

ホウレンソウリポキシゲナーゼ活性に 及ぼす β -カロチンの影響*

高木 茂明
(生物化学研究室)

Received November 1, 1978

Effect of β -Carotene on Spinach Leaf Lipoxygenase Activity

Shigeaki TAKAGI

(Laboratory of Biological Chemistry)

Inhibition of lipoxygenase activity, which was partial purified from spinach chloroplast, by β -carotene, and the bleaching of β -carotene itself at the same time, were investigated comparing with lutein.

1 The degree of interaction of β -carotene to lipoxygenase would be milder than that of lutein from the spectra patterns of the complexes and other results, thus the inhibition by β -carotene would be also weaker than that of lutein.

2 The bleaching of β -carotene by lipoxygenase required for the existence of slight amount of linoleate as well as in lutein, while the bleaching velocity was slower.

3 The inhibition of β -carotene bleaching by linoleate with higher concentration was the same as lutein, though the inhibition was taken place at the lower concentration than lutein.

From the above results, the milder interaction of β -carotene to lipoxygenase at the results 1, 2 and 3, could be deduced to be arisen from the difference of polarities.

Thus, these phenomena, that is, the inhibition of spinach lipoxygenase activity by carotenoid and the carotenoid bleaching at the same time in the presence of slight amount of linoleate, might be widely applied to another carotenoids.

結 言

リポキシゲナーゼ活性存在下でカロチノイドが褪色することは古くから知られており、この性質を利用してダイズ粉をパンの漂白に用いている⁶⁾。その後アルファルフア中のカロチノイドが飼料として貯蔵中に著しく減少することがGROSSMAN⁵⁾、BEN-AJJI¹⁾らによって取り上げられ、両者の関係が究明されているが褪色機構については明らかにされておらない。

著者ら⁷⁾はホウレンソウリポキシゲナーゼ活性に対するルテインの阻害機構を詳しく調べて以前から云われているところのリノール酸ヒドロパーオキシドとの共酸化によるものでないこと、又多分パーオキシラジカルが触媒的にカロチノイドを酸化褪色させることなどを明らかにした。

こゝではルテインのかわりに β -カロチンを用い、リポキシゲナーゼ活性阻害がルテイン以外のカロチノイドによっても起るかどうかを調べた。

材 料 と 方 法

1. リポキシゲナーゼ標品 市販ホウレンソウを0.5M蔗糖(0.01Mトリス緩衝液, pH7.0を溶媒とする)の5倍容とともにホモジナイズし、ガーゼ濾過後1,500rpmで3min遠

* カロチノイドの生化学的研究(8)とする

沈して沈澱を除き、上澄を 6,000rpm, 15min 遠沈して whole 及び Disintegrated chloroplast を得る。これを少量の蒸留水に懸濁させたものを約10倍容の -30°C アセトンに攪き混ぜながら少しずつ加える。しばらく攪き混ぜたのち、吸引濾過し残渣を減圧乾燥させてアセトン粉末を得る。アセトン粉末に約5倍量の 1% Triton (0.05M リン酸緩衝液, pH7.0 を溶媒とする) を加えて、ゆっくりとかき混ぜながら冷所に1夜放置後遠沈して得た上澄を 0.1M リン酸緩衝液, pH7.0 に透析し、続いて蒸留水に透析したのち、凍結乾燥する。これを 0.005 M 酢酸緩衝液, pH5.7 に溶かして CM-セルロースカラムクロマトに供し、その F-5 画分⁹⁾ をリポキシゲナーゼ標品として供試した。

2. 基質 (リノール酸) リノール酸 (東京化成, EP, 純度 91.5%) 約 0.45g を精秤し、0.1M リン酸緩衝液, pH7.0, 2ml を加えて懸濁させ、さらに Tween-20 0.5ml を加えて乳化させる。これに 1N 水酸化ナトリウムを少しずつ加えて行き、全体がぼろ透明になったところで 0.1M リン酸緩衝液を加えて 25ml にメスアップし、これを基質とした。

3. β -カロチン 結晶 β -カロチン (メルク) を少量のエタノールに溶解させたのち 1% Triton X-100 水溶液を加えて可溶化させたものを直接反応混合物に加えた。供試 β -カロチン濃度は $\epsilon_{452} = 12,800^{10)}$ (エタノール) を用いて 452nm の吸光度から求めた。

4. β -カロチンの褪色測定法 酵素反応混合物における β -カロチン褪色度は水溶液の λ_{max} の吸光度減少値 ($-\Delta\text{OD}_{460}$) を直接反応混合物について測定した。

5. 酵素活性測定法 ワールブルグ検圧計を用いたガスメトリーにより酵素吸収活性を測定した。組成は基質 (リノール酸濃度は通常 $6.44 \times 10^{-2}\text{M}$) 1.9ml, 10^{-3}M EDTA 0.1ml, 0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0, 0.3ml, β -カロチン溶液 0.2ml を主室に入れ、副室には 20% KOH 0.2ml, 側室に酵素標品 0.5ml を入れて全液量を 3.0ml とした。したがって、 β -カロチンを加えない場合の緩衝液量は 0.5ml となる。

結果と考察

1. β -カロチンとタン白質との結合性 既に報告⁹⁾ しているようにルテインは卵白アルブミン (OVA) と結合して複合体を作り、この作用がリポキシゲナーゼの活性阻害に関係するものと考えられているが、同様のことを β -カロチンについて調べた。供試タン白質は OVA である。

0.1M リン酸緩衝液, pH7.0 に溶かした 2% OVA に β -カロチンエタノール溶液 0.2ml を攪き混ぜながら加えたが、水系での β -カロチン析出のため、不均一系となり複合体は生成しなかった。

つぎに上記 2% OVA 2ml に 10% Triton X-100 0.2ml を加えた溶液に 0.17% β -カロチンエタノール溶液 0.2ml を加えて混合すると均一系となり、透明な橙黄色溶液となる。これを蒸留水に対して1夜透析すると黄色沈澱を生じるから、その沈澱を 0.1M リン酸緩衝液, pH7.0 に溶かした 1

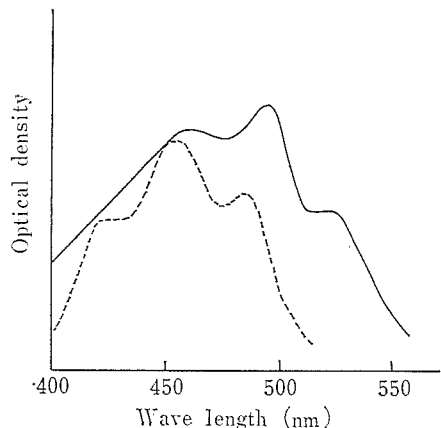


Fig. 1 Visible absorption spectrum of β -carotene - OVA complex. —, complex. ·····, β -carotene in diethylether.

9% Triton X-100 溶液に溶かし複合体溶液とした。

この複合体溶液の可視吸光スペクトルはFig.1 のようになる。対照のβ-カロチンエーテル溶液と比較して小さな赤色移動が起っており、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 励起における極性溶媒効果を生じていることは明らかである。ルテイン-OVA 複合体のときには大きな青色移動をしているから、これと比較して大きな相違がある。このことはルテインの場合に水酸基に由来する $n \rightarrow \pi^*$ の溶媒効果が極めて顕著であったことを示すものである。

したがってβ-カロチンはルテインと比較してタン白質との結合性が弱く、タン白質によってβ-カロチン分子があまり拘束されていない状態にあると考えられる。

つぎにこの複合体のゲル濾過における挙動を調べた。担体には Sephadex G-200ゲル、溶媒には 0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 に溶かした 1% Triton X-100 溶液を用いた。この結果 (Fig. 2) から、ルテインの場合と同じく

2つのピークが現れ、β-カロチンは $V_e = 8.25\text{ml}$ のピークに主として附随して溶出される。遅れて出現するピークはOVAのそれに一致する。複合体ピークの分子量をゲル濾過によって求めると 316,000 となり、β-カロチンの存在下でOVAが会合していることを示している。このゲル濾過におけるタン白質回収率は 100%、β-カロチンのそれは 58%でありβ-カロチンの残部はカラム上部に吸着されている。

以上のことからβ-カロチンは弱いながらもタン白質と非極性結合をすることは明らかである。

2. リノール酸酸化活性に及ぼすβ-カロチンの影響 β-カロチンがタン白質に結合することは明らかとなったので、リポキシゲナーゼのリノール酸酸化活性に及ぼす影響を調べると Fig. 3 のようになり、弱いながらも活性阻害を行っている。同濃度で阻害度をルテインの場合と比較すると反応30minのところでβ-カロチンが14%阻害、ルテインが27%阻害である。両者の阻害度の相違がどこに起因するかは明らかでないが、カロチノイドの構造に由来するタン白質への結合性の相違によるものと考えられる。

3. リポキシゲナーゼ活性阻害と同時に起るβ-カロチンの褪色 リポキシゲナーゼによるリノール酸酸化が起ると同時にカロチノイドが共存すると、その褪色も起ることが知られており³⁾、ルテインの場合同時褪色しているのでβ-カロチンについてこの点を検

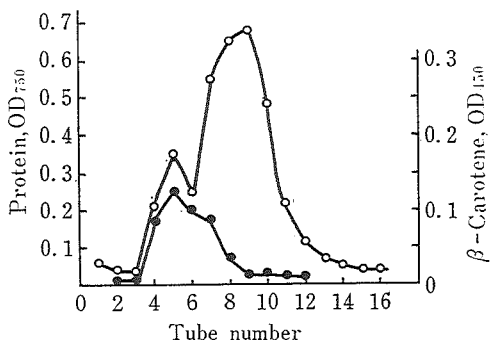


Fig. 2 Gel chromatography of OVA-β-carotene complex with Sephadex G-200. ○—○, Protein (O.D. 750); ●—●, β-carotene (O.D. 460). Solvent, 1% Triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. 1 fraction, 1.65ml.

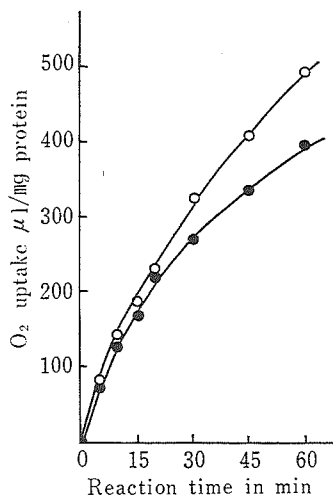


Fig. 3 Inhibition of lipoxigenase activity by β-carotene. Linoleate, 6.49×10^{-2} M, β-carotene, 5×10^{-4} μM. Enzyme, 56 μg/ml. ○—○, in no β-carotene; ●—●, in β-carotene.

討した。

β -カロテンは反応が進むと褪色していくが、その速度はルテインの場合⁷⁾よりかなり小さい(Fig. 4)。

褪色反応は酸素吸収反応と比例しており、またリポキシゲナーゼを加えなければ進行しないので、明らかに酵素が触媒する反応である。さらにリノール酸が存在しないと褪色度が激減することから、リノール酸も褪色反応に必須の要因である。また Ben-Aziz ら²⁾はアルフェルフェリリポキシゲナーゼ標品中に共存すると考えられる Cyt c 及びパーオキシゲナーゼを用いてリノール酸の有無による β -カロテンの褪色を調べ、リポキシゲナーゼと Cyt c はリノール酸が存在しないと β -カロテンを褪色させないことを明らかにしている。

しかしここで用いた酵素標品は CN^- による活性阻害がないことを確かめているので⁸⁾、ここにおける挙動はリポキシゲナーゼによって起っていると考えるよい。Fig. 5 に褪色時における β -カロテンのスペクトル変化を示す。Fig. 1 と Fig. 5 A のスペクトルパターンが異っており、OVA と複合体を作った場合の長波長側への Shift は大きい ($\lambda_{\text{max}}=485\text{nm}$)。この Shift の相違は β -カロテンのタン白質との結合性に強弱があることによるものと思われるが、Fig. 5 の結果は Tween-80 を可溶化剤としてダイズリポキシゲナーゼによる β -カロテンの褪色パターン²⁾ とほとんど同じである。したがって β -カロテンの場合ルテインとかなり異なった結合挙動をとることがわかる。

Fig. 5 A は反応開始直後の、また B は反応 5 min 後のスペクトルであり、褪色に伴うパターンの変化はなく、吸光度の減少のみが見られる。この点もルテインの場合とかなり異なっている。

4. 酸素吸収活性及び β -カロテン褪色の関係 リポキシゲナーゼ活性は β -カロテンにより阻害され (Fig. 3), その際 β -カロテンは褪色する (Fig. 4) が、これが同一の酵素反応によるものかどうかを調べるために酵素量を変動させて活性測定を行った (Fig. 6)。

酸素吸収と褪色度は共に酵素量に比例しているので、両反応とも同時に起っている酵素反応であると考えてよい。

いっぽう、リノール酸濃度を変えて β -カロテン存在下での酸素吸収を測定し、これを

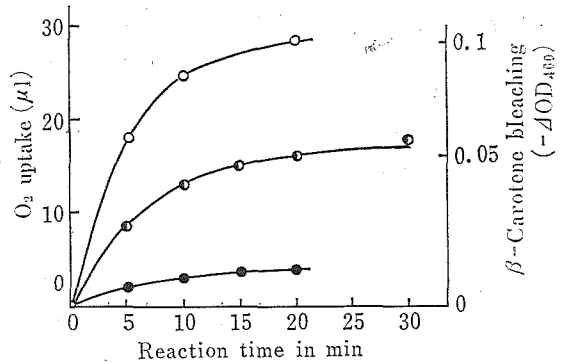


Fig. 4 β -carotene bleaching by lipoxygenase.

○—○, 6.55×10^{-2} M of linoleate; ●—●, no linoleate. Enzyme, $55.8 \mu\text{g/ml}$; β -carotene, $7.9 \mu\text{M}$. ○—○, O_2 uptake in the absence of β -carotene.

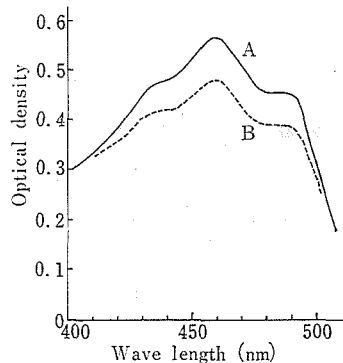


Fig. 5 Visible absorption spectrum of β -carotene in reaction mixture.

Incubation time, 0 min (A); 5 min (B).

Lineweaver-Burk プロットすると、 $K_m = 5.3 \times 10^{-3} M$ が算出されるが、図形からは非拮抗型阻害が示されている。

5. β-カロチン褪色のリノール酸濃度による影響 β-カロチンのリポキシゲナーゼによる褪色はルテインの場合と同じくリノール酸が存在しなければ起らない (Fig. 4)。そこでリノール酸濃度によって褪色度がどのように変わるかを調べた (Fig. 7)。リノール酸濃度 $2 \times 10^{-3} M$ まではその濃度に比例して褪色速度は急激に上昇するが、そこをピークにしてリノール酸濃度が大きくなるにつれて褪色は抑えられている。このピークを示すリノール酸濃度はダイズリポキシゲナーゼに対するβ-カロチンの作用の場合²⁾と完全に一致している。またルテインの場合と比較すると、この極大値を示すリノール酸濃度が $5 \times 10^{-3} M$ であること以外はほぼ同じパターンを示している。このような褪色ピークを示す理由として、リノール酸は酸素をβ-カロチンに渡すキャリアーとして働くと同時に多量のリノール酸はβ-カロチンの酵素との接触を妨げることが考えられる。

6. 酸素吸収に及ぼすβ-カロチン濃度の影響 酸素吸収が起ることによってβ-カロチンが褪色することはこれまでの結果からも明らかであるが、いっぽうではβ-カロチンが酸素吸収活性阻害を行っている。そこでβ-カロチン濃度を变化させたときの酸素吸収及びβ-カロチン褪色度を調べた (Fig. 8)。このときリノール酸濃度は褪色ピークを示す濃度よりかなり高いものを用いている。

β-カロチン濃度が大きくなるにつれ酸素吸収活性は抑えられ、β-カロチンの褪色は増大する。この酸素吸収活性阻害とβ-カロチン褪色とは比例関係にあり、β-カロチンがリノール酸酸化生成物から酸素を受取って自身は褪色するが、そのときリノール酸の酸化を抑える働きを示しており、この結果もルテインの場合と全く同一である。

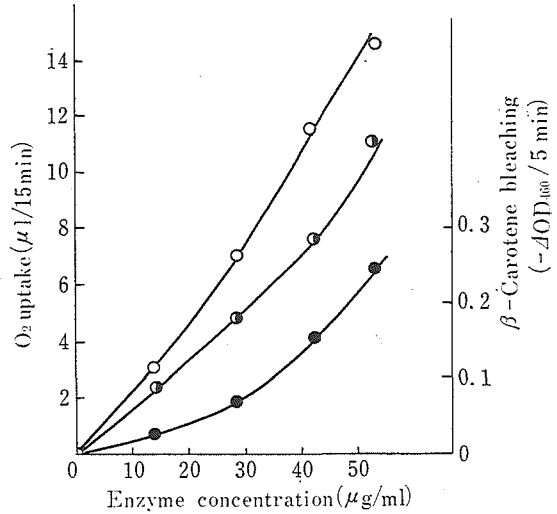


Fig. 6 Effects of enzyme concentration to O_2 uptake and β -carotene bleaching. Linoleate, $6.57 \times 10^{-2} M$; β -carotene, $15.8 \mu M$. ○—○, O_2 uptake in no β -carotene (control); ○●—○●, O_2 uptake in β -carotene; ●—●, β -carotene bleaching.

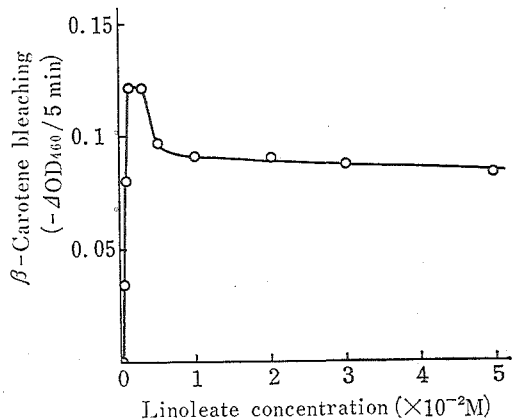


Fig. 7 Relation of β -carotene bleaching and linoleate concentration in presence of spinach lipooxygenase. Enzyme, $55.8 \mu g/ml$; β -carotene, $7.9 \mu M$. Maximum bleaching of β -carotene was at 2 mM concentration of linoleate.

7. リポキシゲナーゼ活性に対するルテインと β -カロチンの作用性の比較 以上の結果から判断して β -カロチンのリポキシゲナーゼ活性に及ぼす影響、そのときの褪色挙動などは本質的にルテインのそれと変わらない。個々のデータの検討を行うとタンパクの結合性がルテインの場合に強く、この差が得られた結果の多くに現われているようである。したがってリポキシゲナーゼ活性に対する影響はルテイン及び β -カロチン以外のカロチノイドでも認められると思われ、事実 crocin⁴⁾についても同様のことが認められている。

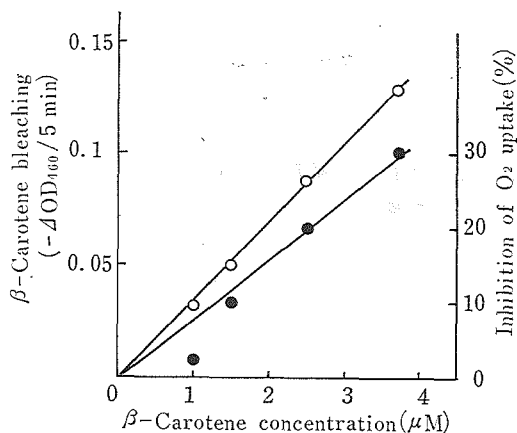


Fig. 8 Effects β -carotene to O_2 uptake and β -carotene bleaching activities of spinach leaf lipooxygenase. Linoleate, $6.57 \times 10^{-2} M$; Enzyme, $55.8 \mu g/ml$. \bigcirc — \bigcirc , Inhibition of O_2 uptake; \bullet — \bullet , β -carotene bleaching.

要 約

ホウレンソウのクロロプラストから精製したリポキシゲナーゼ標品について β -カロチンが及ぼす活性阻害と、そのときの β -カロチン自身の褪色についてルテインと比較しながら検討した。

1. リポキシゲナーゼと β -カロチンとの結合性はルテインと比較して弱く、そのため β -カロチンによる活性阻害度も低い。

2. β -カロチンのリポキシゲナーゼによる褪色機構はルテインの場合と同じくリノール酸の存在を要するが、褪色速度は遅い。

3. 高濃度のリノール酸による β -カロチンの褪色抑制もルテインと同じパターンを示すが、この場合リノール酸の比較的低い濃度から褪色阻害が起っている。

これらの点から β -カロチンはルテインとくらべてリポキシゲナーゼへの結合性が小さいが、このことは1, 2, 3いずれの結果の主原因でもあると考えることが出来、カロチノイドとしての極性の相違が現われているものと思われる。したがってホウレンソウリポキシゲナーゼ活性に対するカロチノイドの阻害効果と、そのとき生じるカロチノイドの褪色及びリノール酸との関連性はルテイン、 β -カロチン以外のカロチノイドにも適応されるものと考えられる。

本実験を行うに当り協力頂いた高橋公憲君に感謝します。

文 献

- 1) BEN-AZIZ A., S. GROSSMAN, P. BUDOWSKI, and I. ASCARELLI: J. SCI. Fd. Agric. 19, 605-608 (1968)
- 2) BEN-AZIZ A., S. GROSSMAN, I. ASCARELLI and P. BUDOWSKI: Phytochem. 10, 1445-1452 (1971)
- 3) BEN-AZIZ A., S. GROSSMAN, P. BUDOWSKI and I. ASCARELLI: Phytochem. 10, 1823-1830

(1971)

- 4) DICKS J. W. and J. FRIEND : *Phytochem.* **6**, 1193 (1967)
- 5) GROSSMAN S. : *Phytochem.* **8**, 2287 (1969)
- 6) HAAS L. M and R. M. BOHN : US Patent 1,957,333
- 7) 高木茂明, 松上道雄 : *農化誌* **51**, 489-495 (1977)
- 8) 高木茂明, 松上道雄 : *守時 勤, 岡大農学報***49**, 35-44 (1977)
- 9) 高木茂明 : *農化誌* **52**, 25-30 (1978)
- 10) VETTER W., G. ENGLERT, N. RIGASSI and U. SCHWIETER : *Carotenoids (O. ISLER ed.)* , 198, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1971)

正 誤 表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
26	34	VANDENBLERGH	VANDENBERGH
27	3	LEE S. VAN DER	VAN DER LEE S.
"	4	"	"
31	Fig. 2	OD ₄₅₀ (縦軸右)	OD ₄₆₀