

固定化酵素／フローインジェクション分析法によるアデノシン三リン酸とグルコースー6ーリン酸の同時定量

八尾俊男^{*}、松本義弘、和佐 保

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

Simultaneous Determination of Adenosine-5'-triphosphate and Glucose-6-phosphate Using a Flow-Injection System with Immobilized Enzymes

Toshio Yao, Yoshihiro Matsumoto, and Tamotsu Wasa

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

A flow-injection analytical system with immobilized enzyme reactors is described for the high-selective and high-sensitive simultaneous determination of glucose-6-phosphate (G6P) and adenosine-5'-triphosphate (ATP). The sample is split, so that part passes through an immobilized glucose-6-phosphate dehydrogenase reactor, before passing through an immobilized hexokinase reactor. The other part only passes through the latter reactor. Separate peaks are obtained for G6P and total of G6P and ATP. The first and second peak-current are linearly related to G6P in the range 0.01 - 4mM and to total of G6P and ATP in the same range, respectively; 30 samples per hour can be processed with a r.s.d. < 2%.

1. 緒言

生体内でのグルコースの代謝経路はいくつか知られているが、その代謝の第一段階はほとんど例外なく、ヘキソキナーゼによるリン酸化であり、アデノシン三リン酸 (ATP) を消費し、グルコース-6-リン酸 (G6P) を生成する。そこで、ATP と G6P を同時に測定すれば、生体内のエネルギー代謝に関するより詳しい知見が得られる¹⁾。本研究では、固定化酵素の基質特異性と反応性を利用し、以前に報告した²⁻⁶⁾分岐点と合流点を持つ2成分同時定量FIA流路に2本の異なった固定化酵素リアクターを組み込み、高感度、高選択的、迅速なATP と G6P の同時定量フローインジェクション分析 (FIA) 法について検討した。

2. 実験

2.1 試薬

ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1; 145 U mg⁻¹, 酵母製)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.49; 400 U mg⁻¹, from *Leuconostoc mesenteroides*), 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)、G6P、ATP はオリエンタル工業製のものを用いた。D-グルコース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の作製

LiChrosorb-NH₂ (Merck製アミノ基結合シリカ、粒子径 10 μ m) への酵素の固定化は、既報²⁻⁶⁾の方法に準じ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5mmと12mm) にLiChrosorb-NH₂を充填し、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2時間洗浄した後、5mmカラムにヘキソキナーゼ (300U) 溶液 (0.1M, pH 7.0リン酸緩衝液) 10mlを、12mmカラムにグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (1000U) 溶液 (0.1M, pH 8.0炭酸緩衝液) 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) で2時間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 °C で保存した。

2. 3 測定システムと方法

測定システムの概略をFig.1 にしめす。装置は送液ポンプ（柳本製作所製RP-203）、インジェクター（Rheodyne 7125）、電気化学検出器（柳本製作所製VMD-101）、記録計（柳本製作所製YR-101A）とフォロースルー型グラッシーカーボン電極等から構成されている。

キャリアー溶液として、0.1mM NAD⁺、2mM D-グルコース、3mM 塩化マグネシウム及び0.1M塩化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）を、一定流量（2.0 ml/min）で送液する。インジェクターから注入された試料ゾーン（10 μl）は、三方接手で2流路に分割される。リアクターEでATPはG6Pに変換され、更にリアクターGでG6Pはグルコノラクトン-6-リン酸に変換されると共に、NAD⁺からNADHを生成する。遅延コイルを図のように入れることによって、リアクターEを通った試料ゾーンはリアクターD（ブランクカラム）を通った試料ゾーンに比べて、一定時間の遅れを伴って検出器（グラッシーカーボン電極）に達し、電流測定される（検出加電圧：0.85V vs. Ag/AgCl）。従って、二つの分離したピークが得られるが、第一ピークはG6P濃度に比例し、第二ピークはG6PとATPの総濃度に比例する。

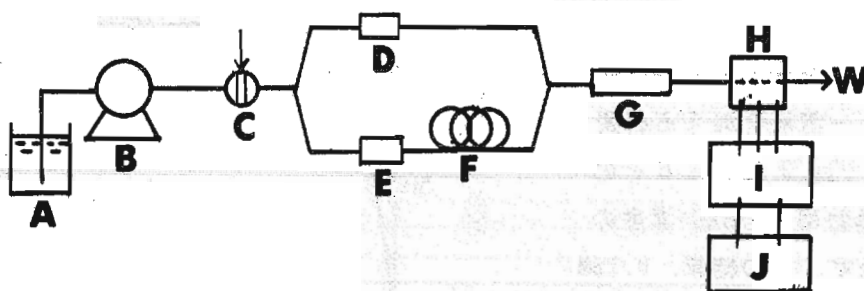
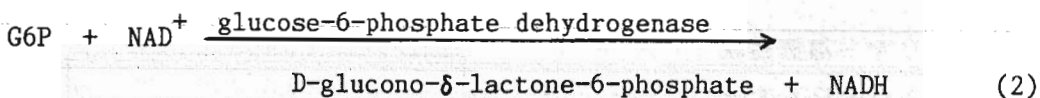
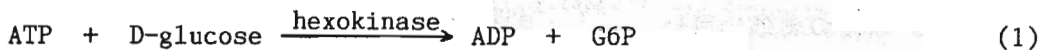


Fig. 1. FIA manifold for simultaneous determination of G6P and ATP.

(A) carrier solution; (B) pump (flow rate, 2.0 ml/min); (C) injector; (D) LiChrosorb-NH₂ packed column (4mm i.d., 5mm long); (E) hexokinase immobilized reactor (4mm i.d., 5mm long); (F) delay coil (0.5mm i.d., 4.0m); (G) glucose-6-phosphate dehydrogenase reactor (4mm i.d., 12 mm long); (H) flow-through glassy carbon electrode; (I) potentiostat; (J) recorder; (W) waste.

3. 結果と考察

3. 1 FIAシステムの 最適操作条件

a) キャリヤー溶液のpH

固定化酵素の活性及び安定性は一般に溶液のpHに依存する。Fig.2 にG6PとATPのピーク電流へのキャリヤー溶液pHの影響を示す。pH 8.0でG6PとATPに対して最大応答が得られ、また酵素変換効率が100%であることから、ATPはヘキソキナーゼ固定化リアクターで定量的にG6Pに変換できたものと考えられる。そこでpH 8.0を最適pHとして選び、以後の実験に用いた。

b) キャリヤー溶液組成

本FIAシステムでは、G6P脱水素酵素を用いているので、補酵素として NAD^+ をキャリヤー溶液に加える必要がある。Fig.3 に、G6Pの酵素変換効率への NAD^+ 濃度の影響を示す。その結果、0.1mM以上の濃度でG6Pは定量的に酵素変換された。又、G6P脱水素酵素の安定化剤として、一般に塩化マグネシウムが用いられているが、キャリヤー溶液に1-6 mMの塩化マグネ

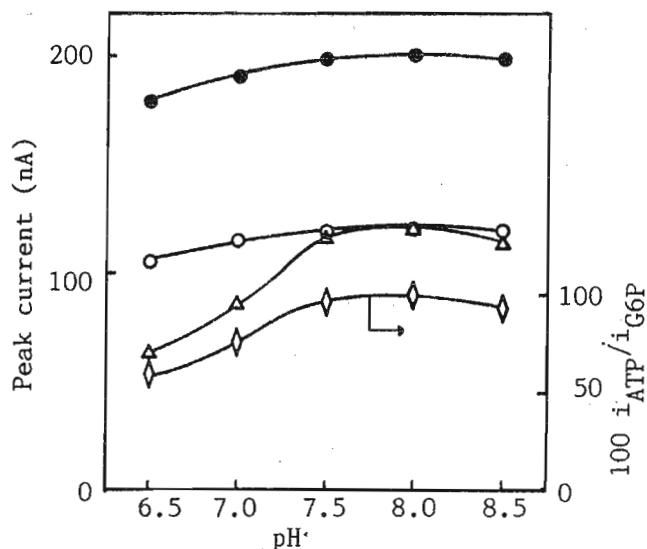


Fig. 2. The pH dependence for 1mM G6P (●, 1st peak; ○, 2nd peak) and 1mM ATP (△) and for enzymatic conversion efficiency (◇, $100 i_{\text{ATP}}/i_{\text{G6P}}$).

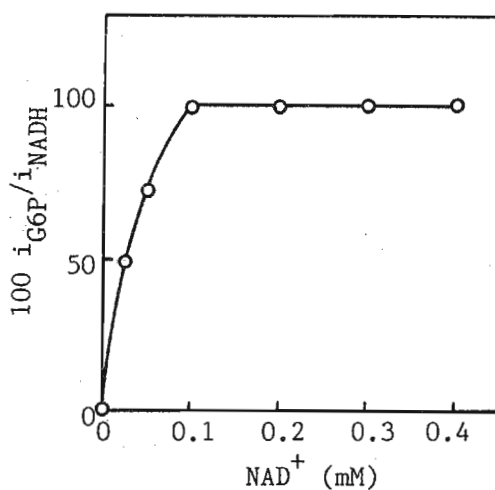


Fig. 3. Effect of NAD^+ concentration on enzymatic conversion efficiency of G6P ($100 i_{\text{G6P}}/i_{\text{NADH}}$).

シウムを加えても、応答電流にはほとんど影響しなかった。しかし、酵素の長期にわたる安定性を考慮して、塩化マグネシウムを 3mM になる様、キャリアー溶液に加えることにした。次に、ヘキソキナーゼ固定化酵素リアクターでの反応に必要な D-グルコース濃度について検討した (Fig. 4)。ATP に対する応答電流は、D-グルコースが 0.2mM 以上でほぼ一定となるが、酵素変換効率は 0.2mM D-グルコースの場合に約 90% であり、酵素変換を定量的に行わせるためには、2mM 以上加える必要があった。以上の検討の結果からキャリアー溶液として、0.1M NAD⁺、2mM グルコース、3mM 塩化マグネシウムと電解質として 0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.05M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.0) を用いることにした。

c) 遅延コイルの長さ

遅延コイルの長さは、第一ピークと第二ピークの分離に影響する。しかし、余りに長すぎると、分離は良

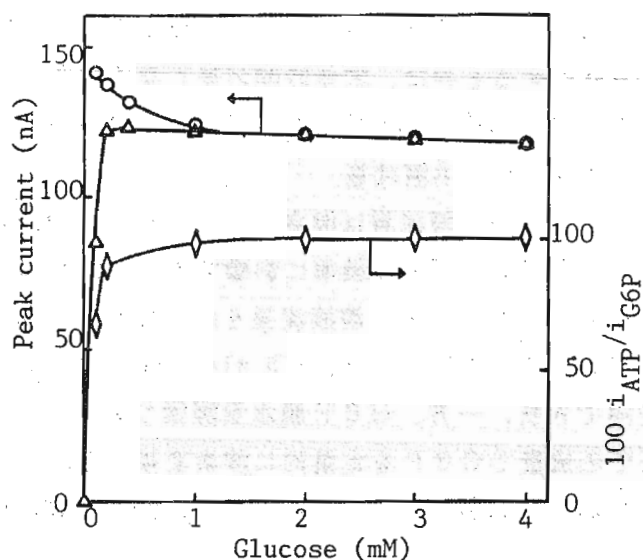


Fig. 4. Effect of glucose concentration on peak current for 1mM ATP (Δ) and second peak (\circ) of 1mM G6P and for enzymatic conversion efficiency (\diamond , $100 i_{ATP}/i_{G6P}$).

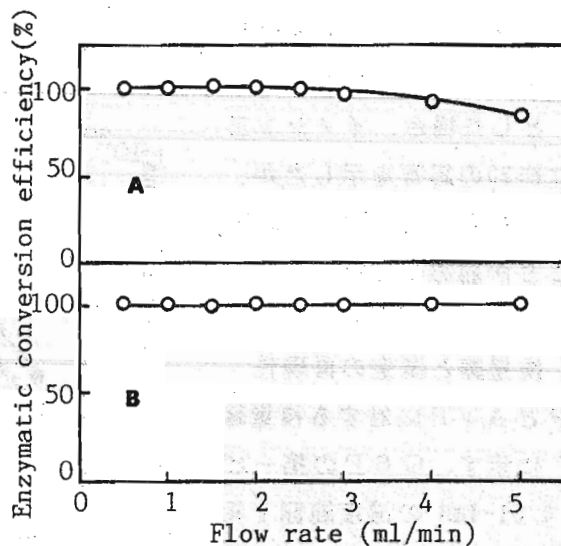


Fig. 5. Effect of flow rate on enzymatic conversion efficiency into hexokinase immobilized reactor (A) and glucose-6-phosphate dehydrogenase immobilized reactor (B).

くなるが、コイル内の試料ゾーンの分散のため、第二ピークは広がり、ピーク高さが減少すると共に、定量時間が長くなる。そこで、分離度、感度、定量速度を考慮して、内径 0.5mm長さ4mのテフロン管を遅延コイルとして用いた。

d) キャリヤー溶液流量

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に依存するので、各酵素反応の変換率に影響する。Fig.5 には、各酵素リアクターでの酵素変換率を、キャリヤー溶液流量を変化させて室温で測定した。ヘキソキナーゼ酵素リアクターの場合には、2.5 ml/minまでの流量で、ATPを定量的にG6Pに変換できた。一方、G6P脱水素酵素リアクターの場合には、検討した5 ml/minまでの流量でG6Pを定量的に酵素変換できた。そこで、キャリヤー溶液流量を2.0 ml/minに設定した。この流量で、毎時30試料の測定が可能であった。

3. 2 基質特異性

ATP以外の高エネルギーリン酸結合を持った他のヌクレオチド類も、ヘキソキナーゼの基質となる可能性がある。そこで、本FIAシステムによる検出の選択性について検討した。その結果、ATPに対する応答を100とした場合、イノシン三リン酸に約33の応答を示したが、他のヌクレオチド類には全く応答しないことが認められた。

3. 3 検量線と測定の再現性

G6PとATPに対する検量線をFig.6 に示す。G6Pの第一ピークは0.01-4mMの濃度範囲で相関係数0.999の直線関係を示した。又、G6Pの第二ピークとATPに対するFIAピークも同じ濃度範囲において相関係数0.997の直線関係を示した。更にG6Pの第

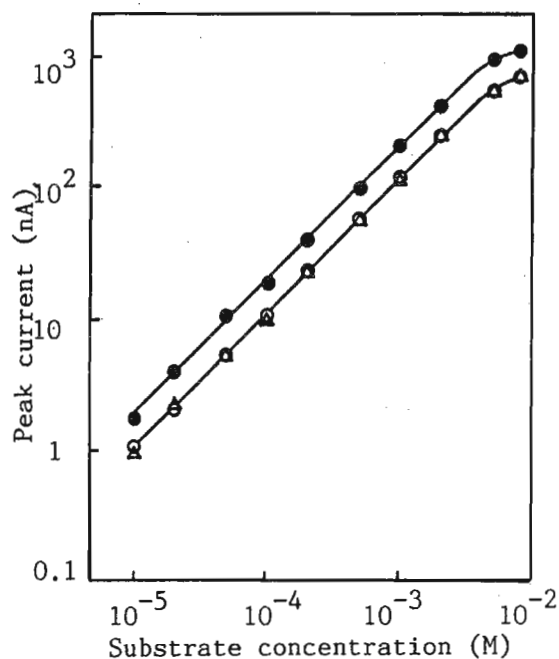


Fig. 6. Analytical calibration graphs for G6P (●, 1st peak; ○, 2nd peak) and ATP (△).

二ピークとATPに対する検量線は全く同一の直線を示したので、実際試料の測定の際には、G6Pの標準溶液を用いて、第一ピークと第二ピークに対する検量線を作製すればよいことになる。

G6PとATPの標準溶液、及びその混合溶液を用いてFIAピークの測定の再現性について検討した。0.1mMの基質濃度で、FIA第一ピークの測定の再現性は相対標準偏差(n=10)で0.82%であった。第二ピークに対しては1.82%であった。又、G6PとATPに対する検出下限(S/N=3)は、それぞれ 1.2×10^{-6} M、 2.3×10^{-6} Mであった。

4. 文献

- 1) F.Scheller and D.Pfeiffer, *Anal. Chim. Acta*, 117, 383 (1980).
- 2) T.Yao and T.Wasa, *Anal. Chim. Acta*, 175, 301 (1985).
- 3) 八尾俊男、松本義弘、和佐保、*J. Flow Injection Anal.*, 4, 112 (1987).
- 4) T.Yao and T.Wasa, *Anal. Chim. Acta*, 207, 319 (1988).
- 5) 八尾俊男、松本義弘、和佐保、*分析化学*, 37, 236 (1988).
- 6) T.Yao, R.Akasaka, and T.Wasa, *J. Flow Injection Anal.*, 5, 5 (1988).

(1989年4月10日受理)