様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５年　６月１４日現在

機関番号：３２６４４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０５２９２

研究課題名（和文）分子間架橋酵素電極による生体内微量D-アミノ酸の高感度・高選択的定量技術

研究課題名（英文）Sensitive and selective quantification of trace D-amino acids in vivo using intermolecular crosslinked enzyme electrodes

研究代表者
山口　浩（Yamaguchi, Hiroshi）

東海大学・農学部・教授

研究者番号：００４６６２３６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：　近年、様々な遊離D-アミノ酸が生体内に存在し、L-アミノ酸とは異なる生理機能が見出されている。しかし、D-アミノ酸は生体内含有量がL-アミノ酸と比較して低い為、定量分析には課題があり、生理的役割はいまだ明らかになっていない。本研究では、申請者らの分子間架橋技術を発展させ、（１）高感度（２）高選択性（３）再利用が可能および（４）安価な酵素電極の開発し、この酵素電極を用いたバイオセンサーを作製し、生体内微量遊離D-アミノ酸の高感度・高選択的で安価な定量分析技術の確立を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　近年、D-アミノ酸が統合失調症や慢性腎障害などの疾患バイオマーカーとして、D-アミノ酸酸化酵素による老化関連疾患との関係が報告され、注目されている。しかし脳内のD-セリン以外のD-アミノ酸は生体内含量がL-アミノ酸と比較して低い。従来の定量分析では多段回操作による精製が必要であること、高価な分析機器が必要であることなどの理由から、D-アミノ酸の生理的役割には未解明の部分が多く残されている。その為、申請者らの酵素固定化技術を発展させ酵素電極を作製し、電気化学的手法と組み合わせることで、生体内微量D-アミノ酸の定量分析が高感度かつ安価に行えれば、その生理的役割に関する研究が進展すると考える。

研究成果の概要（英文）：Recently, various free D-amino acids exist in living organisms, and physiological functions different from L-amino acids have been found. However, since the content of D-amino acids in vivo is lower than that of L-amino acids, there are problems in quantitative analysis, and the physiological role has not yet been clarified. In this study, we developed (1) highly sensitive, (2) highly selective, (3) reusable, and (4) inexpensive enzyme electrodes by developing the intermolecular crosslinking technology of the applicants, and fabricating a biosensor using the enzyme electrode, with the aim of establishing a highly sensitive, highly selective, and inexpensive quantitative analysis technology for trace free D-amino acids in vivo.

研究分野：タンパク質・ペプチド化学

キーワード：D-アミノ酸　固定化酵素　D-アミノ酸酸化酵素　酵素電極　生体分子検出　比色反応

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質構成アミノ酸はグリシンを除いてすべて光学異性体のL-アミノ酸である。その為、長年、細菌以外の多くの生物はL-アミノ酸のみを特異的に使用していると考えられ、もう一方の光学異性体であるD-アミノ酸の生理的役割はあまり重要視されていなかった。近年光学異性体の分離技術の発展により様々な遊離D-アミノ酸が生体内に存在し、L-アミノ酸とは異なる生理機能が明らかにされ、疾患との関係性も見出されている。しかしD-アミノ酸は生体内含有量がL-アミノ酸と比較して低いこと、従来の分析法は一時間以内に高感度で測定が可能であるが試料調製に多段回操作が必要なこと、高感度の質量分析器など高価な機器が必要なこと、機器のランニングコストが高価なことなどの理由の為、D-アミノ酸の生理的役割には、未解明の部分が多く残されている。これらの背景から、高感度･高選択的かつ安価なD-アミノ酸の定量分析技術の確立はその生理的役割に関する研究推進の課題と考えた。

申請者らはこれまで酵素の触媒機能を低下することなく固定化する汎用的な技術開発とその応用研究を行ってきた。具体的には酵素分子表面のアミノ基間、またはアミノ基を表面にほとんどもたない酸性の酵素とポリリジンとの複合体間を分子間架橋し、膜状に架橋体を形成させ固定化する技術である。これら酵素固定化法は従来の固定化法とは異なり、安価で簡便に様々な酵素を固定化する事が可能であり、申請者ら独自の技術である。調製された固定化酵素は長時間その触媒活性が持続した。また高温および有機溶媒存在下で、その触媒活性が酵素溶液と比較して向上することを報告した。これらの特性を活かし、迅速なタンパク質の翻訳後修飾部位の分析方法や低環境負荷かつ効率の良い生理活性物質の合成技術を開発した。これらの研究成果は申請者らの酵素固定化技術とそれを利用した応用研究への有用性を示している。その為、本研究は研究代表者がこれまで研究･開発してきた酵素固定化技術をより発展させ、高効率･高収量なD-アミノ酸の定量分析技術の開発を考えるに至った。

2. 研究の目的

D-アミノ酸は生体内でD-アミノ酸酸化酵素により選択的に分解される。本研究課題では申請者らがこれまで研究･開発してきた酵素固定化技術を発展させ、①D-アミノ酸を選択的に検出する酵素電極を開発すること、②この酵素電極を利用し、従来の分析法よりも高感度･高選択的かつ安価なD-アミノ酸の定量分析技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵素のマイクロビーズ表面への高濃度固定化条件の確立

酵素には市販の**D-アミノ酸酸化酵素とヘモグロビン**を利用した。これら酵素の等電点は5付近であり、以前の研究から、酵素の固定化にはポリリジンが必要である。高い酵素重合率と触媒活性を両立する為、酵素濃度、ポリリジンの大きさ(分子量)と濃度および架橋剤であるアルデヒド濃度を検討し、マイクロビーズ表面への高濃度固定化条件を確立した。

(2) 固定化酵素の性能評価

固定化酵素の性能評価は市販のD-アラニンを基質として、補酵素FADの吸光度変化および、過酸化水素とルミノールとの反応による発光を測定し、(1) 反応処理量、(2) 連続使用時間、(3) 使用回数、(4) 水溶性有機溶媒への耐性を行った。

4. 研究成果

研究計画に基づき、酸化酵素の固相表面への共固定化条件の確立を行った。酵素にはD-アミノ酸酸化酵素とヘモグロビンを利用した。2種の酵素の等電点は酸性であり、以前の研究から酵素の固定化にはポリリジンが必要である。マイクロビーズには、アミノ基がビーズ表面に修飾されているPEGA樹脂を使用した。ビーズ上のアミノ基は、酵素もしくはポリリジンのアミノ基と容易にアミド結合を形成し、ビーズ表面に酵素を固定化できる。従来法では、酵素濃度は支持体表面の修飾基の数に依存する為、一般に低い。加えて、酵素は支持体へ一点もしくは数点で架橋しているので、自由度が高く、容易に変性し、失活が起きると考えられる。対して、ポリリジンを介した今回の酵素固定化法では、酵素はポリリジンが形成する重合体へ取り込まれた形により、酵素をビーズ表面へ積層することで、高濃度の酵素を固定化できると考える。

高い酵素重合率と触媒活性を両立する為、酵素濃度、ポリリジンの濃度および架橋剤であるアルデヒド濃度を検討した。その結果、酵素はポリリジンが形成する重合体へ取り込まれることでビーズ表面へ積層され、高濃度の酵素を期待したように固定化できた。この PEGA ビーズへの酵素の固定化とその有効性は論文として発表した。

酵素反応は、少量のビーズを用いてサンプルチューブ内で簡便かつ迅速に行った。その結果、酵素は期待通りに高濃度で PEGA ビーズへ固定化できた。反応温度 30 度において、40 回以上の繰り返し利用が可能であった。この事は酵素分子の立体構造は損なわれずに、高濃度でかつ自由度が低い酵素重合体が形成されることで、長時間その触媒活性が持続し安定性が増加したと考えられた。しかしながら反応温度を上昇するとその安定性の低下が観測された。その為、引続き D-アミノ酸の定量分析に最適な酵素固定化条件（架橋剤、各試薬濃度など）を検討した。その結果、反応温度 30 度から 40 度において、酵素活性が安定する架橋条件を決定した。作製した固定化酵素を用いた D-アミノ酸の定量分析法を 2 通り検討した。①酵素反応により生成する過酸化水素をペルオキシダーゼにより比色反応から定量する方法、②酵素電極を作製し、電気化学的に定量する方法の二通りを検討した。①の分析法は検出感度これまで報告されている結果と同程度であった。反応温度を上げることで酵素反応効率が増加し、検出感度が上がると期待していたが、今回の固定化酵素は反応温度が 40 度以上では上述のように安定性が低い為、検出感度のさらなる改善が検討できなかった。②の分析法は酵素反応に必要な補酵素の還元反応の電流値または過酸化水素の電解電流から定量するが、金電極への酵素の固定化が検討途中のため、活性評価を研究期間内にできなかった。研究期間内に期待していた成果（性能）までは達成できなかったが、研究課題に関連した内容で科学論文を期間内に3報を報告した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Yamaguchi Hiroshi、Miyazaki Masaya	４．巻 11
２．論文標題 Laccase aggregates <i>via</i> poly-lysine-supported immobilization onto PEGA resin, with efficient activity and high operational stability and can be used to degrade endocrine-disrupting chemicals	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Catalysis Science & Technology	６．最初と最後の頁 934～942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CY01413C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Yamaguchi Hiroshi、Miyazaki Masaya	４．巻 159
２．論文標題 Enzyme-immobilized microfluidic devices for biomolecule detection	５．発行年 2023年
３．雑誌名 TrAC Trends in Analytical Chemistry	６．最初と最後の頁 116908～116908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trac.2022.116908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kato Kazuyuki、Mukawa Yasutake、Uemura Shoichi、Okayama Masataka、Kadota Zentaro、Hosozawa Chika、Kumamoto Sayaka、Furuta Shun、Iwaoka Michio、Araki Tomohiro、Yamaguchi Hiroshi	４．巻 657
２．論文標題 A protein identification method for proteomics using amino acid composition analysis with IoT-based remote control	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Analytical Biochemistry	６．最初と最後の頁 114904～114904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2022.114904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 加藤一幸、山川千夏、植村昌一、岡山祐孝、門田善太郎、岩岡道夫、荒木朋洋、山口　浩
２．発表標題 IoTを利用した遠隔操作によるアミノ酸分析を用いたプロテオーム解析におけるタンパク質同定手法
３．学会等名 第95回日本生化学会大会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関