

微弱発光法による大豆の活性酸素消去能に関する研究： 活性酸素消去成分の検索と大豆リポキシゲナーゼの発光特性

吉城由美子・苑 虎・飯田哲郎・川根政昭・大久保一良*

東北大学大学院農学研究科

Reactive Oxygen Scavenging Activity of Soybean by Photon Emission : Especially Screening Test of Reactive Oxygen Scavenging Components and Photon Emission Characteristics of Soybean Lipoxigenase

Yumiko YOSHIKI, Yuan HU, Tetsuo IIDA, Masaaki KAWANE and Kazuyoshi OKUBO

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555

ABSTRACT

The novel screening test by photon emission in the presence of 2% hydrogen peroxide (X) and 5 mM gallic acid (Y) indicated that a typical Z components was either of iron phosphate (Ⅱ) or (Ⅲ) insoluble in water and that the spectral maxima were 380, 515, 678 and 777 nm. Also the test indicated bases of nucleic acid, some compounds of ketone, amide and carbonic acid, iron chelate and vitamins. Root and root hair of sprouted soybean in the presence of X and Y emitted photon of spectral maxim 507 nm as Z. Soybean lipoxigenase emitted photon of spectral maxim 519 nm in the presence of *t*-butyl peroxide and 690 nm in the presence of *t*-butyl peroxide and gallic acid. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 52-57, 1998.

Key words : photon emission, chemiluminescence, soybean lipoxigenase, reactive oxygen scavenging activity

これまでの一連の研究で、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Yはアンチオキシダントであるのに対し、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協奏的に抗酸化性を促進する。その代表的成

分がDDMPサポニンであり、たん白質もその範疇に入り、味噌、醤油、もやし等の大豆食品に未確認Z成分が存在する予備的結果を得、これまで明らかになった代表的X、YおよびZ成分をTable 1⁶⁾に示した。また、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⁷⁾。本報ではVIMカメラによるYとZ成分の簡易検出、発光スペクトルおよび大豆LOXの発光特性について調べた。

*〒 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

方 法

試薬, フォトン検出用 XYZ 標準液および試料液の調製

没食子酸 (GA) 等の XYZ 関連試薬をナカライテスク (株), 生化学工業 (株), シグマアルドリッチジャパン (株), 三徳化学 (株), メルク (株) および三井化学 (株) からそれぞれ購入した. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) ないし水を溶媒とし, 2% HOOH ないし

Table 1. X, Y and Z components in the XYZ photon emission system

X	Y	Z
O ₂ ⁻	Gallic acid	Acetaldehyde
H ₂ O ₂	Catechins	DDMP saponins
HO•	Flavone	Heme
ROOH	Antocyanin	Heme proteins
RO•		None heme protein
ROO•	Glycation end products	
ROOH	Soybean fermented foods	
NO _x	Chinese medicine	

2% *tert*-butylOOH (*t*-BuOOH) を X, 5 mM gallic acid (GA) を Y および 2% CH₃CHO (MeCHO) を Z として, それぞれの標準液を調製した. ポリトロン (Kinematica AG Littau, PT 10-35) を用い, 各試料の水分散液を強制懸濁して試料液とした.

微弱発光波長の測定

XYZ 系で発生するフォトンの波長を東北電子 (株) 試作 1 ないし 2 号機器 (Model CLA-SP1 or 2) を用い, 次のようにして測定した. すなわち石英セル内に X, Y ないし Z 標準液と試料液を注入し, CL 検出試料室内で攪拌しながら, 発生するフォトン分光器経由で光電面冷却型 ICCD (195-850 nm) で検出し, 波長を解析した.

VIM カメラによる微弱発光の検出

XYZ 系で発生する微弱発光を浜松ホトニクス (株) の ARGUS-50 シリーズを用い, 次のようにして写真撮影した. すなわちウエル型ホールに X, Y ないし Z 標準液と試料液を注入攪拌し, イメージボックス (専用暗箱, Hamamatsu A4178), カメラヘッド (C2400-40, ICCD camera C-2400), カメラコントロールユニット (M314), イメージプロセッサ (C3930-50), カラービデオモニターで検出し, カラービデオプリンター (Mitsubishi SCT-CP 154) で撮影した.

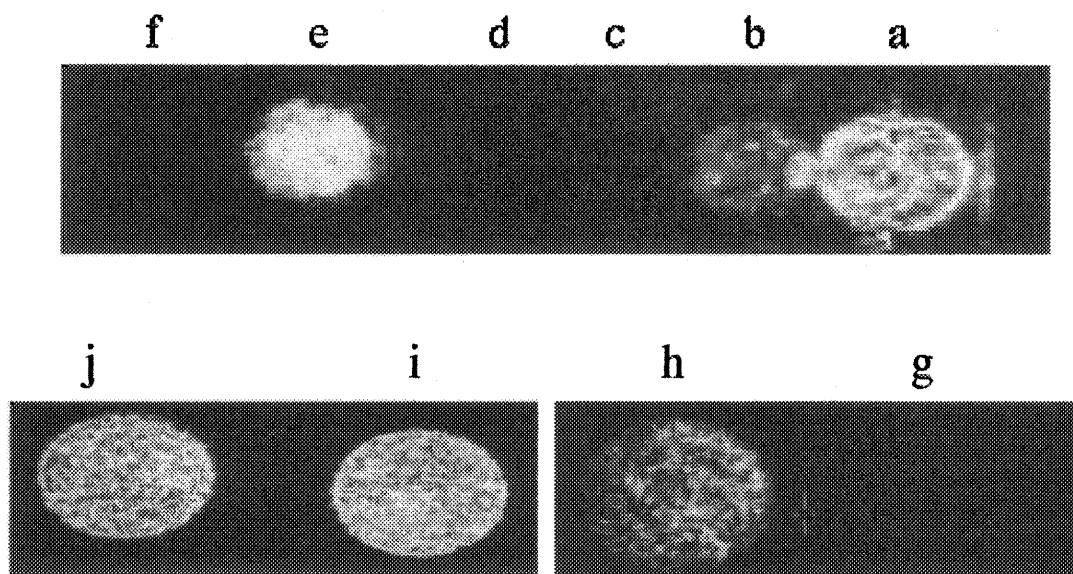


Fig. 1. Photon emission of iron phosphate as Z in the XYZ system. a ; 2% H₂O₂ (X), 5 mmol/L gallic acid (Y) and 0.1% HRP(Z₁) in PBS: b ; X, Y and Z₁ in water: c ; Y and 25 mmol/L FeCl₂ (Z₂) in PBS: d ; Y and Z₂ in water: e ; Y and Z₂ in PBS: f ; Y and Z₂ in water: g ; X, Y and supernatant of from F in water: h ; X, Y and precipitation from F in water: i ; X, Y and iron phosphate (II) in water: j ; X, Y and iron phosphate (III) in water.

結果と考察

不溶性リン酸鉄のXYZ系におけるZとしての微弱発光

ヒドロキシラジカル生成用塩化第一鉄溶液を加えた際に、XYZ系において溶媒として用いたリン酸緩衝液で水より著しい微弱発光がこれまでしばしば観察された。その原因を探るために、Zとしての発光強度の強い0.2% horse radish peroxidase (HRP), Xとして2% HOOH, Yとして5 mM GA, Fとして25 mM FeCl₂を用い、リン酸緩衝液と水での発光を比較した結果 (Fig. 1 a,b), リン酸緩衝液での発光が水でのそれより強かった。そこで次に念のためにHRPを用いずに、Xとして2% HOOH, Yとして5 mM GA, Fとして25 mM FeCl₂比較のために、25 mM FeCl₃を用いて発光を試みた。その結果、予想に反して緩衝液での2% HOOH, 5 mM GA, 25 mM FeCl₂で明らかな発光が観察された (Fig. 1 e)。また、念のために50 mM リン酸緩衝液に水で調製した25 mM FeCl₂を混合してみた結果、わずかな浮遊物の生成がみられたことから、この浮遊物を遠心分離し、

水で洗浄して回収した。この沈澱物を2% HOOHと5 mM GAに懸濁して、VIMカメラで観察し (Fig. 1 h), 波長解析した結果、380, 515, 678, 777 nmに極大波長を示す見事な発光がみられた。この沈澱物を元素分析した結果、その50.22%がFe, 37.83%がP, 10.89%がC, 1.06%がKであり、明らかにリン酸鉄であることがわかった。次に試薬としてのリン酸鉄(Ⅱ)と(Ⅲ)を同様に調べた結果 (Fig. 1 i, j), いずれにおいても同様の発光が観察された。これまでXYZ系微弱発光はXを活性酸素種, Yを触媒種, Zを受容種とする溶液状態で生じる現象であると考えられてきた。しかし、水に不溶性リン酸鉄(Ⅱ)と(Ⅲ)が見事なZであり、Yがフラボン類であることから、Zはむしろ触媒種であり、YがH⁺とe⁻供与体と考えられる。またこのXYZ系の範囲が予想以上に広いものと推察される。

不溶性物質を考慮したZ成分の検索

XYZ系微弱発光ではZは触媒として発光に寄与し、必ずしも溶解している必要のないことがわかったことから、XとY標準液を用い、考えられる試薬についてVIMカメラで検索した。その結果 (Table 2), アデニ

Table 2. Pure chemicals as Z in the XYZ system

Base

guanine (x, ++), cytosine (x, +), thymine (x, +), xanthine (x, +), cytidine (O, ++), arabinocyl cytosine (O, ++), thymidine (O, ++), uridine (O, ++), xanthosine (x, ++), inosine (O, ++), caffeine (O, +)

Ketone, amide, carbonic acid etc.

urea (O, +), 1, 3-dimethyl urea (O, +), iminodiacetic acid (O, +), oxamide (x, +), acetamide (O, +), calcium oxalate (x, ++), iron(Ⅱ) (x, ++), ammonium iron(Ⅲ) oxalate (x, ++), diethyl malonate (O, +), diethyl methylmalonate (O, +), malonamide (O, ++), L-(-)-malic acid (O, ++), DL-malic acid (O, ++), (+)-ammonium tartrate (O, +), dimethyl succinate (O, +), oxalacetic acid (O, +), glutaric acid (O, ++), adipic acid (O, +), 3-methyladipic acid (O, +), mucic acid (x, ++), caffeic acid (O, ++), 3, 4-dimethoxyphenylacetic acid (x, ++), diethylketone (O, +), dimethyl acetal (O, ++)

Iron complex

Iron(Ⅲ) phosphate (x, ++), iron(Ⅱ) phosphate (x, ++), iron(Ⅲ) citrate hydride (x, ++), ammonium iron(Ⅲ) citrate, green (O, +), ammonium iron(Ⅲ) citrate, brown (OO, +), iron(Ⅱ) oxalate (x, ++), ammonium iron(Ⅲ) oxalate (x, ++)

Vitamins

D-panthothenic acid calcium or sodium salt (O, +), vitamin B₁ hydrochloride (O, ++), DL- and L-carnitine (vitamin B_T) hydrochloride (O, ++), L-carnitine dihydrochloride (O, +), pyridoxine and pyridoxal (vitamin B₆) hydrochloride (O, +), orotic acid(vitamin B₁₃) (x, +), nicotinamide (O, +), creatine (O, +), creatinine (O, +)

(O or x : soluble or insoluble in water, + < ++ : intensity of photon emission)

ンを除く核酸の塩基類、ケトン、アミド、カルボン酸類、鉄キレート類、ビタミン類等に多くのZ物質をみつけることができた。従って、XYZ微弱発光系は生体内外で広範囲で見られる発光系であり、活性酸素消去の観点からだけでなく、生体防御、臨床への応用等の観点からも注目される発光系であるものと思われ、そ

の個々の詳細な研究が期待される。

VIMカメラによるYとZ成分の検索

本検索法は各種食品、生体素材等多方面に活用でき、本報ではもやしをその一例として報告する。市販の大豆もやしを入手し、初葉、子葉、胚軸、根および根毛の各部位に解体し、3倍加水して乳鉢で磨碎した後、

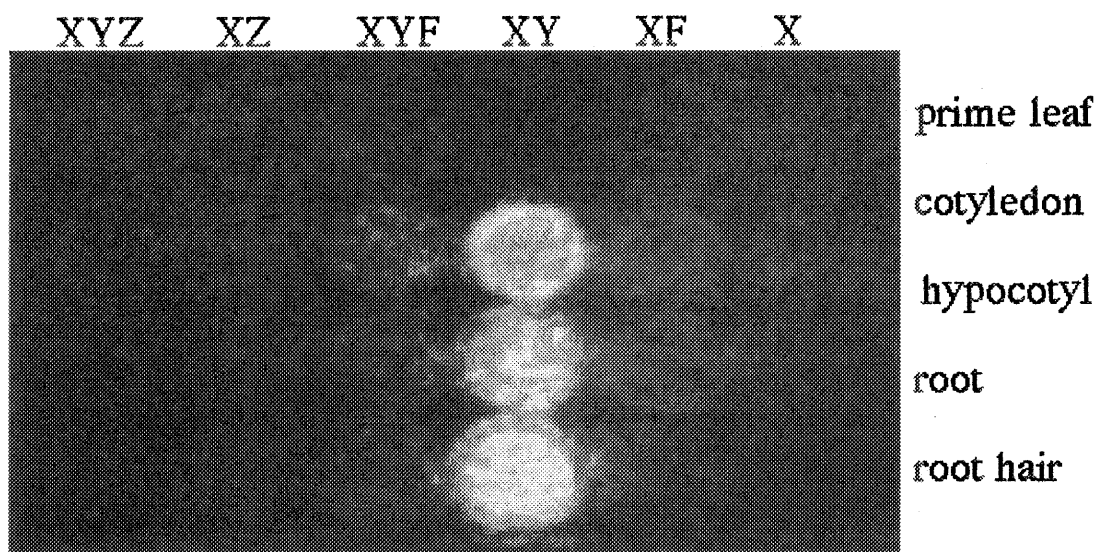


Fig. 2. Screening test for Y and Z of sprouted soybean in the XYZ system.

X ; 2% HOOH, 0.5 mL : Y ; 5m M gallic acid, 0.5 mL : Z ; 2% CH₃CHO, 0.5 mL : F ; 25 mM FeCl₂, 0.5 mL.

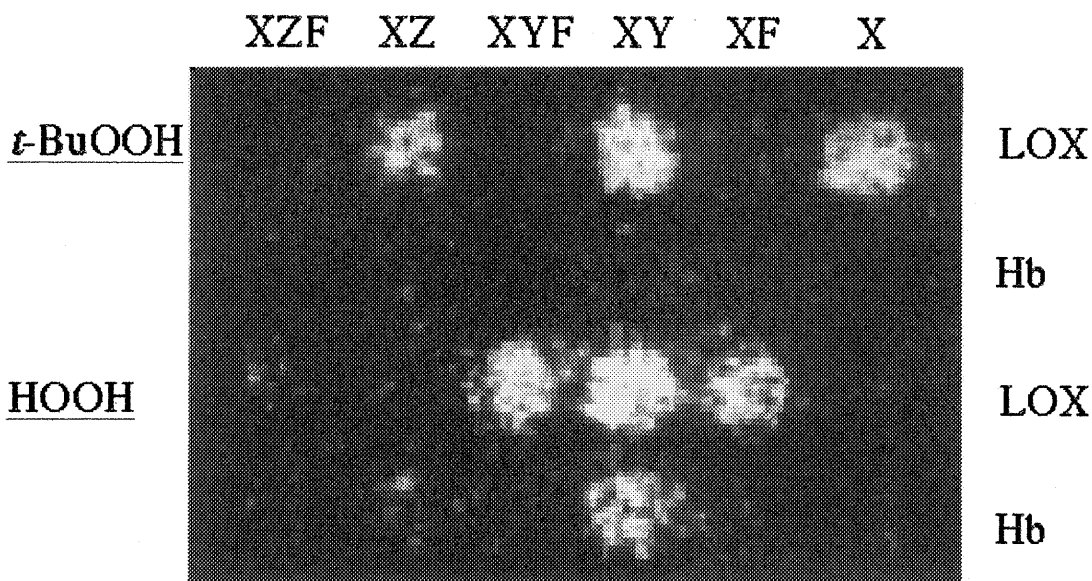


Fig. 3. Screening test for Y and Z of hemoglobin (Hb) and lipoxigenase (LOX) in the XYZ system.

X ; 2% HOOH or 2% *t*-BuOOH, 0.25 mL : Y ; 5 mM gallic acid, 0.25 mL : Z ; 2% CH₃CHO, 0.25 mL : F ; 25 mM FeCl₂, 0.25 mL : Hb ; 0.2%, 0.25 mL : LOX ; 0.7%, 0.25 mL.

ポリトロンでその懸濁試料液を得た。これにX, Y, Z およびF標準液を加え, VIMカメラで発光挙動を観察した。その結果 (Fig. 2), 初葉部位ではいずれの標準液でも発光が観察されなかったが, 他の部位ではXY標準液で発光が観察され, 根毛>根>胚軸>子葉の部位順に強く, その極大波長は507 nmである興味ある結果が得られた。すなわちYと共存することによりXを消去するZ成分の存在が示唆され, 生体では防御成

分として関与していることが示唆された。

リポキシゲナーゼ (LOX) の発光特性

XYZ系微弱発光において典型的なZ成分であるヘモグロビン (Hb) を対照にし, VIMカメラによるLOXの発光特性を次のようにして調べた。すなわち0.2% Hbと0.7% LOXを試料溶液とし, 2% HOOHないし2% *t*-BuOOHのX標準液, 5 mM GAのY標準液, 2% MeCHOのZ標準液および25 mM FeCl₂のF標準液を用い, VIM

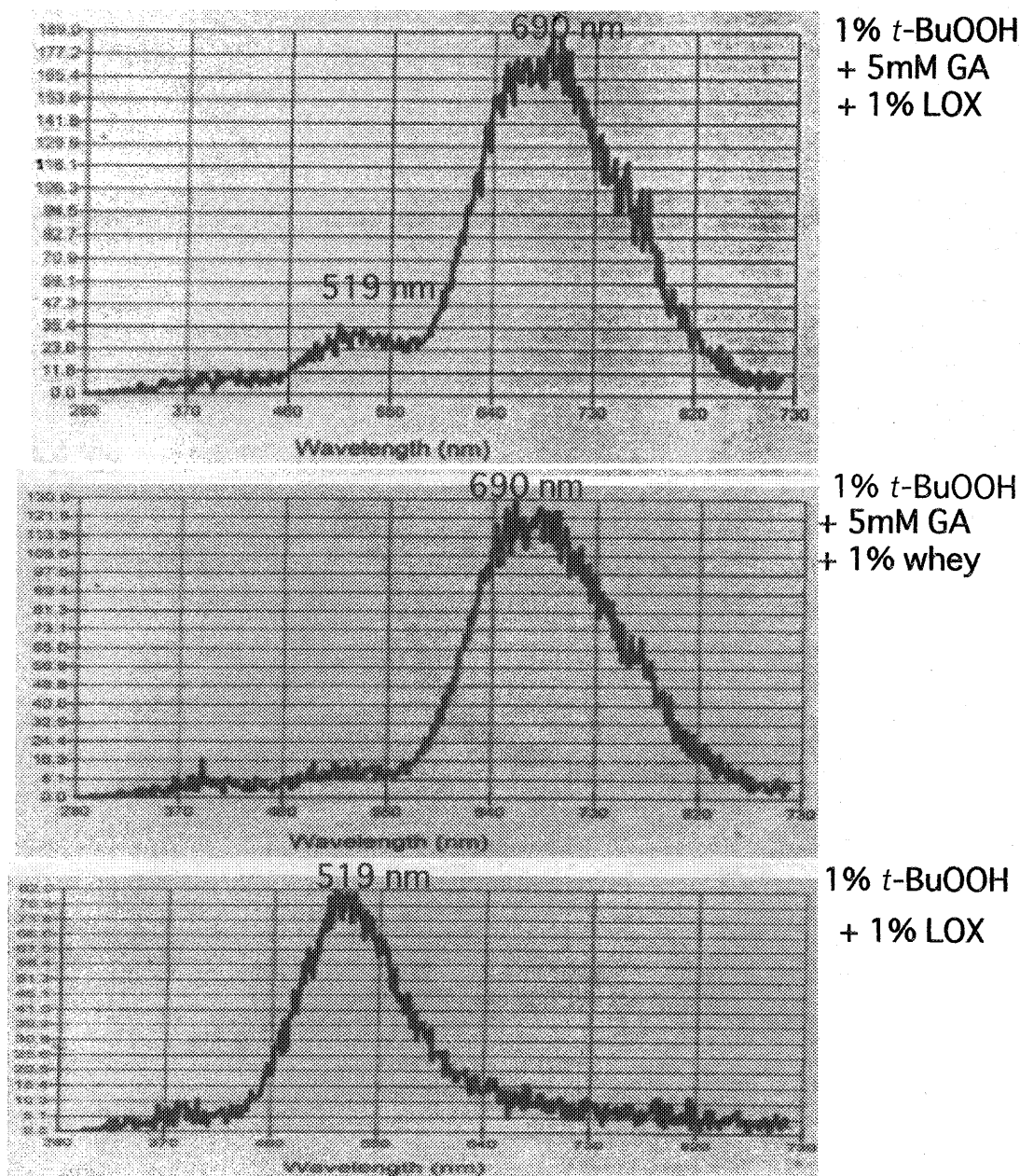


Fig. 4. Photon spectra of lipoxigenase (LOX) and whey in the presence of 1% *t*-BuOOH and 5 mM gallic acid.

カメラで発光現象を観察した。その結果 (Fig. 3), Hb では 2% HOOH の X と Y でのみ発光が観察されたが, LOX では 2% HOOH の X と F, 2% HOOH の X と Y, 2% HOOH の X と YF, 2% *t*-BuOOH の X, 2% *t*-BuOOH の X と Y および 2% *t*-BuOOH の X と Z で発光が観察された。この結果は Hb が HOOH の消去に Z として寄与しているが, *t*-BuOOH のペルオキシドの消去には寄与せず, LOX とは明らかに異なることがわかった。この Hb の特性に対し, LOX は Y ないし F と共存することにより HOOH の消去に寄与しているが, *t*-BuOOH のペルオキシドの消去にはそれ自身で寄与できることがわかった。しかもこの寄与に Z は邪魔しないが, F と共存すると全く発光しないことから, ペルオキシド

の消去であり, そのオキシラジカルの消去には寄与しないものと推察される。この LOX の発光特性は過酸化脂質の消去およびその検出に応用できるものと期待される。

X として 1% *t*-BuOOH, Y として 5 mM GA を用い, X + Y + 1% LOX, X + Y + 1% whey および X + 1% LOX の発光波長解析を行った。その結果 (Fig. 4), X + Y + 1% LOX と X + Y + 1% whey では 690 nm に主極大と 519 nm に副極大波長を持つ類似の発光波長曲線であったが, X + 1% LOX では 519 nm にだけ極大波長を持つ発光波長曲線であった。従って, 690 nm は XYZ 三者で, 519 nm は XY 二者でそれぞれ生じる励起種からの発光であることがわかった。

要 約

XYZ 微弱発光系は活性酸素消去系としても注目されることから VIM カメラによる Z 成分の検索を試みた。その結果, 水に不溶なリン酸鉄で Z として 380, 515, 678, 777 nm に極大波長を示す発光がみられた。さらに試薬を検索した結果, 核酸の塩基類, ケトン, アミド, カルボン酸類, 鉄キレート類, ビタミン類等に多くの Z 物質をみつけることができた。VIM カメラによる YZ 成分の簡便検索法を開発し, 大豆もやしの根, 根毛で Z として 507 nm に極大波長を示す発光がみられた。同様にリポオキシゲナーゼの発光特性を調べた結果, ヘモグロビンとは異なり, *t*-BuOOH との二者で 519 nm に, 没食子酸との三者で 690 nm に極大波長を示す発光を観察することができた。

文 献

- 1) Yoshiki Y, Okubo K, Onuma S and Igarashi K (1995) : Chemiluminescence of benzoic 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) Yuan H, Yoshiki Y and Okubo K (1998) : Screening test for reactive oxygen scavenging biomaterials by photon emission in the presence of reactive oxygen species (X), catalytic species (Y) and acceptive species (Z). *International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence*, Sept. 4-8, Boronia, Italy.
- 7) 吉城由美子, 川根政昭, フスニザ フセイ, 苑虎, 大久保一良 (1997) : 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, 特に大豆リポオキシゲナーゼについて. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 42-48.