

# 自動酸化リノレン酸メチルによるペプシン活性促進\*<sup>1</sup>

幡手英雄・入部太郎<sup>\*2</sup>・河内正通

## Acceleration of Pepsin Activity by Autoxidized Methyl Linolenate

Hideo Hatate, Tarouichi Iribe<sup>\*2</sup>, and Masayuki Kōchi

The accelerating effect of oxidized lipid on enzymatic activity was investigated using methyl linolenate (MLn) and porcine pepsin. Pepsin was preincubated under various conditions with MLn autoxidized at 40°C, and then the proteolytic activity of the pepsin was measured using casein as a substrate. The accelerating effect of autoxidized methyl linolenate (oxd MLn) on pepsin activity changed with the extent of oxidation of oxd MLn, but did not correlate to the magnitude of peroxide value of oxd MLn. This fact indicates that MLn hydroperoxides were not the main accelerating substance. The accelerating effect also varied with the preincubation conditions employed. The proteolytic activity of pepsin increased about twice that of the intact pepsin when the pepsin had been preincubated with oxd MLn at pH 5.0, 37°C for 2 hours. On the other hand, no significant change was observed in the pepsin activity towards oxd MLn pre-treated casein as a substrate. This indicates that the accelerating effect of oxd MLn was caused by the reaction of oxd MLn with pepsin but not with the substrate. Among the fractions obtained by chromatography of oxd MLn on a Sephadex LH-20 column, degradation products of oxd MLn strongly stimulated the proteolytic activity of pepsin, while the other fractions could also enhance the activity to some extent. Carbonyl and/or hydroxyl groups in the degradation products were found to be responsible for the occurrence of the accelerating effect, by means of chemical modification of these functional groups.

### 1. 緒 言

高度不飽和酸を含む脂質は自動酸化し、種々の酸化生成物を生じる。この酸化生成物は、褐変や酸敗臭の原因となり商品の価値を下げるばかりでなく、生体成分（例えば酵素タンパク質）と相互作用して毒性を発現することがある。

酸化脂質は、酵素と反応して酵素分子を不溶化したり酵素分子相互の架橋による重合体などを生成させ、酵素活性を阻害することが種々の酵素について調べられてい

る<sup>1)</sup>。このような酸化脂質による酵素活性阻害についての報告は多数あるが、ペプシン<sup>2,3)</sup>やトリプシン<sup>4)</sup>など一部の酵素では活性を促進されることも知られている。Matsushitaらはリノール酸の酸化生成物とペプシンを温和な条件下で反応させ、リノール酸ヒドロペルオキシド<sup>2)</sup>およびさらに酸化の進行した酸化二次生成物<sup>3)</sup>に強いペプシン活性促進作用があることを報告している。しかし、この酸化二次生成物は過酸化物が検出されなくなるまでリノール酸ヒドロペルオキシドをさらに酸化させて調製されたものであり、リノール酸の重合体や分解生成物な

\* 1 水産大学校研究業績 第1199号, 1989年1月23日受理。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No.1199. Received Jan.23,1989.

\* 2 (株)かねふく

どが含まれている可能性が高い。一方、酸化脂質の酵素への作用は、その官能基の種類は勿論のこと、脂質酸化生成物の分子サイズによって異なる<sup>5)</sup>。

本研究では、酸化リノレン酸メチル (oxd MLn) を分子サイズに基づいて分画し、各画分がペプシン活性に及ぼす影響を調べ、さらに活性促進作用の発現に關する官能基について検討した。

## 2. 実験方法

### 2・1 MLnの自動酸化と酸化指標

約2gのMLn (東京化成製) を40°C, 暗所で攪拌しながら自動酸化させた。oxd MLnの酸化程度は過酸化物価<sup>6)</sup> 共役ジエン量<sup>7)</sup> およびTBA値<sup>8)</sup> で表示した。

### 2・2 セファデックス LH-20によるoxd MLnの分画

約400mgのoxd MLnをアセトンを出溶剤としてセファデックスLH-20カラム (123×2.2cm) で分画した。各画分の溶出物量は減圧下で溶媒を除去した後、重量測定により求めた<sup>4)</sup>。

### 2・3 oxd MLnとペプシンとの反応

oxd MLnとペプシン (ブタ胃粘膜ペプシン, シグマ社製) とを0.02M リン酸緩衝液 (pH 5.0) の10%エタノール溶液中で、37°C, 1時間プレインキュベートして反応させた。同反応混合液を用いて後述の酵素活性を測定した。

### 2・4 酵素活性測定

ペプシン活性はおもにカゼイン (和光純薬工業製) を基質とし、必要に応じて牛血清アルブミン (和光純薬工業製), 牛血清ヘモグロビン (和光純薬工業製) または合成基質N-Acetylphenylalanyl-L-diiodotyrosine (APD, シグマ社製) を使用して測定した。本文中において、特記していない場合はカゼインを基質として酵素活性を測定した結果である。

カゼインを使用した場合: 上記反応混合液0.5ml (約12.5 μgのペプシンを含む) を、2%カゼインを含む0.02N HCl溶液2mlに加え、37°Cで30分間反応させた。反応終了後、5%トリクロル酢酸溶液5mlを加えて酵素反応を停止させ、ろ液について280nmの吸光度を測定した。

アルブミンおよびヘモグロビンを基質とした場合も上記の方法に準じて酵素活性を測定した。

APDを基質とした場合: 上記反応混合液0.5ml (約12.5 μgのペプシンを含む) を1mM APDを含む0.01N NaOH 0.25mlと0.05N HCl 0.25mlとの混合液に加え、37°Cで1時間反応させた。反応終了後、遊離されたジヨードチロシンをニンヒドリン法で分析し、570nmの吸光度を測定した<sup>9)</sup>。

なお、oxd MLnを添加せずに同様に処理したペプシン溶液の酵素活性を100%とし、oxd MLnによるペプシン活性の促進率を算出した。

### 2・5 分解生成物のカルボニル基およびヒドロキシル基の修飾

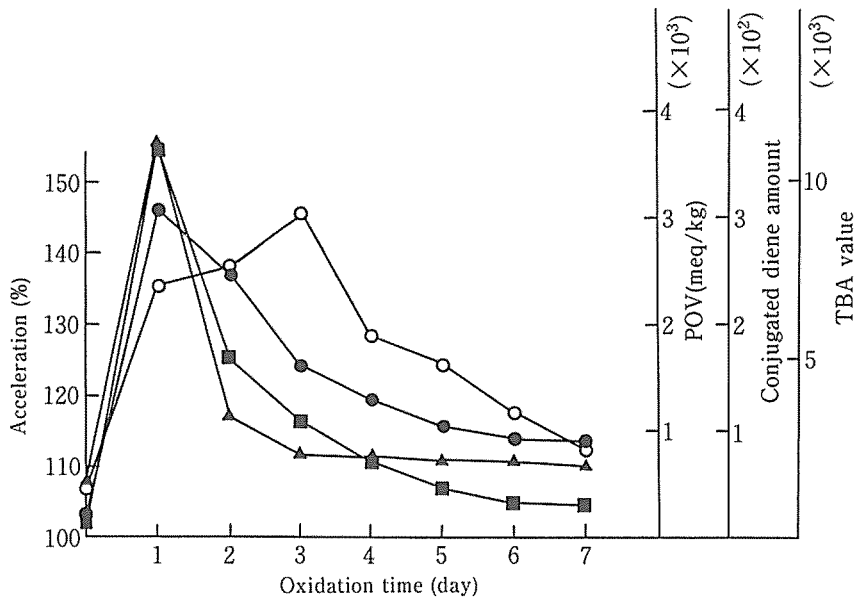
酸化分解生成物のカルボニル基およびヒドロキシル基をそれぞれJohnsonらの方法<sup>10)</sup>でジメチルヒドラゾン (DMH) 化およびFreedmanらの方法<sup>11)</sup>でトリメチルシリルエーテル (TMS) 化した。

## 3. 結果および考察

### 3・1 MLnの自動酸化とoxd MLnによるペプシン活性の変化

40°Cで自動酸化させたMLnの酸化程度 (過酸化物価, 共役ジエン量, TBA値) と各種酸化段階のoxd MLnによるペプシン活性の変化をFig. 1に示す。ペプシン活性の促進率は3日間自動酸化させたMLnで最高値を示し、それ以上自動酸化させたMLnによっては徐々に低下した。一方、過酸化物価, 共役ジエン量およびTBA値はいずれも1日間自動酸化させたMLnで最高値を示し、酸化指標と活性促進作用との間に相関は認められなかった。また、過酸化物価が最高値を示した1日間自動酸化させたMLnによる促進率が最大でなかったことから、oxd MLnによるペプシン活性の促進作用は酸化一次生成物であるヒドロペルオキシドによるものでなく、おもにoxd MLnの酸化二次生成物によるものと考えた。

以後の実験では、強いペプシン活性の促進作用を示した40°Cで3日間自動酸化させて得たoxd MLnを用いて検討した。



**Fig. 1.** Acceleration of pepsin activity by MLn autoxidized at 40°C for various days. oxd MLn (1.0mg) was allowed to react with 12.5 μg of pepsin in 0.5 ml of the mixture of ethanol and 0.02 M phosphate buffer, pH 5.0 (1/9,vol/vol)at 37°C for 1 h, and then pepsin activity was measured by using 2% casein as the substrate. Pepsin activity measured without adding oxd MLn was taken as 100%. This expression is to be applied for all figures and table. ○: Acceleration rate of pepsin activity ●: POV ▲: Conjugated diene amount ■: TBA value

3・2 oxd MLn とカゼインとの反応およびプレインキュベーションの条件がペプシン活性に及ぼす影響

oxd MLn と基質との反応がペプシン活性に及ぼす影響を明らかにするために、oxd MLn とカゼインをあらかじめ

プレインキュベートさせたものを基質としてペプシンの酵素活性を測定した (Table 1)。

Table 1に示すように、oxd MLn の添加量の増加およびプレインキュベーション時間の延長によってもペプシン活性はほとんど変化しなかった。この結果から、oxd MLn は基質ではなく、ペプシンに作用して酵素活性を

**Table 1.** Effect of preincubation between oxd MLn and casein on acceleration of pepsin activity

Added amount of oxd MLn to 2ml of 2% casein (μg)	Preincubation time (min)	Acceleration (%)
100	0	106
100	15	106
100	30	94
100	60	97
1000	0	103
1000	15	103
1000	30	100
1000	60	103

促進することが確認された。

oxd MLn とペプシンとの反応時間、反応系の pH および反応温度が酵素活性に及ぼす影響を検討し、その結果を Fig. 2a, b, c に示す。ペプシン活性は、反応時間の延長にともない上昇し、pH 5 以上で強く促進された。反応温度が45°C までは、温度の上昇にともなって活性促進作用は増強した。55°C では、oxd MLn を添加していない対照実験の酵素活性が著しく低下したが、oxd MLn と反応させたペプシンは、依然として酵素活性を有しており、熱に対する安定性を高められた (Fig. 2c)。このことは、oxd MLn との反応によってペプシン活性が促進されるばかりでなく、oxd MLn がペプシンの性状を変化させたことを示唆している。

なお、対照としたペプシンがブレインキュベーション

中に失活し、その結果としてペプシン活性の促進率が著しく高く算出される場合がある。しかし、本研究で使用した37°C, pH 5.0, 1時間の温和なブレインキュベーション条件では、対照ペプシンの酵素活性はブレインキュベーション前のペプシンの酵素活性と大差なく、殆ど失活していないので、このブレインキュベーション条件で算出された促進率は、ペプシン活性の増強程度を示していると判断して誤りはない。

### 3・3 oxd MLn のゲルろ過法による分画と各画分のペプシン活性に及ぼす影響

3日間自動酸化させたMLnをセファデックスLH-20ゲルろ過法で分画し、各画分によるペプシン活性促進作用を調べた (Fig. 3)。

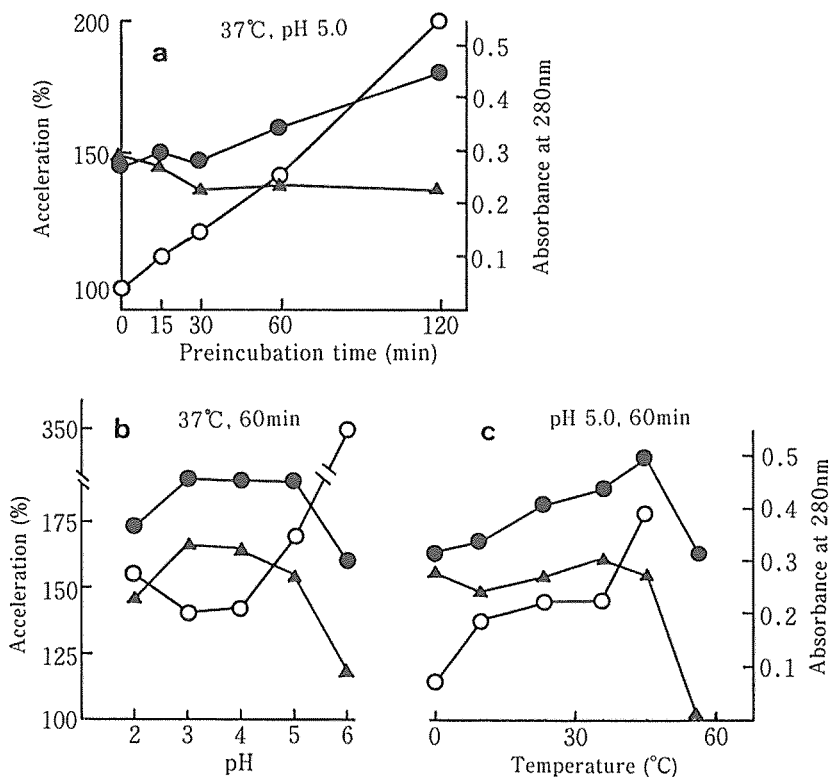


Fig. 2. Effect of preincubation time, pH, and temperature on acceleration of pepsin activity. (oxd MLn 1.0 mg, Pepsin 12.5  $\mu$ g)

b: Reaction media were prepared with 0.02 N HCl (pH 2.0), 0.02 M acetate buffer (pH 3.0, 4.0), and 0.02 M phosphate buffer (pH 5.0, 6.0).

○: Acceleration rate of pepsin activity

●: Pepsin activity measured with adding oxd MLn

▲: Pepsin activity measured without adding oxd MLn

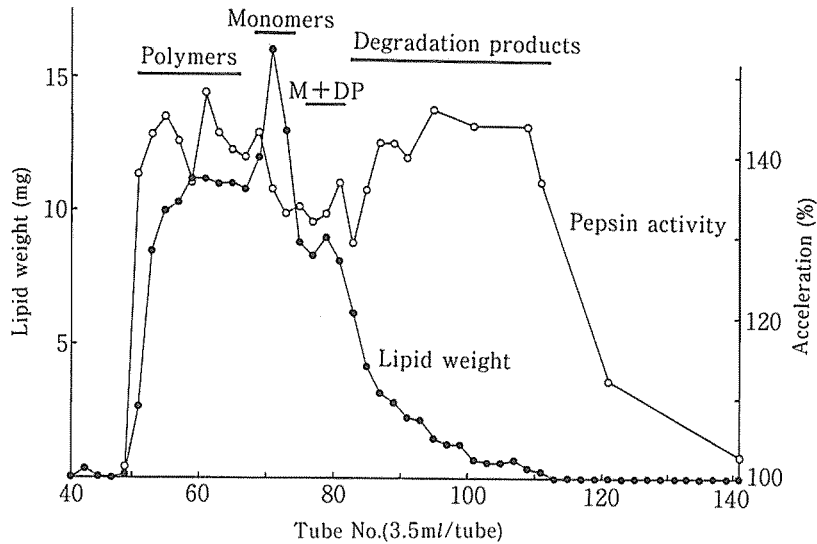


Fig. 3. Separation of oxd MLn by chromatography on Sephadex LH-20, and acceleration of pepsin activity by fractions obtained.

Chromatographic conditions: column size, 123 × 2.2cm; eluent, acetone; flow rate, 1.6 ml/min; sample, 400mg.

M + DP: mixtures of monomers and degradation products

oxd MLn は、分子サイズの差異に基づいて、重合体、単量体、単量体と分解生成物の混合物および分解生成物に分離された<sup>4)</sup>。これらの溶出画分中に特異的に強い促進作用を示すものがあるかどうかを調べた。すなわち、各画分を0.5mlのエタノールに溶解したもの50  $\mu$ lを12.5  $\mu$ gのペプシンを含む0.02 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) 0.5mlに加えて37°Cで1時間ブレインキュベートして反応させた。終了後、カゼインを用いてペプシン活性を測定した。その結果、いずれの画分にもペプシン活性促進作用が認められた。しかし、溶出物の単位重量あたりの促進作用は分解生成物で強いようであった。それゆえ、各画分をそれぞれ回収し、各画分の添加量とペプシン活性促進作用を比較、検討した結果、分解生成物が最も強い活性促進作用を示すことが明らかとなった (Fig. 4)。

### 3・4 ペプシン活性促進作用に関する分解生成物の官能基

含窒素化合物との反応に関与する分解生成物のおもな官能基としてカルボニル基およびヒドロキシル基が考えられるので、これらの官能基を修飾した分解生成物がペプシン活性に及ぼす影響を検討した。

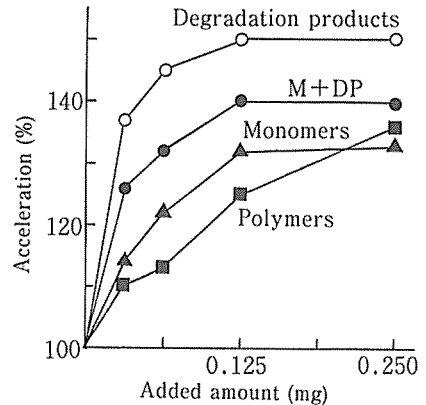


Fig. 4. Acceleration of pepsin activity by increasing amounts of fractions<sup>※</sup> obtained from oxd MLn. (Pepsin 12.5  $\mu$ g)

<sup>※</sup>Refer to Fig. 3.

Fig. 5 に示すように、分解生成物のカルボニル基およびヒドロキシル基をそれぞれ DMH 化、TMS 化した誘導体はいずれもペプシン活性促進作用を抑制された。さらに、DMH 化した後 TMS 化した誘導体、すなわちカルボ

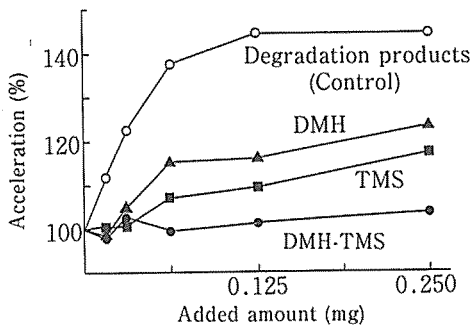


Fig. 5. Effect of modification of functional groups in degradation products on acceleration of pepsin activity. (Pepsin 12.5  $\mu$ g)

ニル基とヒドロキシル基をともに修飾した分解生成物では、ペプシン活性促進作用がほとんど認められなかった。これらの結果から、分解生成物の主関連官能基はカルボニル基とヒドロキシル基であることが確認された。現在、これらの官能基の役割や反応に関与したペプシン分子のアミノ酸残基の種類について検討中である。

次に、分解生成物とプレインキュベートして反応させたペプシンの酵素作用を種々の基質を用いて測定した結果をFig. 6に示す。カゼインを基質としたときと比較してAPD、アルブミンを基質とした場合、ペプシン活性の促進率に多少の違いはあるが、ほぼ同様な傾向を示し、この促進作用がカゼインを基質とした時のみに発現する特異な現象ではないことが判明した。しかし、ヘモグロビンを基質とした場合ペプシン活性は促進されず、わずかに阻害された。タンパク質を基質としているにもかかわらずこのような違いが起こる原因は明らかではないが、酸化脂質による酵素活性促進作用機構を解明するうえで興味ある研究対象と思われる。

#### 4. 要 約

40℃で種々の日数自動酸化させたMLnをペプシンと反応させたところ、3日間自動酸化させて得たoxd MLnがペプシン活性の強い促進作用を示した。一方、過酸化物質価、共役ジエン量およびTBA値は、いずれも1日間自動酸化させたMLnで最高値を示し、活性促進作用と酸化指標との間に相関は認められなかった。また、oxd MLnとあらかじめインキュベートさせたカゼインを基質としてペプシン活性を測定しても、酵素活性に変化は認

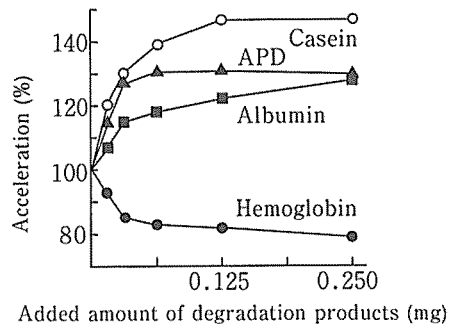


Fig. 6. Change of pepsin activity towards some substrates. (Pepsin 12.5  $\mu$ g)

められず、oxd MLnは基質ではなく、ペプシンに作用して活性を促進することがわかった。

3日間自動酸化させて得たoxd MLnからセファデックスLH-20ゲルろ過法で分離された画分のうち、分解生成物に強いペプシン活性促進作用が認められた。この活性促進作用の発現には、分解生成物のカルボニル基とヒドロキシル基が関与していることが、官能基の修飾実験からわかった。

#### 文 献

- 1) H.W.Gardner: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 220 ~ 229 (1979).
- 2) S. Matsushita and M. Kobayashi: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 825~829 (1970).
- 3) S. Matsushita: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 150 ~ 154 (1975).
- 4) 幡手英雄・中村孝: *油化学*, **35**, 1014~1017 (1987).
- 5) 幡手英雄・豊水正道: *九大農学芸誌*, **39**, 9 ~ 14 (1984).
- 6) 日本油化学協会: *基準油脂分析試験法* (日本油化学協会編), 日本油化学協会, 東京, 1971, 2・4・12-71, pp. 1 ~ 2.
- 7) 内山 充: *脂質の化学* (日本生化学会編), **1**, 東京化学同人, 東京, 1974, p. 539.
- 8) 浅川具美・野村幸弘・松下雪郎: *油化学*, **24**, 55~56 (1975).
- 9) A.P.Ryle: *Methods in Enzymology* (ed. by G.E.Perlmann and L.Lorand), Vol. 19, Academic Press Inc., New York, 1970, pp. 317~319.

- 10) C.B.Johnson, A.M.Pearson, and L.R.Dugan, Jr.: *Lipid*, **5**, 958~963 (1970).
- 11) B.Freedman: *J.Am.Oil Chem. Soc.*, **44**, 113 ~ 116 (1967).