

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750075

研究課題名(和文) 金属イオンを指標とする糖質加水分解酵素の酵素活性高速分析法の開発

研究課題名(英文) Development of High Performance Enzyme Activity Assay for Glycoside Hydrolase Using Metal-ions as Indicator

研究代表者

高貝 慶隆 (TAKAGAI, Yoshitaka)

福島大学・共生システム理工学類・准教授

研究者番号：70399773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、銅フタロシアニンで修飾されたセルロースとともに、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析、もしくは、フレームレス原子吸光光度計のいずれの分析装置を用いることで、セルラーゼの簡便な定量法及び活性の測定法を開発した。このとき、セルラーゼ自体には金属元素を含まないが、銅フタロシアニン結合型セルロースにセルラーゼを作用させると、銅フタロシアニンで修飾されたセルロースから銅イオンが放出される現象を見出した。この現象を利用して原子吸光光度分析法やICP発光分光分析法を用いることで、吸光光度法に比べてセルラーゼを特異的かつ迅速(15分間程度)で定量することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the simple determination method of cellulase has been developed using copper(II)-phthalocyanine complex modified cellulose with the alternative of an inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) or flame-less atomic absorbance spectrometer (FL-AAS). Then, although the cellulase does not include the metal ion in the molecule, the metal ion is released by the biodegradation of copper(II)-phthalocyanine complex modified cellulose into the solution. The presented method can measure the cellulase concentration and the activity in short time (within 15min) as comparing with common spectrophotometric method.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：酵素活性測定 バイオマス セルロース セルラーゼ

1. 研究開始当初の背景

次世代エネルギーの確保は、日本の将来を左右する重要課題であり、バイオマスエネルギー源とする科学技術の推進は日本国の最優先課題である。セルロースを糖化するセルラーゼは、バイオマス次世代利用の鍵となる物質であり、セルロースを高効率に糖化するセルラーゼの探索は世界を挙げた緊急課題となっている (Nature, 450, 487(2007), Science, 315, 804(2007))。しかし、従来のセルラーゼの酵素活性測定法は、酵素反応の代謝物である糖類を測定するために分析感度や分析精度に問題があった (Methods in Enzymology, Vol.160 (1988))。特に、セルラーゼはセロピオヒドロラーゼを中心としたエンドグルカナーゼや 1,4-β-グルコシダーゼなどの糖質加水分解酵素の総称であり、これら糖質加水分解酵素の迅速かつ高精度な定量および酵素活性の測定法が求められている (Angew. Chem. Int. Ed., 44, 3358-3393(2005))。従来、(1)染色セルロースを用いる吸光光度法や(2)酢酸セルロースによる還元糖の比色法が汎用されているが、感度不足やマトリックスの影響、また、実際の酵素活性値との間にズレ(測定誤差)が生じる等の問題点があった。一方で、我々は、これまで様々な金属錯体結合セルロースを合成してきた。

その一方で、金属イオン(金属元素)は物質の中でも容易かつ高感度に測定できる分析対象物の一つ(ICP-MS 検出限界: ppq~ppt)であり、さらに、有機物と異なり元素であるためそれ以上分解しない。したがって、分子認識の標識物質として金属イオンは優れた物質である。我々は、この点に着目して金属イオンを標識とする酵素定量および酵素活性測定法を提案した。未だに金属イオンを複合酵素の活性測定法の標識として利用された例はない(*金属イオンを触媒とする利用例はある)。特に、これまでキレート形成後の金属錯体結合セルロースに着目する研究者は皆無であった。

2. 研究の目的

代替エネルギー源の確保は、日本国が抱える最優先課題の一つである。本研究の目的は、バイオエネルギー源の探索を分析化学の領域から支援するために、金属イオンを標識とする糖化酵素の迅速分析法を構築することである。すなわち、本研究は、セルロース糖化酵素“セルラーゼ”の定量および酵素活性の同時測定法を開発するものである。この手法により、たとえ酵素内に金属イオンを含まなくとも、ICPなどで特異的、かつ、短時間(前処理操作を含めて15分以内)、高精度(5%以内)に、そして高感度定量(ppbレベル)とともに酵素活性測定が同時に出来るシステムを構築することが目的である。その概念図を図1に示す。

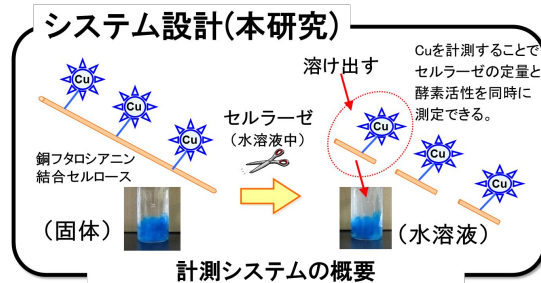


図1 計測システムの概要

3. 研究の方法

(1) セルラーゼ測定における最適な金属錯体結合セルロースの合成と選択

金属錯体結合セルロースを使用して、セルラーゼ分解反応における最適な系と条件を探索する。

(2) セルラーゼ定量における分析システムの構築

ICPを用いて金属マーカの測定を行い、内標準物質とブランク制御に関する検討を行う。

(3) 酵素分解反応における代謝物の解明

酵素反応により水溶液に放出された金属元素を含む化学種をLC-TOF/MSを用いて特定する。

(4) 種々のセルラーゼを用いた酵素活性測定と既存法との相関性

5種類のセルラーゼの活性測定を行い、測定値と既存法による値との間で相関性を検討する。

4. 研究成果

(1) セルラーゼ測定における最適な金属錯体結合セルロースの合成と選択

セルラーゼ分解反応に適した金属錯体結合セルロースを合成した。銅フタロシアニン結合セルロースの合成法(Y. Takagai, et al, Analyst (2004))に基づき、中心金属が銅以外の金属フタロシアニン(特に Fe, Zn, Co, Sn)セルロースを新たに作製した(図2)。セルラーゼ分解反応およびセルラーゼ計測に最適な樹脂を探索し、結晶性、ならびに非結晶性のセルラーゼによる違い等も検討して条件の最適化を行った。

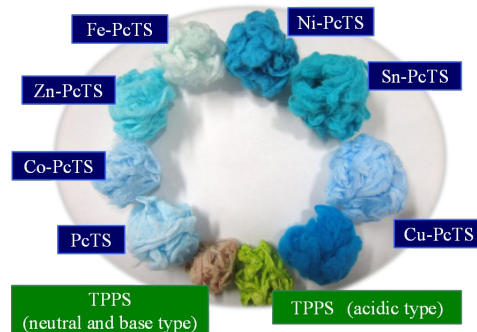


図2 合成金属フタロシアニンセルロース

(2) セルラーゼ定量における分析システムの構築

酵素分析法は、一般的に測定誤差が大きく (Methods in Enzymology, Vol.160 (1988)) , 測定誤差の抑制が不可欠であった。ICP 分析では一般的に Y (イットリウム)などを内標準物質として添加するが、本研究では標準溶液とサンプル溶液でマトリックスが異なり発光強度に差が生じる懸念と、Y は強酸性溶液で溶液調製している為、酵素反応を阻害する懸念があった (*セルラーゼ分解反応の最適 pH: 7 ~ 10, 生産菌によって異なる)。そこで本研究ではオンライン内標準添加システムを採用(高貝慶隆,日本分析化学会討論会 2008(名古屋))を参考として、セルラーゼ分解反応に適した測定系の設計を行った。ppb レベルのセルラーゼ濃度の検出を行った。また、フレイムレス原子吸光光度計 (FL-AAS) での測定も行った。

(3) 酵素分解反応における代謝物の解明

酵素反応によって溶液中に放出された金属元素を含む化学種を液体クロマトグラフ - 飛行時間型質量分析計 (LC-TOF/MS) を用いて特定した。セルラーゼの一般的な総活性測定は、最終生成物のグルコース量を計測するため、従来は 1,4- β -グルコシダーゼの量と活性に依存する測定法であった。しかし、本システムでの指標物質は、溶液中に可溶した銅イオンを含む化学種であるため、単糖よりも多糖類 (2~6 糖) として放出されていること意味していた。これまでにエンドグルカナーゼとセロピオヒドロラーゼを同時に識別できる分析方法は無く、本研究では反応時間の設定で各酵素を分別定量できることが示唆された。エンドグルカナーゼとエキソグルカナーゼは自然界の糖化現象の基礎となる酵素であるため、本法は自然科学における様々な糖化現象の機構解明に寄与できる。5 種類のセルラーゼの活性測定ならびにミカエル-メンテン定数 (K_m) の測定を行い、測定値と既存法による値との間で相関性を検討した。また、 K_m はミカエル-メンテン式に基づき、Lineweaver-Burk 式に従って計算し、従来法との比較を行った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) T. Ohtomo, Y. Takagai, O. Ohno, S. Igarashi: Journal of Flow Injection Analysis, 28(2), 136-141 (2011). "Chemiluminescence Reaction of an Iron(III)- Phthalocyanine Complex and Its Application to FIA of L-Tyrosine".
- (2) T. Ohtomo, Y. Takagai, O. Ohno, S.

Igarashi: Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2012, doi:10.1155/2012/520248 (2012). "Quenching-chemiluminescence determination of trace amounts of L-tyrosine contained in dietary supplement by chemiluminescence reaction of an iron-phthalocyanine complex".

- (3) 高貝慶隆, 分析化学(総合論文), 62(4), 317-323 (2013). "カスケード型高倍率濃縮分離システムの構築と分析化学的応用".
- (4) T. Ohtomo, S. Igarashi, Y. Takagai: Biological and Pharmaceutical Bulletin, 36(11), 1-5 (2013). "Flow injection spectrophotometric analysis of human salivary α -amylase activity using an enzyme degradation of starch-iodine complexes in flow channel and its application to human stress testing".

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Y. Takagai, S. Kodama, M. Furukawa, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometric Quantifications of Cellulase and its Activity Assay Using Biodigestion of Metal-pigment Complex Modified Cellulose, Analytical Research Forum 2012 (Durham University, UK) 2012.7.4.
- (2) 大野愛莉, 高貝慶隆, "金属イオンを指標とするセルラーゼ活性測定法と既存法との相関性", 第3回分析化学セミナー (宇奈月温泉・富山), 2012.9.5
- (3) 清水冴子, 高貝慶隆, "セルラーゼ分解反応における代謝物の解明", 第3回分析化学セミナー (宇奈月温泉・富山), 2012.9.5
- (4) Y. Takagai, S. Kodama, M. Furukawa, Development of Indirect Determination Method of Cellulase Concentration in Environment Using Biodigestion of Metal-Complex Modified Cellulose, SETAC Asia Pacific 2012 (Kumamoto) 2012.9.24.
- (5) T. Ohtomo, T. Takahashi, S. Igarashi, Y. Takagai, Flow-injection Spectrophotometric Determination of α -Amylase Activity Using the Degradation of Starch-Iodine Complex Coloration, Flow Chemistry ASIA 2012,

(Hotel Royal Queens, Singapore)
2012.10.25-26.

- (6) 大友孝郎, 阿部遼太, 五十嵐淑郎, 高貝慶隆, “ヨウ素デンプン錯体の酵素分解によるヒト唾液 - アミラーゼ活性のフローインジェクション分析とそのストレステストへの応用”, Separation Sciences 2013 (東京都立産業技術研究センター, 東京) 2013.8.1-2.
- (7) 高貝慶隆, 大野愛莉, 清水冴子, 古川真, “ICP 発光分光分析ならびにフレイムレス原子吸光光度計を用いるセルラーゼの酵素活性測定法”, 日本分析化学会第62年会(大阪, 近畿大学東大阪キャンパス) 2013. 9. 12.
- (8) M. Matsueda, Y. Takagai, Synthesis and evaluation of cellulose bearing covalently linked metal phthalocyanine and porphyrine derivatives and its application to the removal of environmental mutagens, TJASSST 2013 (Hammamet, Tunisia) 2013. 11. 16.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.takagai-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高貝 慶隆 (TAKAGAI, Yoshitka)

福島大学共生システム理工学類, 准教授

研究者番号: 70399773

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし