

大豆たん白質由来抗酸化ペプチドの構造と機能の相関性

村本光二*・陳 華敏・山内文男

東北大学農学部

Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein

Koji MURAMOTO, Hua-Ming CHEN and Fumio YAMAUCHI

Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981

ABSTRACT

Antioxidative activities of 28 synthetic peptides against the peroxidation of linoleic acid in an aqueous system, which were designed based on an antioxidative peptide (Leu-Leu-Pro-His-His) derived from proteolytic digests of a soybean protein, were measured with the ferric thiocyanate method. The deletion of the C-terminal His decreased the activity, whereas the deletion of the N-terminal Leu had no effect. His and Pro in the sequence played important roles in the antioxidative activity and, among the peptides tested, Pro-His-His was the most antioxidative. The activity decreased on substitution of the second His with D-His. Introduction of Tyr to the positions of Pro or His did not increase the activities of the corresponding peptides. Antioxidative peptides showed synergistic effects with nonpeptidic antioxidants as observed in soybean protein hydrolysates. The magnitude of the effects, however, did not correlate with the antioxidative activities of the peptides. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 17, 23-28, 1996.

Key words: antioxidative peptide, antioxidant, soybean protein hydrolysate, synergistic effect

たん白質およびその構成単位であるアミノ酸やペプチドには、抗酸化性がみられることが以前から知られている。チロシン、メチオニン、ヒスチジン、リジン、トリプトファンなどに抗酸化性が認められているが、アミノ酸単独でよりも、ペプチドとしてより強い抗酸化性を発揮する¹⁾。ペプチドの抗酸化性は、金属キレート形成作用やフリーラジカル捕捉効果によるものと考えられている。筆者らは、種々の大豆たん白質の酵素

消化物のリノール酸の自動酸化に対する抗酸化性を調べ、 β -コングリシニンの酵素消化物から6種類の抗酸化ペプチドを単離し、構造決定を行った²⁾。これらは5から16残基のアミノ酸から構成され、N末端にバリンまたはロイシンが位置し、プロリン、ヒスチジン、チロシンを配列に持っていた。本研究では、大豆たん白質から得た抗酸化ペプチドの機能特性を明らかにするために、大豆抗酸化ペプチドの中からLeu-Leu-Pro-His-His(LLPHH)をモデルとして選び、28種類の化学合成ペプチドの構造と機能の相関性、および非ペプ

*〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

チド性の抗酸化剤との相乗効果などを調べた。

実験方法

たん白質酵素分解物

大豆(*Glycine max*)をヘキサンで十分に脱脂後、グリシニン、 β -コングリシニン、塩基性7Sグロブリンに分離した。各たん白質1 gを33 mLの蒸留水に溶解し、pHを8.0に調整した後、30 mgのプロテアーゼS(天野製薬)を加えて、70°Cで1時間加水分解した。加水分解終了後、3分間の煮沸処理により酵素を失活させた。分解液をpH 7.0に調整した後、遠心分離(15,000 rpm, 20, 10 min)により不溶部分を除去し、凍結乾燥した。分解物の加水分解率は α -フタルアルデヒド(OPA)法により測定した。

抗酸化性測定

分解物の抗酸化力はリノール酸を基質としたモデル系を用いて検討した。試料は1.0 mLの0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶かし、1.0 mLの50 mM リノール

酸を含むエタノールおよび0.5 mLの蒸留水を5 mL容試験管に入れ、シリコンキャップで密栓し、60°Cの恒温器に遮光状態で放置、経日的に生成された過酸化物質をロダン鉄法により測定して抗酸化力を求めた³⁾。

ペプチドの化学合成

ペプチドの化学合成は、高効率多種品目同時ペプチド合成機島津モデル(PSSM-8)を用いてFmoc-chemistryにより固相法で行った。合成ペプチドの純度はHPLCと質量分析により確認した。また、P^DHHの中央のヒスチジンがD型であるのを除き、ペプチドのアミノ酸はすべてL型を用いた。

結果と考察

たん白質分解物の抗酸化性

大豆 β -コングリシニンを異なる基質特異性をもつペプシンおよびプロテアーゼM, N, P, S(天野製薬)により、それぞれの最適温度と最適pHで加水分解し

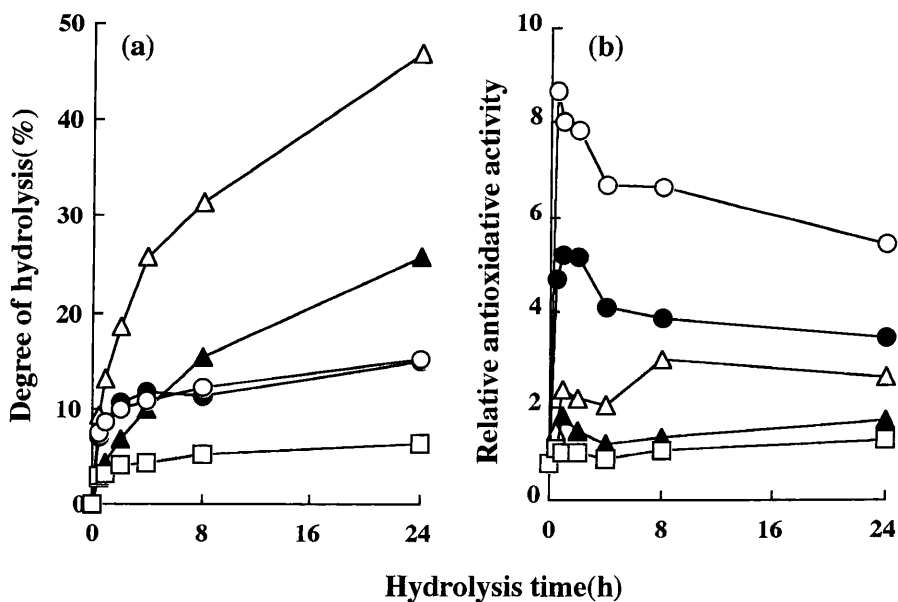


Fig. 1. Time courses of hydrolysis and antioxidative activity of β -conglycinin treated with five different proteases at 3:100 (w/w) enzyme/substrate. Protein concentrations were 3%. (a) Degree of hydrolysis of β -conglycinin hydrolysates: pepsin, pH 2, 37°C (□); protease M, pH 3, 50°C (△); protease N, pH 7, 55°C (●); protease P, pH 8, 45°C (▲); protease S, pH 8, 70°C (○). (b) Antioxidative activities of β -conglycinin hydrolysates. The numbers of the relative antioxidative activity correspond to the days of induction period. The arrow indicates the activity of unhydrolyzed β -conglycinin. Five milligrams of samples were used for the assay.

たところ、酵素によって異なる分解率と抗酸化性がみられた (Fig. 1)。この結果は、たん白質の酵素分解物の抗酸化性の強さは、分解率で表わされるペプチドの大きさだけではなく、酵素基質特異性に基づいて生成されたペプチドのアミノ酸配列に帰因していることを示している。

合成抗酸化剤との抗酸化力の比較

β -コングリシニンのプロテアーゼ S 分解物から単離した抗酸化ペプチド LLPHH の化学合成品と合成抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT) の活性を比較したところ、ペプチドは 8×10^{-7} M から 4×10^{-4} M の範囲で BHA より若干強い抗酸化性を示した (Fig. 2)。BHT は 5×10^{-5} M 以上では LLPHH より強い抗酸化性を示したが、低濃度では LLPHH の抗酸化力が勝っていた。LLPHH の N 末端ロイシンを除去しても抗酸化性には影響がほとんどなかった。一方、C 末端のヒスチジンを除去した LLPH と HL にはこの濃度範囲では抗酸化性がみられなかった。このことから、LLPHH の抗酸化活性には N 末端のロイシンは必要ではなく、C 末端部の配列が重要であることが明らかになった。

合成ペプチドの構造と抗酸化性

抗酸化ペプチドの抗酸化性に対するアミノ酸配列の重要性を調べるために、LLPHH の C 末端にヒスチジ

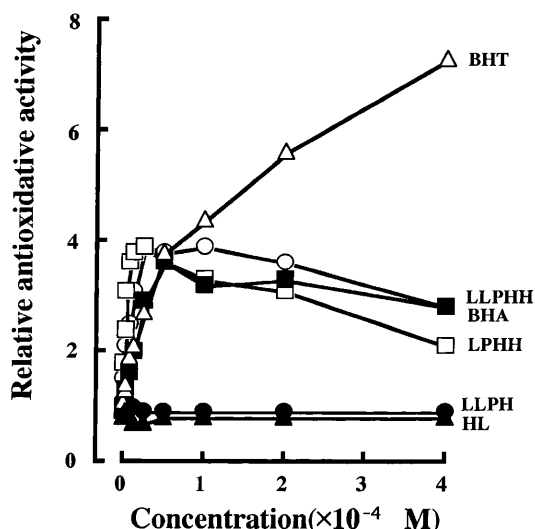


Fig. 2. Antioxidative activity of synthetic peptides and nonpeptidic antioxidants. ($\circ$) Leu-Leu-Pro-His-His ; ($\square$) Leu-Pro-His-His ; ($\bullet$) Leu-Leu-Pro-His ; ($\blacktriangle$) His-Leu ; ($\blacksquare$) BHA ; ($\triangle$) BHT.

ンを付加した LLPHHH と除去した LLPH, および N 末端から 1 つずつアミノ酸を除去した LPHH, PHH, HH の抗酸化性を測定した。Fig. 3 に示したように、LLPHHH は LLPHH とほぼ同じ抗酸化力を示したが、LLPH では活性を失った。一方、LLPHH の N 末端からアミノ酸を 1 つずつ除去した LPHH, PHH および HH には活性が認められ、PHH には特に強い抗酸化性がみられた。しかし、HH の活性は LLPHH ほど強くなかった。従って、HH の基本構造にプロリンが結合することによって抗酸化性が強められていると考えられた。

HH の N 末端に 1 残基のロイシンを結合した LHH でも強い抗酸化性を示した。しかし、その抗酸化力はプロリンが結合した PHH より弱かった。また、LHH の N 末端にもう 1 残基ロイシンを結合した LLHH では抗酸化力が低下し、プロリンを結合した PLHH では抗酸化性がみられなかった。HPLH と HH の間に 2 残基を挿入した HPLH, HLPH では抗酸化性がなかった。一方、LPHH, HLHP, HLH およ

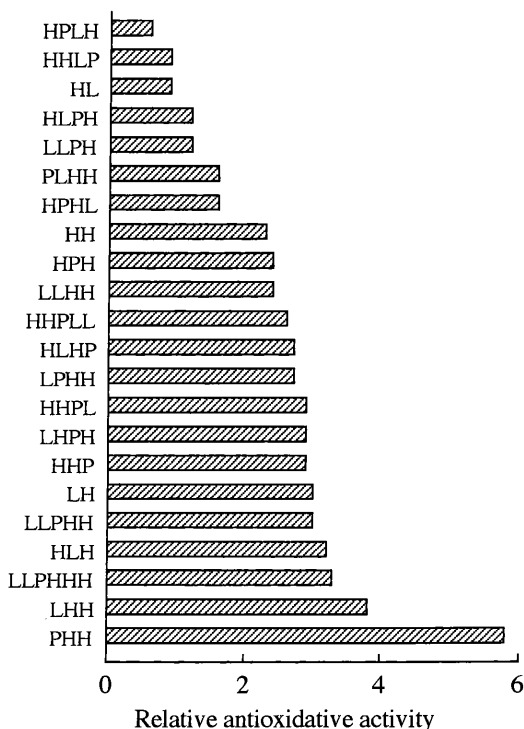


Fig. 3. Antioxidative activities of Leu-Leu-Pro-His-His and its structurally related peptides. The peptide concentration was 4.0×10^{-5} M. Data represent the mean of three replications. H, His ; P, Pro ; L, Leu.

び HPH は LPHH と同程度の抗酸化性を示した。

ヒスチジンの代わりにチロシンを入れてもペプチドの抗酸化性は強くならず、むしろヒスチジン含有ペプチドより弱い抗酸化性を示した。2 残基目のヒスチジンを D 型にした P^DHH の抗酸化活性は PHH より大きく低下した。すなわち、ペプチドの抗酸化性が配列内のアミノ酸側鎖の立体構造によって大きく影響を受けていることが示唆された。また、PHH のプロリンをチロシンと置換してもロイシンの場合と同様に活性は向上しなかった。従って、プロリンの抗酸化性への寄与も大きいと考えられる。

先に述べたように、ペプチドのアミノ酸配列が抗酸化性発現に大きく関わっていることは間違いない。構造と活性の相関は十分解明されたとは言いが、ヒスチジン含有ペプチドの抗酸化性発現のためにはヒスチジンのイミダゾール基が C 末端部に位置する必要があると考えられる。典型的な例として LH と HL および PHH と HHP が挙げられ、いずれのペプチドでも後

者では抗酸化性が大きく低下している。従って、ヒスチジンの N 末端側へのアミノ酸の付加は、抗酸化性発現に好ましい影響を与える場合があるが、ヒスチジンの C 末端側への付加は抗酸化性に負の効果をもたらすといえる。

抗酸化性の相乗効果

次に 40 μ M の合成ペプチド、100 μ M の合成抗酸化剤 BHA、BHT および 10 μ M の天然抗酸化剤 δ -トコフェロールを用いて、それぞれ単独の場合と共存させたときの抗酸化性を調べた。Table 1 に示したように、LLPH を除き、これらのペプチドにはいずれにおいても非ペプチド性抗酸化剤との相乗効果が観察され、その効果の大きさは BHA > δ -トコフェロール > BHT の順であった。ペプチド単独で強い抗酸化性を示した LLPHH、HLH、LLPHHH、LHH、PHH の相乗効果は抗酸化性の弱いペプチドの効果と同程度であり、HPLH、HHLP、HL のように単独では抗酸化性をもたないペプチドが大きな相乗効果を示した。以上の結

Table 1. Synergistic effects of synthetic peptides on the antioxidative activity of nonpeptidic antioxidants

	Peptide	+BHA	+BHT	+Tocopherol
Control	1.0			
BHA		2.4		
BHT			1.9	
Tocopherol				1.3
HPLH	0.6	13.1(4.4)	5.7(2.3)	7.2(3.8)
HHLP	0.9	16.1(4.9)	5.7(2.0)	9.4(4.3)
HL	0.9	7.4(2.2)	3.2(1.1)	3.9(1.8)
HLPH	1.2	9.3(2.6)	3.4(1.1)	3.9(1.6)
LLPH	1.2	2.5(0.7)	1.4(0.5)	0.9(0.4)
PLHH	1.6	10.3(2.6)	6.9(2.0)	10.1(3.5)
HPHL	1.6	14.3(3.6)	6.2(1.8)	10.1(3.5)
HH	2.3	13.6(2.9)	5.9(1.4)	8.2(2.3)
LLHH	2.4	14.0(2.9)	6.5(1.5)	9.1(2.5)
HHPLL	2.6	14.2(2.8)	5.7(1.3)	9.2(2.4)
HLHP	2.7	11.9(2.3)	4.5(1.0)	6.4(1.6)
LPHH	2.7	11.4(2.2)	6.2(1.3)	7.6(1.9)
HHPL	2.9	14.2(2.7)	6.4(1.3)	8.1(1.9)
LHPH	2.9	15.0(2.8)	6.3(1.3)	9.8(2.3)
LH	3.0	12.1(2.2)	6.1(1.2)	9.2(2.1)
LLPHH	3.0	9.3(1.7)	4.8(1.0)	3.1(0.7)
HLH	3.2	14.0(2.5)	4.3(0.8)	6.5(1.4)
LLPHHH	3.3	12.4(2.2)	5.8(1.1)	5.1(1.1)
LHH	3.8	14.0(2.3)	6.3(1.1)	8.9(1.7)
PHH	5.8	16.4(2.0)	6.6(0.9)	9.4(1.3)

Antioxidative activity was evaluated using the ferric thiocyanate method. The assay was performed with 40 μ M of peptides, 100 μ M of BHA and BHT, and 10 μ M of tocopherol. The number in parentheses is the magnitude of synergistic effect : (Activity of peptide + antioxidant) / (Activity of peptide) + (Activity of antioxidant). Data represent the mean of three replications.

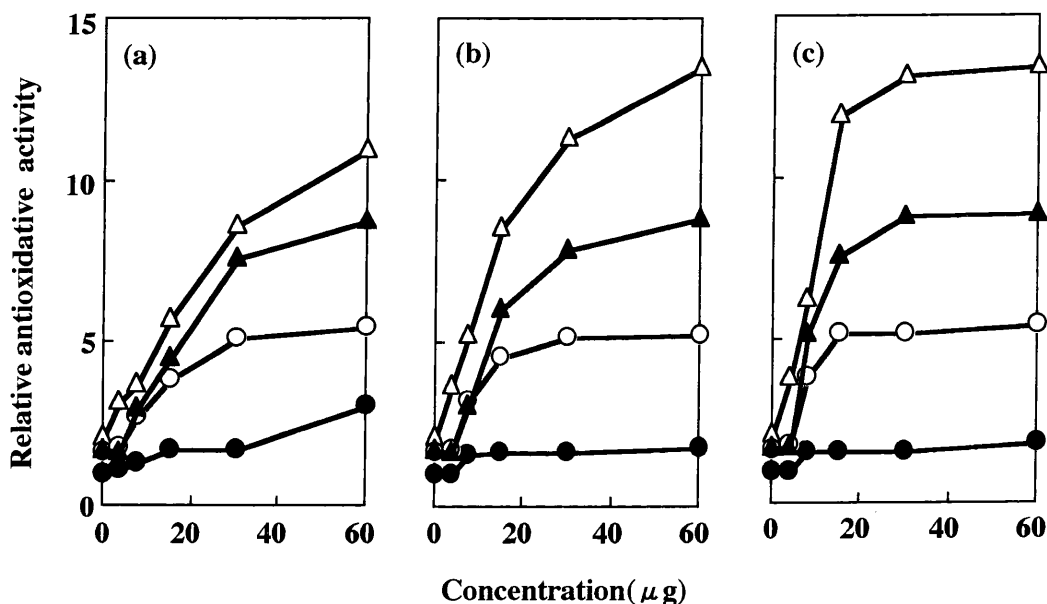


Fig. 4. Synergistic effects of soybean protein hydrolysates on the antioxidative activity of nonpeptidic antioxidants. Data represent the mean of three replications. (a) β -conglycinin hydrolysate ; (b) glycinin hydrolysate ; (c) basic 7S globulin hydrolysate ; (●) hydrolysate itself ; (△) hydrolysate + BHA ; (○) hydrolysate + BHT ; (▲) hydrolysate + tocopherol.

果から、合成ペプチドも非ペプチド性抗酸化剤に対して相乗効果を持っているが、その効果はペプチドの抗酸化性の強さには関係がないことが明らかになった。

そこで大豆 β -コングリシニン、グリシニンおよび塩基性7S グロブリンのプロテアーゼ S1時間酵素分解物 (3.75~60 μ g) と、100 μ M の合成抗酸化剤 BHA、BHT および 10 μ M の天然抗酸化剤 δ -トコフェロールを用いて、それらの相乗効果を調べた。その結果、たん白質分解物単独では抗酸化性がみられない濃度範囲において、BHA、BHT および δ -トコフェロールとの間で大きな相乗効果が観察された (Fig. 4)。最大量である 60 μ g を加水分解率から逆算すると、分解物の

濃度は約 20 μ M である。従って、低濃度では弱い抗酸化性しか示さないたん白質分解物でも非ペプチド性抗酸化剤との併用によって強い抗酸化作用を引き出すことが可能であると考えられる。たん白質間で相乗効果の大きさに違いがみられ、プロテアーゼ S 分解物での効果の強さは、塩基性 7S グロブリン、グリシニン、 β -コングリシニンの順であった。非ペプチド性抗酸化剤のたん白質分解物に対する相乗効果の大きさは、合成ペプチドの場合と同じく、BHA、 δ -トコフェロール、BHT の順であった。ペプチドの抗酸化性に対する相乗効果の機構は不明であり、今後詳細に検討する予定である。

要 約

大豆 β -コングリシニンのプロテアーゼ分解物から単離した 6 種類の抗酸化ペプチドの構造を決定した。その中の 1 つの Leu-Leu-Pro-His-His をモデルとして類似構造をもつ 28 種類のペプチドを化学合成し、それらの構造と抗酸化性の相関性を検討した。合成 Leu-Leu-Pro-

His-His は、 5.0×10^{-5} から 4.0×10^{-4} M の範囲で BHT より弱く、BHA より若干強い抗酸化性を示した。N 末端の Leu を除去しても活性に大きな変化は認められず、一方 C 末端の His を除去したところ活性を失った。Pro-His-His に最も強い抗酸化性がみられ、ペプチドの抗酸化性には構成アミノ酸の種類だけでなく、アミノ酸配列が重要であることが明らかになった。

文 献

- 1) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生(1975): 油脂の安定性に及ぼすアミノ化合物の影響. 日本食品工業学会誌, **22**, 428-430.
- 2) Chen HM, Muramoto K and Yamauchi F(1995): Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J Agric Food Chem*, **43**, 574-578.
- 3) 満田久輝, 安本教傳, 岩見公和(1966): リノール酸の自動酸化におけるインドール化合物の抗酸化作用. 栄養と食糧, **19**, 210-214.