

酸化リノレン酸メチルによるtrypsin阻害

幡手, 英雄
九州大学農学部水産製造学教室

豊水, 正道
九州大学農学部水産製造学教室

<https://doi.org/10.15017/22157>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 39 (1), pp.9-14, 1984-07. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害

幡 手 英 雄・豊 水 正 道

九州大学農学部水産製造学教室

(1984年3月28日受理)

Inhibition of Trypsin by Oxidized Methyl Linolenate

HIDEO HATATE and MASAMICHI TOYOMIZU

Laboratory of Fisheries Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-04, Fukuoka 812, Japan

緒 言

酸化脂質とタンパク質との相互作用がタンパク質の変性をもたらすことはよく知られている (Ory and Angelo, 1975; Gardner, 1979; 戸谷, 1980).

酸化脂質と酵素との相互作用による酵素活性阻害に関して Bernheim *et al.* (1952) は、紫外線照射したリノレン酸メチルが choline oxidase, succinate dehydrogenase を阻害することを見出し、ミトコンドリアのインキュベーション中における TBA 値の上昇に伴う酸化酵素の阻害が、脂質酸化に基づく主張している。その後、酸化酵素、転移酵素、加水分解酵素など多岐にわたる酵素について酸化脂質による酵素活性阻害が報告されている (Roubal and Tappel, 1966; Chio and Tappel, 1969; Matsushita, 1975; 山口ら, 1981)。他方、例外として pepsin に対する活性促進も報告されている (Matsushita and Kobayashi, 1970)。

これらの活性阻害機作については必ずしも解明されていないが、脂質酸化度、酸化脂質の差異のみならず酸化脂質と酵素との反応条件のほか対象とする酵素の化学的性質などによっても阻害機作は異なっているようである。

protease は消化酵素としての役割だけでなく、酵素前駆体の活性化、生理活性ペプチドの産生など多くの生命現象と関係している。これらの protease のうち serine protease である trypsin (EC3. 4. 4. 4) については化学構造、触媒機構 および 基質特異性などが解明され、タンパク質性インヒビターについては勿論、種々の低分子インヒビターについてもよく研究

されている。しかし、酸化脂質による trypsin 阻害作用に関しては Matsushita (1975) の研究以外には見当たらない。

本報では酸化脂質と酵素との相互作用による活性阻害の研究のために、温和な条件で自動酸化させたリノレン酸メチルをウシすい臓 trypsin と温和な条件下で反応させて trypsin の活性阻害を調べた。

実 験 方 法

1. リノレン酸メチルの自動酸化と酸化指標

リノレン酸メチル (東京化成工業製) 約 2 g を 50 ml 容三角フラスコ中、40°C で攪拌しながら暗所で4日間自動酸化させた (特記していない場合には、酸化リノレン酸メチルは 40°C で4日間自動酸化させたリノレン酸メチルである)。酸化指標として POV (日本油化学協会, 1971)、共役ジエン量すなわち $E_{1\text{cm}, 233\text{nm}}$ (内山, 1974) および TBA 値 (浅川ら, 1975) を測定した。

2. 酸化リノレン酸メチルの Bio-Beads S-X 3 カラムクロマト法による分画

酸化リノレン酸メチル約 350 mg をベンゼンを溶出剤とし、Bio-Beads S-X 3 カラム (1.6×124 cm) クロマト法で分画した。

3. trypsin 阻害の測定

酵素活性は α -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide · HCl (BAPNA, Sigma 社製) を基質として主に測定し、必要に応じてカゼイン (和光純薬工業製、特級) を用いた。

BAPNA を基質とした場合: 約 30 μ g のウシすい臓 trypsin (2回結晶, Sigma 社製) を含む 0.1 M

Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液 2 ml に酸化リノレン酸メチルを含むエタノール溶液 0.1 ml を添加し、インキュベートとして反応させた後、Dietz *et al.* (1967) の方法に準じて残存酵素活性を測定した。すなわち、この酵素液 1 ml を 1 mM BAPNA-0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液-0.02 M CaCl_2 5 ml に注加し、37°C で 10 分間作用させた後、30% 酢酸 1 ml で酵素作用を停止して 400 nm の吸光度を測定した。酸化リノレン酸メチル無添加時の吸光度を A、残存酵素活性の示す吸光度を B として $A - B / A \times 100$ で阻害率を算出した。

カゼインを基質とした場合：約 100 μg の trypsin を含む 0.01 M リン酸 (pH 8.0) 緩衝液 0.9 ml に酸化リノレン酸メチルを含むエタノール溶液 0.1 ml を添加して反応させた後、常法 (Laskowski, 1955) に従って残存酵素活性を測定した。すなわち、この酵素液 0.5 ml を 2% カゼイン-0.1 M リン酸 (pH 8.0) 緩衝液 2 ml に注加し、37°C で 30 分間作用させた後、5% TCA 5 ml で酵素作用を停止し、ろ液の 280 nm の吸光度を測定して阻害率を算出した。

実験結果

1. 酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害

trypsin が酸化リノレン酸メチルとの反応によって受ける阻害と酸化リノレン酸メチルの添加量との関係

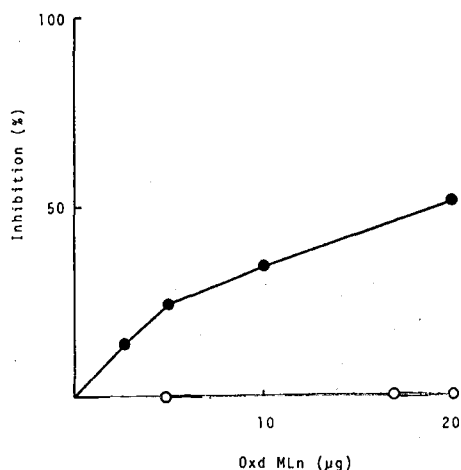


Fig. 1. Inhibition of trypsin by autoxidized methyl linolenate (oxd MLn) and effect of Ca^{2+} on inhibition. Trypsin (14.8 μg) was allowed to react with oxd MLn in 0.5 ml of 4.8% EtOH-0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 37°C for 7 min. BAPNA was used as substrate. —●— in the absence of Ca^{2+} , —○— in the presence of Ca^{2+} .

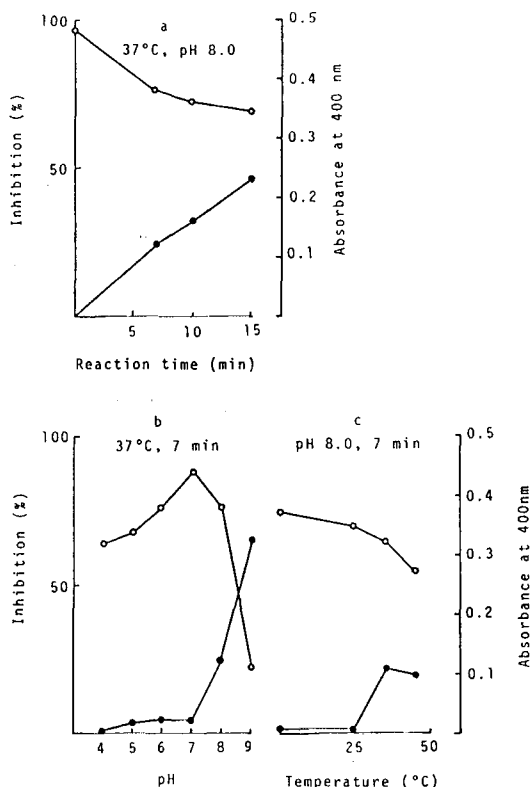


Fig. 2. Effect of time, pH and temperature on inhibition of trypsin by oxd MLn. (trypsin 14.8 μg , oxd MLn 5 μg , BAPNA). b) Reaction media were prepared with 0.1 M acetate buffer (pH 4-6) and 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7-9). —●— inhibition, —○— control activity (absorbance at 400 nm).

を Fig. 1 に示した。 Ca^{2+} の存在しない系では酸化リノレン酸メチルの添加量を増加すると阻害率は上昇し、酸化リノレン酸メチルが trypsin を阻害することを明らかにした。酸化リノレン酸メチルと trypsin との反応条件を時間、pH および温度について検討し、Fig. 2 に示した。酸化リノレン酸メチル無添加でインキュベートした trypsin の活性 (対照) は反応時間の延長、pH および温度の上昇により低下し、それに伴って酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害率は上昇した。これらの結果から、酸化リノレン酸メチルと trypsin との反応条件を Ca^{2+} 無添加で 7 分間、pH 8.0、37°C とした。

酸化リノレン酸メチルと反応させた trypsin の活性阻害を BAPNA およびカゼインを基質として調べて Fig. 3 に示してある。酸化リノレン酸メチルは合成基

質あるいはカゼインを基質としても trypsin 阻害作用を示した。酸化リノレン酸メチルと基質との反応が trypsin 阻害へ及ぼす影響を明らかにするために、酸化リノレン酸メチルと 37°C で反応させた 1 mM BAPNA あるいは 2% カゼインを基質として trypsin 活性を測定した。Table 1 に示すように、酸化リノレン酸メチルとの反応時間を延長しても両基質で阻害がほとんど認められず、2% カゼインに大過剰の酸化リノレン酸メチルを添加した場合のみわずかに阻害を示したにすぎなかった。したがって trypsin 阻害には酸化リノレン酸メチルと基質との反応は関与していないと考えた。

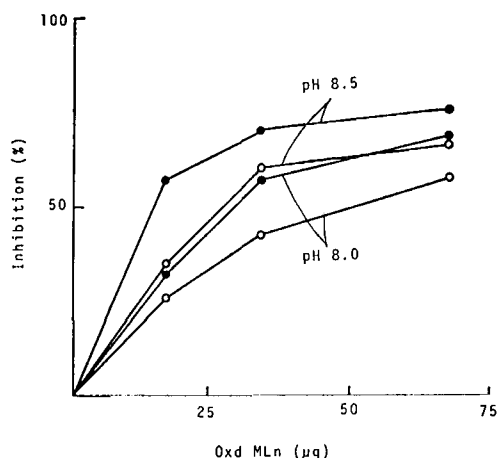


Fig. 3. Inhibition of trypsin estimated by using BAPNA and casein as substrates. Trypsin was allowed to react with oxd MLN in 4.8% EtOH-0.01 M phosphate buffer (pH 8.0, 8.5) at 37°C for 7 min. Residual activity was determined using 1 mM BAPNA and 2% casein as substrates. The amounts of oxd MLN added to reaction media were converted on the basis of 15 μ g of trypsin. —●— BAPNA, —○— casein.

2. リノレン酸メチルの酸化の進行に伴う trypsin 阻害および trypsin 阻害を示す酸化リノレン酸メチル画分

リノレン酸メチルを 40°C で自動酸化させると、Fig. 4 に示すように、POV, 共役ジエン量および TBA 値は 1 日目で最高であり、その後は低下した。この自動酸化させたリノレン酸メチルによる trypsin 阻害率は、Fig. 5 に示すように、酸化日数の延長に伴って上昇したが、4 日目以降の上昇はわずかであった。それゆえ、酸化リノレン酸メチルによる trypsin

Table 1. Effect of reaction between oxd MLN and substrates on inhibition of trypsin

(A) BAPNA (trypsin 14.3 μ g)

Reaction time (min)	Added amount of oxd MLN to 5 ml of 1 mM BAPNA (μ g)	Inhibition (%)
7	15	0
15	15	1.9
7	50	1.3
15	50	1.9

(B) Casein (trypsin 53.1 μ g)

Reaction time (min)	Added amount of oxd MLN to 2 ml of 2% casein (μ g)	Inhibition (%)
0	15	0.5
15	15	3.4
30	15	-2.9
60	15	3.5
0	1000	-1.7
30	1000	5.4
60	1000	10.9
120	1000	13.5

阻害はハイドロパーオキシドによるものでなく、酸化二次生成物によるものと考え、リノレン酸メチルの 40°C における自動酸化日数を 4 日間と決めた。

酸化リノレン酸メチルを Bio-Beads S-X 3 カラムクロマト法で多量体 (A), 2 量体 (B), 単量体 (C), 分解物 (D) および単量体と分解物の混合物 (D') に分画した (Fig. 6)。本研究室の中村・豊水 (1975) は各画分の平均分子量を蒸気圧法で測定し、A 画分を 903, B 画分を 622, C 画分を 298 と報告している。これらの画分による trypsin 阻害を BAPNA およびカゼインを基質として求めた (Table 2)。多量体でのみ顕著な阻害を示し、単量体と分解物の混合物である D' 画分にわずかに阻害が認められた。酸化リノレン酸メチルによる phospholipase A 阻害において、最

Table 2. Inhibition of trypsin by various fractions obtained from oxd MLN (40°C, 4 days)

Fraction	Inhibition (%)	
	BAPNA ¹⁾	Casein ²⁾
A	40.6	70.1
B	1.8	5.1
C	0	4.5
D	0	0.6
D'	6.2	5.4

1) trypsin 14.8 μ g, fraction 5 μ g

2) trypsin 55.1 μ g fraction 15 μ g

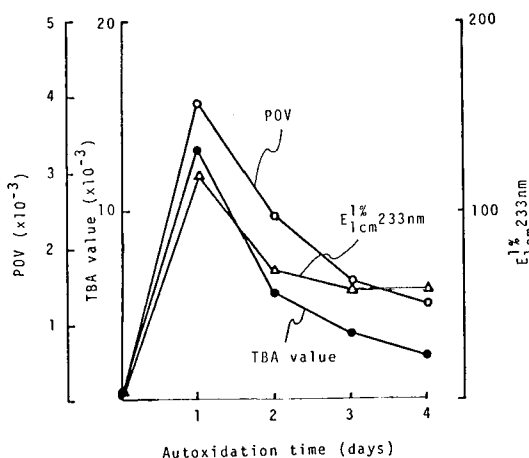


Fig. 4. Autoxidation of MLN at 40°C.

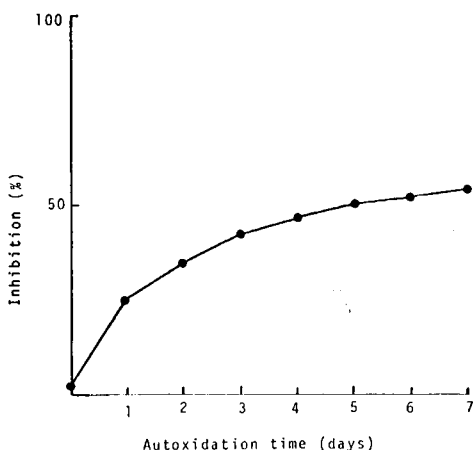


Fig. 5. Inhibition of trypsin by oxd MLN during autoxidation of MLN. (trypsin 15 μg , oxd MLN 10 μg , BAPNA).

高の阻害率を示す分解物画分 (山口ら, 1981) は trypsin に対してはほとんど阻害作用を示さなかった。

多量体による trypsin 阻害型式を明らかにするために、Lineweaver-Burk プロットを試みた。すなわち、BAPNA を基質とし、基質濃度の上昇に伴う反応速度の変化を多量体と反応させた trypsin および反応させてない trypsin (対照) について測定した (Fig. 7)。対照 trypsin の Michaelis 定数と多量体と反応させた trypsin のそれとが等しく、両者の最大速度が異なっていたことから、多量体は基質と競合して阻害作用を示したのではなく、酵素活性中心とは別の部位で作用する非競合型阻害であることがわかった。

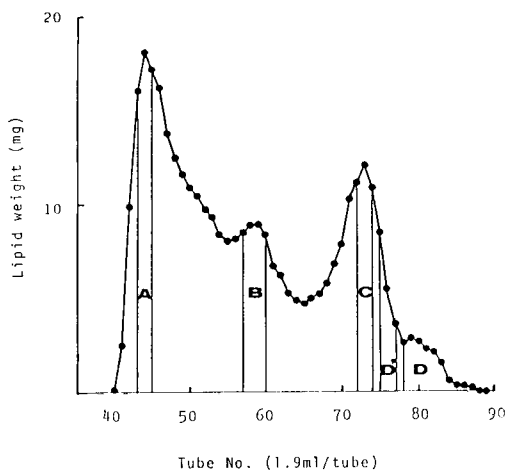


Fig. 6. Chromatography of oxd MLN (40°C, 4 days) on Bio-Beads S-X3. Oxd MLN (356 mg) was chromatographed on Bio-Beads S-X3 (1.6 \times 124 cm) using benzene as eluent.

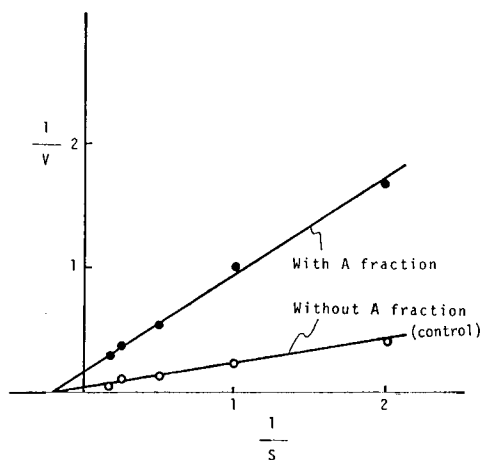


Fig. 7. Reaction kinetics of trypsin in the absence and presence of A fraction (arbitrary units). The Lineweaver-Burk method of plotting was employed. V: velocity S: substrate concentration. (trypsin 15 μg , A fraction 13 μg , substrate concentration 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mM BAPNA).

考 察

酸化脂質はタンパク質と反応して生体系に対しては阻害作用を、食品においては品質劣化をもたらすことが最近注目されているが、これらのモデルとしては激しすぎる条件がしばしば用いられている。著者らは 40°C で自動酸化させたリノレン酸メチルを用いて温

和な条件での trypsin 阻害について研究した。

酸化脂質による trypsin 阻害に関しては 37°C で 70 時間自動酸化させたリノール酸を用いた Matsu-shita *et al.* (1970) および Matsushita (1975) の研究がある。同氏は、ribonuclease A を阻害するリノール酸ヒドロパーオキシドは trypsin を阻害せず、酸化二次生成物が著しい阻害を示すと述べている。酸化リノレン酸メチルを用いた本研究でも最高の POV を示した 40°C、1 日間の自動酸化で阻害作用は大でなく、高い阻害率は 4 日間の自動酸化で生成した多量体画分に認められた (Table 2)。

酸化リノレン酸メチルと反応させた trypsin の残存酵素活性を BAPNA あるいはカゼインを基質として測定しても、trypsin 阻害率に大差は認められなかった (Fig. 3)。このことは、Barrett and Starkey (1973) が α_2 -マクログロブリンの proteinase 阻害で指摘している高分子化合物が酵素分子を物理的に取り込むトラップ機作とは異なる機作で、酸化リノレン酸メチルが trypsin を阻害していることを示唆した。また、酸化リノレン酸メチルと反応させた基質を用いて trypsin 活性を測定しても活性はほとんど変化しなかったので、酸化リノレン酸メチルは基質ではなく trypsin に作用していることがわかった。さらに、Lineweaver-Burk プロットを適用したところ、多量体による trypsin 阻害作用は trypsin の活性中心で結合する種々のタンパク質性インヒビターとは異なる非競合型であり (Fig. 7)、分子量 500 以上の縮合タンニンが trypsin を阻害する型式 (Tamir and Al-mot, 1969) と同様であった。

酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害が大であった反応条件は、対照 trypsin 活性が低下した条件であり (Fig. 2)、trypsin の自己分解を抑制する Ca^{2+} の存在していた条件では阻害が全く認められなかった (Fig. 1)。これらの結果は酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害と trypsin の自己分解との関連を暗示した。

要 約

著者らは酸化リノレン酸メチルが trypsin を阻害することを明らかにしたので、リノレン酸メチルの自動酸化と trypsin 阻害との関連を研究した。結果は次の通りである。

1. 酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害は Ca^{2+} の存在していない系でのみ観察され、その阻害率は trypsin の自己分解によって trypsin 活性が低

下する条件で上昇した。

2. 酸化リノレン酸メチルの阻害作用は基質ではなく trypsin との反応に依存していた。

3. 自動酸化させたリノレン酸メチルによる trypsin 阻害は、POV、共役ジエン量および TBA 値が最高を示した 40°C で 1 日間自動酸化させたリノレン酸メチルでは大でなく、酸化の進行に伴って漸増した。このことから trypsin 阻害はリノレン酸メチルヒドロパーオキシドによるものでなく酸化二次生成物によることが明らかとなった。

4. 酸化リノレン酸メチルの Bio-Beads S-X 3 カラムクロマト法による分画画分の中で、多量体による阻害が顕著であった。

5. 多量体の阻害作用は Lineweaver-Burk プロット法により非競合型であることが明らかとなった。

文 献

- 浅川具美・野村幸弘・松下雪郎 1975 油脂の酸化測定のための TBA 法の一変法。油化学, 24: 55-56
- Barrett, A. J. and P. M. Starkey 1973 The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinase. *Biochem. J.*, 133: 709-724
- Bernheim, F., K. M. Wilbur and C. B. Kanaston 1952 The effect of oxidized fatty acids on the activity of certain oxidative enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 38: 177-184
- Chio, K. S. and A. L. Tappel 1969 Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and malonaldehyde. *Biochemistry*, 8: 2827-2832
- Dietz, A. A., L. K. Hodges, H. M. Rubinstein and R. R. Briney 1967 Estimation of the antitrypsin activity of serum. *Clin. Chem.*, 13: 242-253
- Gardner, H. W. 1979 Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J. Agr. Food Chem.*, 27: 220-229
- Laskowski, M. 1955 Trypsinogen and trypsin. In "Methods in Enzymology", Vol. 2, ed. by S. P. Colowic and N. O. Kaplan, Academic Press, Inc., New York, pp. 26-36
- Matsushita, S. 1975 Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins, *J. Agr. Food Chem.*, 23: 150-154
- Matsushita, S. and M. Kobayashi 1970 Effect of linoleic acid hydroperoxides on pepsin activity. *Agric. Biol. Chem.*, 34: 825-829
- Matsushita, S., M. Kobayashi and Y. Nitta 1970 Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. *Agric.*

- Biol. Chem.*, **34**: 817-824
- 中村 孝・豊水正道 1975 リノレン酸メチル自動酸化生成物のゲルクロマト法による分画とその変色力. 日水誌, **41**: 59-64
- 日本油化学協会 1971 過酸化値 日本油化学協会編: 基準油脂分析試験法, 日本油化学協会, 東京, 2. 4. 12-71, 1-2 頁
- Ory, R. L. and A. J. Angelo 1975 Symposium of effect of oxidized lipids on food proteins and flavor. *J. Agr. Food Chem.*, **23**: 125
- Roubal, W. T. and A. L. Tappel 1966 Polymerization of proteins induced by free-radical lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**: 150-155
- Tamir, M. and E. Alumot 1969 Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs. *J. Sci. Food Agric.*, **20**: 199-202
- 戸谷洋一郎 1980 過酸化脂質と窒素化合物の相互作用. 油化学, **29**: 323-329
- 内山 充 1974 脂質の化学 (日本生化学会編). 東京化学同人, 東京, 539 頁
- 山口邦子・中村 孝・豊水正道 1981 酸化脂質によるホスホリパーゼA阻害. 九大農芸誌, **35**: 71-80

Summary

The authors found that autoxidized methyl linolenate (oxd MLn) inhibited trypsin, so the relation between the autoxidation of MLn and the inhibition of trypsin by oxd MLn was studied. The results obtained are summarized as follows.

1. The inhibition by oxd MLn was observed only in the absence of Ca^{2+} and the rate of inhibition increased under the condition that trypsin activity lowered owing to the autolysis of trypsin.

2. The inhibitory action of oxd MLn depended on the reaction with trypsin but not on the substrates used in the determination of trypsin activity.

3. Peroxide value, conjugated diene content and TBA value of oxd MLn were the highest in one day, when oxidized at 40°C. The inhibition by oxd MLn was not so serious at the early stage of oxidation and increased gradually with the progress of oxidation. The fact indicated that the inhibition was not due to methyl linolenate hydroperoxides but to the secondary products of oxd MLn.

4. The polymer inhibited trypsin definitely among the fractions obtained from oxd MLn by chromatography on Bio-Beads S-X 3.

5. The inhibitory action of polymer on trypsin was found to be the non-competitive type by employing the Lineweaver-Burk method of plotting.