

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19750065
研究課題名（和文） 酵素スイッチング機構を指標としたバイオセンシングシステムの開発とその応用
研究課題名（英文） Development of Biosensing system based on the enzyme switching mechanism and the application of the system.
研究代表者 飯田 泰広（IIDA YASUHIRO） 神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授 研究者番号：40329305

研究成果の概要：本研究では、酵素を1分子のスイッチと見立て、その活性を可逆的にON/OFF制御できるシステムの構築と、そのシステムを用いた分析、更には酵素の阻害剤のスクリーニングに関する研究を展開してきた。具体的には、1) 新規酵素固定化担体の開発、2) 酸性ウレアーゼ阻害剤のスクリーニング、3) 金属酵素を用いたコファクターセンシングである。

1) に関しては、骨格にアミノ基を有する新規なモノリスシリカの作成方法を開発し、固定化担体として、酵素を高密度で集積できること、微量の試料を迅速かつ高感度に分析できること等の有用性を例証した。2) に関しては、1) で開発した固定化担体に酸性ウレアーゼを固定化、フローシステムに組込んだ。活性を評価した後、阻害剤と作用させ活性を消失させ、再度基質を注入して活性の回復を評価することにより、阻害剤の評価を行った。このように、酵素活性のON/OFFを評価して、薬剤の持続性を容易に評価できるシステムを用いて、市販生薬を対象にスクリーニングを行い、ダイオウ中に従来の阻害剤以上に持続性のある（不可逆的に活性を阻害する）ことを見出した。また、阻害剤評価のハイスループット化を実現するため、磁気ビーズを用いてパッチ式で薬剤の持続性を評価できるシステムを構築した。3) に関しては、亜鉛（II）イオンを活性中心に持つ金属酵素の一種である、アルカリファスファターゼを用いて、補因子（コファクター）である亜鉛（II）イオンを除去、付与することにより活性を制御、付与する金属溶液の濃度と活性の回復の間の相関を用いてZn(II)イオンおよびMg(II)イオンを計測できるシステムを構築し、当該イオンの計測を行った。

本研究により、酵素を分子スイッチとして制御できる系を構築し、その活性を指標として新たな金属分析用バイオセンシングシステムを開発し、また、酵素活性の不可逆的阻害を容易に評価できる薬剤評価法を開発することが達成され、その意義は極めて大きいと思われる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

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：生物・生体工学、バイオセンサ、酵素阻害剤、固定化酵素、FIA、スクリーニング、ウレアーゼ、固定化単体

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムプロジェクトの終焉と共に、ポストゲノムの時代へと入り、そのデータベースを如何に有効に利用するのか、特にハイスループット化や、バイオインフォマティクスへの期待が高まっている。一方で、このことは遺伝子産物であるタンパク質や酵素の種類には限りがあると言う事実を突きつけられていることを意味している。つまり、既知産物に対する新しい利用方法を開発することは、今後我々が取り組むべき重大かつ緊急の課題なのである。現在では、遺伝子組み換え等による機能の付加や高機能化も盛んであるが、申請者らは、より生体機能の原理に基づいた、根本的に新しい利用方法が必要であると考えている。

ここで、申請者らは、固定化酵素とフローシステムを組み合わせることで、酵素の活性をスイッチのように ON/OFF 制御できることを見出してきており、そのような酵素の機構を用いた、新しい機能利用法の確立を試みた。その応用として、一つはこれまでは評価できなかった、酵素阻害剤の持続性の評価であり、もう一つは、微量金属イオン分析への応用である。

通常の薬剤は、時間とともに代謝あるいは排出され、薬剤濃度が低下、除去されていくことに対して、現実の阻害剤の評価においては、常に薬剤と酵素および基質を共存させてその活性を評価しており、阻害剤が代謝されてしまった状態で、酵素の活性を抑えた状態でいられるのか、回復してしまうのといったことは評価することができない。そこで、その様な、阻害の持続性、不可逆性を容易に評価できる酵素阻害剤の評価法（図 1）の確立と応用を行うこととした。対象として、酸性ウレアーゼを選定した。胃がんや胃潰瘍の原因菌であるヘリコバクター・ピロリが尿素を酸性ウレアーゼにより代謝、アンモニアを生成させて胃に着床・生育していくことが知られており、哺乳類が当該酵素を有していないことから、その阻害剤は副作用の少ない有用な除菌剤として期待されている。

微量金属への応用は、金属酵素がその活性に金属を必要とし、金属を除去することに活性が消失、付与することにより活性が回復することから、その活性を指標として微量金属の計測が可能となる。通常の酵素センサは、基質を計測するものであることに対し、本法は、コファクターである金属を計測するユニ

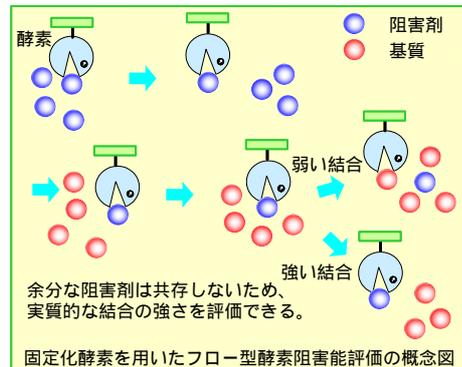


図 1. 固定化酵素を用いた酵素阻害能評価の概念図

ークなものである。一般に、酵素の基質に対する K_m 値に比べ、金属イオンの K_d 値の方がはるかに低いため、酵素センサとしての利用は、金属を対象とした方が高感度になることが期待され、適切な酵素の選定により、様々な金属への応用が可能である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、酵素を 1 分子のスイッチと見立て、その活性を可逆的に ON/OFF 制御できるフローシステムを構築し、その応用を行うことである。具体的には、新規酵素固定化担体の開発、酸性ウレアーゼ阻害剤のスクリーニング、金属酵素を用いたコファクターセンシングである。

に関しては、酵素をスイッチのように活性を瞬時に ON/OFF するためには、従来用いている酵素カラムではその体積が大きく、時間がかかってしまうため、微小な領域に高密度で固定化できる担体が必要である。

に関しては、酵素阻害剤のスクリーニングへの適用に関しては、モデルケースとして酸性ウレアーゼの阻害剤のスクリーニングを行い、不可逆的に酵素活性を消失させる化合物を有意に評価できる手法を確立し、当該物質の分離・精製、構造解析を行い例証することを目的としている。実現できれば、様々な酵素阻害剤への応用が可能となる。

に関しては、微量重金属イオンの検出においては、亜鉛、およびコバルトイオンを数分以内に、数十マイクロリットルの試料から、ppb レベルの検出を可能とすることを目標としている。

3. 研究の方法

(1) 新規酵素固定化用担体の開発

酵素カラムの微小化および酵素反応の効率化を目標とした酵素固定化用の新規担体の開

発を行った。具体的には、微細網目構造を有するモノリスシリカカラムで、そのシリカ骨格にアミノ基を有する官能基を作成時から導入したものである。

そのため、新規化合物であるBoc(二炭酸ジ-tert-ブチル ((Boc)₂O))化したγ-APTES(3-アミノプロピルトリエトキシシラン)の合成を行った。4にて(Boc)₂Oとγ-APTESを等量混合、12時間反応させて合成、5%クエン酸溶液を混合して遠心、有機層を回収し、GC-MSおよびNMRによりその構造を評価した。

合成した新規化合物(Boc-APTES)0.1 mLとテトラメトキシシラン0.1 mL、ポリエチレングリコール27 mgを10 mM 酢酸0.25 mLで溶解させたものを混合、攪拌後、キャピラリー内に注入し、40、48時間静置して乾燥させた。4M塩酸を通液させて脱Bocを行い、純水で洗浄、グルタルアルデヒド溶液を通液させてアルデヒド活性化を行った後、酵素溶液を通液、カップリング反応をさせることにより酵素の固定化を行った。作成した新規固定化担体は、走査性電子顕微鏡により、その構造を評価した。

(2) 酸性ウレアーゼ阻害剤のスクリーニングとハイスループット化

作製した新規酵素固定化担体に、酸性ウレアーゼを固定化、酵素活性を評価するシステムを構築した。構築したシステムを図2に示す。

キャリアーとしてグリシン-塩酸をプランジャーポンプにより送液、酵素活性を評価するための基質である尿素と各種阻害剤および阻害剤スクリーニングソースは回転式注入弁より注入した。注入された尿素は酵素カラム一体型ガス拡散デバイスへと送液される。当該ガス拡散デバイスは、図3のような構造をしており、外側にガラスキャピラリー、内側に中空糸膜を有した二重管構造を取っている。酵素反応ではアンモニアと二酸化炭素が生成するが、キャリアーのpHが低いため、アンモニアはイオンで、二酸化炭素は炭酸ガスとして存在するため、二酸化炭素のみ中空糸膜を透過、内側を流れる呈色液であるBTB(ブロモチモールブルー)溶液に吸収、BTBの色調

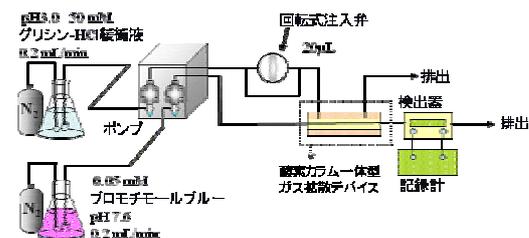


図2. 酸性ウレアーゼ活性評価システム

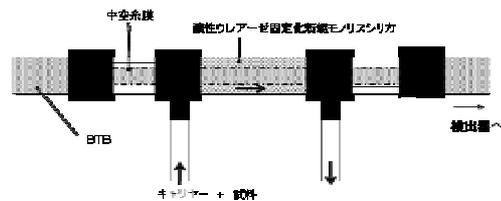


図3. 酵素カラム一体型ガス拡散デバイス

を変化させ、フロー式の吸光光度計によりモニタリングされる。この吸光度変化と酵素活性が比例するため、指標として酵素活性の評価を行った。

ハイスループット化に関しては、アミノ基が修飾された磁気ビーズ(ダイナビーズ)にアルデヒド活性化後酵素を固定化した。当該ビーズを96穴マイクロプレートに分注し、緩衝液(グリシン-塩酸)で溶解した尿素を注入、酵素活性を評価した。尿素を除去、緩衝液で洗浄した後、阻害剤を注入、阻害剤を除去後、尿素を用いて再度当該酵素の活性を評価した。これを繰り返すことにより、酵素活性の阻害能や阻害の持続性の評価を複数のサンプルを同時に行えるようにした。

(3) アルカリホスファターゼを用いた微量金属計測への適用

アルカリホスファターゼは活性中心にZn(II)イオンを有しており、その金属を除去することにより活性が消失、付与することにより回復する。その活性のON/OFFは金属イオンの濃度に依存することから、金属の定量に適用した。はじめに、当該酵素を用いた亜鉛(II)イオン計測に適用した。その後、Mg(II)イオン計測へ適用、更に、活性中心にCo(II)イオンを有したアルカリホスファターゼの構築を行い、コファクターセンシングへの適用を試みた。

各種金属イオンの計測は、基質を注入して活性を評価した後、キレート剤を注入、活性を消失させ、その後、目的の濃度に調節した金属イオン溶液を注入、再度基質を注入し、その回復した活性と金属イオン濃度の関係を用いて検量線を作成し、実試料への計測を試みた。また、Co(II)イオンを活性部位に有するアルカリホスファターゼに関しては、アルカリホスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを購入、ミスマッチプライマーを用いた部位特異的変異導入により、153番目のアスパラギン酸残基をヒスチジン(D153H)に、328番目のリシン残基をトリプトファン(K153W)への変異を試みた。

当該アルカリホスファターゼを、金メッシュに、グルタルアルデヒド架橋法を用いて固

定化、ミニカラムに充填する。このカラムと、ポンプ、インジェクションバルブ、吸光光度計、記録計よりなるフローシステムを構築した(図4)。50 mM Tris-HCl (pH 8.0)をキャリアーに用いて通液、酵素活性の評価には基質であるパラニトロホスフェート (PNPP) を利用した。PNPP 注入に伴う吸光度の変化から酵素活性を評価する。金属イオンの除去、付与を行い、金属計測への適用を試みた。

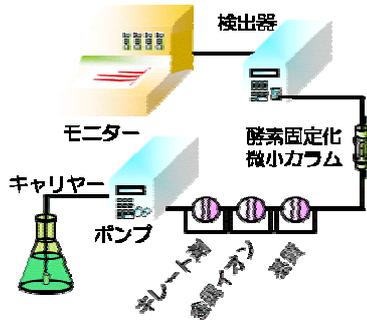


図4. コファクターセンシング用フローシステム

4. 研究成果

(1) 新規酵素固定化用担体の開発

合成されたBoc-APETSは、¹H-NMR、¹³C-NMR、およびH-H COSYおよび、GC-MSによる分子量計測から同定を行った。その結果、目的の化合物が得られていることを確認できた(図5)。

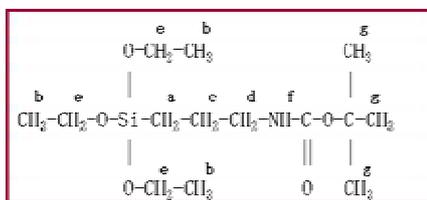


図5. Boc-APTESの構造とNMR解析結果

$\delta = 0.64$ (2H, Ha), $\delta = 1.24$ (9H, Hb)
 $\delta = 1.45$ (9H, Hg), $\delta = 1.62$ (2H, Hc)
 $\delta = 3.12$ (2H, Hd), $\delta = 3.84$ (6H, He)

また、当該化合物を用いて作成したモノリスシリカカラムに酸性ウレアーゼを固定化し、計測を行った。作成したモノリスシリカカラムへの固定化率は従来の方法により作成したものとは比べ、約3分の1と低下していたが、通液時の圧力が5分の1以下になっており、流速をあげられるため拡散が防げることや、アルキルアミノ化の過熱による中空系膜の劣化を回避できることから、当該システムを用いて得られた応用曲線は従来のものに比べ、感度が向上していることが例証された(図6)。

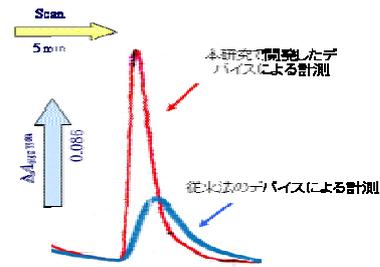


図6. 新規モノリスシリカカラム-酸性ウレアーゼカラムの応答曲線

(2) 酸性ウレアーゼ阻害剤のスクリーニングとハイスルーブット化

図7に当該手法を用いた酵素阻害における、パラメーターである阻害率と回復率の定義を示す。Aは、基質である尿素を注入して最初の酵素活性を評価したものである。Bは、Aの操作の後、阻害剤(今回はヒドロキシ尿素とアセトヒドロキサム酸)を注入後、尿素を注入して活性を評価したものの、Cは、更に基質を注入、活性を評価することにより、酵素活性がどの程度回復するかを評価したものであり、薬剤の持続率を評価したことと同義である。本方法では、酵素を固定化しているため、このような阻害剤と反応させた後、阻害剤を除去、再度酵素活性を評価できることから、薬剤の持続性を容易に評価できる方法となっている。

当該手法を用いて既存の阻害剤であるヒドロキシ尿素とアセトヒドロキサム酸の効果を評価した結果を図8に示す。A,B,Cは、それぞれ図7におけるA,B,Cと同様の操作を示しており、C1-C5は、活性の持続性を評価するために、繰り返し(5回)尿素を注入して活性を評価したものである。ヒドロキシ尿素は、阻害剤注入後、ほぼ活性が消失するものの(図8-B)急速な活性の回復が確認された(図8-C1~C3)。それに対して、アセトヒ

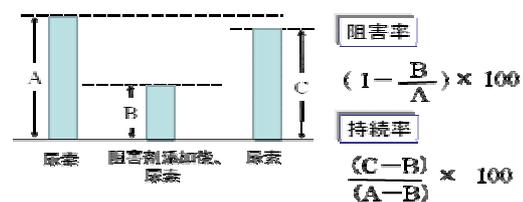


図7. 阻害率及び回復率の評価法

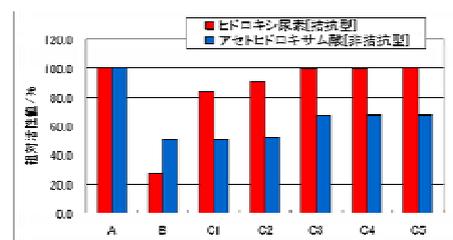


図8. ウレアーゼ阻害剤の阻害特性

ドロキサム酸は、阻害自体はそれほど強くないものの(図 8-B) 活性が持続することが示された(図 8-C1~C5)。これらの結果から、当該システムにより、活性の持続性を容易に評価できることが例証された。

以上の結果を受けて、当該システムを用いて、酸性ウレアーゼ阻害剤のスクリーニングを行った。38 種類の試薬生薬に対して阻害剤の特性(阻害能と持続能)を評価した結果を表 1. に示す。様々な生薬の 50%エタノール抽出物の阻害能を調べた結果、ダイオウが阻害能を有していることが示された。

また、磁気ビーズ上にウレアーゼを固定化、バッチ式で使用するにより、フロー型と同様に薬剤の持続性を評価できることが例証されたと共に、マイクロプレートリーダーを用いることで、多数のサンプルを同時に評価できるシステムを構築することができた(データは非表示)。



(3) アルカリホスファターゼを用いた微量金属計測

当該システムを用いて亜鉛(II)イオンの計測を行った結果を図 9 に示す。2.5 μM から 30 μM の間で直線を得ることができ、それぞれの濃度における r. s. d. は 3% 以下、直線率も 0.99 と再現性を得られることが示された。また、実試料として、ミネラルウォーターやお茶などの飲料を実試料として用いて標準添加法で計測を行い、原子吸光法と比較して、相関性を得ることができた。

また、アルカリホスファターゼは、亜鉛

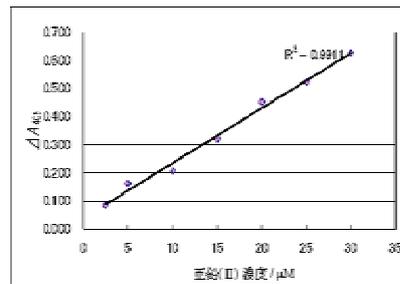


図9. 亜鉛(II)イオンの検量線

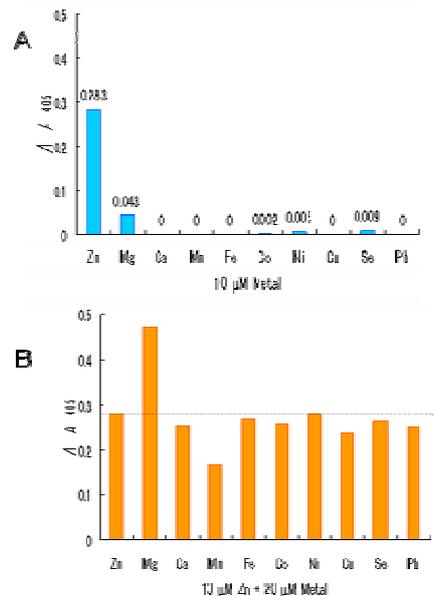


図10. 各種金属イオンのアルカリホスファターゼ活性への影響

A: キレート処理後、各種金属イオンを注入、酵素活性を評価した結果。B: キレート処理後、亜鉛(II)イオンと各種金属イオンの混合液を注入、酵素活性を評価した結果。

(II)イオン非存在下では、ほとんど他の金属イオンの影響を受けないが、共存下では、Mg(II)イオンのみ大きく影響を受けることを見出した(図 10)。そのため、本システムを用いて Zn(II)イオンの濃度を一定に、Mg(II)イオンの濃度を変化させて検量線を作成、Mg(II)イオンの計測に適用した。その結果、2.5 μM から 25 μM の間で計測できることが示された。また、Co(II)イオン計測用のアルカリホスファターゼに関しては、現在構築を続行しており、構築完了後、Co(II)イオンの計測へ適用する予定である。

コバルトイオンの計測は未完了であるが、微量金属イオンの分析として、当初の目的である、数分以内での、数十マイクロリットルの試料から、ppb レベルの検出を可能とすることに於いては、すべて達成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Y. Iida, Y. Tsukada, N. Murayama, J. Yamaguchi,

T. Saito, I. Satoh, Development of Nocel Silica Monolith and the Application to the Support for Immobilized Enzyme, The papers of Technical Meeting on Chemical Sensor IEE Japan, CHS-07, 29-32, 2007, 査読有

Y. Iida, Y.Takahara, and I. Satoh, Screening of Enzyme Inhibitors with Use of an Immobilized Enzyme as a Recognition Element, Chemical Sensor, 23-A, 25-27, 2007, 査読無

Y. Iida, S. Aki, N. Murayama, Y. Tsukada, I. Satoh, and O. Yamamoto, Development of novel supporting materials for immobilizing enzymes and the application of the preparation to micro biosensing, Chemical Sensor, 23-B, 100-102, 2007, 査読無

T. Ohira, O. Yamamoto, Y. Iida, Z. Nakagawa, Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation, *J. Mater. Sci: Mater Med*, 19, 1407-1412, 2008, 査読有

Y. Iida, D. Nojima, K. Yoshino, K. Matsumoto, I. Satoh, Cofactor Sensing with use of Enzyme Switching Mechanism, Chemical Sensor, 24-A, 121-123, 2008, 査読無

飯田泰広・佐藤生男、アルコール飲料中の尿素分析用FIAシステム、*Flow Injection Anal.*, 24, 90-101, 2007, 査読有

飯田泰広、リアクター型センサ、*マテリアルインテグレーション*, 21, 299-306, 2008, 査読無

T. Ohira, O. Yamamoto, M. Kawamura, Y. Iida, Z. Nakagawa, Antibacterial Characteristics of MgO-ZnO Solid Solution with Different Chemical Compositions, *Trans. MRS-J.*, 33, 1273-1276, 2008, 査読有

T. Ohira, M. Kawamura, Y. Iida, M. Fukuda, O. Yamamoto, Influence of the mixing ratio on antibacterial characteristics of MgO-ZnO solid solution in two phase coexistence region, *J. Ceramic Society of Japan*, 116, 1234-1237, 2008, 査読有

I. Satoh, Y. Kobayashi, Y. Iida, Calorimetric biosensing for copper(II) ions using immobilized ASOD-preparations, Chemical Sensor, 25-A, 82-84, 2009, 査読無

[学会発表](計13件)

飯田泰広、野島大佑、吉野 翔、松本邦男、佐藤生男、酵素スイッチング機構を用いたコファクターセンシング、電気化学会第74回大会、2008年3月

野島大佑・佐藤生男・飯田泰広、金メッシュ固定化アルカリホスファターゼを用いた微量亜鉛(II)イオンの計測、*Separation Science* 2007, 2007年11月

安藝翔・佐藤生男・飯田泰広、アミノ基導入型新規モノリスカラムの開発、*Separation Science* 2007, 2007年11月

飯田泰広・安藝翔・佐藤生男、新規モノリスカラムの作成と微量バイオセンシングへの適用、*Separation Science* 2007, 2007年11月

飯田泰広・安藝翔・村山尚子・塚田結香・佐藤生男・山本修、酵素固定化用モノリスカラムの開発と微量計測への応用、2007年電気化学会秋季大会、2007年9月

飯田泰広・塚田結香・村山尚子・山口淳一・斎藤貴・佐藤生男、新規モノリスシリカカラムの開発と酵素固定化担体への適用、平成19年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、2007年7月

管博臣・安藝翔・佐藤生男・飯田泰広、持続的阻害効果を指標とする新規薬剤評価法の開発とウレアーゼ阻害剤探索への適用、防衛防衛学会第35回年次大会、2008年9月

D. Nojima, I. Satoh, Y. Iida, Determination of zinc(II) ions with use of enzyme switching mechanism, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis, 2008.9

Y. Iida, H. Kan, I. Satoh, Development of novel silica monolith as a support for immobilized enzyme based on the FIA system and application of the system for determination of urea, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis, 2008.9

T. Satoh, N. Maezumi, Y. Iida, Evaluation of properties of catechin as a tyrosinase inhibition, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis, 2008.9.

H. Kan, S. Aki, Y. Iida, Development of a microfluidic system and application of the system with use of immobilized acid urease to screening of urease inhibitors from herbal medicines, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis, 2008.9

D. Nojima, T. Satoh, I. Satoh, Y. Iida, Flow-injection analysis of Zn(II) and Mg(II) ions with an ALP-column based on an apoenzyme reactivation method, 214th Meeting of The Electrochemical Society, 2008. 10.

Y. Iida, I. Satoh, N. Maezumi, Development of novel screening method with use of an immobilized enzyme as a recognition element and the investigation of the properties of inhibitors, 214th Meeting of The Electrochemical Society, 2008. 10.

[図書](計1件)

飯田泰広(分担) 先進化学センサ、*糊ティー・アイ・シー*, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 泰広 (IIDA YASUHIRO)
神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号：40329305