食品タンパク質のメチオニン残基の酸化と修復†

林 力 丸

(京都大学食糧科学研究所)

タンパク質のメチオニン残基は、生体外ではもちろんのこと生体内でも酸化を受ける。このため、食品化学、栄養学、ペプチド化学、生化学あるいは医学の領域で、メチオニンの酸化と酸化型メチオニンスルホキシドをめぐるいくつかの問題が提起されている(文献1~4を参照)。これらの問題を究明するためのキーポイントは、メチオニンスルホキシド残基の正確かつ簡便な定量方法の確立であると筆者は考え、定量方法を工夫するとともに、メチオニン残基の酸化と修復の問題に関心をもってきた。ここでは、食品化学や栄養学を中心にこの研究の一端と周辺的话题を紹介する。

1. メチオニンの酸化と還元の化学

メチオニンは酸化を受けると、イオウ原子に1原子の酸素を結合しメチオニンスルホキシドとなる。さらに強い酸化を受けると、もう1原子の酸素を結合しメチオニンスルホンに変化する(図1)。このスルホンは、酸化の最終物質であり通常の方法では還元を受けず、メチオニンとしての栄養的効果もない。一方、メチオニンスルホキシドは還元を受けメチオニンに修復される。

メチオニンのイオウに酸素がひとつ結合すると、このS原子は不斉中心となる。したがって、メチオニンの α 炭素がLならば、化学的酸化によりL-メチオニン *d*-スルホキシドとL-メチオニン *l*-スルホキシドというジアステレオマーが生成する。

メチオニンのスルホキシドへの酸化は容易に起こる。過酸化水素などによる酸化処理⁽⁵⁾のほか、食品に関係あるものでは、酸化脂肪酸⁽⁶⁾やアスコルビン酸水溶液中でも酸化が起こる⁽⁷⁾。タンパク質の精製などの取り扱い中にも自然に酸化するようである⁽⁴⁾。

一方、メチオニンスルホキシドをSH化合物で還元するのは容易でない。たとえば、Houghten および Li (1983)⁽⁸⁾によると、7個のメチオニンをスルホキシドに酸化させたプロラクチンは、6%のメルカプトエタノールを37°Cで作用させたところ、24時間後に81%しか還元されないし、24%の試薬を用いても、24時間後に96%が還元されただけであった。遊離のメチオニンスルホキシドを6%のメルカプトエタノールで還元する場合でも、完全に還元するためには165時間以上を必要とした。

メチオニンスルホキシドはアルカリ中で安定であるが、塩酸中で加熱するとメチオニンになってしまう。

2. メチオニンスルホキシドの残基の定量法

タンパク質に含まれるメチオニンスルホキシド残基を遊離のアミノ酸にするために、6N塩酸による加水分解を行うと大部分がメチオニンになってしまうので、従来は主にアルカリ加水分解が行われていた⁽⁹⁾。しかし、この方法では、ほとんどのアミノ酸が分解してしまい、メチオニンスルホキシドしか測定できないという大きな欠点がある。

一方、間接的測定法として、タンパク質に含まれるメチオニン残基をヨード酢酸⁽⁹⁾あるいは臭化ブロム⁽¹⁰⁾で完全に修飾したのち、過ギ酸酸化し、メチオニンスルホキシドをスルホンにして定量する方法がある。この方法は、操作が繁雑であるとともに、測定値に誤差を生じやすく、その上、不溶性のタンパク質や食品自体の分析には適用しがたいという難点がある。

さらに、いずれの方法もタンパク質の総メチオニン量やアミノ酸組成を求めるため、6N塩酸による加水分解を別に行わねばならない。このような測定法の制約は、メチオニンの酸化と修復をめぐる研究の遅れの一因と思われる。

塩酸と違いスルホン酸類による加水分解では、メチオニンスルホキシドは安定に保たれるという報告が十分な

† Oxidation and Repairing of Methionine Residues in Food Proteins.
Rikimaru HAYASHI (The Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji, Kyoto 611)

図 1 メチオニンの酸化過程

表 I 商品として得られるタンパク質および食品に含まれるメチオニンとメチオニンスルホキシド⁽¹²⁾

試 料	含 量	
	メチオニン	メチオニンスルホキシド
精製タンパク質		
mol/mol		
リゾチーム	1.83	0.07
卵アルブミン	14.95	0.63
リボヌクレアーゼA	3.72	0.25
タカアミラーゼ	9.02	0
αキモトリプシンノーゲンA	1.82	0
カルボキシペプチダーゼY	6.30	0.58
ミオグロビン	2.06	0
食品および食品材料*		
μmol/g 試料		
大豆分離タンパク質		
(粉 状)-A	70.5	0.5
同 上 (顆粒状)-B	21.9	10.9
同 上 (繊維状)-A	66.6	13.2
同 上 (粉 状)-C	14.7	29.3
脱脂大豆粉-D	20.4	11.3
卵白分離タンパク質-E	191.2	31.0
同 上 -F	225.3	24.7
牛乳ホエー濃縮物-G	112.4	32.0
かまぼこ-H	71.5	12.4
うどん-I	10.1	4.6

* アルファベットは製造会社。

証明がないまま以前からなされていた⁽¹¹⁾。そこでパラトルエンスルホン酸による加水分解法をくわしく検討した⁽¹²⁾。その結果、厳密に精製したパラトルエンスルホン酸の3N水溶液を用い、真空下に110°Cで22から72時間加水分解すると、メチオニン残基とスルホキシド残基のほか、トリプトファンを除くすべてのアミノ酸を精度よく遊離できることが判明した。この方法では、加水分解中に多量の糖や他のアミノ酸を共存させても、メチオニンやスルホキシドの回収率に影響しない。この方法では糖タンパク質に含まれるグルコサミンも80%以上の回収率で遊離させることができた。純化しにくい

が、メタンスルホン酸もこの目的に使える。

3. タンパク質や食品中の酸化メチオニンの量

精製後凍結乾燥され市販されているタンパク質に相当量のメチオニンスルホキシドが存在することがある(表I)しかし、一残基分の存在が認められることはないから、ここで検出されたスルホキシドは酵素にとって意味のあるものではなく、精製あるいは保存中に生じたものと考えられる。

食品あるいは食品素材は、大量のメチオニンスルホキシドを含むことがある。とくに、ある市販の大豆タンパク質にはメチオニンよりその酸化型の量が多い(表I)という驚くべき結果が得られた⁽¹²⁾。Todd らもアルカリ加水分解法により、大豆の粉、濃縮物、分離物では総メチオニンの4~59%、乳児用乳製品では7~32%がメチオニンスルホキシドと報告している⁽¹³⁾。

このようなメチオニンスルホキシドは食品の加工途中あるいは貯蔵中に生成するものと思われる。たとえば、脱脂粉乳や調整粉乳を水分活性0.80の条件で貯蔵すると1カ月後には、メチオニンの酸化がかなり進むことを筆者らは確認している⁽¹⁴⁾。注意深く精製し、丁寧に保存してあるはずの精製酵素標品にも酸化型が認められる(表I)ことは、激しい食品加工の工程や貯蔵の経過中にはそれ以上のメチオニンの酸化が起こっても不思議ではない。

市販の食品素材のなかにメチオニンの酸化型が多いという分析結果は、看過することはできない。この酸化型が直ちに毒性とか栄養性の劣化に結びつかないにしても、口に入れる食品が分子レベルで汚れていることは、とくに加工食品を日常的に食べざるをえない都会生活者にとって、何とも気持ちの悪いものである。

タンパク質内のメチオニン残基の酸化を引き起こす酸化体の同定や酸化の機構を究明する研究は少ないのが現状であるが、食品の加工工程や貯蔵過程で起こりうるタンパク質の酸化劣化を防ぐために、この研究はなされなければならないと常々考えている。いったん酸化されると、還元処理による修復は難しいことは、上記(1. 参照)のとおりである。

4. 酸化メチオニンの栄養性と代謝作用

メチオニンは多くの食品や飼料の第一制限アミノ酸であるから、この酸化型の栄養性に関して古くから多くの関心が持たれている。

遊離のメチオニンスルホキシドの栄養的有効性はメチ

オニンとはほぼ等しいし、組織への取込み量や排泄量に大きな差はない。しかし、吸収速度が低いためかあるいは還元作用が律速になるためか、炭酸ガスへの生体内変換は遅れる⁽³⁾。メチオニンスルホキシドの生体内還元および還元酵素に関する報告がある⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。

タンパク質結合型のメチオニンスルホキシドも非常によく利用されるというが、組織内分布に差が見出されている⁽³⁾。

メチオニンスルホキシド残基の光学異性体をプロテアーゼが区別することがある(林, 未発表)。たとえば、メチオニンスルホキシドを含むペプチドとメチオニンを含むペプチドのプロテアーゼ消化性を比較すると、前者が非常に遅いことがある。また、パンクレアチンはSの不斉性を区別し、dスルホキシドをl体よりも非常に遅く遊離させる。プロテアーゼがスルホキシド残基を遊離しにくいというほかの報告もある⁽¹⁸⁾。酵素の特異性を考えるとプロテアーゼばかりでなく、メチオニン還元酵素もSの不斉性を区別する可能性があるから、スルホキシド異性体の消化や吸収の差異にも注意を払う必要がある。このほか、過酸化水素処理したタンパク質は、メチオニンの酸化だけが原因ではないが、プロテアーゼ消化性のほかいろいろな物性に変化が起こる⁽¹⁹⁾。

おわりに

食品の加工や貯蔵中にメチオニンが酸化され、栄養性や加工特性に多少なりとも影響がでることは明らかである。いったん酸化されると、還元を行うことは非常に困難であるから、酸化抑制の工夫が食品の分野で重要な課題である。そのため、メチオニン酸化の要因究明など酸化の化学に関して知識を深める必要がある。メチオニンスルホキシドをめぐる生化学の問題については別稿に譲る⁽⁴⁾が、これらの問題の解決のために、メチオニンスルホキシドの簡便かつ正確な定量法の設定は大いに貢献すると考える。

- (1) N. Brot and H. Weissbach : *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 271 (1983).
- (2) N. Raksakulthai, A. Aksnes and L. R. Njaa : *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 619 (1983).
- (3) P. A. Finot : "Modification of Proteins : Food, Nutritional and Pharmacological Aspects," ed. by R. E. Feeney and J. R. Whitaker, Am. Chem. Soc., Washington, D. C. 1982, p. 91.
- (4) 林 力丸 : 「活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構—」, 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, 蛋白質 核酸 酵素, 特集号, 印刷中 (1988).
- (5) S. Boonvisut, A. Aksnes and L. R. Njaa : *Food Chem.*, **9**, 183 (1982).
- (6) 小林邦彦, 中原孝子, 三角英治, 松富直利 : 栄養と食糧, **35**, 69 (1982).
- (7) A. Aksnes and L. R. Njaa : *Food Chem.*, **7**, 305 (1981).
- (8) R. A. Houghten and C. H. Li : *Method Enzymol.*, **91**, 549 (1983).
- (9) N. P. Neumann : *Method Enzymol.*, **11**, 487 (1967).
- (10) Y. Shechter, Y. Burnstein and A. Patchornik : *Biochemistry*, **14**, 4497 (1975).
- (11) W. E. Savage and A. Fontana : *Method Enzymol.*, **47**, 453 (1977).
- (12) R. Hayashi and F. Suzuki : *Anal. Biochem.*, **149**, 521 (1985).
- (13) J. M. Todd, N. L. Marable and N. L. Kehrberg : *J. Food Sci.*, **49**, 1547 (1984).
- (14) M. Okamoto and R. Hayashi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1683 (1985).
- (15) C. Aymard, L. Seyer and J.-C. Cheftel : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1869 (1979).
- (16) A. Nakamura, M. Higuchi, K. Iwami and K. Iwai : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2395 (1983).
- (17) K. Iwami, A. Nakamura, M. Higuchi, K. Yasumoto and K. Iwai : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2555 (1983).
- (18) J. L. Cuq, M. Provansal, F. Guilleux and C. Cheftel : *J. Food. Sci.*, **38**, 11 (1973).
- (19) P. F. Fox and F. V. Kosikowski : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1183 (1967).