

NADPH 酸化酵素と G-6-P 脱水素酵素とを利用した酵素電極

奥田 篤, 水谷 文雄*, 矢吹 聡一*

Amperometric enzyme electrode with the use of NADPH oxidase and G-6-P dehydrogenase .

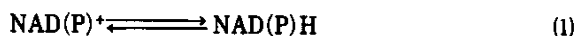
Atsushi OKUDA, Fumio MIZUTANI, So-ichi YABUKI

抄 録

NADPH酸化酵素固定化膜を利用してNADPH応答性の酵素電極を構成した。この酵素電極は応答時間が約3分であり、5 μ Mから3mMの濃度範囲のNADPHを測定できた。さらに、NADPH酸化酵素/グルコース6リン酸(G-6-P)脱水素酵素固定化膜を利用して酵素電極を構成した。この酵素電極がNADP⁺の存在下、5 μ Mから2.5mMの濃度範囲のG-6-Pを定量できることを明らかにした。また、G-6-P存在下ではNADP⁺/NADPH酸化還元の循環的な反応によりNADPHの高感度測定が行ない得た。その際の検出下限濃度は0.1 μ Mに達しており、NADPH酸化酵素のみを利用した電極に比べてNADPHに対する応答が50倍程度に増幅されていた。

1. 緒言

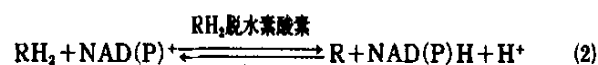
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD,還元型はNADH)及びそのリン酸塩(NADP,還元型はNADPH)は、多くの酸化還元酵素による基質還元に関与する補酵素であり(反応式(2)),その測定はこれら酵素の活性や基質濃度の定量に広く利用されている。一般にNADH・NADPHの測定は、



の反応に伴う荷電の変化が紫外吸収スペクトルの変化に著明に反映している事を利用して、分光法により行なわれているが¹⁾、より簡便な測定法が求められている。従って、NADH・NADPH測定用のセンサーの開発は興味深い課題である。

NADHに関しては活発に研究されており、電気化学的あるいは酵素的にNADHを測定するセンサーの開発が報告されている^{2),3)}。一方、NADPHについてはその様な開発例が見られない。

本報では、反応式(3)に示される様に、酸素によるNADPHの酸化反応を触媒するNADPH酸化酵素⁴⁾を用いて、酸素電極と組み合わせてNADPH測定用の酵素電極を構成し、NADPHの定量を試みた。その結果、構成した酵素電極を用いてNADPHの定量が行ない得ることを明らかにした。



RH₂, R:脱水素酵素基質とその酸化型

2酵素を同時に固定化した酵素固定化膜を用いることにより、2つの酵素反応を組み合わせて利用する酵素電極が活発な研究課題となっている^{5),6)}。このタイプの酵素電極として、NADH依存の脱水素酵素/NADH酸化酵素の2酵素系と酸素電極から構成した酵素電極が脱水素酵素基質の測定に利用し得ることが報告されている^{7),8)}。従って、NADPH酸化酵素とNADPH依存の脱水素酵素とを組み合わせた2酵素系と酸素電極から酵素電極を構成した場合には、2酵素の連続的な反応、すなわちNADPH生成を伴う脱水素酵素基質の酸化(反応式(2))と酸素の存在下NADPH酸化酵素によるNADPHの酸化(反応式(3))により脱水素酵素基質の定量が可能であると考えられる。

このような酵素電極は、2酵素の連続的な反応により脱水素酵素基質の定量が可能であるだけでなく、脱水素酵素基質の存在下NADPH/NADP⁺酸化還元の循環的な反応によりNADPHの増幅測定が行ない得ると期待される^{3),9)}。

本報では、グルコース6リン酸(G-6-P)脱水素酵素/NADPH酸化酵素の2酵素系を用い、酸素電極と組み合わせて酵素電極を構成した。得られた酵素電極を用いて、連続的な酵素反応によるG-6-Pの測定および循環的な酵素反応に

(* 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所)

よる NADPH の増幅測定が行ない得ることを明らかにした。得られた知見について報告する。

2. 実験

2.1 酵素及び試薬

NADPH 酸化酵素 (*Bacillus megaterium* 由来, 28U · mg⁻¹, 東洋醸造), G-6-P 脱水素酵素 (EC 1.1.1.49, *Leuconostoc mesenteroides* 由来, 700U · mg⁻¹, GradeIII, 東洋紡) 及びグルタミン酸脱水素酵素 (EC 1.4.1.4, *Proteus sp.* 由来, 13700U · mg⁻¹, GradeII, 東洋紡) を実験に用いた。NADP 及び NADPH は (株) 興人より, フラビンモノヌクレオチド (FMN) はナカライテスク社より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 酵素固定化膜の調整

NADPH 酸化酵素 · FMN · 光架橋性ポリビニルアルコール (PVA-SbQ)¹⁰⁾ 水溶液 (8w/v%) を 1:1:20 の重量比で混合した溶液をテフロン板上に展開し, 暗所 (4℃) で 16 時間自然に乾燥した。乾燥した膜をテフロン板上より剥離し, 両面にキセノンアークランプ光 (30mW · Cm⁻²) を 5 分間照射して PVA 担体を光架橋化させることにより, 酵素を PVA マトリックス中に包括固定して, 酵素固定化膜 I を調整した^{9,10)}。

同様の方法で, NADPH 酸化酵素 · G-6-P 脱水素酵素 · FMN 及び PVA-SbQ 水溶液を 1:1:1:20 の重量比で混合した溶液から酵素固定化膜 II を得た。作製した酵素固定化膜の膜厚は, いずれの膜も約 50 μm であった。

2.3 酵素電極の構成及び測定系

酵素固定化膜 I 及び II (いずれも直径 5mm) を, それぞれ Clark 型酸素電極 (Able 社, DG-5G, 電池式, 白金陰極径 3mm) のテフロン隔膜上に, ポリエステルメッシュ (直径 2cm) と O リングを用いて固定して酵素電極 I 及び II を構成した。

構成した酵素電極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。試験液は 0.2mM FMN を含む緩衝液とし, 空気を飽和して用いた。必要に応じて試験液中に所定の濃度の NADP 及び G-6-P を添加した。使用した緩衝液は, 0.1M 酢酸-酢酸カリウム緩衝液 (pH3.9~5.6), 0.1M リン酸緩衝液 (pH5.6~7.7), 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5~8.5) 及び 0.1M グリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH8.7~9.1) である。試験液は磁気攪拌子で攪拌 (約 500 rpm) し, 30.0±0.5℃ に液温を保った。FMN は NADPH 酸化酵素の活性化剤として試験液中に添加した。酵素電極の出力電流は電流計 (北斗電工, HM-102) で計測した。使用時以外は酵素電極を 0.2mM FMN を含む 0.1M リン酸緩衝液

(pH7.0) 中に浸し, 4℃ で保存した。

3. 結果および考察

3.1 酵素電極 I の特性

酵素電極 I の 0.5mM NADPH 添加に対する応答を図 1 に示した。試験液 (pH7.0, リン酸緩衝液) 中への NADPH の添加直後から電極電流は減少し, 約 3 分後に定常値に達している。同程度の膜厚を有する同一担体を用いたグルコース · 乳酸などに対して選択性を持つ酵素電極^{7,9,11)} の応答時間 (0.5~1分) に比べて, 得られた応答は若干時間を要している。これは, NADPH が比較的高分子量の基質であり, 光架橋化 PVA 膜中での拡散速度が小さいことに起因すると考えられる。

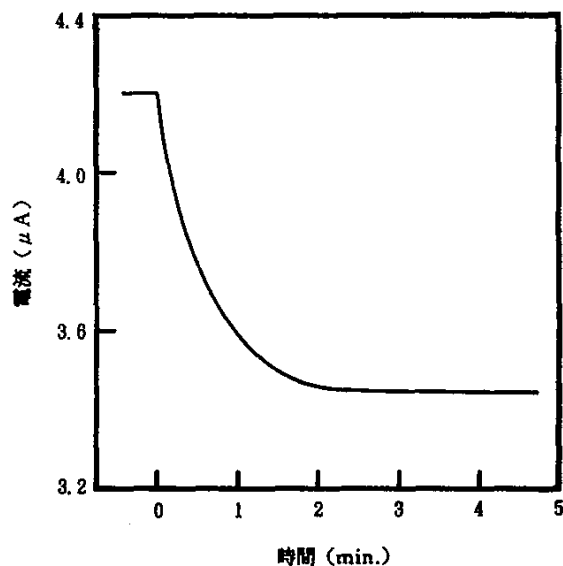


図 1 酵素電極 I の NADPH に対する電極応答の時間/電流曲線

時間 0 で濃度 0.5mM となるように試験液 (0.2mM FMN を含む 0.1M リン酸緩衝液, pH7.0) 中に NADPH を添加している。

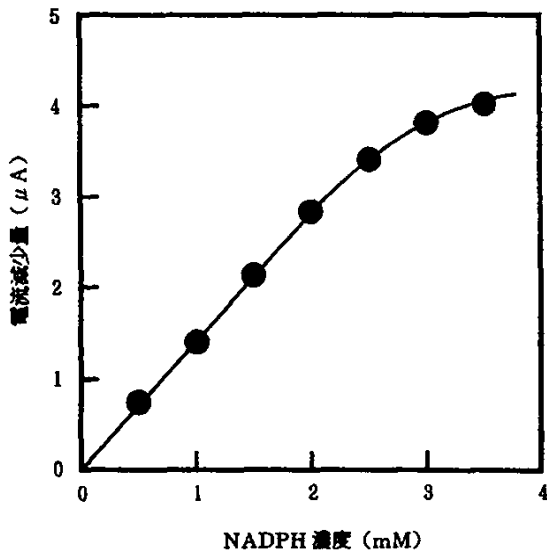


図2 酵素電極 I の NADPH 濃度に対する校正曲線

0.2mM FMN を含む0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) を試験液として用いた。

この電極の NADPH 濃度に対する定常電流応答の校正曲線を図 2 に示す。電極応答と NADPH 濃度の間には 2mM まで直線関係が成立している。2mM 以上の濃度に於いても、応答は濃度の増加と共に増大しており、3mM 程度までの NADPH の定量が可能である。検出下限濃度は $5 \mu\text{M}$ ($S/N = 5$) と見積られた。この電極を 1 日 10 回程度の NADPH 測定に供した場合、1 月以上にわたって安定に作動することを確認した。

3.2 NADPH 酸化酵素の活性 /pH プロフィール

酵素電極 I の 1mM NADPH 添加に対する定常電流応答と試験液の pH との関係を図 3 に示す。図 3 から明らかな様に、応答の至適 pH 値は 4.5 前後であり、NADPH 酸化酵素は酸性側で高い活性を有している。従って、この酵素を脱水素酵素と組み合わせ、連続的な酵素反応により脱水素酵素基質濃度を測定する場合および循環的な酵素反応により NADPH の増幅測定を行なう場合に、組み合わせの対象となる脱水素酵素が、NADPH 生成側の反応の至適 pH 値が比較的低い酵素に限定されると考えられる。

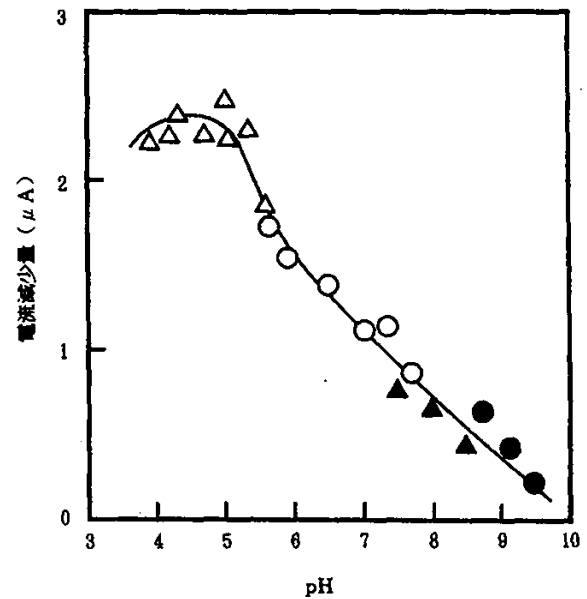


図3 酵素電極 I の電極応答と試験液の pH との関係

試験液中に濃度 1 mM となるように NADPH を添加して電極応答を得た。使用した試験液は、0.1M 酢酸-酢酸カルシウム緩衝液 (Δ)、0.1M リン酸緩衝液 (\circ)、0.1M トリス-塩酸緩衝液 (\blacktriangle)、0.1M グリシン-水酸化カルシウム緩衝液 (\bullet) である。いずれの緩衝液も 0.2mM FMN を添加して用いた。

NADPH 生成の至適 pH 値が 10 前後であるグルタミン酸脱水素酵素と NADPH 酸化酵素とを固定化した酵素固定化膜を用いて構成した酵素電極を用いてグルタミン酸の測定を行なった場合には、グルタミン酸応答のレベルは小さく、高い感度が得られなかった(検出下限濃度は pH8.0 の試験液中に於いて 0.1mM 程度である)。

G-6-P 脱水素酵素による G-6-P 酸化すなわち NADPH 生成の至適 pH 値は 7.5 - 8.0 であり、NADPH 酸化酵素と組み合わせる利用が上記グルタミン酸脱水素酵素の場合より容易となると期待される。

3.3 酵素電極 II の特性

酵素電極 II の、0.5mM NADPH 添加に対する応答と 0.5mM G-6-P 添加に対する応答とを図 4 に示す。試験液 (1mM NADP^+ を含む トリス-塩酸緩衝液, pH8.0) 中への NADPH あるいは G-6-P の添加直後から電極電流は減少しており、いずれの場合も約 3 分後に定常電流に達している。

この電極の NADPH および G-6-P 濃度に対する定常電流応答の校正曲線を図 5 に示す。得られた NADPH に対する応答は、酵素電極 I の NADPH 応答と同様の結果を示している。G-6-P に対する応答と G-6-P 濃度との関係より、 $5 \mu\text{M}$ ($S/N = 5$) から 2.5mM までの濃度範囲の G-6-P の定量を行ない得ることが明らかとなった。

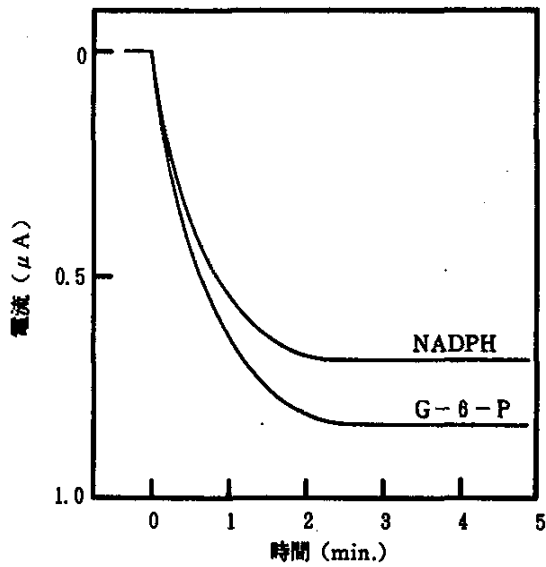


図4 酵素電極IIの電極応答の時間/電流曲線

時間0で濃度0.5mMとなるように試験液(1 mM NADP⁺および0.2 mM FMNを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液, pH8.0)中にNADPHあるいはG-6-Pを添加している。

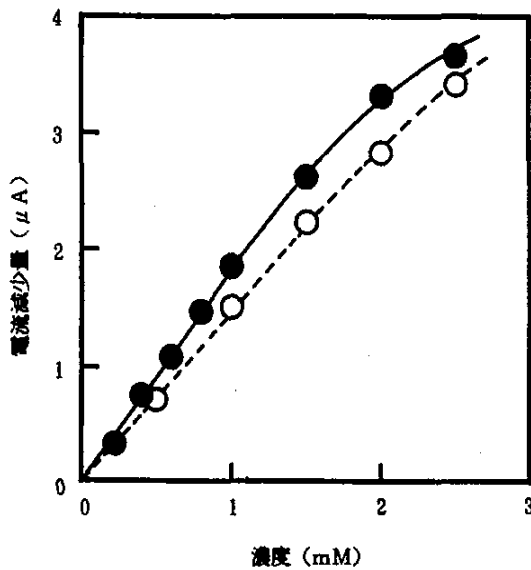


図5 酵素電極IIのNADPH濃度およびG-6-P濃度に対する校正曲線

●: NADPHに対する応答; ○: G-6-Pに対する応答
1 mM NADP⁺および0.2mM FMNを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を試験液として用いた。

この電極を用いて、NADPH酸化酵素によるNADPH酸化(NADP⁺生成)とG-6-P脱水素酵素によるG-6-P存在下でのNADP⁺からNADPHの再生との循環的な酵素反応によるNADPHの増幅測定を試みた。G-6-P(10mM)を含む試験液(トリス-塩酸緩衝液, pH8.0)中およびG-6-Pを含まない試験液中で得られた電極応答のNADPH濃度に対する校正曲線を図6に示す。G-6-Pを含まない試験液中で電極応答を測定した場合には、G-6-P脱水素酵素は作用

せず、NADPH酸化酵素のみが作用する為に、電極応答/NADPH濃度の関係は酵素電極Iのそれとほぼ一致している。一方、G-6-P添加下では、NADPH応答が著しく増幅されている。電極作製当日に於ける電極応答の増幅率は400以上であり、翌日以降1週間は約50倍の増幅率を維持した。当日-翌日間に於ける増幅率の低下の原因については未詳であるが、増幅率50の場合でも電極IIのNADPH検出下限濃度は0.1 μMに達している。以上の結果は、2酵素系の循環的な反応の利用がNADPH測定用の酵素電極の高感度化に好適なことを明示している。

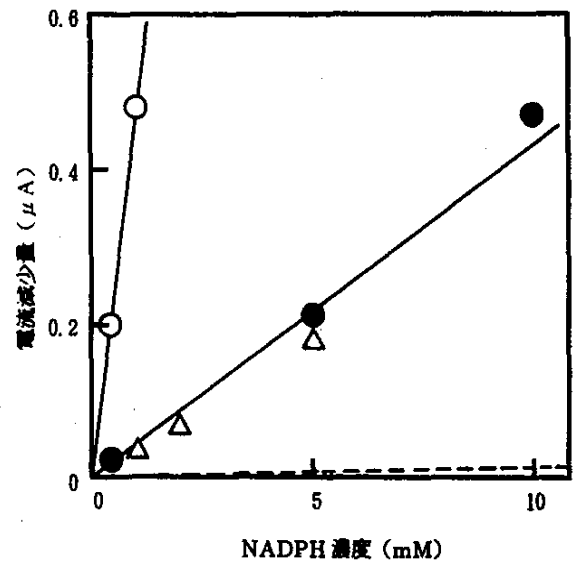


図6 G-6-P存在下に於ける酵素電極IIのNADPH濃度に対する校正曲線

試験液(0.2mM FMNを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液, pH8.0)中にG-6-P(10mM)を添加して(実線)あるいは添加せずに(破線)電極応答を得た。電極作製当日(○)、電極作製後1日経過時(●)および2日経過時(△)に測定したG-6-P存在下に於ける電極応答を示す。

4. 結言

NADPH酸化酵素固定化膜を用いて酵素電極を構成し、5 μMから3mMの濃度範囲のNADPHを測定できることを明らかにした。さらに、NADPH酸化酵素/G-6-P脱水素酵素固定化膜を用いて酵素電極を構成した。この電極はNADP⁺の存在下、5 μMから2.5mMの濃度範囲のG-6-Pを測定することが可能であった。また、G-6-P存在下ではNADP⁺/NADPH酸化還元の循環的な反応によりNADPHの高感度測定が実現できた。今後は、寿命延長・安定性向上・一層の高感度化などについて検討し、より高性能な酵素電極の構成を目指したい。併せて、得られた知見を利用して、各種の脱水素基質測定用酵素電極の開発を試みる予定である。

参考文献

- 1) H.G.Netheler , in H.U.Bergmeyer (Ed.),Methods of Enzymatic Analysis , Verlag Chemie/Academic Press , NewYork , Vol.1 , 1974 , p.184 .
- 2) M.Aizawa, M.Wada , S.Kato and S.Suzuki , Biotechnol . Bioeng.,22 , 1769 (1980).
- 3) 水谷文雄, 津田圭四郎, 日本化学会誌, 3 , 531 (1987).
- 4) 佐伯行一, 野崎光洋, 松本邦男, 生化学, 59(8), 825 (1987).
- 5) F.W.Scheller , F.Schubert, R.Renneberg , H.-G.Muller , M.Janchen and H.Weise , Biosensors , 1,135(1985).
- 6) F.Mizutani and M.Arai , in D.L. Wise (Ed.),Bioinstrumentation, Butterworths , Boston , USA , 1990 , p.317 .
- 7) F.Mizutani , S.Yabuki and M.Asai , Anal . Chim . Acta , 245,145 (1991).
- 8) F.Mizutani, S.Yabuki and T.Katsura , Anal . Sci., 7 (Suppl), 871 (1991).
- 9) F.Mizutani, T.Yamanaka , Y.Tanabe and K.Tsuda , Anal.Chim.Acta , 177 , 153 (1985).
- 10) K.Ichimura , J. Polym. Sci. Polym . Chem . Ed.,22 , 2817 (1984).
- 11) F.Mizutani and M.Asai , Anal . Chim . Acta , 236 , 245 (1990).
- 12) F.Mizutani , S.Yabuki and T.Katsura , Sensors and Actuators B , 13 – 14,574(1993)