

ポリエチレングリコール修飾グルコース酸化酵素／ フェロセン固定化カーボンペースト電極によるグルコース測定

奥田 篤, 水谷 文雄*, 矢吹 聡一*

Glucose — sensing Electrode Based on Carbon Paste Containing Polyethylene Glycol —
attached Glucose Oxidase and Ferrocene .

Atsushi OKUDA, Fumio MIZUTANI, So-ichi YABUKI

抄 録

ポリエチレングリコールで修飾したグルコース酸化酵素 (GOD) と 1, 1'-ジメチルフェロセンとを練り込んだカーボンペーストを利用してグルコース応答性電極を構成した。ポリエチレングリコールで修飾した酵素を電極作製に利用すると、同一重量の未修飾な酵素を用いた場合に比べて、グルコースに対する電流応答が著しく (3 倍以上) 大きくなった。修飾により酵素が、n-ヘキサン等の有機溶媒と水の両者に可溶となり、その結果として疎水性のカーボンペースト／水溶液界面でより高い活性を示すことが応答増幅の原因と考えられる。修飾 GOD を利用した電極の応答時間は約 30 秒であり、0.1 ~ 50mM の濃度範囲のグルコースを測定できた。

1. 緒 言

酵素・電極間の電子授受を仲介する電子メディエーターを酵素と一緒に固定化して構成される酵素電極が活発な研究課題と成っている¹⁻³⁾。最近、このタイプの酵素電極の作製方法として、酵素とメディエーターの両者を練り込んだカーボンペーストを用いて電極を構成する方法が発表された⁴⁻⁶⁾。この酵素／メディエーター修飾カーボンペースト電極は作製方法が簡単であることに加えて、酵素・メディエーター・センシング部位の三者が極めて近接していることから、電極応答が速い、メディエーターの効率が高い等の利点が期待される。しかしながら、疎水性のカーボンペースト上で親水性の酵素が十分に活性を発揮し得るかについて疑問が残る。一方、酵素 (リパーゼ・カタラーゼ等) をポリエチレングリコール (P

EG) で修飾した場合、酵素は水のほか多くの有機溶媒 (ベンゼン・アセトン・エタノール等) に可溶となり、これらの溶媒中で活性を発揮することが報告されている⁷⁻⁹⁾。このような PEG 修飾酵素を電極作製に利用すると、修飾により酵素がカーボンペースト上でより高い活性を示し、その結果として電極応答の増大などの効果が現われると期待される。

本報では、GOD と 1, 1'-ジメチルフェロセンとを練り込んだカーボンペーストを用いて構成されるグルコース応答性電極に於いて、未修飾な酵素を利用した場合と PEG で修飾した酵素を用いた場合の比較を行なった。この結果、修飾酵素を用いた電極では、未修飾な酵素を用いた電極に比べて、グルコースの添加に対する電流応答が期待したように増大され、かつ測定可能なグルコース濃度範囲も拡大されることが見いだされた。得られた知見について報告する。

* 通商産業省工業技術院繊維高分子材料研究所

2. 実 験

2.1 酵素及び試薬

GOD (EC1.1.3.4, *Aspergillus sp.* 由来, $100\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) 及びペルオキシダーゼ (EC1.11.1.7, Horseradish 由来, $110\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) は東洋紡から購入した。塩化シアヌルで活性化した PEG (活性化 PEG; 平均分子量 $5,000$)¹⁰⁾ はシグマ社から, 1, 1'-ジメチルフェロセンはアルドリッチ社から入手したものである。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。脱イオン後, 2 回蒸留した水をすべての実験に使用した。

2.2 PEG による GOD の修飾

0.1M ホウ酸-水酸化カリウム緩衝液 (pH10, 37°C) 2ml 中に GOD14mg 及び活性化 PEG140mg を溶解させ, 2 時間放置して, GOD のリジン残基のアミノ基と塩化シアヌルとの反応を行なわせた。その後, 酢酸 (1M) を滴下して pH を 6 前後にまで低下させることにより反応を停止させた。液温を 0°C とし, 以下の操作で未反応の活性化 PEG を除いた。即ち, 限外濾過膜 (ミリポア, モルカット II, 分画分子量 30,000) を用いて, 残液量が 1ml 以下になるまで濾過を行なった。次いで 0.05M 重炭酸アンモニウム 1ml を加え, 残液量が 1ml 以下になるまで限外濾過を続ける操作を 3 回繰り返した。その後, 凍結乾燥を行なって淡黄色粉末 (10mg) を得た。

修飾及び未修飾 GOD の分子量を推定するために SDS-ポリアクリルアミド (4-20%) ゲル電気泳動を行なった。分子量マーカータンパク質にはミオグロビン・カルボニックアンヒドラーゼ・アルドラーゼ・ウシ血清アルブミン・ β -ガラクトシダーゼ及びミオシンを用いた。分子量はそれぞれ 17,000・30,000・42,000・66,000・116,000 及び 200,000 である。

水溶液中及びカーボンペースト電極へ固定化した状態での修飾及び未修飾 GOD の酵素活性は, ペルオキシダーゼ/ジアニシジンを発色系として用いる方法¹¹⁾ に従って測定した。また, 修飾 GOD 中の GOD 含量は, 酵素中のフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 分子の 450nm に対する吸光度から見積った。島津製作所製 160A 型分光光度計をこれらの測定に利用した。

2.3 酵素電極の構成及び測定系

酵素とメディエーターとを固定化したカーボンペースト電極は以下のようにして作製した。修飾または未修飾の GOD, 1, 1'-ジメチルフェロセン及びカーボンペースト (BAS 社, CP-0, グラファイト粉末とパラフィンとの混合物) を 10:10:80 の重量比で 30 分以上攪拌して混合し, カーボンペースト電極 (BAS 社, model 11-2010) のスロット (深さ約 4mm, 電極表面積 3.2mm^2) 中に詰め込んで酵素電極とした。

作製した酵素電極を作用極, 銀/塩化銀電極 (BAS 社, model 11-2020) を参照極, 白金線を対極とし, これらを円筒型ガラスセル内の試験液 (20ml) 中に挿入して測定を行なった。試験液には 0.1M 酢酸-酢酸カリウム緩衝液 (pH5.0) を用い, 液中にアルゴンを常時通気して溶存酸素を除いている。試験液は磁気攪拌子で攪拌 (約 500rpm) し, $30.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ に液温を保った。使用時以外は酵素電極を酢酸-酢酸カリウム緩衝液中に浸し, 4°C で保存した。なお, 本報に記載する電位はすべて銀/塩化銀電極に対する値である。

3. 結果及び考察

3.1 PEG 修飾 GOD の特性

PEG 修飾 GOD 及び未修飾 GOD の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。未修飾 GOD の場合では, ゲル上に分子量約 7 万に相当する単一バンドが明瞭に認められている。GOD (分子量約 15 万) は同一分子量のサブユニット 2 個から構成されており, この単一バンドはサブユニット (分子量約 7.5 万) に対応していると考えられる。一方, 修飾 GOD では分子量約 7 万以上の連続的なバンドが与えられている。この連続的なバンド形成の原因は, GOD 分子に結合した活性化 PEG の分子数に分布があること, 及び酵素分子との結合に関与する活性化 PEG 中の塩素が 1 分子当たり 2 個存在しているために, 酵素分子間に若干の架橋が起こっていることの 2 点と考えられる。いずれにせよ, 図 1 は GOD と活性化 PEG との反応により, より高分子量の修飾 GOD が生成したことを明示している。得られた修飾酵素は水はもとより何種類かの有機溶媒に可溶であった。例えば, 修飾酵素約 1mg をベンゼンあるいは n-ヘキサン 1ml 中に添加すると, 一瞬のうちに溶解することが観察された。

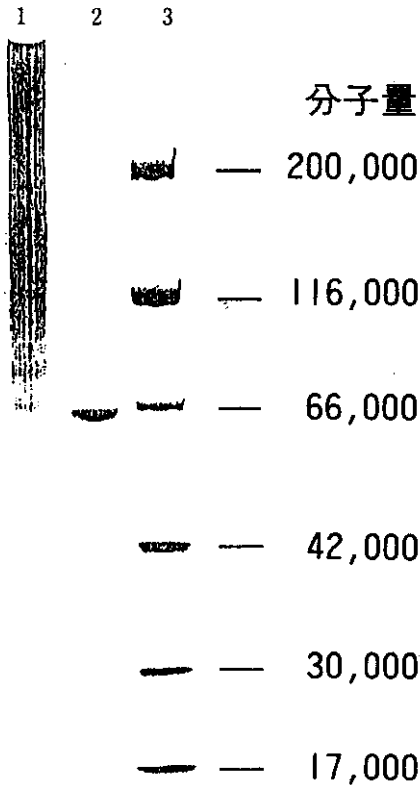


図1 修飾及び未修飾GODのSDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動像

1:修飾GOD; 2:未修飾GOD; 3:マーカートンパク質

PEG 修飾 GOD 及び 未修飾 GOD 溶液の 450nm に対する吸光度測定の結果から、修飾酵素中の FAD 濃度は未修飾酵素中の FAD 濃度の約半分であることが示された。修飾操作による GOD からの FAD の脱落がないと仮定すると、生成物はその重量の半分量の GOD 分子と、残り半分量の結合 PEG (及び塩などの不純物) からなると考えられる。PEG 修飾 GOD 及び未修飾 GOD の、酢酸-酢酸カリウム緩衝液中に於ける 30℃での活性測定から、それぞれの酵素の比活性は 15 及び 105U・mg⁻¹ と見積られた。PEG による修飾に伴い、酵素活性は 1/7 (修飾反応生成物中の GOD 含量が 1/2 である寄与を補正しても 1/3.5) に低下している。

一方、カーボンペースト中に練り込んだ状態では、未修飾 GOD に比べて修飾 GOD は著しく高い活性を示した。修飾または未修飾 GOD とカーボンペーストを重量比 10:90 で混合し、カーボンペースト電極中に詰め込んだ状態で活性測定を行なうと、修飾 GOD を用いた電極では約 0.1U・cm⁻² の値を示したのに対し、未修飾 GOD

D を利用した電極の活性はこの数分の 1 であった。n-ヘキサン・ベンゼンへの溶解性などから推測される修飾酵素のカーボンペーストとの親和性が電極上での高活性の原因と考えられる。

3.2 酵素電極の特性

修飾 GOD または未修飾 GOD と 1, 1'-ジメチルフェロセンとを固定化したカーボンペーストを利用して作製した電極 (電極 A 及び B) の、作製直後に於ける 25mM グルコース添加に対する応答を図 2 (それぞれ曲線 A 及び B) に示した。電極電位はいずれも 0.4V とした。緩衝溶液中で測定した電極 A 及び B のサイクリックボルタモグラムにおいて、0.15V 付近から 1, 1'-ジメチルフェロセンの酸化に基づくアノード電流の起ち上がりが観察され、0.4V 付近にブロードなピークが認められたことから、メディエーターの酸化が十分に進む電位として上記の値を選択した。いずれの電極においてもグルコース添加の直後からアノード電流は増加し、1 分以内に定常値に到達している。両者の応答を比較すると、電極 B に比べて電極 A は 3 倍以上の電流増加を与えている。すなわち、GOD を活性化 PEG で修飾したことに起因するカーボンペースト電極上での酵素活性の増加が、グルコース応答の増大に寄与していることが明らかである。

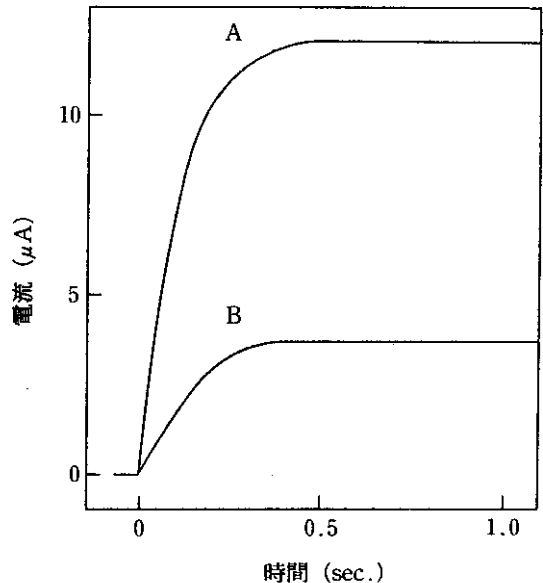


図2 酵素電極の電流応答/時間曲線

A:電極A (修飾GOD利用); B:電極B (未修飾GOD利用) いずれの応答も時間0で濃度25mMとなるようにグルコースを添加している。

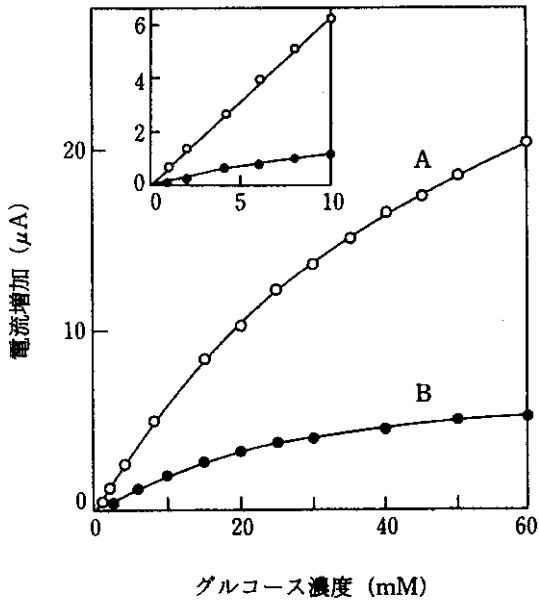


図3 酵素電極のグルコース濃度に対する校正曲線

A: 電極A; B: 電極B 挿入した図は低濃度領域での校正曲線の拡大図である。

これら2種類の電極のグルコース濃度に対する校正曲線を図3に示す。電極Bにおける電極応答/グルコース濃度の直線性成立範囲は0.3 - 5mMであり(検出下限濃度0.3mMでS/N比, 5), 高濃度領域での校正曲線から明らかなように, 濃度40mM以上では, グルコース濃度の増加に対する電流応答の増加はほとんど認められない。一方, 電極Aにおける検出可能なグルコースの下限濃度は0.1mM (S/N比, 5)であり, 0.1mMから約10mMまでの濃度範囲で電極応答/グルコース濃度の間に直線関係が成立していた。10mM以上の濃度範囲では応答/濃度の関係はサブリニアールとなるが, グルコース濃度の増加に伴う応答の増加は濃度50mMを越えても明瞭に観察された。以上の結果は, グルコース測定のダイナミックレンジの拡大(特に高濃度のグルコース測定)に, 活性化PEG修飾酵素の利用が好適なことを明示している。

電極Aに関して, その特性をいくつか評価した結果について以下に述べる。まず, 試験液中の溶存酸素が電極応答に及ぼす干渉を調べた。アルゴンに換わって空気を通気しながらグルコース応答を測定すると, 25mMグルコース添加に対する応答が約30%減少した。メディエーター/酵素比を検討するなどして, 溶存酸素の干渉による寄与を低下させる必要がある。10mMグルコースの添

加を10回繰り返した場合, 電極Aにおける電流応答の相対標準偏差は2.5%であった。電極Aを1日20回以上のグルコース測定に供し, これを連日繰り返した結果, 8日目には電極応答が作製直後の応答の約80%に減少していた。

以上のように, GOD/メディエーターのカップルをカーボンペースト中に練り込んで構成されるグルコース応答性電極において, GODを活性化PEGで修飾することにより, 電極応答の増大及びダイナミックレンジの拡大が実現できた。しかし, 未修飾な酵素に比べて修飾GODが安定にカーボンペースト中へ固定化され, より長寿命の酵素電極が構成できると期待されたが, この点に関しては有意な結果は認められなかった。今後, 修飾剤・修飾方法などについて一層の検討を行い, より高性能な酵素電極の構成を行なう予定である。

参考文献

- 1) M. F. Cardosi and A. P. F. Turner, in A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson (Eds.), *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1987, p.257.
- 2) F. Mizutani and M. Asai in D. L. Wise (Ed.), *Bioinstrumentation: Research, Developments and Applications*, Butterworthes, Boston, 1990, p.317.
- 3) S. P. Hendry, I. J. Higgins and J. V. Bannister, *J. Biotechnol.*, 15, 227 (1980).
- 4) L. Gorton, H. I. Karan, P. D. Hale, T. Inagaki, Y. Okamoto, and T. A. Skotheim, *Anal. Chim. Acta*, 228, 23 (1990).
- 5) P. D. Hale, T. Inagaki, H. S. Lee, H. I. Karan, Y. Okamoto, and T. A. Skotheim, *Anal. Chim. Acta*, 228, 31 (1990).
- 6) J. Wang, L.-H. Wu, Z. Lu, R. Li and J. Sanchez, *Anal. Chim. Acta*, 228, 251 (1990).
- 7) Y. Inada, H. Nishimura, K. Takahashi, T. Yoshimoto, R. A. Saha and Y. Saito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 845 (1984).
- 8) K. Takahashi, A. Ajima, T. Yoshimoto and Y. Inada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125, 761 (1984).

- 9) K. Takahashi, A. Ajima, T. Yoshimoto, M. Okada, A. Matsumoto, Y. Tamura and Y. Inada, *J. Org. Chem.*, 50, 3414 (1985).
- 10) A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk and F. F. Davis, *J. Biol. Chem.*, 256, 3578 (1977).
- 11) H. U. Bergmeyer, K. Gawehn and M. Grassl, in H. U. Bergmeyer (Ed.), *Method of Enzymatic Analysis*, Vol. 1, Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, 1974, p.457
- 12) F. Mizutani, S. Yabuki, A. Okuda and T. Katsura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 2849 (1991).