

《解 説》

ポリフェノールオキシダーゼと食品の酵素的褐変

木原智子

中部大学応用生物学部

はじめに

食品の品質を評価する上で、重要な項目の一つに色がある。食事を楽しむことは味や香りだけでなく、色を味わうことであり、また、色は鮮度を判別する指標としても重要である。食品の原材料となる動植物の色素は不安定な物が多く、加工や貯蔵の間に褐色に変化したり、元来の色の明度が下がり濃くなったりする。このような現象を褐変という。

食品の褐変には酵素が関与しない非酵素的褐変と、酵素が関与する酵素的褐変とがある。非酵素的褐変の代表的なものはアミノ-カルボニル反応で、この反応の発見者であるフランス人Louis C. Maillardにちなみマイヤール反応（メイラード反応）とも言う。この反応はその名が表すように、還元糖などのカルボニル基とアミノ酸やタンパク質側鎖のアミノ基が反応して起こる。ほとんどの食品がこれらの反応基質を含んでいるので、食品の加工貯蔵中にアミノ-カルボニル反応が起こりやすい。この反応により最終的にメラノイジンと呼ばれる高分子褐色色素や香気成分が形成される。醤油や味噌の茶色、パンやクッキーの焼き色と香ばしい香りなどはアミノ-カルボニル反応によってもたらされるのである。

一方、酵素的褐変は紅茶のように製造過程でその反応を積極的に利用する食品もあるが、一般には果実や生野菜の色調の劣化とオフフレーバーを引き起こし、食品加工において望ましくない現象、つまり商品価値を下げるものとして認識されている。この酵素的褐変の原因酵素として知られるのがポリフェノールオキシダーゼ（PPO）である。PPOは活性中心に銅を持ち、フェノール類をその対応するキノン体に酸化する酵素である。生成したキノン体は反応性が高く、それ自身や他のフェ

ノール類と重合したり、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。PPOによる酵素的褐変はほとんどの植物で起こるため、その制御は植物性食品の加工貯蔵上重要なテーマの一つであり、多くの食品学的研究がなされている。また、PPOは植物ばかりでなく微生物や動物にも広く存在する酵素で、その存在は古くから知られており、生化学的、分子生物学的研究も多くなされている。

本稿ではPPOの生理学的意義、活性化機構、褐変制御法などの今後期待されるテーマを中心に解説したい。

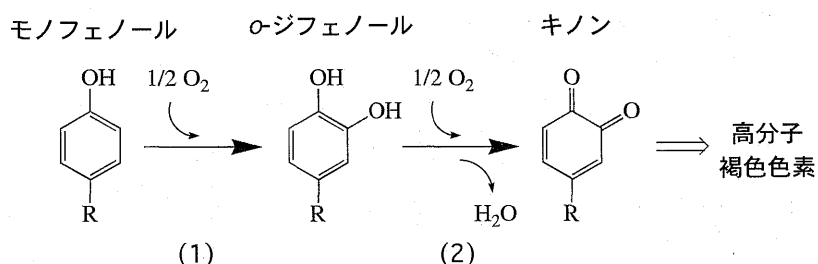
PPOの分類

PPOは広義には o -ジフェノールを o -キノンに酸化する酵素を指すが、その他の基質に対する特異性の違いからカテコールオキシダーゼ（ジフェノールオキシダーゼ、 o -ジフェノラーゼ、カテコラーゼ、EC1.10.3.1）、ラッカーゼ（ウルシオールオキシダーゼ、EC1.10.3.2）、チロシナーゼ（モノフェノールオキシダーゼ、クレゾラーゼ、EC1.14.18.1）に分類される（第1表）。ラッカーゼはモノフェノールを酸化しないことで区別されるが、カテコールオキシダーゼがチロシナーゼ様のモノフェノールモノオキシダーゼ活性を示すことがあるので、カテコールオキシダーゼとチロシナーゼを合わせてPPOと呼ぶことが多い。本稿でもそれに倣った。PPOのフェノール類の酸化経路を第1図に示した。まずPPOはモノフェノールのオルソ位を水酸化し o -ジフェノールとする（モノフェノールオキシダーゼ活性）。次に o -ジフェノールはキノンに酸化される（ジフェノールオキシダーゼ活性）。

キーワード：ポリフェノールオキシダーゼ、酵素的褐変
受 理 日：2005年3月16日受理

第1表. PPOの分類

酵素名	カテコールオキシダーゼ ジフェノールオキシダーゼ <i>o</i> -ジフェノラーゼ カテコラーゼ	ラッカーゼ ウルシオールオキシダーゼ	チロシナーゼ モノフェノールオキシダーゼ クレゾラーゼ
酵素番号	1.10.3.1	1.10.3.2	1.14.8.1
基質	<i>o</i> -ジフェノール	<i>o</i> -ジフェノール <i>p</i> -ジフェノール	<i>o</i> -ジフェノール モノフェノール



第1図. PPOによるフェノール類の酸化経路

(1)モノフェノールオキシダーゼ活性, (2)ジフェノールオキシダーゼ活性

PPOの局在性と生理学的意義

PPO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 (Vaughn and Duke, 1984). 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PPOによる反応は起こらない。しかし、植物が成熟してその細胞の構造が壊れるか、または、外からの物理的傷害を受けると、この局在性は失われ、PPOと基質が接触することになる。紅茶の製造では「揉捻」と呼ばれる工程によって茶葉の組織や細胞が破壊され、それまで茶葉中で別々に存在していたPPOと基質となるカテキン類が混合される。揉捻とそれに続いて高湿度の発酵室に数時間放置することによって、カテキン類が酸化重合して橙赤色のテアフラビンとそれがさらに重合した赤褐色のテアルビジンが形成される。

PPOの生理学的意義は哺乳動物ではメラニン色素の生成に関与し、節足動物ではクチクラの硬化や病原体や寄生虫からの生体防御機構にPPOが重要な役割を果たすことが知られている。一方、植物におけるPPOの正確な生理学的意義は未解明であるが、やはり生体防御機構との関連が古くから言われている。ジャガイモの葉表面のトリコーム (毛状突起) にはPPOとポリフェノール類が高度

に濃縮して存在しており、虫によって破壊されるとPPOによる褐変反応が起こる。形成された重合物が虫の口を覆うことで摂食阻害が起こることが確認され、実際に対昆虫防御システムとして機能することが示された (Kowalski and Steffens, 1992). さらに、PPOが傷害のシグナル物質であるジャスモン酸メチルによって誘導されたことや、病傷害誘導性ペプチドホルモンであるシステムインを強制発現させたトマトでプロテインインヒビターと同時にPPOの発現が誘導され、その葉を粉砕すると強く褐変したことが (Constabel et al., 1995) が報告されている。

また、PPOが葉緑体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連も指摘されている (Vaughn and Duke, 1984; Vaughn et al., 1988). 最近になって、花色の発現にPPOが関与することも示された。キンギョソウ花卉の黄色素の主成分オーレウシジンや、マツバボタンに近縁のポーチュカ花卉の赤色素の主成分ベタシアニンの生合成経路にPPOが含まれると推定されている (Nakayama et al., 2000; Yamamoto et al., 2002).

植物PPO遺伝子のクローニングと構造

植物PPOは1950-1970年代には30 kDaのサブユニットからなる四量体であると考えられていた。1980年代前半には45 kDaのサブユニットからなる

いることによると言われており、PPOでもC末端ドメインが同様の機能を持つと考えられている。C末端ドメインを含むPPOの結晶解析はなされていないが、Gerdemannら (2002) はミズダコのヘモシアニン (odgHC) とC末端ドメインを欠くサツマイモPPO (ibCO) の結晶構造解析をもとにibCOのC末端ドメインの立体構造を予測し、比較した。その報告によるとodgHCのC末端領域に存在するロイシン残基 (Leu2830) が活性中心の遮蔽に機能しており、ibCOのC末端ドメインにもodgHCのLeu2830に相当するロイシン残基 (Leu439) があった。C末端ドメインが切断され除かれるか、切断されないまでも立体構造の変化によって活性中心があらわになれば活性化が起こると推察している。*in vitro*での様々な試薬による活性化もこのようにして起こると考えられる。

RathjenとRobinson (1992) はSultanaという品種のブドウとSultanaの突然変異種でPPO活性の低いBruce[®] Sportを比較し、PPO活性の高いSultanaでは40 kDaのPPOを多く含むが、PPO活性の低いBruce[®] Sportでは60 kDaのPPOを多く含むことを示した。また、この60 kDaのPPOをトリプシンまたはサーモリシンで分解すると、40 kDaと20 kDaのペプチドが検出されたが、PPO活性の増加は認められなかったことから、PPOの活性化には正確な部位でのC末端の切断が必要であると考へ、Bruce[®] SportではPPOの活性化に必要な特異的なプロテアーゼが欠損しているのでは60 kDaの不活性なPPOが蓄積するのではないかと推察している。

また、桑原 (1997) はPPOには自己分解を起こしうる構造が内在し、プロテアーゼ活性を有するためにC末端の切断が起こると述べている。桑原はハウレンソウの60 kDa PPOを比較的ネイティブな状態で精製し、Ser-384とLeu-385の間で特異的に分解することを明らかにした。このPPOの予測される二次構造には2つのモジュール構造が存在するが、切断部位はちょうどそれらを結ぶところにあり、60 kDa PPOの分解がPPO活性の活性化を伴うことから、N末端側の40 kDa部分は銅結合部位を持つ触媒モジュールであり、C末端側の20 kDa部分は活性を抑制する役割を果たす調節モジュールであると推察している。これらの報告は他の研究者による検証が待たれるところである。

一方、GolbeckとCamarata (1981) はリノレ

ン酸がハウレンソウのPPOを活性化すると報告している。正常な状態ではPPOは不活性な形でチラコイド膜に結合しており、一方、基質となるフェノール類は液胞に閉じこめられている。ストレス条件下ではリパーゼの活性化により膜の脂質が加水分解して遊離脂肪酸が放出され、次にこの遊離脂肪酸によってPPOは活性化され、一方で膜の完全性が壊れたことで酵素と基質が接触するという機構が提案されている。

以上のように*in vivo*におけるPPOの活性化機構の仮説がいくつか立てられているが、いずれも直接的な証明はされておらず、PPOの生理学的意義や活性の制御を考える上で重要なテーマとなるであろう。

褐変制御とPPO

食品の酵素的褐変に関与する要因は活性なPPOの濃度、基質ポリフェノールの種類と濃度、温度、pH、酸素、阻害剤の種類と濃度などが考えられる (村田と本間, 1998)。PPO活性やポリフェノール含量は品種によって大きな差があることが知られており、PPO活性が低いか、ポリフェノール含量が少ない品種を使用したり育成する。PPO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や、加熱中に反応が進行してしまう場合もある。果汁やスライスした果実や野菜をクエン酸、リンゴ酸などでpH 4以下にするとPPO活性は減少し、褐変が抑えられる。酸素がないとPPOによる酸化反応は進行しないので、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避けることも褐変防止に重要である。阻害剤には還元剤、キノンカップラー、銅キレート剤、基質アナログなどのタイプがある。還元剤として広く用いられているのはアスコルビン酸やその異性体のエリスルビン酸である。アスコルビン酸は生成したキノンを還元するが、アスコルビン酸が酸化され尽くすと褐変が復活してしまう。アスコルビン酸エステルは安定性を増すための誘導体で、徐々に分解され、アスコルビン酸になる。L-システインも褐変防止に有効である。そのSH基は還元作用もあるが、SH基の水素は金属と置換され、チオラート (メルカプチド) を形成することから、PPO活性中心の銅と結合し、PPOが不活性化すると考えられている。また、L-システインはキノンと付加物をつ

くり褐変を阻害する。しかし、L-システインを添加した食品を長期間保存すると硫化水素を発生するなどの問題もある。リンゴを切つてすぐに食塩水に漬けると褐変が抑制されるが、これは酸素が遮断されるとともに、ハロゲン化イオン（この場合はNaClから生ずるClイオン）が活性中心の銅と複合体を形成するために阻害されると考えられている。基質アナログタイプの阻害剤としては、桂皮酸やフェルラ酸がある。

新たな褐変制御法として遺伝子工学を利用しPPO遺伝子の発現を抑制する方法が期待されている。特定の遺伝子発現を抑制する技術としてアンチセンス技術やコサプレッションがあるが、これらの技術を食品分野で利用した例としては、ポリガラクトクロナーゼの発現を抑制し、ペクチンの分解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がある。アンチセンス技術によってポリガラクトクロナーゼの発現を抑制したトマト「フレーバー・セイバー」は世界で初めて発売された遺伝子組換え作物として有名である。PPOについては、アンチセンスDNAを組み込んだジャガイモが作られた (Bachem et al., 1994)。そのジャガイモではPPO活性が下がり実際に褐変が抑制されていた。トマトPPOをジャガイモにセンス方向に組み込み、ジャガイモ塊茎のPPO活性が減少し、褐変も抑制された例もある (Coetzer et al., 2001)。オーストラリアではPPOの発現を抑制したブドウ、サトウキビ、ジャガイモ、パイナップルの圃場試験が始まっている。しかし、PPOの発現を抑制したトマトで、斑葉細菌病菌である *Pseudomonas syringae* に対して感受性が高まったという報告 (Thipyapog et al., 2004) もある。トマト (Newman et al., 1993)、ジャガイモ (Hunt et al., 1993; Thygesen et al., 1995)、ソラマメ (Cary et al., 1992)、リンゴ (Boss et al., 1995) などではPPOは多重遺伝子ファミリーを形成しており、トマトでは7つ、ジャガイモでは6つのPPOがクローニングされている。食品として利用する部位で発現しているPPOアイソザイムのみが抑制された作物ができれば、耐病性を大きく落とすことなく、加工貯蔵性の良い食品ができると考えられる。

引用文献

- Bachem, C. W. B., Speckmann, G. J., van der Linde, P. C. G., Verheggen, F. T. M., Hunt, M. D., Steffens, J. C. and Zabeau, M. 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology* 12: 1101-1105.
- Boss, P. K., Gardner, R. C., Janssen, B. -J. and Ross, G. S. 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.* 27: 429-433.
- Cary, J. W., Lax, A. R. and Flurkey, W. H. 1992. Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 20: 245-253.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J. and Tumer, N. 2001. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 49: 652-657.
- Constabel, C.P., Bergey, D. R and Ryan, C. A. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 407-411.
- Gauillard, F. and Richard-Forget, F. 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L, ca Williams): activation, purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.* 74: 49-56.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Galla, H. -J. and Krebs, B. 2002. Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure *J. Inorg. Biochem.* 89: 155-158.
- Golbeck, J. H. and Cammarata, K. V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- Hunt, M. D., Eannetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. and Steffens, J. C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21: 59-68.
- Kenten, R. H. 1957. Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves *Biochem. J.* 67: 300-307.
- King, R. S. and Flurkey, W. H. 1987. Effects of lim-

- ited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.* 41: 231-240.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. struct. biol.* 5: 1084-1090.
- Kowalski, S. P. and Steffens, J. C. 1992. Comparison of polyphenol oxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. *Plant Physiol.* 100: 1885-1890.
- Moore, B. M. and Flurkey, W. H. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 4982-4988.
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T. and Nishino, T. 2000. Aureusidin synthase: A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290: 1163-1166.
- Newman, S. M., Eannetta, N. T., Yu, H., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Tanksley, S. D. and Steffens, J. C. 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21: 1035-1051.
- Onsa, G. H., Saari, N. B., Selamat, J. and Bakar, J. 2000. Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): Partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5041-5045.
- Rathjen, A. N. and Robinson, S.P. 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* 99: 1619-1625.
- Robb, D. A., Mapson, L. W. and Swain, T. 1964. Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature* 201: 503-504.
- Robinson, C. and Mant, A. 1997. Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci.* 2: 431-437.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton-114. *Plant Physiol.* 91: 1481-1487.
- Steffens, J. C., Harel, E. and Hunt, M. D. 1994. Polyphenol oxidase. In *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, ed. by B. E. Ellis, G. W. Kuroki and H. A. Stafford. Plenum Press, New York, pp. 275-312.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D. and Steffens, J. C. 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220: 105-117.
- Thygesen, P. W., Dry, I. B. and Robinson, S. P. 1995. Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. and Wichers, H. J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45: 1309-1323.
- Vaughn, K.C. & Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vaughn, K.C., Lax, R.L. and Duke, S.O. 1988. Polyphenol oxydase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- Yamamoto, K., Kobayashi, N., Yoshitama, K., Teramoto, S. and Komamine, A. 2001. Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Physiol.* 42: 969-975.
- 桑原朋彦 1997. 植物ポリフェノールオキシダーゼ研究の新展開. *生化学* 69: 1384-1389.
- 村田容常・本間清一 1998. ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御 —最近の研究動向—. *日本食品科学工学会誌* 45: 177-185.

Title : Polyphenol Oxidase and Food Enzymatic Browning

Author : Tomoko Kihara

Key words : Polyphenol oxidase, Enzymatic Browning