

ベンゾイルロイコメチレンブルーを利用した リポキシゲナーゼの活性測定法

黒田 久夫

A method to measure lipoxygenase (LOX) activities of large numbers of samples using benzoyl leuco methylene blue was investigated. Firstly, effect of buffer reagents and pH condition on the reaction of benzoyl leuco methylene blue to methylene blue (LMB colorimetric reaction) with *tert*-butyl hydroperoxide was determined. Optimal pH was determined to be 5.0 and the acetate buffer was the best reagent among phosphate, 2-morpholinoethanesulfonic acid, 2-amino-2-hydroxy-methyl-1,3-propanediol and glycine. Secondly, LOX activities of purified soybean LOX and crude extracts of soybean seeds were determined. Enzyme samples were incubated with linoleic acid, and the amount of linoleic acid hydroperoxide formed was determined by LMB colorimetric reaction. This method was successfully applied to these samples and was very useful to measure large numbers of samples, although when the concentration of extract is too high, it is thought that the turbidity may interfere the measurement of absorbance of samples.

キーワード : lipoxygenase, benzoyl leuco methylene blue, soybean, microplate analysis

1. 背景と目的

リポキシゲナーゼ (LOX) は 1,4-*cis,cis*-ペンタジエン構造を有する脂肪酸に酸素分子を付加して脂肪酸ヒドロペルオキシドを生成する酵素であり、動物・植物・微生物に広く存在する¹⁾。LOX は、動物においてはプロスタグランジンやロイコトリエンの合成²⁾、植物・微生物ではホルモンやその他の生理活性物質の合成を触媒する³⁾。植物性食品においては、LOX は脂質酸化を介してオフフレーバーを生成し、食品の品質を低下させる⁴⁾。

LOX の活性測定法は、反応初速度を計測する方法、いわゆるレート法として、反応生成物の脂肪酸ヒドロペルオキシドを経時的に測定する方法がある⁵⁾。この方法では、脂肪酸ヒドロペルオキシドが有する共役ジエン構造の紫外吸収を、分光光度計を利用して測定する。しかし、サンプル一つにつき2-3分の測定時間を要し、また毎回セルを良く洗浄する時間も必要である。もう一つのレート法として、酸素の消費を、酸素電極を用いて測定する方法がある⁵⁾。しかし、酸素電極は大きく、この方法では微量(数百マイクロリットル - 数ミリリットル)のサンプルを測定するのに不向きである。また、紫外吸光の測定と同様に測定に時間がかかり、容器と電極を毎回洗浄する必要があり、多数のサンプルを測定する場合は非常に煩雑な実験となる。

レート法は、酵素反応の初速度を正確に測定できるので、ミカエリス定数や最大反応速度の決定など、酵素反応速度論を解析する目的には優れている。一方、多検体を測定するには、エンドポイント法が便

利である。例えば、筆者らは、大豆の加工における LOX 活性の挙動を研究しているが、複数の大豆品種を比較する場合などには、サンプル数が数十から数百になる場合があり、レート法よりもエンドポイント法が便利である。エンドポイント法で、反応生成物の脂肪酸ヒドロペルオキシドを測定する方法としては、これまでにキシレノールオレンジ⁶⁾、テトラメチルペンチジン⁷⁾、10-*N*-メチルカルバモイルメチレンブルー⁸⁾、ベンゾイルロイコメチレンブルー⁹⁾を利用して、脂肪酸ヒドロペルオキシドを間接的に比色定量する方法が開発されてきた。キシレノールオレンジを利用する方法は、エステル型の基質の酸化物も測定できて便利であるが、有機溶媒（メタノール）の利用が必要である⁶⁾。テトラメチルペンチジンを用いる方法は、反応生成物の光と温度に対する不安定性が指摘されている⁹⁾。10-*N*-メチルカルバモイルメチレンブルーは、単体では販売されておらず合成が必要である⁸⁾。また、測定キットが市販されているが、非常に高価である。

よって、以上の試薬の中で、現在のところ、安価で入手しやすいベンゾイルロイコメチレンブルーを用いる方法が最も利用しやすく、測定に問題が少ない。この方法では、LOX 活性により生成した脂肪酸ヒドロペルオキシドが、ベンゾイルロイコメチレンブルー（無色）をメチレンブルー（青色）に変換する反応（LMB 発色反応）を利用する（Fig. 1）。生成したメチレンブルーの吸光度（660 nm）を測定することにより、ヒドロペルオキシドの生成量を間接的に定量する。この方法でウサギ網赤血球の LOX 活性を測定できることが示されているが⁹⁾、植物材料の LOX 活性測定への利用が可能かは調べられていない。また、LMB 発色反応に用いる緩衝液系について、最適な pH の条件と緩衝液の種類が検討されていない。さらに、この報告では、緩衝液としてリン酸緩衝液を用いているが、緩衝作用の領域を大きく超える pH で測定していて問題がある（リン酸の pKa は 7.1 であるが、pH 5.0 で測定している）。

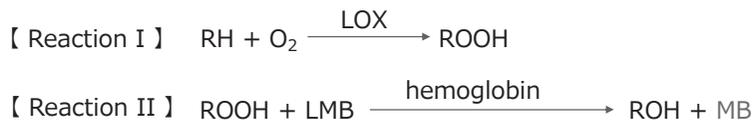


Fig. 1 Schematic representation of colorimetric determination of LOX activity using benzoyl leuco methylene blue.

LOX, lipoxygenase; RH, fatty acid having 1,4-*cis*, *cis*-pentadiene structure ; ROOH, fatty acid hydroperoxide; LMB, benzoyl leuco methylene blue; ROH, hydroxy fatty acid; MB, methylene blue

そこで、本研究では、*tert*-ブチルヒドロペルオキシドを利用して、LMB 発色反応の最適な pH 条件と緩衝液の種類を決定し、精製した大豆 LOX と大豆種子の抽出液を利用してアッセイ系を検証したので報告する。今回検討した活性測定法は、96 穴マイクロプレートを利用することができ、一度に多検体の LOX 活性を測定することが可能である。

2. 実験材料と方法

2-1 試薬

ベンゾイルロイコメチレンブルー（CAS No. 1249-97-4, 純度 96%, 製品コード：B0207）、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド（70% 水溶液、製品コード：B3153）は、東京化成工業株式会社より購入した。牛血液ヘモグロビン（製品コード：H2500-1G）、大豆 LOX（Type I-B, 製品コード：L7395-15MU）は、メルク株式会社より購入した。りん酸二水素カリウム（特級、製品コード：28721-55）、りん酸水素二カリウム（特級、製品コード：28727-95）、ジメチルホルムアミド（特級、製品コード：13016-94）、Triton X-100（生

化学用、製品コード:12969-25) は、ナカライテスク株式会社より購入した。りん酸 (特級、製品コード:167-02161)、グリシン (特級、製品コード:077-00735)、トリスヒドロキシアミノメタン (生化学用、製品コード:204-07885)、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid、製品コード:349-01623)、酢酸 (特級、製品コード:017-00256)、酢酸ナトリウム・無水 (特級、製品コード:192-01075)、リノール酸 (一級、製品コード:126-03612)、牛血清アルブミン FractionV (製品コード:013-17843)、エタノール (製品コード:057-00456) は、富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。

2-2 機器と器具

緩衝液の pH は、株式会社堀場アドバンスドテクノの電極スタンダード ToupH (9615S-10D) を同社製 LAQUA act D-72 に接続した pH メーターを利用して計測した。pH メーターは、同社製の pH 標準液 (pH2, pH4, pH7, pH9) を用いて、緩衝液の pH に近い pH 標準液を用いて、2点校正により校正した。吸光度の測定は、マイクロプレートリーダー (BioTek 社製、製品コード:800TS) を用いた。96 穴マイクロプレートは、IWAKI 社製 (製品コード:3881-096) を用いた。

2-3 LMB 発色試薬の調製

A 液として、50 mg のベンゾイルロイコメチレンブルーを 8 mL のジメチルホルムアミドに溶解し、エッペンドルフチューブに分注して -20℃ で保存した。B 液として、Table 1 に示した緩衝液 (92 mL, 濃度 0.1 M) に 1.4 g の Triton X-100 を加えて溶解し、4℃ で保存した。C 液として、50 mg のヘモグロビンを 1 mL の蒸留水に溶解し、エッペンドルフチューブに分注して -20℃ で保存した。アッセイを行う直前に、A 液と C 液を解凍し、B 液を室温に戻した。B 液 11.5 mL に A 液 100 μ L を加えて混合し、混合液が透明になったところで (B 液と A 液を混合すると白濁するが、数秒で透明になる)、さらに C 液を 13 μ L を加えて混合して LMB 発色試薬を調製した。

Table 1 Buffer reagents and pH used in this study

Buffer reagents	Phosphate	Acetate	MES-NaOH	Phosphate	Tris-HCl	Glycine-NaOH
pKa	2.1	4.8	6.2	7.1	8.2	9.6
	2					
	3					
		4				
		5	5			
pH		6	6	6		
			7	7	7	
				8	8	
					9	9
						10

The concentration of buffer solution was 0.1 M.

2-4 *tert*-ブチルヒドロペルオキシド標準液の調製と LMB 発色反応

Table 1 に示した緩衝液 9 mL に対して、エタノールを 1 mL 加え、希釈液を調整した。この希釈液を用いて、*tert*-ブチルヒドロペルオキシドを 0.5 - 16 mM の濃度に希釈した。マイクロプレートに各濃度の *tert*-ブチルヒドロペルオキシド希釈液を 50 μ L 加えた ($n = 3$)。これに、8 連ピペッターを用いて LMB 発色試薬を 150 μ L ずつ加え、5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 分後にマイクロプレートリーダーを用いて 660 nm の吸光度を測定した。測定は、20°C に設定した室内で行なった。

2-5 LMB 発色反応を利用した大豆 LOX と大豆種子の LOX 活性測定

5.5 mg の大豆 LOX を 550 μ L の蒸留水に溶かし、エッペンドルフチューブに分注して -20°C で保存した。2 種類の大豆品種 (とよまさり・すずさやか) 100 g を一晩吸水したのちに、水を 500 mL 加えてミキサーで磨砕した。磨砕液をさらしで漉し、少量をエッペンドルフチューブに移した。4°C、20,400 \times g の条件で 10 分間遠心し、上清をエッペンドルフチューブに分注して -20°C で保存した。大豆 LOX と大豆種子の抽出液のタンパク質濃度は、バイオラッド社製のブラッドフォードプロテインアッセイ (製品コード: 5000006JA) を用いて測定した。標準液は、牛血清アルブミン FractionV を蒸留水に溶解したものをを用いた。

酵素希釈液は、10mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)、10mM リン酸緩衝液 (pH 6.6)、または 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) に、牛血清アルブミン FractionV を終濃度 10 μ g/mL 加えたものを利用した。酵素希釈液を用いて、酵素原液を 1/10 から 1/7290 まで系列希釈した。それぞれの酵素希釈液 ($n = 4$) をマイクロプレートに 45 μ L 加え、さらに 8 連ピペッターを用いて、エタノール、またはリノール酸エタノール溶液 (40 mM) を 5 μ L 加えた (それぞれ $n = 2$)。5 分間室温で静置したのちに、LMB 発色試薬を 8 連ピペッターを用いて 150 μ L ずつ添加し、マイクロプレートリーダーを用いて 20 分後に 660 nm の吸光度を測定した。LMB 発色試薬の緩衝液は、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) を利用した。同時に標準液として、酵素希釈液 9 容に対しエタノールを 1 容混合した溶液を用いて *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを 0.5 - 16 mM の濃度に希釈した。これを 50 μ L ずつマイクロプレートに加え ($n = 2$)、同様に LMB 発色試薬を加えて吸光度を測定した。0.5 - 16 mM の吸光度から 0 mM の吸光度を差し引いたのち、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド濃度に対して吸光度をプロットし、2 次関数フィッティングにより 2 次式を求めた。次に、リノール酸と反応させたサンプルの吸光度から、エタノールと反応させたサンプルの吸光度を差し引き、この値を 2 次式の逆関数に代入して、酵素反応によって生じたリノール酸ヒドロペルオキシドの生成量を *tert*-ブチルヒドロペルオキシドの当量として計算した。酵素反応と測定は、20°C に設定した室内で行なった。比活性は、3 点の希釈データを線形解析して、1 次式の傾きから算出した。本論文における LOX 活性 IU は、1 分間に生成したヒドロペルオキシド当量 (μ mol) と定義した。

2-6 統計解析と作図

基本統計量、1 次および 2 次関数フィッティングと検量式は、マイクロソフトエクセル (Microsoft® Excel for Mac バージョン 16.30) を用いて計算した。

3. 結果

3-1 *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを利用した LMB 発色反応の解析

LMB 発色反応に最適な pH 条件と緩衝液を決定するために、Table 1 に示した緩衝液系で反応を行なった。Fig. 2 は、各条件における *tert*-ブチルヒドロペルオキシド濃度に対する 660 nm の吸光度をプロットしたものである (*tert*-ブチルヒドロペルオキシドの濃度 0 mM - 16 mM、反応 20 分後)。次に、Fig. 2 の *tert*-ブチルヒドロペルオキシド濃度が 4 mM のときの吸光度から、0 mM のときの吸光度を差し引

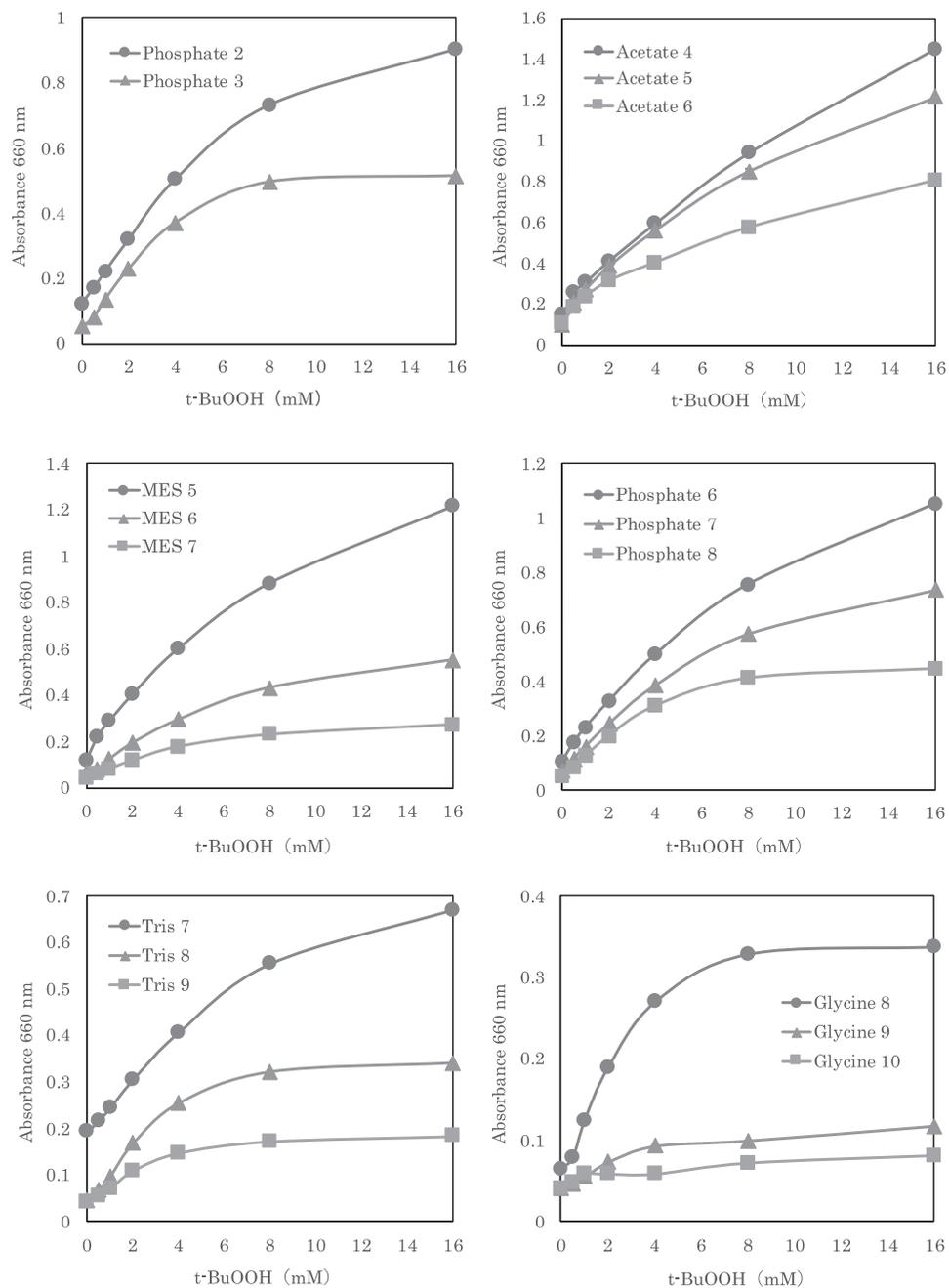


Fig. 2 Analysis of LMB colorimetric reaction with various buffer reagents and pH
Absorbance of 660 nm was measured with microplate reader after incubating *tert*-butyl hydroperoxide (0 – 16 mM) and LMB colorimetric reagent for 20 min. Data indicate the averages of three measurements. *t*-BuOOH, *tert*-butyl hydroperoxide.

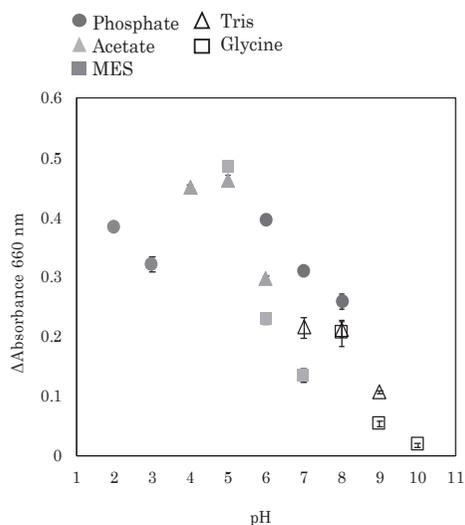


Fig. 3 Analysis of pH optimum of LMB colorimetric reaction

Absorbance of 660 nm at 4 mM minus that of 0 mM of Fig. 1 and pH of each buffer was plotted. Optimal pH was determined to be 5.0 and the acetate buffer was determined to be the best reagent among reagents tested, regarding pKa of acetic acid and buffering capacity. Data indicate the averages of three measurements. Error bars indicate SE.

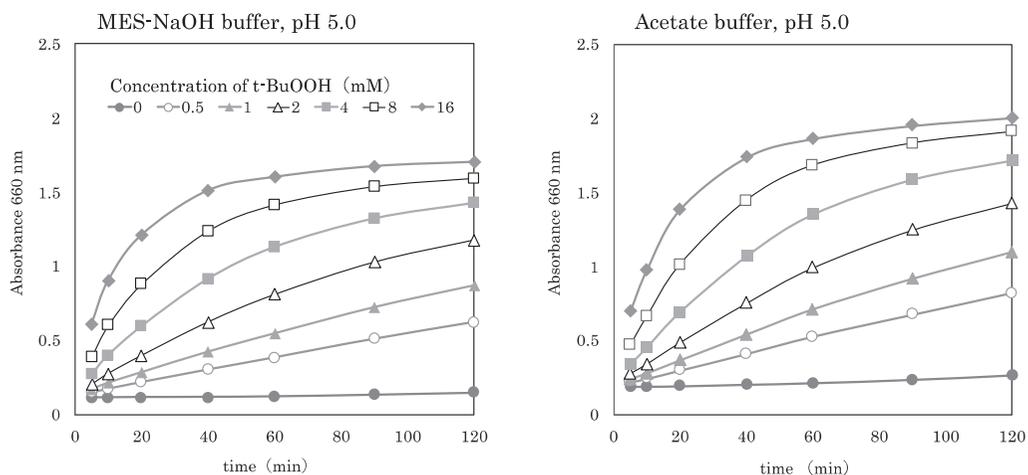


Fig. 4 Time course analysis of LMB colorimetric reaction

Absorbance of 660 nm was measured with microplate reader after incubating *tert*-butyl hydroperoxide and LMB colorimetric reagent in MES-NaOH buffer (pH 5.0) or acetate buffer (pH 5.0) at 5, 10, 20, 40, 60, 90, and 120 min. Data indicate the averages of three measurements.

いた値を計算し、緩衝液の pH に対してプロットした (Fig. 3)。Fig. 3 から、LMB 発色反応は、pH 4.0 - pH 5.0 の時に最も高いことがわかった。なお、Fig. 2 の酢酸緩衝液のデータでは、pH4.0 のカーブの方が pH 5.0 のカーブより上に位置しているが、濃度 0 のときのバックグラウンドを差し引くと、4mM のときは、pH 5.0 の方が高くなる。緩衝液の種類では、酢酸緩衝液 (pH4.0, pH5.0) と MES-NaOH 緩衝液 (pH 5.0) の成績が良かったが、緩衝液の緩衝能を考えると酢酸緩衝液 (pH 5.0) が最も優れている。また、試薬のコストを考えると、MES-NaOH 緩衝液よりも酢酸緩衝液の方が経済的である。以上の理由で、以降の実験では、LMB 発色反応の緩衝液は酢酸緩衝液 (pH 5.0) を利用することにした。LMB 発色反応の時間は、感度と操作性を考慮して 20 分とした (Fig. 4)。感度については、既報⁹⁾ と比べると約 14% であった。この理由は今のところ不明である。

3-2 LMB 発色反応を利用した大豆 LOX と大豆種子の LOX 活性測定

精製した大豆 LOX と、大豆種子の抽出液を用いて、LOX 活性を測定した。大豆種子には、L-1, L-2, L-3 の 3 種類の LOX アイソザイムがあるが、至適 pH がそれぞれ、6.0, 6.6, 9.0 である³⁾。そこで、pH = 6.0, 6.6, 9.0 の条件で、反応を行なった。Fig. 5 は、精製した大豆 LOX を用いて酵素活性を測定した結果である。比活性は、8.10 U/mg (pH 6.0)、8.46 U/mg (pH 6.6)、45.7 U/mg (pH 9.0) であった。

次に、大豆種子の抽出液を用いて、LOX 活性を測定した。大豆の品種は、とよまさり (普通大豆) とすずさやか (LOX レス大豆) を用いた。すずさやかは、大豆の青臭みを低減する目的で育種された大豆種子の 3 種類の LOX アイソザイム L-1, L-2, L-3 を全て欠失する品種である^{10,11)}。大豆種子を一晩吸水させ、

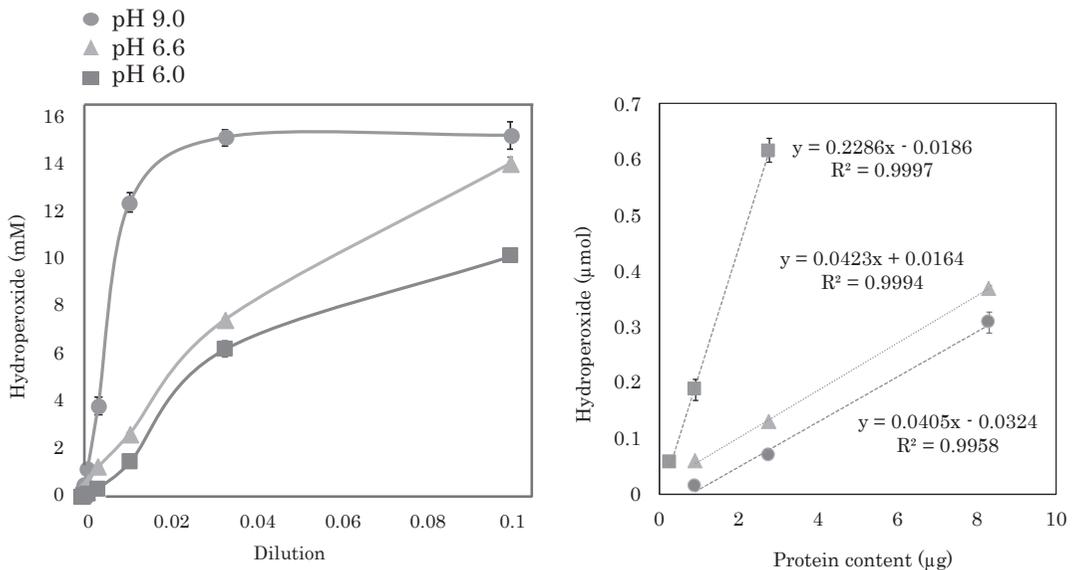


Fig. 5 Analysis of enzymatic kinetics of purified soybean LOX

Purified soybean LOX (Type I-B, Sigma-Aldrich code: L7395-15MU) was dissolved in H₂O at 10 mg/mL and diluted with 10 mM phosphate buffer, 10 μg/mL bovine serum albumin with indicated pH. Enzyme solution (45 μL) was incubated with 5 μL of 40 mM linoleic acid (ethanol solution) for 5 min. Concentration of hydroperoxide was determined by LMB colorimetric reaction with standard solution of *tert*-butyl hydroperoxide (left panel). Specific activity was determined with three dilution points (right panel). Specific activities were determined with slope of linear approximation. Data indicate average ± SE (n = 2).

水で磨砕したサンプルを遠心分離した上清を希釈して酵素活性を測定した (Fig. 6)。すずさやか (LOXレス大豆) では、LOX 活性が検出されなかった。とよまさり (普通大豆) の比活性は、167 U/mg (pH 6.0)、364 U/mg (pH 6.6)、405 U/mg (pH 9.0) であった。

このように、今回検討した活性測定法は、植物材料の粗抽出液にも問題なく適用できることが分かった。しかし、抽出液の濃度が高い場合は、濁りが生じる (Fig. 7)。その理由は今のところ不明であるが、活性の低い材料を測定する場合には、注意が必要である。

4. 考察

リポキシゲナーゼ (LOX) は 1,4-*cis,cis*-ペンタジエン構造を有する脂肪酸に酸素分子を付加して脂肪酸ヒドロペルオキシドを生成する酵素であり、動物・植物・微生物の生理活性物質の合成を触媒する。また、植物性食品においては、脂質酸化を介してオフフレーバーを生成し、食品の品質を低下させる。筆者らは、大豆の加工における LOX 活性の挙動を研究している中で、多数の検体の LOX 活性を測定する必要性が生じ、今回ベンゾイルロイコメチレンブルーを利用したエンドポイント法を検討した。検討の結果、高濃度の粗抽出液では濁りが生じて測定に干渉が生じる可能性があるが、希釈をすれば実用的には問題なく利用できることが分かった。また、精製した LOX では高濃度でも濁度を生じなかったため、粗抽出液に含まれる脂質と糖質が濁度に関与している可能性がある。簡易精製により、脂質と糖質を除くことができれば、より活性の低い材料を用いても活性を測定できる可能性がある。

今回検討した活性測定法では、酵素反応生成物の生成量を *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを利用してヒドロペルオキシド当量として求めた。植物の酵素の場合、実際の反応生成物は主にリノール酸ヒドロペルオキシドとリノレン酸ヒドロペルオキシドであるが、これらのヒドロペルオキシドと LMB 発色試薬との反応の解析については、今後の課題である。既報においては、13(S)-リノール酸ヒドロペルオキシドと *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを比較解析したデータがあり、13(S)-リノール酸ヒドロペルオキシドの方が、約 50 倍高いことが報告されている。一方、LMB 発色試薬に用いる緩衝液の問題については、今回の研究で解決することができた。至適 pH については、既報⁹⁾と同じ結果となったが、緩衝液としてはリン酸緩衝液を用いる方法よりも、酢酸緩衝液を用いる方法が優れていることが示された。LMB 発色試薬と *tert*-ブチルヒドロペルオキシドの反応に関して、本研究のデータと既報⁹⁾を比べると約 14% であった。しかし、LOX 活性を測定する上で実用上の問題はなかった。

今回検討した方法の感度と、レート法の感度との比較は、今後の課題である。レート法は、酵素反応の初速度を正確に測定できるので、ミカエリス定数や最大反応速度の決定など、酵素反応速度論を解析する目的には優れている。しかし、多数の検体を測定する必要がある場合で、サンプル間の活性を相対的に比較する場合は、エンドポイント法が実用的で優れている。今後は、今回検討した活性測定法を用いて、食品の加工保存における LOX 活性の挙動を解析していく予定である。

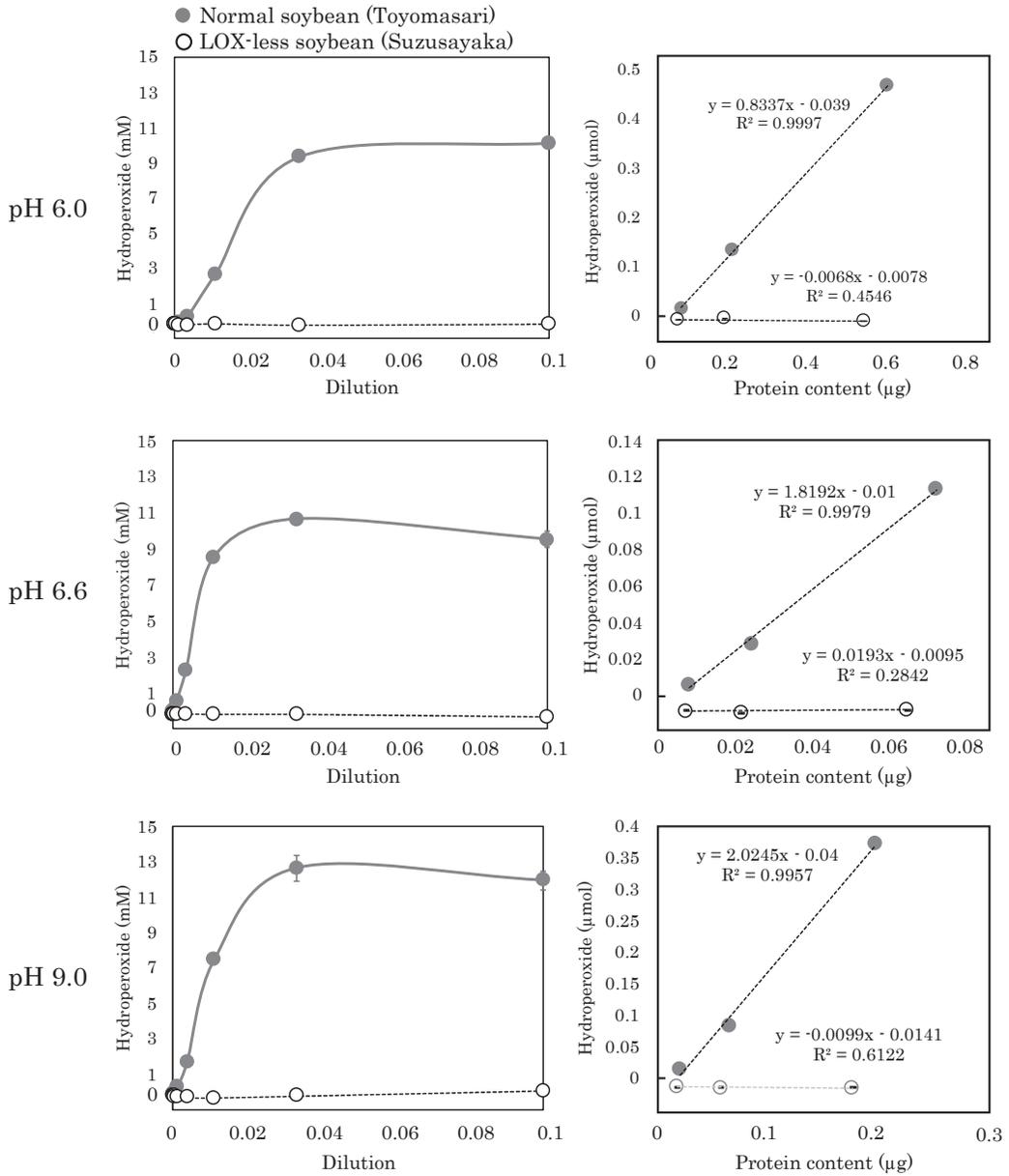


Fig. 6 Analysis of enzymatic kinetics of crude extract of soybean seeds

Soybean seeds (variety Toyomasari, normal soybean; variety Suzusayaka, LOX-less soybean) were soaked overnight and homogenized with water. Homogenates were centrifuged and supernatants were used as crude extract. Extracts were diluted with 10 mM phosphate buffer, 10 μg/mL bovine serum albumin with indicated pH. Enzyme solution (45 μL) was incubated with 5 μL of 40 mM linoleic acid (ethanol solution) for 5 min. Concentration of hydroperoxide was determined by LMB colorimetric reaction with standard solution of *tert*-butyl hydroperoxide (left panel). Specific activity was determined with three dilution points (right panel). Data indicate average ± SE (n = 2).

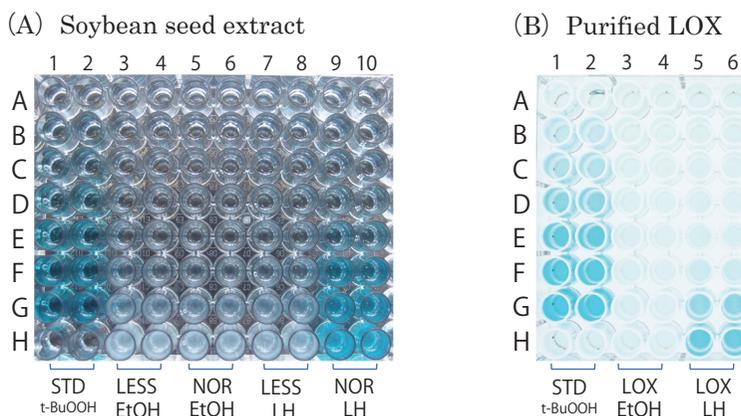


Fig. 7 Photographs of microplate of after enzymatic reaction and LMB colorimetric reaction

(A) Soybean seed extract (LOX-less soybean, LESS; normal soybean, NOR) was diluted with 10 mM phosphate buffer (6.6), 10 μ g/mL bovine serum albumin from 1/10 (row B) to 1/7290 (row H), and incubated with ethanol (EtOH) or linoleic acid dissolved in ethanol at 40 mM (LH) for 5 min. After enzymatic reaction, LMB colorimetric reagent (pH 5.0) was added and incubated for 20 min. Turbidity were observed at row G (1/30 dilution) and H (1/10 dilution).

(B) Purified soybean LOX (Type I-B, Sigma-Aldrich code: L7395-15MU, 10 mg/mL) was diluted with 10 mM phosphate buffer (6.0), 10 μ g/mL bovine serum albumin from 1/10 (row B) to 1/7290 (row H), and enzymatic reaction and LMB colorimetric reaction were done similarly as (A). After the reaction, a photograph was taken through transmitted light. Turbidity was not observed with purified LOX.

(Both A and B) Column 1 and 2 are standards (STD) of *tert*-butyl hydroperoxide; 0.5 mM (row B) to 16mM (row G). H1 and H2, LMB colorimetric reagent (pH 5.0) only.

利益相反

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

謝辞

本研究を進める上で、東京家政学院大学の上藺薫先生に多大なサポートをいただきました。深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Newcomer, M. E. and Brash, A. R. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Sci.* 24: 298-309 (2015)
- 2) Horn, T. et al., Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog. Lipid Res.* 57: 13-39 (2015)
- 3) Siedow, J.N., Plant lipoxygenase: Structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145-188 (1991)
- 4) 黒田久夫「植物性食品のおいしさと脂質酸化酵素」『東京家政学院大学紀要』第61号 1-17頁, 2021年
- 5) 高村仁知, 的場輝佳「リポキシゲナーゼとシクロオキシゲナーゼの測定1) 植物」*化学と生物* 30:813-816 (1992)
- 6) 黒田久夫「穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法」特許第3715839号 登録日平成17年9月2日 (2005)
- 7) Anthon G.E. and Barrett D. M., Colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity. *J Agric Food Chem.* 49:32-37 (2001)

- 8) Yagi, K., et al. Use of a new methylene blue derivative for determination of lipid peroxides in foods. *Biochem. Int.* 12:367-371. (1986)
- 9) Auerbach, B. J. et al., A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid. *Anal. Biochem.* 201:375-380. (1992)
- 10) 湯本節三ら「東北地域向きリポキシゲナーゼ欠失ダイズ新品種「すずさやか」の育成」東北農業研究センター研究報告 105:35-48 (2006)
- 11) 古田収, 羽鹿牧太「リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の育成とその加工利用について」*日本醸造協会誌* 92: 573-578 (1997)

(受付 2022.3.9 受理 2022.6.30)

