

酸化リノレン酸メチルとtrypsinとの反応機構

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/10.15017/22159>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 39 (1), pp.23-26, 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と trypsin との反応機構

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)

Reaction Mechanism between Oxidized Methyl Linolenate and Trypsin

HIDEO HATATE and MASAMICHI TOYOMIZU

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

緒 言

前報(幡手・豊水, 1984)でリノレン酸メチルは40°Cでの自動酸化の進行に伴って trypsin 阻害作用を増強し, 強い阻害作用は4日間自動酸化させた酸化リノレン酸メチルの多量体によることを明らかにした。

著者らは, 予備実験で酸化リノレン酸メチルおよび多量体が Lys との反応で褐変し, この褐変した酸化リノレン酸メチルおよび多量体は trypsin 阻害活性を著しく低下したことを見出した。それゆえ, 酸化リノレン酸メチルあるいは多量体による trypsin 阻害にカルボニル基が関与している可能性があると考え, 酸化リノレン酸メチルあるいは多量体と trypsin との反応によって生成した蛍光を調べた。

実 験 方 法

1. リノレン酸メチルの自動酸化

前報(幡手・豊水, 1984)と同様にリノレン酸メチル(東京化成工業製)を40°Cで4日間自動酸化させた。Bio-Beads S-X3 カラムクロマト法による各画分の分離も同報に従った。

2. 蛍光測定

1.75 mg のウシすい臓 trypsin (2回結晶, Sigma 社製)あるいはウシ血漿アルブミン(BPA, Fraction V, Armar 社製)を含む0.1 M リン酸(pH 8.0)緩衝液5 ml と0.5 mg の酸化リノレン酸メチルあるいは酸化リノレン酸メチルの各画分を含むエタノール溶液0.1 ml とを振盪しながら37°Cで24時間反応させた。この反応混合液の蛍光を日立 MPF-

2A 型分光蛍光光度計で測定した。標準溶液として0.2 μM 硫酸キニーネ-0.1 N H₂SO₄ を用い, この蛍光強度を100とした。

3. 多量体の修飾

多量体は Johanson *et al.* (1970) の方法でジメチルヒドラゾン(DMH)化し, あるいは Freedman (1967) の方法でトリメチルシリル(TMS)化した。

4. 多量体との反応による trypsin のアミノ酸損傷

10 mg の trypsin と40 mg の多量体とを2.4 ml の16.6%エタノール-0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) 緩衝液中で37°C, 7分間反応させた。多量体無添加で同様に処理した trypsin を対照とし, 多量体との反応によるアミノ酸の損傷を Maroux and Desnuelle (1969) の方法によって日本電子アミノ酸分析計 JLC-6 AH で分析して求めた。

実 験 結 果

1. 酸化リノレン酸メチルと trypsin との反応で生成する蛍光

酸化リノレン酸メチルと trypsin あるいは BPA とを反応させて生じる蛍光の最大励起波長はともに340 nm であつた。励起波長340 nm での最大発光波長は420 nm であつた(Fig. 1)。これらの最大波長は trypsin と酸化リノレン酸の二次生成物との反応で生じる蛍光の最大励起波長355 nm, 最大発光波長425 nm (Matsushita, 1975) に近似し, ウシ血清アルブミンと crotonaldehyde との反応で生じる蛍光の最大励起波長340 nm, 最大発光波長420 nm (Fletcher and Tappel, 1971) とよく一致したが,

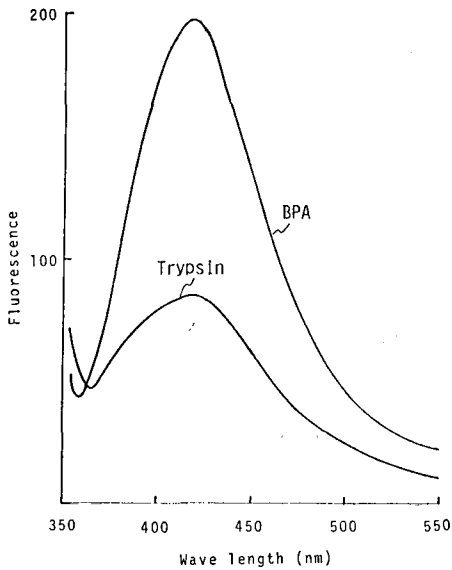


Fig. 1. Emission spectra of trypsin and BPA allowed to react with autoxidized methyl linolenate (oxd MLn) at 37°C for 24 hr at pH 8.0. (trypsin, BPA 1.75 mg, oxd MLn 0.5 mg). Excitation wave length set at 340 nm.

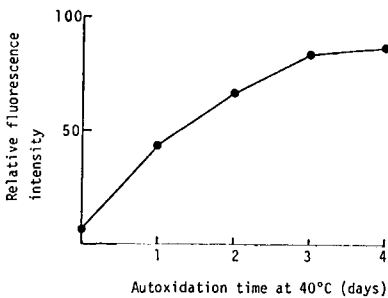


Fig. 2. Relation between fluorescence and autoxidation time of oxd MLn. (trypsin 1.75 mg, oxd MLn 0.5 mg).

malonaldehyde がタンパク質と 1-amino-3-imino propene 結合で架橋を形成する際に生じる蛍光の最大励起波長 350-395 nm, 最大発光波長 430-470 nm

(Chio and Tappel, 1969) よりも短波長側にあつた。

trypsin との反応で生じた蛍光の強度と反応させたリノレン酸メチルの 40°C での自動酸化日数との関係を Fig. 2 に示した。蛍光強度は自動酸化日数の延長に伴つて増加し、この傾向は前報 (幡手・豊水, 1984) に示したリノレン酸メチルの自動酸化日数の延長に伴う trypsin 阻害作用の増強と一致した。

酸化リノレン酸メチルの各画分と trypsin との反応で生じた蛍光の強度を Table 1 に示した。多量体との反応で最大の強度を示したが、trypsin 阻害を示さない 2 量体, 単量体あるいは分解物との反応でも明らかに蛍光を生じた。タンパク質と酸化脂質との反応で生じる蛍光はシッフ塩基の形成によるもので、カルボニル基は各画分に存在しうから、多量体以外の画分との反応で蛍光を生じたのは当然であろう。

2. 多量体の修飾あるいは trypsin の修飾が trypsin 阻害へ及ぼす影響

trypsin 阻害を示さなかつた画分との反応によつても trypsin が蛍光発色団を生成したので、酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害が多量体のカルボニル基と trypsin の遊離アミノ基との共有結合によることを明確にするために、カルボニル基を修飾した多量体による trypsin 阻害を調べた。カルボニル基を DMH 化した多量体と水酸基を TMS 化した多量体による trypsin 阻害を Table 2 に示した。この結果から明らかのように、多量体は水酸基の修飾によつて trypsin 阻害に影響を受けなかつたが、カルボニル基の修飾によつては trypsin 阻害をほとんど示さなくなつた。

trypsin の Lys 残基の ε-アミノ基を修飾した、acetyltrypsin (Sigma 社製) を多量体と 37°C で 7 分間反応させた後、BAPNA¹⁾ を基質として残存酵素活性を測定した (幡手・豊水, 1984)。多量体無添加時の活性を 100% として残存活性率を算出した。

Fig. 3 に示すように、対照である未修飾の trypsin の活性は多量体の増量に伴つて明瞭に低下したが、対照 trypsin がほとんど活性を示さなくなる多量体の添加量においても acetyltrypsin の活性は全く低

Table 1. Fluorescence of trypsin allowed to react with various fractions obtained from oxd MLn (40°C, 4 days) by chromatography on Bio-Beads S-X 3

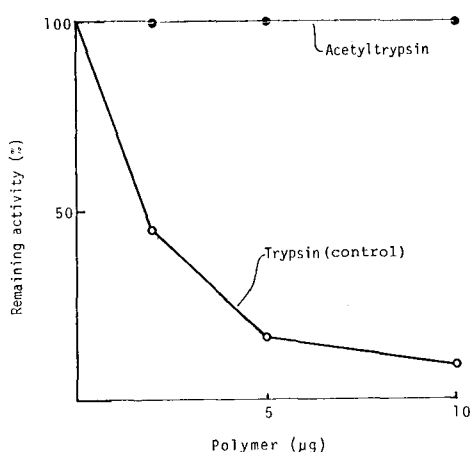
Fraction	Polymer	Dimer	Monomer	Degraded products	Monomer + Degraded products
Relative fluorescence intensity	68	65	43	63	55

(trypsin 1.75 mg, each fraction 0.5 mg)

1) α-N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-HCl

Table 2. Effect of modification of polymer with DMH and TMS on inhibition of trypsin

Treatment	DMH	TMS	Control
Inhibition (%)	1.2	40.2	41.3

(trypsin 15.0 μ g, polymer 5.0 μ g)**Fig. 3.** Action of polymer on acetyltrypsin. Acetyltrypsin was allowed to react with polymer in 4.8% EtOH-0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0) at 37°C for 7 min. (acetyltrypsin, trypsin 15 μ g).

下せず, trypsin の ϵ -アミノ基の修飾は多量体の trypsin 阻害作用を無効にした. このことは trypsin 阻害に関与した遊離アミノ基が, N-末端アミノ基ではなくて ϵ -アミノ基であること (Hofmann and Scrimger, 1966; Hofmann *et al.*, 1967) を示唆した.

3. 多量体との反応による trypsin のアミノ酸損傷

多量体と反応させた trypsin のアミノ酸損傷をアミノ酸分析によつて調べた. Table 3 に示すように, 損傷を受けた主なアミノ酸は Lys, His, Arg, Asp, Met および Leu などであり, この結果は酸化脂質によつ

Table 3. Damage to amino acid of trypsin by reaction with polymer

Amino acid	Loss (%)	Amino acid	Loss (%)
Lys	23	Ala	3
His	45	Cys-Cys	0
Arg	30	Val	7
Asp	10	Met	9
Thr	0	Ile	4
Ser	0	Leu	10
Glu	0	Tyr	6
Pro	5	Phe	2
Gly	0		

てタンパク質が受けるアミノ酸損傷の報告 (Gardner, 1979; Karel *et al.*, 1975; Matsushita, 1975) と大差なかった. このように酸化脂質によるアミノ酸損傷は必ずしも特異的であるとは言えず, trypsin 阻害とは直接に関与しないアミノ酸残基あるいは trypsin が失活した後に損傷されたアミノ酸残基もこの中に含まれている可能性はある. しかし, trypsin のアミノ酸組成を勘案すると, trypsin 分子中で損傷を受けた分子数の量も多いアミノ酸残基は Lys であった.

考 察

酸化脂質とタンパク質との相互作用は, 疎水基の会合あるいは水素結合による複合体の形成, 過酸化脂質の生成や分解で生じるラジカルが関与する反応あるいは酸化二次生成物が関与する共有結合による複合体の形成などに大別されている (Gardner, 1979).

酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害は多量体で顕著であったことおよび酸化リノレン酸メチルと多量体は Lys との反応によつて trypsin 阻害活性を低下したことから, これらの trypsin 阻害にリノレン酸メチルの酸化二次生成物である多量体のカルボニル基が主役を演じていると推測した.

酸化リノレン酸メチルと反応させた trypsin あるいは BPA は同様な蛍光スペクトルを示した. この蛍光スペクトルは malonaldehyde と反応させたタンパク質のそれとは異なり, 共役カルボニルと反応させたウシ血清アルブミンのそれとよく一致した. しかし, 酸化リノレン酸メチルから分子サイズに基づいて分画した trypsin 阻害を示さなかつた画分との反応によつても, trypsin は蛍光発色団を生成した. それゆえ, カルボニル基を修飾した多量体による trypsin 阻害および trypsin の ϵ -アミノ基を修飾した acetyltrypsin に対する多量体の阻害作用を調べた. その結果, 多量体による trypsin 阻害は, 多量体のカルボニル基と trypsin の ϵ -アミノ基との結合に基づき, しかも, 酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害活性の発現には, 長炭素鎖をもつ疎水性分子との複合体形成を必須とすると考えた. 多量体との反応による trypsin のアミノ酸損傷の結果もこれを裏付けた.

要 約

酸化リノレン酸メチルと trypsin との反応機構を明らかにするため, これらの官能基を調べた. 結果は次の通りである.

1. 酸化リノレン酸メチルと反応させた trypsin

は最大励起波長 340 nm および最大発光波長 420 nm を示す蛍光発色団を生成した。

2. リノレン酸メチルの自動酸化日数の延長に伴って蛍光強度も漸増した。酸化リノレン酸メチルの分画画分中では多量体で最大の蛍光強度を示したが、ほかの画分でも蛍光が観察された。

3. 多量体はカルボニル基の修飾によつて trypsin 阻害をほとんど示さなくなった。また, trypsin の ϵ -アミノ基を修飾した acetyltrypsin は多量体によつて全く阻害されなかった。

4. 多量体との反応によつて trypsin では Lys が主に損傷されていた。

以上の結果から, 酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害は多量体のカルボニル基と trypsin の ϵ -アミノ基との共有結合に基づくものと結論した。

文 献

- Chio, K. S. and A. L. Tappel 1969 Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and malonaldehyde. *Biochemistry*, 8: 2827-2832
- Fletcher, B. L. and A. L. Tappel 1971 Fluorescent modification of serum albumin by lipid peroxidation. *Lipids*, 6: 172-175
- Freedman, B. 1967 Gas-liquid chromatography of hydroxy fatty esters: Comparison of trifluoroacetyl and trimethylsilyl derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44: 113-116
- Gardner, H. W. 1979 Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. *J. Agr. Food Chem.*, 27: 220-229
- 幡手英雄・豊水正道 1984 酸化リノレン酸メチルによる trypsin 阻害. 九大農学芸誌, 39: 9-14
- Hofmann, T. and S. T. Scrimger 1966 A primary amino group in the active site of trypsin. *Federation Proc.*, 25: 589
- Hofmann, T., H. Schachter, J. W. Dixon, C. Borrowes, A. Gertler and S. T. Scrimger 1967 Kinetics of nitrous acid inactivation of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Federation Proc.*, 26: 828
- Johanson, C. B., A. M. Pearson and L. R. Dugan, Jr. 1970 Gas chromatographic analysis of dimethylhydrazones of long chain aldehydes. *Lipids*, 5: 958-963
- Karel, M., K. Schaich and R. B. Roy 1975 Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agr. Food Chem.*, 23: 159-163
- Maroux, S. and P. Desnuelle 1969 On some autolyzed derivatives of bovine trypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 181: 59-72
- Matsushita, S. 1975 Specific interaction of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *J. Agr. Food Chem.*, 23: 150-154

Summary

In order to elucidate the mechanism of reaction between autoxidized methyl linolenate (oxd MLn) and trypsin, the authors studied the functional groups participating in the reaction. The results obtained are summarized as follows.

1. Trypsin which was allowed to react with oxd MLn produced the fluorescent chromophores, which showed the excitation maximum at 340 nm and the emission maximum at 420 nm.

2. The prolongation of the autoxidation time of MLn was accompanied by the gradual increase in the fluorescence intensity.

3. The fluorescence was observed remarkably by the reaction with the polymer fractionated from oxd MLn, but also observed with the other fractions

4. Trypsin was scarcely inhibited by the polymer whose carbonyl groups had been modified. In addition, acetyltrypsin, which had been prepared by the modification of ϵ -amino groups in trypsin, was not inhibited by intact polymer.

5. Lys was markedly damaged in trypsin by the reaction with the polymer, compared with other amino acids.

From these results, the authors concluded that the inhibition of trypsin by oxd MLn was based on the covalent binding between carbonyl groups of the polymer and ϵ -amino groups in trypsin.