

## 不飽和脂肪酸エステルの自動酸化および各種酸化生成物の トリプシン活性に及ぼす影響

幡手英雄\*<sup>1</sup>・吉田勇人\*<sup>1</sup>・田中竜介\*<sup>2</sup>

### Autoxidation of Unsaturated Fatty Acid Esters and Effect of Their Autoxidized Products on Trypsin Activity

Hideo Hatate\*<sup>1</sup>, Hayato Yoshida\*<sup>1</sup>, and Ryusuke Tanaka\*<sup>2</sup>

Unsaturated fatty acid esters such as methyl oleate (MO), methyl linoleate (ML), and methyl linolenate (MLn) were autoxidized at 40°C in the dark. The extent of lipid oxidation was estimated by the measurement of peroxide value. Each of the autoxidized fatty acid esters, which showed various peroxide values, was separated into polymers, monomers, and degradation products by gel chromatography on a Sephadex LH-20 column. Moreover, the effect of these oxidized products on the amidase activity of bovine trypsin was investigated. The results obtained are summarized as follows.

1. Autoxidation rates of unsaturated fatty acid methyl esters increased in the following order : MO, ML, and MLn.
2. MO formed small amounts of polymers and considerable amounts of degradation products upon autoxidation. On the other hand, ML and MLn formed large amounts of polymers and degradation products upon autoxidation.
3. Trypsin activity was strongly inhibited by a group of the degradation products obtained from the autoxidized MLn, while other fractions, such as the polymers, the monomers, and other degradation products, accelerated the activity substantially. Neither autoxidized MO nor ML showed any inhibitory action but did show an acceleration effect to some extent.

#### 1 緒 言

不飽和脂質は、空気中の酸素の影響を受けて自動酸化し、初期酸化生成物としてヒドロペルオキシドを生じ、さらにはカルボニル化合物、脂肪酸、アルコールなどを生じるとともに重合物を生成する。このような酸化生成物は、食品の劣化、栄養価の低減などを引き起こすだけでなく、新鮮

な脂質に見られなかった毒性を持つようになる。この毒性発生原因として、脂質酸化生成物が各種の酵素系に作用し、これを不活性化することにより毒性が生じるものと考えられている。しかし、これらの、活性阻害機作については必ずしも解明されておらず、脂質ヒドロペルオキシドなどの関与するラジカルによる酵素タンパク質の破壊やヒドロペルオキシドの分解によって形成される各種カルボニル化合

水産大学校研究業績 第1479号, 1994年8月11日受付.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1479. Received Aug. 11, 1994.

\*<sup>1</sup> 水産大学校製造学科食品化学講座 (Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Shimonoseki University of Fisheries).

\*<sup>2</sup> 現所属：九州大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kyushu University).

物と酵素タンパク質との複合体形成による酵素の不活性化などが考えられている。<sup>1)</sup>

筆者らは前報<sup>2)</sup>において、リノレン酸メチルを自動酸化させるとトリプシン活性阻害作用や促進作用を示す種々の酸化生成物が形成されることを報告した。脂質酸化生成物の酵素への作用は、脂質の種類、酸化程度および酸化生成物の分子サイズなどにより異なることが推察される。本研究では炭素数18のモノエン、ジエンおよびトリエン酸のメチルエステルであるオレイン酸メチル (MO), リノール酸メチル (ML), リノレン酸メチル (MLn) の自動酸化の進行過程を調べ、形成された種々の酸化生成物がトリプシンのアミダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 脂質の自動酸化および Sephadex LH-20ゲルろ過法による分離

本実験で使用したMO, MLおよびMLnはシグマ社より購入し、いずれも純度99%であった。これらの脂質各4gを40℃, 暗所で攪拌しながら自動酸化させた。一定期間ごとに一部を分取し、各脂質の酸化度を常法<sup>3)</sup>により過酸化物価 (POV) で評価した。必要に応じて、各種酸化段階の脂質約400mgをアセトンで溶出剤とするSephadex LH-20カラム (123×2.3cm) で分画した。<sup>2)</sup> 各画分の溶出量は減圧下で溶媒を除去した後、秤量して求めた。

### 2.2 β-トリプシンの調製

市販のトリプシン標品には、不活性なタンパク質や基質に対する反応速度を異にする種々のトリプシン誘導体が混在している。<sup>4)</sup> そのため本研究では、ウシ膵臓トリプシン (2回結晶, シグマ社製) からShroederとShowの方法<sup>4)</sup> に準じて精製し、比活性の高いβ-トリプシンを供試した。以下、β-トリプシンはトリプシンと略記した。

### 2.3 脂質酸化生成物とトリプシンとの反応およびトリプシンのアミダーゼ活性測定

脂質酸化生成物を含むエタノール溶液30μℓを4.5μgのトリプシンを含む0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH8.5) -0.05M CaCl<sub>2</sub> 90μℓに加え、37℃で90分間インキュベートして反応させた。反応終了後、同反応混合液についてトリプシンのアミダーゼ活性を測定した。<sup>2)</sup> すなわち、反応混合液に1mM α-N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide・HCl (シグ

マ社製) 1mlを加え、37℃で7分間酵素反応させた。反応終了後、30%酢酸0.25mlを加えて酵素作用を停止させた。さらにメタノール2.5mlを混和して大量の酸化脂質成分の添加による濁りを解消した後、400nmの吸光度を測定した。酵素活性阻害率は、次式によって求めた。

$$\text{酵素活性阻害率 (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A: 酸化脂質を添加していない時の酵素活性

B: 酸化脂質を添加した時の酵素活性

## 3 結果

### 3.1 MO, ML および MLn の自動酸化

Fig. 1に40℃で自動酸化させたMO, MLおよびMLnの酸化時間の延長にともなうPOVの変化を示してある。MLnとMLのPOVはそれぞれ1, 2日間の自動酸化で最高に達し、その後は急速に低下した。一方、MOのPOV上昇速度はMLやMLnに比べて著しく遅く、自動酸化に対して安定であることが示された。しかし、一定期間が経過するとMOにおいても高いPOVを示し、しかもMLやMLnよりも長期間にわたって高い値が持続された。二重結合数が増加するにつれて不飽和脂肪酸の自動酸化速度が指数関数的に上昇することは知られているが、生成した過酸化物の分解も二重結合数が増加するほど速やかであることが示唆された。

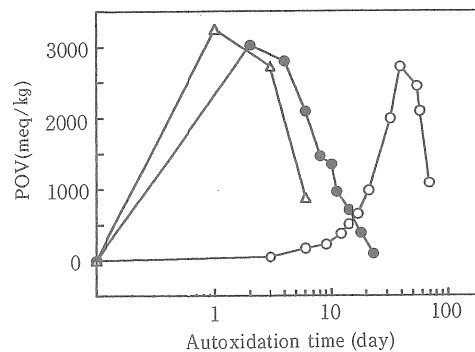


Fig. 1. Changes in POV of unsaturated fatty acid esters during autoxidation at 40℃.

○- methyl oleate (MO), ●- methyl linoleate (ML),  
△- methyl linolenate (MLn).

### 3.2 MO, ML および MLn 自動酸化物の Sephadex LH-20ゲルろ過法による分離および各画分のトリプシン活性に及ぼす影響

MO, ML および MLn について, Fig. 1 で示した最高の POV からその値が低下していく過程で3段階を選び, 酸化程度の異なる MO, ML および MLn を Sephadex LH-20ゲルろ過法でそれぞれ分離した。さらに, 分離された各画分のトリプシン活性に及ぼす影響を検討した (Figs. 2,3,4)。なお, 溶出された各画分のアミダーゼ活性に及ぼす影響は, 次のようにして検討した。溶出された各試験管を減圧下で乾固し, 秤量後, エタノール0.5mlで再溶解させ, その30  $\mu$ l をトリプシンを含む緩衝溶液90  $\mu$ l に加え, 37°Cで90分間インキュベートして反応させた。反応終了後, 残存するアミダーゼ活性を測定し, 酵素活性阻害率を算出した。

Fig. 1で最高の POV を示した40°C, 1日間自動酸化させた MLn のゲルろ過パターンを Fig. 2a に示してある。このゲルろ過法によって酸化 MLn は分子サイズに基づいて重合体, 単量体および分解生成物に分離された。<sup>5)</sup>酸化程度の異なる MLn, MO および ML についても同様に分離して各酸化生成物の溶出量 (%) をそれぞれ算出し, その結果を Table 1 に示してある。MLn は自動酸化時間の延長により, 単量体が急激に減少し, それに応じて重合体が増加した。しかし, 分解生成物は POV の最高値から低下するにつれてわずかではあるが減少する傾向が認められた。この原因として, MLn は酸化分解により ML や MO よりも揮発性の分解生成物を形成しやすいこと, あるいは生成した分解

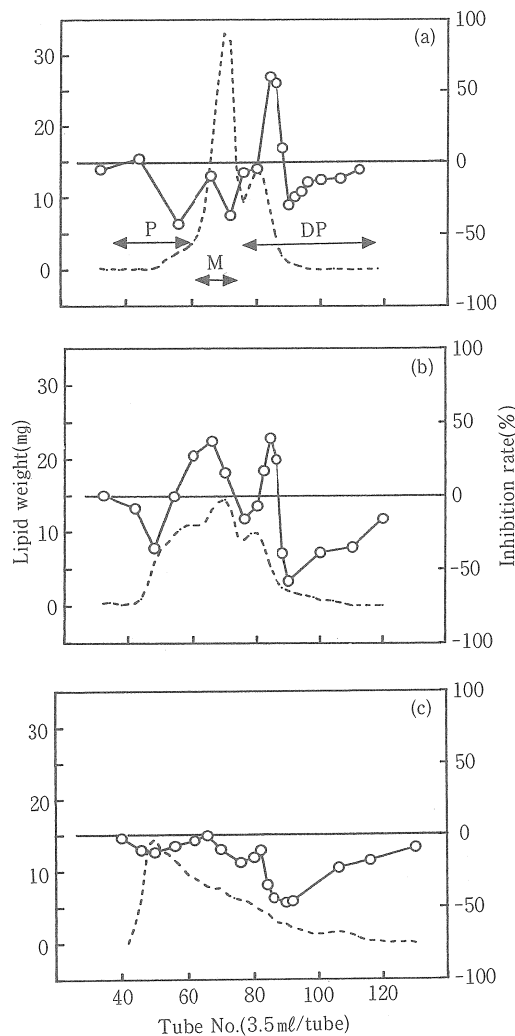
生成物が高い反応性であるため酸化時間の延長にともなって酸化脂質相互の反応で高分子化し, 重合体画分に溶出されたことなどが考えられる。ML も MLn とほぼ同様な傾向であったが, MLn に比べて重合体の生成量は相対的に少なく, 自動酸化過程末期においても分解生成物の残存量が多く認められた。一方, MO で POV の最高値を示した45日間自動酸化させた MO 酸化生成物における単量体の量は60%程度であったが, 酸化がさらに進行しても ML や MLn に比べて単量体の残存量は多く, 重合体の形成量は大きくなかった。

次に, Sephadex LH-20 で分画された各酸化生成物のトリプシン活性に及ぼす影響について検討すると, いずれの酸化段階の MO においてもアミダーゼ活性阻害作用は認められず, 逆に弱い活性促進作用が認められた (Fig. 4a,b,c)。同様に, 3または7日間自動酸化させた ML の各画分についてもアミダーゼ活性促進作用だけが発現したが (Fig.3a,b), 自動酸化過程末期の ML (Fig. 3c) によってトリプシン活性はほとんど影響されなかった。一方, POV の最高値を示した1日間自動酸化させた MLn については一群の分解生成物 (試験管番号80~90) に阻害作用またそのほかの画分では促進作用が認められた (Fig. 2a)。また, 最高値の POV からやや低減した3日間自動酸化させた MLn では, 分解生成物のほかに重合体でも阻害作用が認められ (Fig. 2b), MLn の酸化生成物が MO や ML のそれとは異なる機作でトリプシンに作用して, 阻害活性を発現していることが示唆された。しかし, 自動酸化過程末期で重合体のさらに進行した6日間自動酸化させた MLn ではアミダー

**Table 1.** Changes in the amount of polymers, monomers, and degradation products of unsaturated fatty acid esters\* during autoxidation at 40°C

Fatty acid esters	Autoxidation time (day)	POV(meq/kg)	Polymers(%)	Monomers(%)	Degradation products(%)
MO	45	3078	13.7	61.3	24.7
	57	2091	16.6	52.5	30.9
	68	1086	18.9	48.0	33.1
ML	3	3066	29.2	54.2	16.6
	7	1151	34.8	25.2	40.0
	23	199	40.6	17.3	42.1
MLn	1	3250	9.1	60.2	30.7
	3	2728	36.8	35.8	28.2
	6	876	52.5	23.2	24.3

\*Refer to Figs. 1, 2, 3, and 4.



**Fig. 2.** Separation of autoxidized MLn by gel chromatography on a Sephadex LH-20 column, and inhibition of amidase activity of trypsin by the fractions obtained.

--- Lipid weight, -○- Inhibition rate.

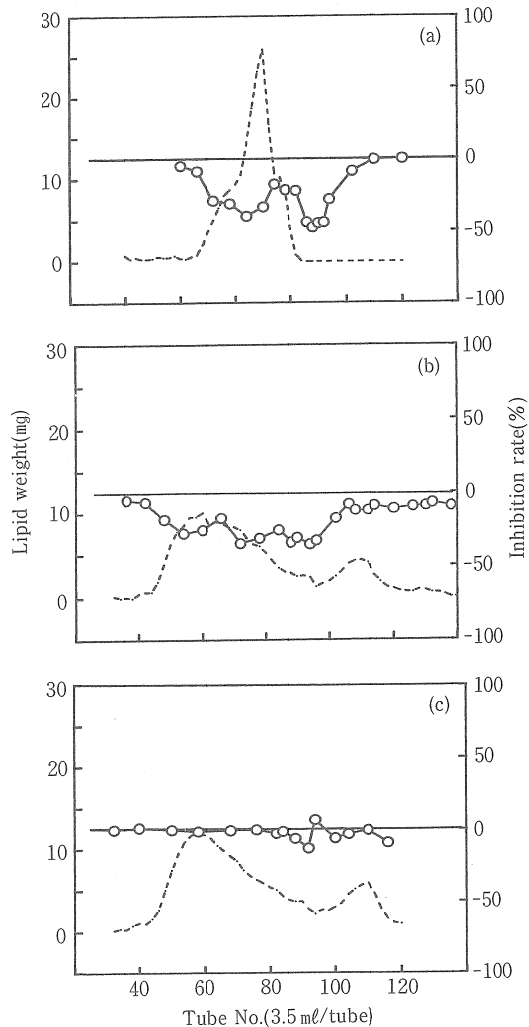
P : polymers, M : monomers, DP : degradation products.

(a) Autoxidation period : 1 day, POV : 3250meq/kg, Sample load : 420mg

(b) Autoxidation period : 3 days, POV : 2728meq/kg, Sample load : 418mg.

(c) Autoxidation period : 6 days, POV : 876meq/kg, Sample load : 443mg.

(a), (b), (c) : refer to Fig.1 and Table 1.



**Fig. 3.** Separation of autoxidized ML by gel chromatography on a Sephadex LH-20 column, and inhibition of amidase activity of trypsin by the fractions obtained.

--- Lipid weight, -○- Inhibition rate.

Polymers, monomers, and degradation products were eluted at the same regions shown in Fig.2a.

(a) Autoxidation period : 3 days, POV : 3066meq/kg, Sample load : 410mg.

(b) Autoxidation period : 7 days, POV : 1151meq/kg, Sample load : 413mg.

(c) Autoxidation period : 23 days, POV : 199meq/kg, Sample load : 422mg.

(a), (b), (c) : refer to Fig. 1 and Table 1.

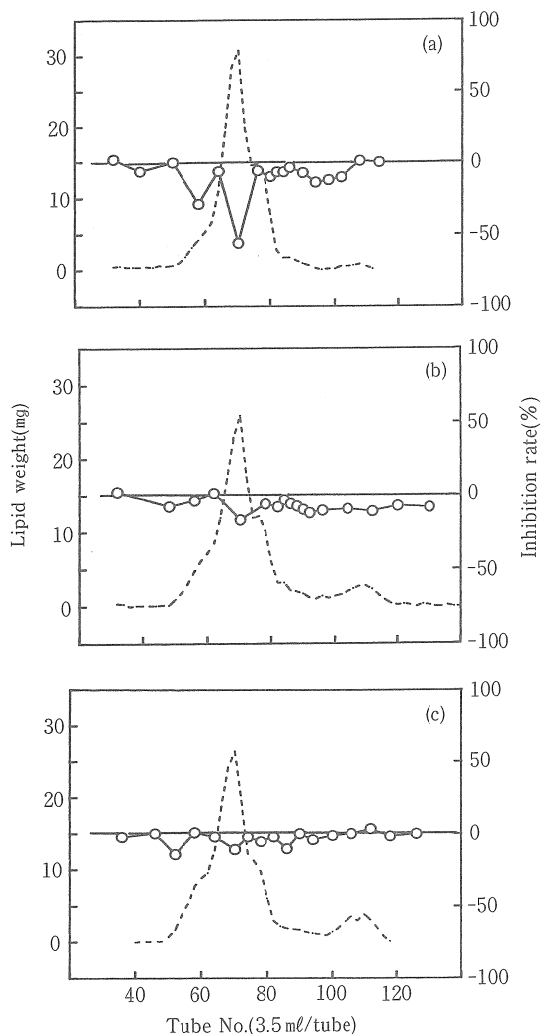


Fig. 4. Separation of autoxidized MO by gel chromatography on a Sephadex LH-20 column, and inhibition of amidase activity of trypsin by the fractions obtained.

--- Lipid weight, ○- Inhibition rate.

Polymers, monomers, and degradation products were eluted at the same regions shown in Fig. 2a.

(a) Autoxidation period: 45 days, POV: 3078meq/kg, Sample load: 395mg.

(b) Autoxidation period: 57 days, POV: 2091meq/kg, Sample load: 415mg.

(c) Autoxidation period: 68 days, POV: 1086meq/kg, Sample load: 463mg.

(a), (b), (c): refer to Fig. 1 and Table 1.

ゼ活性促進作用が分解生成物画分で認められるが、阻害作用は検出されなかった (Fig. 2c)。

トリプシンのアミダーゼ活性促進作用については、その強さに差はあるが、MO, ML および ML<sub>n</sub> の各種酸化段階の酸化生成物に広く認められ、不飽和脂肪酸の不飽和度や酸化程度は促進作用の発現にそれほど深く関与していないように思われる。一方、モノエン酸やジエン酸である MO や ML のいずれの酸化生成物にも有意のアミダーゼ活性阻害作用が検出されず、トリエン酸である ML<sub>n</sub> のみに強い阻害作用が発現した。すなわち、脂質酸化物の POV とトリプシンのアミダーゼ活性阻害力との関連性は必ずしも認められず、二重結合数の多い脂肪酸ほど強い阻害作用を持つ酸化生成物を形成しやすいものと思われる。

#### 4 考 察

脂質酸化生成物の酵素への作用は脂質の酸化程度、酸化生成物の分子サイズのほかに、対象とする脂肪酸や酵素の種類により異なる。セリンプロテアーゼであるトリプシンは化学構造、触媒機構および基質特異性などが解明されており、しかも高純度の標品を調製できるので、現在でも酵素化学的な研究を進めるうえで汎用されている。さらに、プロテアーゼは食品の消化のみならず、生理活性ペプチドの産生など生体機能の発現にも関与している。このような観点から、筆者らは酸化脂質と酵素との相互作用を検討するうえで、ウシ膵臓トリプシンを研究推進に有効な酵素と判断して従来から使用している。

MO, ML および ML<sub>n</sub> の酸化進行速度を経日的に測定すれば、Fig. 1で示したように POV の増減を観察できる。しかし、食品の脂質劣化の程度を測る際には、ある特定の時期に POV を測定する 경우가多く、ML や ML<sub>n</sub> のように POV が急激に上昇し、低下するような不飽和脂肪酸を含む食品においては、本研究で観察されたように POV が低くても酵素分子と反応性のある脂質酸化重合体や分解生成物を形成して脂質劣化が進行している可能性がある。不飽和脂肪酸やそのエステルの自動酸化速度に関する研究は多数あり、本研究で得られた結果と同様に、炭素鎖長が同じ場合には不飽和度の高い脂肪酸エステルほど酸化が速いことが報告されている。<sup>6)</sup>しかし、酸化程度の異なる脂肪酸エステルを、それぞれ分子サイズに基づいて分画し、各画分の酵素に対する影響を調べた研究例はない。また、各種酸化生成物があるままの形で生体に取り込まれるか、あるいは生体内脂質の過酸化により形成されるかどうかは現在のところ明らかでない。従って、本研究で得られた結果を、

そのまま *in vivo* における脂質酸化物の酵素分子への挙動と判断することはできない。しかし、油脂類の劣化程度や毒性は POV だけでなく、構成脂肪酸の種類やその酸化生成物の反応性をも考慮して判定される必要がある。

Sephadex LH-20 ゲルろ過法では酸化脂質中に存在するトリブシン活性の阻害または促進作用を持つ酸化生成物が同時に溶出された可能性が高く<sup>2)</sup>、本研究で示されたトリブシン活性阻害率は阻害作用と促進作用との相対的な強さにより評価された結果であり、必ずしも両者の絶対量を示すものではない。例えば、有意の阻害作用は算出されなかったが、Fig. 3a に示した試験管番号75~87に阻害物質の存在を推察させる屈曲点が認められ、ML においてもトリブシン阻害作用を持つ分解生成物が形成されている可能性を示唆している。しかし、不飽和度が高い脂肪酸ほど酸化しやすく、自動酸化末期（著しく重合化が進む）までは、形成された酸化生成物、特に分解生成物が酵素活性に様々な作用を発現することが推察される。本報には示していないが、この推察を支持する結果がベンタエン酸であるエイコサペンタエン酸エチル (EPEA) の酸化生成物について得られた。すなわち、EPEA を40℃で自動酸化させると、8時間で POV が3340meq/kg に達した。この酸化 EPEA をゲルろ過し、各画分のトリブシン活性への作用を検討し、分解生成物画分で MLn 酸化生成物よりもさらに強力なアミダーゼ活性阻害作用と促進作用が認められ、不飽和度の高い脂肪酸ほどトリブシン活性に強い作用を持つ酸化生成物を形成しやすいことが示唆された。

不飽和脂肪酸の酸化生成物によるトリブシン活性阻害や促進機構については現在のところ不明な点が多く、酸化脂質と酵素との相互作用の実態を解明するうえでも、酸化脂質に存在する酵素活性促進物質および阻害物質の構造解析が不可欠と考えられる。筆者らは、MLn の分解生成物中に存在するトリブシンのアミダーゼ活性促進物質の構造を解明しており、<sup>7)</sup> ひきつづき阻害物質についても現在検討中である。

#### 4 要 約

炭素数18のモノエン、ジエンおよびトリエン酸のメチルエステルであるオレイン酸メチル (MO)、リノール酸メチル (ML)、リノレン酸メチル (MLn) の自動酸化の進行過程を調べた。各脂肪酸エステルを異なる酸化段階で Sephadex LH-20ゲルろ過法で分離し、分画された重合体、単量体および分解生成物の形成量を求めた。さらに、各酸化生成物がトリブシンのアミダーゼ活性に及ぼす影響を検

討した。得られた結果は次のとおりである。

- 1) 自動酸化速度は MO, ML, MLn の順で高くなった。
- 2) 自動酸化の進行につれて MO は少量の重合体とかなりの量の分解生成物を形成した。一方、ML と MLn は多量の重合体と分解生成物を形成した。
- 3) 自動酸化させた MLn の一群の分解生成物に強いトリブシン活性阻害作用が発現し、重合体、単量体、およびそのほかの分解生成物には活性促進作用が認められた。自動酸化させた MO や ML の各種酸化生成物にトリブシン阻害作用はなく、有意の促進作用が認められた。

#### 文 献

- 1) H. W. Gardner : *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 220-228 (1979).
- 2) 幡手英雄・中村 孝：油化学, **35**, 1014-1017 (1986).
- 3) 日本油化学協会：基準油脂分析試験法 (日本油化学協会編), 日本油化学協会, 東京, 1971, 2・4・12-71, pp. 1-2.
- 4) D. D. Shroeder and E. Show : *J. Biol. Chem.*, **243**, 2943-2949 (1968).
- 5) 中村 孝・豊水正道：日水誌, **41**, 59-64 (1975).
- 6) T. Takagi and K. Miyashita : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 407-413 (1987).
- 7) H. Hatate and T. Nakamura : *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **36**, 210-212 (1987).