

大豆由来抗酸化ペプチドと非ペプチド性抗酸化剤の相乗作用

村本光二*・陳 華敏・斎藤晃一郎・小川智久

東北大学大学院農学研究科

Synergistic Effects of Antioxidative Peptides from a Soybean Protein Digest on the Antioxidative Activity of Nonpeptidic Antioxidants

Koji MURAMOTO, Hua-Ming CHEN, Koichiro SAITO and Tomohisa OGAWA

Graduate School of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981

ABSTRACT

The antioxidative properties of synthetic peptides, which were designed based on the antioxidative peptide from a soybean protein digest, were examined with regard to their antioxidative activity against the peroxidation of linoleic acid, and the scavenging effects on active oxygen and free-radical species. The antioxidative activities of these peptides in an emulsion oxidation system using 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride as a radical initiator correlated well with in an aqueous system. Although the peptides had a quenching activity on singlet oxygen, they did not show antioxidative activity in an 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile)-induced oxidation system nor scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide. The metal-ion chelating activities and the hydrophobicities of these peptides showed no direct correlation with their antioxidative activities. Nonpeptidic antioxidants, such as tocopherol, BHA and BHT, potentiated the antioxidative activities of the peptides. The magnitude of the synergism had no relationship with the antioxidative activities of the peptides. The random tripeptide library consisting of two histidine or two tyrosine residues was, then, constructed in order to further explore the relationship between the antioxidative activities and the synergistic effects. Tyr-His-Tyr was found to be the most active with or without nonpeptidic antioxidants. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 55-61, 1997.

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

たん白質を加水分解すると抗酸化性をもつようになることが以前から知られているが、その作用機構などの詳細については不明である。そこで筆者らは、大豆たん白質 β -コングリシニンのプロテアーゼ分解物から単離した抗酸化ペプチド Leu-Leu-Pro-His-His

(LLPHH)をモデルとして、Leu, Pro, His の数と配列をいろいろ変えて28種類の関連ペプチドを化学合成し、水溶液系におけるリノール酸の自動酸化に対するペプチドの抗酸化性を検討した¹⁻³⁾。合成した LLPHH は 5.0×10^{-5} M 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。LLPHH のN末端を1残基ずつ除去した LPHH, PHH および

*〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

HH にも活性が認められ、PHH には特に強い抗酸化性がみられた。しかし、PHH を逆向きに配列した HHP や 2 残基目の His を D 型にした P^DHH は弱い抗酸化力しか示さず、これらのことから LLPHH の抗酸化性発現には 2 残基の His がもつイミダゾール基の適正な配置が重要であることが明らかになった。

本研究では、大豆たん白質分解物がもつ抗酸化性の相乗作用の詳細を明らかにするために、上記 His 含有ペプチドの抗酸化特性、すなわち異なる系における抗酸化性や、フリーラジカル、一重項酸素、スーパーオキシドの消去作用を調べ、さらにこれらの特性とペプチドの金属イオンキレート形成能や疎水性との関連を検討した。また、Tyr(Y) 及び His を 2 残基配置したトリペプチドのライブラリーを作成し、スクリーニングで選り出した抗酸化ペプチド Y-Arg-Y, Y-Lys-Y, Y-His-Y についても、クエン酸、BHA、 α -及び δ -トコフェロールに対する相乗作用を調べた。

実験方法

ペプチドの化学合成

ペプチドの化学合成は、高効率多製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。

ラジカル開始剤による誘導酸化におけるペプチドの抗酸化性

リノール酸の 1% Triton X-100/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) エマルジョンにペプチド (33 μ M) を加え、溶存酸素計のセルに入れた。水溶性ラジカル開始剤として 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 水溶液 (50 mg/mL 蒸留水) 100 μ L を注加し、溶存酸素量が 50% まで減少した時間 (誘導時間) を酸素電極で測定した。

リノール酸エタノール溶液 0.5 mL、ペプチドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.8 mL 及び脂溶性ラジカル開始剤 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) エタノール溶液 0.7 mL を 5 mL 容試験管に入れ、経時的にヘッドスペースからの酸素吸収量をガスクロマトグラフィーで分析した。

一重項酸素の捕捉

試料を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.0 mL、50 mM リノール酸とメチレンブルーを含むエタノール 1.0 mL、及び蒸留水 0.5 mL を 5 mL 容試験管に入れ、光増感酸化反応で生成した一重項酸素の捕捉をリノール酸の過酸化物量から測定した。

フリーラジカルの捕捉

試料を含む 1.5 mL の蒸留水に 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) のエタノール溶液 0.5 mL とエタノール 0.5 mL を加えた。十分に混合した後、室温に 30 分間放置、517 nm における吸光度を測定した。

ペプチドの金属キレート力と疎水性度

金属イオンを負荷したキレートカラム (Pharmacia) HPLC での保持時間によってペプチドのキレート力を比較した (キレート力が強ければ保持時間が長い)。またペプチドの疎水性度は、0.1% トリフルオロ酢酸におけるアセトニトリルのグラジエントで溶出したときの ODS カラムに対する保持時間で比較した。

結果と考察

抗酸化性の相乗作用

40 μ M の合成ペプチド、100 μ M の合成抗酸化剤 BHA と BHT 及び 10 μ M の天然抗酸化剤 δ -トコフェ

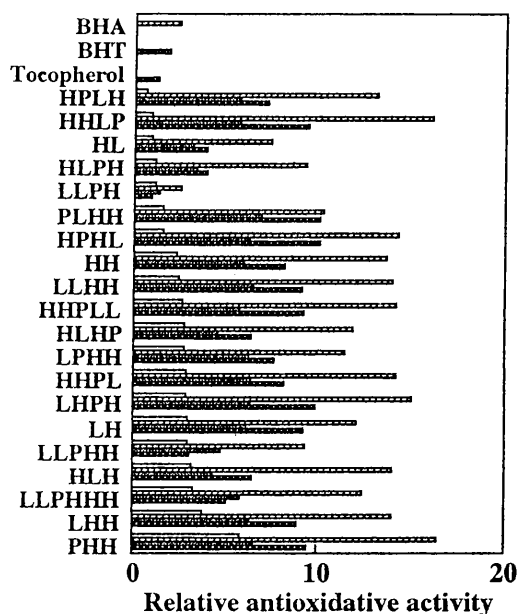


Fig. 1. Synergistic effects of synthetic peptides on the antioxidant activity of nonpeptidic antioxidants. Antioxidative activity was evaluated by the ferric thiocyanate method. The assay was performed with 40 μ M peptides, 100 μ M BHA and BHT, and 10 μ M tocopherol.

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 Fig. 1 に示した。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作用が観察され、その作用の大きさは 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 の相乗作用は抗酸化性の弱いペプチドの作用と同程度であり、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作用を示した。以上の結果から、たん白質分解物と同じく合成ペプチドも非ペプチド性抗酸化剤に対して相乗作用を持っており、その作用の強さはペプチドの抗酸化性の強さには一致しないことが明らかになった。

ラジカル開始剤による誘導酸化におけるペプチドの抗酸化性

均一溶液系におけるリノール酸の酸化をロダン鉄法

で測定して抗酸化ペプチドの精製や単離を行ってきたが、異なる測定系におけるペプチドの抗酸化性を検討するために、エマルジョン系に水溶性ラジカル開始剤 (AAPH) を加えた誘導酸化、及び水溶液系に脂溶性ラジカル開始剤 (AMVN) を加えた誘導酸化に対する抗酸化性を調べた (Table 1)。AAPH の誘導酸化を酸素電極を用いる溶存酸素測定法で求めたペプチドの抗酸化性と、均一溶液系でロダン鉄法による比色法で求めた抗酸化性には相関性がみられた。しかし、均一溶液系で強い抗酸化性を示した PHH と HLH には AMVN 誘導酸化に対する抗酸化力はみられなかった。これは、ペプチドのラジカル開始剤に対する親和性の違いによるものと考えられた。

一重項酸素の捕捉

合成抗酸化ペプチド (40 μ M) の抗酸化性と一重項酸素の捕捉効果には相関がみられた (相関係数 0.82) (Table 1)。ヒスチジン含有ペプチドであるカルノシ

Table 1. Antioxidative properties of His-containing peptides

Peptide	Relative antioxidative activity		Radical scavenging effect		
	Aqueous system ^a	AAPH-induced oxidation system ^b	Singlet oxygen ^c	DPPH radical ^d	Superoxide ^e
HPLP	0.6	0.98	ND	1.05	1.06
HHLP	0.9	0.97	1.29	1.03	1.03
HL	0.9	0.98	ND	1.00	1.06
HLPH	1.2	ND	1.29	1.05	1.00
LLPH	1.2	0.94	1.00	1.00	1.03
PLHH	1.6	1.03	1.18	1.05	0.95
HPLH	1.6	0.97	1.10	1.03	1.03
HH	2.3	1.10	1.25	1.05	1.03
HPH	2.4	1.02	1.15	1.03	0.97
LLHH	2.4	1.03	1.10	1.05	1.00
HHPLL	2.6	1.15	1.22	1.03	1.06
HLHP	2.7	1.14	1.25	1.03	1.00
LPHH	2.7	1.10	1.05	1.00	1.00
HHPL	2.9	1.07	1.22	1.03	1.03
LHPH	2.9	1.12	1.15	1.03	0.97
HHP	2.9	1.06	1.05	1.00	1.09
LH	3.0	1.08	1.02	1.02	1.03
LLPHH	3.0	1.10	1.13	1.00	1.06
HLH	3.2	1.21	1.36	1.05	0.97
LLPHHH	3.3	1.13	1.10	1.08	1.03
LHH	3.8	1.08	1.32	1.05	1.00
PHH	5.8	1.30	1.32	1.03	0.97

a : The data were from Chen et al. (1996). The peptide concentrations were 33 μ M for b, 50 μ M for c, 33 μ M for d, and 40 μ M for e. The results are shown as relative activities by adjusting the control to be 1.00, and are the averages of three independent experiments. ND: not determined.

ンと PHH の一重項酸素の捕捉効果を比較したところ、カルノシンでは濃度の増加に伴って増強し、1 mM で 60%の一重項酸素捕捉効果を示した。一方 PHH では、0.25 mM のとき最大の22%の捕捉効果を示したが、それ以上では捕捉効果の減少がみられた。

フリーラジカルの捕捉

δ -トコフェロールは濃度依存的な DPPH 捕捉効果を示し、50 μ M では32%，250 μ M では92%の DPPH 捕捉効果がみられた。しかし、合成ペプチド (50 μ M) にはほとんど DPPH 捕捉能がみられず、スーパーオキシドの捕捉効果もなかった。

ペプチドの金属キレート力と疎水性度

ペプチドに含まれるヒスチジン残基数が増えるに伴い、金属イオンに対するキレート力の増強が観察された (Table 2)。また、銅イオンとのキレート力においてヒスチジンがペプチドの N 末端に位置する方が C 末端側に位置するより強いキレート力がみられた。ペプチドの疎水性度はアミノ酸組成によって異なり、その

配列には影響されなかった。ペプチドの抗酸化力と金属イオンキレート力及び疎水性度には直接的な相関は検出されなかった。

抗酸化測定試験液からのペプチドの回収と分析

LLPHH をリノール酸自動酸化条件で処理した後、逆相分配系 HPLC でペプチドを分離回収した (Fig. 2)。リノール酸の酸化に伴い LLPHH のピーク (P1) 前後にいくつかのピークが生成していることが観察された。溶出ピークを分取しアミノ酸分析とエレクトロスプレー質量分析を行ったところ、P2 には質量数17の増加がみられた。酸化に伴って修飾を受けたペプチド量は添加ペプチド量の約15%であり、抗酸化ペプチドにはヒドロキシラジカル捕捉作用があることが確認された。

トリペプチドライブラリーの抗酸化性

大豆たん白質から単離した抗酸化ペプチドの構造解析からは、His や Pro に加えて Tyr が重要な働きをしていることが予想された。そこで Fig. 3 のように、

Table 2. Metal-ion chelating activities and hydrophobicities of His-containing peptides expressed by retention times (min)

Peptide	Metal-ion chelating activity		Hydrophobicity
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	
HPLH	28.6	7.0	28.9
HHLP	27.2	13.0	29.2
HL	13.1	3.2	15.2
HLPH	26.9	11.2	29.4
LLPH	4.5	2.5	42.9
PLHH	24.6	15.0	28.9
HPHL	27.8	19.0	32.4
HH	27.6	17.0	8.0
HPH	28.0	12.0	15.8
LLHH	24.9	14.2	40.3
HHPLL	29.0	15.2	42.5
HLHP	30.2	10.8	ND
LPHH	25.2	16.9	27.9
HHPL	29.3	16.2	26.6
LHPH	23.6	8.2	26.3
HHP	28.0	13.6	14.6
LH	4.9	3.1	ND
LLPHH	24.2	14.4	46.1
HLH	28.2	13.0	21.1
LLPHHH	29.3	41.5	ND
LHH	26.1	11.0	20.7
PHH	26.2	6.9	14.4

The metal-ion chelating activities were measured on the metal-ion loaded columns. The hydrophobicities were measured on the ODS column. Experimental conditions are described in the text.

His 及び Tyr を2残基ずつ配置したトリペプチドライブラリーを作成し、ロダゲル法で抗酸化性をスクリーニングしたところ、両端に Tyr をもち、間に塩基性アミノ酸が配置したトリペプチドに最も強い抗酸化性があった。さらにサブライブラリーを作成し、Tyr-Lys-Tyr (YKY), Tyr-Arg-Tyr (YRY), Tyr-His-Tyr (YHY) の抗酸化性を比較した結果、YHY に最も強い抗酸化性がみられた。

トリペプチドの相乗作用

YHY, YKY, YRY と非ペプチド性抗酸化剤の相乗作用を調べるために、各トリペプチド40 μM に100 μM BHA, 100 μM クエン酸, 10 μM の α -及び δ -トコフェロールを共存させたときの抗酸化性を測定した (Fig. 4). YKY と YRY では相乗作用は観察されなかったが、YHY に BHA や δ -トコフェロールを添加した場合には非常に強い相乗作用が観察された。

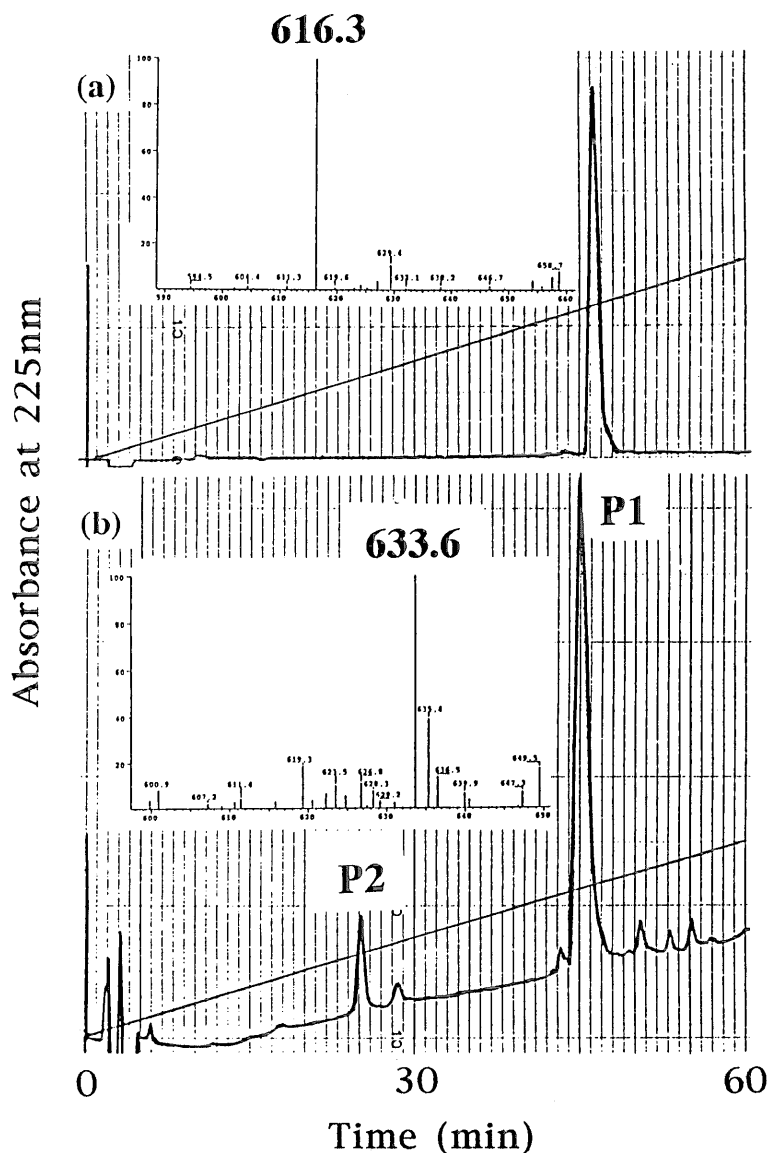


Fig. 2. Reversed-phase HPLC of LLPHH before (a) and after incubating in an aqueous ethanol solution containing linoleic acid (b). Inset indicates mass spectrum of P1 (a and b) and P2 (b).

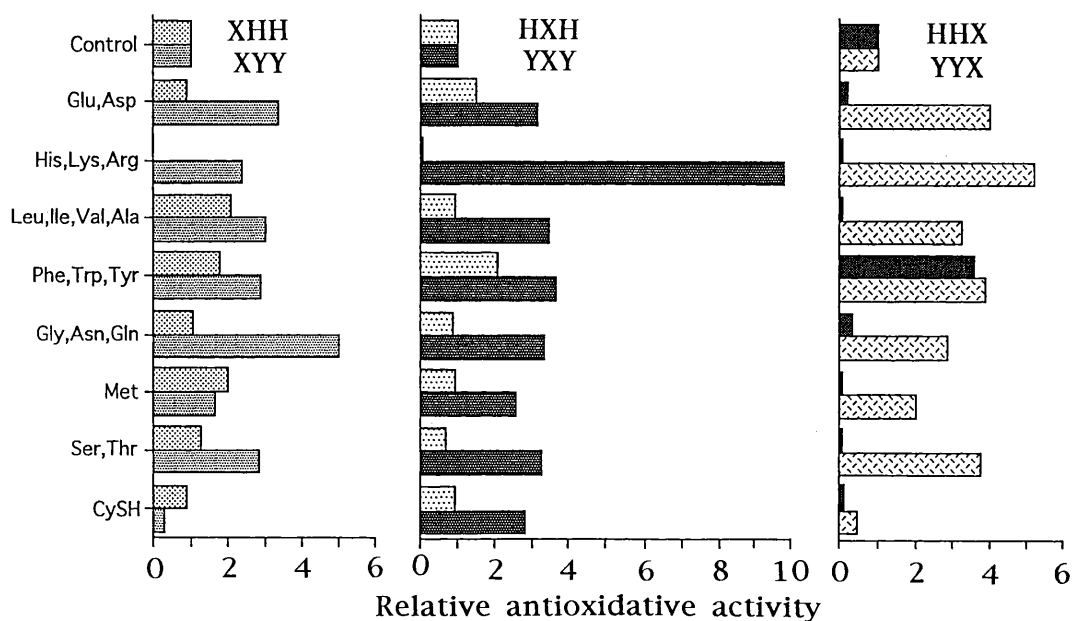


Fig. 3. Antioxidative activities of random tripeptide library. The peptide library was constructed by inserting each group of amino acids to the position X. The assay was performed with 40 μ M peptides.

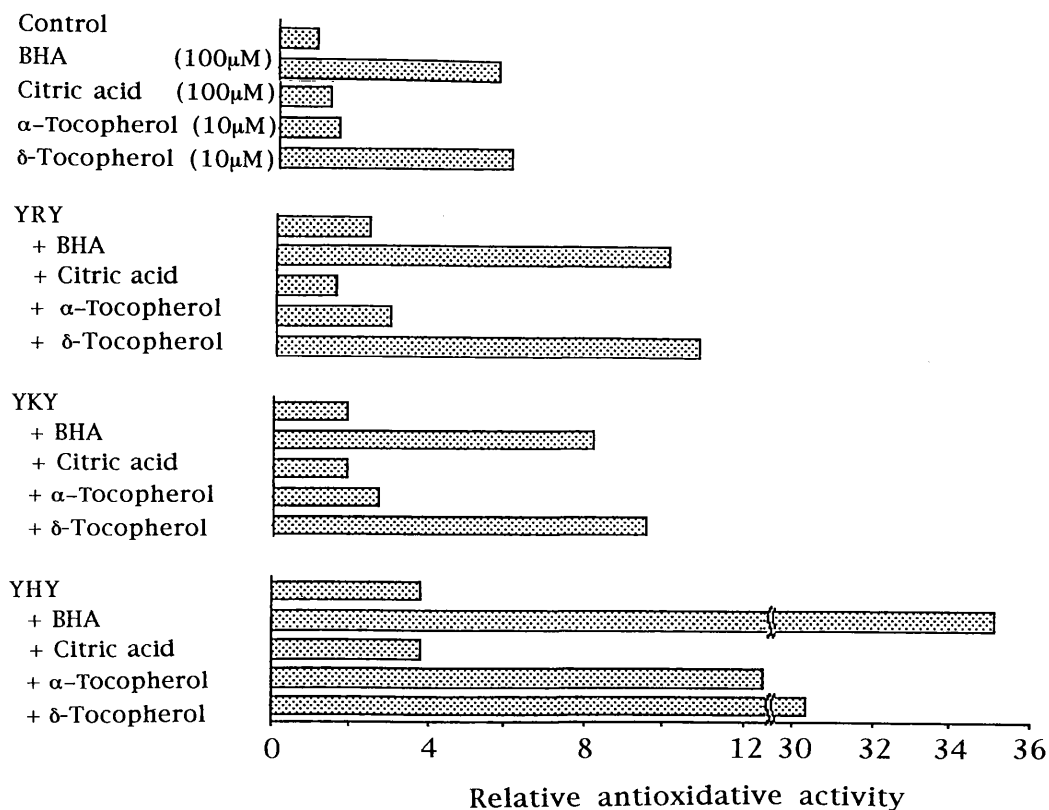


Fig. 4. Synergistic effects of Tyr-containing tripeptides on the antioxidative activity of nonpeptidic antioxidants.

要 約

大豆たん白質 β -コングリシニンの酵素分解物から単離した抗酸化ペプチドをモデルとしてペプチドを化学合成し、それらの抗酸化特性を検討した。ペプチドと非ペプチド性抗酸化剤には抗酸化性の相乗作用がみられた。ペプチドの抗酸化性は、エマルジョン系における水溶性ラジカル開始剤 (AAPH) の誘導酸化によっても確認できた。一方、脂溶性ラジカル開始剤 (AMVN) による誘導酸化においては、抗酸化性がみられなかった。ヒスチジン含有ペプチドには一重項酸素の捕捉効果がみられ、リノール酸の自動酸化においてペプチドがヒドロキシラジカルを捕捉していることも確認された。これまでの結果を総合すると、個々のペプチドは金属イオンとのキレート形成、一重項酸素やラジカル消去作用など、異なる作用機構で抗酸化性や相乗作用を発現していると結論され、大豆たん白質分解物の抗酸化性も多様な作用機構をもつペプチドの協同作用によるものであると理解できる。こうした複雑な機構で抗酸化性を発現するペプチドからより強力な抗酸化ペプチドを選抜するためには、ペプチドライブラリーは優れた手法である。

文 献

- 1) 村本光二, 陳 華敏, 山内文男 (1996): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 23-28.
- 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) Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F and Nokihara K (1996): Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, **44**, 2619-2623.