脂質の酸化に伴うタンパク質中のメチオニン およびリジンの損傷

小林 邦彦*, 村田 昌一**, 松富 直利*
加藤 昭夫*

* 山口大学農学部農芸化学科

** 九州大学農学部食糧化学工学科

Damage to Methionine and Lysine in Proteins Involved with Oxidation of Lipids

Kunihiko KOBAYASHI,* Masakazu MURATA,**

Naotoshi MATSUDOMI,* Akio KATO*

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
Yamaguchi, 753

** Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka, 812

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 36, 379~382 (1983)

Egg albumin (from Difco)-ethyl linoleate mixture (2:1) was stored at 30°C, RH 80%. Damage to methionine and lysine residues, and changes of browning value (whiteness by Hunter) of the oxidized protein with the lipid in this system were estimated. On the oxidation of ethyl linoleate, PV of the lipid increased rapidly after 3-4 days and reached the maximum after 7 days, while CV increased rapidly after 5-6 days and reached the maximum after 8-9 days. Lysine residue (FDNB reactive lysine) of the oxidized protein was damaged gradually after 7 days and whiteness decreased gradually with damage to lysine. Methionine of the oxidized protein, which was determined by both of the Neumann method (iodoacetate treatment-performic acid oxidation method) and gas chromatographic method (cyanogen bromide treatment-methylthiocyanate method), was damaged rapidly after 5 days and about 70% of methionine was damaged during 12 days. From these results, it was concluded that damage to methionine arose more rapidly than damage to lysine and browning of the oxidized protein with lipids. Furthermore it was shown that the method by gas chromatography for determination of methionine residue in proteins was more convenient than the Neumann method.

(Received March 17, 1983)

前報¹⁾においてリノール酸エチルの自動酸化に伴う共存タンパク質(カゼイン)中のメチオニン残基の酸化をNeumann法および酵素消化法により測定した。その結果、酸化の初期においてすでにメチオニン残基のスルホキンド、スルホンへの酸化が起こっていることを認め、このメチオニンの酸化はタンパク質の褐変、リジンの変化などに先立って起こっているであろうと推論した。今回は前回よりおだやかな条件でリノール酸エチルと卵アルブミンを混合酸化させて、Neumann法、ブロムシアニン法によりメチオニン残基を測定するとともに、2, 4ジ

ニトロフルオロベンゼン(FDNB)反応性リジン、タンパク質の褐変度を測定して比較検討した。

実験方法

1. リノール酸エチルとの混合により自動酸化された卵アルブミン

リノール酸エチル(東京化成製)と卵アルブミン粉末(Difco製)を1:2の割合で乳鉢中でよく混合し、大型シャーレに拡げ、相対湿度80%(飽和塩化カリウム溶液で調整)に調整したデシケータに入れ30°Cの恒温器中で保存反応させた。一定時間後に試料の一部をとりだし、前報¹⁾同様エーテルにて油脂を抽出し、リノール酸

*〒753 山口市吉田 1677-1

**〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1

エチル画分および酸化された卵アルブミン画分の分析試料を得た。なお対照 (0 日) は混合直後に採取したものである。

2. メチオニンの測定

卵アルブミン中のメチオニン (Met) は前報¹⁾に示した Neumann 法²⁾ (モノヨード酢酸処理・過ギ酸酸化法) により測定した。また Finlayson および McKenzie によるブロムシアン分解ガスクロマト法³⁾ によっても測定した。すなわち試料タンパク質約 5 mg を 1 ml のスクリーパイアルにとり 0.2 ml のギ酸に溶解あるいは懸濁し、これに 10% ブロムシアンおよび内部標準エチルチオシアネート (EtSCN) を含むギ酸溶液 0.2 ml を加えて 4°C, 24 時間反応させた。その上清をとり、生じたメチルチオシアネート (MeSCN) を測定した。MeSCN のガスクロマトグラフィーによる測定は装置日立 063 型、検出器 FID を用い、固定相は 5% EGA で被覆された High Performance DMCS-処理 Chromosorb-W (80~100 メッシュ) を 2.5 mm×6 ft のガラスカラムに詰め、carrier gas は窒素ガス 30 ml/min, 温度 90°C (injector 温度 140°C) にて行なった。内部標準として EtSCN を用いて MeSCN との面積比からあらかじめ作成した検量線より MeSCN の濃度を求めた。

3. FDNB 反応性リジンの測定

Carpenter のいわゆる有効性リジンに相当するもので Booth の改良法⁴⁾によって測定した。

4. 過酸化物質価およびカルボニル価の測定

抽出したリノール酸エチルの過酸化物質価 (PV) は AOAC 法⁵⁾, カルボニル価 (CV) は日本油脂協会法⁶⁾により測定した。

5. 褐変度の測定

リノール酸エチルを除いた酸化卵アルブミン画分の粉末を測色計 (日本電色工業 N5 型) の粉末用セルに入れハンター色度 (L, a, b) を測定し、ハンター白度を求め褐変度とした。

実験結果および考察

1. リノール酸エチルの酸化

リノール酸エチルと卵アルブミンの混合物を RH 80%, 30°C で貯蔵したときのリノール酸エチルの酸化の進行を PV と CV を測定することにより追跡した結果は Fig.1 のようであった。

PV は 3~4 日ごろから急激に上昇し 7 日ごろで最高に達し、以後急激に減少していった。また CV は PV よりわずかに遅れ 5~6 日ごろから上昇し 8~9 日で最高に達し、以後急激に減少するが 12~13 日からほぼ一定のレベルに達した。以上、今回のリノール酸エチルの酸化は過酸化物質の生成についてカルボニル化合物の生成と

Fig.1. Time course of lipid oxidation in the egg albumin-ethyl linoleate mixture (2:1), at 30°C, RH 80%.

○ PV, × CV.

Fig.2. Chromatograph of methylthiocyanate, ethylthiocyanate and formic acid by gas chromatography.

(1) Formic acid, (2) Methylthiocyanate, (3) Ethylthiocyanate.

いった通常みられる油脂の自動酸化の進行がみられ、前報¹⁾ (RH 80%, 50°C) に比べて非常にゆるやかに進行した。

2. 酸化卵アルブミン中のメチオニンの損傷

タンパク質中の Met 残基のガスクロマトグラフィーによる定量時の MeSCN と EtSCN のガスクロマトグラフは Fig.2 のようであった。EtSCN と MeSCN の分離もよく、検量線も直線関係が認められた。これを用いて酸化卵アルブミンの Met 残基を測定した結果は Fig.3 のようであった。ついで Neumann 法¹²⁾により酸化卵アルブミン中の Met 量を測定した結果は Fig.3

Fig. 3. Damage of methionine in egg albumin-ethyl linoleate mixture stored at 30°C, RH 80%.

○ Neumann method, × Gas chromatography method, ● Performic acid oxidation method.

のようであった。またモノヨード酢酸処理を行わない通常の過ギ酸酸化法⁷⁾による Met の測定値を Fig. 3 に併記した。

酸化卵アルブミン中の Met をモノヨード酢酸処理を行わないで過ギ酸酸化法⁷⁾により測定した結果では5日目ごろからゆるやかに減少し始め 12 日で約 28% 損傷を受けたことを示した。これに対してメチオニンスルホキシド (MetSO) やメチオニンスルホン (MetSO₂) を考慮に入れた Neumann 法およびガスクロマト法による Met の測定では、5日目ごろから急激に減少し 10日目ごろからゆるやかになり、12 日目で約 70% 損傷を受けたことを示した。なお図に示さなかったが 18 日目の試料について Neumann 法で分析した結果、Met 含量は 0.60% で損傷率約 83% にまで酸化損傷されていた。このように Neumann 法により求めた Met の値とモノヨード酢酸前処理をしないで過ギ酸酸化法により求めた Met の値の差は、その定量法の原理から MetSO, MetSO₂ 量を示すものである。この差が Fig. 3 にみられるように貯蔵日数とともに大きくなっていることは、Met が MetSO さらには MetSO₂ に酸化された部分の多いことを示している。12 日目についてみると Met の約 70% が損傷を受け、損傷 Met の約 65% は MetSO, MetSO₂ への酸化であった。残りはさらに Met の基本骨格構造の破壊にまで進んだものと推察された。Met の MetSO, MetSO₂ への酸化の開始期および急増期はいずれもリノール酸エチルの PV の増加開始期および急増期と 1~2 日のずれで起こっていることから、油脂の自動酸化により生じた過酸化化物により Met が酸化されたことを暗示している。

また Fig. 3 にみられるようにガスクロマトグラフ法と Neumann 法により測定された Met 含量はほとんど

Fig. 4. Changes in FDNB reactive lysine and browning value (whiteness by Hunter) of egg albumin-ethyl linoleate mixture stored at 30°C, RH 80%.

○ FDNB reactive lysine, × Whiteness.

一致していた。このことからタンパク質中の Met 測定のための両方法を比べるとガスクロマトグラフ法は Neumann 法に比べて実験操作が非常に簡単で速く、多数の試料の測定にはより便利であることが認められた。

3. 酸化卵アルブミン中のリジンの損傷

酸化卵アルブミン中の FDNB 反応性リジンを測定した結果は Fig. 4 のようであった。また卵アルブミン粉末の褐変の進行を測色計で白度 (whiteness) を測定することにより追跡した結果も Fig. 4 に示した。

酸化卵アルブミン中の FDNB 反応性リジンは7日目ごろからゆるやかに減少し始め、一方白度も7日目ごろから減少し始め、両者はほぼ並行して減少した。このことは一般に認められているように褐変の主因がタンパク質のアミノ基、とくにリジンの ε-アミノ基とカルボニル基の反応に基づいているということから説明できる。Fig. 4 では 16 日でリジンが約 33% 損傷を受け、褐変も肉眼観察でやや黄褐色の程度であった。Fig. 4 に示さなかったが 52 日でリジンは約 50% 損傷を受け、褐変も黄褐色がやや濃くなった (白度約 61) が全体的には非常にゆるやかな変化であった。このことは、リジンの損傷、褐変がリノール酸エチルの酸化により生じたカルボニル基とリジンの ε-アミノ基を含むタンパク質のアミノ基との反応に始まることからリノール酸エチルの CV の変化 (Fig. 1) から説明できる。今回はリノール酸エチルの酸化条件を前報¹⁾よりゆるやかにして、PV と CV の急変時期に差が現われるように酸化を徐々に行なわせた。このため Met 残基はすみやかに損傷を受けるのに対して、リジン残基の損傷や褐変は比較的にゆるやかに進行することが認められた。このことはこのような酸化タンパク質の理化学性や栄養性を論ずる場合、Met 残

基の損傷の影響がリジン残基の損傷の影響より早く現われ、とくに酸化の初期においては Met 残基の損傷の影響が顕著に現われることが暗示された。

要 約

リノール酸エチルと卵アルブミン (Difco 製) を 1:2 の割合で混合したものを 30°C, RH 80% で保存し反応させた。酸化された卵アルブミンのメチオニン残基およびリジン残基を測定するとともに、褐変度 (ハンター白度) を測定して比較検討した。

リノール酸エチルの酸化状況は PV では 3~4 日ごろから急激に上昇し、7 日ごろで最高に達した。これに対して CV ではわずかに遅れ 5~6 日ごろから上昇し 8~9 日で最高に達した。リジン残基 (FDNB 反応性リジン) は 7 日ごろから減少し始め徐々に損傷を受け、それとともに褐変も進行した。一方メチオニン残基は Neumann 法 (モノヨード酢酸処理-過ギ酸酸化法) およびブロムシアン処理ガスクロマトグラフィ法いずれを用いて測定しても 5 日ごろから急激に減少し、12 日で約 70% 損傷を受けた。このように油脂と共存するタンパク質の酸化では褐変やリジンの損傷に先立ってメチオニンが酸化損傷されることが明らかにされた。

なおタンパク質中のメチオニン残基の定量には従来の Neumann 法よりはブロムシアン・ガスクロマトグラフ

法が操作が簡単で、速く、優れていることが認められた。

本報の概要は昭和 53 年 5 月日本栄養・食糧学会総会で報告した。

本実験の遂行にあたり多大のご協力をいただいた嶺すみ江、山内律子両嬢および本学部生物化学教室の諸氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 小林邦彦, 中原孝子, 三角英治, 松富直利: 栄養と食糧, **35**, 69 (1982)
- 2) Neumann, N.D., Moore, S. and Stein, W.H.: *Biochemistry*, **1**, 68 (1962)
- 3) Finlayson, A.J. and McKenzie, S.L.: *Anal. Biochem.*, **70**, 397 (1976)
- 4) Booth, V.H.: *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 658 (1971)
- 5) A.O.A.C.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11th Ed. (Horwitz, W., ed.), 445 (1970)
- 6) 日本油脂協会編: 基準油脂分析法, 73 (1973)
- 7) Hirs, C.H.: *Methods in Enzymology*, Vol. XI (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.), 59 (1967), Academic Press (New York)

(昭和 58 年 3 月 17 日受理)