

# 酵素サイクリング法を用いた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの超高感度化学発光測定法とその酵素活性測定法への応用

前田 昌子, 石沢 春生, 辻 章夫<sup>®\*</sup>

(1989年5月11日受理)

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) を高感度に測定することを目的として、酵素サイクリング法により NADH を増幅させ、化学発光法で測定する方法を検討した。酵素サイクリングに用いた酵素反応系はマレイン酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ系で、生成したマレイン酸を過剰量の  $\text{NAD}^+$  とマレイン酸デヒドロゲナーゼにより NADH とする。NADH は既報の方法に従ってイソルミノール/マイクロペルオキシダーゼにより化学発光測定する方法である。最適条件下での NADH の検量域は  $30 \text{ fmol} \sim 6 \text{ pmol/assay}$  で酵素サイクリングを用いない既報に比較して約 300 倍感度が向上しその精度は 3.1~10.5% (相対標準偏差) であった。本法をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの酵素活性測定に応用したところ、 $3 \times 10^{-21} \sim 3 \times 10^{-17} \text{ mol/assay}$  の検量域で既報に比し約 100 倍高感度化することができた。

## 1 緒 言

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) は種々の脱水素酵素の補酵素として生体内の脱水素反応に関与するため、その基質や酵素活性の高感度測定には NADH を高感度に測定することが必要である。NADH の測定法としては吸光分析法<sup>1)</sup>、蛍光分析法<sup>2)3)</sup> 及び電気化学的測定法<sup>4)</sup> などが報告されている。又、更に高感度な分析法としては、バクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光法が知られている<sup>5)~7)</sup>。

著者らは 1-メトキシフェナジンメトサルフェート (MPMS) とイソルミノール (IL) 及びマイクロペルオキシダーゼ (m-POD) を用いる NAD(P)H の化学発光分析法を開発し、種々の生体成分の測定に応用し<sup>8)</sup>、更に酵素免疫測定法 (EIA) への応用としてグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を用いる 17-ヒドロキシプロゲステロンの化学発光 EIA を報告した<sup>9)</sup>。本報では NADH を更に高感度に測定することを目的として酵素サイクリング法<sup>10)</sup> により NADH を増幅させ、化学発光法で測定する方法を検討した。酵素サイクリング法を用いない方法に比べて約 300 倍高感度化することができた。更に本法を G6PDH の活性測定に応用した。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

NADH,  $\text{NAD}^+$ , オキサロ酢酸, マレイン酸脱水素酵素 (MDH), アルコール脱水素酵素 (ADH), グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) はベーリンガーマンハイム山之内製, グルコース-6-リン酸はオリエンタル酵母製, MPMS は半井テスク製, m-POD は Sigma Chemical Co. 製, マレイン酸, エタノール, その他の試薬は和光純薬工業製特級品を使用した。

### 2.2 試 液

酵素サイクリングに用いる NADH 標準液は 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を, MDH 溶液 (30 U/ml) は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を, ADH 溶液 (20 U/ml) は 0.04 M ピロリン酸緩衝液 (pH 8.8) を,  $\text{NAD}^+$  (5 mM)/MDH (12 U/ml)/グルタミン酸 (25 mM) 混合溶液は 2-アミノ-2-メチルプロパノール緩衝液 (pH 9.9) を用いて調製した。オキサロ酢酸 (2 mM)-エタノール (1.2 M) 混合溶液は 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて調製した。G6PDH 活性測定に用いる G6P 溶液 (1.2 mM),  $\text{NAD}^+$  標準溶液 (1 mM), G6PDH 溶液はそれぞれ 0.1 M リン酸緩衝液

\* 昭和大学薬学部: 142 東京都品川区旗の台 1-5-8

(pH 8.0) を用いて調製した。

化学発光測定に用いる IL 溶液 ( $1.2 \times 10^{-4}$  M) は 0.8 M 炭酸塩緩衝液 (pH 9.5) を用いて調製した。MPMS 溶液 ( $5 \times 10^{-6}$  M) 及び m-POD 溶液 ( $1 \times 10^{-6}$  M) は再蒸留水を用いて調製した。

### 2.3 測定装置

化学発光測定装置はアロカ製のルミネッセンスリーダーを用いた。

### 2.4 化学発光測定法

**2.4.1 酵素サイクリングを用いる NADH の化学発光測定法** NADH 標準溶液 2  $\mu$ l, ADH 溶液 10  $\mu$ l, MDH 溶液 10  $\mu$ l, オキサロ酢酸/エタノール混合溶液 20  $\mu$ l をマイクロガラス試験管にとり, 密栓して 4°C, 一夜反応させ, 次いで沸騰水浴中 3 分間加熱して酵素反応を停止させる。冷却後, NAD<sup>+</sup>-MDH-GOT-グルタミン酸混合溶液を 200  $\mu$ l 加え, 20°C 10 分間反応させる。この反応液 40  $\mu$ l をとり, MPMS 溶液 500  $\mu$ l を加え, 80 秒間室温に放置し, IL-m-POD 混合溶液を 500  $\mu$ l 加えた後, 直ちにルミネッセンスリーダーに入れ, 15 秒後から 6 秒間の発光量を測定する。

**2.4.2 G6PDH 活性測定法** G6PDH 標準液 5  $\mu$ l, G6P 溶液 50  $\mu$ l, NAD<sup>+</sup> 溶液 50  $\mu$ l をマイクロガラス試験管にとり, 30°C 30 分間反応させた後, 0.35 M NaOH 溶液 5  $\mu$ l を加え, 75°C, 20 分間水浴中で加熱する。この反応液 2  $\mu$ l をとり, 2.4.1 に準じて操作し,

化学発光測定する。

## 3 結果及び考察

### 3.1 測定原理

酵素サイクリングによる NADH の化学発光測定法及び G6PDH 活性測定法の原理を Fig. 1 に示す。

オキサロ酢酸は MDH によりマレイン酸になり, その際補酵素 NADH は NAD<sup>+</sup> になり, 次いでエタノールが ADH によりアセトアルデヒドになる際に NAD<sup>+</sup> は NADH に戻る。この反応が繰り返され(サイクリング), マレイン酸が蓄積される。加熱してサイクリング反応を停止した後, マレイン酸は新たに加えた過剰量の NAD<sup>+</sup> と MDH によりオキサロ酢酸となり, NAD<sup>+</sup> が NADH へ変換される。以上により NADH が増幅される。

この反応の平衡を生成系側に偏らせるために, 一般にはヒドラジンが用いられているが, NADH の化学反応を阻害するために用いることができない。従って, 本法では生成したオキサロ酢酸をグルタミン酸/GOT により  $\alpha$ -ケトグルタミン酸として系外に除去する。

生成した NADH を既報の方法<sup>9)</sup>に基づいて IL/m-POD による化学発光法で測定することにより, 最初の試料中の NADH が増幅し高感度に測定される。

### 3.2 至適測定条件の検討

**3.2.1 NADH の化学発光測定法** NADH の酵素サイクリング反応における各種酵素, 基質の至適濃度を

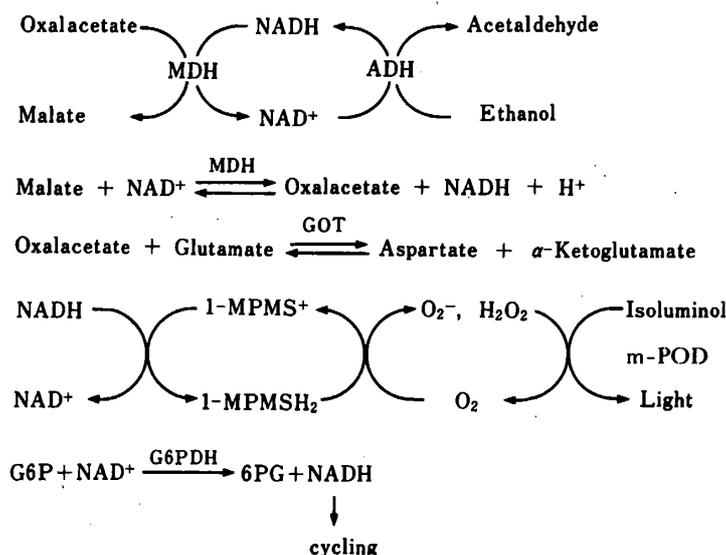


Fig. 1 Principle of enzyme cycling reaction for NADH and G6PDH

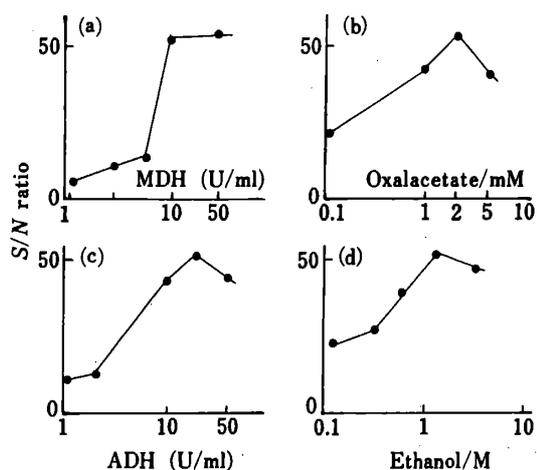


Fig. 2 Effects of various concentrations on enzyme cycling reaction

(a) MDH concentration; (b) oxalacetate concentration; (c) ADH concentration; (d) ethanol concentration

求めるため、2・4・1の反応条件のうち、検討対象成分のみの濃度を変化させて測定し、発光量についての  $S/N$  比を縦軸に、濃度の対数を横軸にとりプロットした。Fig. 2(a)に示すように MDH の濃度の増加に従って発光強度は増大し、10~30 U/ml で  $S/N$  比はほぼ一定となったので 40 U/ml とした。オキサロ酢酸は Fig. 2(b)に示すように 2 mM で発光強度の  $S/N$  比は最大となり、更に濃度が増大すると低下した。従って、2 mM オキサロ酢酸溶液を用いることとした。同様に、Fig. 2(c), 2(b)に示すように、ADH 及びエタノールも濃度の増加に従って  $S/N$  比が最大となったので、それぞれ 20 U/ml, 1 M 溶液を用いることとした。

次に酵素サイクリングで生成したマレイン酸に MDH/NAD<sup>+</sup>/GOT/グルタミン酸を加えて対応する NADH に変換する反応条件について、NAD<sup>+</sup>, MDH, グルタミン酸, GOT 濃度をそれぞれ変化させて至適条件を求めた。NAD<sup>+</sup>, MDH, グルタミン酸はそれぞれ濃度が増大するにつれて発光量が大きくなり、 $S/N$  比も大となる。NAD<sup>+</sup> とグルタミン酸は、Fig. 3(a), 3(d)に示すようにそれぞれ 5 mM, 25 mM で最大となり、MDH は 30 U/ml にした。GOT は 0.3 U/ml 以上でほぼ一定の  $S/N$  比を示したので、1 M 溶液を用いることとした。

**3・2・2 G6PDH 活性の化学発光測定法** 既報<sup>9)</sup>に準じて 2・4・2 の測定条件の基質の G6P 及び補酵素 NAD<sup>+</sup> 溶液の濃度を検討した。Fig. 4(a) Fig. 4(b)に示すように、本法では既報<sup>9)</sup>の至適条件とは若干異なる

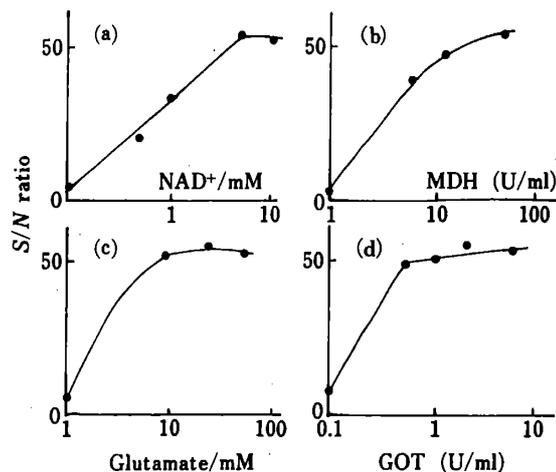


Fig. 3 Effects of various concentrations on enzyme cycling reaction

(a) NAD<sup>+</sup> concentration; (b) MDH concentration; (c) glutamate concentration; (d) GOT concentration

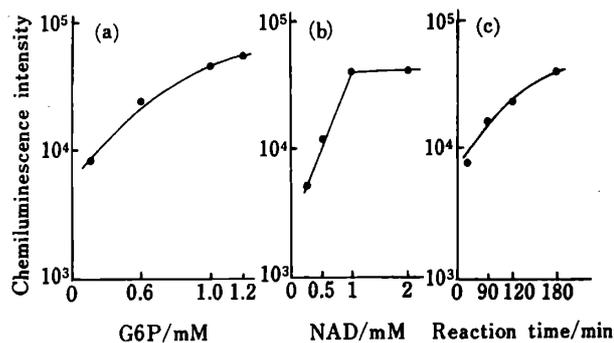


Fig. 4 Effects of various conditions on G6PDH enzymatic reaction

(a) G6P concentration; (b) NAD concentration; (c) reaction time

り、G6P は 1.2 mM, NAD<sup>+</sup> は 1 mM であった。Fig. 4(c)に示すように反応時間は長くなるに従って化学発光強度は増大したので、180分に定めた。

### 3・3 検量線及び測定精度

3・2で設定された 2・4・1 及び 2・4・2 の測定法により NADH 及び G6PDH の検量線を作成した。Fig. 5に示すように NADH の検量域は 30 fmol~6 pmol/assay であり、検出限界は 30 fmol であった。各点での測定値の相対標準偏差 (R.S.D.) は 3.1~10.5% で良好であった。酵素サイクリングを用いない既報<sup>9)</sup>の NADH の化学発光測定法の検出限界は 10 pmol であり、従って本法は約 300 倍感度が向上した。Table 1 に種々の

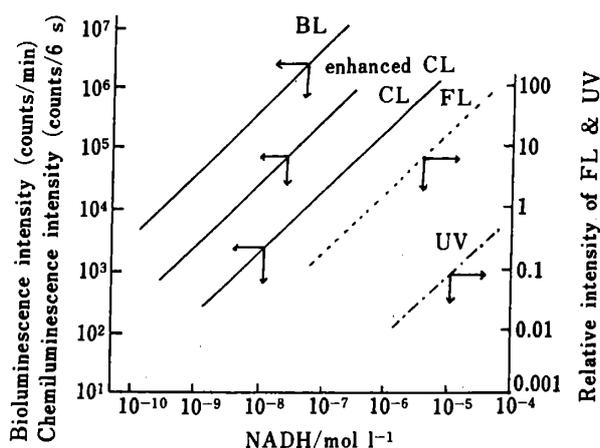


Fig. 5 Standard curves for NADH obtained by various methods

Table 1 Detection limits of NADH obtained by various methods

Method	Detection limit/M
Spectrophotometry	$10^{-9}$
Fluorophotometry	$10^{-10}$
Chemiluminescence	$10^{-11}$
Bioluminescence	$10^{-14}$
Proposed method	$3 \times 10^{-14}$

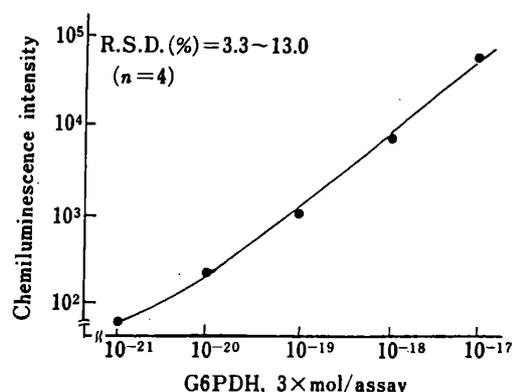


Fig. 6 Standard curve for glucose-6-phosphate dehydrogenase

NADH 測定法の検出感度を比較した。本法はバクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光法とほぼ同レベルの高感度な測定法であった。

G6PDH の検量線を Fig. 6 に示す。G6PDH の検量域は  $3 \times 10^{-21} \sim 3 \times 10^{-17}$  mol/assay で、各測定点での測定値の R.S.D. は 3.3~13.0% であった。又、酵素サイクリングを用いない既報<sup>8)</sup>の方法の測定限界は  $1 \times 10^{-19}$  mol/assay であり、従って本法は約 100 倍高感度化する

ことができた。

以上のように、酵素サイクリングによる NADH の増幅反応を用いる NADH の化学発光測定法は、吸光光度法や蛍光光度法より高感度な既報<sup>8)</sup>の化学発光法より更に 300 倍高感度化することができた。又、G6PDH 活性測定に応用し、既報<sup>8)</sup>の化学発光法に比べて 100 倍高感度化することができた。最近、微量分析法の進歩に伴い種々の高感度分析法が開発されているが、本化学発光法は NADH 及び関連生体成分の超高感度分析法として有用な方法であると思われる。

## 文 献

- 1) 真重文子, 山中学: 臨床化学, **8**, 191 (1979).
- 2) H. P. Schwarz, K. V. Bergamann, G. Paumgartner: *Clin. Chim. Acta*, **50**, 197 (1974).
- 3) G. H. Murphy, B. H. Billing, D. N. Baron: *J. Clin. Path.*, **23**, 594 (1970).
- 4) L. Bartalits, G. Nagy, E. Pungor: *Clin. Chem.*, **30**, 1780 (1984).
- 5) M. DeLuca, W. D. McElroy: "Bioluminescence and Chemiluminescence" in "Basic Chemistry and Analytical Applications", p. 97 (1981), (Academic Press, New York).
- 6) L. J. Kricka, T. J. N. Curter: "Clinical and Biochemical Luminescence", p. 75 (1982), (Marcel Dekker, New York).
- 7) H. H. Weetall: *Methods Enzymol.*, **44**, 104 (1976).
- 8) 田部一弘, 河崎孝男, 前田昌子, 辻 章夫, 藪内正彦: 分析化学, **36**, 82 (1987).
- 9) 須藤幸夫, 石沢春生, 前田昌子, 辻 章夫: 分析化学, **37**, 185 (1988).
- 10) T. Kato, S. J. Berger, J. A. Carter, O. H. Lowry: *Anal. Biochem.*, **53**, 86 (1973).

☆

## Ultrasensitive chemiluminescence assay for hydrogen nicotinamide adeninedinucleotide using enzyme cycling and its application to determination of enzyme activity.

Masako MAEDA, Harumi ISHIZAWA and Akio TSUJI (School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142)

A highly sensitive assay system for NADH was developed by coupling with the enzyme cycling method using alcohol dehydrogenase (ADH) and malate dehydrogenase (MDH). This enhanced chemiluminescent assay of NADH has been applied to the determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). The method is as follows; To an assay tube, add 2  $\mu$ l of NADH solution, 10  $\mu$ l of ADH solution (20 U/ml), 10  $\mu$ l of MDH solution (30 U/ml) and 20  $\mu$ l of oxalacetate/ethanol solution (2 mM/1.2 M) and then incu-

bate at 4°C overnight. After heating in boiling water for 3 min, 200  $\mu$ l of enzyme cycling solution (5 nM NAD<sup>+</sup>, 12 U/ml MDH, 1 U/ml GOT and 25 mM glutamate in 2-amino-2-methyl-propanol buffer, pH 9.9) was added to the assay tube, and then incubated at 25°C for 10 min. After standing 80 s, 40  $\mu$ l of the reaction mixture was mixed with 500  $\mu$ l of 1-methoxyphenazinium methyl sulfate ( $5 \times 10^{-9}$  M), 500  $\mu$ l of isoluminol ( $1.2 \times 10^{-4}$  M)/microperoxidase ( $1 \times 10^{-6}$  M) (1:1) solution was added and then chemiluminescent intensity measured for a 6 s interval from 15 s to 21 s after addition of the chemiluminescent reagent. The calibration range for NADH was from 30 fmol to 6 pmol/assay and the detection limit was about  $3 \times 10^{-14}$  mol/assay. The proposed

enhanced chemiluminescent assay for NADH was applied to the assay of G6PDH, in which excess NAD<sup>+</sup> was destroyed by adding NADH and heating at 75°C for 20 min. The generated NADH was assayed as described above. The detection limit was  $3 \times 10^{-21}$  mol/assay.

(Received May 11, 1989)

**Keyword phrases**

chemiluminescent assay of NADH; enhanced chemiluminescent assay of NADH; enzyme cycling; chemiluminescent assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase.