

グルタチオンペルオキシダーゼの新規測定法による赤身魚、植物からの抽出

毛利 哲

(宮城県産業技術総合センター)

A New Assay Method for Glutathione-Peroxidase and Its Activity in Red Meat Fish and Plants

Satoshi MOHRI

(Industrial Technology Institute of Miyagi Prefectural Government)

1 はじめに

生体内での活性酸素による酸化反応は生活習慣病との関わりが指摘されており、この予防のために食材由来の抗酸化物質について多くの研究がなされてきた。

生体内での酸化反応は、脂質の酸化を開始反応として生じた脂質酸化物の分解により活性酸素が生じ、以後連鎖的に反応が促進されるところに特徴があり、従来知られているビタミンEやポリフェノールは、この連鎖反応を抑制するものである。また、脂質酸化物を還元消去し、連鎖反応を生じさせない物質も一部知られており（予防型抗酸化物質）、これにはグルタチオンペルオキシダーゼがある¹⁾。

連鎖反応停止型の抗酸化物質については食材中の定量化も行われているが、予防型の抗酸化物質であるグルタチオンペルオキシダーゼについては、動物中の各組織に存在していることは知られているものの、食材中の定量化は行われていない。

そこで本研究では、食品中のグルタチオンペルオキシダーゼを主とする脂質過酸化物還元能測定法の高感度化を図り、植物系特にネギ中にグルタチオンペルオキシダーゼ活性を新たに認めたので、その諸性質について報告する。

2 試験方法

(1) 脂質過酸化物還元能の測定

食品試料に pH7.2 の 5mM Tris 緩衝液を加え、ホモジナイザーで粉碎し、遠心上清を試料溶液として用いた。

i) 従来法（いわゆる共役酵素法によるグルタチオンペルオキシダーゼ活性測定²⁾）

反応液は、0.5 mM の EDTA、10mM の還元型グルタチ

オン、1 unit のグルタチオンリダクターゼ、0.2 mM の NADPH を含む 0.1 mM の Tris 緩衝液 (pH 8.0) に適量の試料溶液と 0.35 mmol の t-butyl hydroperoxide を加え、37℃で5分間インキュベートする間の 340 nm の吸収の減少量から、グルタチオンペルオキシダーゼ活性が求められる。

ii) HPLC 法による脂質過酸化物還元能測定

反応基質であるリノール酸ヒドロペルオキシドは、リノール酸を大豆リポキシゲナーゼで反応させて得られた反応生成物を用いた。5 mM の EDTA、2 mM の還元型グルタチオンと適量の試料溶液を含む pH 8.0 の Tris 緩衝液中で、37℃で 10 分間インキュベートした生成物を HPLC 試料とした。HPLC 条件は、カラムとして Inertsil SIL (4.6 × 150 mm, GL science Co. LTD) を接続し、溶出液としてヘキサン:2-プロパノール:酢酸 (99:1:0.1, 1 ml/min) を用いて、235 nm で検出した。カラムの温度は 35℃とした。

3 試験結果及び考察

(1) 脂質過酸化物還元能の高感度測定

HPLC 法では、従来法である共役酵素法に対し生成物を直接的に定量できる。表 1 に示したように、この結果検出限界を従来の 100 倍にまで高め、0.0032 units/mL まで測定することができた。

(2) 高感度測定法によるネギグルタチオンペルオキシダーゼの検出

57 種類の食品についてスクリーニング試験を行った (図 1)。その結果、動物系ではグルタチオンペルオキシダーゼを含有していることが知られている³⁾が、マグロ、カツオ等の赤身の魚類肉に多くあることが判った。さらにまた植物系でもグルタチオンペルオキシ

ダーゼ様の脂質過酸化還元能を有していることが判った。特にネギ類には、植物としては高い活性が存在していた。見出されたネギの脂質過酸化物還元能は、熱安定性や還元型グルタチオンを反応に必須とすることなどからグルタチオンペルオキシダーゼであった。

i) 長ネギの各部位の活性

長ネギの各部位および廃棄部位の脂質過酸化物還元能を測定したところ、各部位にほぼ同等の活性が見られ、廃棄部位においても80%程度の活性が残っていた。このことから、特定部位に存在しているものではなく、ネギ廃棄部位の利用が期待される。

ii) ネギグルタチオンペルオキシダーゼの諸性質

長ネギから精製したグルタチオンペルオキシダーゼの諸性質を調べた(表2)。既存品のウシ血小板由来のものに比べ、比活性は弱いものの安定なpH範囲が広いことや冷凍耐性があり保存性に優れるなどの性質を持っていた。

4 まとめ

脂質過酸化物還元能の高感度測定法を開発した。本方法により赤身魚や植物にもグルタチオンペルオキシダーゼが存在することを見出し、ネギグルタチオンペルオキシダーゼについてその諸性質を調べた。

引用文献

1) 「活性酸素種の化学」、日本化学会編、1990、学会出版センター(東京)、pp. 179.
2) 「活性酸素実験プロトコール」、谷口編、1990、秀潤社(東京)、pp. 105.
3) 渡部・平塚、蛋白質核酸酵素臨時増刊、33(16)、2949(1988)。

表1 開発した方法と従来法により測定可能な、ウシ血小板グルタチオンペルオキシダーゼの濃度範囲

	検出可能な濃度範囲
開発した方法	0.0032~3.2 units/mL
従来法	
(基質) トーピチルヒドロペルオキシド	0.32~ units/mL
(基質) 過酸化水素	0.32~ units/mL
(基質) リノール酸ヒドロペルオキシド	0.32~ units/mL

表2 長ネギ由来とウシ血小板由来グルタチオンペルオキシダーゼの諸性質比較

	ネギ由来	ウシ血小板由来
分子量	~48,000	84,500
比活性(units/mg)	78	300~700
反応最適pH	8.0	8.8
安定pH範囲	5~11	7~10
加熱耐性	65℃、10分 75℃、1分	65℃、10分 75℃、1分
溶液の冷蔵保存期間	20日間	5日間
凍結・凍結乾燥耐性	冷凍で3ヶ月以上安定 凍結乾燥可能	冷凍時に安定化剤が必要

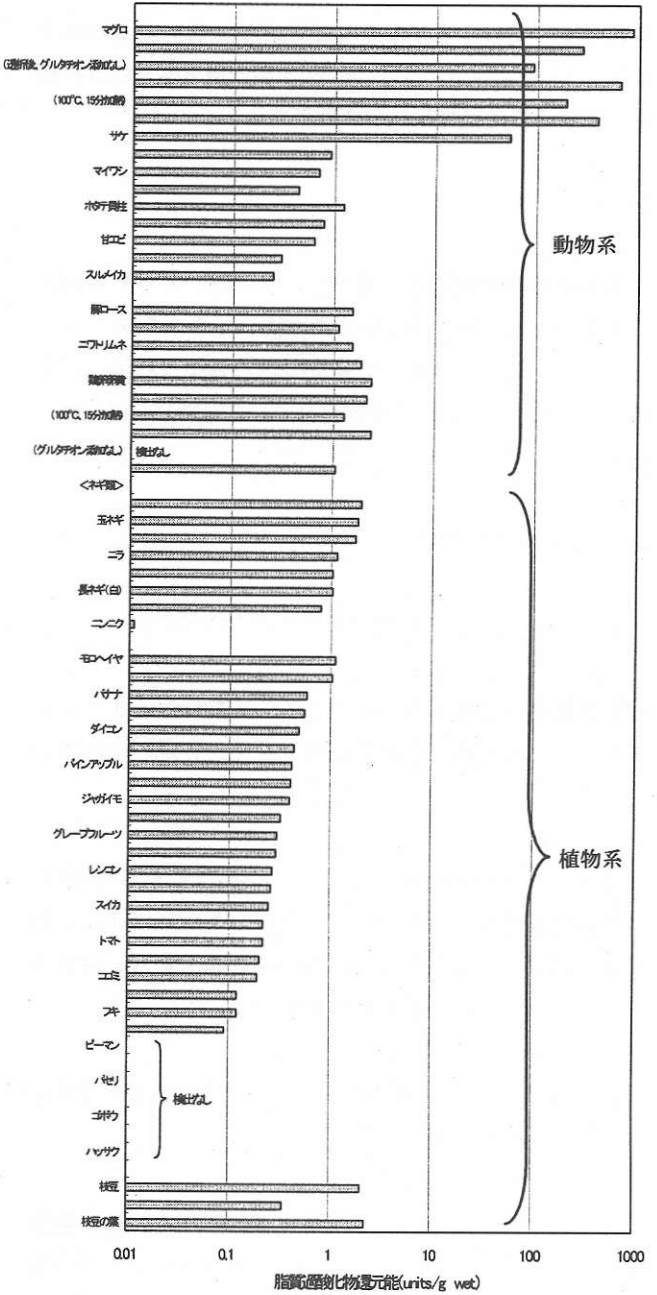


図1 食材の脂質過酸化物還元能