

lum carbide formed on the surface of the treated tube was identified by X-ray diffraction method. This method enabled a simultaneous treatment of many tubes. The relative standard deviation of tin atomic absorption was 8.1 % among 9 simultaneously treated tubes. The temperature-time characteristics of the treated tubes were almost same as those of untreated tubes. Although the peak enhancement was observed among several elements, signals of elements forming refractory oxide like as titanium were depressed because of the decrease in the reducing power of the tube. The tantalum carbide treatment prolonged the life of the tube; when 1.0mg of nickel in 0.1 N nitric acid was used as the sample, the treated tube was broken only after 280 times of firing, whereas an untreated tube was broken after 186 times of firing. The weight loss of the treated tube by firing was almost same as that of an untreated tube, but the formation of fine carbon powder was not observed on the surface. Therefore, the apparent absorption due

to scattering of fine carbon powder did not appear, and the signals obtained by the treated tube were constant regardless of the age of the tube. The results of surface analysis by EPMA and electron microscope indicated that the treated tube was not coated with tantalum carbide but minute holes of the surface of a carbon tube was filled by tantalum carbide. A prolongation of soaking time and/or the further repetition of the treatment enabled formation of tantalum carbide layer, but caused a decrease of the reducing power of the tube.

(Received Aug. 8, 1980)

Keyword phrases

atomic absorption, flameless; treatment of the carbon tube with tantalum; characteristics of the treated tube; formation of tantalum carbide.

酵素電極の酵素 (β -D-グルコースオキシダーゼ) 阻害剤スクリーニングへの適用

今井 日出夫[®], 河内 康司*

(1980 年 7 月 31 日受理)

β -D-グルコースオキシダーゼ (GOD) を包括固定化したコロジオン (パイロキシリン) 膜を, Clark 型酸素電極に装着した酵素電極を, *in vitro* での阻害剤スクリーニングに用いた. このセンサーは, 25 °C, pH 5.5 の酢酸緩衝液中, 定常かくはん下, 基質 (グルコース) 濃度に対し, 0.1 mM から 6 mM まで良好な直線的応答を示した. 固定化 GOD の見掛けのミカエリス定数 (K_m') は, (17~35)mM でこの値は膜を作る条件により変動した. Lineweaver-Burk プロット, Dixon プロットを検討し, 硝酸ナトリウムとセミカルバジドは, きつ抗阻害を示し, それぞれの阻害剤定数は, 13 mM, 43 mM であり, 金属イオンでは, Tl^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} による阻害は見られず, Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} が阻害を示し, Cu^{2+} は非きつ抗阻害に近い挙動を示すとともに, 酵素及び酵素质複合体に対する阻害剤定数値は, ほぼ近いが前者が大きく, その値は Cu^{2+} の場合, 0.4 mM 程度であり, Hg^{2+} は非きつ抗と反きつ抗の中間で反きつ抗が強く, K_I' 値は (0.6~1)mM 程度であった.

このように, 比較的簡単な操作で作れ, 繰り返し使用可能な酵素電極が, 酵素阻害により薬効を示す薬剤の, *in vitro* でのスクリーニングに有力な方法であることが分かった.

1 緒 言

固定化酵素の分析化学的応用は, その基質特異性と,

* 広島大学医学部総合薬学科薬品分析化学教室: 広島県広島市南区霞 1-2-3

迅速な触媒反応速度による一種の増幅効果をもって, 簡便, 高選択性, かつ高感度な分析法として注目されている. 酵素固定化膜を電極系に組み合わせた酵素電極が, Updike-Hicks¹⁾によって報告されて以来, 数多くのセンサーとしての適用が報告されているが, それらは主とし

て基質の定量を目的としたものである。又、これに関連して固定化膜中の物質移動過程を取り扱った理論も報告されている²⁾。しかし、酵素反応の阻害剤スクリーニングという観点から固定化酵素センサーを用いることは、薬学的立場から特に重要な意味を持っていると考えられるが、阻害剤を対象としたものは固定化ウレアーゼに関するもののみである³⁾。

著者らの用いた GOD の阻害剤について、Keilin-Hartree⁴⁾の硝酸ナトリウム、セミカルバジドに関する報告、Nakamura-Ogura⁵⁾の銀塩、銅(II) 塩、水銀(II) 塩、有機水銀化合物に関する報告がある。これらは酵素溶液中での反応を取り扱ったものである。

著者らは、GOD をコロジオン (Pyroxyline) 膜中に包括固定し、これと酸素電極とを組み合わせることで酵素阻害の測定を行い、*in vitro* での酵素阻害剤のスクリーニングを試み、簡易に測定できるこのセンサーが極めて有用であることを認めたので、ここに報告する。

2 実 験

2.1 試料及び試薬

GOD (EC 1, 1, 3, 4) 溶液はベーリンガー・マンハイム社製 (20 U/mg) の GOD 0.0158 g を 0.1 ml の蒸留水に溶解し調製した。この GOD の起源はカビであるが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により同定したところ、そのサブユニットの分子量は約 60000 $\pm$ 6000 で、これに不純物として含まれるカタラーゼの量は約 10% であった。酢酸緩衝液は pH=5.5, μ (イオン強度)=0.2 に調整した。グルコース溶液は β -D-グルコース (東京化成) を緩衝液に溶かし 1 夜平衡化させて用いた。コロジオン溶液は市販 5% 溶液 (片山化学) をエタノールで 6 倍に希釈して用いた。

2.2 酵素電極

スライドガラス上に内径 16 mm, 高さ 10 mm のガラス円筒を置いてせきを作り、コロジオン溶液 150 μ l を滴下し、円筒内面に広がらせて静置する。多孔性の膜を得るため、コロジオン溶液の乾燥直前に蒸留水を上から静かに注ぎ、次いで蒸留水を流し出して乾燥する。GOD 溶液 10 μ l をコロジオン膜の中心部約 4 mm 直径に滴下、減圧乾燥し、その上に再びコロジオン溶液 150 μ l を加え、静置、乾燥直前の水処理を前と同様に行う。出来上がった膜は、酢酸緩衝液に浸してガラス面から外し、緩衝液に浸したまま 4 $^{\circ}$ C で 1 夜保存して実験に供した。酸素電極 (クラーク型、バイオニクス機器 OX-1200) のテフロン薄膜に重ねて GOD 固定化膜をオリングで装着する。

この膜電極の基質 (グルコース) に対する応答性は、

基質添加後約 1 分で定常電流値を示した。

得られた酵素膜電極は、作り方の微妙な条件差によって、基質濃度に対し一定の電流変化 ($\Delta i = i_0 - i$, i_0 は基質を加えないときの溶存酸素による電流値, i は基質を加えたときの電流値) を示すとは限らない。しかし、酵素膜を装着しないときの電流値 (極めて薄いテフロン膜を用いて、25 $^{\circ}$ C で約 5 μ A) が、酵素膜装着によって、20% 内の電流減少にとどまるような 1 枚の膜を用いて一連の実験を行う限り支障はなく、酢酸緩衝液中で室温保存したとき少なくとも 1 週間は酵素活性の変化は見られなかった。

グルコース濃度に対する電流値変化を Fig. 1 に示す。溶液の定常かくはん条件の下で、グルコース濃度 (0.1~6) mM の範囲で良好な直線関係が得られるが、更に高濃度でしだいに飽和して直線からずれる。

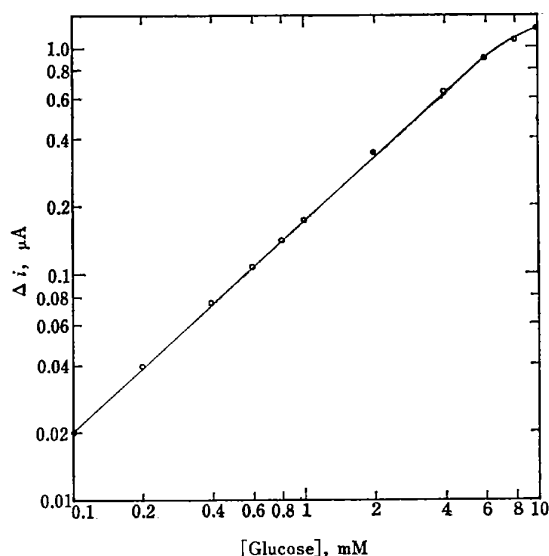


Fig. 1 Working curve of glucose sensor

酸素電極の測定電流値は、溶液のかくはん条件によって変動する。測定容器底面に適合した円板型テフロンかくはん子を用い、マグネティックスターラーの回転速度を上げていくと、電流値はしだいに定常状態に達するので、かくはんはその条件下で行った。

2.3 阻害剤を用いる測定

実験はすべて 25 $^{\circ}$ C, pH 5.5 (GOD の至適 pH 値) で行った。グルコース濃度は (1.5~6) mM 濃度範囲とし、阻害剤の添加は順次高濃度に及ぶようにして一連の実験を行った。可逆的阻害の系では実験後、緩衝液中に酵素電極を長時間浸し、再生させて反覆使用に供した。

3 結 果

3.1 固定化 GOD の見掛けの K_m' 値

製作した幾つかの酵素固定化膜を用い、Eadie-Hofstee プロットを取り、見掛けのミカエリス定数、 K_m' を求めた。Eadie-Hofstee プロットでは後述する Lineweaver-Burk プロット (以下 L-B プロットと略記) よりもデータのばらつきが強調されて現れる。得られた K_m' 値は (17~35)mM と変動が大きい。Keilin-Hartree⁶⁾ による *Penicillium notatum* 起源の GOD の 20 °C における K_m 値は 9.6 mM, Nakamura-Ogura⁷⁾ による *Aspergillus niger* 起源の GOD の 25 °C での K_m 値は 64 mM で、いずれも酵素溶液中の反応で求められているが測定温度を異にするものである。固定化による K_m' 値は、膜中での酵素活性の変化、反応物質の膜中拡散速度などによって変化すると考えられる。又、基質阻害も膜中では起こりやすい状況にある。しかし、1枚の膜を用いて一連の実験を行う限り、プロットは良い直線性を示し、膜中での拡散制御下の定常反応速度測定によって、ミカエリス-メンテン型機構に適合する結果が得られた。

3.2 固定化 GOD に対する阻害剤の効果

3.2.1 硝酸ナトリウムによる阻害 硝酸ナトリウムを (1~30)mM 加えたときの L-B プロットと Dixon プロット (以下 D プロットと略記) において、一連の直線は一点に収れんし、きつ抗阻害のパターンを示した。D プロットにおいて基質濃度を変えたときの一連の直線の交点の横軸座標は酵素 (E), 阻害剤 (I), 複合体 (EI) の解離平衡定数 (阻害剤定数) K_I の負値を与える。図から得たこの値は、

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = 13(\text{mM}) \quad \dots\dots\dots (1)$$

であった。

3.2.2 セミカルバジドによる阻害 塩酸セミカルバジド ($\text{NH}_2\text{NHCONH}_2 \cdot \text{HCl}$) の (20~60) mM を加えたときの L-B 及び D プロットは硝酸ナトリウムと同様の傾向を示し、きつ抗阻害と結論され、 K_I 値は 43 mM であった。

前項の結果と比較すると、阻害剤定数は約 3.3 倍塩酸セミカルバジドが大きい。このことは、Keilin-Hartree⁸⁾ による 10 mM 阻害剤濃度における硝酸ナトリウムによる阻害は 13 %, セミカルバジドによる阻害は 20 % という結果に相反する傾向である。これは前述の K_m 値の

違いから考えて酵素の起源の違いによるかあるいは固定化による違いと考えられる。

3.2.3 金属イオンによる阻害 1価イオンでは Tl^+ による阻害は見られなかったが、 Ag^+ では大きな阻害が観測された。Nakamura-Ogura⁶⁾ によると、 Ag^+ は酵素の FAD 部分による吸収帯の差スペクトルに大きな変化を与えると報告している。著者らの場合、 Ag^+ により酵素固定化膜の表面に黒色析出物を生じ Ag^+ の阻害機構を解析するに足る定量的データを得ることは困難であった。

2価イオンについては、Nakamura-Ogura⁶⁾ らの結果と同様に、 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} による阻害は見られず、又 3価イオン Fe^{3+} による阻害も見られなかった。しかし、 Cu^{2+} , Hg^{2+} による阻害は顕著であった。

硫酸銅の (0.5~1)mM の濃度範囲での L-B 及び D プロットをそれぞれ Fig. 2, Fig. 3 に示す。硫酸銅濃度が 0.5 mM 以上になると K_m' 値の顕著な減少が見られ、グルコース濃度が高くなると、 K_I 値がしだいに減少する傾向が見られる。

Cu^{2+} 濃度 0.5 mM で K_m' 値が顕著に減少する理由として、用いた GOD 中に共存するカタラーゼの Cu^{2+} による部分阻害が考えられる。GOD による反応は、グルコース + H_2O + O_2 = グルコン酸 + H_2O_2 で、カタラーゼはこの H_2O_2 を $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ と分解して O_2

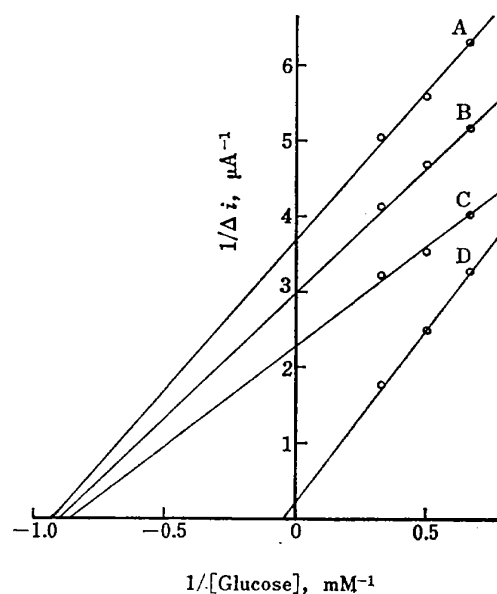


Fig. 2 Lineweaver-Burk plot of immobilized GOD in the presence of Cu^{2+}

$[\text{CuSO}_4] = (\text{A}) 1 \text{ mM}, (\text{B}) 0.75 \text{ mM}, (\text{C}) 0.5 \text{ mM}, (\text{D}) 0 \text{ mM}$

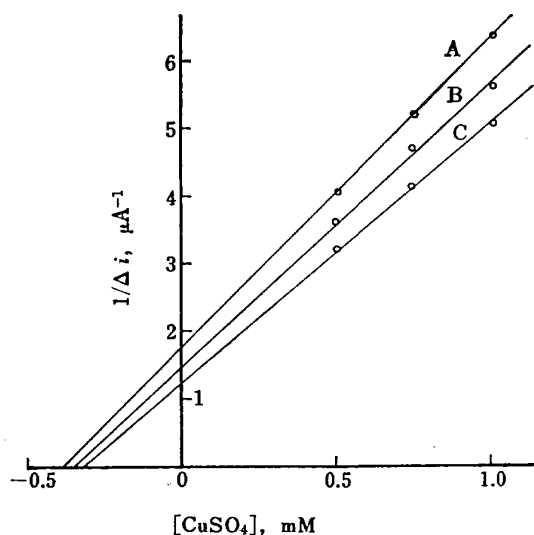


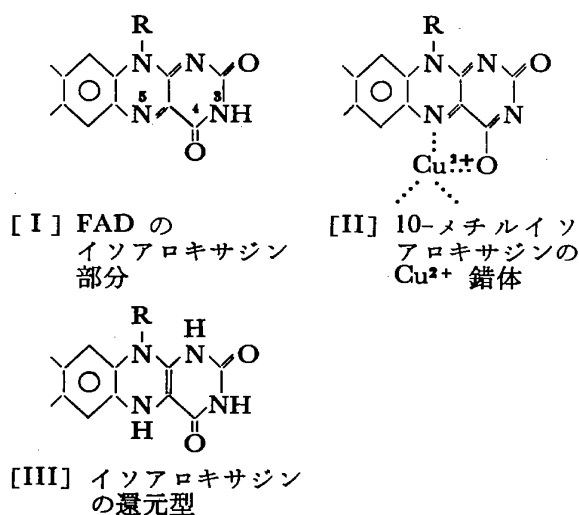
Fig. 3 Dixon plot of immobilized GOD in the presence of Cu^{2+}

[Glucose]=(A) 1.5 mM, (B) 2 mM, (C) 3 mM

を再生する。カタラーゼの反応が阻害されると、GOD による酸素消費は見掛け上増加するから、酸素電極で測定する限り、GOD の活性が見掛け上増加したことになり、見掛けの K_m' 値は減少することになると考えられる。

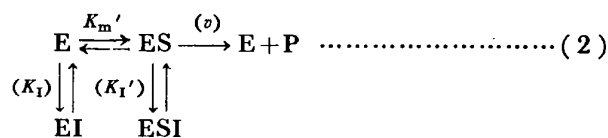
Yu-Fritchie⁸⁾によると、10-メチルイソアロキサジンの Cu^{2+} 錯体のX線結晶解析の結果は、N-5とC-4についた酸素原子によって、アロキサジンの2分子が Cu^{2+} に配位していると報告している。

以上のことを、FAD のイソアロキサジン部分について示すと、次のようになる。



ここで注目されることは、イソアロキサジンのN-5は Cu^{2+} への配位に関連するとともに、GOD の活性中心としても機能していることである。

次の非きつ抗阻害反応を考えてみよう。



ここで、Eは酵素、Sは基質、Iは阻害剤、Pは生成物、EI、ESI、ESはそれぞれの複合体、 K_I 、 K_I' はEI、ESIそれぞれの解離反応の阻害剤定数である。これから

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \left\{ 1 + \frac{K_m'}{[S]} + \frac{K_m'}{[S]} \frac{[I]}{K_I} + \frac{[I]}{K_I'} \right\} \quad \text{..... (3)}$$

が導かれる。 v は酵素反応の速度、 $v_{\max}$ は最大速度、 $[]$ はそれぞれの濃度を示す。これから、L-B、Dプロットのそれぞれの横軸の切片は、

$$\left\{ \frac{1}{[S]} \right\}_{1/v \rightarrow 0} = - \frac{1}{K_m'} \left\{ \frac{K_I K_I' + K_I [I]}{K_I K_I' + K_I' [I]} \right\} \quad \text{..... (4)}$$

$$\{ [I] \}_{1/v \rightarrow 0} = - K_I K_I' \left\{ \frac{[S] + K_m'}{K_I [S] + K_I' K_m'} \right\} \quad \text{..... (5)}$$

となる。式(4)、式(5)から、 $K_I = K_I'$ のときのみ、Fig. 2, Fig. 3の各直線は横軸上で一点に交わることになり、 $K_I > K_I'$ のときは直線の横軸との交点は左に、 $K_I < K_I'$ のときは右にシフトすることになる。

Fig. 2, Fig. 3において、L-Bプロットでは阻害剤濃度が高いほど、Dプロットでは基質濃度に対し阻害剤濃度が相対的に高いほど、横軸との交点は左にずれており、ESIの解離のほうがEIの解離より起こりにくいこと($K_I > K_I'$)を示している。しかし、Fig. 2, Fig. 3いずれにおいてもプロットがほぼ一点に収れんするに近いことから、基本的には非きつ抗阻害に近いものと考えられる。

Cu^{2+} による活性中心に対する阻害を確かめる目的で、pH 5.5の酢酸緩衝溶液中にGODを溶かし、これに硫酸銅を加えていくときの吸収スペクトルの変化をイソアロキサジンによる370 nm, 450 nm付近の吸収帯について観測した。(0.5~1)mMの硫酸銅によって酵素溶液は顕著にこん濁を生じて変性する。これはアポ酵素のSHに対し Cu^{2+} が反応するためと考えられ、酵素の特異性決定中心においても阻害が起こりうることを示唆するものである。なおこん濁を汜別した溶液のスペクトルにも、又その差スペクトルにおいても錯形成を示す顕著な変化は見られなかった。

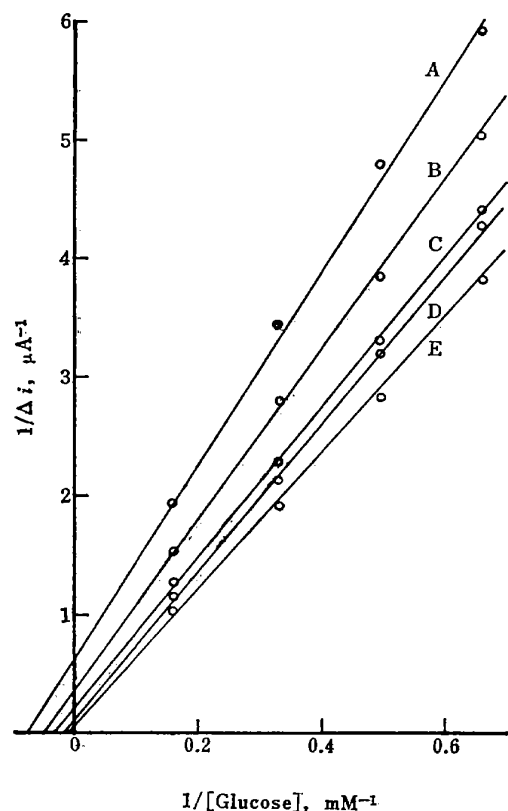


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of immobilized GOD in the presence of Hg^{2+}

$[\text{HgCl}_2]$ = (A) 0.5 mM, (B) 0.25 mM, (C) 0.1 mM, (D) 0.05 mM, (E) 0 mM

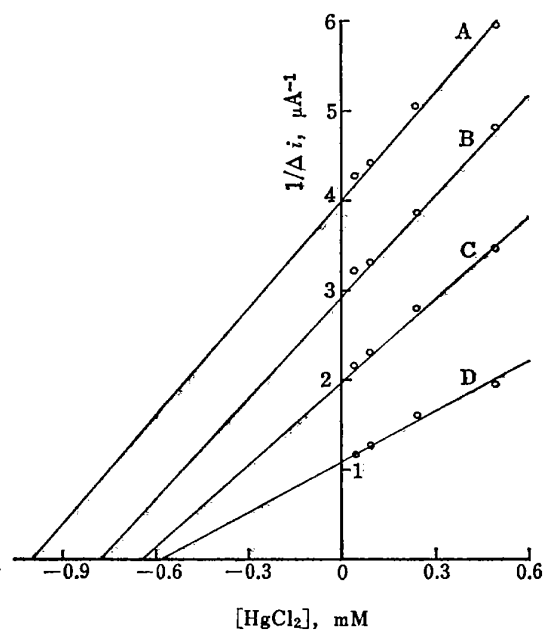


Fig. 5 Dixon plot of immobilized GOD in the presence of Hg^{2+}

$[\text{Glucose}]$ = (A) 1.5 mM, (B) 2 mM, (C) 3 mM, (D) 6 mM

塩化水銀(II)の(0.05~0.5)mMの濃度範囲におけるL-B及びDプロットをそれぞれFig. 4, Fig. 5に示す。Fig. 4で塩化水銀(II)の濃度が0.1mM以上になると K_m' 値の減少が見られ、又Fig. 5でグルコース濃度が高いほど、阻害剤定数が小さくなる傾向が見られる。この傾向は硫酸銅の場合と同じであるが、各プロットの収れんの度合は小さい。

Nakamura-Ogura⁵⁾によると Hg^{2+} は水素受容体としての分子状酸素と競合することにより、還元型FAD部分の酸化を阻害し、又多少ともFAD部分の還元も阻害するとし、その阻害機構はきつ抗、非きつ抗のいずれでもないとしている。Fig. 4, Fig. 5の各直線が完全に平行するときは、反きつ抗阻害で、EIは生成せず、ESIのみが生成することになる。上述のFig. 4, Fig. 5の傾向と、式(4)、式(5)の関係から見る限り、 K_I 値は K_I' 値よりかなり大きく、阻害機構は非きつ抗阻害と反きつ抗阻害の中間にあって、むしろ反きつ抗阻害がかなり顕著であると結論される。

4 結 論

コロジオン膜中に包括固定化した β -D-グルコースオキシダーゼを用いた酵素膜電極によって、酵素阻害剤のスクリーニングを行った。酵素電極の応答はグルコース濃度(0.1~6)mM範囲内で良い直線性を示し、その濃度を越えるとしだいに直線からずれる。固定化GODのミカエリス定数は(17~35)mM程度(膜のでき方による変動)であった。各種阻害剤のLineweaver-Burkプロット、Dixonプロットを検討し、硝酸ナトリウムとセミカルバジドはきつ抗阻害し、その阻害剤定数はそれぞれ13mM, 43mMとなった。各種金属イオンのうち Ag^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} の阻害が認められ、 Ag^+ については決定的な結論は得られなかったが、 Cu^{2+} は非きつ抗阻害に近い挙動を示すこと、 Hg^{2+} は非きつ抗阻害と反きつ抗阻害の中間で反きつ抗阻害に近い挙動を示すものと結論された。酵素及び酵素基質複合体に対する阻害剤定数は、 Cu^{2+} の場合ほぼ近い値で0.4mM程度、 Hg^{2+} の場合は前者に比し後者が小さく、酵素-基質-阻害剤複合体の影響が大きく、その値は(0.6~1)mM程度と推定された。

この方法は操作簡便で、多量の酵素を必要とせず、酵素阻害によって薬効を示す薬剤の*in vitro*でのスクリーニングに有力な手段を提供するものと考えられる。

文 献

- 1) S. J. Updick, G. P. Hicks : *Nature*, **214**, 986

- (1967).
- 2) W. J. Blaedel, T. R. Kissel, R. C. Boguslaski: *Anal. Chem.*, **44**, 2030 (1972).
 - 3) C. Tran-Minh, J. Beaux: *Anal. Chem.*, **51**, 91 (1979).
 - 4) D. Keilin, E. F. Hartree: *Biochem. J.*, **42**, 221 (1948).
 - 5) S. Nakamura, Y. Ogura: *J. Biochem.*, **64**, 439 (1968).
 - 6) D. Keilin, E. F. Hartree: *Biochem. J.*, **50**, 331 (1952).
 - 7) S. Nakamura, Y. Ogura: *J. Biochem.*, **63**, 308 (1968).
 - 8) M. W. Yu, C. J. Fritchie, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 946 (1975).

☆

Application of immobilized enzyme electrode to inhibitor screening of β -D-glucose oxidase.
Hideo IMAI and Yasushi KAWAUCHI (Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Medicine, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiro-

shima-shi, Hiroshima)

A pyroxyline membrane entrapping β -D-glucose oxidase (GOD) was installed on an oxygen electrode, and used for the inhibitor screening *in vitro*. The sensor showed good linear response to the glucose concentration from 0.1 mM up to 6 mM. The apparent Michaelis constant of the immobilized GOD was (17~35) mM depending upon the entrapping condition. Sodium nitrate and semicarbazide showed competitive inhibition with inhibitor constant of 13 mM and 43 mM, respectively. Cupric sulfate and mercuric chloride showed more involved mode of inhibition closely related to non-competitive inhibition and anti-competitive inhibition, respectively. The detail of the inhibition mechanism is described.

(Received July 31, 1980)

Keyword phrases

immobilized β -D-glucose oxidase electrode for inhibitor screening.

共鳴ラマン効果を利用した脂肪族アルデヒドの 高速液体クロマトグラフィー

小泉 均[®], 小島 久尚, 鈴木 義仁*

(1980 年 7 月 14 日受理)

共鳴ラマン効果は試料の吸収帯がレーザー励起波長と一致したとき著しいラマン強度の増大を示す現象である。そのため試料は一般には有色であり、レーザー光の照射により多量の熱を吸収して分解しやすく、又照射時間経過とともにラマン強度が減衰する。この現象を防ぐために回転セルが使用されるが測定液量が多量に必要であり、レーザー光束の照射面積に比べると不必要な大きさである。

本研究ではキャピラリーフローセルを用いて脂肪族アルデヒドの 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体のアルカリ添加直後のラマンスペクトルを得ることができた。このフローセルを応用して共鳴ラマン効果を高速液体クロマトグラフの検出器として使用することを検討した。

すなわち、アルデヒド誘導体混合物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離後各流出成分に連続的にアルカリ溶液を加え、発色させた後、キャピラリーフローセルへ導入した。レーザーはアルゴンイオンレーザー 488.0 nm, 出力 300 mW, 検出波長 1601 cm⁻¹ でモニターしてクロマトグラムを得た。この条件下でホルムアルデヒド誘導体の 2 μ g まで検量線は直線を示し、検出限界は 100 ng であった。

1 緒 言

レーザーラマン分光光度計の普及とともにラマン分光

法の分析化学的応用が最近注目されている。赤外・ラマン分光などの振動スペクトル法は紫外分光法と比べて一般に感度は低い選択性が高いことが知られている。特にラマン法は赤外法と比べても種々の利点がある。

すなわち, (1) 水溶液状態で測定が可能, (2) ガラス

* 山梨大学工学部工学基礎教室 : 山梨県甲府市武田 4-3-11