

固定化酵素リアクターを用いたフローインジェクション法 によるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類の化学増 幅検出

八尾 俊男[®], 松本 義宏, 和 佐 保^{*}

(1988 年 10 月 6 日受理)

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 固定化リアクターと G6PDH/ジアホラーゼ固定化リアクターを, グラッシーカーボン電極を検出器とした FIA 流路に組み込み, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類の化学増幅型リアクターとして用いた. 前者のリアクターでは, グルコース-6-リン酸 (G6P) とフェナジンメトサルフェートの過剰の下で, 酵素反応/化学反応リサイクリングによって, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類に対して増幅された応答を与えた. 後者のリアクターでは, G6P とヘキサシアノ鉄(III) 酸イオンの過剰の下で, 酵素反応/酵素反応リサイクリングによって, 同様に増幅された応答を与えた. 増幅率はキャリアー流量に依存したが, 0.5 ml min^{-1} の流量で, 前者のリアクターで 17~19 倍, 後者のリアクターで約 6 倍であった. しかし, より低流量で増幅率は著しく増大した.

1 緒 言

化学増幅 (chemical amplification) はエレクトロニクスにおける信号増幅に対し, 化学反応を利用した増幅方法であり, 検出感度を著しく向上できる. 又, 酵素反応は化学反応に比べ, 特異性に優れ, 特定の反応のみを触媒するので, 高選択的な分析に利用されてきている. 酵素反応を利用した化学増幅は, 特に酵素免疫センサーに導入され, 酵素標識による化学増幅がその代表的な例である¹⁾²⁾. 一方, 二つの酵素反応あるいは酵素反応と化学反応を組み合わせたリサイクル反応による化学増幅の原理が, グルコース³⁾⁴⁾, NAD^+ ⁴⁾⁵⁾, L-乳酸⁶⁾の酵素センサーに導入されてきている. しかし, 酵素センサーは一般に薄い反応層 (酵素膜) を用いているので, 化学増幅を起こさせるに十分な量の酵素を保持しているとは言いがたく, 増幅率に限界があり, 満足のいくものではない. 一方, 酵素リアクターは必要十分な量の酵素を保持できるので, 酵素センサーに比べて大きな増幅率を得ることが期待できる. しかし, このような酵素リアクターを用いた化学増幅の研究は, 酵素サーミスターを用いた L-乳酸の定量⁷⁾に限られているのが現状である. 本研究で

は, 多くの脱水素酵素の補酵素として重要なニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類の化学増幅による検出を例にとり, 化学増幅型リアクターとしての機能の発現について, グラッシーカーボン電極を備えた FIA 流路を用いて基礎的検討を加えたので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.49; 397 IU mg^{-1} , from *Leuconostoc mesenteroides*; 以下 G6PDH と略記), ジアホラーゼ (EC 1.6.4.3; 100 IU mg^{-1} , from *Clostridium kluyveri*), D-グルコース-6-リン酸 (G6P), β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) とその還元型 (NADH) 及び β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸 (NADP^+) とその還元型 (NADPH) はオリエンタル工業製のものを用いた. フェナジンメトサルフェート (PMS^+) とグルタルアルデヒド (20% 水溶液) は和光純薬工業製のものを用いた. その他の試薬はすべて市販特級品をそのまま用いた.

2.2 固定化酵素リアクター作製

LiChrosorb- NH_2 (Merck 製アミノ基結合シリカ, 粒子径 $10 \mu\text{m}$) への酵素の固定化は, 既報⁸⁾の方法に準じ

^{*} 大阪府立大学工学部応用化学教室: 591 大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804

て次のように行った。2本のステンレス鋼製カラム（内径4mm，長さ12mm）にLiChrosorb-NH₂を充てんし，5%（v/v）グルタルアルデヒド（0.1M炭酸水素ナトリウム溶液）10mlを約2時間循環して，スパーサー部末端にホルミル基を導入した。蒸留水で1.5時間洗浄した後，1本のカラムにG6PDH（1000U）とジアホラーゼ（300U）の混合酵素溶液（0.1M，pH 8.0炭酸緩衝液）10mlを，他のカラムにG6PDH（2000U）を同緩衝液に溶解した酵素溶液10mlをそれぞれ2時間循環して，酵素を固定化することによって，2種類の酵素リアクターを作製した。又，未反応のホルミル基と過剰の酵素を，0.1Mグリシン緩衝液（pH 8.0）250ml

で洗浄することにより除去した。これらの酵素リアクターは使用しないときに，固定化に用いた緩衝液中に浸して，冷蔵庫内に4～6℃で保存した。

2.3 測定システムと測定原理

測定システムの概略をFig. 1に示す。装置は高速液体クロマトグラフポンプ（柳本製作所製L-2000），ポテンショスタット（柳本製作所製VMD-101），記録計（日立製作所製056）とフロースルー型グラッシーカーボン電極（柳本製作所製）などから構成されており，破線で囲まれた部分は35±0.2℃にした恒温水槽に浸されている。キャリアー溶液として，G6PDH固定化リアクターを用いる場合には，2mM G6Pと0.2mM PMS⁺を含む0.1M炭酸緩衝液（pH 8.5）を用いた。G6PDH/ジアホラーゼ固定化リアクターの場合には，2mM G6Pと0.5mM ヘキサシアノ鉄（III）酸カリウムを含む0.1M炭酸緩衝液（pH 7.5）を用いた。インジェクターから注入された試料ゾーン（10μl）は酵素リアクター内で分散すると共に，Fig. 2に示したNAD⁺-NADHリサイクリング化学増幅モデルに従って，G6PDHリアクターの場合にはPMSH（PMS⁺の還元型）を，G6PDH/ジアホラーゼリアクターの場合にはFe(CN)₆⁴⁻を生成する。これらの増幅された生成物をグラッシーカーボン電極で電流測定することで，ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類に対して増幅された応答を得ることができる。

3 結果と考察

3.1 キャリヤー溶液組成とpH

3.1.1 G6PDH酵素リアクターシステム キャリヤー溶液の最適な組成とpHについて検討した。1mM G6Pと0.2mM PMS⁺を含む種々の緩衝溶液（Tris-HCl，リン酸，炭酸緩衝液；pH 8.5）をキャリアー溶液として用いて検討した結果，炭酸緩衝液の場合にNAD⁺とNADHに対して最大の感度が得られた。更に，炭酸緩衝液に添加するG6PとPMS⁺の最適濃度について検討した結果，G6PとPMS⁺の濃度がそれぞれ2mM，0.2mM以上で応答電流は最大となり，それ以上の濃度ではほぼ一定となった（Fig. 3）。又，溶液のpHは酵素反応速度に影響するので，キャリアー溶液のpHについて検討した結果，pH 8.5で最大感度が得られた（Fig. 4A）。そこで，以後の実験では，2mM G6Pと0.2mM PMS⁺を含む0.1M炭酸緩衝液（pH 8.5）をキャリアー溶液として用いることにした。

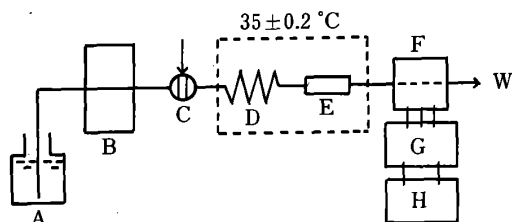


Fig. 1 FIA system with immobilized enzyme reactor for amplified detection of nicotinamide-adenine dinucleotides

A: carrier solution; B: pump; C: injector; D: stainless-steel tube (50 cm long, 0.25 mm i.d.); E: G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) immobilized reactor or G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor; F: flow-through glassy carbon electrode; G: potentiostat; H: recorder; W: waste

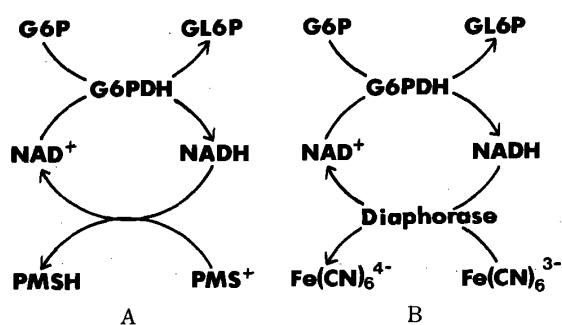


Fig. 2 Scheme of chemical amplification of nicotinamide adenine dinucleotides

A: G6PDH immobilized reactor system; B: G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system. G6P: D-glucose-6-phosphate; GL6P: D-glucose-6-lactone-6-phosphate; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; PMS⁺: phenazine methosulfate; PMSH: reduced form of PMS⁺; NAD⁺: nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH: reduced form of NAD⁺

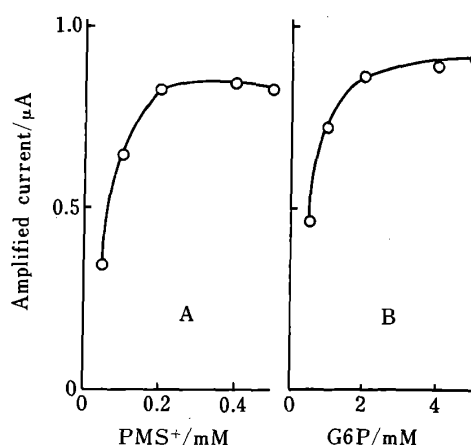


Fig. 3 Effect of PMS⁺ and G6P concentration on amplified current of NADH obtained by using G6PDH immobilized reactor system

Carrier solution : A, 0.1 M carbonate buffer (pH 8.5) containing 2 mM G6P; B, 0.1 M carbonate buffer (pH 8.5) containing 0.2 mM PMS⁺. Injected sample : 1.5 nmol NADH. Flow rate : 0.5 ml min⁻¹

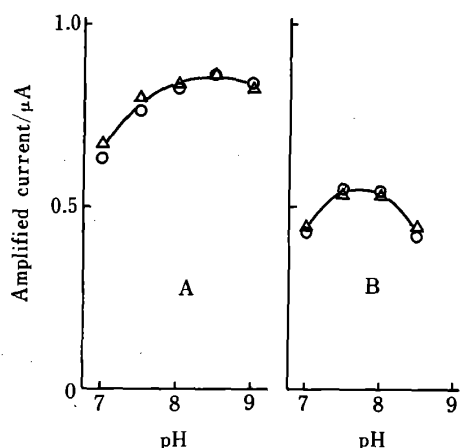


Fig. 4 Amplified current of NADH(○) and NAD⁺(△) as a function of pH of carrier solutions in G6PDH immobilized reactor system (A) and G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system (B)

Carrier solution : A, 0.1 M carbonate buffer containing 2 mM G6P and 0.2 mM PMS⁺; B, 0.1 M carbonate buffer containing 2 mM G6P and 0.5 mM hexacyanoferrate(III). Injected sample : 1.5 nmol each of NADH and NAD⁺. Flow rate : 0.5 ml min⁻¹

3・1・2 G6PDH/ジアホラーゼ酵素リアクターシステム Fig. 2B の化学増幅モデルから明らかなように, この系ではキャリアー溶液に充分量の G6P とヘキ

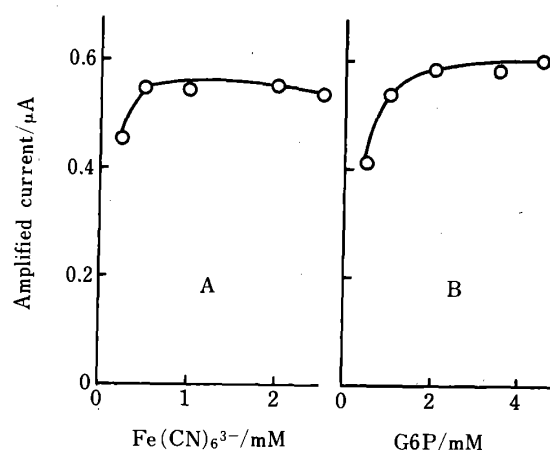


Fig. 5 Effect of hexacyanoferrate(III) and G6P concentration on amplified current of NADH obtained by using G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system

Carrier solution : A, 0.1 M carbonate buffer (pH 7.5) containing 2 mM G6P; B, 0.1 M carbonate buffer (pH 7.5) containing 0.5 mM hexacyanoferrate(III). Injected sample : 1.5 nmol NADH. Flow rate : 0.5 ml min⁻¹

シアノ鉄(III)酸イオンを加えておく必要があるの
で, 基礎液として 0.1 M 炭酸緩衝液を用い, これらの
最適濃度について検討した結果を Fig. 5 に示す. 又,
pH の影響について検討した結果を Fig. 4B に示す. こ
れらの結果から, 以後の実験では, キャリヤー溶液とし
て 2 mM G6P と 0.5 mM ヘキサシアノ鉄(III)酸カリ
ウムを含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 7.5) を用いること
にした.

3・2 検出加電圧

それぞれの化学増幅型リアクターに対して, 最適化さ
れたキャリアー溶液とグラッシーカーボン電極を検出器
として用い, NADH を注入した場合の最適な検出加電
圧について検討した. G6PDH 酵素リアクターシステム
では PMSH が, G6PDH/ジアホラーゼ酵素リアクター
システムではヘキサシアノ鉄(II)酸イオンが実際に検
出される物質となる. Fig. 6 は前者の測定系に対して
0.0 V (vs. Ag/AgCl), 後者の測定系に対して 0.4 V (vs.
Ag/AgCl) が最適な検出加電圧であることを示す.
NADH の電極による直接的な酸化には 0.8 V 以上⁹⁾の
加電圧を必要とすることと比較して, これらの化学増幅
系では低電位で, 又高感度に検出できる利点がある.

Table 1 Calibration graphs and detection limits for nicotinamide-adenine dinucleotides obtained by using G6PDH immobilized reactor system

	Amplified response				No amplified response [†]	
	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH	NADH	NADPH
Linear range (pmol)	20~1×10 ⁴	20~1×10 ⁴	20~1×10 ⁴	20~1×10 ⁴	5×10 ² ~1×10 ⁵	5×10 ² ~1×10 ⁵
Slope (nA/pmol)	0.552	0.550	0.498	0.489	0.0291	0.0289
Intercept (nA)	3.1	2.3	0.6	2.1	-5.9	-5.1
<i>r</i>	0.997	0.998	0.999	0.996	0.999	0.999
D. L.	6.1	5.9	6.8	6.5	188	165

[†] In the absence of G6P in the carrier solution. *r*: correlation coefficient; D. L.: detection limit

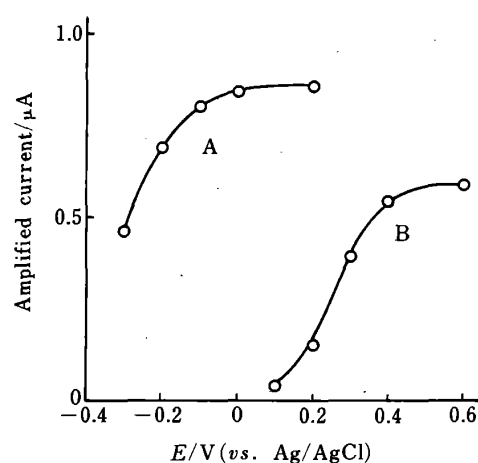


Fig. 6 Amplified current of NADH as a function of applied potential, *E*

A: G6PDH immobilized reactor system; B: G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system. Injected sample: 1.5 nmol NADH. Flow rate: 0.5 ml min⁻¹

3.3 温度

一般に、酵素の活性はある範囲までは温度の上昇と共に増加する。本研究で用いた酵素リアクターにおいても、温度の上昇と共に感度は増大したが、40°C 以上で酵素リアクターの長期安定性が悪くなり、特に 45°C 以上で酵素は急激に失活した。そこで、すべての測定を 35±0.2°C で行うことにした。

3.4 キャリヤー溶液流量と検量線

キャリヤー溶液流量は酵素リアクター内での試料ゾーンの滞留時間（反応時間）に関係する。従って、流量を減少すると酵素リアクター内でのサイクリング反応のターンオーバー数が増加し、Fig. 7 に示したように増幅率は著しく増大した。又、ここで用いた G6PDH は NAD⁺ の他に NADP⁺ にも作用するので、NADP⁺ と

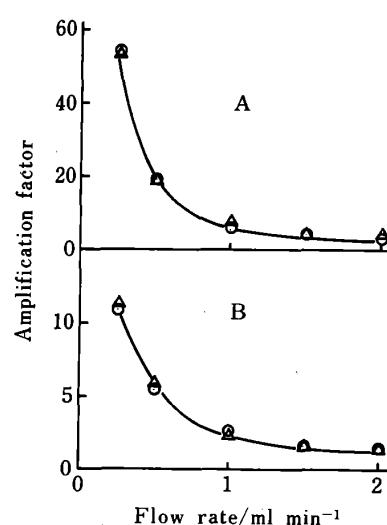


Fig. 7 Effect of carrier flow rate on amplification factor for NAD⁺ (Δ) and NADH (○) obtained by using G6PDH immobilized reactor system (A) and G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system (B)

Injected sample: 1.5 nmol each of NAD⁺ and NADH

NADPH に対しても同様の化学増幅応答を得ることができた。キャリヤー溶液流量が 0.5 ml min⁻¹ のときに得られた各種ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドに対する検量線の解析結果を、G6PDH 酵素リアクターを用いた場合について Table 1 に、G6PDH/ジアホラーゼ酵素リアクターを用いた場合について Table 2 に示す。増幅率は前者のリアクターで 17~19 倍、後者のリアクターで約 6 倍であった。又、検出下限は *S/N*=3 のとき、前者の系で約 6 pmol、後者の系で約 20 pmol であった。

3.5 酵素リアクターの安定性

酵素は多くの場合、固定化することで安定性が改善さ

Table 2 Calibration graphs and detection limits for nicotinamide-adenine dinucleotides obtained by using G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system

	Amplified response				No amplified response [†]	
	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH	NADH	NADPH
Linear range (pmol)	50~1×10 ⁴	50~1×10 ⁴	50~1×10 ⁴	50~1×10 ⁴	5×10 ² ~1×10 ⁵	5×10 ² ~1×10 ⁵
Slope (nA/pmol)	0.360	0.354	0.345	0.341	0.0631	0.0618
Intercept (nA)	0.8	0.6	0	0.6	-2.9	-2.1
r	0.999	0.999	0.997	0.999	0.999	0.999
D. L.	18.5	17.9	16.8	20.1	78	70

[†] In the absence of G6P in the carrier solution.

れるが, 本研究で作製した二つの酵素リアクターも溶液状態の酵素に比べて, 安定性が著しく改善された. 両酵素リアクターは共に 3 週間毎日使用しても, 固定化時に得られた増幅率を維持したが, その後増幅率は徐々に減少し, 35 日後に増幅率は半減した.

本研究で述べた酵素リアクターの特長は, リアクター内で酵素反応/化学反応リサイクリングあるいは酵素反応/酵素反応リサイクリングを行わせることで, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類の化学増幅型リアクターとして機能することである. しかし, NADH の高感度検出法の一つである蛍光光度法と比べて, 現状では感度的に満足のものではないが, このような酵素リアクターによる化学増幅の原理はいろいろな酵素反応系に適用することが可能であるので, 今後の新たな展開が期待できる. 又, 本研究で述べたように, 化学増幅率はキャリアー溶液流量に著しく影響したので, ストップフロー FIA システムを用い, カラム内での試料ゾーンの滞留時間を長くすることにより, 更に大きな増幅率を得ることも可能である. このようなストップフロー FIA 流路を用いた化学増幅の結果については, 後に報告する.

文 献

- 1) 鈴木周一: “イオン電極と酵素電極”, p. 144 (1981), (談談社サイエンスフィク).
- 2) 鈴木周一: “バイオセンサー”, p. 79 (1984), (談談社サイエンスフィク).
- 3) D. Pfeiffer, F. Scheller, M. Janchen, K. Bertermann: *Biochimie*, **62**, 587 (1980).
- 4) F. Schubert, D. Kirstein, K. L. Schroder, F. W. Scheller: *Anal. Chim. Acta*, **169**, 391 (1985).
- 5) A. A. Malinauskas, J. J. Kulys: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 513 (1979).

- 6) F. Mizutani, Y. Shimura, K. Tsuda: *Chim. Lett.*, **199** (1984).
- 7) F. Scheller, N. Siegbahn, B. Danielsson, K. Mosbach: *Anal. Chem.*, **57**, 1740 (1985).
- 8) 八尾俊男, 松本義宏, 和佐 保: 分析化学, **37**, 236 (1988); T. Yao, T. Wasa: *Anal. Chem. Acta*, **207**, 319 (1988).
- 9) T. Yao, Y. Kobayashi, S. Musha: *Anal. Chem. Acta*, **138**, 81 (1982); **139**, 363 (1982).

☆

Chemically amplified detection of nicotinamide adenine dinucleotides in a flow injection system with immobilized-enzyme reactors. Toshio YAO, Yoshihiro MATSUMOTO and Tamotsu WASA (Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 4-804, Mozu-Umemachi, Sakai-shi, Osaka 591)

The glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)-immobilized reactor and G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor were used to increase the detectability of nicotinamide adenine dinucleotides in a FIA system with a glassy carbon electrode as the amperometric detector. In the former reactor, the amplified response was obtained by enzyme reaction/chemical reaction recycling, in the presence of 2 mM D-glucose-6-phosphate (G6P) and 0.2 mM phenazine methosulfate in the carrier solution (0.1 M carbonate buffer, pH 8.5); in the latter reactor, the amplified response was similarly obtained by enzyme reaction/enzyme reaction recycling, in the presence of 2 mM G6P and 0.5 mM hexacyanoferrate(III) in the carrier solution (0.1 M carbonate buffer, pH 7.5). The amplified currents were linearly related to the injected amounts of the nucleotides in the range of 20~1×10⁴ pmol in the former reactor and in the range of 50~1×10⁴ pmol in the latter reactor. The amplification factors of the former and latter reactors were dependent on the carrier flow rate; at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, they were ca. 17~19 and ca. 6 and the detection limits were ca. 6 pmol and ca. 20 pmol, respectively. However, at lower flow rates (<0.5 ml min⁻¹) the amplification fac-

tors increased remarkably. In conclusion, these enzyme reactors were found to be useful for chemical amplification in the detection of nicotinamide adenine dinucleotides, particularly in a stopped flow FIA system.

(Received October 6, 1988)

Keyword phrases

chemical amplification; nicotinamide adenine dinucleotides; flow injection system with immobilized-enzyme reactor; enzyme reaction/chemical reaction recycling; enzyme reaction/enzyme reaction recycling.
