

超好熱菌色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を素子とした バイオセンサーの開発

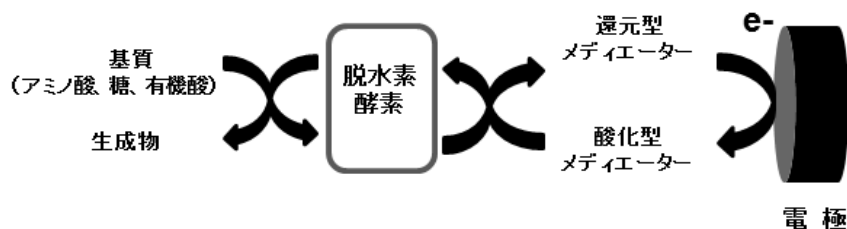
研究代表者： 里村 武範（工学研究科・准教授）
共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）、
坂元 博昭（産学連携本部・テニユアトラック講師）

概 要
本研究では様々な疾病の診断用マーカー、あるいは食品の品質管理用マーカーとして期待されている D-乳酸を簡便に定量できるバイオセンサーの開発を行うことを目的とした。特に、現在 D-乳酸定量用バイオセンサー開発における課題となっている短寿命という要素を克服するため安定性が高い超好熱菌 <i>Caldiarchoaeum subterraneum</i> 由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素 (Cs-DLDH) を用いて、これまで開発が進んでいなかった D-乳酸定量用バイオセンサーの開発を行った。Cs-DLDH とカーボンナノチューブ (CNT) を Nafion によって電極に包括固定化した Cs-DLDH/CNT 修飾電極を作製し D-乳酸の定量を行った。その結果、30 から 2500 μM の D-乳酸をワイドレンジに定量できることが明らかとなった。また、血清中、赤ワイン中の D-乳酸の定量にも成功した。
関連キーワード
超好熱菌、色素依存性 D-乳酸脱水素酵素、バイオセンサー

研究の背景および目的

D-乳酸は現在、医療や農業、食品の品質管理など多岐の分野で注目されている。その中で、医療分野においては、現代病である糖尿病や、その複合病である糖尿病ケトアシドーシスなどの病気診断のバイオマーカーとしての利用が期待されている¹⁾。健常者の血漿中の D-乳酸濃度は 250 μM 程度であることが知られている。一方、糖尿病患者の血漿中の D-乳酸濃度はおおよそ 250~470 μM と上昇し、糖尿病型ケトアシドーシスに至っては、3.8 mM 以上という高い D-乳酸濃度を示すことが報告されている²⁾。このことから、生体内の D-乳酸を即位に測定することは、これら疾病の早期予防につながると思われる。また、食品の分野においては、日本酒やワイン、ビールなどの発酵食品中に D-乳酸が含まれていることが知られており、ワインやビールにはそれぞれ 3.5~5.2 mM、0.75 mM 含まれていることが報告されている³⁾。ワインやビールは、生産地や種類によって含まれる D-乳酸濃度がほぼ一定であり、腐敗や損傷によって濃度大

幅に変化することが解っている。このため、これらの発酵食品中の D-乳酸濃度をモニタリングすることで、品質管理を簡便に行うことが可能となる³⁾。これらの理由から、どんな場所でも、迅速に再現性良く、D-乳酸を測定する方法が求められている。従来の D-乳酸の測定方法としては高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が挙げられる。しかし、HPLC は検出感度が高いが、測定に時間を要すること、装置が大きく研究室以外では実用性に欠けるといった問題が挙げられる。一方、酵素を電極用素子として用いる電気化学的バイオセンサーは簡便で再現性良く測定可能で安価かつ携帯可能な装置への応用が可能といった利点を有する (Scheme 1)。そこで本研究では、近年、全ゲノム配列が明らかとなった *Candidatus Caldiarchoaeum subterraneum* が有する色素依存性 D-乳酸脱水素酵素 (DLDH) を素子とした電極を作製し電気化学的検出法による D-乳酸検出の検討を行った。



Scheme 1 酵素を電極用素子として用いた電気化学測定法の概略図

研究の内容および成果

Cs-DLDH をコードする遺伝子を大腸菌によるタンパク質発現用ベクターpColdI に導入し、大腸菌内で組換えタンパクの発現を行った。大腸菌によって生産された組換えタンパク質をニッケルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製した。精製した Cs-DLDH の酵素化学的性質の解析を行ったところ、80℃、10 分間の熱処理を行っても失活せず高い安定性を示し、バイオセンサー用素子として有用性が高いことが明らかとなった。そこで、Cs-DLDH をグラッシーカーボン (GCE) 電極上に CNT と Nafion を混合した溶液で包括固定化した Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の作成を行い、本電極の機能評価を行った。まず、CNT の修飾量の最適化を検討した結果、CNT の濃度が 8 μg/ml で最も大きい酸化電流値が得られた。さらに、Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極における D-乳酸の検出限界及び定量性を検討した結果、30℃にお

いては、検出限界が 30 μM であり、30 から 2500 μM で高い直線性を有し広範囲の D-乳酸濃度を測定することが可能であることが明らかとなった (図 1)。この結果より、本酵素を用いた D-乳酸バイオセンサーは、ヒト血清中あるいは発酵食品中の D-乳酸を充分検出できる能力を有していることが判明した。また、Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の長期安定性を検討した結果、1 ヶ月以上使用しても D-乳酸に対する電流応答を維持していることが確認できた (図 2)。これより、本電極は、高い長期安定性を有し、センサーに用いるにあたって非常に有用であると考えられる。次に、本センサーを用いて実際に血清中、赤ワイン中の D-乳酸濃度の定量を行った。その結果、管理血清中、赤ワイン中の D-乳酸の濃度は 263±4.4 μM、6.7±1.5 mM と算出された。これら算出された D-乳酸濃度はこれまで報告されている文献値の濃度範囲であったことから

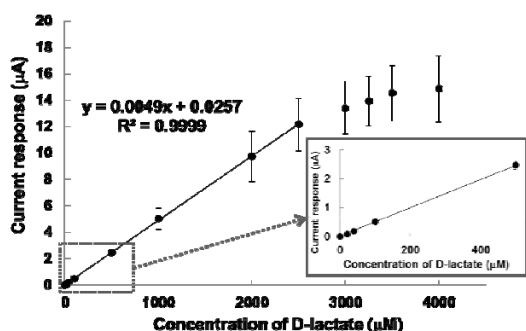


図 1 Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極による D-乳酸の検量線

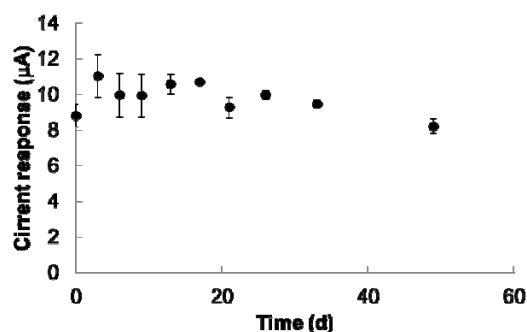


図 2 Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の長期安定性

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

「好熱性アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を用いた D-乳酸バイオセンサの開発」里村武範、大柳佑太、布浦拓郎、高木善弘、高見英人、高井研、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗
日本農芸化学会 2015 年度大会 札幌コンベンションセンター 平成 28 年度 3 月 28 日

海外雑誌に論文投稿準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 C に申請中