ヘパトカタラーゼによるリノール酸メチル-ヒドロ パーオキシドのペルオキシダーゼ性分解について

内 藤 博, 嶋 矢 督

広島大学水畜産学部食品工業化学科

On the Peroxidatic Decomposition of Methyl Linoleate Hydroperoxide by Hepato-Catalase

Hiroshi Naito, Susumu Shimaya

Department of Food Chemistry and Technology, Hiroshima University,
Fukuyama, Hiroshima

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 24 (5), 284~286 (1971)

In an attempt to investigate enzyme-catalyzing degradation of lipid peroxide in the living body, methyl linoleate hydroperoxide (MLHP) was tested as a substrate for peroxidatic reaction catalyzed by a commercial hepatocatalase (E. C. 1. 11. 1. 6.), Caperase.

Autoxidized methyl linoleate was further fractionated on a cellulose-powder column with *n*-hexane then with methanol, and MLHP in the latter eluate was applied on the enzyme assay.

The approximate reaction constant, k_1 , was calculated from the linear relationship of substrate concentration and the maximum velocity on the color development of the excess amount of guaiacol as a hydrogen donor.

Although MLHP did not react with the intact enzyme at all, partial alkali-denaturation within the close pH range between 11.0 and 11.3 made it possible to catalyze the decomposition of both H_2O_2 and MLHP at approximately the same rate of the order of 10^2 sec^{-1} , mole^{-1} , with higher value on MLHP than on H_2O_2 , provided that one mole of hydroperoxide is contained per mole of MLHP.

(Received May 4, 1971)

脂質のヒドロパーオキシド (LHP) は各種の栄養的あるいは病理的要因によって生体内で生成することが明らかにされているが、このような物質が分解または安定化する機構、とくに酵素の関与について現在までに十分な知見がえられていない。いっぽうカタラーゼは水素供与体の存在でヒドロパーオキシド (H_2O_2 もふくめた広義の) を基質としてペルオキシダーゼ (POD) 活性を発現することが知られているが、LHP を基質として検討した報告が見当たらないので本実験をおこなった。

実 験 方 法

1. リノール酸メチル-ヒドロパーオキシド (MLHP) の調製

精製リノール酸メチル尿素複合体(The Holmel Inst.,

U. S. A.) より Banks¹⁾らの方法にしたがって Peroxide Value (P. O. V.)²⁾が約 1,500meq/kg に達するまで *n*-ヘキサン、85%メタノール混液中で酸素通気によりヒドロパーオキシドの調製をおこない、ついで Kokatnur³⁾らの方法により Watman No. 1 粉末ろ紙(Coarse type), または東洋粉末ろ紙(A型, 100—200メッシュ) 2.0×20 cm のカラムで吸着クロマトグラフをおこない、*n*-ヘキサン、メタノールの順にそれぞれ未反応画分および MLHP に分画した(第1図)。

調製品の一部は P. O. V.; 3,600 (理論値の59%), $\epsilon_{232m\mu}$; 14,400 (第2図) をしめた。また赤外線吸収スペクトルでは (oil smear として測定) 2.92 μ (ヒドロパーオキシド) および 10.10 μ (trans-trans diene) の吸収を確認した。

2. 酵素

Fig. 1. Absorption chromatography of autoxidized methyl-linoleate on cellulose-powder column. (Watman No.1, 2.0×20 cm)

Fig. 2. Ultra-violet absorption spectrum of MLHP in ethanol.

市販のカタラーゼ標品, (Caperase, Molins de Rey, Barucelona, Spain, エーザイ株式会社の提供による) をもちいた。(120 Pevya units/mg.)

3. POD 活性の測定

水素供与体としてグアヤコールをもちい 470mμ に

ける発色値から推定したり。

すなわち酵素溶液 (3 mg) 1.0ml とリン酸緩衝液 2.5 ml を混合し, 0.5M KOH で種々の pH に調整し, 室温で30分間放置したのち20mM グアヤコールを加えて全量を5.5ml としたうちから2.0ml をキューベットに入れ, 基質として $1-7 \times 10^{-3}$ M H_2O_2 または $0.3-0.6 \times 10^{-3}$ M MLHP (いずれも最終濃度) を50μl (最終濃度 0.3M) のエタノールに溶解して加え, すみやかにグアヤコールの発色を経時的に測定した。0~20秒間はおおむね直線的であり, この部分を最大反応速度 V' とした。

Hunter¹⁾にしたがって近似的な速度定数 k_1 をもとめた。($k_1 = (1/[\text{基質}] \cdot \text{酵素量}) \times V'$), ただしテトラグアヤコール: 基質=1:4 とし計算。

結 果

第3図に示すように POD 活性は pH 11.0-11.3 のせまい範囲内で発現し, その両側で急激に低下するが, MLHP のばあいは酸性側でよりゆるやかな減少をしめた。また第4図から明らかなように反応速度 V' は H_2O_2 の濃度に比例し, これより速度定数 k_1 を推定した。

本実験にもちいた MLHP は反応液中 0.6×10^{-3} M よりも高い濃度では混濁がいちじるしいため測定が不可能であった。また MLHP は非酵素的にグアヤコールをわずかに発色させるのでブランクとして差引いた。

反応液中に脂質溶剤として加えたエタノールは同時に

Fig. 3. Effect of pH on the peroxidase-activity of hepato-catalase.

Reaction mixtures contained in mM/2.5 ml: 730 phosphate buffer (pH was adjusted with 0.5M KOH), 0.002 caperase, 6.8 guaiacol and 70 H_2O_2 or MLHP 0.6 in a solution of 50 μl ethanol. Measurement was carried out from zero to 20 sec. immediately after addition of substrate.

Fig. 4. Peroxidase activity of alkali-denatured hepato-catalase in different substrate concentrations. Substrate was added after 30 min. preincubation in a room temperature at pH 11.0-11.3. Details are also shown in the footnote of Fig. 3.

水素供与体であるために無添加区に比較して V' が減少しているが、第1表に示したようにいずれのばあいも Horse raddishペルオキシダーゼ (EC. 1. 11. 1. 7.) の k_1 : 10^6 ⁴⁾ にくらべて低い 10^2 の値をしめた。Inada⁵⁾ らは牛肝カタラーゼが pH 11. 1においてロイコマラカイト緑を水素供与体としたばあい H_2O_2 に対して 10^2 の値を報告しており、本実験結果と一致した。

なお MLHP はカタラーゼ反応を全くしめさないが、ペルオキシダーゼ作用に関しては H_2O_2 と同様であり、むしろやや反応性を高める傾向さえしめた。この結果は至適 pH 曲線が両者でややよこなっていることと関連して興味深い現象と考えられる。

Table 1. Estimated rate constant of peroxidase activity of alkali-denatured hepatocatalase

Substrate		V' ΔA 470m μ /sec.	k sec. ⁻¹ mole ⁻¹
H_2O_2	$7.0 \times 10^{-2} M$	13.0×10^{-3}	0.4×10^2
H_2O_2	$7.0 \times 10^{-2} M$	$6.5 \times //$	$0.2 \times //$
+ 0.3M ethanol			
MLHP	$0.6 \times 10^{-3} M$	$4.0 \times //$	$1.4 \times //$
+ 0.3M ethanol			
H_2O_2	$7.0 \times 10^{-2} M$	$5.0 \times //$	$0.15 \times //$
+ 0.3M ethanol			
+ $1.1 \times 10^{-3} M$ Methyl linoleate			

See in the foot-notes of Fig. 3 and Fig. 4.

考 察

以上の実験結果からカタラーゼは pH 11.0—11.3のせまい範囲で MLHP を基質として POD 活性をしめすことが明らかである。カタラーゼの POD 活性発現に関しては多くの報告があり、酸、アルカリ、各種の蛋白質変性剤あるいはプロテアーゼ作用などによって酵素の立体構造が一部解離して、内部のヘム部分が露出することにより基質と結合反応するものと解釈されている⁶⁾。

いっぽう生体内の脂質酸化に関しては多くの研究がなされているが、細胞の膜成分は多量の不飽和脂肪酸をふくんでいるので、もし脂質酸化がおこるものとすればその反応は自己触媒的であるために有害な影響をあたえることが予想されるが、これに対し種々の安定化要因が考えられる。Christophersen⁷⁾ はラット肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼが GSH を水素供与体としてリノール酸ハイドロパーオキシドを安定なハイドロオキシ化合物に還元することをしめた。生体内のカタラーゼの作用機作については現在明らかでないが、ある種の生理的狀態において POD 活性を発現することはじゅうぶん考えられることである。

MLHP は in vitro でミトコンドリアの酸化的リン酸化を非共役化するが⁸⁾、いっぽう Neubert⁹⁾ は ATP で回復するミトコンドリアの swelling は「収縮因子」によっても回復し、その主成分はカタラーゼであることを見出しているが、MLHP のリン脂質酸化を経由したリン酸化非共役に対してカタラーゼがその POD 活性の発現によって阻止する可能性が示唆される。

文 献

- 1) Banks, A., Fazakerley, S., Keay, J. N. and Smith, J. G. M.: *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 724 (1961)
- 2) Olcott, H. S. and Doler, O. A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 820 (1963)
- 3) Kokatnur, M. G., Bergan, J. G. and Draper, H. H.: *Anal. Biochem.*, **12**, 325 (1965)
- 4) Hunter, M. J., (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., ed.) *Method in Enzymol.*, **2**, 770 (1955), Acad. Press.
- 5) Inada, Y., Kurozumi, T. and Shibata, K.: *J. Biochem.*, **46**, 155, 1101 (1959)
- 6) 満田久輝: 蛋白質・核酸・酵素, **8**, (11), 83 (1963)
- 7) Christophersen, B. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, 35 (1968)
- 8) Naito, H., Johnson, B. and Connor Johnson, B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 545 (1966)
- 9) Neubert, D., (Tager J. M., Papa, S., Quagliaricillo, E. and Slater, E. C., ed.) *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, 359, (1966), Elsevier Pub. Co.

(昭和46年5月4日受理)