

〔研究ノート〕

# 米ぬか水抽出物のペルオキシナイトライト消去能

松本 孝・佐々木絵梨・小鹿真由子・池田啓一・川崎広明・山倉文幸

## The Scavenging Activity of Water Soluble Extract of Rice Bran against Peroxynitrite-induced Protein Modification

Takashi MATSUMOTO, Eri SASAKI, Mayuko KOSHIKA,  
Keiichi IKEDA, Hiroaki KAWASAKI and Fumiyuki YAMAKURA

Oxidative stress is known as one of the major causes of diseases and is known to be initiated by reactive oxygen species (ROS). Peroxynitrite (PON) is a highly reactive ROS, which can nitrate and oxidize biomolecules, and is produced by the rapid reaction between superoxide and nitric oxide. In tissues of patients with a number of diseases, 3-nitrotyrosine has been detected. These results strongly suggest that there is formation of PON in the tissues *in vivo*. Therefore, from the standpoint of preventive medicine, it is important to clarify the PON scavenging activities of dietary antioxidants.

In this study, we used three methods to evaluate the efficacy of rice bran to protect proteins from peroxynitrite-mediated modification. By coexistence of the rice bran extract in the reaction mixture, inhibition of pig heart lactate dehydrogenase by 1 mM PON treatment was suppressed about 70%, and the formation of 3-nitrotyrosine and yellow pigment production by 1 mM PON in bovine serum albumin were inhibited about 75% and 60%, respectively. These results suggest that there is strong scavenging activity of PON in the extract of rice bran.

*Key words:* peroxynitrite scavenging activity (ペルオキシナイトライト消去能), rice bran (米ぬか), protein modification (タンパク質の修飾)

生体内で過剰に生産された活性酸素はタンパク質、脂質、DNAなどを傷害し生活習慣病や癌の発症に関与している<sup>(1)</sup>。そこで、近年、カロテノイドやフラボノイドなど食品に含まれる抗酸化成分の摂取が生活習慣病の予防上注目され、多くの研究がなされてきた。例えばカロテノイドは、活性酸素の一重項酸素に対する消去作用が強いという特徴があり、一方、フラボノイドに代表されるポリフェノール類はスーパーオキシドラジカルに対する消去作用が強いとされている<sup>(2)</sup>。一方、ペルオキシナイトライト（以下PONと略）は活性酸素の一つであるスーパーオキシドラジカルと、血管内皮由来弛緩因子とし

て発見された一酸化窒素の両ラジカルから生成し中性条件下では半減期が数秒の不安定な物質で、スーパーオキシドラジカルより強い酸化力を有する物質である。またPONの生成速度はスーパーオキシドラジカルがスーパーオキシドジスムターゼによって分解する反応速度より速く、タンパク質中でのチロシン残基やトリプトファン残基のニトロ化をもたらすことから、生体組織タンパク質中の3-ニトロチロシンの存在はPON生成を示唆すると考えられる<sup>(3)</sup>。PONによる生体物質のニトロ化反応は、生体内に豊富（1.2 mM）に存在する二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）により促進され、PONがCO<sub>2</sub>と直接反応し、生じ

た  $\text{ONOOCO}_2^-$  が強いニトロ化活性を發揮すると考えられている<sup>(4)</sup>。3-ニトロクロシンの存在は抗ニトロクロシン抗体を用いた免疫組織染色法や Western Blotting 法の結果から、動脈硬化、成人呼吸促進症候群、急性肺傷害、アルツハイマー病、虚血再灌流、*Helicobacter pylori* 感染（胃炎）など、様々な病態で確認されている<sup>(5, 6)</sup>。そのような背景から、近年は食品成分による PON 除去効果を評価する研究も多く見られるようになった<sup>(7, 8)</sup>。

米ぬかはフィチン酸、イノシトール、フェルラ酸、ビタミン B<sub>1</sub> や、ビタミン E、 $\gamma$ -オリザノールなど、生理作用で注目される成分を多量に含んでおり、フェルラ酸やビタミン E はビタミン C やフラボノイドなどと並んで抗酸化性を有していることが知られている。既報<sup>(9)</sup>で我々は、クロシンやトリプトファンがニトロ化により黄色を呈し特徴的な吸収帯をもつようになることを利用し、フェルラ酸をはじめいくつかの生体関連物質による PON 消去能を分光学的手法を用いて報告した。今回、我々は米ぬか抽出液に強い PON 消去能を見出したので、その消去能を分光学的手法、免疫学的手法、そして酵素の失活抑制効果測定法の 3 つの異なる方法で評価した結果をここに報告する。

## 実験方法

### 試薬

PON 溶液は Dojindo Laboratories 社製、ブタ心臓由来乳酸脱水素酵素（以下 LDH と略）は Roche Diagnostics 社製、ウシ血清アルブミン A-6003（以下 BSA と略）は Sigma-Aldrich 社製、抗ニトロクロシン抗体（rabbit polyclonal IgG）は Upstate 社製、抗-IgG Rabbit, Donkey-Poly, AP は Chemicon International 社製を用い、その他の試薬は市販の高純度試薬を使用した。

### 米ぬか抽出溶液の調製法

近隣の米穀店で市販されている米ぬか 25 g に蒸留水 100 ml を加えて室温で 30 分浸漬したのちポッター型ホモゲナイザーを用いてホモジナイズした。その後、20,000 g、15 分間、4°C で遠心分離を行い、

その上澄液を試料とした。抑制効果を測定するときは上澄液をさらに蒸留水で 10 倍に希釈したものを使用した。

### タンパク質の PON 処理

PON 処理の条件は、BSA を用いた黄色吸収帯（以下黄色成分）生成の分光学的測定、抗ニトロクロシン抗体を用いた免疫学的検出、LDH を用いた酵素活性の測定のいずれも、以下の反応条件で行った。すなわち、1.5 ml 容エッペンドルフ型遠心チューブに 1 M カリウムリン酸緩衝液（pH 7.4）0.20 ml、0.5 mM ジエチレントリアミン五酢酸 0.20 ml、0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  0.05 ml、蒸留水と試料溶液を合わせて 0.45~0.50 ml 加え、1.0 mg BSA あるいは 0.03 U LDH を加えて全量を 1.0 ml とした。これらを 37°C の恒温槽で 5 分間加温し、PON 濃度が 0.33 mM になる液量（5  $\mu$ l 以下）をすばやく加え混合し 37°C の恒温槽で 1 分間放置した。この PON 添加操作を 3 回繰り返す、PON の最終添加濃度が 1.0 mM になるよう調整した。また、BSA あるいは LDH のみ加えない状態で PON を 1.0 mM まで添加し 37°C、5 分間放置後、BSA あるいは LDH を添加したものをブランクとして用いた。

### PON による BSA の黄色吸収帯生成の分光学的測定

米ぬか抽出液の黄色成分生成を抑制する能力については、米ぬか抽出液の存在下、非存在下で前述の PON 処理を行った後、BSA の可視部領域の吸収スペクトル変化を測定し、既報の方法<sup>(9)</sup>に従い評価した。

### PON による BSA 中クロシン残基のニトロ化の免疫学的測定

米ぬか抽出液の 3-ニトロクロシン残基生成を抑制する能力は、Western Blotting 法を利用した免疫学的方法で行った。Western Blotting 法は Sang-Guk Shin 等の方法<sup>(10)</sup>を参考に実施し、BSA を濃度の異なる PON で処理して検量線を作成し、それをもとに抑制率を評価した。すなわち、米ぬか抽出液の存在下、非存在下で前述のように

PON 処理を行った後、SDS-PAGE で BSA を分離、PVDF 膜への転写、抗 3-ニトロチロシン抗体処理、二次抗体による発色を行わせ、PVDF 膜上に現れた発色バンドをスキャナーで読み取り、その面積と濃さを NIH Image を用いて解析し、あらかじめ作成した検量線をもとに評価した。

### LDH 活性阻害の抑制効果測定

PON はヒト Mn-SOD など、いくつかの酵素活性を完全に阻害することが判っているが、容易に入手可能な市販酵素の活性に及ぼす影響を検討した結果（未発表データ）、LDH は 1.0 mM PON によって活性が比較的顕著に阻害（約 70%）されることが判った。そこでこの LDH 活性が PON 処理時に米ぬか抽出液の存在下、非存在下でどのくらい阻害されるかを測定し、PON による酵素活性阻害抑制率を評価した。ただし、米ぬか抽出液の共存は LDH 活性をわずかに活性化するので阻害抑制率は以下のようにして算出した。すなわち、1.5 ml 容エッペンドルフ型遠心チューブに①米ぬか抽出液を加えず PON 処理もせずに LDH 添加した状態で得られる活性測定用、②米ぬか抽出液を加え LDH も添加した状態で PON 処理をしないで得られる活性測定用、③米ぬか抽出液、LDH を加えた状態で PON 処理をし得られる活性測定用、④米ぬか抽出液を加えない状態で LDH を PON 処理したときの活性測定用の 4 種類の反応液を用意した。PON 処理溶液の組成は、最終的にそれぞれのチューブに 1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）0.20 ml、0.5 mM ジエチレントリアミン五酢酸 0.20 ml、0.5 M NaHCO<sub>3</sub> 0.05 ml、蒸留水と米ぬか抽出液を合わせて 0.50 ml、LDH 50 μl（約 5 U）を加え全量を 1.0 ml にした。反応後の LDH の残存活性の測定は全量 3.0 ml 中に、300 μmol リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）、2 μmol ピルビン酸ナトリウム、0.4 μmol NADH を含む反応混液に適量の PON 処理した反応混液（約 0.02 ml）を添加することで開始し、340 nm における吸光度の減少を分光光度計により測定した。抑制率の計算は以下の算式に従い算出した。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\{[1 - (\text{④}/\text{①})] - [1 - (\text{③}/\text{②})]\}}{[1 - (\text{④}/\text{①})]} \times 100$$

注：①②③④は上記文中の反応液で得られた活性を示す

## 結果と考察

### BSA 中の黄色成分生成に対する米ぬか抽出物の効果～分光学的測定

BSA に PON を反応させるとニトロ化反応が起き、反応混液の色が黄色く呈色する。この呈色を指標として、米ぬか抽出液を加えることで PON による呈色がどの程度抑制されるかを分光学的に測定した。米ぬか抽出液による BSA の黄色成分生成は、米ぬか抽出液 120 μl で 56% 抑制された（Fig. 1）。この抑制率は、同じ条件で実験した生体関連物質のうち比較的抑制効果が大きい 0.3 mM フェルラ酸（42.5%）、0.3 mM NADPH（47%）、0.3 mM 還元型グルタチオン（56.1%）、1.0 mM トリプトファン（51.9%）など<sup>(9)</sup>の結果に相当するものであった。

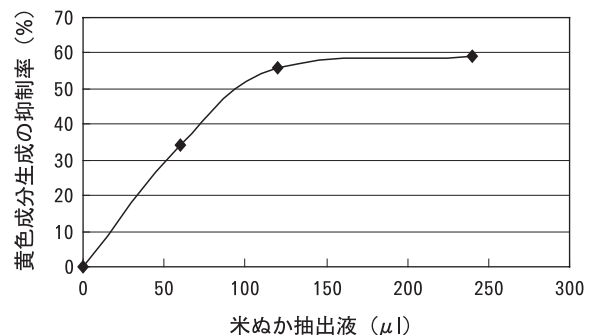


Fig. 1 米ぬかによる黄色成分の抑制

以上の結果から、米ぬかの PON 消去能は高いと推定されたので、以下に示す異なる評価法でもその効果を確認した。

### BSA 中チロシン残基のニトロ化に対する米ぬか抽出液の効果～免疫学的測定

BSA に PON を反応させると、BSA 中のチロシン残基がニトロ化され、3-ニトロチロシンを生成する。これを市販の抗ニトロチロシン抗体・二次抗体を利用して発色させ、米ぬか存在下でのニトロチロシン生成量を調べた。これを非存在下で作成した検量線による生成量と比較し、米ぬか抽出液の添加量

とその抑制効果の関係を Fig. 2 に示した。米ぬか抽出液 90  $\mu$ l で 41%，300  $\mu$ l で 71% のニトロ化抑制がみられた。

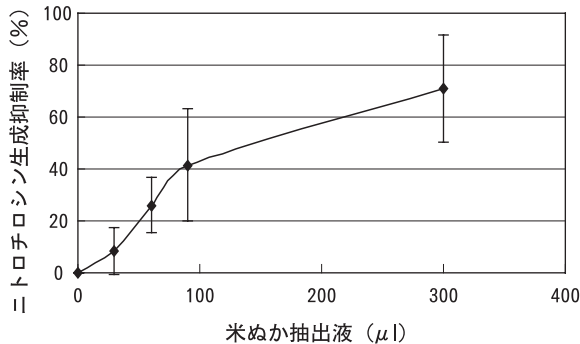


Fig. 2 米ぬかによるニトロ化抑制

もともと、Western Blotting 法を利用したニトロクロロシンの検出は免疫組織化学的検出に優れているが、定量性に乏しいといわれている。Fig.2に見られるように米ぬか抽出液添加の実験は5~19回繰り返したが、かなり大きな標準偏差を有する結果となった。

#### PON による LDH 活性阻害に及ぼす米ぬか抽出液共存の効果

LDH 活性は①の条件で得られる活性値に対し④で得られる活性値は 28.2~28.8% であり、約 70% の活性が阻害されることが判った。一方、米ぬか抽出液の LDH 活性に対する影響は、米ぬか抽出液 60  $\mu$ l を添加した②で得られる活性値は①の状態に較べ 125% に増加し、米ぬか抽出液の添加量が増えるに従い増加傾向が認められた。PON に誘導される LDH 活性の阻害は米ぬか抽出液の添加量に対し、濃度依存的に抑制され、120  $\mu$ l の添加時は 76% の抑制効果があった (Fig. 3)。

今回の研究では、PON で誘導される BSA の化学修飾を分光学的測定と免疫学的測定で、また PON による LDH の活性阻害をもとに、米ぬかの PON 消去能を評価した。いずれの方法でも強い PON 消去能を確認することができ、LDH を用いた実験方法はデータの再現性も良好であった。米ぬかはビタミン B、E やナイアシン、ミネラル、食物繊維、ポリフェノールなど、多くの有用成分を含んで

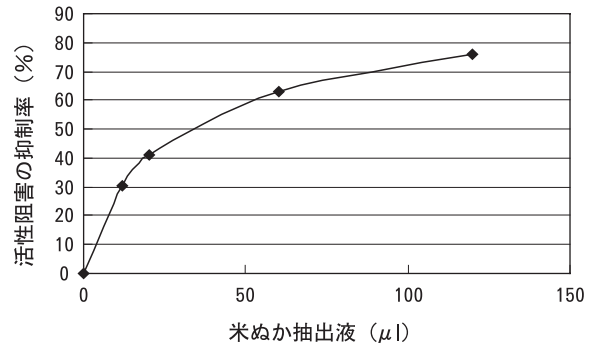


Fig. 3 LDH 活性阻害の抑制

いることが知られているが、米ぬかのポリフェノールとしてはフェルラ酸やシナピン酸など抗酸化活性をもった成分が含まれている。既報<sup>(9)</sup>では、この 0.3 mM フェルラ酸に比較的強い PON 消去能があることを確認したが、今回の実験条件での米ぬか抽出液の PON 消去能もこれら抗酸化成分の影響と考えることができる。しかし抽出液中に含まれるフェルラ酸濃度は前回の実験で用いた濃度よりも低濃度と考えられる。別の抗酸化成分の関与やフェルラ酸の配糖体のような結合型フェノールが存在しているためかもしれない。今後は米ぬか中の PON 消去能を有する化学成分の分離同定を行いたい。

最後に、我々は最近、神経細胞 PC 12 の粗抽出液を PON 処理後、プロテオーム解析を行ったところ、LDH のアミノ酸配列上でニトロクロロシンおよびニトロトリプトファンを見出しており、この PON による LDH の修飾が、より生体系に近い環境でも生じることを確認している (Kawasaki, H. et al., 未発表)。今後、LDH の吸収変化や抗体との反応等も用い、酵素失活と修飾部位との関連についても検討したい。

#### 要 約

米ぬか抽出液の PON 消去能を、タンパク質の修飾反応の抑制という視点から異なる三種類の方法で検討した。その結果、米ぬか抽出液には 60~75% の修飾抑制効果があることが判った。

## 引用文献

1. 井手友美 (2008) 酸化ストレスの医学 メタボリックシンドロームと酸化ストレス 吉川敏一監修 診断と治療社 248-56
2. 大柳善彦 (1989) 活性酸素と病気 化学同人 161-85
3. 中木敏夫 (1999) NO 合成酵素阻害薬, NO 消去薬, NO 供与薬 NO の生理作用と疾患 谷口直之・鈴木敬一郎編 羊土社 94-100
4. Uppu, R. M., Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 335-43
5. Crow, J. P., and Ischiropoulos, H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in protein: In vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.*, **269**, 185-194
6. 谷口直之, 鈴木敬一郎 (1999) NO: 活性酸素, 抗酸化酵素とのクロストーク, NO の生理作用と疾患 谷口直之・鈴木敬一郎編 羊土社 12-17
7. Toshio Niwa, Umeyuki Doi, and Toshihiko Osawa (1999) Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro. *FEBS Lett.* **459**, 43-46
8. Takanori Tsuda, Yoji Kato, and Toshihiko Osawa (2000) Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett.* **484**, 207-10
9. 松本孝, 若林ゆう, 池田啓一, 山倉文幸 (2008) 種々の生体物質のペルオキシナイトライト消去能, 学苑 (生活科学紀要), No. 818, 35-39
10. Shin, S-G., Kim, J. Y., Chung, H. Y., and Jeong, J. C. (2005) Zingerone as an antioxidant against peroxynitrite. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7617-22

(まつもと たかし 管理栄養学科)

(ささき えり 平成 18 年度生活科学科卒業生)

(こしか まゆこ 平成 20 年度生活科学科卒業生)

(いけだ けいいち 順天堂大学スポーツ健康科学部健康学科)

(かわさき ひろあき 順天堂大学環境医学研究所)

(やまくら ふみゆき 順天堂大学医療看護学部)