

大豆リポキシゲナーゼのXYZ系微弱発光とその応用

吉城由美子・佐竹久美・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

Photon Emission Characteristics of Soybean Lipoyxygenase in the Presence of Reactive Oxygen Species (X), Hydrogen Donors (Y) and Mediators (Z), and the Application

Yumiko YOSHIKI, Kumi SATAKE, 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% HOOH (X), 5 mM gallic acid (Y, GA) and 2% CH₃CHO (Z, MeCHO) indicated that soybean lipoyxygenase (LOX) was as Z rather than Y. Galloyl moiety on C-3 and hydroxyl moiety on C-5' of catechin group were effective on the photon emission of LOX in the XYZ system. $[P]=k[X][Y][Z]$ was observed at low concentration of *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BuOOH) on the photon emission of LOX in the XYZ system. It made clear that photon emission of LOX in the XYZ was not caused by singlet oxygen. E_e (kcal/mol) calculated from emission spectra indicated that the photon emission should be caused by excited triplet carbonyl via O-O bond dissociation. Although photon emission of hemoglobin (Hb), superoxide dismutase (SOD) and horseradish peroxidase (HRP) was observed at some specific hydroperoxide, the photon emission of LOX was observed at HOOH, *tert*-BuOOH, methylethylketone hydroperoxide (MEKOOH) and cumene hydroperoxide (cumeneOOH). Indeed, the photon intensity from the oil/GA/LOX system corresponded with peroxidation of linoleic acid and food oil such as salad oil. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 49-54, 1999.

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

これまでの一連の研究で、X (活性酸素種)、Y (H・ドナー) および Z (メディエーター) 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

カベンジャーの速度論的解析により、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¹⁻⁶⁾。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。大豆た

*〒 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

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⁷⁻⁹⁾。本報ではさらに
LOX 発光特性について調べ、過酸化測定法への応用に
ついて考察した。

方 法

LOX の精製

LOX (ナカライテスク) を既報⁷⁾に従って精製した。
試薬, フトン検出用 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て 2% HOOH ないし 2%
tert-butylhydroperoxide (*tert*-BuOOH) を X, 5 mM gallic
acid (GA) を Y および 2% CH₃CHO (MeCHO) を Z 標
準液として調製した。

微弱発光強度の測定

既報⁷⁻⁹⁾に従い、Z として 2% (360 mM) MeCHO, Y
として 5 mM GA, X として微弱発光強度を測定した。

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、
発生するフォトン分光器経由で光電面冷却型 ICCD
(400-850 nm) で検出し、波長を解析した。

CCD 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、写真撮影した。

リノール酸過酸化度の測定

リノール酸 (ナカライテスク) を、酸素をバブリン
グしながら沸騰湯浴中に 5 時間保った。これを 30 分ま
たは 1 時間おきにサンプリングして試料とした。食用
油脂 (オリーブ油, コーン油, サラダ油, ゴマ油) を
日光照射, 冷所保存, 室温保存したものを試料とした。
即席麺を粗く砕いてシャーレに入れ, 直射日光と 60°C
恒温器中に放置した。これを 1g ずつサンプリングし、
エタノールでの抽出液を試料とした。

過酸化物質の測定

ロダン鉄¹⁰⁾, Wheeler 法¹¹⁾で過酸化物質を測定した。
XYZ 系微弱発光法では、Z として 63 μM LOX, Y とし
て 5 mM gallic acid, X として各試料を用いた。

結果と考察

標準系 (HOOH/GA/MeCHO) における LOX の微弱発光

LOX の微弱発光特性を調べるために、CCD カメラに
よる微弱発光検出を行い、他の Z 成分であるヘモグロ
ビン (Hb), スーパーオキシドデスモターゼ (SOD),
ホースラデッシュペルオキシダーゼ (HRP) と比較し
た。その結果 (Fig. 1), LOX の微弱発光は、他の Z 成
分とは異なり、Y と Z 両方の作用を示すことがわかつ
た。さらに微弱発光強度を測定した結果、Y として
476 counts/s, Z としてその約 2 倍である 893 counts/s で
あることがわかった。

活性酸素種/カテキン類/LOX の微弱発光

活性酸素種 (X) として HOOH, *tert*-BuOOH を用い、
カテキン類 (Y) 存在下における LOX の微弱発光強度
を比較した。その結果 (Fig. 2), LOX は HOOH よりも
tert-BuOOH 存在下で高い微弱発光強度を示し、*tert*-
BuOOH に対し特異性が高かった。カテキン類 (Y) の
構造に着目し微弱発光強度を比較すると、HOOH 存在
下では、カテコール体よりもピロガロール体が高い。

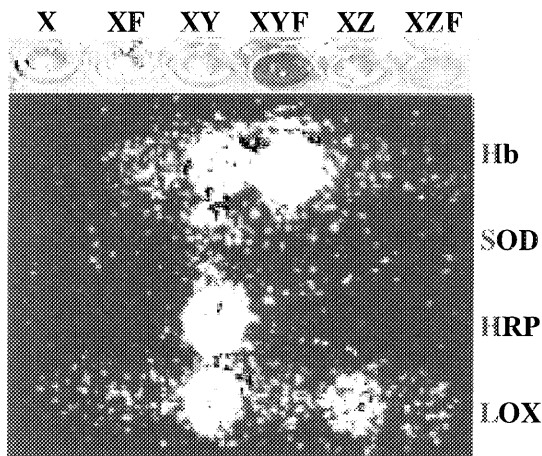


Fig. 1. Photon emission for hemoglobin (Hb), superoxide
dismutase (SOD), horseradish peroxidase (HRP)
and soybean lipoxygenase in the XYZ system.

Sample : 31 μM Hb, 7.8 μM SOD, 5.7 μM HRP
and 6.3 μM LOX in 50 mM phosphate
buffer, pH 7.0, each 0.5 mL.

Reagent : X, 2% HOOH ; Y, 5 mM gallic acid
(GA) ; Z, 2% CH₃CHO (MeCHO) ; F, 25
mM FeCl₂, each 0.5 mL.

Detection : CCD camera.

またガレート体で高く、C-3 位のガロイル基、C-5' 位のヒドロキシル基が LOX の微弱発光に参与している。 *tert*-BuOOH 存在下でも、C-3 位のガロイル基、C-5' 位のヒドロキシル基に対し HOOH 存在下での微弱発光と同様の傾向を示した。しかしながら、ガロカテキнгаレート、エピガロカテキнгаレートの微弱発光はガロカテキン、エピガロカテキンよりも低く、HOOH 存在

	H ₂ O ₂	<i>tert</i> -BuOOH
Catechin	440	1,840
Epicatechin	380	1,380
Catechin gallate	540	2,930
Epicatechin gallate	620	2,820
Gallocatechin	620	3,430
Epigallocatechin	640	3,670
Gallocatechin gallate	1090	2,700
Epigallocatechin gallate	800	1,420
Gallic acid	620	1,070

(CPS)

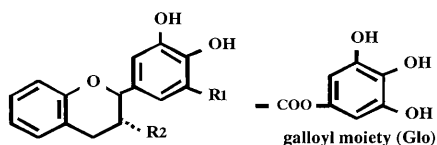


Fig. 2. Effect of catechin group on the photon emission in the presence of LOX and HOOH, or *tert*-BuOOH.

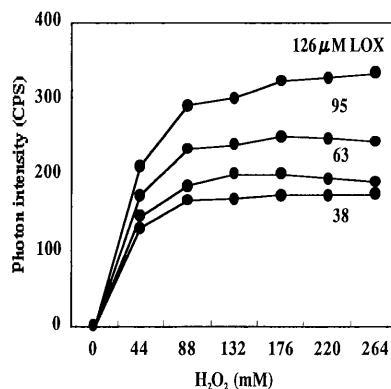
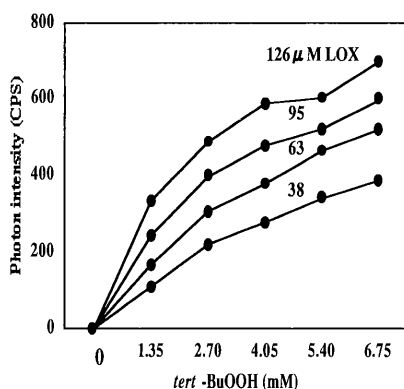


Fig. 3. Concentration dependence of photon intensity in the *tert*-BuOOH/GA/LOX and HOOH/GA/LOX.

下での微弱発光とは異なる結果を得た。これは HOOH と *tert*-BuOOH の構造特性、分子サイズの違いに由来すると考えられる。すなわち *tert*-BuOOH のようなハイドロペルオキサイドとの反応にはある一定の空間配置が必要であり、ガロカテキнгаレートでは C-3 位と C-5' 位付近の分子密度が高まり立体障害が生じたものと仮定できる。その他、エピカテキンの C-2 位と C-3 位の立体異性体であるカテキンで 100-500 counts/s 高い微弱発光強度を示すことから、*tert*-BuOOH 存在下での LOX の微弱発光には立体構造が重要な因子であることがわかった。

LOX 微弱発光の濃度依存性

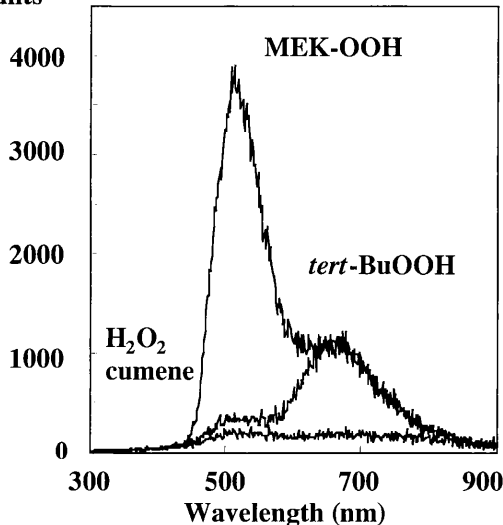
XYZ 三者間の濃度と微弱発光強度との関連について検討した。その結果 (Fig. 3), 6.75 mM 以下の低い *tert*-BuOOH 濃度では, $[P] = k [X] [Y] [Z]^5$ に従う濃度依存性がみられた。しかし, 44 mM 以下の HOOH では微弱発光が弱すぎて同様の濃度依存性をみることができなかったが, 88 mM 以上の HOOH では, フラット現象が初めて観察され, その消去能に限界のあることが示唆された。

LOX 微弱発光波長の解析

基準 XYZ 系である 196 mM HOOH (X), 5 mM GA (Y), 360 mM MeCHO (Z) の発光スペクトルを解析した結果, 657 nm のピークをもつ発光スペクトルが得られ, その発光強度は 86 count/s であった。次に, X として 176 mM HOOH, 6.75 mM *tert*-BuOOH, 6.56 mM クメンヒドロペルオキシド (cumeneOOH), 4.8 mM メチルエチルケトンヒドロペルオキシド (MEKOOH), Y として 5 mM GA, Z として 63 μM LOX を用い, XYZ の組み合わせで各々 0.4 mL ずつ石英セルに入れ, 180 秒間測定を行った。発光スペクトル, 強度および励起

20 mg/mL LOX/5 mM gallic acid

counts



	E _{max} (nm)	E _e (kcal/mol)	Intensity (CPS)
H ₂ O ₂	507	60.9	455
<i>tert</i> -BuOOH	671	48.5	607
Cumene-OOHe	667	61.9	261
MEK-OOH	507	60.6	4800

Fig. 4. Spectra of photon emission in the presence of LOX, GA and X (HOOH, *tert*-BuOOH, cumeneOOH, MEKOOH), and E_e (kcal/mol).

エネルギーを算出した (Fig. 4). 発光スペクトルのピークの上下各々 10% 削除した部分において、発光強度が 1/2 になる波長 λ を求め、次式 (1) に代入して励起エネルギー E_e を計算した.

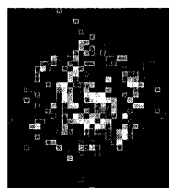
$$E_e (\text{kcal/mol}) = 2.86 \times 10^4 / \lambda \quad \dots\dots (1)$$

発光ピークは HOOH/GA/MeCHO 系, cumeneOOH/GA/LOX 系および *tert*-BuOOH/GA/LOX 系では 665 nm 付近で類似しており, HOOH/GA/LOX 系と MEKOOH/GA/LOX における E_{max} は 507 nm であった. 一重項酸素による発光は, 643, 702, 762, 1,070, 1,270 nm に発光ピークをもつことが観察されている¹¹⁾. この一重項酸素を確かめるために, 東北電子 (株) 試作装置である Ultra sensitive near-infrared CL detector model CLD-310 で測定した結果, 1,270 nm における発光はいずれの系においても観察されなかった. 従って, 一重項酸素由来の発光でないことが明らかとなった. 励起エネルギーはいずれの系においても 48.5 ~ 61.9 kcal/mol の範囲であり, これよりエネルギーが高い C-C 結合 (結合解離エネルギー; 83 kcal/mole), C-H 結合 (結合解離エネルギー; 99 kcal/mole), O-H 結合 (結合解離エネルギー; 99 kcal/mole) を開裂できないことが示唆された. O-O 結合の結合解離エネルギーは 33 kcal/mole であり, 各系の励起エネルギーより小さいため, 本実験での XYZ 系微弱発光は, O-O 結合の開裂を生じさせるエネルギーを持つことが明らかとなった.

XYZ 系微弱発光における LOX の特徴

エタノール, 加熱によって LOX は容易に失活するが, XYZ 系微弱発光においても同様の傾向がみられた

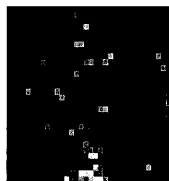
Non heating



H₂O₂

tert-BuOOH

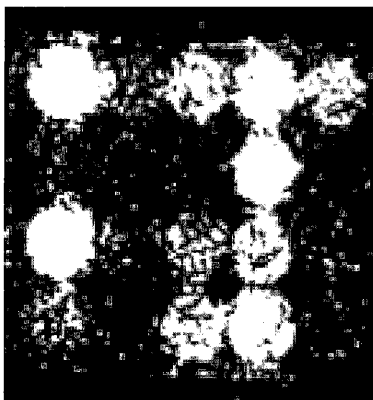
Heating, 20 min



MEK-OOH

cumene-OOH

Hb SOD HRP LOX MeCHO



X:5 mMGA

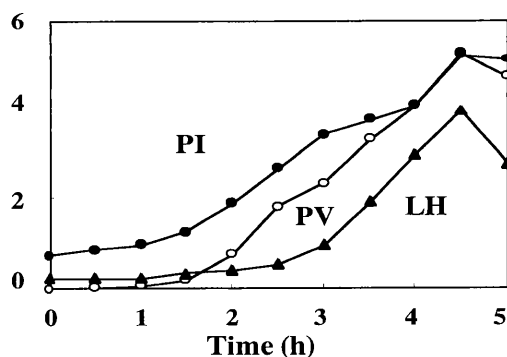
PRO 3, 10 min

Fig. 5. Effect of reactive oxygen species on non-heme and heme protein chemiluminescence in the presence of 5 mM GA.

(Fig. 5). さらにXとしてHOOH, *tert*-BuOOH, MEK-OO, cumeneOOHを, ZとしてHb, SOD, HRP, LOX, MeCHOを, YとしてGAをそれぞれ用い, CCDカメラで発光を観察し, LOXの特徴を調べた. その結果 (Fig. 5), HbとHRPでは, *tert*-BuOOHを除く3種のヒドロペルオキシドで発光が観察され, その中でもHOOHで顕著であった. SODとMeCHOでは, HOOHでのみ発光が観察された. LOXはこれらのZ成分とは異なり, 4種のヒドロペルオキシドすべてで発光が観察され, その中でも *tert*-BuOOHで最も顕著であった. ヒドロペルオキシド類の消去能の観点からみるとLOXの汎用性の高いことがXYZ系微弱発光におけるLOXの特徴であることがわかった.

リノール酸過酸化度の測定法による比較

(A) Peroxidation of linoleic acid



PI, photon intensity (1=200 CPS)
PV, peroxide value (1=100 meq/kg)
LH, linoleic hydroperoxide (1=0.2)

(B) Peroxidation of salad oil

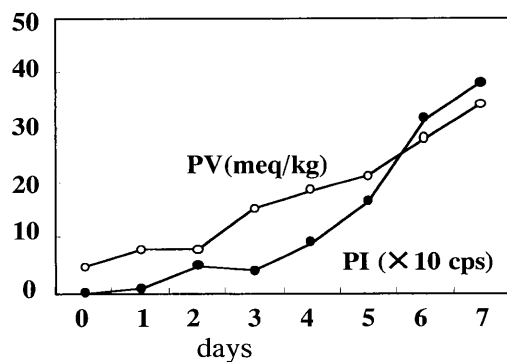


Fig. 6. Comparison of peroxide value and linoleic hydroperoxide with photon intensity on the peroxidation system.

従来の過酸化測定法と微弱発光の比較を行った. その結果 (Fig. 6), 経時的にリノール酸の過酸化物は増加し, 4, 5時間でリノール酸過酸化物分解速度が, リノール酸過酸化物生成速度を上回ったためか, 値が減少した. ロダン鉄法と微弱発光を比較すると, ロダン鉄法の吸光度は, 微弱発光強度に較べて, 値の上昇が緩やかである. Wheeler法と微弱発光を比較すると, 値の上昇が類似しており, 相関性があると言える. しかし, Wheeler法では, 感度が低いため, 大量の試料を必要とするのに対し, 微弱発光法では一度の試験に10 μ Lを要するだけで, 操作も簡便である. ヒドロペルオキシド生成量は, 過酸化物質の測定によって, 知ることができるが, この微弱発光法とWheeler法に見事な相関性がみられることから, 微弱発光法によってもヒドロペルオキシド生成量を知ることができる. また, 試料は微量でよく, 感度が優れているという点から, 生体試料の脂質ペルオキシドの測定にも有効であると考えられる. *tert*-BuOOHを用いた検量線は, 低濃度 (13 ~ 39 mM) で直線関係が得られ, CCDカメラによる脂質ペルオキシドの検出でも経時的に脂質ペルオキシドが増加し, 微弱発光強度も大きくなっていることを視覚的に捉えることができた (Fig. 7). CCDカメラによる脂質ペルオキシドの検出は, 操作が簡便な上, 視覚的に確認できることから, 今後実用化が大いに期待される.

食用油脂過酸化度の比較

直射日光を当てた試料と暗所に放置した試料を比較して, 光の影響と油の種類による過酸化度の違いについて, Wheeler法と微弱発光法により検討した (Fig. 6). 日光照射した試料の過酸化物量は, 2次曲線的に増加し, 暗所保存した試料の過酸化物量はほとんど増

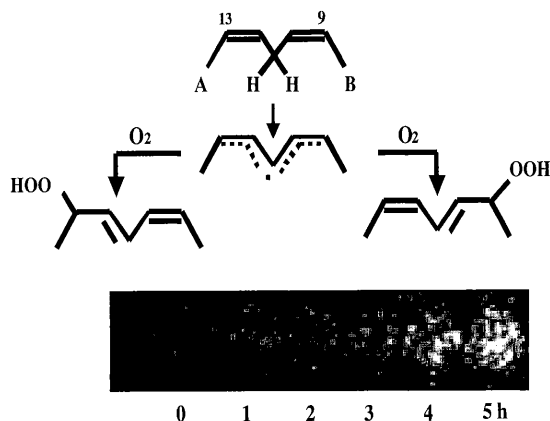


Fig. 7. Detection of linoleic hydroperoxide by photon emission in the GA/LOX system.

加しなかった。日光照射した試料を用いた時、Wheeler 法と微弱発光法との間には高い相関性が見られ、他条件の試料を用いた時にも、相関性が見られた。

要 約

XYZ 系における微弱発光を検出・測定した結果、LOX は Y および Z として発光し、特に Z としての発光の方が大きかった。カテキン類を Y として用いた時の LOX の微弱発光では、カテキン C-3 位のガロイル基、C-5' 位の OH 基、立体配座が微弱発光に影響を及ぼすことがわかった。XYZ 三者間の濃度関係を調べた結果、HOOH よりも *tert*-BuOOH での発光が顕著で、 $[P] = k [X][Y][Z]$ に従う傾向がみられた。多波長解析装置による XYZ 系微弱発光波長を測定した結果、本実験で用いたすべての系において発光は一重項酸素によるものではないことがわかり、励起エネルギーから、本発光は O-O 開裂に由来するものであると推察された。代表的 Z 成分である Hb, SOD, HRP は特定のヒドロペルオキシド類で発光するのに対して、LOX は HOOH, *tert*-BuOOH, MEKOOH, cumeneOOH のすべてのペルオキシド類においても発光し、特に *tert*-BuOOH での発光が大きかった。リノール酸の過酸化度測定において、XYZ 系 LOX 微弱発光法は、Wheeler 法と高い相関性を示した。食用油脂の過酸化度測定においても、両者の測定値には相関性がみられた。

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 acetaldehyde 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*, Sep. 4-8, Bologna, Italy.
- 7) フスニザ フセイン, 川根政昭, 吉城由美子, 大久保一良 (1998): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 33-39.
- 8) 吉城由美子, 川根政昭, フスニザ フセイン, 苑虎, 大久保一良 (1998): 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.
- 9) 吉城由美子, 苑虎, 飯田哲郎, 川根政昭, 大久保一良 (1998): 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, 活性酸素消去成分の検索と大豆リポオキシゲナーゼの発光特性. 大豆たん白質研究, **1**, 52-57.
- 10) Inatani R, Nakatani N and Fuwa H (1983): Antioxidant effect of the constituents of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric Biol Chem*, **47**, 521-528.
- 11) Khan A U and Kasha M (1970): Chemiluminescence arising from simultaneous transitions in pairs of singlet oxygen molecules. *J Am Chem Soc*, **92**, 3293-3300.