

5 2

助成番号 0152

塩類によるアスコルビン酸オキシダーゼの阻害メカニズムの解明

助成研究者：大羽 和子 (名古屋女子大学 家政学部)

共同研究者：山本 淳子 (名古屋女子大学 家政学部)

藤江 歩巳 (名古屋女子大学 家政学部)

多くの野菜にはアスコルビン酸 (AsA と略す) を酸化するアスコルビン酸オキシダーゼ (EC 1.10.3.3) が存在する。アスコルビン酸オキシダーゼは野菜や果物の重要な機能性成分であるビタミンCを酸化分解する。外食産業への依存度が急速に進んでいる現在、野菜や果物を収穫後加工・調理してから食するまでの時間が長くなっているため、酵素的褐変やビタミンの損失の防止が以前に増して重要になってきた。そこで、本研究では、アスコルビン酸オキシダーゼを精製し、食塩および他の塩類による活性阻害のメカニズムを酵素レベルで解明することを目的とした。年間を通して安定的に供給される軟弱野菜の黒緑豆もやしに、ニンジンの活性の2倍以上高い活性が存在することを見出したので、もやし胚軸を材料として用い、以下の結果を得た。黒緑豆もやしには新鮮重100g当たり約10mgのビタミンCが含有されたが、水で磨砕すると、AsAの99%以上が酸化された。食塩水で磨砕すると食塩濃度に比例してAsAの酸化が阻害された。食塩によるAsAの酸化阻害のメカニズムを解明する目的で、黒緑豆もやし胚軸の磨砕液を40~70%硫酸飽和で沈殿する画分を集め、DE-52カラムクロマトグラフィを行うと、2つのアイソザイム(IとIIと命名)が存在した。この段階でIは15.4倍に、IIは27.1倍に精製された。アイソザイムIおよびIIの活性の最適pHは5付近にあり、AsAの濃度に比例して活性が増大し、Michaelis-Menten型のカーブが得られた。アイソザイムIおよびIIのAsAに対する K_m 値は 12.5×10^{-5} Mおよび 4.4×10^{-5} Mであった。アイソザイムIおよびIIの活性は種々の塩類によって濃度依存的に阻害され、阻害の程度は $\text{Na-citrate} > \text{NaCl} > \text{KCl} > \text{Na-malate} > \text{NH}_4\text{Cl} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の順に小さくなった。活性阻害が大きかったクエン酸ソーダと食塩の2種類の塩濃度を変えてアイソザイムIおよびIIのLineweaver-Burkプロットをとると、添加する塩濃度が高くなるにつれて、最大活性が小さくなり、直線の傾きが大きくなった。アイソザイムIは、クエン酸ソーダでも食塩でも非拮抗型様式で阻害され、その阻害定数 K_i 値は50 mMおよび130 mMであった。一方、アイソザイムIIはこれら2種の塩で拮抗的に阻害され、クエン酸ソーダおよび食塩の K_i 値は各々25 mMおよび28 mMであった。生野菜の調理に際し、食塩やレモン汁がよく使われるが、用いられる食塩濃度は約1% (170 mM) であり、クエン酸はレモン汁中に6~10%含まれる。本研究の結果で得られたクエン酸塩や食塩のAAOに対する阻害定数 K_i 値から考えると、日常使用しているこれらの塩の濃度でAAO活性が効果的に阻害されていることが判明した。

16

助成番号 0152

塩類によるアスコルビン酸オキシダーゼの阻害メカニズムの解明

助成研究者：大羽 和子 (名古屋女子大学 家政学部)
 共同研究者：山本 淳子 (名古屋女子大学 家政学部)
 藤江 歩巳 (名古屋女子大学 家政学部)

1. 研究目的

野菜はビタミンC (VC) のよい供給源であるが、多くの野菜にはアスコルビン酸 (AsA と略す) を酸化するアスコルビン酸オキシダーゼ (AAO, EC 1.10.3.3) が存在する^{1), 2)}。AAO は野菜や果物の重要な機能性成分である VC を酸化し、デヒドロアスコルビン酸 (DHA) を生成する反応を触媒する。外食産業への依存度が增大している現在、野菜や果物を収穫後に加工・調理してから食するまでの時間が長くなっている。したがって、生鮮食材の酵素的褐変や VC の損失を防止することが以前に増して重要になってきた。そこで本研究では、食塩および他の塩類による AAO 活性の阻害のメカニズムを、野菜の AAO を精製して酵素レベルで解明し、野菜に含有される VC の酸化を防止するのに有効な塩類およびそれらの濃度を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 材料

年間を通して安定的に供給される軟弱野菜の黒緑豆もやし (愛知県・柴田商店産) を実験当日の朝名古屋市内の市場から購入した。AAO 活性の大部分は胚軸に存在したので胚軸部分を分取して冷却し、材料として用いた。

2.2 AAO 活性の測定³⁾

0.17 mM AsA を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中 25°C で反応させ、265nm の吸光度の減少を経時的に追跡し、その傾きから酵素活性を算出した。1 分間に 1 μ mol の AsA を酸化する酵素量を 1 unit とした。

2.3 AAO アイソザイムの分離と部分精製

以下のすべての操作は 4°C 以下で行った。

黒緑豆もやし胚軸 400 g を 30 mM メルカプトエタノールを含む 100 mM K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) 400ml とともにホモブレンダーで 1 分間磨砕した。磨砕液を二重のナイロンガーゼで濾過した後、遠心分離 (4°C, 10,000rpm, 15

分間) し、上澄液を抽出液とした。

抽出液に40%飽和になるように硫酸アンモニウム(硫安)を加え、その上澄画分にさらに70%飽和になるように硫安を加え、40~70%飽和硫安で沈殿するタンパク質画分を集めた。これを5 mM K-リン酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化したDE-52セルロースカラムに吸着させ、KCl濃度0Mから0.4Mまでの直線濃度勾配をつけて、タンパク質を溶出した(Fig. 1)。

2.4 タンパク質の定量

子牛血清アルブミンを標準タンパク質として用い、Bradford⁴⁾の方法に従い、タンパク質量を求めた。

3. 結果および考察

3.1 アスコルビン酸の酵素的酸化(AAO活性)に対する食塩の阻害

黒緑豆もやしには新鮮重100g当たり約10mgのVCが含有されたが、水で磨砕するとVCの99%以上が酸化型VCのデヒドロアスコルビン酸(DHA)に変換した。2%、5%の食塩水で磨砕すると食塩濃度に比例してVCの酸化が阻害された(Table 1)。

Table 1 Effect of NaCl on the levels of total VC, DHA and AsA in crude extract of mung bean sprouts

NaCl	Total VC mg(%)	DHA mg(%)	AsA mg(%)
0%	6.8(100)	6.76(99.4)	0.04(0.6)
2%	5.2(100)	4.7 (90.4)	0.5 (9.6)
5%	7.0(100)	4.1 (58.6)	2.9 (41.4)

Contents of Total VC, DHA and AsA of fresh tissue were 10.4, 1.7 and 8.7 mg/100g fr. wt., respectively.

3.2 AAO アイソザイムの分離と部分精製

DE-52セルロースカラムクロマトグラフィにより黒緑豆もやし胚軸のAAOは2つの活性ピークに分離した(Fig. 1)。キュウリやかぼちゃのAAOではアイソザイムの存在は報告されていない⁵⁻⁸⁾。アイソザイムの存在が黒緑豆もやし胚軸のAAOに特異的であるか、葉茎菜類に普遍的であるかは今後検討したい。

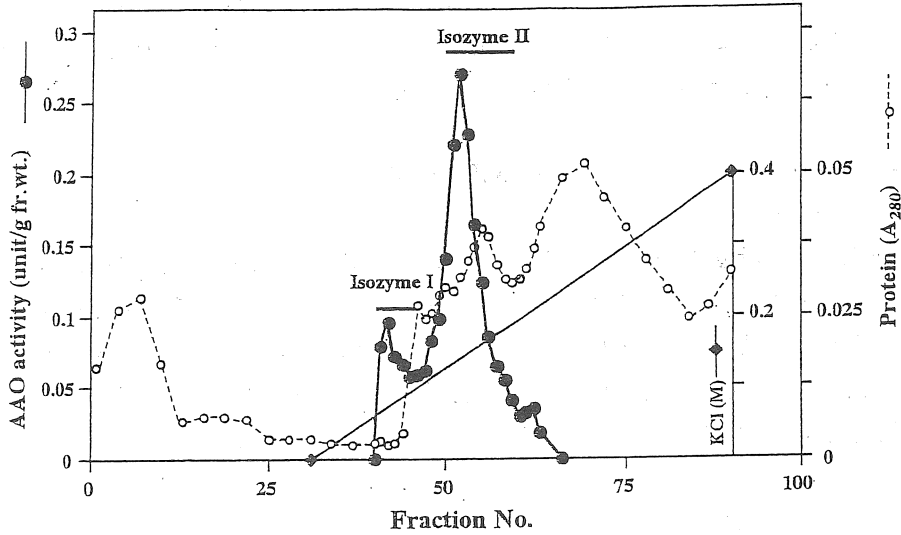


Fig. 1 Elution profile of DE-52 cellulose column chromatography of mung bean sprout AAO.

黒緑豆もやし胚軸の主要な AAO アイソザイムの分離と部分精製のステップを Table 2 にまとめた. 粗酵素液中の総 AAO 活性は, 黒緑豆もやし胚軸 1g あたり 0.23 unit, タンパク質 1mg あたり 0.67 unit であった. DE-52 セルロースカラムクロマトグラフィで分離したアイソザイム I の活性は粗酵素液の活性の 27.5% の回収率で比活性は 15.4 倍に増大した. アイソザイム II の活性は

Table 2 Purification steps of AAO Isozymes from mung bean sprouts

Purification	AAO activity (unit/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	0.229	0.666	0.34	1.0	100.0
Ammonium sulfate (40-70%)	0.212	0.042	5.0	14.7	92.6
DE-52 Cellulose (isozyme I)	0.063	0.012	5.2	15.4	27.5
(isozyme II)	0.165	0.018	9.2	27.1	72.1

72.1%の回収率で、比活性は27.1倍に増大した。すなわちアイソザイム I および II は 15.4 倍および 27.1 倍に部分精製されたことになる。これらの AAO アイソザイムを部分精製酵素として以下の実験に用いた。

3.3 AAO アイソザイム I および II の性質

3.3.1 最適 pH

50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.10~6.15), 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.00~7.45) を用いてアイソザイム I および II の最適 pH を調べた結果、活性の pH 依存カーブは若干異なったがアイソザイム I および II の最適 pH はおよそ 5 付近にあった (Fig. 2)。キュウリの AAO の最適 pH は 5.5~7.0 と報告されているので⁹⁾, 黒緑豆もやしの AAO の最適 pH の方が若干低いといえる。

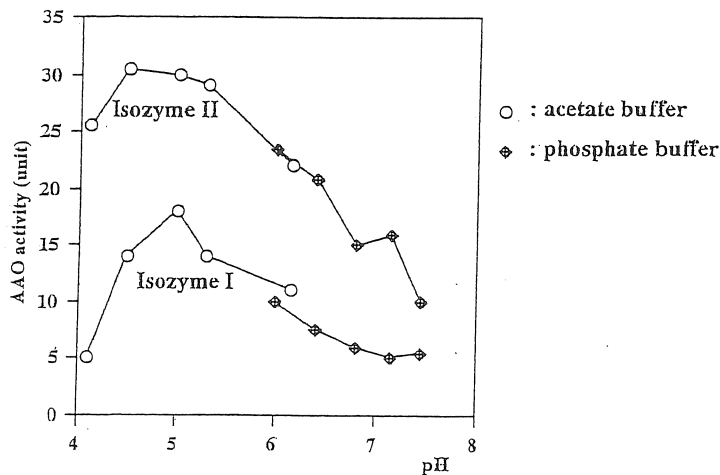


Fig. 2 Optimum pH of partial purified mung bean sprout AAO isozymes I and II.

3.3.2 K_m 値

基質濃度と酵素反応速度との関係を見ると、塩類の存在しない時には、Michaelis-Menten型のカーブが得られた (Fig. 5, 6 参照)。アイソザイム I および II の AsA に対するみかけの K_m 値を Lineweaver-Burk プロットから算出すると、各々 1.25×10^{-4} M および 4.4×10^{-5} M であった。キュウリの AAO の AsA に対する K_m 値は 1.4×10^{-3} M と報告⁹⁾されているので、黒緑豆もやしの 2 つの AAO アイソザイムの方が K_m 値が小さいことが判明した。

3.4 黒緑豆もやしの AAO アイソザイムの活性に及ぼす塩類の影響

3.4.1 AAO 活性に及ぼす種々の塩類の影響

AAO アイソザイム I および II の活性に及ぼす 6 種類の塩類の影響を調べ、結果を Fig. 3 に示した。用いた塩類すべてがアイソザイム I および II の活性を阻害したが、塩類による阻害の程度は異なり、クエン酸塩で最も強く、次に食塩で強く阻害された。陽イオンでは、 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$ の順に阻害が小さくなった。陰イオンでは、クエン酸²⁻ $> \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ の順に阻害が小さくなった。

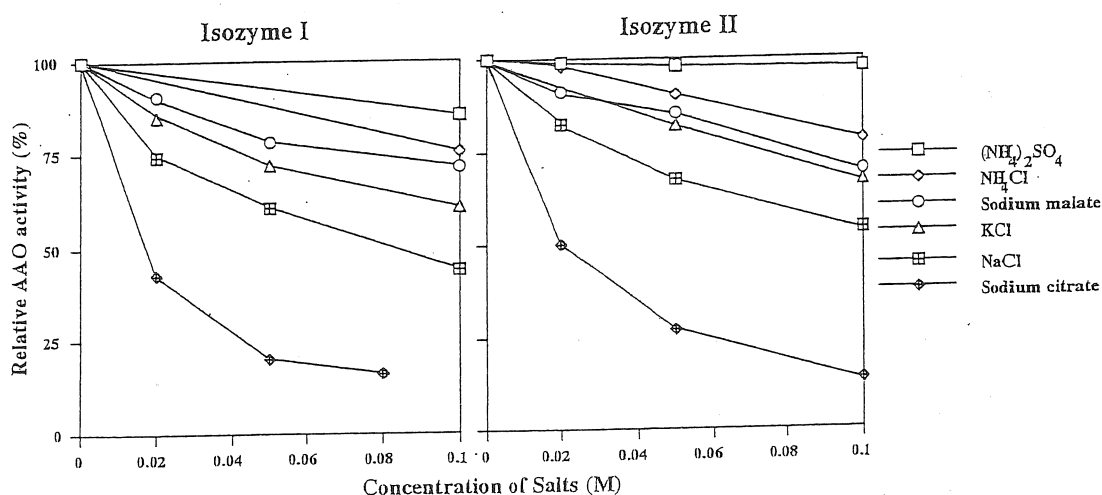


Fig. 3 Effect of various salts on the activity of mung bean sprout AAO isozymes I and II.

3.4.2 クエン酸塩による AAO アイソザイム活性の阻害様式

酵素活性の阻害の程度が最も大きかったクエン酸塩による AAO アイソザイムの阻害様式を明らかにするために、反応速度論的解析を行い、結果を Fig. 4 に示した。アイソザイム I および II の Lineweaver-Burk プロットをとると、添加するクエン酸塩の濃度が増加するにつれて最大活性が小さくなり、直線の傾きが大きくなった。アイソザイム I の場合 (Fig. 4 左), 異なるクエン酸濃度の存在下でプロットした Lineweaver-Burk プロットの 3 本の直線が X 軸上で交差したので、アイソザイム I に対するクエン酸塩の阻害様式は非拮抗型阻害であることが示唆された。クエン酸塩に対する K_i 値は 50 mM であった。アイソザイム II の場合 (Fig. 4 右), 3 本の Lineweaver-Burk プロットが y 軸上で交差し

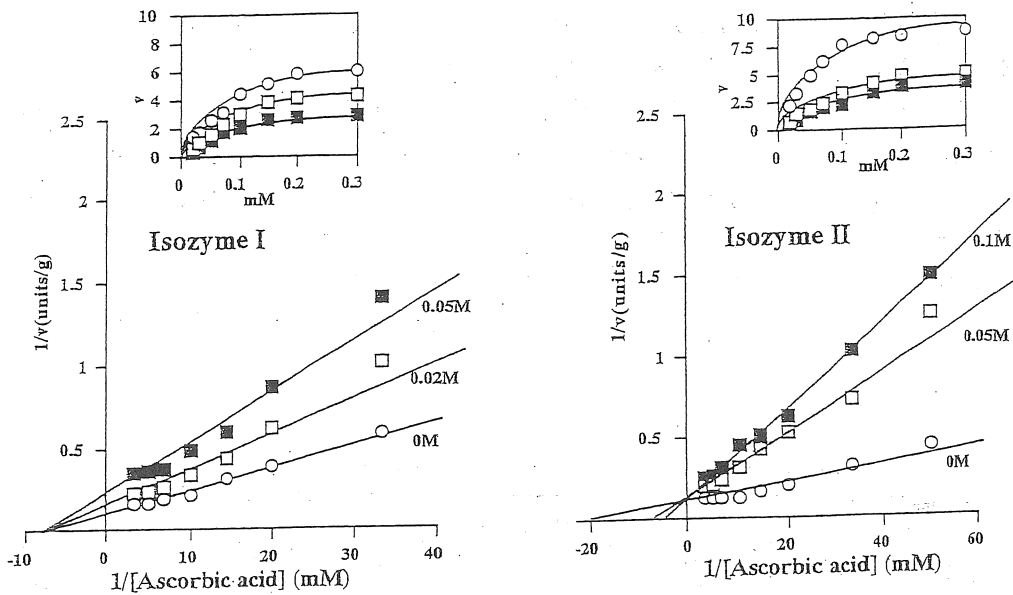


Fig. 4 Lineweaver-Burk plots of AAO isozymes I and II as a function of AsA concentration in the absence (○) and presence (□, ■) of sodium citrate. The insets show the Michaelis-Menten plots of the two AAO isozymes.

たので拮抗型阻害であることが示唆された。また、クエン酸塩に対する K_i 値は 22 mM であった。

3.4.3 食塩による AAO アイソザイム活性の阻害様式

食塩はクエン酸塩の次に AAO アイソザイム I および II の活性を強く阻害した (Fig.3)。そこで、食塩による AAO アイソザイム I および II の活性の阻害様式を知るために、反応速度論的解析を行った (Fig. 5)。アイソザイム I の場合 (Fig. 5 左), 添加する食塩濃度が増加するにつれて, Lineweaver-Burk プロットの直線の傾きが大きくなり, 3 本の直線が X 軸上で交差したので, 食塩は非拮抗的に酵素活性を阻害することが示唆された。食塩に対する K_i 値は 130 mM であった。アイソザイム II の場合 (Fig. 5 右), 3 本の Lineweaver-Burk プロットの直線が y 軸上で交差したので, 拮抗型阻害であることが示唆された。食塩に対する K_i 値は 28 mM であった。AAO アイソザイム I および II の性質は若干異なり, クエン酸塩や食塩による阻害の様式も I は非拮抗型阻害, II は拮抗型阻害であり, アイソザイム II の塩類に対する K_i 値は I の K_i 値より小さかった。生野菜の調理に際し, 食塩やレモン汁がよく使われるが, 用いられる食塩濃度は約 1% (170 mM) であり, クエン酸はレモン汁中に 6~10% 含まれる¹⁰⁾。

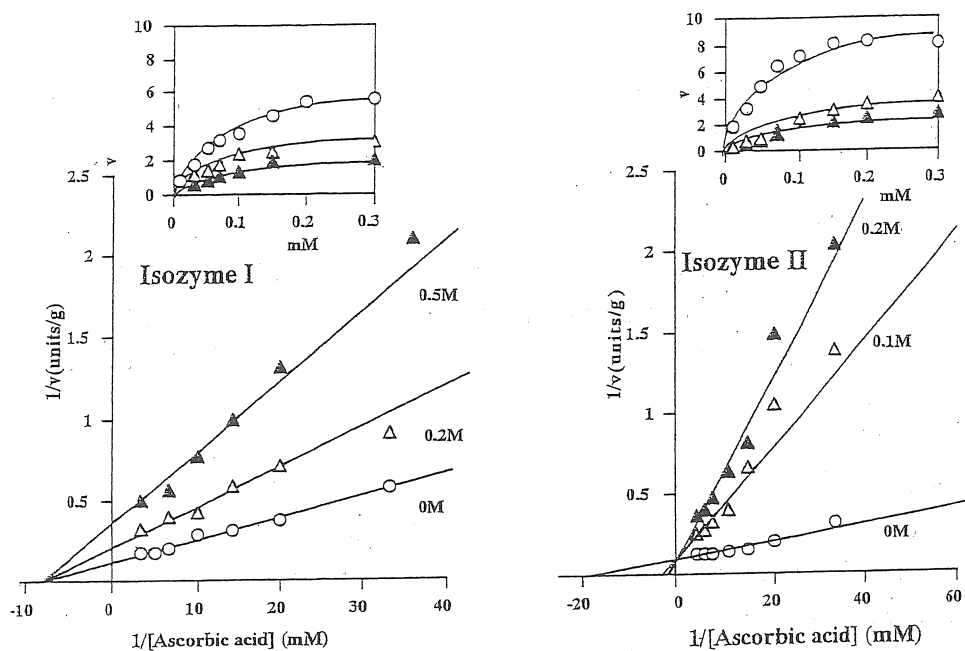


Fig. 5 Lineweaver-Burk plots of AAO isozymes I and II as a function of AsA concentration in the absence (○) and presence (△, ▲) of NaCl. The insets show the Michaelis-Menten plots of the two AAO isozymes.

本研究で得られたクエン酸塩や食塩の AAO に対する阻害定数 (K_i) から考えると、日常使用しているこれらの塩類の濃度で AAO 活性が効果的に阻害されていることが判明した。

4. 結論および今後の課題

本研究において、野菜を磨碎するとアスコルビン酸オキシダーゼ (AAO) の作用で、含有されるアスコルビン酸 (AsA) がデヒドロアスコルビン酸に酸化されるが、食塩の添加で AsA の酸化が阻害されることを確認した。そこで、塩類による AsA の酸化阻害のメカニズムを酵素レベルで解明する目的で、年間を通して入手可能な黒緑豆もやしから AAO を部分精製した。その過程でもやしの AAO に 2 つのアイソザイムが存在することが判明した。アイソザイム I および II の至適 pH, K_m 値は若干異なった。アイソザイム I, II とともに用いた 6 種類の塩類のいずれでも活性が阻害され、クエン酸ソーダによる阻害が最も大きく、次に食塩による阻害が大きかった。クエン酸塩、食塩による阻害の様式はアイソザイム I では非拮抗型阻害、II では拮抗型阻害であり、阻害定数 K_i も異なった。AAO にアイソザイムが存在することが黒緑豆もやしに特異的であるか、葉茎菜類に普遍的であるかを明らかにすることが今後の課題である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたソルトサイエンス研究財団に深く感謝いたします。

5. 引用文献

- 1) 大羽和子：野菜の切断・放置，生食調理に伴うビタミン C 量およびアスコルビン酸オキシダーゼ活性の変化，家政誌，**41**，715-721 (1990)
- 2) 大羽和子：新鮮野菜のアスコルビン酸オキシダーゼ，調理科学，**29**，120-124 (1996)
- 3) 山本淳子，大羽和子：カット野菜のビタミン C 量およびその合成・酸化に関与する酵素の活性，家政誌，**50**，1015-1020 (1999)
- 4) Bradford: A rapid sensitive method For the quantitation of microgram of protein Utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem.，**72**，248-254 (1976)
- 5) M.Esaka, K.Enoki, B.Kouchi and T.Sasaki: Purification and Characterization of Abundant Secreted Protein in Suspension-Cultured Pumpkin-cells, Plant Physiol. **93**，1037-1041 (1990)
- 6) M.Esaka, K.Fujisawa, M.Goto and Y.Kisu: Regulation of Ascorbate Oxidase Expression in Pumpkin by Auxin and Copper, Plant Physiol. **100**，231-237 (1992)
- 7) G.D'andrea, A.Oratore, L.Avigliano, A.Rossi and A.Finazziagro: Characterization and Cross-reactivity of Antibodies Against Ascorbate Oxidase from Green zucchini Marrows (CUCURBITA PEPOMEDULLOSA), Plant Science, **56**，107-112 (1988)
- 8) L.S.Lin and J.E.Varner: Expression of Ascorbic Acid Oxidase in Zucchini Squash, Plant Physiol. **96**，159-165 (1991)
- 9) T.Nakamura, N.Makino and Y.Ogura: Purification and Properties of Ascorbate Oxidase from Cucumber. J.Biochem.，**64**，189-195 (1968)
- 10) F. Forrin and S. D amico eds.: The visual food encyclopedia, 225, Quebec/Amerique inc., (Canada) (1996)

Mechanism for the suppressive effect of salts on ascorbate Oxidase activity of vegetables

Kazuko OBA, Atsuko YAMAMOTO and Ayumi FUJIE
Department of Food Science and Nutrition, Nagoya Women's University

Summary

Ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3, AAO) is widely distributed in plants, and responsible for the oxidation of ascorbate (vitamin C) during storage, processing, and cooking of vegetables. It is well known that the level of ascorbic acid in Momijioroshi, a grated radish and carrot mixture, is decreased rapidly after preparation. We determined that 99% of ascorbic acid of mung bean (*Vigna mungo*) sprouts was oxidized after homogenization with water, but the oxidation was prevented by the addition of NaCl. To elucidate the mechanism for suppressive effect of salts on AAO activity of vegetables, we tried to purification of AAO from mung bean sprouts. Two isozymes (I and II) of AAO were separated by a DE-52 cellulose column chromatography after ammonium sulfate fractionation. The partial purified two isozymes were used for further studies. The optimum pHs of I and II were 5.0 and 4.5~5.2, respectively. The isozymes I and II showed the apparent K_m values of $12.5 \times 10^{-5} M$ and $4.4 \times 10^{-5} M$ for ascorbic acid, respectively. The both isozymes were inhibited strongly by several salts and the effective order was Na-citrate > NaCl > KCl > Na-malate >

NH_4Cl > $(NH_4)_2SO_4$. Lineweaver-Burk plots of isozyme I in the absence and presence of Na-citrate and NaCl showed that inhibitions by Na-citrate and NaCl were non-competitive with the substrate ascorbic acid. K_i values for Na-citrate and NaCl were 50 mM and 130 mM, respectively. On the other hand, Isozyme II was inhibited competitively by the two salts, and the K_i values for Na-citrate and NaCl were 25 mM and 28 mM, respectively. These results suggest that the concentration of NaCl used in cooking of fresh vegetables and lemon juice effectively inhibit AAO activity, and results in preventing of oxidation of ascorbic acid in fresh vegetables after cutting and grating.