

## 酸化脂質によるホスホリパーゼA阻害

山口, 邦子  
九州大学農学部水産製造学教室

中村, 孝  
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/10.15017/22272>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 35 (3/4), pp.71-80, 1981-07. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

## 酸化脂質によるホスホリパーゼA阻害

山口邦子・中村 孝・豊水正道

九州大学農学部水産製造学教室

(1980年12月25日受理)

### Inhibition of Phospholipase A by Oxidized Lipid

KUNIKO YAMAGUCHI, TAKASHI NAKAMURA  
and MASAMICHI TOYOMIZU

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

#### 緒 言

著者らはホスホリパーゼAによるレシチンの加水分解を検討中、基質であるレシチンによつて加水分解率が著しく相違し、その原因がレシチンの酸化によることに気が付き、酸化脂質によるホスホリパーゼAの不活性化を見いだした。

これまでも酸化脂質による酵素の不活性化について数多く報告されている。Matsushita (1975) はリノール酸ヒドロパーオキシドおよびその二次分解物によりリポヌクレアーゼが著しく阻害され、トリプシン、キモトリプシンも阻害されるが、ペプシンは活性化されると報告した。Chio and Tappel (1969) は sulfhydryl 酵素が脂質酸化中間生成物により不活性化されやすいこと、および膜に結びついた NADPH チトクロームCレダクターゼがミクロゾーム膜の脂質過酸化による膜の親油性区分の分解のために消失することを認めた。Chen and Packett (1971) は  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性が過酸化リノール酸およびそのK塩によつて減少するとし、吉岡ら(1972) はリパーゼ、パパインおよびチトクロームCの失活度は油の酸化度が高くなるにつれて大となると述べた。そのほか、ミトコンドリアやミクロゾームに対するヒドロパーオキシドおよび酸化分解物の作用が Osinskaya and Chumakov (1980) および Buege and Aust (1978) によつて報告されている。しかし、酸化脂質のホスホリパーゼA阻害についての報告は見当たらない。酵素活性阻害物質はヒドロパーオキシドであるとするもののほかに、二次分解物であるとするものもあり、

吉岡・金田(1972)は炭素数5~9の4-hydroxy-2-en-1-alを阻害物質としている。

本研究では、酸化脂質として酸化リノレン酸メチルを用いてホスホリパーゼA阻害について検討し、ゲルクロマトグラフィによつて酸化リノレン酸メチル中の有効画分を分離し、分解物画分からホスホリパーゼAと反応して酵素を不活性化する化合物をGLCによつて分離し、さらにGC-MSによつてこれら化合物を同定したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. レシチンの調製法

新鮮なニワトリ卵黄から Faure (1950) の方法で得たレシチン画分をケイ酸カラム(ケイ酸:Hyflo-Super-Cel 2:1)クロマトグラフィで分画し、クロロホルム:メタノール4:1で中性脂質、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールを溶出後、クロロホルム:メタノール3:2溶出画分を集めた。これはTLCで単一スポットを与えた。レシチン調製の概要をFig. 1に示す。

試験管にレシチンを薄膜状に広げて30°Cで24時間放置し、酸化レシチンを得た。

##### 2. ホスホリパーゼA活性測定

Wells and Hanahan (1969) の方法に準じた。特に記載する以外は95%エーテル-5%メタノール2.0 mlに溶かしたレシチン約10  $\mu$ molに0.22 M NaCl-20 mM CaCl<sub>2</sub>-1 mM EDTA (pH 7.5) 25  $\mu$ lに溶かした *Crotalus adamanteus* 毒から調製したホスホリパーゼA (EC. 3.1.1.4, Sigma 社製) 0.8  $\mu$ g

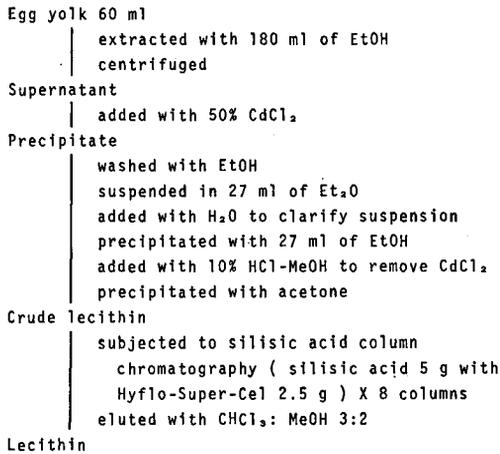


Fig. 1. Preparation of lecithin from egg yolk.

を加え、30秒間激しく振とう後、25°Cで15分反応させた。反応終了後、エタノール 8.0 ml を加え、反応液 1.0 ml のエステル基を Snyder and Stephens (1959) の方法で定量し、エステル基の減少量をレシチンの加水分解量とした。

### 3. リノレン酸メチルの酸化

リノレン酸メチル (東京化成製) を Frankel *et al.* (1961) のケイ酸カラムクロマトグラフィで精製後、スターラーで攪拌しながら 40°C で酸化した。酸化指標として TBA 値 (Ottolenghi, 1959), POV (日本油化学協会, 1971) および共役ジエン量すなわち  $E_{1cm, 233nm}^{1\%}$  (内山, 1974) を測定した。

### 4. 酸化リノレン酸メチルによるホスホリパーゼ A 活性阻害と阻害率

ホスホリパーゼ A を酸化リノレン酸メチルとプレインキュベーション後、レシチンと反応させる方法 (Method-A) では 0.306 M NaCl-1.39 mM EDTA (pH 7.5) 0.9 ml に溶かしたホスホリパーゼ A 40 μg にエタノール 0.1 ml に溶かした酸化リノレン酸メチル 60 μg を加え、25°C で 30 分プレインキュベーションした後、20 μl (ホスホリパーゼ A 0.8 μg, 酸化リノレン酸メチル 1.2 μg) を 100 mM CaCl<sub>2</sub> 5 μl とともに 95% エーテル-5% メタノール 2.0 ml に溶かしたレシチン約 10 μmol に添加して酵素反応させた。

一方、プレインキュベーションせずに酸化リノレン酸メチルを直接反応系に添加する方法 (Method-B) では 95% エーテル-5% メタノール 1.0 ml に溶かしたレシチン約 10 μmol に 95% エーテル-5% メタノール

1.0 ml に溶かした酸化リノレン酸メチル 800 μg と、0.22 M NaCl-20 mM CaCl<sub>2</sub>-1 mM EDTA (pH 7.5) 25 μl に溶かしたホスホリパーゼ A 0.8 μg とを加えて酵素反応させた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 酸化リノレン酸メチル無添加時におけるレシチンの加水分解量

B: 酸化リノレン酸メチル添加における加水分解量で表した。

### 5. 酸化リノレン酸メチルの Bio-Beads S-X3 による分画

40°C, 4日酸化リノレン酸メチル 435.6 mg を Bio-Beads S-X3 カラム (1.54×135 cm) に注加し、ベンゼンを溶出剤として溶出し、1.9 ml ずつ分取してベンゼンを除去後、重量を測定した。

### 6. 分解物画分の GC-MS 分析

エタノールに溶かした分解物画分 (Fraction d) に Fig. 2 に示すように食塩と EDTA との溶液を加え、ソニケーターで分散させ、ホスホリパーゼ A を加えて 25°C, 60 分間プレインキュベーションした。

プレインキュベーション後、食塩のほか、内部標準物質として C<sub>20:0</sub> 酸メチルおよび抽出剤としてエーテルを加え、遠心分離してエーテル層の脂質を集め、硫酸ナトリウムで脱水後、蒸発乾固し、Jhonson *et al.* (1970) の方法に準じてジメチルヒドРАЗОН

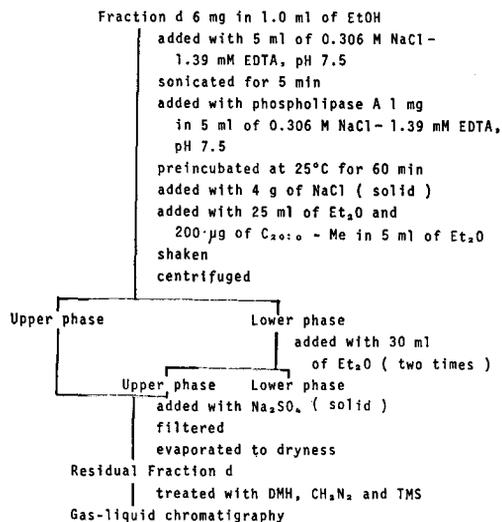


Fig. 2. Preparation of sample for gas-liquid chromatography after incubation with phospholipase A.

(DMH) 化, Schlenk and Gellerman (1960) の方法でメチル (Me) 化, Freedman (1967) の方法でトリメチルシリル (TMS) 化した. ホスホリパーゼA処理したものと, 無処理の Fraction d についてガスクロマトグラフ分析した. ガスクロマトグラフィはGC-4BPFE (島津製作所製) を用い, 5% SE-30 (60-80メッシュ Shimalite W) ガラスカラム (2m x 4 mm) で 100~220°C, 2°C/分で昇温分析した. ピーク面積を半値幅法で測定し, 内部標準物質として用いた C<sub>20:0</sub> 酸メチルとの相対面積で表示し, ホスホリパーゼA処理により減少したピークをGC-MS (RM-50 GC 日立製作所製) で分析した. イオン化電圧は 60 eV で m/e 0~800 のマスレンジを5秒で走査した.

結果および考察

1. ホスホリパーゼAによるレシチンの加水分解

紫外吸収スペクトルを Fig. 3 に示してある調製直後のレシチンを用いてホスホリパーゼAによるレシチンの加水分解を酵素量, 基質量および反応時間について検討した結果を Fig. 4 に示す. ホスホリパーゼA活性阻害を検討するための条件は, 基質量によつては加水分解量が変わらないで, 酵素量と反応時間によつては加水分解量が変わる条件であることが望ましいので, 2.025 ml の反応系で酵素量 0.8 μg, 基質量約 10 μmol, 反応時間 15 分, 25°C を反応条件と決めた. この条件は Wells and Hanahan (1969) のホスホリパーゼA測定条件とほぼ一致している.

酸化の徴候を示す 233nm の明瞭な吸収を Fig. 3 に示している 30°C で1日酸化した酸化レシチンを基質として供試した場合の加水分解量は Fig. 4 に示してあるように著しく低下した. すなわち, 酵素量と反応時間の増大によつて加水分解量の僅かな増加は認められたが, 酸化レシチン量の増加による酸化レシチン中の未酸化レシチン増加の効果は全く認められなかつた. これらのことから, 酸化レシチンを基質とした場合の加水分解量の減少の原因はレシチンが酸化して

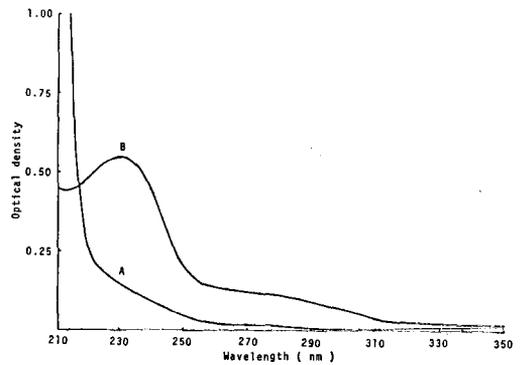


Fig. 3. Ultra violet absorption spectra of lecithin and autoxidized lecithin. The spectrum of lecithin (A) was measured at 1.06 mM in ethanol. Lecithin was oxidized at 30°C for 24 h and the spectrum (B) was measured at 0.19 mM in ethanol.

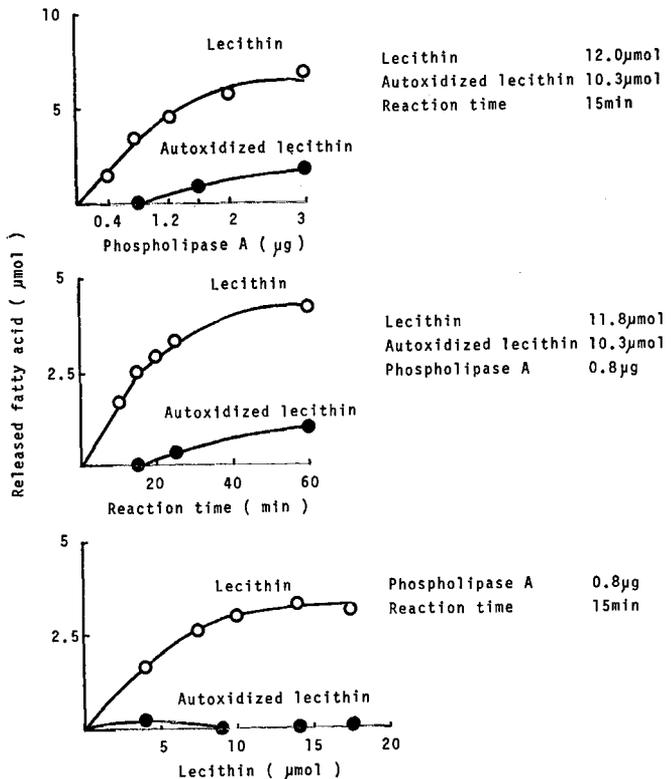


Fig. 4. Hydrolysis of lecithin and autoxidized lecithin with phospholipase A. A mixture of enzyme (0.8 μg) in 25 μl of 0.22 M NaCl-20 mM CaCl<sub>2</sub>-1 mM EDTA pH 7.5 and lecithin (about 10 μmol) in 2 ml of 95% ether-5% methanol was shaken vigorously for 30 s and set aside at 25°C for 15 min. Then ester group was determined. Lecithin was oxidized at 30°C for 24 h.

基質になり得ないことのみによるのではなく、レンチンの酸化生成物によりホスホリパーゼAが不活性化されることによると結論した。この酸化脂質によるホスホリパーゼA活性阻害を検討するために、以降の実験では酸化脂質として酸化リノレン酸メチルを用いた。

## 2. 酸化リノレン酸メチルによるホスホリパーゼA阻害

ホスホリパーゼAを酸化リノレン酸メチルとプレインキュベーション後、阻害を測定する Method-A を用いると、ホスホリパーゼA 40  $\mu\text{g}/0.9\text{ ml}$  と 40°C、4日酸化リノレン酸メチル 60  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  とのプレインキュベーション時間と阻害との関係は、Fig. 5 に示すように 25°C、30分のプレインキュベーションで酵素活性の約30%が阻害され、30分以上プレインキュベーションしても阻害の増加は小であつた。また、酵素 40  $\mu\text{g}/0.9\text{ ml}$  との30分間のプレインキュベーション系に添加すべき酸化リノレン酸メチルの量は Fig. 6 に示すように 60  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  で、活性の約30%が阻害されて平衡に達した。このプレインキュベーション後での酵素反応系 (2.025 ml) の量は酵素 0.8  $\mu\text{g}$  に対して酸化リノレン酸メチル 1.2  $\mu\text{g}$  となる。一方、プレインキュベーションせずに酵素反応系 (2.025 ml) に酸化リノレン酸メチルを直接添加して阻害を測定する Method-B を用いると、Fig. 6 で示すように酵素量 0.8  $\mu\text{g}$  に対して 40°C、4日酸化リノレン酸メチル添加量が増加すると阻害率も上昇し、30%の阻害を示す酸化リノレン酸メチルの添加量は 800  $\mu\text{g}$  であつた。酵素活性の約30%を阻害するのに必要な Method-A と Method-B における酸化リノレン酸メチル量の差異の原因は次のように推定される。Method-A では10%エタノール溶液 (1.0 ml) 中酸化リノレン酸メチル 60  $\mu\text{g}$  と酵素 40  $\mu\text{g}$  が30分間接触して酵素が損傷を受けて平衡に達するのに対し、Method-B では酵素反応系 (2.025 ml) 中に酸化リノレン酸メチル 800  $\mu\text{g}$ 、酵素 0.8  $\mu\text{g}$  および基質約 10  $\mu\text{mol}$  が同時に存在し、酸化リノレン酸メチルと酵素の接触が酵素と基質の反応と同時に起こり、酵素の一部は損傷を受ける前に基質と反応することのほかに、後述するように酵素阻害に関与する化合物が異なることによる阻害機構の差異も関係していると思われる。

つぎに、リノレン酸メチルの酸化度とホスホリパーゼA阻害との関係を検討した。リノレン酸メチルは40°Cで酸化すると Fig. 7 で明らかなように、TBA値、POV、E値のいずれも1日が最大で、その後は

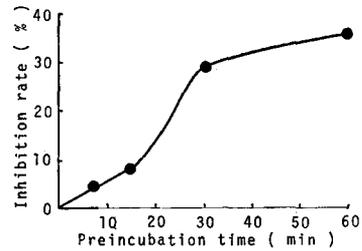


Fig. 5. Effect of preincubation time on inhibition of phospholipase A. Enzyme (40.4  $\mu\text{g}$ ) in 0.9 ml of 0.306 M NaCl-1.39 mM EDTA pH 7.5 was preincubated at 25°C with autoxidized linolenate (60  $\mu\text{g}$ , oxidized at 40°C for 4 days) in 0.1 ml of ethanol. At specific time intervals, 20  $\mu\text{l}$  of the solution (enzyme 0.8  $\mu\text{g}$  and autoxidized linolenate 1.2  $\mu\text{g}$ ) and 5  $\mu\text{l}$  of 100 mM  $\text{CaCl}_2$  were added to lecithin (13.1  $\mu\text{mol}$ ) in 2 ml of 95% ether-5% methanol, and enzyme activity was determined as described in Fig. 4. The inhibition rate was calculated as per cent inhibition taking the original activity as 100%.

5日まで減少を続け、ヒドロパーオキシドの生成・分解とそれともなう重合の進行が示唆された。この酸化リノレン酸メチルを用いて Method-A と Method-B で阻害を測定すると、Fig. 8 で示すように Method-A によると2日酸化で30%を阻害し、その後の阻害の増加は小で、ほぼ平衡に達した。Method-B によると1日酸化では阻害が小さく、3日酸化で約30%阻害を示し、その後もわずかなずつ増加した。以上の結果から以降の実験では4日酸化リノレン酸メチルを用いた。

## 3. 酸化リノレン酸メチルのゲルクロマトグラフィと各画分による阻害

40°C、4日酸化リノレン酸メチルを Bio-Beads S-X3 ゲルクロマトグラフィで Fig. 9 に示すように5画分に画分した。a画分が多量体、b画分が二量体、c画分が単量体およびd画分が酸化分解生成物であり、中村・豊水 (1975) は各ピーク相当部の平均分子量を蒸気圧法で測定し、a画分は903 (前半部は1190)、b画分は622、c画分は298と報告した。これら5画分のホスホリパーゼA活性阻害率を Method-A と Method-B で測定した結果を Table 1 に示す。Method-A ではa画分が最高阻害率を示し、次いでb画分、d画分であり、これらはいずれも30%以上の阻害率であつた。一方、Method-B ではd画分が最高阻害率を示し、次いでa画分、b画分であつた。

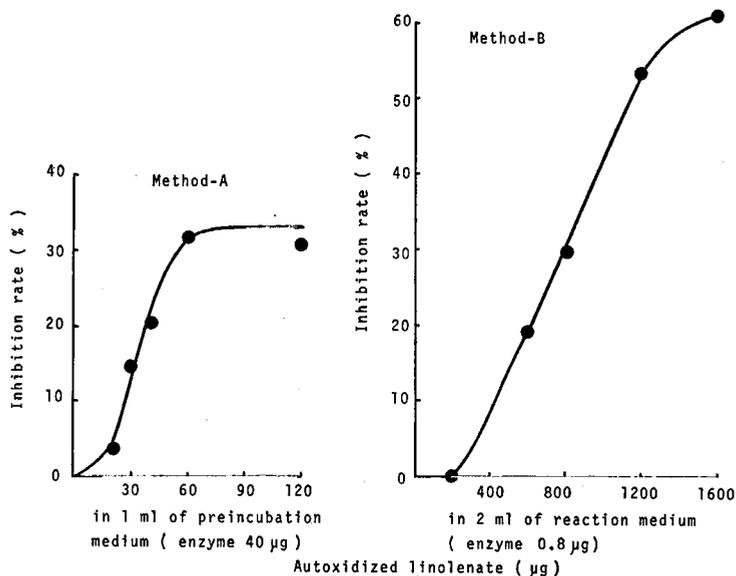


Fig. 6. Inhibition of phospholipase A by autoxidized linolenate. Method-A—with preincubation: Enzyme ( $40 \mu\text{g}$ ) were preincubated with autoxidized linolenate ( $20\text{--}120 \mu\text{g}$ , oxidized at  $40^\circ\text{C}$  for 4 days) and the inhibition rate was determined as described in Fig. 5. Method-B—without preincubation:  $25 \mu\text{l}$  of enzyme ( $0.8 \mu\text{g}$ ) solution and autoxidized linolenate ( $200\text{--}1600 \mu\text{g}$ , oxidized at  $40^\circ\text{C}$  for 4 days) in  $1.0 \text{ ml}$  of 95% ether-5% methanol were directly added to lecithin ( $10 \mu\text{mol}$ ) in  $1.0 \text{ ml}$  of 95% ether-5% methanol, and the enzyme activity was determined at a reaction time of 15 min.

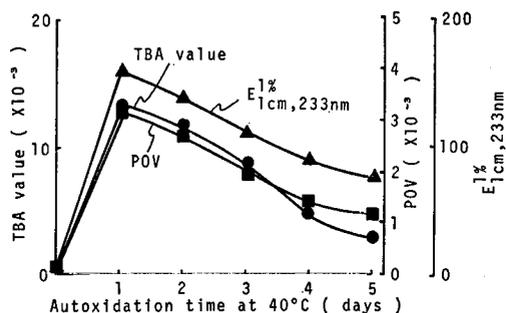


Fig. 7. Autoxidation of linolenate at  $40^\circ\text{C}$ .

#### 4. ホスホリパーゼA阻害に関する酸化分解物の同定

酵素活性阻害の大きいd画分について、その構成成分の酵素処理前後の量的変化を調べて酵素活性阻害物質を検索した。すなわち、ホスホリパーゼA処理d画分と無処理d画分(Origin)をDMH, Me, TMS化後GLCで分析し、無処理d画分のガスクロマトグラムをFig. 10に示している。各ピーク面積を内部標準物質として用いた $\text{C}_{20:0}$ 酸メチル(ピーク14)との相対面積で表示した(Table 2)。ホスホリパーゼ

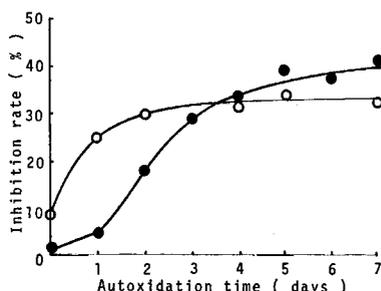


Fig. 8. Inhibition of phospholipase A by linolenate oxidized at  $40^\circ\text{C}$  for various times. In method-A  $\bigcirc\text{---}\bigcirc$  enzyme ( $40 \mu\text{g}$ ) was preincubated with autoxidized linolenate ( $60 \mu\text{g}$ ) for 30 min as described in Fig. 6. In method-B  $\bullet\text{---}\bullet$  enzyme ( $0.8 \mu\text{g}$ ) and autoxidized linolenate ( $800 \mu\text{g}$ ) were added to the reaction mixture without preincubation as described in Fig. 6.

A処理により明瞭に減少したピークはFig. 10で暗影を付している。酵素処理により、比較的対称性のよいピーク9, 11, 13および対称性の劣るピーク6, 7, 8が減少した。これらのピークをGC-MSで分析した。

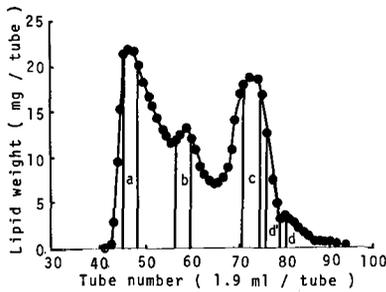


Fig. 9. Gel chromatogram of autoxidized linolenate on Bio-Beads S-X3 column. Autoxidized linolenate (435.6 mg, oxidized at 40°C for 4 days) was gel-chromatographed on Bio-Beads S-X3 column (1.53×135 cm) with benzene.

ピーク 9: DMH 化だけで出現し, 分子イオンは 240 で基準ピークは  $m/e$  111 である (Fig. 11). M-15 ( $-\text{CH}_3$ ), M-31 ( $-\text{OCH}_3$ ),  $m/e$  59

( $\text{H}_3\text{COCO}^+$ ) のフラグメントはメチルエステル, M-44,  $m/e$  44 は DMH 誘導体であることを示唆している. これは methyl 9-formyl-8-nonenoate の DMH 誘導体である (Nakamura *et al.*, 1977). ピーク 11: 分子イオンは 254 で基準ピークは  $m/e$  111 であり, ピーク 9 の同族体で炭素鎖が 1 個大きい methyl 10-formyl-9-decenoate の DMH 誘導体である (Nakamura *et al.*, 1977). ピーク 13: 分子イオンは 356 で, M-31,  $m/e$  59, 55 からメチルエステル, M-44,  $m/e$  44 から DMH 誘導体, M-89,  $m/e$  73 から TMS 誘導体であり, 基準ピーク  $m/e$  199 は TMS の位置を推定させる. これは methyl 11-formyl-9-hydroxy-10-undecenoate の DMH, TMS 誘導体である (中村ら, 1979). ピーク 6: 分子イオンは, 非常に小さいが  $m/e$  271 (M-15), 255 (M-31) の存在から 286 であると推定される (Fig. 11). M-31,  $m/e$  59, 55 はメチルエステルに由来し, 卓

Table 1. Inhibition of phospholipase A by autoxidized linolenate fractions. Linolenate was oxidized at 40°C for 4 days and fractionated as described in Fig. 9.

Fraction	Method-A*—with preincubation enzyme 40 $\mu\text{g}$		Method-B*—without preincubation enzyme 0.8 $\mu\text{g}$	
	Added amount ( $\mu\text{g}$ )	Inhibition rate (%)	Added amount ( $\mu\text{g}$ )	Inhibition rate (%)
a	60.04	41.1	1208	53.7
b	59.97	38.1	1213	37.4
c	60.01	3.0	1200	22.2
d	59.96	30.6	1204	58.5
d'	59.95	9.0	1200	22.4
Origin	60.06	36.6	1211	52.7

\* See legend in Fig. 6.

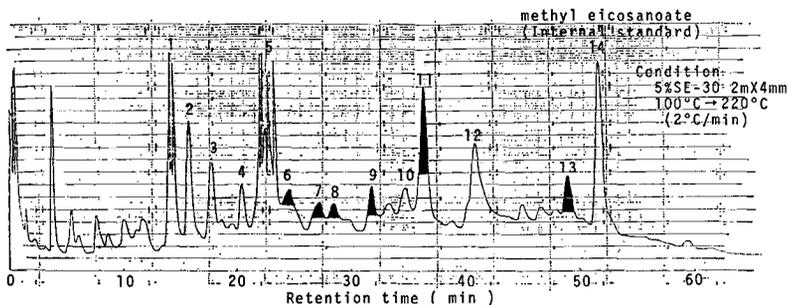


Fig. 10. Gas-liquid chromatogram of Fraction d treated with DMH,  $\text{CH}_2\text{N}_2$  and TMS. GLC was carried out on Fraction d after treatment with dimethylhydrazine, diazomethane and trimethylchlorosilane and hexamethyldisilazane, with a Shimadzu GC-4BPEF gas chromatograph equipped with 2m×4mm I. D. glass column, packed with 5% SE-30 on 60-80 mesh Shimalite W. Temperature was linearly programmed 100 to 220°C at 2°C per min. Fraction d (6 mg) was subjected to GLC before and after preincubation with enzyme (1 mg) as described in Fig. 2. Shaded peaks were significantly decreased after preincubation with enzyme.

Table 2. Phospholipase A reactants in degradation products of autoxidized linolenate\*. The peak areas were determined by half-band width method and calculated from taking peak area of internal standard C<sub>20:0</sub> as 100.

Peaks	Relative peak area		Original compounds identified
	Origin	Enzyme treatment	
1	104	107	methyl 8-hydroxy octanoate
2	53	53	methyl 8-carboxy octanoate
3	41	50	methyl 7-formyl heptanoate
4	24	25	methyl 9-carboxy nonanoate
5	265	259	methyl 8-formyl octanoate
6*	55	37	methyl 9-hydroxy-10-undecenoate
7*	26	19	unidentified
8*	26	18	methyl 11-hydroxy-9-undecenoate
9*	28	18	methyl 9-formyl-8-nonenoate
10	42	42	methyl 10-formyl-9-decenoate (isomer of peak 11)
11*	94	77	methyl 10-formyl-9-decenoate
12	75	68	methyl 9-formyl-9-oxo-nonanoate
13*	53	38	methyl 11-formyl-9-hydroxy-10-undecenoate
14	100	100	methyl eicosanoate (internal standard)

越した m/e 73 は TMS 誘導体であることを、基準ピーク m/e 129 および微小であるが m/e 259 (M-27) は TMS の位置を示唆している。これは methyl 9-hydroxy-10-undecenoate の TMS 誘導体であると考えられる (中村ら, 1979)。また m/e 257, m/e 147 は dihydroxy 化合物の TMS 誘導体が混入していることを推定させる。ピーク7:

TMS 誘導体である数種の化合物の混合ピークであると推測され、同定し得なかつた。ピーク8: m/e 271 (M-15), m/e 239, 199 などそのスペクトルはピーク6に酷似している (Fig. 11)。しかし基準ピークは m/e 73 であり, m/e 129 は大きくはない。m/e 103 は1級アルコールの TMS 誘導体であることを示している。これは methyl 11-hydroxy-9-undecenoate

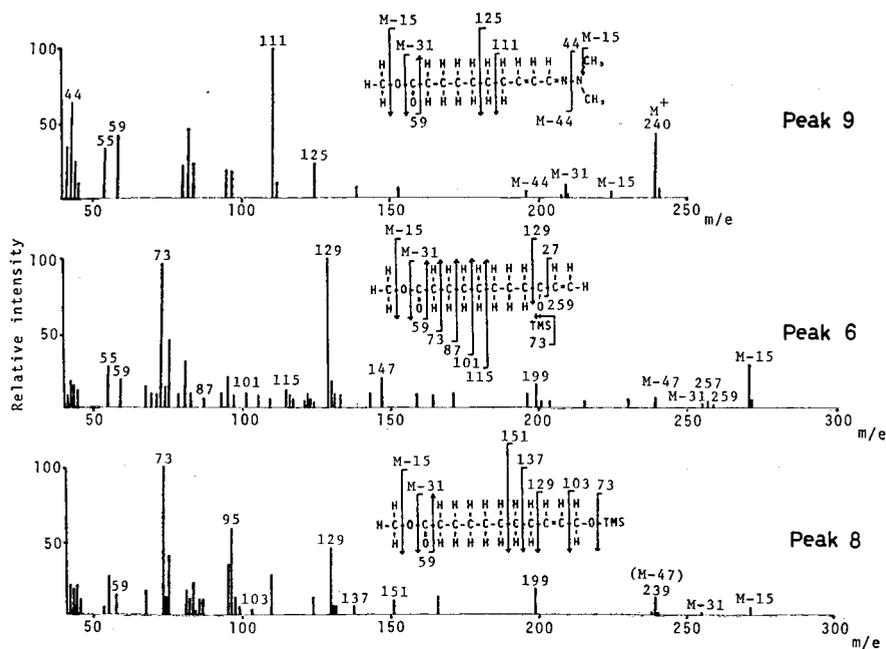


Fig. 11. Mass spectra of peak 9, 6 and 8. GC-MS analysis was carried out with a RM-50 GC Hitachi mass spectrometer equipped with 2 m×3 mm glass column packed with 5% SE-30 on 60-80 mesh Shimalite W and programmed from 100 to 220°C at 2°C per min.

の TMS 誘導体と考えられる (中村ら, 1979).

減少していないピークについても GC-MS スペクトルと既報のデータ (Nakamura *et al.*, 1977; 中村ら, 1979) から同定して化合物名を Table 2 に示している。

これらホスホリパーゼ A と反応する化合物は中村ら (1976) および 吉岡・金田 (1972) によつてアミノ酸と反応しやすい物質として、また強い毒性を示す物質として分離同定された化合物のように、いずれも二重結合と共役した位置に水酸基またはカルボニル基をもつ活性物質であり、とくに共役カルボニルがホスホリパーゼ A と反応して減少するという結果は、アミノ酸との反応性を調べた中村ら (1976) の報告とよく一致している。また、Wells (1973 a, b) は、ホスホリパーゼ A のカチオン結合部位近くに存在するリジン残基が修飾されると活性部位のコンホメーションの変化、および酵素の活性型である dimer form の安定性の減少をひき起こし、その結果酵素が失活すると報告していることから、GC-MS 分析で同定した活性共役カルボニルがホスホリパーゼ A のリジン残基に直接影響を与えている可能性もある。一方、共役アルコールに関しては、飽和アルコールである methyl 8-hydroxy octanoate (ピーク 1) がほとんど減少しないことを考慮すると水酸基の共役化も反応性を高めていると推測される。また、活性阻害が大きい a 画分でも高分子表面にむき出しになっている活性基中に d 画分の活性基と類似のものが存在すると思われる。]

## 要 約

*Crotalus adamanteus* のホスホリパーゼ A 活性測定にあたり、30°C、1 日酸化されたレシチンを基質とするとレシチンの加水分解量は著しく減少した。これはレシチンが酸化して基質になり得ないことのみによるのではなく、レシチンの酸化生成物でホスホリパーゼ A が不活性化されることによると結論した。

次に酸化脂質として酸化リノレン酸メチルを用いてホスホリパーゼ A 活性阻害を調べ、40°C 酸化では 4 日酸化したものの阻害が最も大であつた。酵素と酸化リノレン酸メチルをブレインキュベーションした後、レシチンを加水分解させる Method-A では酵素 0.8  $\mu\text{g}$  の活性を 30% 阻害するに要する 40°C、4 日酸化リノレン酸メチルの量は 1.2  $\mu\text{g}$  であつた。一方、ブレインキュベーションせずに酸化リノレン酸メチルを反応系に直接添加する Method-B では酵素 0.8  $\mu\text{g}$  の活性を 30% 阻害するに要する 40°C、4 日酸化リノ

レン酸メチルの量は 800  $\mu\text{g}$  であつた。

40°C、4 日酸化リノレン酸メチルの Bio-Beads S-X3 クロマトグラフィで得た 5 画分による阻害率を Method-A および Method-B で測定すると、Method-A では多量体画分が最高で、二量体画分、分解物画分の順であり、Method-B では分解物画分が最高で多量体画分、二量体画分の順であつた。

酵素活性阻害の大きい分解物画分をガスクロ分析し、酵素とのインキュベーション後減少したピークを GC-MS 分析した。分解物画分中ホスホリパーゼ A 阻害化合物として methyl 9-formyl-8-nonenoate, methyl 10-formyl-9-decenoate, methyl 11-formyl-9-hydroxy-10-undecenoate, methyl 9-hydroxy-10-undecenoate および methyl 11-hydroxy-9-undecenoate を同定した。これらは二重結合と共役した位置に水酸基またはカルボニル基をもつ活性物質である。

## 文 献

- Buege, J. A. and S. D. Aust 1978 Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52: 302-310
- Chen, L. H. and L. V. Packett 1971 Influence of alpha-tocopherol on the inhibition of beta-glucuronidase by peroxidized linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24(10): 1232-1237
- Chio, K. S. and A. L. Tappel 1969 Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry*, 8(7): 2827-2832
- Faure, M. 1950 Methode purification des lecithines (phosphatidylcholine). *Bull. Ste. Chim. Biol.*, 32(7-8): 503-508
- Frankel, E. N., C. D. Evans, D. G. McConnell and E. P. Jones 1961 Analyses of lipids and oxidation products by partition chromatography. Fatty acid hydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38(3): 134-137
- Freedman, B. 1967 Gas-liquid chromatography of hydroxy fatty esters: Comparison of trifluoroacetyl and trimethylsilyl derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44(2): 113-116
- Johnson, C. B., A. M. Pearson and L. R. Dugan 1970 Gas chromatographic analysis of the dimethylhydrazones of long chain aldehydes. *Lipids*, 5(12): 958-963
- Matsushita, S. 1975 Specific interaction of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *J. Agr. Food Chem.*, 23(2): 150-154
- 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(1): 59-64
- Nakamura, T., M. Toyomizu and T. Nagamoto 1977 Lipid degradation products capable of reacting with amino acid - Identification of 4-hydroxy-2-hexenal, 9-formyl methyl-8-nonenoate, and 10-formyl methyl-9-decenoate from autoxidized methyl linoleate. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43(9): 1097-1104
- 中村 孝・豊水正道・佐々木敬郎 1976 リノレン酸メチルの自動酸化によつて生じる2量体とリジンの変色反応. 日水誌, 42(7): 777-782
- 中村 孝・上木原 昇・豊水正道 1979 自動酸化リノール酸メチル酸分解物のゲルクロマト法とガスマス法による分析. 日水誌, 45(1): 107-114
- 日本油化学協会 1971 過酸化物価. 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
- Osinskaya, L. F. and V. N. Chumakov 1980 Comparative properties of mitochondrial and microsomal NAD(P)H-dependent lipid peroxidation. *Biokhimiya*, 45(2): 217-227
- Ottolenghi, A. 1959 Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochim. Biophys.*, 79: 355-363
- Schlenk, H. and J. L. Gellerman 1960 Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal. Chem.*, 32(11): 1412-1414
- Snyder, F. and N. Stephens 1959 A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 34(1): 244-245
- 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
- Wells, M. A. 1973 a Spectral perturbation of *Crotalus adamanteus* phospholipase A<sub>2</sub> induced by divalent cation binding. *Biochemistry*, 12(6): 1080-1085
- Wells, M. A. 1973 b Effects of chemical modification on activity of *Crotalus adamanteus* phospholipase A<sub>2</sub>. Evidence for an essential amino group. *Biochemistry*, 12(6): 1086-1091
- Wells, M. A. and D. J. Hanahan 1969 Phospholipase A from *Crotalus adamanteus* venom. In "Methods in Enzymology," Vol. 14, ed. by J. M. Lowenstein, Academic Press, Inc., New York and London, pp. 178-184
- 吉岡倭子・金田尚志 1972 自動酸化油脂の毒性に関する研究 (第1報) 有毒成分の分離と同定 (その1). 油化学, 21(6): 316-321
- 吉岡倭子・鈴木勝久・金田尚志 1972 自動酸化油脂の毒性に関する研究 (第2報) 自動酸化油脂の酵素に及ぼす影響. 油化学, 21(12): 881-887

### Summary

Hydrolysis of lecithin with phospholipase A (EC. 3. 1. 1. 4) was markedly inhibited when the lecithin had been oxidized, and preliminary trials showed that the autoxidized lecithin was not only hydrolyzed with the enzyme as a substrate but inactivated the enzyme directly. Therefore the inhibition of phospholipase A by autoxidized lipid was studied by using autoxidized methyl linolenate.

The highest inhibition was observed in linolenate which was oxidized at 40°C for four days. By method-A in which the phospholipase A activity was determined after preincubation of the enzyme with the autoxidized linolenate at 25°C for 30 min, 0.8 μg of phospholipase A was brought to 30% loss of the activity by 1.2 μg of the autoxidized linolenate, while by method-B in which the activity was determined in the presence of the autoxidized linolenate without the preincubation, the same loss rate of the enzyme activity (0.8 μg) required 800 μg of the autoxidized linolenate.

In order to identify the active compounds to inhibit the enzyme, the autoxidized linolenate was fractionated by gel chromatography on Bio-Beads S-X3 column. The inhibitory action of each fraction on the enzyme was determined by method-A and -B, and the following results were obtained: by method-A, polymer > dimer > degradation product; by method-B, degradation product > polymer dimer. Then the decomposition product fraction was analyzed by GLC after conversions of carbonyl into dimethylhydrazone, of hydroxy group into trimethylsilyl ether and of carboxyl group into methyl ester, and the compounds that decreased after reaction with the

enzyme were identified by GC-MS. The active compounds to inhibit phospholipase A were 9-formyl-8-nonenoate, 10-formyl-9-decenoate, 11-formyl-9-hydroxy-10-undecenoate, 9-hydroxy-10-undecenoate and 11-hydroxy-9-undecenoate. These were conjugated carbonyl or conjugated hydroxy compound.