

微弱発光法による大豆たん白質の活性酸素ラジカル消去能 に関する研究

フスニザ フセイン・川根政昭・吉城由美子・大久保一良*

東北大学農学部

Active Oxygen-Radical Scavenging Activity of Soybean Proteins

Husniza HUSSAIN, Masaaki KAWANE, Yumiko YOSHIKI and
Kazuyoshi OKUBO

Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981

ABSTRACT

Active oxygen species (X) can cause damage to biomolecules including protein and DNA. Previously, we have reported that catalytic species (Y) such as flavonoids as natural radical scavengers exhibited very weak light emission (chemiluminescence; CL) in the presence of X and receptive species (Z) such as acetaldehyde and DDMP saponin and proposed that the system of XYZ is a scavenging mechanism for active oxygen species in accordance with the CL intensity $[P] = k [X] [Y] [Z]$; k , photon constant. In this study, soybean protein fractions involved in the XYZ system were investigated. It could be concluded that the isolated protein from soybean whey fraction acted as Z in the XYZ system due to the proportionate P against $[X, H_2O_2]$, the O_2^- scavenging activity increased with the addition of gallic acid as Y, and that pro-oxidative characteristic changed into antioxidative with Y through the ferric thiocyanate method. The isolated protein might be lipoxygenase on the basis of SDS-PAGE profile. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 33-39, 1996.

Key words : active oxygen, radical scavengers, chemiluminescence, XYZ system, lipoxygenase

これまでの一連の研究で、非酵素系であるX（活性酸素種）、Y（触媒種）およびZ（受容種）存在下での微弱発光現象をみつけ、フラボノイド等の天然ラジカルスカベンジャーでの速度論的解析でこのXYZ系が活性酸素ラジカル消去系であることを明らかにすることができた¹⁻⁵⁾。この系のZが相乗的に抗酸化性を促進する成分で、その代表的成分がDDMPサポニンであ

り、たん白質等もその範疇に入り、味噌、醤油、もやし等の大豆食品に未確認Z成分が存在するという予備的結果を得ている。本研究では大豆たん白質等からYおよびZ成分を検索した結果、ホエー区分にその活性がみられ、微弱発光特性、ESRスピントラッピング法によるラジカル消去能、抗酸化活性を明らかにすることができた。

*〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

実験方法

試料の調製

低温脱脂大豆から10倍加水水抽出液を得、Fig. 1に従って、水抽出たん白質(water extracted protein, WEP)、ホエー(whey)、酸沈澱たん白質(acid precipitated protein, APP)、粗11S (11S)、粗7S (7S)およびホエーII (whey II)の各画分を調製した。

ゲルろ過

50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に分散した約5 mLの試料液を、同緩衝液であらかじめ平衡化しておいたセファロース 6B、4Bまたは2Bカラム(2.5 × 70 cm)に注入し、同緩衝液で溶出した。溶出液を5 mL毎に分取し、280 nmにおける吸光度を測定した。

電気泳動分析

Studier⁶⁾に従い、SDS-PAGEで電気泳動し、0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250で染色することによってゲル電気泳動分析した。

抗酸化性の測定

ログン鉄法⁷⁾で次のようにして抗酸化性を求めた。すなわち、1 mLの試料液(50 mM リン酸緩衝液)に2.51%リノール酸エタノールの1.026 mLを加え、蒸

留水で5 mLにした。リノール酸含有試料液を37°Cにそれぞれ放置した後、その0.1 mLを採取し、4.7 mLの75%エタノールを加え、続いて0.1 mLの30% ammonium thiocyanateを加えた。この混合液に3.5%塩酸で調製した0.02 M ferrous chlorideを加えて発色させ、3分後に500 nmにおける吸光度を測定した。

微弱発光の測定

微弱発光の測定は既報¹⁾に従い次のようにして行った。すなわち、送液ポンプ(Waters Model 510)とインジェクター(Waters U6K)付帯フォトンカウンティングタイプCL検出器(東北電子CLD-110, 300-650 nm)を用い、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を1.0 mL/minで送液し、インジェクターからH₂O₂等の活性酸素種(X)、没食子酸等の触媒種(Y)およびCH₃CHO等の受容種(Z)を注入することによって発生するフォトン測定した。

SOD 活性の測定

河野ら⁸⁾のESRスピントラッピング法(日本電子JES-RE1X)により次のようにしてSOD活性を測定した。すなわち、スピントラッピング剤として9.2 M DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide, LABOTEC CO., LTD製) 20 μL, 試料水溶液 50

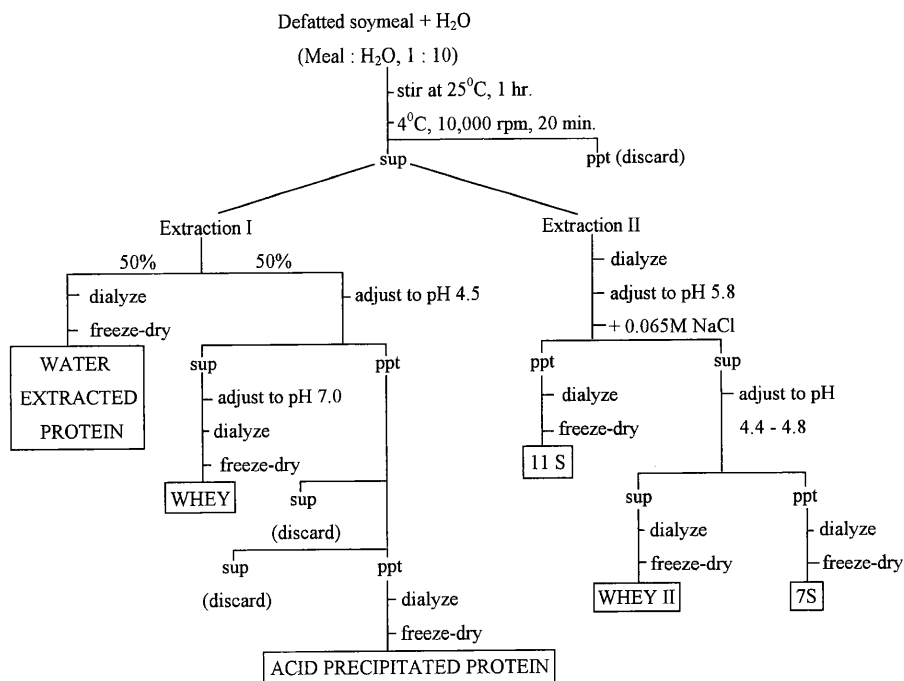


Fig. 1. Schematic diagram for preparation of defatted soymeal fractions.

μL , 2 mM ヒポキサンチン 溶液 (SIGMA CHEMICAL 製) 50 μL , 0.4 U/mL キサンチンオキシダーゼ溶液 (Behringer Mannheim 製) 50 μL を混合・攪拌後, 水溶液偏平セルに混合溶液を吸引し, 45秒間インキュベートした後, 測定を行った。

結果と考察

XYZ微弱発光系における比較

XYZ微弱発光系における各たん白質画分の比較を次のようにして行った。

Yとして40 mg/mLの各たん白質溶液を準備し, Zとして2% CH_3CHO を用い, 微弱発光強度に及ぼすXとしての H_2O_2 濃度の影響を調べた。その結果(Fig. 2(A)), APPではほとんど観察されなかったが, whey>whey II>WEPの順に H_2O_2 濃度に依存した

顕著な微弱発光が観察された。

Zとして40 mg/mLの各画分溶液を準備し, Yとして50 mM 没食子酸を用い, 微弱発光強度に及ぼす H_2O_2 濃度の影響を調べた。その結果(Fig. 2(B)), WEP, APP, 11Sおよび7Sでは低かったが, whey>whey IIの順に H_2O_2 濃度に依存した顕著な微弱発光が観察された。しかし, その発光強度はYとしての約半分の値であった。

2% CH_3CHO または50 mM 没食子酸存在下における40 mg/mL whey および1時間加熱処理同画分の微弱発光に及ぼす H_2O_2 濃度の影響を調べた。その結果(Fig. 3), CH_3CHO 存在下におけるYおよび没食子酸存在下におけるZとしてのwheyの微弱発光は H_2O_2 濃度に比例して直線的に増加したが, 加熱処理wheyの微弱発光はYとして僅かな直線的増加がみられたに過ぎなかった。これらの結果から H_2O_2 存在下

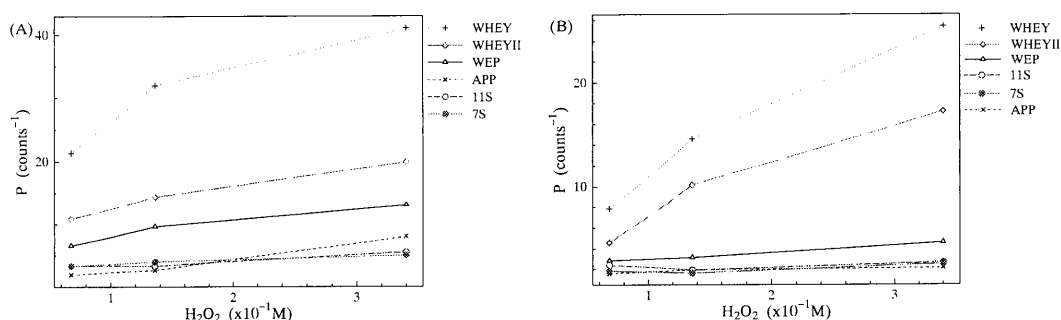


Fig. 2. Chemiluminescence intensity of soybean proteins.

A; X= H_2O_2 , Y=40 mg/mL protein, Z=2% CH_3CHO

B; X= H_2O_2 , Y=50 mM gallic acid, Z=40 mg/mL protein

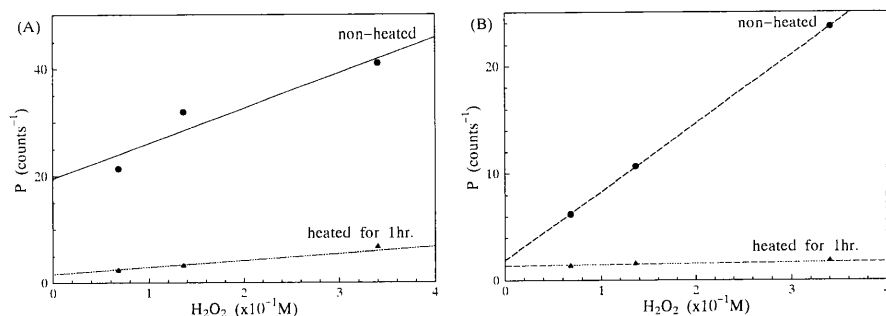


Fig. 3. Chemiluminescence intensity of whey.

A; X= H_2O_2 , Y=40 mg/mL whey, Z=2% CH_3CHO

B; X= H_2O_2 , Y=50 mM gallic acid, Z=40 mg/mL whey

における whey の微弱発光成分は酵素系であるものと推察され、より直線の H_2O_2 濃度依存性を示すことから Z 特性を有しているものと思われる。また、whey には酵素的 Y 特性成分の存在も推察される。

SOD 活性

5, 10 および 20 mg/mL の各画分溶液を調製し、ESR スピントラッピング法で SOD 活性を調べた。その結

果 (Fig. 4), APP と 11S にはほとんど SOD 活性がみられなかったが、SOD 活性は、WEP と 7S で 0.1 U/mg, whey II で 0.3 U/mg, 特に whey で 1.7 U/mg もの高い活性がみられた。図には示さなかったが、没食子酸の添加で微弱発光挙動と同様にこれらの活性が高まった。

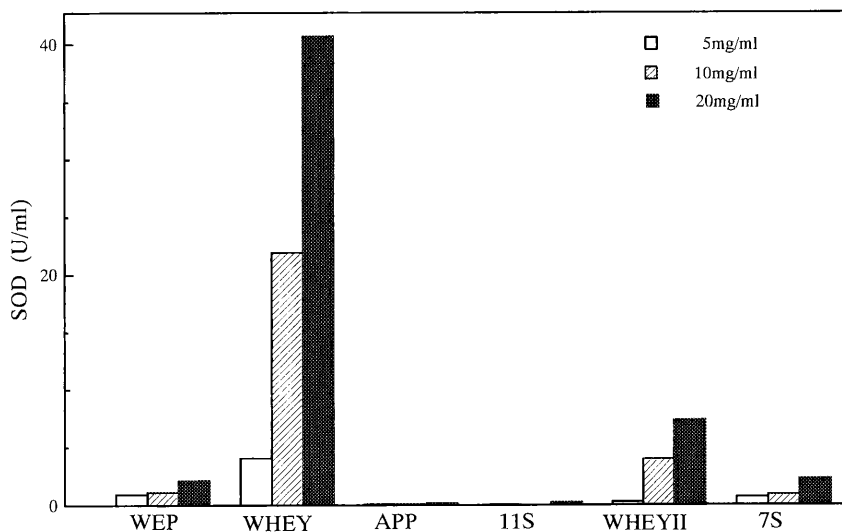


Fig. 4. O_2^- scavenging activity of defatted soymeal fractions by ESR spin-trapping method.

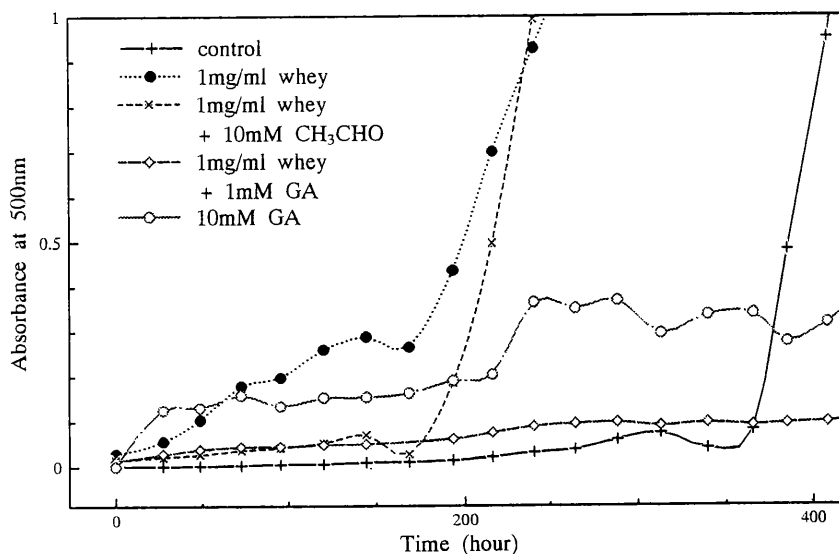


Fig. 5. Antioxidative activity of whey fraction using ferric thiocyanate method.

Whey の抗酸化性におよぼす Y の影響

ロダン鉄法でリノール酸の自動酸化に及ぼす whey, Y としての没食子酸および Z としての CH_3CHO の影響を調べた。その結果 (Fig. 5), 1 mg/mL の whey およびその CH_3CHO 添加ではリノール酸の自動酸化が促進されたのに対し, 没食子酸および没食子酸添加 whey ではリノール酸の自動酸化が顕著に抑制された。従って, whey は X Y Z 系における Z の特性を有して

いることが明らかとなった。

Whey の分画

セファローズ 6 B によるゲルろ過で whey を分画し, SDS-PAGE でゲル電気泳動分析した結果 (Fig. 6), 94 kDa に主バンドがみられるピーク 1 と 30 kDa に主バンドがみられるピーク 2 に分画された。得られたピーク 1 と 2 について X Y Z 系における微弱発光を調べた結果, ピーク 1 には Y と Z の特性がみられたのに

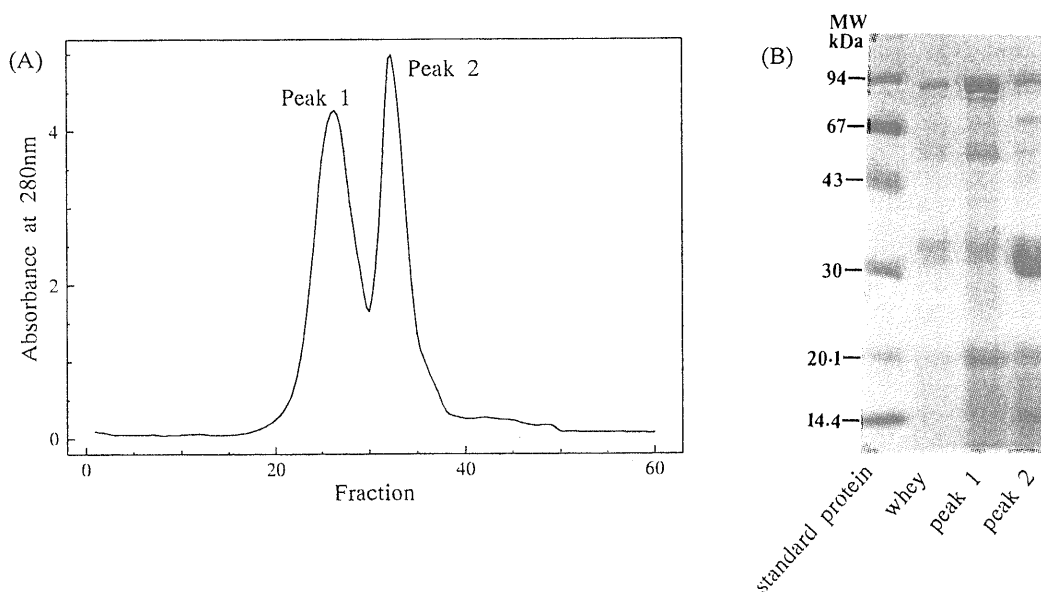


Fig. 6. Partial purification of whey protein.

A ; Sepharose 6B column chromatogram of whey, eluted with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0

B ; SDS-PAGE profile of purified protein prepared with 2-mercaptoethanol.

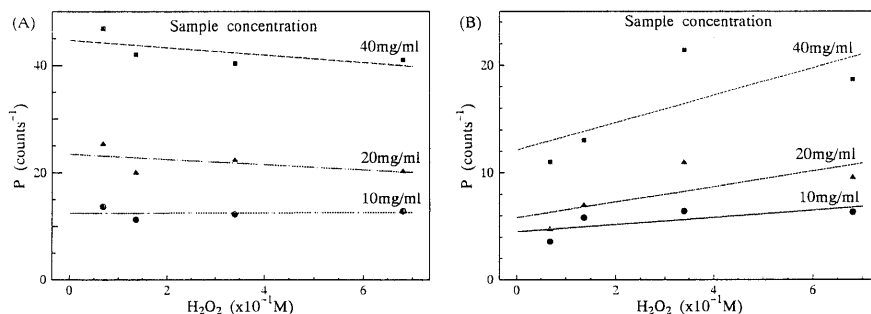


Fig. 7. Chemiluminescence intensity of protein fraction isolated by Sepharose 2B.

A; X = H_2O_2 , Y = Sepharose 2B isolated protein, Z = 2% CH_3CHO

B; X = H_2O_2 , Y = 50 mM gallic acid, Z = Sepharose 2B isolated protein.

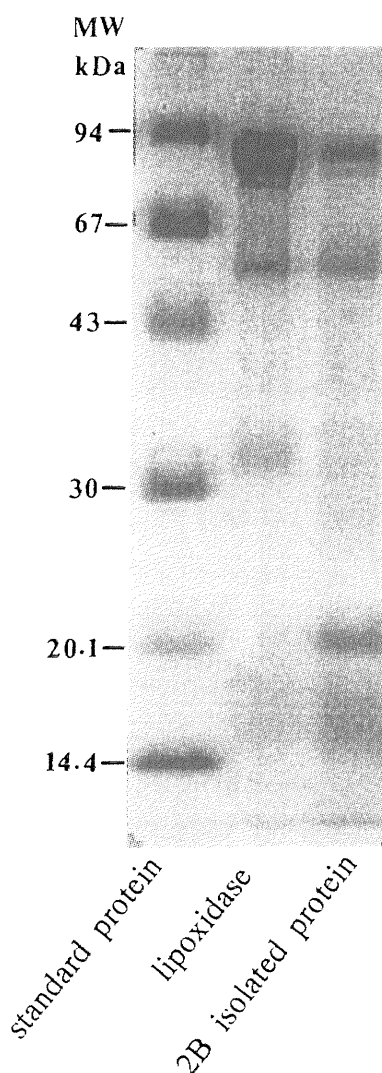


Fig. 8. SDS-PAGE profile of protein fraction isolated by Sepharose 2B, prepared with 2-mercaptoethanol.

要 約

これまでの一連の研究で、非酵素系であるX（活性酸素種）、Y（触媒種）およびZ（受容種）存在下での微弱発光現象を見つけ、その発光の強さは下式に従うことがわかった。

$$[P] = k [X] [Y] [Z]; k, \text{photon constant.}$$

本研究ではダイズたん白質等からYおよびZ成分を検索した結果、ホエー区分にその活性がみられ、微弱発光、ESRスピントラッピング法によるラジカル消去能、抗酸化活性におけるZの特性を有していることが明らかとなった。ホエー区分からの単離標品の主成分はリポキシゲナーゼであると示唆された。本研究ではリポキシゲナーゼはSOD活性を有し、その酸化性はYの存在で抗酸化性に転換する酵素であることが強く推察された。

対し、ピーク2にはZのみの特性がみられた。そこでピーク1に注目し、分画範囲の大きいセファロース4Bと2Bで再ゲルろ過した結果、いずれのゲルろ過においてもシングルピークとして検出された。

単離標品の微弱発光特性およびリポキシゲナーゼ標品との比較

Wheyからのゲルろ過単離標品の10, 20および40 mg/mL溶液を調製し、2% CH_3CHO または50 mM 没食子酸存在下における微弱発光に及ぼす H_2O_2 濃度の影響を調べた。その結果(Fig. 7), いずれにおいても濃度に依存した微弱発光が観察され、 CH_3CHO 存在下におけるYとしての微弱発光は没食子酸存在下におけるZとしての微弱発光の約2倍の発光フォトン量であった。しかし、Yとしては H_2O_2 濃度の影響がみられなかったが、Zとしては明らかにその依存性がみられた。

この単離標品には94 kDaに相当する主バンドが検出されたことから、メルク製品のリポキシゲナーゼ標品と比較した。その結果(Fig. 8), メルク標品の主バンドも94 kDaに相当することから、単離標品の主成分はリポキシゲナーゼであるものと推察された。

リポキシゲナーゼは基質に酸素を付加する典型的な酸化酵素であり、大豆食品加工においては不快臭発生の原因酵素であることが知られている。しかし、本研究ではSOD活性を有し、その酸化性はYの存在で抗酸化性に転換する酵素であることが強く推察され、XYZ系におけるさらなる詳細な研究に興味もたれる。

文 献

- 1) Yoshiki Y, Okubo K, Onuma S and Igarashi K (1995): Chemiluminescence of benzoic acid and cinnamic acid, and flavonoids in the presence of aldehyde and hydrogen peroxide or hydroxyl radical by Fenton reaction. *Phytochemistry*, **39**, 225-229.
- 2) Yoshiki Y and Okubo K (1995) : Oxygen radical scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) conjugated saponin in soybean seed. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 1556-1557.
- 3) Yoshiki Y , Okubo K and Igarashi K (1995): Chemiluminescence of anthocyanins in the presence of aldehyde and *tert*-butyl hydroperoxide. *J Biolumin Chemilumin*, **10**, 335-338.
- 4) Yoshiki Y, Kinumi M, Kahara T and Okubo K (1996): Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. *Plant Science*, **116**, 125-129.
- 5) Yoshiki Y, Kahara T, Okubo K, Igarashi K, Yotsuhashi K and Fenwick GR (1996): Mechanism of catechin chemiluminescence in the presence of active oxygen. *J Biolumin Chemilumin*, **11**, 131-136.
- 6) Studier FW (1973): Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab/gels. *J Mol Biol*, **79**, 237-248.
- 7) Nakatani N and Kikuzaki H (1987): A new antioxidative glucoside isolated from *Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem*, **51**, 2727-2731.
- 8) Hiramatsu M and Kohno M (1987): Determination of superoxide dismutase activity by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. *JEOL News*, **23**, 6-9.