

# 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 —特に大豆リポキシゲナーゼについて—

吉城由美子・川根政昭・フスニザ フセイン・苑 虎・大久保一良\*

東北大学大学院農学研究科

## Active Oxygen-radical Scavenging Activity of Soybean Proteins : Especially Soybean Lipoxygenase

Yumiko YOSHIKI, Masaaki KAWANE, Husniza HUSSAIN, Yuan HU 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 presense 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 lipoxygenase (LOX) involved in the XYZ system was investigated. It could be concluded that (1) the LOX acted as Y and Z in the XYZ system when compered with horseradish peroxidase, cytochrome c and superoxide dismutase acted as typical Z in the system, and that (2) gallic acid had not a synergistic effect on the SOD activity of the LOX but had the effect on the HO• scavenging, antioxidant and LOOH scavenging activities of the LOX. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 42-48, 1997.

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

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<sup>1-5)</sup>。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成分が存在がする予備の結果を得ている。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、その本体はリポキシゲナーゼ(LOX)であることがわかった。本研究ではLOX標品の微弱発光特性、ESRスピントラッピング法によるラジカル消去能、抗酸化活性を調べ、ホースラデッシュペルオキシダーゼ(HRP)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)およびシトクロ

\*〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

ムc (Cyt c) と比較した。

## 実 験 方 法

### 試料・試薬

没食子酸(GA), リノール酸(LA), HRP および SOD はナカライテスク㈱から, LOX は生化学工業㈱から, 過酸化水素 (30%) は三徳化学㈱から, アセトアルデヒド (MeCHO) はメルク㈱から, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide は三井化学㈱からそれぞれ購入した。また低温脱脂大豆から10倍加水水抽出液を得, 前報に従ってホエイ (whey) 画分を調製した。

### 抗酸化性の測定

ロダン鉄法<sup>6)</sup>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 (LA) エタノールの1.026 mL を加え, 蒸留水で 5 mL にした。LA 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<sup>1)</sup>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от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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等の X, 没食子酸 (GA) 等の Y および CH<sub>3</sub>CHO (MeCHO) 等の Z を注入することによって発生するフオンを測定した。

### SOD 活性およびヒドロキシラジカル (HO・) 消去能の測定

河野<sup>7)</sup>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。即ち, 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  $\mu$ L, 試料水溶液 50  $\mu$ L, 2 mM ヒポキサンチン溶液 (Sigma Chemical 製) 50  $\mu$ L, 0.4 U/mL キサンチンオキシダーゼ溶液 (Behringer Mannheim 製) 50  $\mu$ L 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。同様に, 河野<sup>8)</sup>に従い, HO・消去能を ESR ス

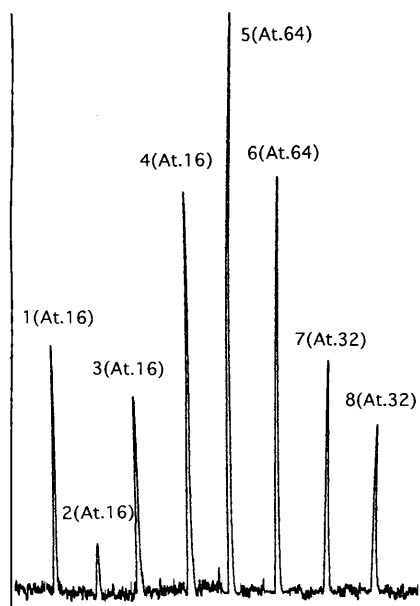


Fig. 1. Photon intensity of LOX in the presence of active oxygen species, catalytic species and receptive species.

|                                                      | counts/sec |
|------------------------------------------------------|------------|
| 1. 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mg/mL LOX   | 32         |
| 2. 5 mM gallic acid + LOX                            | 9          |
| 3. 2% MeCHO + LOX                                    | 27         |
| 4. 10% <i>t</i> -BuOOH + LOX                         | 61         |
| 5. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + gallic acid + LOX | 328        |
| 6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + LOX + MeCHO       | 236        |
| 7. <i>t</i> -BuOOH + gallic acid + LOX               | 62         |
| 8. <i>t</i> -BuOOH + LOX + MeCHO                     | 46         |

ピントラッピング法により測定した。キレート剤として5.5 mM DTPA (Diethylenetriamine-N, N, N', N'', N''-pentaacetic acid (同仁化学研究所) 10  $\mu$ L, スピントラッピング剤として9.2 mM DMPO 15  $\mu$ L, 試料水溶液50  $\mu$ L, 1 mM 過酸化水素水50  $\mu$ L, 0.1 mM 塩化第二鉄 (ナカライテスク) 水溶液50  $\mu$ L 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。

#### HPLC による LA およびそのヒドロペルオキシド (LOOH) の測定

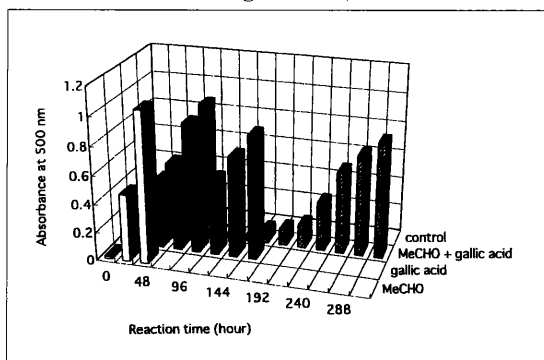
Cosmosil  $_5$ C<sub>18</sub>-AR (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm) カラム, 移動相として MeCN : H<sub>2</sub>O : HOAc=6,500 : 3,500 : 3, ウォーターズ 991J の HPLC, 流速0.9 mL/min で LA および LOOH を分析した。

Table 1. Chemiluminescence of LOX from soybean as receptive species in the presence of active oxygen species and catalytic species

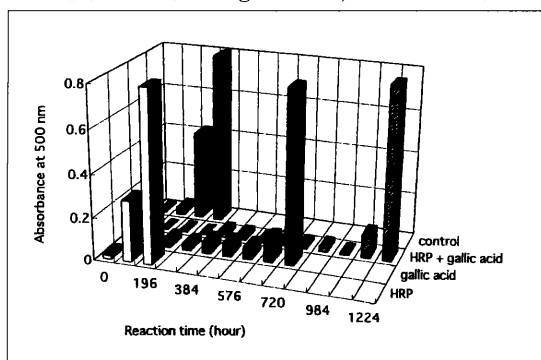
|                              | Photon counts (CPS)           |                 |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------|
|                              | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | <i>t</i> -BuOOH |
| (-)-Catechin                 | 44                            | 184             |
| (-)-Epicatechin              | 38                            | 138             |
| (-)-Catechin gallate         | 54                            | 293             |
| (-)-Epicatechin gallate      | 62                            | 282             |
| (-)-Gallocatechin            | 62                            | 343             |
| (-)-Epigallocatechin         | 64                            | 367             |
| (-)-Gallocatechin gallate    | 109                           | 270             |
| (-)-Epigallocatechin gallate | 80                            | 142             |
| Gallic acid                  | 62                            | 107             |

176 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ L and *t*-BuOOH 10  $\mu$ L were used as active oxygen species. 5 mM catechin and gallic acid as catalytic species and 10 mg/mL LOX as receptive species were used for photon emission.

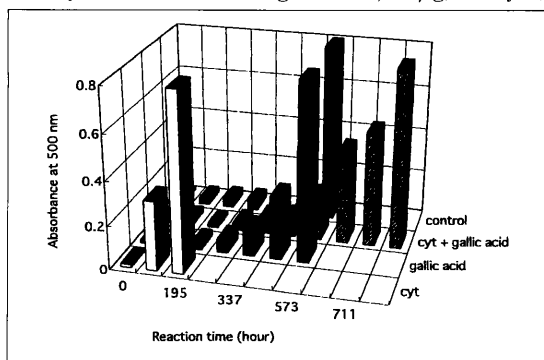
(A) MeCHO (1 mM gallic acid, 10 mM MeCHO)



(B) HRP (1 mM gallic acid, 13.9 nM HRP)



(C) Cytochrome c (0.1 mM gallic acid, 0.4  $\mu$ g/mL Cyt c)



(D) SOD (0.1 mM gallic acid, 0.02  $\mu$ g/mL SOD)

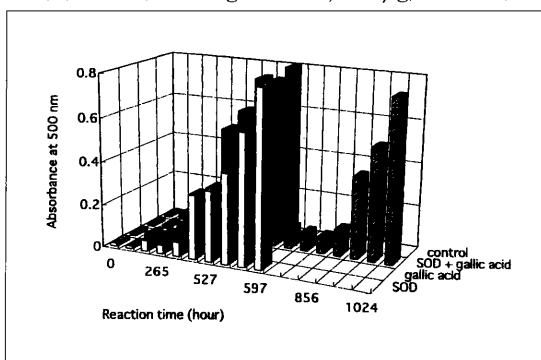


Fig. 2. Effects of gallic acid and receptive species on lipid autoxidation.

## 結 果

### LOX の微弱発光特性

XYZ 微弱発光系における LOX の発光特性を調べるために 10 mg/mL LOX 10  $\mu$ L に及ぼす 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ L, 5 mM GA 10  $\mu$ L, 2% MeCHO 10  $\mu$ L および 10% *t*-BuOOH 10  $\mu$ L の影響を調べた。その結果 (Fig. 1 の 1, 2, 3 および 4), GA では無視できるほどの発光であったが, MeCHO と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では僅かに発光が検出され, *t*-BuOOH では GA または MeCHO 共存に匹敵する発光が観察された。さらに XYZ 系について調べた結果 (Fig. 1 の 5, 6, 7 および 8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> においては Y, Z 両方の特性が LOX に顕著にみられ, Z の特性が幾分強いことがわかった。*t*-BuOOH では GA と MeCHO の影響がみられなかった。

次に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と *t*-BuOOH おける Z としての LOX に

及ぼす Y としての catechin 類と gallic acid の影響を調べた。その結果 (Table 1), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> においては (-)-gallo catechin gallate で最も強く, gallo, gallate 類での強い発光傾向が観察された。*t*-BuOOH では (-)-epigallocatechin で最も強く, 続いて (-)-gallo catechin, (-)-catechin gallate, (-)-epicatechin gallate, (-)-gallo catechin gallate の順であり, GA の影響が最も少なかった。比較のために行った典型的な Z である HRP では X としての H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対しては GA の影響が最も強く, LOX は HRP より複雑で X によって Y の組み合わせの異なることがわかった。

スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), HO $\cdot$  消去能に及ぼす Y としての GA の影響

XYZ 微弱発光系において HRP は典型的な Z 特性を示すのに対して LOX は Y と Z の両特性を示すことがわかった。そこで ESR スピントラッピング法により O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO $\cdot$  消去能に及ぼす Y として GA の影響を

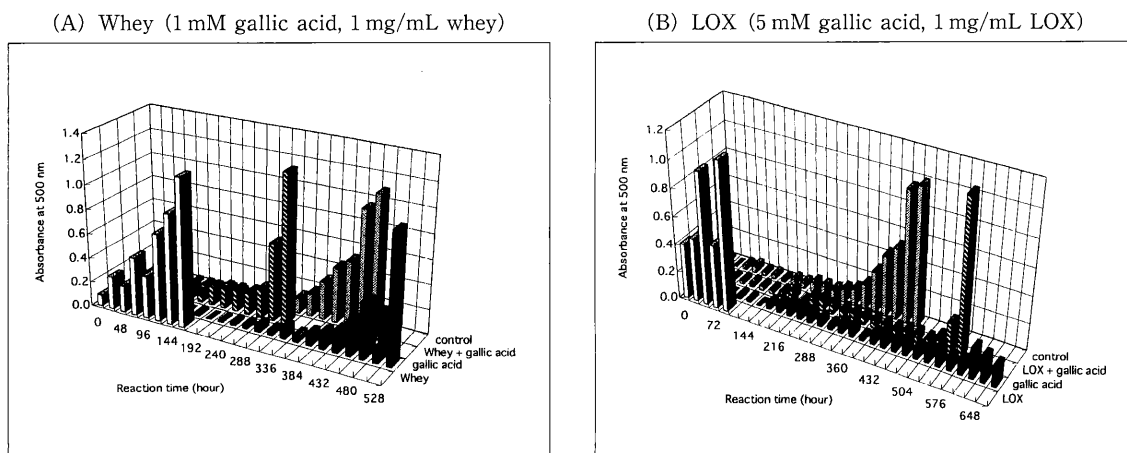


Fig. 3. Effects of gallic acid and receptive species on lipid autoxidation.

Table 2. Effects of horseradish peroxidase or lipoxygenase and gallic acid on the superoxide and hydroxyl radical scavenging activities

|     |            | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> inhibition (SOD unit/mL) |        | HO $\cdot$ -inhibition (%) |       |
|-----|------------|------------------------------------------------------|--------|----------------------------|-------|
|     |            | GA                                                   |        | 1.0 mM GA                  |       |
| HRP | 17.4 nM    | 0.43                                                 | 1.24*  | 11.17                      | 32.04 |
|     | 174.0 nM   | 1.54                                                 | 2.46*  | 6.70                       | 97.28 |
| LOX | 1.0 mg/mL  | 0.52                                                 | 0.84** | 7.77                       | 18.35 |
|     | 10.0 mg/mL | 2.29                                                 | 1.98** | 33.59                      | 98.16 |
| GA  | 0.01 mM    | 0.01                                                 |        |                            |       |
|     | 1.0 mM     | 1.41                                                 |        | 9.32                       |       |

The reaction mixture contained HRP or LOX and 0.01(\*) or 1.0 mM gallic acid(\*\*).

調べた。その結果 (Table 2), 0.01 mM GA の  $O_2^-$  消去能はほとんど観察されなかったが, 1.0 mM GA では 1.41 SOD unit/mL に相当する消去能がみられた。HRP の  $O_2^-$  消去能に対して 0.01 mM GA の著しい相乗効果がみられたが, LOX に対しては 1.0 mM GA でも全くその相乗効果がみられなかった。しかし, HO・消去能においては HRP, LOX に対する GA の著しい相乗効果が観察された。この結果から LOX は活性酸素種に対して HRP とは明らかに異なった酸化還元挙動を示すものと推測される。

#### LA の自動酸化に及ぼす LOX の影響

##### (1) 自動酸化に及ぼす影響

XYZ 微弱発光系において MeCHO, HRP, Cyt c, SOD は典型的な Z 成分である。ロダン鉄法で LA の自動酸化に及ぼす Z としての影響を調べた。その結果 (Fig. 2), Z は LA の自動酸化を促進するが, GA と

共存すると LA の自動酸化を抑制した。同様に whey と LOX の影響を調べた結果 (Fig. 3), いずれも LA の自動酸化を著しく促進し, GA によってその促進が抑制されたが, GA 以上の抗酸化性はみられなかった。

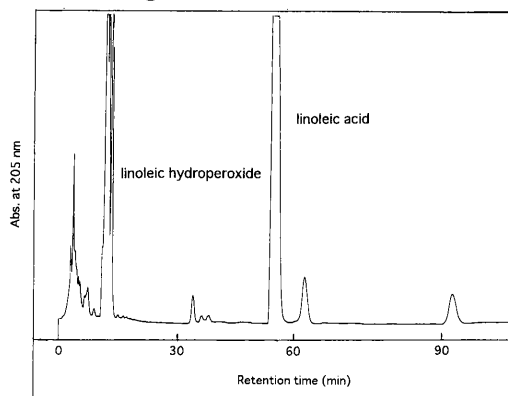
##### (2) HPLC による検討

LOX による LA の酸化および GA によるその抑制挙動を HPLC で調べた。その結果 (Fig. 4), LOX の添加により LOOH ピークが観察され, GA の共存によりこれらのピークの生成が抑制された。

##### (3) LOOH に及ぼす LOX と GA 共存の影響

LA を放置することにより LOOH の生成を試みた結果 (Fig. 5), LOOH:LA=6.2:1 の試料を得ることができた。これに LOX と GA を添加し, HPLC で調べた結果, 0.1 mM GA では LOOH:LA=4.2:1, 0.5 mM では 3.3:1 と明らかに gallic acid の増加に伴いペルオキシリノール酸の減少がみられた。従って,

(A) LA + 0.1 mg/mL LOX



(B) LA + 0.1 mg/mL LOX + 0.1 mM gallic acid

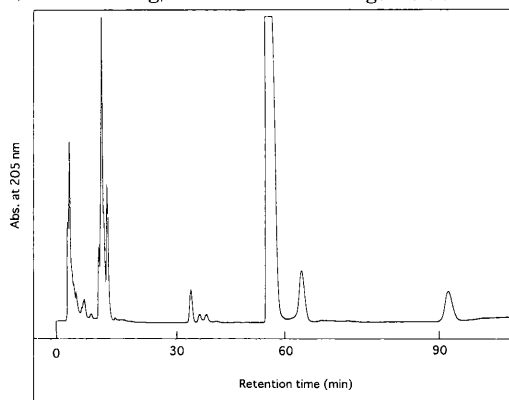
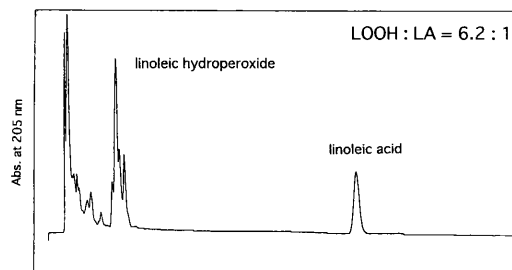
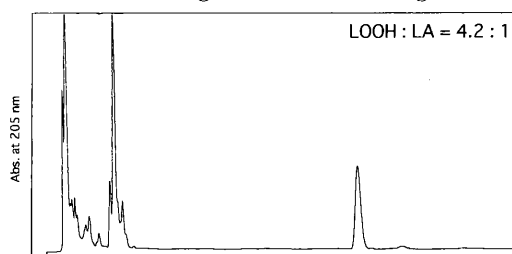


Fig. 4. Effects of LOX and gallic acid on linoleic acid. Column, cosmosil  $\mu$ C<sub>18</sub>-AR (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm); mobile phase, MeCN : H<sub>2</sub>O : HOAc=6,500 : 3,500 : 3; flow rate, 0.9 mL/min.

(A) LOOH



(B) LOOH + 0.1 mg/mL LOX + 0.1 mM gallic acid



(C) LOOH + 0.1 mg/mL LOX + 0.5 mM gallic acid

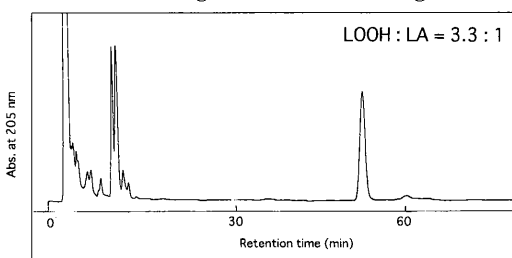


Fig. 5. Effects of LOX and gallic acid on lipid hydroperoxide. Lipid hydroperoxide concentration was measured by ferric thiocyanate method.

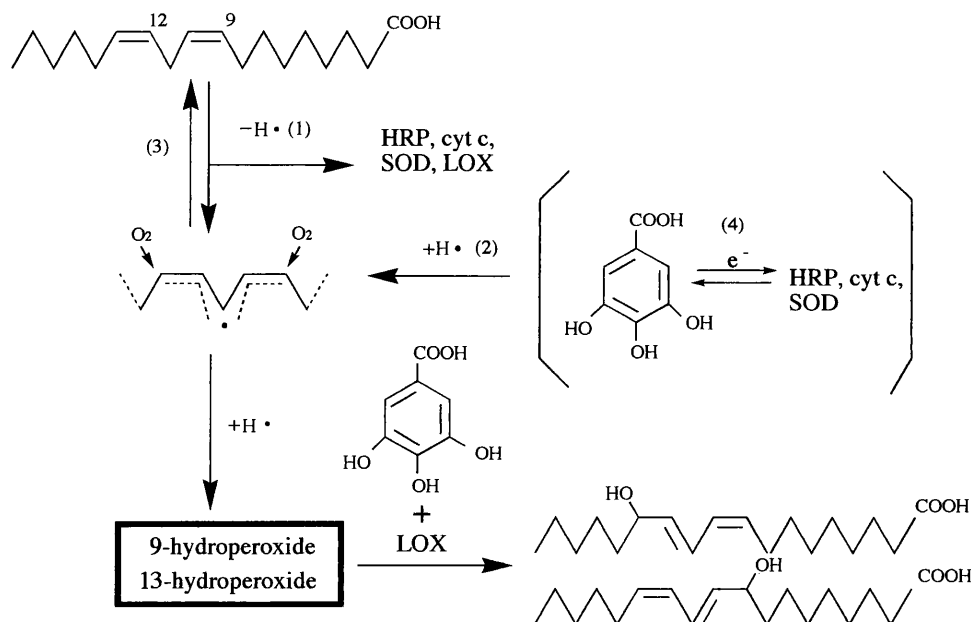


Fig. 6. Possible mechanism for XYZ system during autoxidation of linoleic acid.

LOX と GA は LOOH を消去していることが明らかである。

## 考 察

XYZ 微弱発光系において MeCHO, DDMP サポニン, HRP, Cyt c および SOD は典型的な Z 成分であるが, LOX は Y と Z の両特性を示した。従って, 微弱

発光においては Y としての GA の影響が少なかったが, LA の自動酸化においては GA による酸化抑制効果とその共存による LOOH の消去能が確認された。従って, Fig. 6 に示すように LOX は典型的 Z 成分同様にリノール酸からの水素引き抜き作用があるが, GA の抗酸化性を抑制し, 同時に水素引き抜き作用も弱まるものと思われる。さらに GA との共存により LOOH の消去にも関与しているものと考察される。

## 要 約

活性酸素はたん白質, 脂質, DNA の損傷など酸化的障害の原因となり, 炎症, 循環器疾患, 癌などを結果的に引き起こす。フラボノイドに代表される天然ラジカル消去物質 (Y) が活性酸素種 (X) およびアセトアルデヒドのような受容種 (Z) の存在下で微弱発光することを最近明らかにした。その微弱発光強度 (P) は三次反応  $P = k [X] [Y] [Z]$  に従う傾向がみられ, リノール酸の自動酸化において Z はプロオキシダントであるが, Y と共存することによりそのアンチオキシダントを協奏的に強めることがわかった。これまで未確認 Y, Z を検索した結果, DDMP サポニンが大豆種子の典型的 Z であり, 大豆リポキシゲナーゼにも Y, Z の特性がみられた。そこで不飽和脂肪酸を基質とする 2 原子酸素添加酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) に着目し, 他金属酵素と比較することより XYZ 系における LOX の役割について検討した。その結果, ホースラデッシュペルオキシダーゼ (HRP), スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) およびシトクローム c (Cyt c) が XYZ 系において典型的な Z として作用するのに対し, LOX は Y および Z として両方の作用を示した。スーパーオキシド消去活性を測定した結

果, 10.0 mg/mL LOXは2.29 SOD unit/mL に相当する活性を示し, またヒドロキシルラジカル消去能では gallic acid (Y) との著しい相乗効果が観察された。リノール酸を用いた抗酸化活性および LOOH 消去活性でもまた gallic acid との相乗効果が見られた。

## 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 and Yotsuhashi K (1996) : Mechanism of catechin chemiluminescence in the presence of active oxygen. *J Biolumin Chemilumin*, **11**, 131-136.
- 6) Nakatani N and Kikuzaki H (1987) : A new antioxidative glucoside isolated from *Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem*, **51**, 2727-2731.
- 7) 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.
- 8) Kohno M, Yamada M, Mitsuta K, Mizuta Y and Yoshikawa T (1991) : *Bull Chem Soc Jpn*, **64**, 1447-1453.