27Q-am005

改良 Fe^{3+}- キシレノールオレンジ法（FOX 法）のリポキシゲナーゼアッセイへの適用

○赤井　かおり[1], 佐野　真純[1], 盛重　純一[1], 徳村　彰[1], 地阪　光生[2], 柴田　瑩[3], 福澤　健治[3]（[1]徳島大薬, [2]島根大生物資源, [3]安田女大薬）

ヒドロペルオキシド量を測定する FOX 法の原理は、酸性下でヒドロペルオキシドを過剰の Fe^{2+}と反応させて生成する Fe^{3+}量を、キシレノールオレンジ(XO)錯体（Fe^{3+}/XO）量から求めるものである。著者らは最近、560nm に吸収極大を持つ Fe^{3+}/XO が、ホスファチジルコリン膜と複合体を形成して 610 nm により強い極大吸収を持つことを見出し、これを応用した感度の高い改良 FOX 法を報告した（Anal.Biochem.359,18-25,2006）。リポキシゲナーゼ(LOX)やその代謝産物は疾患の進行の様々な過程に係わっていることが報告されており、その簡便な測定法が求められている。そこで著者らは、動物由来の LOX としてヒト 15-リポキシゲナーゼ-2(15-LOX-2)を、また植物由来の LOX として大豆リポキシゲナーゼ(SLOX)を選び、そのアッセイに改良 FOX 法の適用を試みた。15-LOX-2 の場合、アラキドン酸を基質として 237 nm の紫外部吸収強度から求めた 15-*S*-hydroperoxyeicosa-5,8,10,14-tetraenoic acids (15-HPETE)の産生量は、改良 FOX 法による 610 nm の吸光度を測定して得られる値とよく一致し、その経時変化も両法はよく相関した。次に、SLOX について、フリー型脂肪酸のリノール酸（LA）とエステル型脂肪酸で構成される卵黄 PC（EYPC）を基質に用いて両者の反応性を比較検討した。その結果、①LA は速やかに酸化されるが、EYPC の酸化は非常に緩やかに進行すること、②メタノールや適量の界面活性剤 TritonX-100 を添加すると、LA の酸化は著しく低下する（酵素の構造変化）が EYPC の酸化は著しく増大する（膜構造が乱れた状態）ことなどが明らかになった。また、SLOX に対する eicosa-5,8,10,14-tetraenoic acid (ETA)の阻害効果を検討し、本法が新しい LOX 阻害薬探索にも有用であることを示した（J.Nutr.Sci.Vitamin.55, 2009 印刷中）。