

NAD(P)Hの高感度FIAと脱水素酵素基質定量への応用

木羽 信敏

山梨大学 工学部 化学生物工学科：〒400 山梨県甲府市武田4-3-11

Highly Sensitive Flow Injection Analysis of NAD(P)H and their Applications to Determination of Substrates for Dehydrogenases

Nobutoshi Kiba

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Takeda 4-3-11, Kofu 400, Japan

There has been an increased interest in the improvement of sensitivity and selectivity of flow injection analysis. The coupling of immobilized enzyme reactors with chemiluminometric reactions permits the simple and sensitive determination of coenzymes and substrates. This review is described for highly sensitive flow injection methods for the determinations of NAD(P)H and substrates for dehydrogenases with chemiluminescence detection.

1. はじめに

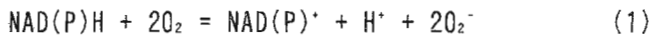
分析法を開発する際の目標は2つに大別できる。ひとつは、高感度化に重点を置き、開発した方法の有用性を探るものである。他の1つは、簡便・迅速を優先させ、実用による現場でのすばやい判断に役立てようとするものである。FIAは、バッチ式マニュアル法で行われていた湿式化学分析を連続流れ系で簡便・迅速に精度良く行なおうとして開発された方法である。そのため、FIAはマニュアル法の基本的な概念をそのまま引き継いでいる。FIAの概念が発表されると、直ちに、多くの研究が行われ、容易に日常分析に取り入れられたのは、その分析条件がマニュアル法のそれを大きく変えることなく使用できたからである。次いで、FIA研究は、更なる簡便・迅速化を目指した。前処理、前濃縮には溶媒抽出法^{1,2)}およびカラム濃縮法³⁾の導入、また、前処理を必要としない選択的検出には固定化酵素⁴⁾、バイオセンサー⁵⁾、膜分離ユニット^{6,7)}の導入が研究され、すばらしい成果をあげた。

理想的な分析法とは、上記2つの目標を同時に兼ね備えた簡便・迅速で高感度な方法である。分析化学者は、高感度な方法の操作性の向上を試み、簡便な方法の高感度化を研

究する。それ故、FIAの研究が高感度化を指向するのは当然のことである。これまでに、FIAの高感度化は、反応系での固定化酵素リアクター⁸⁾の使用と検出系での化学発光検出器^{9,10)}の利用で試みられてきた。本稿では、バッチ式マニュアル法による高感度なNAD(P)Hの測定法としてNADH酸化酵素を用いる方法と1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェイト(メトキシPMS)を用いる方法を解説し、その概念を取り入れた、定量下限が 10^{-7} Mレベルの最近の化学発光検FIAとそれを応用した脱水素酵素基質の定量法を紹介する。

2. NADH酸化酵素を用いる方法

NADH酸化酵素(NOD)は、NAD(P)Hを溶存酸素で直接酸化する酵素であり、過酸化水素生成型と水生成型の2種類が知られている¹¹⁾。過酸化水素生成型NODの還元生成物は、下に示すように、1電子還元によるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)と2電子還元による過酸化水素が考えられるが、実際には、 O_2^- は非酵素的に過酸化水素へ変換されるから、(1)式と(2)式は区別できない。



本酵素は、初め酵素電極に用いられた。水谷らは、*Bacillus megaterium* 由来のNODを固定化したポリ(ビニルアルコール)膜をクラーク式酸素電極に装着し、(2)式の進行にともなう3分後の電極電流の減少値より2~500 μ MのNADHを定量する方法を提案した¹²⁾。さらに、アルコール脱水素酵素との酵素サイクリング反応により、20nMのNADHの検出が可能であることを示した。岡本らは、NADHのみに活性を有する *Streptococcus mutans* および *Bacillus licheniformis* 由来のNODを用い、生成した過酸化水素を化学発光検出するNADHの定量法を開発した¹³⁾。反応はほぼ100%進行し、アルコール脱水素酵素との15分間の酵素サイクリング反応により20fMまでのNADHの測定が可能であった。

2.1. NAD(P)HのFIA

ニコチンアミド補酵素は体内に一番多く存在する補酵素であり、特にNAD⁺およびNADHは生体のエネルギー生産機構に関与しているので、その超微量定量法が生化学の分野で開発された。それらのうち、一般的な方法として酵素サイクリングを利用する方法がある。この方法は、Warburgらが考案し¹⁴⁾、Lowryが発展させた¹⁵⁾。原理的には1分子の測定が可能である。原理は次のようである(図1)。過剰量のエタノールとオキサロ酢酸の存在下で、NADHはリンゴ酸脱水素酵素により酸化され、NAD⁺になると同時に、NADHと等量のリンゴ酸が生成される。続いて、NAD⁺はアルコール脱水素酵素により還元され、NADHに戻ると同時に、NADHと等量のアセトアルデヒドが生成される。このサイクリックな反応がn回繰り返されると、量論的に、もとのNADHのn倍のリンゴ酸とアセトアルデヒドが蓄積される。nを増幅率という。蓄積したリンゴ酸は、過剰のNAD⁺を添加してすべて

NADHに変換した後、NADHを蛍光光度定量する。NAD⁺はNADHと区別なくサイクリングできる。この方法で得られる時間当たりの増幅率は60000である。NADHの蛍光法による定量下限は10⁻¹²Mだから、反応時間1時間で10⁻¹²MまでのNAD⁺およびNADHを測定できる¹⁶⁾。NAD(P)⁺およびNADPHは、グルコース-6-リン酸脱水素酵素とグルタミン酸脱水素酵素を用いるサイクリング反応で、時間当たり20000倍に増幅できる¹⁷⁾。現在、各種補酵素および基質の超微量定量法として20種類以上のサイクリング反応が提案されている。

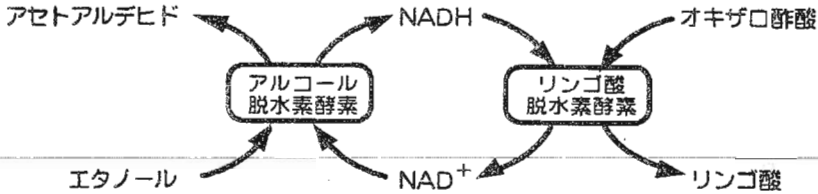


図1 NAD⁺/NADH酵素サイクリングの原理

サイクリング用酵素を同時固定化し、リアクターとして組み込んだ高感度FIAシステムの開発が試みられてきた⁸⁾。最近、Yaoら¹⁸⁾は、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)とNOD活性を有するジアホラーゼをアミノプロピル-CPGに同時固定化したリアクターを用い、サイクリング反応で生成した過酸化水素をヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム・ルミノール化学発光法で検出するNAD(P)⁺とNAD(P)Hの高感度FIAシステムを提案した。図2にサイクリング反応を示す。グルコース-6-リン酸(G6P)と溶存酸素の存在でNAD(P)⁺およびNAD(P)Hはサイクルされ、過酸化水素と6-ホスホグルコン酸(6PG)が生成する。G6PDはNADP⁺だけに活性を示す酵母由来の標品とNAD⁺とNADP⁺の両者に作用する*Leuconostoc mesenteroides*由来の標品が用いられた。このFIAシステムで、分析速度12/hで3x10⁻¹⁰MまでのNADP⁺またはNADPHを、8x10⁻⁹MまでのNAD⁺またはNADHを定量できる。NADP⁺またはNADPHに対する増幅率は600であった。簡単な前処理により、NADP⁺またはNADPH濃度を個別に求めることもできる。

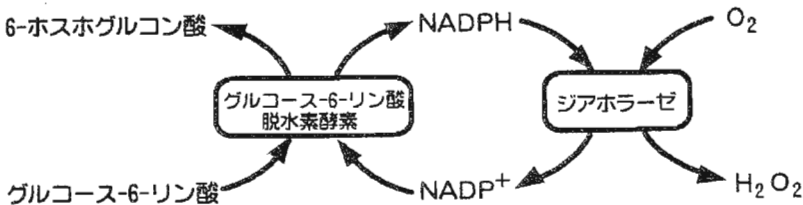


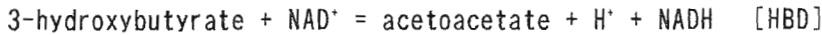
図2 NADP⁺/NADPH酵素サイクリングの原理¹⁸⁾

2.2. 脱水素酵素基質のFIA

a. 3-ヒドロキシ酪酸

3-ヒドロキシ酪酸(HBA)はケトン体と総称される化合物の一つであり、血中および尿中

の濃度は糖代謝の目安となるが、その血中濃度範囲は $10\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ と幅広い。そのため、検量線の直線範囲が広い化学発光法を組み込んだFIAが提案されている^{19,20)}。3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(HBD)とNODを同時固定化したリアクターとヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム・ルミノール化学発光法が用いられた。HBDとNODを同時固定化する利点は、リアクター内で次のように反応が進み、NODがトラッピング酵素としてはたらし、左に傾いているHBD反応の平衡(平衡定数 $=1\times 10^{-9}$)を低い NAD^+ 濃度と低いpHで大きく右に傾けることができる点にある。このシステムを用いて、 $0.2\sim 500\mu\text{M}$ の濃度範囲のHBAを測定できる。この方法は血清中のHBAの迅速定量に応用された。



また、血清中のHBAとD-グルコースを同時に測定できる高感度FIAが報告されている。上記の同時固定化HBD/NODリアクターとグルコース脱水素酵素とNODを同時固定化したリアクターを並列に置く、二流路分割-再結合流路が用いられた²¹⁾。

b. 分岐鎖アミノ酸

ロイシン脱水素酵素(LeuD)とNODを同時固定化したリアクターを組み込んだFIAシステムによる分岐鎖アミノ酸の高感度定量法が開発された²²⁾。固定化LeuDリアクターを用いる蛍光検出FIAでは、酸化的脱アミン反応の平衡が大きく左に傾いているため($K=10^{-14}$)、pH11、 $10\text{mM}\text{NAD}^+$ の分析条件が必要であるが、本リアクターではpH10、 $2\text{mM}\text{NAD}^+$ が最適条件であった。さらに、 NAD^+ とルミノールを含むキャリアー溶液を用いることにより、従来のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム・ルミノール化学発光検出FIAに比して6.5倍の高感度化を達成している。 $0.5\mu\text{M}$ までの分岐鎖アミノ酸を分析速度 $15/\text{h}$ で定量可能であった。

c. グリセリン

グリセロール脱水素酵素とNODを別々に固定化したリアクターを直列に使用した化学発光検出FIAの定量下限は $100\mu\text{M}$ であるが²³⁾、それらを同時固定化したリアクターを用いると $0.3\mu\text{M}$ に改善される²⁴⁾。これらの方法はワイン分析に応用された。

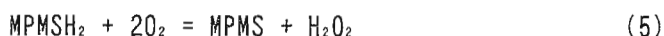
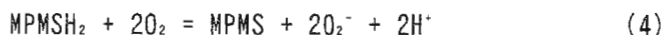
d. リンゴ酸

同時固定化リンゴ酸脱水素酵素(MDH)/NODリアクターを用いるリンゴ酸の高感度FIAが研究されたが、高いMDH活性のリアクターが得られず、固定化MDHリアクターを用いる蛍光検出FIAに比して2倍しか高感度化されていない²⁵⁾。定量下限は $0.3\mu\text{M}$ であった。本システムはワイン分析に用いられたが、赤ワイン中の色素が酵素を失活させるため、前処理が必要である。

3. メトキシPMSを用いる方法

NADH および NADPH の測定には、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェイ

ト(メトキシPMS、MPMS)を電子伝達体として介在させ、テトラソリウム塩の還元で生成する有色ホルマゼンを吸光光度定量する方法が用いられている²⁶⁾。田部ら²⁷⁾は、NAD(P)HとMPMSとの反応で、還元発色試薬が存在しないと、NOD反応と同様に、生成した還元型MPMS(MPMSH₂)が溶存酸素を1および2電子還元し、下式に示すように、O₂と過酸化水素を生成することを見いだした。実際には、O₂は溶液中で過酸化水素にすばやく変換されるので、(4)式と(5)式は区別できない。



NADH、NADPHとMPMSの反応の最適pHはそれぞれ9.5と9.0であり、反応は約2分で完結する。生成した過酸化水素をマイクロペルオキシダーゼ・イソルミノール化学発光法を用い、反応開始後15秒から6秒間の発光を測定した。検量線は10⁻⁹~10⁻⁶Mの範囲で良い直線関係を示した。

3.1. 脱水素酵素基質のFIA

a. 胆汁酸

固定化3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素(HSD)リアクターとMPMS反応を組み込んだ胆汁酸の化学発光検出システムが提案されている²⁸⁾。システムはNAD⁺を含むキャリアー溶液、MPMS溶液、マイクロペルオキシダーゼ・イソルミノール溶液を用いる3流路系で、検量線は0.3~5 μMの濃度範囲で良い直線関係が得られた。胆汁酸スルファターゼ(BSS)とHSDを同時固定化したリアクターを組み込んだFIAシステムが硫酸包含胆汁酸(SBA)の高感度定量に提案された²⁹⁾。SBAはBSSの触媒作用により脱硫酸され、3β-ヒドロキシ胆汁酸になる。システムはNAD⁺とMPMSを含むキャリアー溶液を用いることにより、酵素リアクター中でのMPMS反応による反応率の向上と流路の単純化をはかり、0.1 μMまでのSBAの定量が可能となった。

b. 3-ヒドロキシ酪酸

固定化HBDリアクターとMPMS反応を利用するHBAの高感度FIAが報告されている³⁰⁾。システムはNAD⁺溶液、緩衝液、MPMS溶液、ルミノール溶液、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液の5流路と複雑であるが、0.5~300 μMの範囲のHBAの測定が可能である。

c. メタノール

Sekineらは、アルコール脱水素酵素(AOD)、カタラーゼ(CAT)、ホルムアルデヒド脱水素酵素(FAD)の反応をリアクター中で逐次行わせることにより、エタノール中のメタノールをFIAにより化学発光検出する方法を提案した³¹⁾。リアクター中で、AODはメタノールと反応し、ホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する。試料中の多量に存在するエタノールも反応し、過酸化水素とアセトアルデヒドを生成する。過酸化水素はCATで分解される。ホルムアルデヒドはFDHと特異的に反応し、等量のNADHが生成する。システムは

NAD⁺とMPMSを含むキャリアー溶液とペルオキシダーゼ・ルミノール溶液の2流路系である。100倍濃度のエタノールの共存は妨害しない。

d. ATP

ヘキソキナーゼ(HK)とG6PDを同時固定化したリアクターを組み込んだATPのFIAシステムが提案されている²⁸⁾。ATPはリアクター中で次の2段階の反応によってNADHを生成する。システムは、グルコース、NADP⁺およびMg²⁺を含むキャリアー溶液、MPMS溶液およびマイクロペルオキシダーゼ・イソルミノール溶液を用いる3流路系である。検量線は0.1~10μMの濃度範囲で良い直線性を示した。



4. おわりに

化学発光反応と固定化酵素リアクターを組み合わせたNAD(P)Hと基質のFIAを紹介した。これらの方法は定量下限での繰り返し精度(repeatability)はいずれも6%以下であると報告されている。しかし、再現性(reproducibility)とそれへの影響が大きい固定化酵素リアクターと発光溶液の安定性に関する詳しい記載がない場合がある。

精確さを維持したままFIAをさらに高感度化する試みの1つに、フローセル中で酵素反応と化学発光反応を同時に進行させる方法が検討されている^{32,33)}。脱水素酵素反応の最適pHはルミノール反応のそれと近いものが多い。脱水素酵素反応、過酸化水素生成反応および化学発光反応を検出器中で同時に進行させれば、10倍以上の高感度化が可能となるであろう。

生物発光は化学発光よりはるかに発光効率が高いが、現在、それに関連する安定な酵素標品は調製されていない。遺伝子工学の進歩により安定で安価な酵素が入手できるようになれば、生物発光検出FIAが次世代の高感度分析法の一つとして実用化されると思われる。

引用文献

- 1)本水昌二：J.Flow Injection Anal., 5, 71(1988).
- 2)酒井忠雄, 大野典子：J.Flow Injection Anal., 10, 2(1993).
- 3)小熊幸一：J.Flow Injection Anal., 10, 137(1993).
- 4)八尾俊男：J.Flow Injection Anal., 2, 115(1985).
- 5)陳 力騏, 松本 清：J.Flow Injection Anal., 12, 167(1995).
- 6)宗森 信：J.Flow Injection Anal., 2, 13(1985).
- 7)青木豊明：J.Flow Injection Anal., 11, 24(1994).
- 8)八尾俊男：J.Flow Injection Anal., 9, 2(1992).
- 9)辻 章夫, 前田昌子：J.Flow Injection Anal., 7, 87(1990).

- 10)石井幹太, 山田正昭 : J.Flow Injection Anal., 11, 154(1994).
- 11)樋口允子 : 化学と生物, 35, 547(1997).
- 12)水谷文雄, 津田圭四郎 : 日本化学会誌, 531(1987).
- 13)岡本雅司, 前田昌子, 辻 章夫 : 分析化学, 43,389(1994).
- 14)O.Warburg, W.Christian, A.Griese : Biochem.Z., 282, 157(1935).
- 15)O.H.Lowry, J.V.Passonneau : A Flexible System of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1972.
- 16)T.Kato, S.J.Berger, J.A.Carter, O.H.Lowry : Anal.Biochem., 53, 86(1973).
- 17)O.H.Lowry, J.P.Passoneau, D.W.Schiz, M.K.Rock : J.Biol.Chem., 236, 2746 (1961).
- 18)T.Yao, H.Ogawa, T.Nakahara : Talanta, 42, 1297(1995).
- 19)N.Kiba, H.Koemado, J.Inagaki, M.Furusawa : Anal.Chim.Acta, 298, 129(1993).
- 20)M.Tabata, M.Totani, Anal.Biochem., 229, 133(1994).
- 21)N.Kiba, H.Koemado, M.Furusawa : Anal.Sci., 11, 605(1995).
- 22)N.Kiba, A.Kato, M.Furusawa : Anal.Chim.Acta, 311, 71(1995).
- 23)S.Kondrudruweit, B.A.A.Dremel, R.D.Schmid : Anal Lett., 27, 1489(1994).
- 24)N.Kiba, N.Azuma, M.Furusawa : Talanta, 43, 1761(1996).
- 25)N.Kiba, J.Inagaki, M.Furusawa : Talanta, 42, 1751(1995).
- 26)M.Ishiyama, Y.Miyazono, M.Shiga, K.Sasamoto, Y.Ohkura, K.Ueno : Anal Sci., 12, 515(1996).
- 27)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).
- 28)M.Maeda, A.Tsuji, N.Ohshima, M.Hukuoka : J.Biolumi.Chemilumi., 8, 241(1993).
- 29)高 秀峰,池 弘錫,池袋一典,馬場茂明,軽部征夫,李 永生 : 分析化学,46, 357(1997).
- 30)N.Kiba, H.Koemado, M.Furusawa : Anal.Chim.Acta, 290, 357(1994).
- 31)Y.Sekina, M.Suzuki, T.Takeuchi, E.Tamiya, I.Karube : Anal.Chim.Acta, 208, 179(1993).
- 32)G.Blankenstein, F.Preuschoff, U.Spohn, K.-H.Mohr, M.R.Kula : Anal.Chim. Acta, 271, 231(1993).
- 33)U.Spohn, F.Preuschoff, G.Blankenstein, D.Janasek, M.R.Kula, A.Hacker : Anal.Chim.Acta, 303, 109(1995).