECK, J.H. and CAMMARATA, K.V. : *Plant Physiol.*, **67**, 977 (1981).
- 26) HUTCHESON, S. W., BUCHANAN, B. B. and MONTALBINI, P. : *Plant Physiol.*, **66**, 1155 (1980).
- 27) FLURKEY, W.H. : *Plant Physiol.*, **91**, 481 (1989).
- 28) WICHES, H.J., PEETSMA, G.J., MALINGRE, T.M. and HUIZING, H.J. : *Planta*, **162**, 334 (1984).
- 29) ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G. and MURRAY, E.D. : *J. Food Biochem.*, **12**, 1 (1988).
- 30) 東野哲三・藤田修二・川崎宏隆・李 忠富 : 日食工誌, **60**, 705 (1986).
- 31) SODERHALL, I. and SODERHALL, K. : *Phytochemistry*, **28**, 1805 (1989).
- 32) KOWALSKI, S.P., EANNETTA, N.T., HIRZEL, A.T. and STEFFENS, J.C. : *Plant Physiol.*, **100**, 677 (1992).
- 33) HAREL, E., MAYER, M. and SHAIN, Y. : *Physiol. Plant.*, **17**, 921 (1964).
- 34) HAREL, E., MAYER, M. and SHAIN, Y. : *Phytochemistry*, **4**, 783 (1965).
- 35) MURATA, M., KUROKAMI, C. and HOMMA, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1705 (1992).
- 36) MURATA, M., NODA, I. and HOMMA, S. : *Nippon Shokuhinn Kagaku Kogaku*, **42**, 820 (1995).
- 37) FLURKEY, W.H. : *Plant Physiol.*, **81**, 614 (1986).
- 38) LANKER, T., FLURKEY, W.H. and HUGHES, J.P. : *Phytochemistry*, **27**, 3731 (1988).
- 39) MURATA, M., KUROKAMI, C., HOMMA, S. and MATSUHASHI, C. : *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1385 (1993).
- 40) MURATA, M., TSURUTANI, M., TOMITA, M., HOMMA, S. and KANEKO, K. : *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1115 (1995).
- 41) 松橋 直・成内秀雄・臼井美津子著, 免疫化学実験入門, (学会出版センター, 東京), p. 74 (1981).
- 42) REID, P.D., DEL CAMPILLO, E. and LEWIS, N.L. : *Plant Physiol.*, **93**, 160 (1990).
- 43) FRAIGNIER, M.-P., MARQUES, L., FLEURIET, A. and MACHEIX, J.-J. : *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2375 (1995).
- 44) MARQUES, L., FLEURIET, A. and MACHEIX, J.-J. : *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, 193 (1995).
- 45) THIPYAPONG, P., JOEL, D.M. and STEFFENS, J.C. : *Plant Physiol.*, **113**, 707 (1997).
- 46) HUNT, M.D., EANNETTA, N.T., YU, H., NEWMAN, S. M. and STEFFENS, J.C. : *Plant Mol. Biol.*, **21**, 59 (1993).
- 47) CARY, J.W., LAX, A.R. and FLURKEY, W.H. : *Plant*

- Mol. Biol.*, **20**, 245 (1992).
- 48) DRY, I.B. and ROBINSON, S.P. : *Plant Mol. Biol.*, **26**, 495 (1994).
- 49) HIND, G., MARSHAK, D.R. and COUGHLAN, S.J. : *Biochemistry*, **34**, 8157 (1995).
- 50) JOY IV, R.W., SUGIYAMA, M., FUKUDA, H. and KOMAMINE, A., *Plant. Physiol.*, **107**, 1083 (1995).
- 51) BOSS, P.K., GARDNER, R.C., JANSSEN, B.J. and ROSS, S.P. : *Plant Mol. Biol.*, **27**, 429 (1995).
- 52) NEWMAN, S.M., EANNETTA, N.T., YU, H., PRINCE, J.P., DE VINCENT, M.C., TANKSKEY, S.D. and STEFFENS, J.C. : *Plant Mol. Biol.*, **21**, 1035 (1993).
- 53) HARUTA, M., MURATA, M., HIRAIDE, A., KADOKURA, H., YAMASAKI, M., SAKUTA, M., SHIMIZU, S. and HOMMA, S. : *Biosci., Biotech. Biochem.*, **62**, 358 (1998).
- 54) KEEGSTRA, K. and OLSEN, L. : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 471 (1989).
- 55) SOMMER, A., NE'EMAN, E., STEFFENS, J.C., MAYER, A.M. and HAREL, E. : *Plant Physiol.*, **105**, 1301 (1994).
- 56) GANESA, C., FOX, M.F. and FLURKEY, W.H. : *Plant Physiol.*, **98**, 472 (1992).
- 57) GAYKEMA, W. P.J., HOL, W.G.J., VERELJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. and BEINTEMA, J.J. : *Nature*, **309**, 23 (1984).
- 58) LERCH, K. : *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3635 (1978).
- 59) HIMMELWRIGHT, R., ECKMAN, N.C. and SOLOMON, E.I. : *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1576 (1979).
- 60) HIMMELWRIGHT, R., ECKMAN, N.C., LUBIEN, C.D., LERCH, K. and SOLOMON, E.I. : *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7339 (1980).
- 61) WILCOX, D.E., PORRAS, G., HWANG, Y.T., LERCH, K., WINKLER, M.E. and SOLOMON, E.L. : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4015 (1985).
- 62) SOLOMON, E.I. and LOWERY, M.D. : *Science*, **259**, 1575 (1993).
- 63) LERCH, K. : *Mol. Cell. Biochem.*, **52**, 125 (1983).
- 64) SOLOMON, E.I., BALDWIN, M.J. and LOWREY, M.D. : *Chem. Rev.*, **92**, 521 (1992).
- 65) KORYTOWSKI, W., SARNA, T., KALYANARAMAN, B. and SEALEY, R.C. : *Biochem. Biophys. Acta*, **924**, 383 (1987).
- 66) WALKER, J.R. : ASC symposium series 600, ed. by LEE, C.Y. and WHITAKER, J.R. (American Chemical Society, Washington DC), p. 8 (1995).
- 67) SAPERS, G.M. : *Food Technol.*, **83** (10), 75 (1993).
- 68) OIZZOCARO, F., TORREGIANI, D. and GILARDI, D. : *J. Food Proc. Preserv.*, **17**, 21 (1993).
- 69) SAPERS, G.M. and MILLER, R.L. : *J. Food Sci.*, **58**, 1076 (1993).
- 70) KAHN, V. : *J. Food Sci.*, **50**, 111 (1985).
- 71) SHEEHY, R., KRAMER, M. and HIATT, W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8805 (1985).
- 72) SHERF, B.A., BAJAR, A.M. and KOLATTUKUDY, P. E. : *Plant Physiol.*, **101**, 201 (1993).
- 73) REDENBAUGH, K., HIATT, W., MARTINEAU, B. and EMLAY, D. : *Trends in Food Science and Technology*, **5**, 101 (1994).
- 74) BACHEM, C., SPECKMANN, G., VANDERLINDE, P., VERHEGGEN, F., HUNT, M., STEFFENS, J. and ZABEAU, M. : *Bio/Technology*, **12**, 1101 (1994).
- 75) THIPYAPONG, P., HUNT, M.D. and STEFFENS, J.C. : *Phytochemistry*, **40**, 673 (1995).
- 76) PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S. and RYAN, A. : *Science*, **253**, 895 (1991).
- 77) MACGURL, B., PEARCE, G., OROZCO-CARDENAS, M. and RYAN, A. : *Science*, **255**, 1570 (1992).
- 78) CONSTABEL, C.P., BERGEY, D.R. and RYAN, C.A. : *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 407 (1995).
- 79) MURATA, M., HIRAIDE, A., HOMMA, S., SAKUTA, M., SHIMIZU, S. and KAKIUCHI, N. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1472 (1995).
- 80) GERGORY, P., TINGEY, W.M., AVI, D.A. and BOUTHYETTE, P.Y. : Green MB ed. by HEDIN, P.A. (American Chemical Society, Washington DC), p. 160 (1986).
- 81) YU, H., KOWALSKI, S.P. and STEFFENS, J.C. : *Plant Physiol.*, **100**, 1885 (1992).
- 82) VAUGHN, K.C., LAX, A.R. and DUKE, S.O. : *Physiol. Plant.*, **72**, 659 (1988).
- 83) SHERMAN, T.D., GARDEUR, T.L. and LAX, A.R. : ASC symposium series 600, ed. by LEE, C.Y. and WHITAKER, J.R. (American Chemical Society, Washington DC), p. 103 (1995).

(平成9年8月8日受理)