

固定化乳酸脱水素酵素と NADH との反応の解析

田 畑 勝 好, 田 附 康 彦*

An analysis of the reaction between immobilized LD and NADH

Masayoshi TABATA, Yasuhiko TATSUKI*

Abstract: We tried to analyse the reaction between LD and NADH using a FIA (flow injection analysis) system involving an immobilized enzyme column and chemiluminescence. Peak resolution was determined for NADH utilizing two methods: a sequential LD/NADH oxidase (OD) column reactor, LD column on the upstream and NADH oxidase column on the downstream, and a sequential NADH OD/LD column, NADH OD column on the upstream and LD column on the downstream. The former method resulted in broad peaks, whereas the latter method produced narrower peaks. When lactate was determined, the peak widths obtained using the sequential LD/NADH OD column reactor became remarkably broad. In contrast, a coimmobilized LD/NADH OD column produced narrow peaks and an eight-fold increase in chemiluminescent intensity over the sequential LD/NADH OD column. This phenomenon was not limited to LD and was reproducible with the following dehydrogenase: malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Those results show that because LD and NADH OD are located in close proximity in the coimmobilized LD/NADH OD column, NADH produced by the LD reaction is accessed by NADH OD as soon as it is found on the surface of LD. In consequence, the whole process proceeds without retardation, and the peaks on the chart become satisfactorily sharp. Therefore, when a dehydrogenase is utilized as an analytical reagent, a coimmobilized dehydrogenase/NADH OD column works effectively.

Key words: coimmobilized enzyme column, dehydrogenase, LD, NADH oxidase, immobilized enzyme, FIA, chemiluminescence

はじめに

我々は小さなガラスビーズに酵素を固定化し、この固定化酵素をミニカラムに充填してカラムリアクターを作製した。このカラムリアクターを発光検出器を装着したフローインジェクション分析 (flow injection analysis, FIA) システムに挿入し、試料を 1 μ l インジェクションして、グルコース¹⁾、尿酸¹⁾、アンモニア²⁾、尿素窒

京都大学医療技術短期大学部衛生技術学科
京都市左京区聖護院川原町53

* マルキン醤油株式会社京都研究所
宇治市菟道門前27-2

Division of Medical Technology, College of Medical
Technology, Kyoto University

* Kyoto Research laboratories, Marukin Shoyu Co.,
Ltd.

2001年8月8日受付

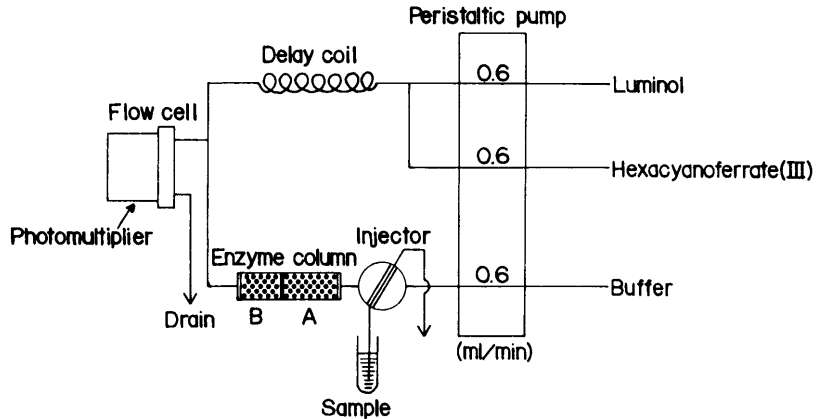
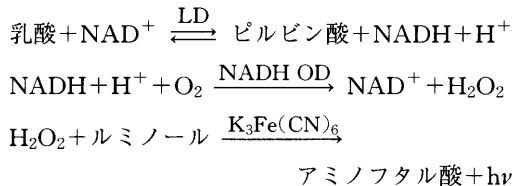


図1 ルミノール、 $K_3Fe(CN)_6$ 化学発光法と固定化酵素カラムリアクターを用いる FIA 方式のダイアグラム

素³⁾などの生体液成分の分析を試みてきた。



固定化乳酸脱水素酵素 (LD) と NADH オキシダーゼ (NADH OD) を用いる乳酸の測定は以下の原理に基づく。すなわち、pH8.5 で乳酸と NAD を基質として LD 反応を行わせ、生成された NADH を NADH OD で酸化分解して生成された過酸化水素をルミノール化学発光法で測定することにより、乳酸濃度を求めるものである。この方法を試みているとき、興味ある現象が起こり、解析した結果を報告する。

実験方法

1) 固定化酵素 (バイオリアクター) の作製: LD (ペーリンガー・マンハイム) と NADH OD (マルキン醤油) の2種の酵素を、多孔性アルキルアミンガラス粒子 (粒子サイズ: 125~177 μm , 孔径 50nm) (Pierce Chemical Co.) にグルタルアルデヒドを用いるシッフ塩基結合法により、別々にあるいは同時に固定化した。

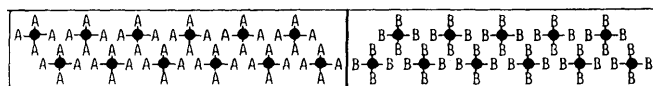
- 2) 試薬: ① 10mM リン酸緩衝液 (pH8.8) ② 0.35mM ルミノール液 ③ 20mM ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム ($K_3Fe(CN)_6$) 液
- 3) 分析方法: バイオリアクターと発光検出器 (倉橋技研) を装着した FIA システムを用いた (図1)。バルブカット方式のインジェクターから緩衝液ラインにインジェクションされた 1 μl の試料はバイオリアクターに導かれ、そこで脱水素酵素反応と NADH OD 反応⁴⁾ により生成された過酸化水素が発光試薬と反応して発光する。脱水素酵素として LD やグルタミン酸脱水素酵素を用いると、得られた発光強度から乳酸やグルタミン酸の濃度を求めることができる。

結果

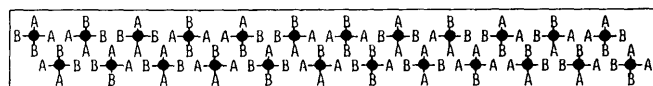
1. 固定化酵素カラムタイプの種類

例えば A と B の2種の酵素を分析試薬として用いる際、いくつかのタイプのカラムが考えられる。基本的には図2に示されているように2種のタイプの固定化酵素カラム (バイオリアクター) である。すなわち、A と B の2種の酵素を別々に固定化し、それらを1つのカラムに2層にして充填するか、あるいは別々のカラムに充填し、その2つのカラムを直列に連結して使用する重層酵素カラム(1)というタイプと、A

1. 重層固定化酵素カラム (Sequential enzyme column)



2. 同時固定化酵素カラム (Coimmobilized enzyme column)



◆: Alkylamine glass beads
A, B: Enzymes

図2 酵素カラムのタイプとそれぞれのカラム内の酵素の存在形態

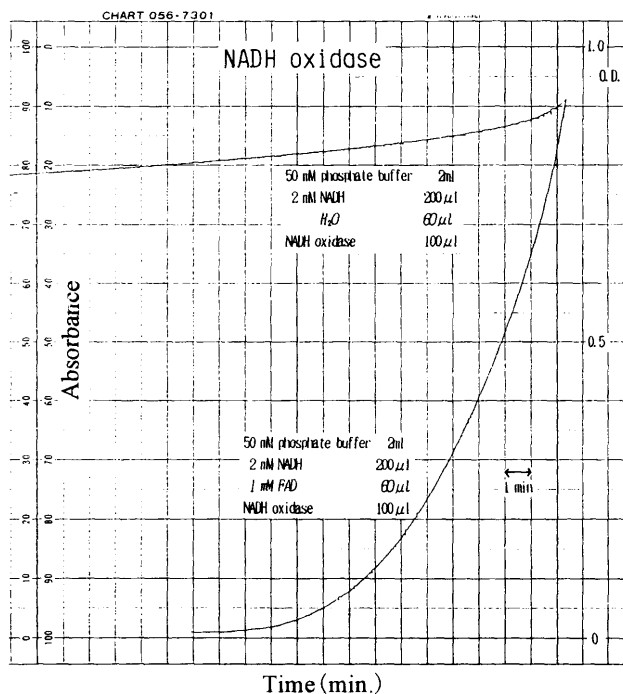


図3 NADH OD 反応のタイムコース

とBの2種の酵素を予め緩衝液と一緒に溶かしておき、その酵素溶液をガラス粒子に加えて、同時に2種の酵素をガラス粒子に固定して作製された同時固定化酵素カラム(2)というタイプがある。固定化酵素カラムとFIAとを組み合わせた我々の方式の特徴は、酵素がガラス粒子に固定化されて、カラム内に閉じこめられているため、酵素から遊離してきた生成物だけを測定することができることである。その結果、酵素から生成物が遊離する速さや遊離状態のNADHだけをピークの形として捕らえること

ができる。ここでは、このようにして得られたピークの形から、主としてLDとNADHとの反応の解析⁵⁾を試みた。

2. NADH OD の反応

LD反応により生成されたNADHを化学発光法で測定するためには、NADHを過酸化水素に変換する必要がある。最近、マルキン醬油から市販された微生物由来のNADHオキシダーゼはNADHを酸化分解して過酸化水素を生成するので、LDとNADH ODを組み合わせることにより、化学発光法で乳酸濃度を求める

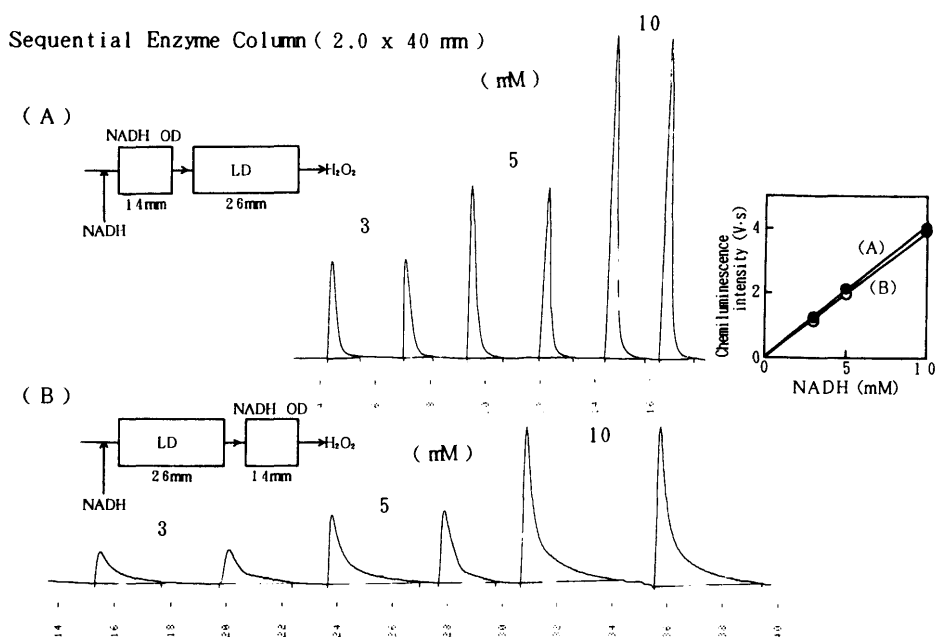


図4 重層酵素カラムが装着されたFIAシステムによるNADHの測定
(A):重層 NADH OD/LD カラム (B):重層 LD/NADH OD カラム

ことができる。使用した NADH OD はフラビン酵素であるが、FAD を少し加えると、図 3 のように反応が急激に進行した。そこで、以後の実験では FAD を加えて行った。

3. 重層酵素カラム

図 4 は、別々に固定化された LD と NADH OD を LD は長さ 26mm, 内径 2mm, NADH OD は長さ 14mm, 内径 2mm の大きさのカラムにそれぞれ充填し、直列に連結して、重層酵素カラムとして使用した。図 4 の上半分 (A) は、NADH OD カラムを上流側に LD カラムを下流側に挿入し、NADH をインジェクションして得られたピークを示す。シャープな形のピークが得られた。下半分 (B) は、これら 2 つのカラムの順序を入れ替えて、NADH OD カラムを下流側に LD カラムを上流側に挿入した。インジェクションされた NADH は、まず LD と接触し、LD カラムを通過してから NADH OD カラムに入り、そこで NADH は酸化分解されて過酸化水素が生成され、発光試薬と反応して得られたピークを図 4-B に示す。

幅広いピークが得られた。LD カラム内の LD 活性が強いほど幅広いピークが得られた。図 4-B で得られた発光強度は図 4-A で得られた発光強度とほとんど同じであった。

4. 同時固定化酵素カラム

重層酵素カラムと同じサイズの同時固定化 LD/NADH OD カラムに NADH をインジェクションして得られたピークを図 5 に示す。図 5 の上半分 (図 5-A) は、LD と NADH OD を同時固定化するとき、NADH OD 量を少なくしたもので、下半分 (図 5-B) は、NADH OD 量を多くしたものである。NADH OD 量が少ない同時固定化 LD/NADH OD カラムではピーク幅は広くなり、NADH OD 量が多いカラムではピーク幅は狭くなった。

5. バイオリアクターを用いた乳酸測定

NADH の代わりに乳酸を、重層 LD/NADH OD カラムにインジェクションして得られた乳酸測定の結果を図 6-A に、同時固定化 LD/NADH OD カラムにインジェクションして得られた結果を図 6-B に示す。両方のカ

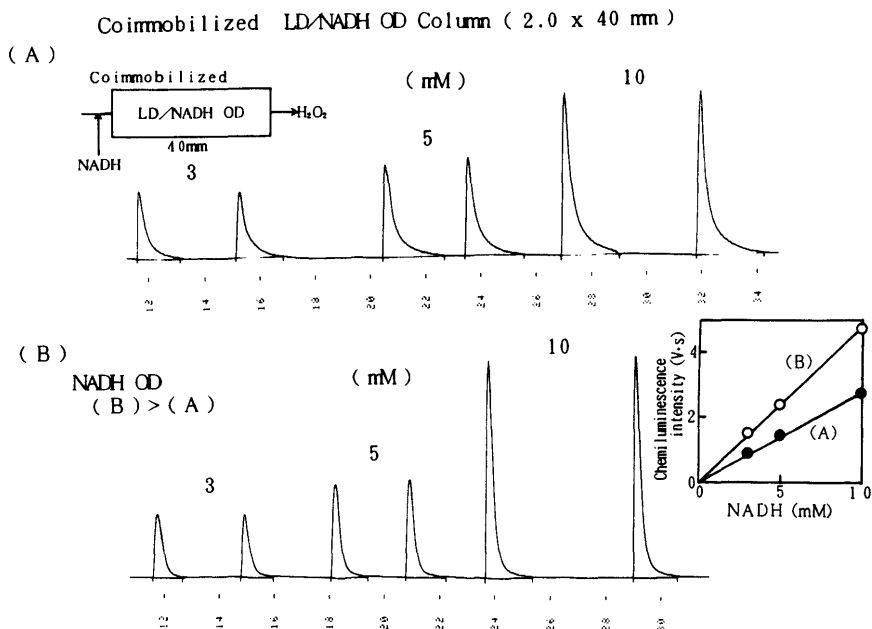


図5 同時固定化 LD/NADH OD カラムが装着された FIA システムによる NADH の測定
NADH OD 量は (B) > (A)

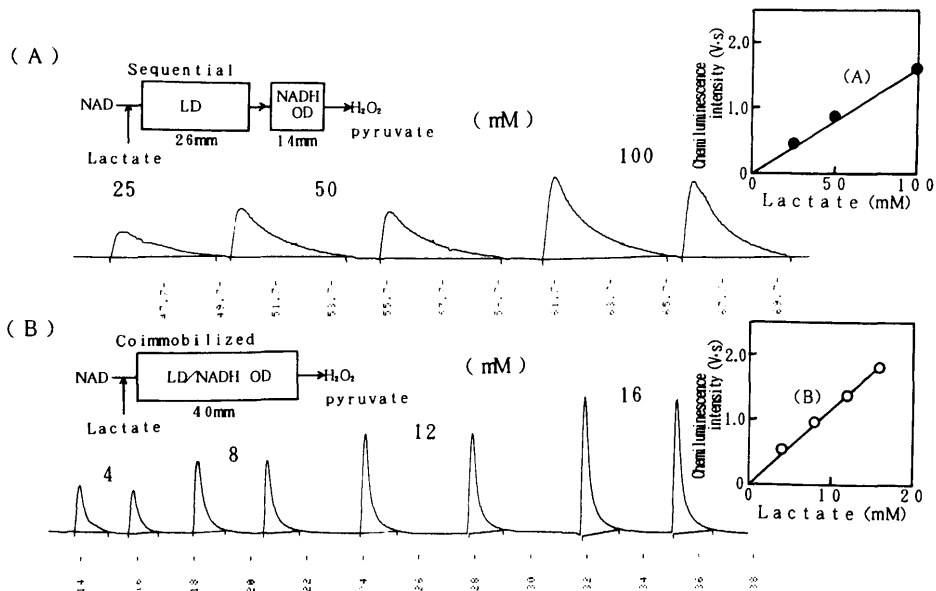


図6 酵素カラムが装着された FIA システムによる乳酸の測定
(A): 重層 LD/NADH OD カラム (B): 同時固定化 LD/NADH OD カラム

Sequential Enzyme Column (2 x 40 mm)

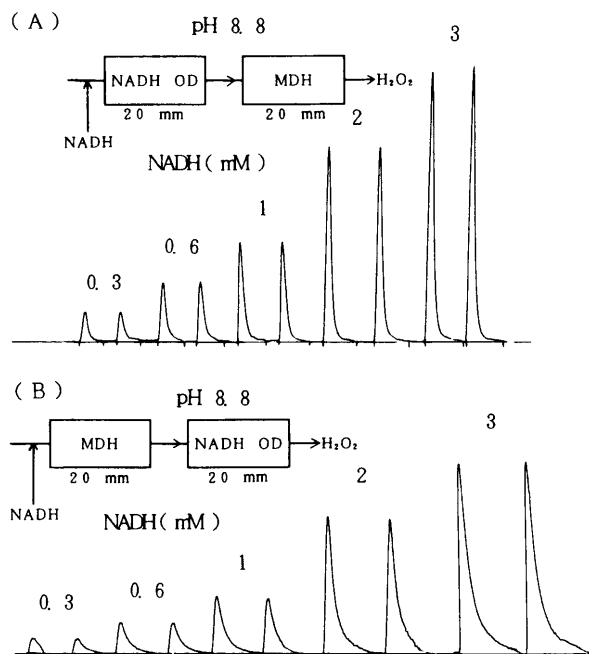


図7 MDHカラムが装着されたFIAシステムによるNADHの測定
(A): 重層 NADH OD/MDH カラム (B): 重層 MDH/NADH OD カラム

ラムサイズは同じで、それぞれのカラム内のLD量とNADH OD量は同じになるように、それぞれのバイオリアクターを作製した。得られたピークは、重層LD/NADH ODカラムの場合、幅広くなった。一方、同時固定化LD/NADH ODカラムを用いた場合、シャープな形のピークを示した。また、乳酸によるピークの出現時間は前者の方が後者に比べて有意に遅れていた。乳酸測定において、得られた発光強度は同時固定化酵素カラムの方が重層酵素カラムを用いた場合より約8倍強かった。

6. LDとピルビン酸との親和性

NADH ODの代わりにピルビン酸オキシダーゼ(PyOD)を用いた重層LD/PyODカラムに乳酸をインジェクションした。LD反応により生成されたピルビン酸はPyODで酸化分解されて過酸化水素ができる。これが発光試薬と反応して得られたピークはNADHの場合とは異なり、幅の狭いピークであった。

7. 重層リンゴ酸脱水素酵素/NADH ODカラム

リンゴ酸脱水素酵素(MDH)をLDの代わりに用いて、重層MDH/NADH ODカラムを作製し、NADHをインジェクションして重層LD/NADH ODカラムと同様な実験を試みた。MDHカラムもNADH ODカラムも共に長さ20mm、内径2mmの大きさである。図7の上半分(A)は、NADH ODカラムを上流側にMDHカラムを下流側に挿入して得られたピークを示す。LDの場合と同様にシャープな形のピークが得られた。下半分(B)は、これら2つのカラムの順序を入れ替えて、NADH ODカラムを下流側にMDHカラムを上流側に挿入した。得られたピークはLDの場合と同様に幅広いピークであった。グルタミン酸脱水素酵素やグルコース-6-リン酸脱水素酵素でも同様の結果を示した。

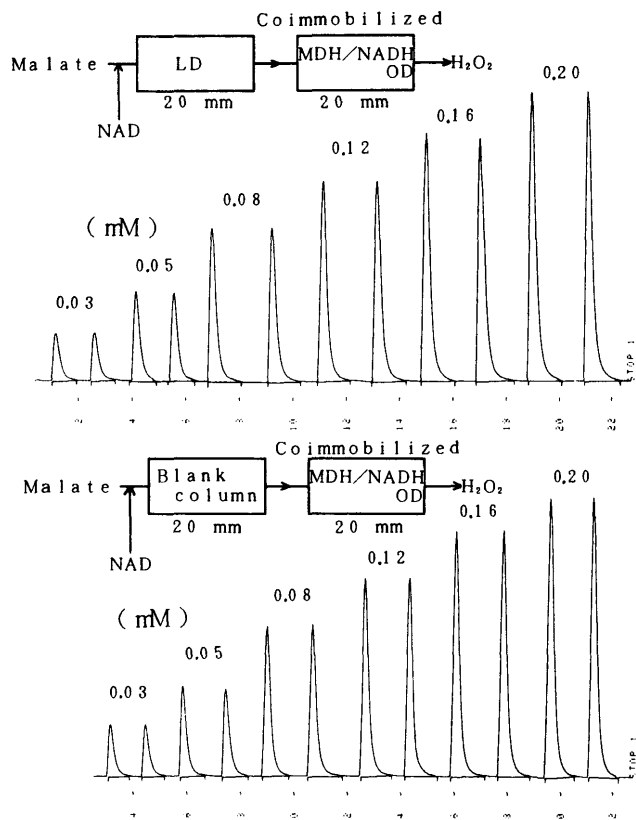


図8 重層LD/同時固定化MDH/NADH OD カラムが装着されたFIAシステムによるLDとNADとの親和性の解析
 (A): 重層LD/同時固定化MDH/NADH OD カラム
 (B): 重層blank/同時固定化MDH/NADH OD カラム

8. LDとNADとの反応状態

LDとNADとの反応状態を調べるために、次の実験を行った。図8-AのようにLDカラム(20×2mm)を上流側に、同時固定化MDH/NADH ODカラム(20×2mm)を下流側に挿入し、他方、対照として、LDカラムの代わりに同じ大きさのブランクカラムを装着した(図8-B)。カラムを流れるリンゴ酸を含んだ緩衝液のラインにNADをインジェクションして、得られた結果を図8に示す。実験の結果では(A),(B)両方の場合のピークは同じ幅でシャープな形のピークであった。

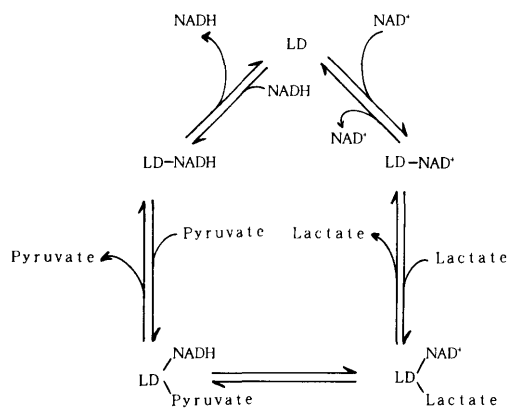


図9 LD反応のメカニズム

考 察

図9にLD反応のメカニズムを示す⁶⁾。まず

LDにNADが、次いで乳酸が結合して、LD-NAD-乳酸複合体が形成され、これが次にLD

-NADH-ピルビン酸複合体に変化し、それからピルビン酸が先に遊離してから NADH が LD から遊離するといわれている。LD から NADH が離れれば再び LD に NAD, 乳酸が結合して、また新しい LD 反応が進行する。LD から一旦離れた NADH が他の LD に結合すると NAD や乳酸が結合できないため、その LD の反応は進行しなくなる。

重層酵素カラムの場合、カラムが NADH OD/LD の順序だと、インジェクションされた NADH に対してシャープな形のピークが得られた (図 4-A)。このカラムの順序を入れ替えた LD/NADH OD カラムに NADH をインジェクションすると得られたピークは非常に幅の広いピークを示した (図 4-B)。使用した FIA システムでは同じ流速で緩衝液、発光試薬が流れているにもかかわらず、カラムの順序を代えるだけで得られたピークの形に大きな違いが出現したが、発光強度には差はほとんど見られなかった。この結果から、NADH は LD と接触すると、LD から遊離しにくくなるのではないかと考えられる。同時固定化 LD/NADH OD カラムでは、NADH OD 量が多いとシャープなピークが得られ、少ないと幅広いピークを示した (図 5)。これは同時固定化すると LD の直ぐ傍に NADH OD が固定化され、その NADH OD が LD からの NADH の遊離を促進させるのではないかと考えられる。いずれにしても、LD から NADH が遊離するやいなやその直ぐ傍に存在する NADH OD が酸化分解してしまうため、NADH が再び他の LD と結合する機会が無くなり、得られた NADH のピークはシャープになる。図 5-B のごとく、多くの NADH OD が固定化されているとより速く NADH の酸化分解が進行し、それだけシャープなピークを示したと考えられる。

次に、重層 LD/NADH OD カラムあるいは同時固定化 LD/NADH OD カラム内で実際に LD 反応を起こさせて、乳酸の測定を試みた。乳酸によるピークの形は同時固定化酵素カラム

の方がはるかにシャープで、得られた発光強度も約 8 倍大きかった。重層カラムの場合、LD 反応により生成された NADH が LD からゆっくり遊離し、さらに再び他の LD への結合を繰り返しながら LD カラムから出てくるため、同時固定化酵素カラムの場合よりも少し遅れて、ピークが出現し、ピーク幅も広がった。同時固定化酵素カラムでは、LD 反応が起こると直ぐ傍に存在する NADH OD が生じた NADH を直ぐに酸化分解するため、NADH が他の LD に結合しなくなって、LD 反応が進行しやすくなる。その結果、得られた発光強度は重層 LD/NADH OD カラムよりも約 8 倍大きくなったと考えられる。以上の結果から判断して、NADH は LD に対して強い親和性を示すことが判明した。

LD 反応に関与するピルビン酸や NAD の LD に対する親和性も調べてみた。ピルビン酸の場合、NADH OD の代わりに PyOD を用いた重層 LD/PyOD カラムに乳酸をインジェクションして得られた結果から、ピルビン酸の LD に対する親和性は NADH の場合に比べて非常に弱かった。NAD の場合、図 8 より NAD の LD に対する親和性も NADH の場合に比べて非常に弱いと考えることができる。

固定化酵素カラムを使用する我々のシステムでは LD から遊離した NADH のみを測定することができるために、この現象を発見することができた。溶液状 LD を用いて生成された NADH を測定する方法では、LD から遊離した NADH のみならず LD-NADH 複合体、LD-NADH-ピルビン酸誘導体も一緒にはかり込むため、LD と NADH との親和性の程度を知ることはできない。

MDH (図 7)、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素も LD と同じように NADH に対して強い親和性を示した。この結果から、一般に脱水素酵素は NADH との親和性が強く、脱水素酵素反応を速やかに進行させるためには生成物である NADH を NADH OD などで反応系から速やかに除去す

る必要がある。故に, 脱水素酵素を分析試薬として用いるときは, 重層脱水素酵素/NADH OD カラムよりも同時固定化脱水素酵素/NADH OD カラムが有効であった。

ま と め

FIA 方式での重層固定化酵素カラムの使用は, それぞれの酵素反応を別々に, そして連続的に進行させることができ, その結果, 酵素から生成物が遊離する速度や状態を観察することを可能にした。固定化 LD を用いることにより, ピルビン酸, NAD とは異なって, NADH は LD にたいして強い親和性を示すことが判明した。その結果から, 脱水素酵素を分析試薬として用いる場合は, 脱水素酵素と NADH OD を同時固定化したカラムを用いる方法が有効であることが明らかとなった。

文 献

- 1) Endo J, Tabata M, Okada S, Murachi T: Use of immobilized enzymes in automated clinical analysis: Determination of uric acid and glucose using immobilized enzymes in column form. Clin. Chim. Acta 1979; 95: 411-417
- 2) Murachi T, Tabata M: Use of a bioreactor consisting of sequentially aligned L-glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase for the determination of ammonia by chemiluminescence. Biotechnol. Appl. Biochem. 1987; 9: 303-309
- 3) Tabata M, Murachi T: A chemiluminometric method for the determination of urea in serum using a three-enzyme bioreactor. J. Bioluminescence Chemilumi. 1988; 2: 63-67
- 4) Tabata M, Koushima F, Totani M: Use of a bioreactor consisting of an immobilized NADH oxidase column and a hydrogen peroxide electrode for the determination of serum lactate dehydrogenase activity. Anal. Chim. Acta 1994; 298: 113-119
- 5) 田畑勝好, 戸谷誠之: フローインジェクション分析での固定化 LD とその反応に関与する物質との親和性. 臨床化学, 1995; 24: 35c
- 6) Clarke AR, Waldman ADB, Hart KW, Holbrook JJ: The rates of defined changes in protein structure during the catalytic cycle of lactate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 1985; 829: 397-407