

リンゴの褐変を防ぐ食塩の効果とそのしくみ —ハロゲン化物イオンによるポリフェノールオキシダーゼの活性阻害—

吉村 悦郎

放送大学教養学部教授
東京大学名誉教授

1. はじめに

果物の皮をむく、あるいは野菜を切ってから時間がたつと、変色することはよく知られている。この現象は褐変といわれ、果物や野菜の内部が空気にさらされることで生じる。そこに含まれるポリフェノールが酸化されるからである。ポリフェノールとは、芳香族炭化水素、つまり不飽和有機化合物の複数の水素が水酸基に置換された化合物をいう。植物界に広く分布し、フラボノイド、タンニンなどその数は 5,000 種以上にも及ぶ。代表的なポリフェノールでリンゴ果実などに含まれるクロロゲン酸の構造式を図 1 に示した。芳香族炭化水素に多くの修飾が施されていて、ポリフェノールが多彩な化合物を含むことが理解できるであろう。

食品工業において、褐変はコーヒーや紅茶の着色で有益な役割を演じている。一方、野菜や果物類では、出荷、貯蔵ならびに処理工程における損傷で変色の原因ともなっている。したがって、食品工業では褐変の制御は重要な因子である。

褐変はさまざまな物質によって阻害を受ける。アスコ

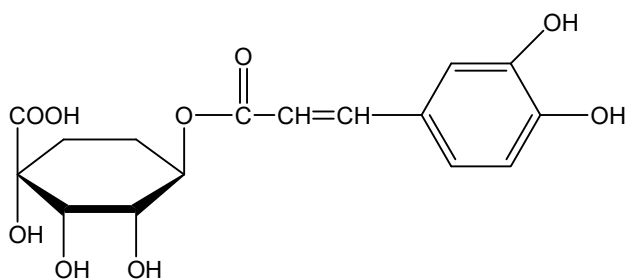


図 1. クロロゲン酸の構造式

ルビン酸やシステインは反応溶液中の溶存酸素濃度を減少させるため阻害剤として機能する。切断したゴボウを水にさらして変色を防ぐのは、同様の理由によると考えられる。

一方、リンゴの果肉は空気にさらすと、褐色を呈するようになるが、一旦食塩水 (NaCl) に浸漬すると空気にさらしても褐変が生じない。塩化ナトリウムは、溶存酸素濃度を減少させる効果はないため、別の機構が働いていることになる。本講演では、褐変が生じる機構ならびに NaCl による褐変の阻害機構を分子論に基づいて解説する。

2. 酸素分子

酸素分子 (O_2) は不思議な分子である。その性質を一言でいうと、『酸化力は強いが、反応性が低い』、ということになる。幾分かパラドキシカルないい方であるが、図 2 を参照すると理解しやすい。有機化合物、ここではブドウ糖 ($C_6H_{12}O_6$) とするが、これが酸素と反応すると、

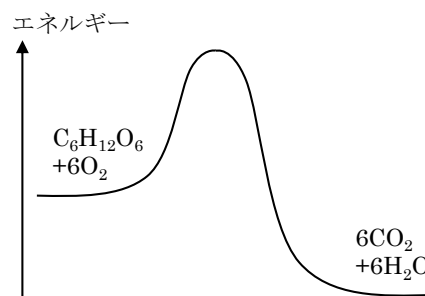
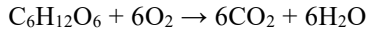


図 2. ブドウ糖の酸素による酸化反応におけるエネルギー変化



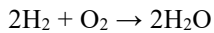
の反応で二酸化炭素と水を生じる。反応では、エネルギーが減少していて、実際に燃焼させるとこのエネルギーは熱として放出される。また、我々が行っている呼吸の概略もこの反応式で表されるが、この場合は放出されるエネルギーは生命活動に用いられている。

さて、それではブドウ糖を空気にさらすと二酸化炭素と水を生じるかという、そうはならない。図 2 に示したように、ブドウ糖と酸素からなる系から二酸化炭素と水からなる系に至る過程には高いエネルギー障壁が存在するからである。我々の体の中でこの反応が進行するのは、酵素といわれる物質(タンパク質)が存在していて、これが触媒として働くからである。酵素は、エネルギー障壁を回避して、反応を円滑に進行させている。

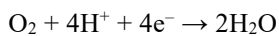
このエネルギー障壁が存在するのは酸素分子の構造に関係している。大気中に存在する酸素分子は、三重項状態といわれる状態をとっている。一方、通常の有機化合物は一重項状態といわれる状態にある。この状態の違いがエネルギー障壁を形成し、反応を抑制していることになる。

3. 酸化還元反応

水素の燃焼は、



で示されるように水素の酸素による酸化であり、酸素が酸化剤、水素が還元剤となっている。一方、別の見方をすると、この反応は



の2つの反応式に分けることができる(前の式を2倍して後の式と足すと前述の燃焼の式になる)。つまり、酸化剤は電子を受容し、還元剤は電子を供与するといえる。

4. ポリフェノールオキシダーゼ

ポリフェノールも一重項の有機化合物であり、そのままでは酸素による酸化は、進行が遅い。一方、果物や野菜で褐変が生じるのは、反応を触媒する酵素が含まれているからである。この酵素は、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)といわれているもので、生物界に広く分布している。

ポリフェノールの酸化を、カテコールを例にとると図 3 に示したようになる。つまり、カテコールがキノンに変換される際に電子を2個放出し、その電子を酸素が受け取る反応となる。生成したキノンは反応性に富んでいて、非酵素的に重合する。その結果、最終的には着色した色素を形成する¹⁾。

PPO は、カテコールから生じた電子を酸素分子に渡すことで、触媒としての機能を果たしている。なお、本講演で紹介するデータはすべてマッシュルームが産生するPPO から得られたものである。

5. PPO による触媒反応

5. 1 PPO 活性に対するカテコール濃度の影響

化学反応、



において、単位時間における物質 A の濃度減少、あるいは物質 B の濃度増加を反応速度として定義することができる。酵素が触媒する反応でも同様に反応速度を定義することが可能である。酵素反応では、反応の原料である基質 S の濃度[S]を用いると反応速度 v は、

$$v = \frac{V_{\max}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M}$$

のミカエリス・メンテンの式で示される。ここで、 V_{\max} は反応速度の最大値、 K_M はミカエリス定数といわれるものである。この式から分かるように、基質濃度の上昇とともに反応速度は上昇し、最後には最大値 V_{\max} に達する。

PPO にその基質であるカテコールを加えるとカテコール濃度が減少しキノン濃度が上昇する。この濃度の単位時間当たりの変化をカテコール濃度に対してプロットすると図 4 が得られる。カテコール濃度の低い領域(1 mM 以下)ではカテコール濃度とともに酵素活性は上昇し、ミ

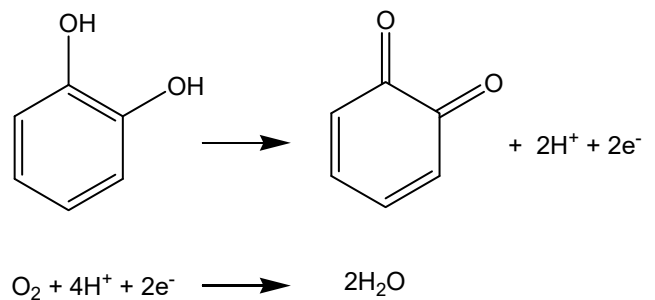


図 3. カテコールから酸素への電子の移動

カエリス・メンテン型の反応形式を示した。一方、基質濃度が高くなると活性は徐々に小さくなり、100 mM カテコールでは最大活性の 40%程度の値を示した。このことから、PPO には活性部位 (site A) とは別の基質結合部位 (site B) が存在し、site B へのカテコールの結合は酵素活性を阻害する働きがあることが示された²⁾。

5. 2 PPO 活性に対するハロゲン化物イオンの影響

ハロゲン化物イオン (Cl^- , Br^- , I^-) が存在するときの PPO 活性をカテコール濃度に対してプロットした (図 5)。塩化物イオンを例にとると (図 5(a))、NaCl の濃度とともに PPO 活性が減少している。とくに、高濃度の NaCl では、活性は低下するものの、全体的にミカエリス・メンテン型の速度式に近づいていることがわかる。つまり、 Cl^- イオンは、site B、あるいはその近傍に結合して PPO 活性を低下させること、ならびに、カテコールの site B への結合を阻害していることが理解できる。

他のハロゲン化物イオン (Br^- , I^-) でも同様に PPO と相互作用していることが示された (図 5(b), (c))。

5. 3 ハロゲン化物イオンによる PPO 活性阻害の pH 依存性

ハロゲン化物 (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) 10 mM が存在するときの PPO 活性の pH 依存性を図 6 に示した。すべてのハロゲン化物イオンにおいて、活性阻害は低い pH の領域で生じていた。また、阻害は F^- , I^- で強く、 Cl^- , Br^- は低い傾向にあった。

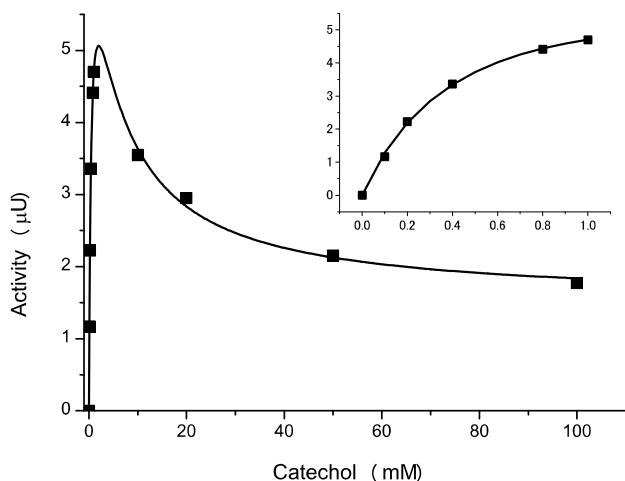


図 4. PPO 活性のカテコール濃度に対する変化

反応は、pH 5.0 で 30°C で行った。挿入図は、カテコール濃度 0 から 1 mM での反応速度を示す。

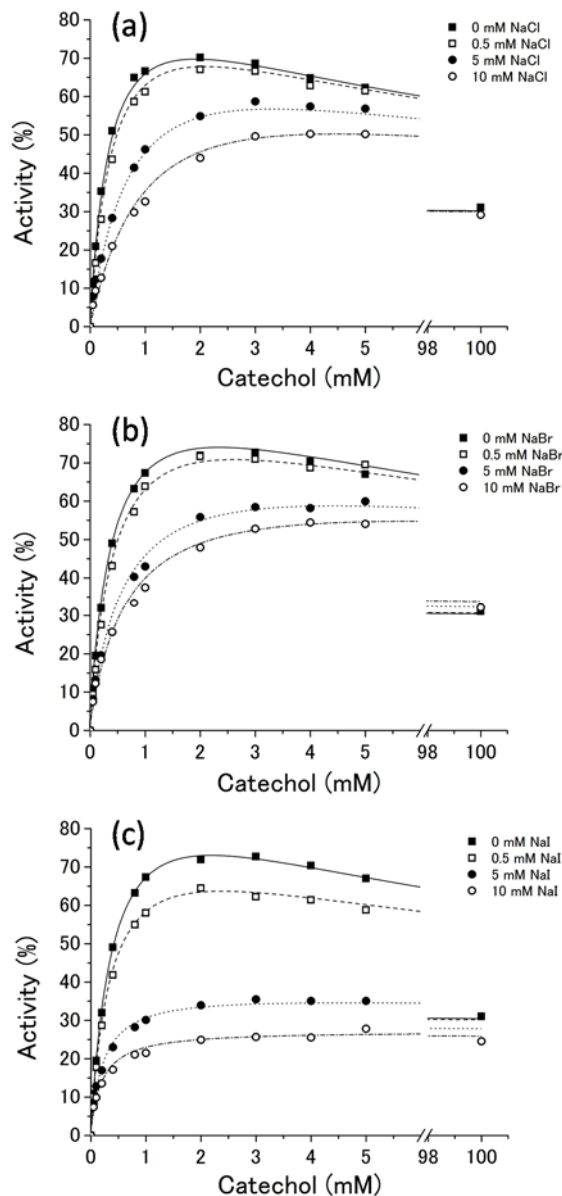


図 5. ハロゲン化物イオン共存下における PPO 活性のカテコール濃度依存性

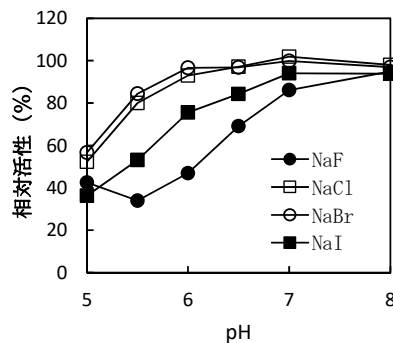


図 6. ハロゲン化物イオンによる PPO 活性阻害の pH 依存性

6. 核磁気共鳴 (NMR) によるハロゲン化物イオンと PPO との結合の解析

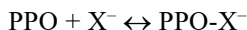
6.1 NMR 法の原理

原子核は、陽子に起因する正の電荷をもっている。また、多くの原子核は自転をしているので、磁石としての性質がある。しかし、我々が通常目にする磁石とは性格が多少異なるため、それとの区別から原子核による磁石はマイクロ磁石とよばれる。

方位磁石は、地球の磁場に沿って一定方向に整列する。マイクロ磁石でも同様の現象が生じる。つまり、分子やイオンを磁場の中に入れると、その中に存在するマイクロ磁石は、磁場の方向に整列する。また、方位磁石を揺らすと、磁石は単振動を行う。マイクロ磁石の場合は、ラジオ波を照射することで同様の単振動を生じさせることができる。この過程ではラジオ波のエネルギーをマイクロ磁石が吸収するが、その周波数を観測するのが NMR 法である。なお、この周波数を共鳴周波数といい、吸収の強さを周波数に対してプロットしたものをスペクトルという。

本研究では、 ^{19}F NMR と ^{127}I NMR を用いている。両者に共通した性質として、イオンの状態 (F と I) では共鳴周波数の分布が小さいシャープな信号を与えるが、PPO に結合した場合は、共鳴周波数の分布が広い、つまり、幅広のスペクトルとなる。

さらに、化学的な交換速度もスペクトルの形状に影響を及ぼす。PPO とハロゲン化物イオン X が



の平衡にある場合、

- ① 早い交換を行っている、スペクトルはフリーの X と PPO に結合している X の重み付き平均となる。
- ② 交換が遅いと、PPO と結合した X は線幅が広がりすぎて観測できず、フリーの X だけが観測される。この場合、フリーの X としての寿命が短くなると、線幅が広がることになる。

6.2 ^{19}F NMR による PPO と F⁻イオンとの結合の解析

PPO は、休止状態では酸化型となっている。これにアスコルビン酸を加えることで還元型に変換することができる。

0.1 mM PPO (酸化型および還元型) と 0.114 mM NaF を含む溶液の ^{19}F NMR スペクトルの線幅を図 7 に示し

た。還元型、酸化型とも温度を上げると NMR スペクトルの線幅が上昇したことから、F⁻ は PPO と遅い交換をしていると判断された。

また、還元型の方が、線幅が広いことから (図 8)、還元型は F⁻ との結合が弱く、交換速度が速いこと、すなわち、寿命が短いことを示していた。なお、NaF 添加とともに線幅が減少するのはフリーの F⁻ が増えて寿命が増加したためと解釈される。

6.3 ^{127}I NMR による PPO と I⁻イオンとの結合の解析

0.1 mM PPO に KI を加えた時の ^{127}I NMR スペクトルの線幅を図 9 に示した。添加する KI とともに還元型 PPO が存在する場合は線幅の減少が見られたが、酸化型 PPO が存在する場合には線幅はほぼ一定の値を示していた。また、ここには示していないが、 ^{127}I NMR スペクト

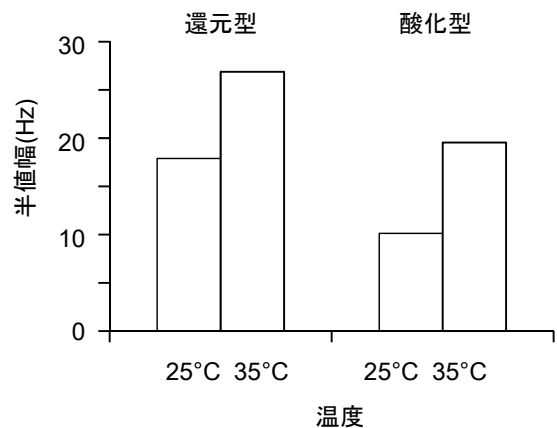


図 7. ^{19}F NMR スペクトルの線幅の温度依存性
0.1 mM PPO と 0.114 mM NaF を含む

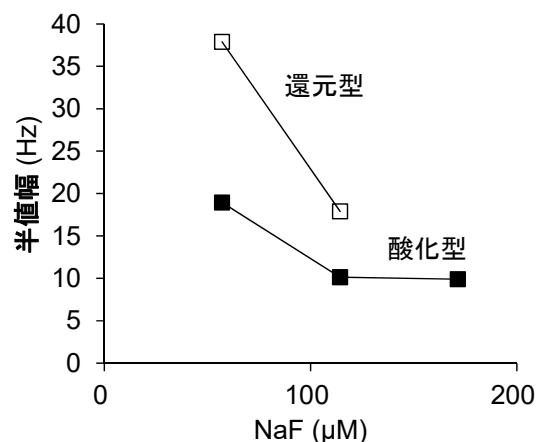


図 8. ^{19}F NMR スペクトルの線幅の NaF 濃度依存性

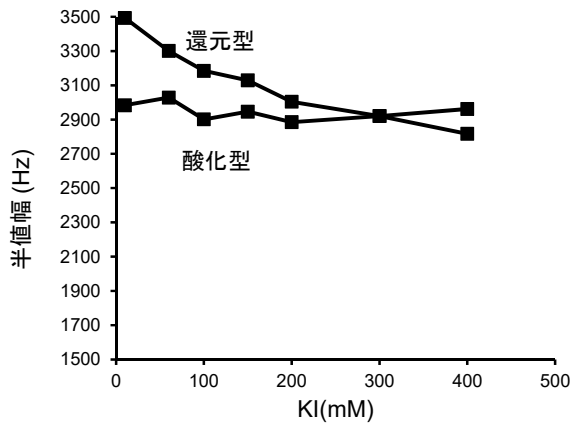


図 9. ^{127}I NMR スペクトルの線幅の KI 濃度依存性

ルの線幅は、還元型 PPO が存在するときには温度とともに減少することから、フリーの I⁻イオンと還元型 PPO に結合した I⁻イオンとは早い交換をしていることが示された。以上から、I⁻イオンは還元型 PPO に結合するが、酸化型 PPO には結合しないことが示された。

7. 総合考察

カテコールを基質とした酵素反応速度論の解析から、PPO には二つのカテコール結合サイトが存在することが判明した(図 10)。ひとつは活性部位(site A)であり、もう一方は阻害部位(site B)である。このため、PPO はカテコール濃度が高い場合は酵素活性に対して阻害的に働き、基質阻害を引き起こす。また、この基質阻害はハロゲン化物イオンによる阻害と競合していることから、ハロゲン化物イオンによる阻害は、site B あるいはその近傍へのハロゲン化物イオンの結合で生じると結論付けられる。

PPO は銅(Cu)を含む金属酵素である。Cu は酵素分子中に 2 個存在している。それぞれの Cu は互いに近接しており、それぞれの Cu には 3 個の His 残基が結合している¹⁾。この複核銅構造が酵素の活性部位を形成している。

ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害は、低 pH 側で顕著に現れていた。アミノ酸残基の中で低 pH 側に pKa を持つものとして His があげられる。His のイミダゾール基に結合した H⁺の pKa は 6.04 であり、この値より低い pH ではイミダゾール基は H⁺化し、His と Cu イオンとの結合は切断されるのであろう。

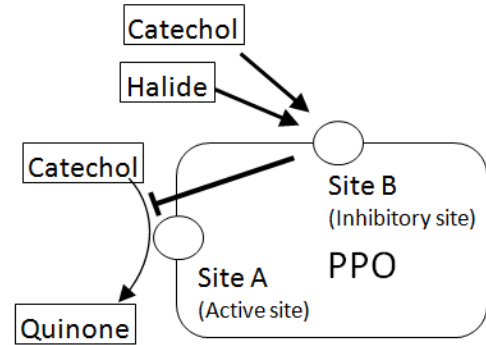
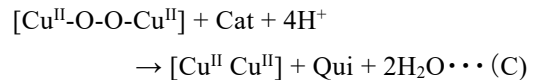
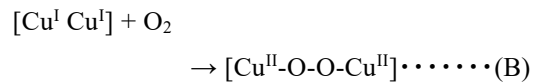
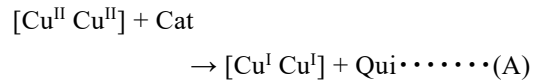


図 10. PPO のカテコールとハロゲン化物イオン結合サイトの模式図

PPO の詳細な反応機構は、活性部位の構造を[Cu^{II} Cu^{II}]で、基質と生成物をそれぞれ Cat と Qui で示すと以下のように示される³⁾。



つまり、Cu は Cu(II)イオンが基質から電子を受容(基質を酸化)し、酸素に電子を供与(酸素を還元)することで酵素反応が進行する。このとき、酸性領域では His との結合が切断された Cu にハロゲン化物イオンが結合すると考えられる。

NMR による解析から、F⁻イオンは酸化型 PPO により強く結合し、I⁻イオンは還元型 PPO にだけ結合することが示された。すなわち、F⁻イオンは[Cu^{II} Cu^{II}]に結合することで(A)の電子の受容反応を、I⁻イオンは[Cu^I Cu^I]に結合することで(B)の電子の放出反応を阻害していると推察される。Cl⁻と Br⁻イオンは Cu(I)と Cu(II)の両者に結合できると考えられるが、その結合力は F⁻や I⁻と比べると小さいものと思われる。このことは、ハロゲン化物による PPO 活性の阻害が、F⁻と I⁻で顕著であることを説明しているものと考えられる。

まとめると、ハロゲン化物イオンは活性部位の Cu イオンと結合するだけであり、基質の結合そのものには影響を与えるものではないが、電子の移動を制御することで PPO 活性を阻害していると結論づけられる。

参考文献

- 1) G. Battain, E. Monzani, L. Casella, E. Lonardi, A.W.J.W. Tepper, G.W. Canters, L. Bubacco, Tyrosinase-catalyzed oxidation of fluorophenol. *J. Biol. Chem.* 277, 44606-44612 (2002).
- 2) G.G.F Lim, Y. Imura, E. Yoshimura, Substrate inhibition competes with halide inhibition in polyphenol oxidase. *Protein J.* **31**: 609-614 (2012).
- 3) P.E.M. Siegbahn, Catalytic cycle of catechol oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 577-590 (2004).

講演者略歴

吉村 悦郎(よしむら えつろう)

放送大学教養学部教授・東京大学名誉教授。1974年東京大学農学部卒業。1979年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了。同年東京電機大学理工学部助手。1981年東京大学農学部助手。1997年東京大学大学院農学生命科学研究科助教授。2006年同大学院教授。2016年同大学を退職し現在に至る。日本農芸化学会元理事、日本土壌肥料学会元理事、日本分析化学会元副会長。1950年生まれ。

主な著書

1. Lanthanide Ions as Probes in Studies for Metal Ion-Dependent Enzymes. *Metal Ions in Biological System Vol. 40* (Eds. A. Sigel, H. Sigel), pp.161-189, Marcel Dekker (2003).
2. Methods for detection and quantification of phytochelatins, a class of heavy metal-binding peptides produced by higher plants, algae, and some fungi. *Inorganic Biochemistry Research Progress.* pp. 181-192 Nova Sci. Pub. Inc., NY USA (2010).
3. 食品と金属、食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて、pp. 45-53 シーエムシー出版 (2010).
4. Cd(II)-activated synthesis of phytochelatins. *Detoxification of heavy metals.* pp. 303-316 Springer (2011).
5. 分析化学便覧、日本分析化学会編(丸善)平成 23 年 9 月.
6. 分析化学用語辞典、日本分析化学会編(オーム社)平成 23 年 10 月.
7. 基礎生物無機化学(丸善)、平成 26 年 3 月.