

ノ ー ト

アポ酵素-補酵素反応を利用したフラビンアデニン ジヌクレオチドの電気化学的測定法についての検討

平塚 淳典*, 川崎 幹生*, 長谷部 清®*

(1995 年 5 月 22 日受付)

(1995 年 6 月 30 日審査終了)

1 緒 言

ビタミン B₂ は生体内での酸化還元反応や酵素反応に深く関与し、リボフラビン (狭義のビタミン B₂: RF), フラビンモノヌクレオチド (FMN), フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 等の関連化合物がある. 特に生体内での活性化形態である FAD は直接, エネルギー獲得, 物質代謝, 薬物代謝に関与し, FAD の分析はビタミン B₂ の欠乏症等の診断に意義がある.

FAD の測定法には, 比色法, 蛍光法等¹⁾がある. 比色法は高濃度のフラビンを要し, 定量範囲は2~30 μM である. 蛍光法は 8 nM~2 μM と検出感度は高いが, 共存蛍光物質の妨害を除去するための前処理が必要である. 又, ビタミン B₂ 類似化合物を分離定量するためにはクロマトグラフィー等を用いる必要性もある. これら従来の比色分析や HPLC 等を利用した生体成分, 代謝産物の化学分析法は, 低特異性, 低操作性, 低感度等の問題点があり, より高感度で高選択性の分析法の開発が望まれている.

著者らは, フラビン酵素である D-アミノ酸オキシダーゼを用い, 酵素の高い基質選択性, 微量検出特性を利用した電気化学的方法による FAD 測定法を確立した.

酵素は, 一般に生体内で起こる様々な代謝反応において重要な役割を果たし, 高特異性かつ高効率の触媒として働く. このような生体の持つ機能性高分子は人工合成分子より優れ, その反応特異性や分子認識能を利用して種々の基質物質の測定が行われている²⁾. 酵素反応は一般に補酵素やアロステリック部位等によって調節, 制御

されており, このような酵素の持つ共同因子, 調節因子を利用するならば, 生体関連物質, 高分子化合物を高感度, 高選択的に検出, 定量することが可能となる. アポ酵素-ホロ酵素による活性発現の機構と補酵素の基質濃度依存性の分析化学への応用例はまだ少ない. 本研究では, 酵素中の補酵素を抜き出したアポ酵素を用い, 補酵素の供給によって酵素反応の発現を制御することによって補酵素を高感度に検出可能とするバイオアッセイ法³⁾を開発したので, 以下に報告する.

2 実 験

2.1 装 置

電気化学測定は, BAS 100W (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, USA) を使用した. 電解系は 3 電極方式とし, 参照電極には銀-塩化銀電極 (Ag/AgCl), 対極には白金線, 作用電極には金又は白金電極を用いた. 酵素反応及び試料の測定は恒温槽 (東京理化製) 中で行い, 温度依存性の検討を除いて 25°C を用いた.

2.2 試 薬

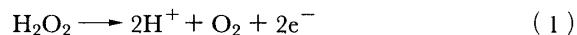
DL-α-アラニン, 過酸化水素水は和光純薬製を, 又, FAD は Merck 製, FMN は関東化学製, RF, D-アミノ酸オキシダーゼ (AO), D-アミノ酸オキシダーゼアポエンザイム (AOAPO) は Sigma 製を使用した. その他の試薬は, すべて特級品を使用した.

2.3 方 法

AOAPO (AO の補酵素である FAD が存在しない状態: アポ酵素) は酵素活性を示さないが, アポ化された酵素に FAD を加えると酵素活性が復活し, 添加 FAD 量に応じて酵素活性が増加する.

* 北海道大学大学院地球環境科学研究科: 060 北海道札幌市北区北 10 条西 5 丁目

AO は本来活性中心に 1 個の FAD を持ち、 H_2O と O_2 の存在下において D-アミノ酸を 2-オキソ酸に変換し、酵素反応に伴って NH_3 と H_2O_2 を生成する。生成した H_2O_2 は電極活性であり、その電極反応は以下のようになる;



H_2O_2 の生成量を測定すると酵素の活性化の度合いが分かり、酵素に取り込まれた FAD 量が測定可能となる。

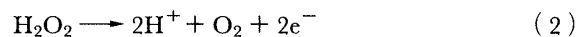
試料溶液は、10 ml メスフラスコに 22 mM リン酸緩衝溶液約 5 ml を採り、ついで 5.2 mM DL-アラニン 10 μl を採り、 6.6×10^{-2} U アポ酵素 0.1 ml を加えた後、必要に応じて適当量の FAD を加え、リン酸緩衝溶液で正確に 10 ml とした。

3 結果と考察

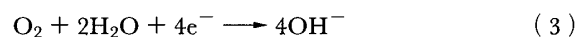
3.1 過酸化水素の電極応答

電極材料としては Au, Pt, Pd 及びグラッシーカーボン (GC) 等を用いた。GC 電極の場合、過酸化水素の明りような酸化還元応答は見られなかった。一方、金属電極の場合、 H_2O_2 の酸化還元波は、触媒波の関係により増幅が見られるので、GC 電極と比較して電流の測定が容易である。それゆえ、特に電位窓の広い Au 及び Pt を用い、サイクリックボルタモグラム (CV) をとり、検討した。Fig. 1 は、Au 電極による CV であり、 -600 , -200 , $+100$ 及び $+500$ mV に、それぞれピークが現れる。特に、過酸化水素の陽極電流である $+500$ mV (a) 及び陰極電流である -600 mV (b) に注目した³⁾⁴⁾。

(a) に対する電極反応を以下に示す⁴⁾⁵⁾。



(b) では電極反応は以下のようになる。



一方、Pt 電極を用いた場合 (Fig. 2), 陽極電流が $+300$ mV から $+400$ mV までの広い電位領域にわたって観測された。又、Au 電極を用いたときと異なり、Pt 電極での CV 波形は溶存酸素の影響をあまり受けないので、過酸化水素の測定には Pt 電極を用いるほうが適している。測定電位は、 $+600$ mV vs. Ag/AgCl とした。

3.2 ホロ酵素の電極応答

5.2 μM DL- α -アラニンを含む 22 mM リン酸緩衝溶液

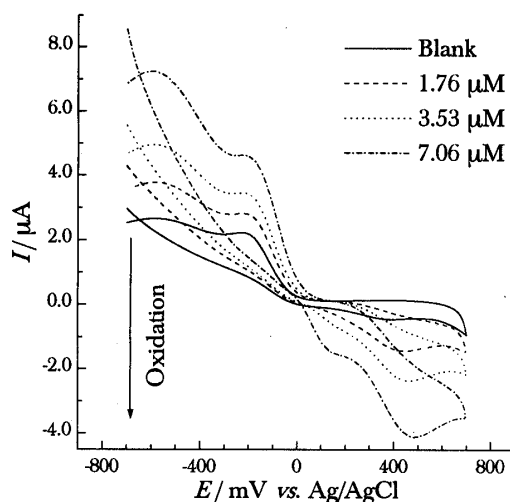


Fig. 1 Red/ox behavior of H_2O_2 (0~7.06 μM) using Au electrode in 22 mM phosphate buffer (pH 8.3)

Scan rate: 50 mV s^{-1}

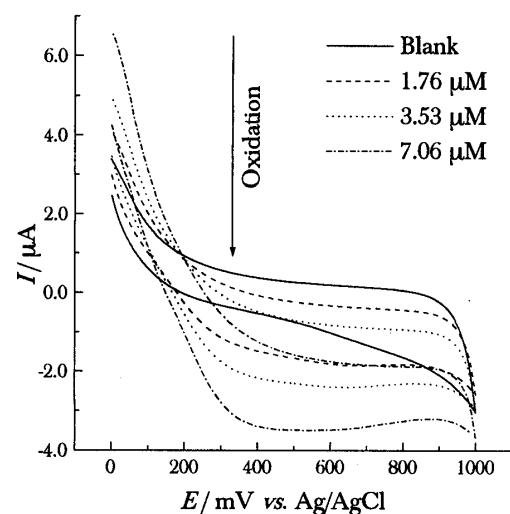


Fig. 2 Red/ox behavior of H_2O_2 (0~7.06 μM) using Pt electrode in 22 mM phosphate buffer (pH 8.3)

Scan rate: 50 mV s^{-1}

(pH 8.3) 中に、AO (ホロ酵素) を添加し、その効果を検討した。その CV を Fig. 3 に示す。ホロ酵素を加えると $+300$ mV から $+1000$ mV の広い電位領域にわたって酸化電流が現れ、過酸化水素が生成していることが確認された。

3.3 酵素活性の温度依存性

酵素反応の最適条件を決定するため、酵素活性の温度

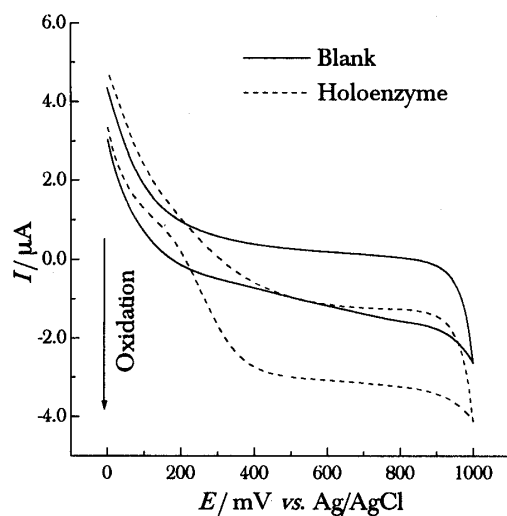


Fig. 3 CVs of blank and holoenzyme in 22 mM phosphate buffer (pH 8.3) with 5.2 μM DL- α -alanine
Scan rate: 50 mV s^{-1}

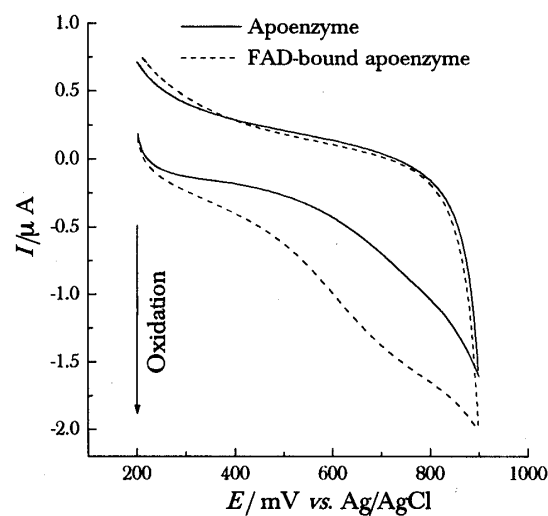


Fig. 4 CVs of apoenzyme and FAD-bound apoenzyme in 22 mM phosphate buffer (pH 8.3) with 5.2 μM DL- α -alanine
Scan rate: 50 mV s^{-1}

Table 1 Temperature dependence of enzymatic activity of D-amino acid oxidase holoenzyme

Temp/ $^{\circ}\text{C}$	30	40	50	AOAPO
Current/ 10^{-10} A	-5.88	-17.1	-3.61	— (-2.97)
Basic electrolyte: 22 mM phosphate buffer (pH 8.3) containing 5.2 μM DL- α -alanine				

依存性を検討した。反応温度以外は前述と同一条件で行った。電気化学測定の結果として、反応開始 30 分後、+600 mV における定電位電流変化 (chronoamperometry) を Table 1 にまとめた。反応温度が 30 $^{\circ}\text{C}$ から 40 $^{\circ}\text{C}$ へと上昇すると、過酸化水素量も増加し酵素活性が増大し、逆に 50 $^{\circ}\text{C}$ になると過酸化水素量が減少し、酵素活性も減少していることが分かる。以上より、反応温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ が最適であり、以後この温度で行うこととした。

3・4 FAD 添加によるアポ酵素の活性化と電極応答

FAD の分析のためにアポ酵素のホロ酵素化の反応を利用して FAD を検出した。6.6 $\times 10^{-4}$ ユニット (U) AOAPO と 5.2 μM DL- α -アラニンを含む溶液に FAD を添加し、その前後の CV 変化を Fig. 4 に示した。FAD がいない場合、アポ酵素は全く活性を示さず、生成物である過酸化水素は生成しない (+200 mV から

Table 2 Effect of analogous compounds on electro-signal

Analogue	Current/ 10^{-8} A	Response, %
FAD	-0.67	100
Apoenzyme	no activity	—
FMN	no activity	—
RF	no activity	—
FAD+FMN	-1.54	229.9
FAD+RF	-0.49	73.1

Basic electrolyte: phosphate buffer (pH 8.3) containing 5.2 μM DL- α -alanine and 6.6 $\times 10^{-4}$ U AOAPO. Concentration of each analogous compound: 4.2 μM . Temp.: 25 $^{\circ}\text{C}$

+900 mV の範囲で酸化電流は観測されない)。一方、FAD を添加すると、アポ酵素が活性部位に反応し酵素活性が復活するとともに、過酸化水素を生成する。従って、FAD の添加によりアポ酵素がホロ酵素に変換され、生成した過酸化水素の +600 mV における酸化電流を観測することから間接的に FAD を検出することが可能となる。

3・5 検量線

FAD 濃度変化に伴う酸化電流の応答変化を調べ、濃度依存性を検討した。本酵素反応は補酵素の添加により直ちに発現するので、一定時間後に計測した。上述の

2・3 の項で述べた実験条件下で、クロノアンペロメトリ法による +600 mV における過酸化水素の酸化電流と濃度の間には良好な直線性が見られ、その回帰式は $Y=42.1+18.1X$ で表される。ここで、 Y は酸化電流 (nA)、 X は FAD 量 (μM) であり、相関係数 (R) は、0.9999 であった。

3・6 FAD 類似化合物の共存による影響

生体内では、ビタミン B₂ は大部分 FAD として存在し、FMN 又は RF としてはほとんど存在しない。FAD と構造的に類似した化合物を単独、又は共存させたときの電気化学シグナルへの影響について検討した。Table 2 は 4.2 μM の FMN 及び RF を FAD の代わりにアポ酵素溶液に添加したときの過酸化水素の電気化学応答をまとめたものである。Table 2 から分かるように、FAD の代わりに RF、FMN を添加しても電極応答は観察されない。次に、これら FAD 類似化合物を FAD と共存させた状態での電極応答を調べた。FAD と FMN、又 FAD と RF をそれぞれ等量 (4.2 μM) ずつ加え、そのシグナルを FAD のみの場合と比較して百分率で示した。FAD と RF が共存した状態では、電極応答は 73.1% となり、あまり顕著な阻害、促進効果はみられないが、FAD と FMN を共存させたとき、応答は FAD 単独のときの 2 倍以上の電流値となった。この現象は、

FMN 単独では全く見られず、FAD が共存するときのみ見られた。これらの現象に関しては、今後の検討課題である。

以上の結果から、アポ酵素-FAD の相互作用を利用することにより生物学的に重要な FAD を測定することができた。又、本法はクロマトグラフィー等による分離操作なしで FAD の定量が可能である。比色法、蛍光法等の従来法と比較して、電気化学的検出法により装置の小型化、高感度化、簡便化が可能となることが示唆された。アポ酵素の安定化、再利用化のための固定化法について現在検討中である。

文 献

- 1) K. Yagi: "Method of Biochemical Analysis", Volume 10, Edited by P. Glick, (1962), (Interscience, New York).
- 2) S. Hikima, T. Kakizaki, K. Hasebe: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 237 (1995).
- 3) A. Hiratsuka, M. Kawasaki, K. Hasebe: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **36**, 157 (1995).
- 4) 藤嶋 昭, 相澤益男, 井上 徹: "電気化学測定法(上)", p. 3 (1984), (技報堂).
- 5) A. M. Bond: "Modern polarographic methods in analytical chemistry", Chap. 2 (1980), (Marcel Dekker, New York).



Electrochemical bioassay using apoenzyme-flavin-adenine dinucleotide interaction for the detection of flavin-adenine dinucleotide. Atsunori HIRATSUKA, Mikio KAWASAKI and Kiyoshi HASEBE (Division of Material Science, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060)

We employed the commercially available D-amino acid oxidase (MW=38000 g/mol) which requires one flavin-adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor of activation. It can enzymatically catalyze the oxidation of D-amino acid to 2-oxoacid in the presence of H₂O and O₂. In addition, this enzyme produces NH₃ and H₂O₂ during enzymatic reactions. This cofactor is essential for the activation of the apoenzyme. The enzyme is reactivated and the active enzyme produces electroactive H₂O₂ and NH₃ when the cofactor is attached to the specific site of the apoenzyme. Therefore we prepared appropriate amounts of apoenzyme and DL- α -alanine in buffer solution (pH 8.30). H₂O₂ was produced by the enzymatic process in response to the addition of FAD. Then the concentration of FAD was estimated from the electrochemical signal of H₂O₂ at +600 mV vs. Ag/AgCl. This configuration discriminated between different concentrations of analyte in the range 0.84~4.2 μM .

(Received May 22, 1995)

(Accepted June 30, 1995)

Keywords

electrochemical detection; FAD; apoenzyme; D-amino acid oxidase.