

ヒト血清アルブミン加水分解物由来のテトラペプチドによる ビタミンEの抗酸化能の向上

水産大学校

幡 手 英 雄

Antioxidative substances play an important role in depression of undesirable oxidation in biological systems as well as in food processing. Although synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene are effective for preventing lipid peroxidation, their safety has been questioned. Therefore, many researchers have been screening for useful antioxidants from various natural materials. At present, vitamin E (α -tocopherol) is widely used as a safe natural antioxidant. Furthermore, it has been demonstrated that peptides from various proteins, such as soybean protein, sardine myofibril protein, and bovine serum albumin, enhanced the antioxidative activity of α -tocopherol (Toc). These results suggest that peptides, which are produced metabolically and incorporated dietetically, will serve as an effective synergist in biological systems. Namely, these peptides are supposed to protect *in vivo* lipid peroxidation in cooperation with antioxidants such as tocopherols. Nevertheless, the investigation on the synergisms of peptides originated from human serum albumin (HSA) is not made yet.

In the present study, S-carboxymethylated HSA (CM-HSA) was employed for the preparation of synergistic peptide, instead of the intact HSA, because the disulfide bridges in the HSA molecule seemed to prevent the proteolytic digestion. The CM-HSA treated with pepsin showed strong synergistic effect towards Toc. From the resulting hydrolysates a peptide, having a strong synergism, was successfully separated by chromatography on a Sephadex G-25 column, and then high-performance liquid chromatography on an ODS column. This peptide, designated as HSA-H-5, was again hydrolyzed with a lysyl endopeptidase to give two peptide fragments. Each fragment thus isolated was tested for its synergistic effect with Toc, and it was found that one fragment had a potent synergism comparable to the original peptide, HSA-H-5, but the other one had little effect. The structure of that active fragment was confirmed as the tetrapeptide, Leu-Gln-His-Lys, by amino acid analysis and sequence determination. In addition, HSA-H-5 and the active fragment corresponded to the amino acid residues 103 to 112 and 103 to 106 of HSA, respectively. Although the role of that active fragment in the HSA was not apparent, it composed of only five amino acid residues. Therefore, it will be advantageous not only for the application as a useful synergist but also for the elucidation of unknown synergistic mechanism of peptide synergists.

1 緒 言

過酸化脂質は食品の品質劣化を引き起こすだけでなく、様々な疾病、老化あるいは発癌などにも関与している。コスメトロジー分野においても紫外線による活性酸素（フリーラジカル）の発生と

老化色素さらには皮膚癌との関連が指摘され、重要な問題になっている。一方、脂質酸化の防止に使用されてきた合成抗酸化剤に関して、発癌作用など人体に対する悪影響が報告され、一部の合成抗酸化剤の使用が禁止されたり、使用量が制限される傾向にある。このような状況から、様々な分野でこれら過酸化脂質の生成を抑制できる抗酸化性物質の開発が期待されている。しかし、新たに開発された抗酸化性物質の多くは毒性や有効性の点で不十分なものが多く、現在もビタミンE（ α -トコフェロール；Toc）が抗酸化剤として汎用されているのが実状である。したがって、新規抗酸化剤の探索と同様に、既存の抗酸化剤の能力を高める物質、すなわちシナジストの開発は重要



Enhancement of Antioxidative Activity of Vitamin E using Tetrapeptide Derived from Human Serum Albumin Hydrolysates

Hideo Hatate

National Fisheries University

な研究課題である。シナージストは様々な物質に存在しており、各種タンパク質の加水分解物も抗酸化剤と強い相乗効果をもつことが報告されている¹⁻⁶⁾。筆者は、人体の基本的構成成分であり生体に受け入れやすいヒト血清アルブミン (HSA) を原料とし、毒性のない有効なペプチドシナージストの開発を試みた。その結果、HSAのプロテアーゼ処理によって生成された各種の加水分解物 (HSA-H) は、予想どおりTocに対して強い相乗効果を発現した。しかし、生成されたペプチドの分子サイズが大きく、しかも多種類であったために有効なペプチドシナージストの構造解明にはいたらなかった。そこで、本研究ではHSAのS-S結合をあらかじめ切断して酵素分解を受け易くした還元カルボキシルメチル化HSA (CM-HSA) を原料タンパク質とした。その結果、Tocと強い相乗効果をもつテトラペプチドが分離されたので以下に報告する。

2 実験

2.1 薬品

リノール酸 (和光純薬製)、HSA (シグマ社製)、ペプシン (ブタ胃粘膜、シグマ社製)、リシルエンドペプチダーゼ (LEP、和光純薬製)、Toc (和光純薬製)、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩2水和物 (TNBS、和光純薬製)、ジチオトレイトール (和光純薬製)。その他、高純度の市販試薬をそのまま使用した。

2.2 CM-HSAの調製

0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に 0.5% (w/v) となるようにHSAを溶解した。この0.5% HSA溶液1mlあたりにジチオトレイトール3mgを加え、容器内の空気を窒素で置換して室温で2時間還元した。還元後、このHSA溶液1mlあたり、ヨード酢酸7.5mgを加え暗所で30分間反応させた。反応終了後、暗所で脱イオン水に対して十分に透析した。透析内液を凍結乾燥してCM-HSAを調製し

た。

2.3 CM-HSAの加水分解物の調製

CM-HSAを0.02M HClに0.5% (w/v) となるように溶解し、沸騰水浴中で5分間加熱処理した。この0.5%CM-HSA溶液にペプシンを100:1 (HSA:酵素、w/w) の割合で添加し、37°Cで9時間酵素反応させた。反応終了後、沸騰水浴中で5分間加熱し、酵素を失活させてCM-HSAの加水分解物 (CM-HSA-H) を調製した。

2.4 CM-HSA-HのセファデックスG-25による分離

CM-HSA-Hを遠心分離した後、この上澄液を 1×10^{-3} M HClを溶出剤としてセファデックスG-25 (Super fine) カラム (2.2cm×111.5 cm) で分画した (流速0.3ml/min)。

なお、本研究ではペプチド量は、254nmの吸光度あるいはTNBS法⁷⁾で定量したアミノ基量で評価した。

2.5 CM-HSA-Hの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離

各種ペプチドは Wakosil 5C18-200T カラム (4.6mm×250mm、和光純薬製) またはTSKgel ODS-80Ts (4.6mm×250mm、東ソー製) を用いてHPLC分析した (検出波長220nm)。溶出剤としては0.1%トリフルオロ酢酸を含む水とアセトニトリルの混合液を使用した (流速 0.5 ml/min)。

2.6 ペプチドのLEPによる断片化

HPLCで分離した有効なペプチドを、LEPで0.1M Tris-HCl緩衝溶液 (pH9.0) 中で、37°C、3時間加水分解処理して断片化した。

2.7 各種ペプチドとTocとの相乗効果の測定

リノール酸の最終濃度が 2.0×10^{-3} Mになるように、エタノール2ml、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 2ml、蒸留水 1mlの混合液を酸化モデル系として設定した。Toc (50 μg) との相乗効果を

判定するときは、各種ペプチド溶液の添加量に応じてこの酸化モデル系から蒸留水の量を減じ、全量は常に5mlとした。これをネジ付試験管(20mm×125mm)で密栓し、60°Cの暗所で自動酸化させた。リノール酸の酸化の程度は、チオシアン酸鉄法^{3, 4)}で経日的に測定し、過酸化物質が100meq/kgに達するのに要する日数(誘導期)でTocとの相乗効果の強さを評価した。

2.8 ペプチドのアミノ酸分析およびその配列決定

常法により、ペプチドを6N HClで110°C、24時間加水分解し、アミノ酸自動分析計でアミノ酸組成を調べた。また、ペプチドのアミノ酸配列をEdman分解法を用いた自動分析装置で決定した。

3 結果

3.1 CM-HSA-HのセファデックスG-25による分離および各画分とTocとの相乗効果

ペプシンで37°C、9時間加水分解して調製されたCM-HSA-HをセファデックスG-25で分離し、各画分0.1mlのTocとの相乗効果を検討した。Fig. 1に示すように、試験管番号23から42の範囲で相乗効果が認められた。その画分中で相対的に少ないペプチドの溶出量であるにもかかわらず、強い相乗効果をもつ一群のペプチド(画分A)が認められ

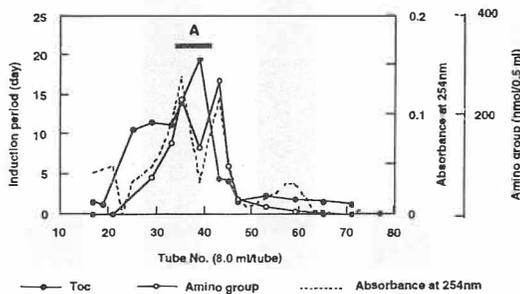


Fig. 1 Separation of CM-HSA-H by chromatography on a Sephadex G-25 column, and synergistic effect of fractions with Toc.

た。このCM-HSA-Hの分離パターンは、還元処理されていないHSAをペプシン処理して同様に調製した加水分解物の分離パターンとは多少異なっていた。しかしながら、強い相乗効果をもつペプチド(画分A)は両者ともほぼ同じ位置に溶出されており、CM-HSA-HとHSA-Hに存在する有用なペプチドシナージストが同様あるいは類似の物質であることが示唆された。

3.2 CM-HSA-Hからのペプチドシナージストの分離

Fig. 1に示した強い相乗効果をもつ画分Aを回収し、凍結乾燥して濃縮した。画分A中に存在するTocと強い相乗効果をもつペプチドを単離するために逆相カラムによるHPLC分析を行った。

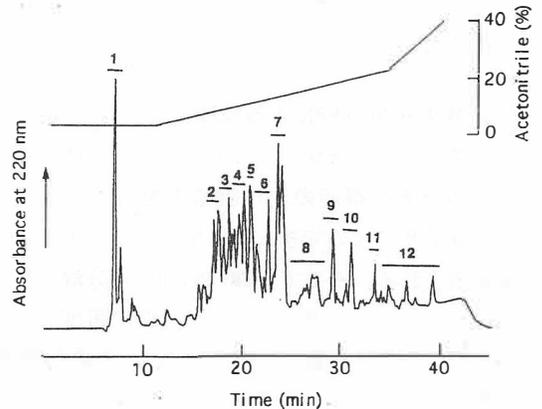


Fig. 2 HPLC of fraction A* obtained from CM-HSA-H Column, Wakosil 5C18-200T; Flow rate, 0.5ml/min. *Refer to Fig. 1

Fig. 2に示すように、画分Aには多数のペプチドが混在していた。これらをピークごとに回収し、各画分15nmolのTocとの相乗効果を測定した。すなわち、各画分を凍結乾燥した後、少量の0.001M HClに再溶解し、ペプチドの濃度をTNBS法で測定して各画分の酸化モデル系への添加量を15nmolに調整した。その結果、ピーク1, 5 および9がTocと強い相乗効果を示した (Fig. 3)。ピーク1および

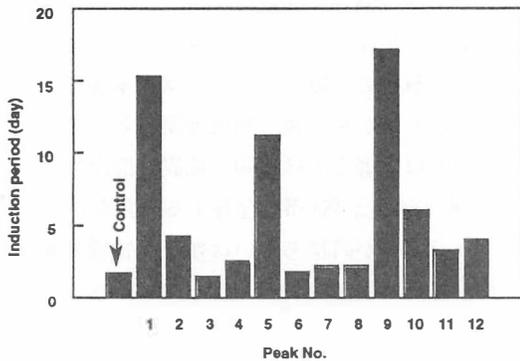


Fig. 3 Synergistic effect of fractions* with Toc. *Refer to Fig. 2

9からは現在のところ有効なペプチドシナージストは単離されていないが、ピーク5からは強い相乗効果をもつペプチドシナージストが、明瞭な単一ピークとして分離された。以後このペプチドシナージストをHSA-H-5と呼称する。

3.3 HSA-H-5のLEPによる断片化

ペプチドシナージストの実用化あるいは不明な点の多いその機能の発現機構を解明するうえでは、分子サイズのできるだけ小さいペプチドの作製が望まれる。そこで、CM-HSA-Hから分離されたペプチドシナージストHSA-H-5をLEPで再度加水分解した。Fig. 4に示してあるように、LEPを3時間程度作用させると、HSA-H-5はほぼ完全に酵素分解され、新たに2つのピーク（フラグメント5-aおよび5-b）を生じた。このことは、HSA-H-5が少なくとも2つのフラグメントから構成されていることを示唆した。Fig. 5にHSA-H-5、フラグメント5-aおよび5-bのTocとの相乗効果を示してある。フラグメント5-aはHSA-H-5と同程度の強い相乗効果を発現し、LEP処理により断片化（低分子化）されても依然として強い相乗効果を保持していた。一方、フラグメント5-bは無効であった。このことは、HSA-H-5の機能発現部位が、フラグメント5-bではなく、フラグメント5-aにあることを明示した。

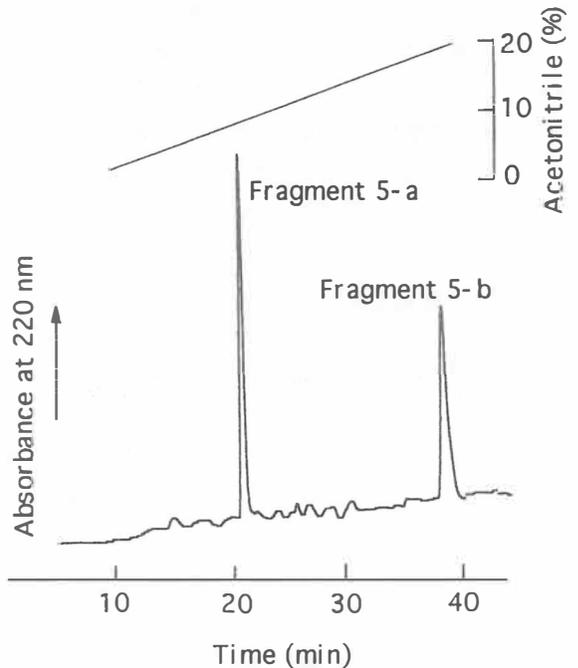


Fig. 4 HPLC of HSA-H-5*after treatment with lysyl endopeptidase at 37°C for 3h. Column, TSK gel ODS-80Ts; Flow rate, 0.5 ml/min. *HSA-H-5 corresponded to peak 5 in Figs. 2 and 3

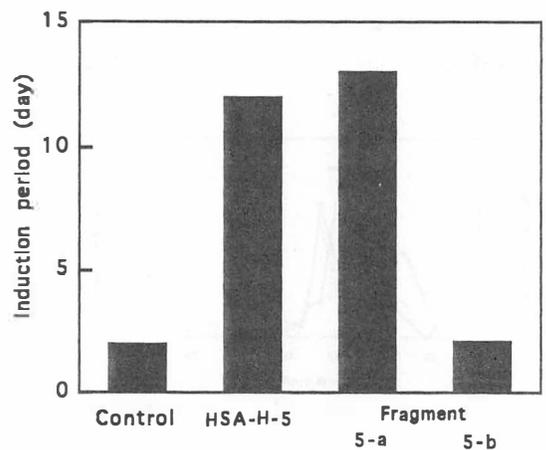


Fig. 5 Synergistic effect of HSA-H-5 and its fragments 5-a and 5-b with Toc.

文 献

- 1) 満田久輝、安本教博、岩見公和：栄養と食糧、19 210 1966
- 2) 山口直彦、横尾良夫、藤巻正夫：日食工誌、22 431 1974
- 3) 山庄司志朗、吉田弘美、梶本五郎：油化学、26 28 1977
- 4) 幡手英雄、永田吉充、河内正通：油化学、39 42 1990
- 5) H. Hatate, Y. Numata, and M. Kochi, : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 1011 1990
- 6) H. Hatate, K. Kusunoki, and M. Kochi, : *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, 42 168 1993
- 7) T. Okuyama and K. Satake, : *J. Biochem.*, 47 454 1960
- 8) B. Meloun, L. Moravak, and Y. Kostka : *FEBS Lett.*, 58 134 1975
- 9) T. Masaki, K. Nakamura, M. Isono, and M. Soejima, : *Agric. Biol. Chem.*, 42 1443 1978