

## 審査の結果の要旨

氏名 リム ジセル グレース フェルナンド

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) は食品中に含まれ、活性部位に3つのヒスチジンが配位した複核銅を有するタイプ3銅含有酵素であり、ベンゼン環のヒドロキシ化とキノン化という2つの反応を触媒する。この反応は食品の褐色化に関与しており、食品の市場価値に影響を与えるため産業的に重要である。この反応はハロゲン化物イオンにより阻害されることが知られているが、その詳細な機構は不明である。機構の解明が行われれば、より効果的に反応を阻害することに貢献できる可能性が期待される。また、それ以外にも食品に対し安全で有効な阻害手段が存在すればその価値は高い。本研究はハロゲン化物イオン、およびPPO阻害活性を有するジスルフィド化合物がPPOを阻害する様式をカイネティクス、電気化学的手法、核磁気共鳴 (NMR) などの手法を用いて明らかにしようとしたものである。

第1章で背景を述べた後、第2章ではカイネティクスの視点からPPOの阻害様式を推定した。PPOの活性の測定はカテコールを基質とし、キノンの生成を波長410 nmの吸光度から測定する手法を用いた。基質の濃度を様々に変化させた実験系において、基質濃度を上昇させるとミカエリス・メンテン曲線にしたがって反応速度が上昇するものの、高濃度の基質を使用すると基質阻害が起こることを明らかにした。また、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素のハロゲン化物イオンは低pHにてPPOを阻害することを明らかにし、さらにこのハロゲン化物イオンによる阻害と、基質阻害が競合していることを見出した。すなわち、ハロゲン化物イオン存在下では基質阻害によって反応速度が低下し始める基質濃度が上昇し、逆に極めて高濃度の基質存在下ではハロゲン化物イオンによるPPO阻害は無視できるほど小さいものであることを見出した。このことから、新規の阻害モデルが提唱された。すなわち、PPOには基質結合部位が2箇所あり、一つは活性化部位でもう一つは阻害部位として機能する。そして阻害部位を巡って基質とハロゲン化物イオンが競合するというモデルである。これはPPOのハロゲン化物イオンによる阻害の様式として全く新しい概念である。さらにpHを変化させた実験においては、フッ化物、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオンの阻害様式に違いが見られることが判明した。このことから、ハロゲン化物イオンの中でも種類によって阻害機構が異なることが予想された。

第3章にてNMRおよびサイクリックボルタンメトリー (CV) を用い、ハロゲン化物イオ

ンの中でも特徴的な挙動を示したヨウ化物イオンとフッ化物イオンについてPPOの結合様式を推定した。CVの結果は以下のようなものである。酸性溶液下において、ヨウ化物イオンを添加した場合、PPOの還元電流ピークは負方向へシフトした。一方、中性溶液下ではこのシフトは見られなかった。酸性溶液下において、フッ化物イオンを添加した場合、PPOのCVピークは消失した。一方、中性溶液下ではこの消失は見られず、フッ化物イオンの有無でボルタモグラムに変化がなかった。この結果から、CVの測定においてフッ化物イオンは酸化型銅 (Cu(II)) に強く結合することで、電子の授受を阻害している可能性が示唆された。また、 $^{127}\text{I}$ -NMRを行い、シグナルの半値幅からPPO-ヨウ化物イオンの結合の交換速度の測定を行った。その結果、ヨウ化物イオンの濃度に比例した交換速度変化は、還元状態のPPO溶液でのみ検出された。このことから、ヨウ化物イオンがPPOへ結合するのは、還元状態のPPOにおいて起こる現象であることが示唆された。この結果から、ヨウ素イオンは還元型銅 (Cu(I)) と結合し、電子の密度を上昇させることでCVにおける還元電流ピークの負方向へのシフトを引き起こしたと考えられた。さらにpHを中性にするとCVでの電流のピークが見られなくなったことは、ハロゲン化物イオンによる阻害はタイプ3銅と結合しているヒスチジンが正電荷を有している場合にのみ起こることを示している。

第4章にてジスルフィド化合物によるPPO阻害について述べた。これまでの研究からシステインがPPOの阻害活性を示すことが知られており、これはシステインの還元力によるものだと考えられていた。しかしながら、本研究において還元能力の無い酸化型のジスルフィド化合物であるシスチンについても、PPOの強い阻害活性を有していることを初めて見出した。シスチンおよびその他のジスルフィド化合物について阻害活性を解析したところ、室温で一定時間PPOとインキュベートした場合にのみ阻害活性を示すことを明らかにした。これはジスルフィド化合物とPPOが直接的に結合することを示唆している。そこで、 $^1\text{H}$ -NMRの緩和時間の測定により、ジスルフィド化合物であるシスチンがPPOに直接結合することを明らかにした。以上の結果は、新たなPPO阻害剤の開発に応用できるものと考えられる。

第5章にて研究のまとめと、今後の課題・展望について議論を行った。

本研究は、PPOの種々の阻害様式を様々な手法・視点から複合的に解析し、その機序を明らかにしたものである。このような多角的なアプローチは斬新で類を見ないものであり学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の論文として価値あるものと認めた。