

基質リサイクリング酵素リアクターを 増幅素子として用いた高感度 F I A

八尾俊男

大阪府立大学工学部応用化学教室
〒591 堺市百舌鳥梅町 4丁804

HIGHLY SENSITIVE FLOW-INJECTION ANALYSIS USING ENZYME REACTOR INVOLVING
AMPLIFICATION BY SUBSTRATE RECYCLING

Toshio YAO

Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of
Osaka Prefecture, Mozu-Umemachi, Sakai, Osaka 591

1. はじめに
2. 酵素リサイクリングの原理
3. 増幅型酵素電極から増幅型酵素リアクターへ
4. 増幅型酵素リアクターを用いたFIA
 4. 1 リン酸
 4. 2 L-グルタミン酸
 4. 3 L-乳酸
 4. 4 ニコチンアミド補酵素
 4. 5 グルコース
5. おわりに
6. 文献

1. はじめに

酵素の機能には分子認識機能、物質変換機能、物質合成機能、触媒機能、構造異性体及び光学異性体分離機能、増幅機能等があり、これらの機能はいずれも特定の物質に対して高選択的（時には特異的）である。この様に多様で高選択的な機能を有する酵素を、フローインジェクション分析法に取り入れることで、多種多様な高マトリックス試料中の特定成分の簡易、迅速な分析に、格段の進歩をもたらしたことは周知の事実である。

研究の初期には溶液酵素が用いられていたが、分析コストの点で、現在では固定化酵素が実用上用いられるようになってきている。また、最近では、固定化酵素の分子認識素子としての機能から、数種の酵素リアクターを組み合わせることによって、複数成分の同時定量にも応用されている。更に、固定化酵素/FIA システムをHPLCの分離カラムの出口に接続することで、特異的なポストカラム反応検出器としても利用されるようになってきている。この様に固定化酵素を用いたFIA法は、FIA法の多様性と酵素機能の多様性とが結合することにより、FIA研究に大きな進歩をもたらしたわけであるが、感度の面で充分とは言い難い場合も多く認められ、高感度化への要求も高まりつつある。固定化酵素/FIA法をより高感度な測定法にするために、最近では検出法をより高感度にする試みがあり、化学発光・生物発光法が注目され、その基礎的研究と応用研究が盛んに行われており、本誌にも総説¹⁾があるので参照されたい。一方、固定化酵素部位を高感度にする試みがある。これは二つの酵素によるリサイクリング反応に基づいた増幅方法であり、一般に酵素増幅(Enzyme Amplification)と呼ばれ、検出感度を著しく向上できる。本稿では、このような増幅型酵素リアクターの反応設計と応用研究について、最近の著者らの研究を含めて解説することにする。

2. 酵素リサイクリングの原理

図1に、増幅型酵素リアクターの一般的な増幅モデルを示す。この酵素リアクターはEnz 1とEnz 2がリアクターに同時固定化されており、キャリアー溶液に反応基質として S_2 と S_3 が共存する場合、注入された試料中の基質 S_1 は、Enz 2により P_1 に変換され、更にEnz 1により S_1 を再生する。同時に生成物 P_2 と P_3 を生成する。つまり、二つの酵素によるリサイクリング反応により、多量の生成物 P_2 と P_3 を生成するので、このどちらかを下流にある検出器で検出することによって、 S_1 と P_1 に対して著しく増幅されたシグナルを得ることが期待できる。

この増幅原理では、増幅率はEnz 1とEnz 2によ

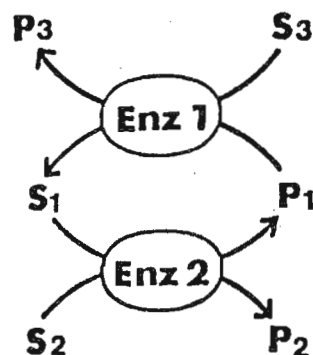


Fig. 1. Substrate recycling model.

る酵素反応のターンオーバー数に比例することから、両酵素反応速度を高める最適な測定条件、例えばキャリアー溶液のpH、イオン強度、酵素反応賦活剤の添加とその濃度、温度、反応基質 (S_2 と S_3) の濃度、を設定する必要がある、更にその測定条件が両酵素反応に共有するものでなくてはならない。また、リアクターのサイズはサンプルゾーンの分散度に影響を与えるので、ピーク高さを取る場合にはなるべく小さなサイズのリアクターを用いる必要がある。しかし、リアクターのサイズが小さくなれば、一般に増幅率が減少するので、酵素を小さなリアクターに高密度に、また安定に固定化する必要がある。

3. 増幅型酵素電極から増幅型酵素リアクターへ

酵素反応を利用した増幅型センサーは、初め酵素標識による酵素免疫センサーに導入されたのがその代表的な例である。一方、ここで述べた酵素リサイクリング反応による増幅の原理は、グルコース^{2, 3)}、 NAD^+ - $NADH$ ⁴⁾、L-乳酸^{5, 6, 6)}、L-グルタミン酸^{6, 7)}、フェロセン⁸⁾等の酵素電極に適用され、高感度化への試みがなされてきた。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、増幅を起こさせるに充分な量の酵素を保持しているとは云い難く、一般に増幅率に限界があり、一部の酵素センサー^{6, 7)}を除いて満足のいくものではない。

一方、酵素リアクターは必要充分な量の酵素を保持できるので、一般に注入された試料中の基質の全てを生成物に酵素変換することができる。この酵素リアクターの特性は基質リサイクリングにとって好ましいものであり、大きな増幅率を得ることが期待できる。更に、増幅型酵素リアクターをFIAの増幅素子として用いることにより、特定の分析種をオンラインで増幅して検出できるので、分析の自動化にも適している。そこで、現在までに発表された増幅型酵素リアクターを用いたFIAについて、その概略を以下に示すことにする。

4. 増幅型酵素リアクターを用いたFIA

Table 1には、基質リサイクリング酵素リアクターを用いた増幅に関して発表された研究を、用いた酵素の組合せ、検出物質と検出方法、増幅率、検出下限に分けて示した。以下に、測定物質ごとにその詳細を示すことにする。

4. 1 リン酸⁹⁾

固定化酵素リアクターを用いたFIAでリン酸を計測するには、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)とキサンチンオキシダーゼ(XO)を固定化したリアクターを用い、キャリアー溶液に反応基質としてイノシンを加えておけば、式(1)と式(2)の連続的な酵素反応により、尿酸と過酸化水素を生成するので、これを電気化学検出器で電流測定することで、リン酸を計測できる。この酵素の組合せに、さらにアルカリ性ホスファターゼ(AP)を加えて固定化したリアクターでは、図2に示したリン酸のサイクリング反応が起こる。つまり、キャリアー溶液にイ

Table 1 The use of immobilized enzyme reactors involving amplification by substrate recycling

Substrate	Enzymes	Optimum carrier solution	Temp. (°C)	Detected species	Detection method	Amplification factor	Detection limit(mol)	Ref.
phosphate	purine nucleoside phosphorylase/ alkaline phosphatase /xanthine oxidase	0.1M borate buffer (pH 7.5) containing 5mM inosine and 1mM MgCl ₂	39	uric acid	Amperometry	12	6 pmol	9)
L-glutamate	L-glutamate oxidase /glutamic-pyruvic transaminase	0.1M phosphate buffer (pH 7.2) containing 1mM L-alanine	37	H ₂ O ₂	Amperometry	24	1 pmol	10)
L-lactate	lactate oxidase/ lactate dehydro- genase/catalase	0.1M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1mM NADH	30	heat of reaction	Calorimetry (thermistor)	1000	5 pmol	12)
	lactate oxidase/ lactate dehydro- genase	0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3mM NADH	25	O ₂	Amperometry (O ₂ electrode)		0.24 nmol	13)
	lactate oxidase/ lactate dehydro- genase	0.1M phosphate buffer (pH 7.3) containing 0.5mM NADH	22	Fe(CN) ₆ ³⁻	Amperometry (POD electrode)	400	0.02 pmol	14)
	lactate oxidase/ lactate dehydro- genase	0.015M phosphate buffer (pH 6.8) containing 1.5mM NADH	20	H ₂ O ₂	Chemiluminescence	140	2.4 pmol	15)

Table 1 Continued

Substrate	Enzymes	Optimum carrier solution	Temp. (°C)	Detected species	Detection method	Amplification factor	Detection limit(mol)	Ref.
NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ , NADPH	glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.1M carbonate buffer (pH 8.5) containing 2mM glucose -6-phosphate and 0.2mM PMS ⁺	35	PMSH	Amperometry	18	6 pmol	17)
	glucose-6-phosphate dehydrogenase/ diaphorase	0.1M carbonate buffer (pH 7.5) containing 2mM glucose -6-phosphate and 0.5mM Fe(CN) ₆ ³⁻	35	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	Amperometry	6	20 pmol	17)
NAD ⁺ , NADH	alcohol dehydro- genase/malate dehydrogenase	0.1M phosphate buffer (pH 9.0) containing 0.2% ethanol and 1.5mM oxaloacetic acid	25	acet- aldehyde or malate	Photometry		24 pmol	18)
	glucose-6-phosphate dehydrogenase/ lactate dehydro- genase/lactate oxidase	0.1M carbonate buffer (pH 8.1) containing 1mM glucose -6-phosphate, 0.3mM pyruvate and 1mM MgCl ₂	22	H ₂ O ₂	Amperometry	400	0.1 pmol	19)
glucose	glucose oxidase/ glucose dehydro- genase/catalase	0.1M phosphate buffer (pH 7.0) containing 3mM NADH	30	heat of reaction	Calorimetry (thermistor)	3	5 nmol	12)
	glucose oxidase/ glucose dehydro- genase	0.1M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.5mM NADH	20	H ₂ O ₂	Chemiluminescence	3.5	0.5 nmol	15)

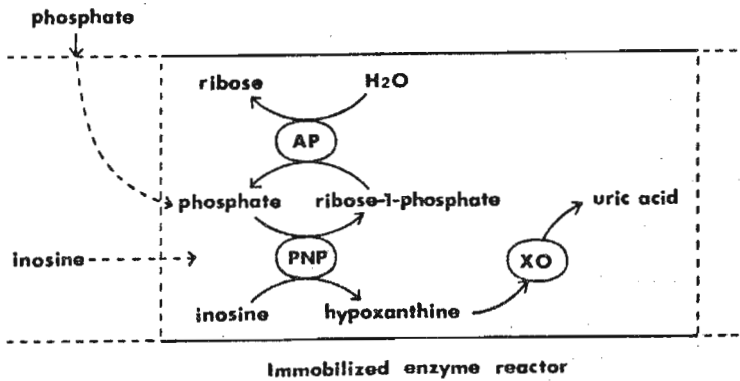
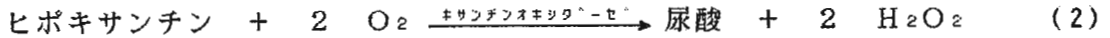
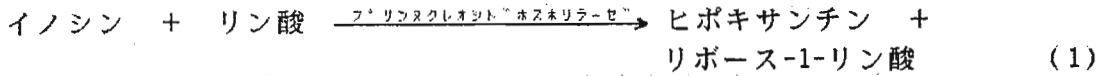


Fig. 2. Enzymatic recycling model of phosphate in the purine nucleoside phosphorylase(PNP)/xanthine oxidase(XO)/alkaline phosphatase(AP) coimmobilized reactor.

ノシンが過剰に存在すると、APとPNPの間でリン酸のサイクリング反応が起こり、多量のヒポキサンチンを生成する。これをXOで尿酸に変換して、グラッシーカーボン電極で電流検出する。表2に、非増幅型リアクター（PNP + XO）と増幅型リアクター（AP/PNP + XO）を用いた場合の、リン酸やその他のイオン、またヌクレオチドに対する応答の選択性を示す。（PNP + XO）リアクターではほぼ特異的にリン酸に反応するが、（AP/PNP + XO）リアクターではリン酸以外にピロリン酸や各種のヌクレオチドにも反応する。これはピロリン酸やヌクレオチドがAPで加水分解されリン酸を脱離し、これがAPとPNPによる増幅過程に取り込まれるためであり、後者のリアクターは有機リン化合物の測定にも利用することができる。

4. 2 L-グルタミン酸¹⁰⁾

L-グルタミン酸を増幅して検出できる酵素リアクターを図3に示す。酵素の組合せには、L-グルタミン酸オキシダーゼ（G10D）とグルタミクーパーピルビクトランスアミナーゼ（GPT）が用いられている。キャリアー溶液にL-アラニンが共存すると、G10DによりL-グルタミン酸から生成した2-ケトグルタル酸は、GPTによりL-グルタミン酸を再生し、右回りの基質サイクリング反応が起こり、大量の過酸化水素を生成するので、これを下流にある白金電極で電流検出している。増幅率や検出下限などは表1に示されている。このリアクターは光学異性体分離機能を

有しており、L体を増幅するがD体には全く応答しない。

Table 2 Substrate selectivity of the proposed method
(phosphate=100)

Substrate ^a	Relative response ^b	
	FIA system without amplification	FIA system with amplification
Phosphate	100	100
Pyrophosphate	0.2	56
Inosine-5'- monophosphate	0	100
Inosine-5'- diphosphate	0	97
Inosine-5'- triphosphate	0	100
Adenosine-5'- monophosphate	0	97
Adenosine-5'- diphosphate	0	102
Adenosine-5'- triphosphate	0	100

^a As the sodium salts. ^b At concentrations of $2 \times 10^{-5} M$.
The following gave zero relative responses in both instances:
sulphite, sulphate, nitrite, nitrate, chlorate, iodate,
bromate, thiocyanate, thiosulphate, carbonate, acetate,
lactate, tartrate, citrate, succinate, oxalate, and ammonium
(as chloride).

4.3 L-乳酸

酵素反応は熱量変化を伴うので、サーミスターを用いた熱計測によるFIAの研究も盛んに行われており、本誌にもその総説¹¹⁾がある。Schellerら¹²⁾は、このような熱計測FIAに、乳酸酸化酵素と乳酸脱水素酵素とカタ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組み込み、L-乳酸の高感度検出を行っている。図4に増幅モデルを示すが、NADHと酸素が過剰に存在するとL-乳酸はサイクルされ、多量の過酸

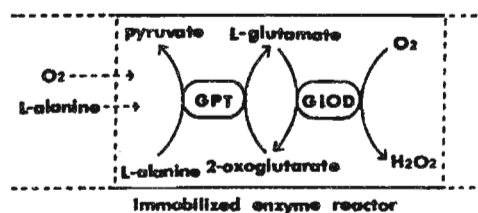
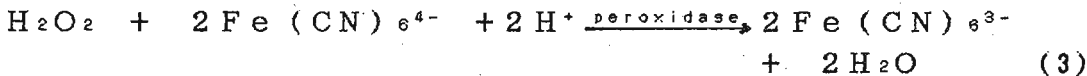


Fig. 3. Enzymatic recycling model of L-glutamate in the L-glutamate oxidase (GLOD)/glutamic-pyruvic transaminase(GPT) coimmobilized reactor.

化水素を生成する。生成した過酸化水素は、さらにカタラーゼにより酸素に分解される。これらの三種の酵素反応による総熱量変化が計測され、L-乳酸に対して最大1000倍の増幅率が得られると報告されている。

Asouzuら¹³⁾は乳酸酸化酵素と乳酸脱水素酵素を同時固定化したリアクターを用い、基質リサイクリング反応によって多量に消費された酸素を酸素電極で検出するFIAシステムを提案したが、検出下限はあまり良くない。

著者ら¹⁴⁾も同様の酵素組成のリアクターを用い、検出器にペルオキシダーゼを固定化した電極によって、リアクターで生成した多量の過酸化水素を最終的にヘキサシアノ鉄(III)酸イオンに変換して{式(3)}、0 V (vs. Ag/AgCl)で検出で



きるFIAシステムを提案した。このFIAシステムでは、0.02 pmolまでのL-乳酸を高感度検出できる。更に、このFIAシステムをODS逆相カラムを用いたHPLCのポストカラム検出器として用いることによって、L-乳酸とピルビン酸の両成分を分離して、高感度検出している。

また、Hansenら¹⁵⁾は同様の酵素リアクターを用い、基質リサイクリング反応の結果、生成した過酸化水素をルミノール化学発光法で検出している。

4.4 ニコチンアミド補酵素

ニコチンアミド補酵素(NAD⁺, NADP⁺)とそれらの還元型(NADH, NADPH)を固定化酵素/FIA法で検出するには、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)を固定化したリアクターを用い、NAD⁺とNADP⁺をそれぞれNADHとNADPHに変換し{式(4)}、フェナジンメトサルフェート(PMS⁺)と反応させ、生成した還元型PMSHを白金電極で電流検出することで{式(5), (6)}、四種のニコチンアミド補酵素に対して同一の感度で測定できるFIA法が提案されている¹⁶⁾。

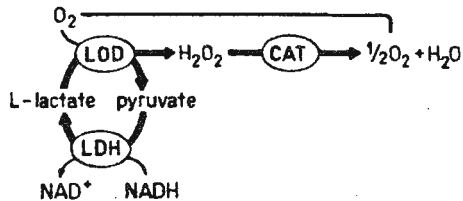
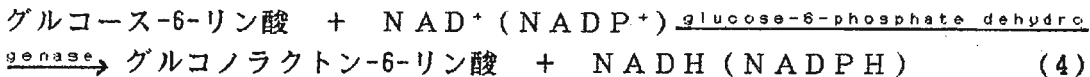
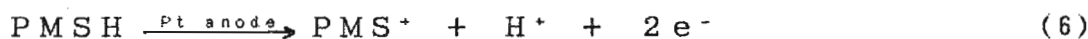
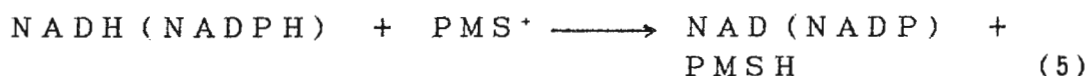


Fig. 4. Enzymatic recycling model of L-lactate in the lactate oxidase(LOD)/lactate dehydrogenase(LDH)/catalase(CAT) coimmobilized reactor.



増幅型酵素リアクターを用いた最初の例¹⁷⁾を図5に示す。図5のAは、キャリア溶液にグルコース-6-リン酸(G6P)とPMS⁺を加えておくと、酵素反応/化学反応リサイクリングによって、ニコチンアミド補酵素に対して増幅された応答を与える。図5のBは、キャリア溶液にG6Pとヘキサシアノ鉄(III)酸イオンの過剰量を加えておくと、G6PDHとジアホラーゼによるサイクリング反応によって、若干の増幅応答を与える。両酵素リアクターは四種のニコチンアミド補酵素に対してほぼ同等の感度の増幅応答を与えた。

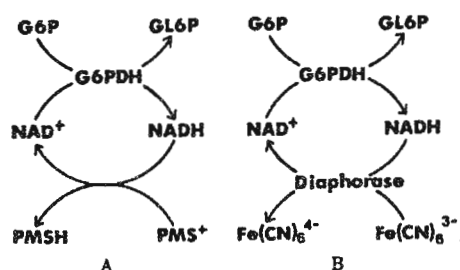


Fig. 5. Enzymatic recycling model of nicotinamide coenzymes. A: Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) immobilized reactor system; B: G6PDH/diaphorase co-immobilized reactor system.

Townshendら¹⁸⁾は、アルコール脱水素酵素とマレイン酸脱水素酵素を同時固定化した増幅型リアクターを用いて、NAD⁺とNADHを増幅して吸光度測定を行っている。増幅率は記載されていないが、検出下限はG6PDH/ジアホラーゼリアクターの場合とほぼ同等である。

NAD⁺とNADHに対して最も大きな増幅率が得られたのが次の例¹⁹⁾である。増幅モデルを図6に示す。ここで用いられた酵素はG6PDHとL-乳酸脱水素酵素(LDH)とL-乳酸酸化酵素(LOD)の三種の酵素を同時固定化したもので、キャリア溶液に反応基質としてG6Pとピルビン酸を過剰に加えておくと、G6PDHとLDHによるサイクリング反応により、多量のL-乳酸を生成するので、これをLODによりピルビン酸に変換すると共に、最終生成物として多量の過酸化水素を生成する。これを白金電極で電流検出することでNAD⁺とNADHに対してかなり増幅された応答が得られた。増幅応答と非増幅応答に対する検量線が比較されている

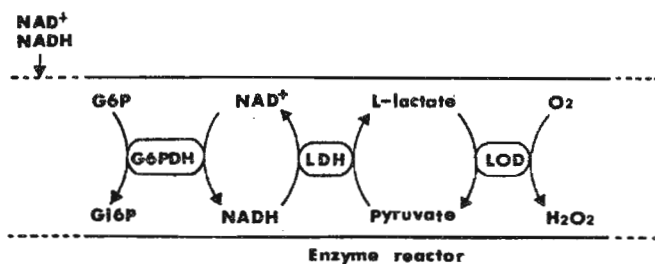


Fig. 6. Enzymatic recycling model of NAD⁺ and NADH in the G6PDH/LOD/LDH coimmobilized reactor.

が、約400倍の増幅率が得られている。

4. 5 グルコース^{12, 15)}

グルコースを増幅して検出するには、グルコース酸化酵素 (GOD) とグルコース脱水素酵素 (GDH) を同時固定化したリアクターが用いられている。その増幅モデルを図7に示す。GODの作用でグルコースから生成したグルコノラク톤は、グルコン酸に速やかに加水分解するので、基質リサイクリングが効率よく起こらないことから、一般に増幅率は数倍程度である。

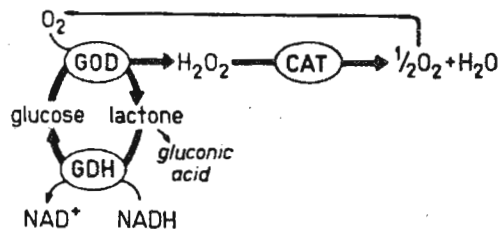


Fig. 7. Enzymatic recycling model of glucose in the glucose oxidase (GOD)/glucose dehydrogenase (GDH)/catalase (CAT) coimmobilized reactor.

5. おわりに

通常の酵素リアクターは酵素の分子認識機能と物質変換機能を利用しているため、高マトリックス試料中の特定成分の高選択的な分析に用いられてきた。一方、増幅型酵素リアクターはこれらの機能の他に、酵素の持っている最大の機能の一つである触媒機能を有効利用したもので、特定の成分をオンラインで増幅できることから、いろいろな高感度検出器と組み合わせることによって、さらに高感度なFIAシステムを構築することも可能である。

増幅型酵素リアクターをFIAに用いた場合、現在のところ、LOD/LDHリアクターを用いたL-乳酸とピルビン酸の検出、G6PDH/LDH/LODリアクターを用いたNAD⁺とNADHの検出に対して数百倍の増幅率が得られている。しかし、この増幅率はキャリア流量が0.4 ml/minの場合であり、増幅率は試料ゾーンのリアクター内での滞留時間に比例するので、キャリア溶液の流量に大きく依存することが分かっている。例として、図8に、LOD/LDHリアクターを用いた場合の増幅率とキャリア流量との関係を示すが、低流量で大きな増幅率が得られることが分かる。そこで、ストップフロー方式のFIAが増幅型酵素

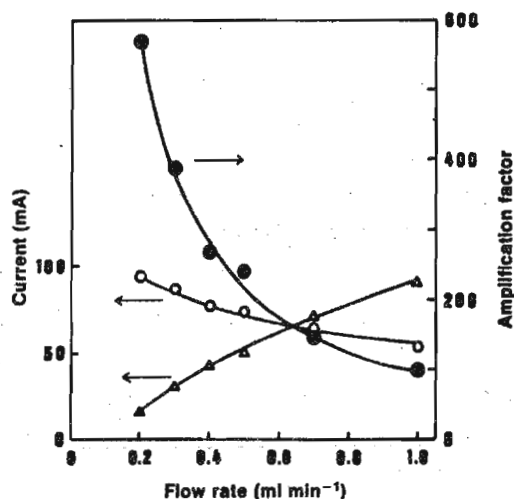


Fig. 8. Effect of the carrier flow rate on substrate amplification in the LOD/LDH coimmobilized reactor. ○, Amplified current (10 μl injection of 0.5 μM L-lactate); △, no amplified current (10 μl injection of 0.1 mM L-lactate); and ●, amplification factor.

リアクターに最適な方法と考えられるので、後の研究の成果に期待する。

6. 文献

1. 辻 章夫、前田昌子: J. Flow Injection Anal., 7, 87 (1990).
2. D. Pfeiffer, F. Scheller, M. Janchen and K. Bertermann: Biochimie, 62, 587 (1980).
3. F. Schubert, D. Kirstein, K.L. Schroder and F.W. Scheller: Anal. Chim. Acta, 169, 391 (1985).
4. A.A. Malinauskas and J.J. Kulys: Biotechnol. Bioeng., 21, 513 (1979).
5. F. Mizutana, T. Yamada, Y. Tanabe and K. Tsuda: Anal. Chim. Acta, 177, 153 (1985).
6. F. Scheller, U. Wollenberger, F. Schubert, D. Pfeiffer and V. Bogdanovskaya: GBF Monogr., 10, 39 (1987).
7. T. Yao, H. Yamamoto and T. Wasa: Anal. Chim. Acta, 236, 437 (1990).
8. T. Yao, H. Yamamoto and T. Wasa: Chem. Express, 5, 125 (1990).
9. T. Yao, N. Kobayashi and T. Wasa: Anal. Chim. Acta, 238, 339 (1990).
10. T. Yao, N. Kobayashi and T. Wasa: Electroanalysis, 2, 563 (1990).
11. 佐藤生男: J. Flow Injection Anal., 8, 111 (1991).
12. F. Scheller, N. Siegbahn, B. Danielsson and K. Mosbach: Anal. Chem., 57, 1740 (1985).
13. M.U. Asouzu, W.K. Nonidez and M.H. Ho: Anal. Chem., 62, 708 (1990).
14. T. Yao, N. Kobayashi and T. Wasa: Electroanalysis, 3, 493 (1991).
15. E.H. Hansen, L. Norgaard and M. Pedersen: Talanta, 38, 275 (1991).
16. T. Yao, Y. Matsumoto and T. Wasa: Anal. Chim. Acta, 218, 129 (1989).
17. 八尾俊男、松本義宏、和佐 保: 分析化学、38, 109 (1989).
18. A.M. Almuiabed and A. Townshend: Anal. Proc., 26, 56 (1989).
19. T. Yao, N. Kobayashi and T. Wasa: Anal. Chim. Acta, 248, 345 (1991).