

# L-グルタミン酸オキシダーゼを用いたグルタミン酸センサーの開発及び GOT/GPT センシングへの応用

有馬 二郎・田村 隆・篠原 寛明<sup>a)</sup>・日下部 均<sup>b)</sup>  
田中 英彦・稲垣 賢二  
(生物資源化学講座)

## Glutamate Sensor Using L-Glutamate Oxidase and Its Application for Sensing GOT/GPT Activity

Jiro Arima, Takashi Tamura, Hiroaki Shinohara<sup>a)</sup>  
Hitoshi Kusakabe<sup>b)</sup>, Hidehiko Tanaka and Kenji Inagaki  
(Department of Bioresources Chemistry)

L-Glutamate measurement and GOT/GPT assay was successful by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement using the L-glutamate oxidase with 4-aminoantipyrine / phenol method. But, in examination of oxygen electrode, immobilized L-glutamate oxidase at the cellulose membrane loses its affinity to the substrate. For application of L-glutamate oxidase to L-glutamate and GOT/GPT sensor, L-glutamate measurement was used for the amperometric determination with non-fixed enzyme. On examination of electron mediator, response for L-glutamate was observed with each of the compounds ferricyane, ferrocene-COOH, ferrocene-MeOH, and benzoquinone. L-Glutamate was measured by carbon printed tip electrode presenting the L-glutamate oxidase and ferricyane based on the principle of chronoamperometry. A linear calibration graph was obtained between 1 mM and 30 mM. These results suggest that L-glutamate oxidase is able to utilize to L-glutamate sensor, and that there is a strong possibility to put this sensor to sensing for GOT/GPT activity.

Key words : L-glutamate oxidase, L-glutamate sensor, GOT/GPT sensor

### 緒 言

L-グルタミン酸は食品の主なうまみ成分である他、体内では脳神経細胞全般にわたり大量に存在し、興奮性の神経伝達物質として働く。また、L-グルタミン酸は接種しすぎることにより、急性神経毒性を示すことが一部で報告があり、その体内における生理活性は、摂取量と非常に密接な関係があることが明らかとなっている。よって、今後L-グルタミン酸検出・定量は、医療、食品などの様々な分野において応用されることが考えられる。しかしその定量は、アミノ酸分析機やグルタミン酸脱水素酵素<sup>1)</sup>、脱炭酸酵素を用いた方法などがあるが、それらは全て不正

確、困難、高価という問題が存在する。そこでL-グルタミン酸を容易かつ確実に定量、微量検出の可能な酵素として、L-グルタミン酸オキシダーゼが発見された<sup>2)</sup>。

L-グルタミン酸オキシダーゼはL-グルタミン酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、通常のL-アミノ酸オキシダーゼとは異なり基質特異性が非常に高く、温度やpHに対して安定である。近年こ

---

Received October 1, 2001

a) 岡山大学工学部  
(Faculty of Engineering, Okayama University)

b) ヤマサ醤油株式会社  
(Yamasa Shoyu Co., Ltd.)

のようなオキシダーゼと電極とを組み合わせたバイオセンサーが開発されつつあり、その代表例としてグルコースセンサー（グルコースオキシダーゼと電極を組み合わせ、血糖値などを測定する機器）がある。そこで我々は本酵素を用いて Fig. 1 A に示すような原理により、L-グルタミン酸の定量が可能であると推測した。また L-グルタミン酸は、肝臓や心臓機能の指標となる血中のグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ<sup>3,4)</sup> (GOT) 及びグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ<sup>5)</sup> (GPT) の生産物でもあることから、L-グルタミン酸センサーを応用することで Fig. 1 B, C に示される原理で、GOT/GPT 測定の可能性を見いだした。そしてそれらのセンサーが開発されることにより、医療分野における本酵素の利用、各診断法、検査法の簡便化が期待されるようになる。これまでにこのようなグルタミン酸センサー及び GOT/GPT センサーについては、グルタミナーゼを膜に固定させたグルタミン・グルタミン酸センサー<sup>6)</sup>、リンゴ酸デヒドロゲナーゼを用いた、オキサロ酢酸センサー及び GOT センサー<sup>7)</sup>の報告がある。しかし、これらは未だに実用化されておらず、また別のシステムを構築する必要があると考えられる。放線菌由来の L-グルタミン酸オキシダーゼは、非常に安定であり、また基質特異性が高い酵素であ

る。よって本酵素は今後、様々な分野においてのグルタミン酸に関わるセンサーに応用されることが期待される。

我々はこれまでに放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌内での発現系を構築した。大腸菌クローン株からは、本酵素は前駆体として発現し、またその性質は基質親和性や安定性について、放線菌から生産されるものと異なった。しかし、大腸菌クローン株より生産される本酵素を、トリプシンで処理することにより、基質親和性が上がったことから、この時点で微量の L-グルタミン酸を検出できるようになり、工業的に利用できる性質を持ち得ることになる。そこで本論文ではセンサーの開発に当たり、まず試験管内で本酵素を GOT/GPT 活性へ応用できるかどうかを記した。そして電極への応用では、再利用のできる酵素固定膜での検討を行うと共に、家庭用グルコースセンサーで実用化されている使い捨て電極チップへの応用の可能性について検討を行った。本研究ではこのように大量生産が可能となった本酵素を用い、L-グルタミン酸センサーの開発及び、GOT/GPT 検査への応用を目的とした。

## 方 法

### 1. L-グルタミン酸オキシダーゼの調製

本酵素遺伝子オープンリーディングフレーム (ORF) を組み込んだ pKK223-3 (pKK-LGOX) を持つ大腸菌 JM109 株より、L-グルタミン酸オキシダーゼ前駆体を精製し、トリプシン分解により基質親和性の優れた酵素を調製した。まず一定量の湿菌体を 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、超音波破碎を行い、遠心分離して上清をとった。これに対し硫酸分画 (20-45%) を行った後、DEAE-Toyopearl 650M イオン交換クロマトグラフィーに吸着させ、100-200 mM NaCl でステップワイズ溶出を行った。酵素活性の高い分画を収集した後、濃縮を行い、さらに Superdex 200 FPLC ゲル濾過クロマトグラフィーに供して L-グルタミン酸オキシダーゼ前駆体を精製した。この精製試料に対し、1/50 容の 1 mg/ml トリプシン溶液を添加し、室温で 1 時間反応させた。その後、トリプシン溶液と等量の 1 mg/ml のトリプシンインヒビターを添加することでトリプシン反応を止め、この試料を L-グルタミン酸オキシダーゼとし

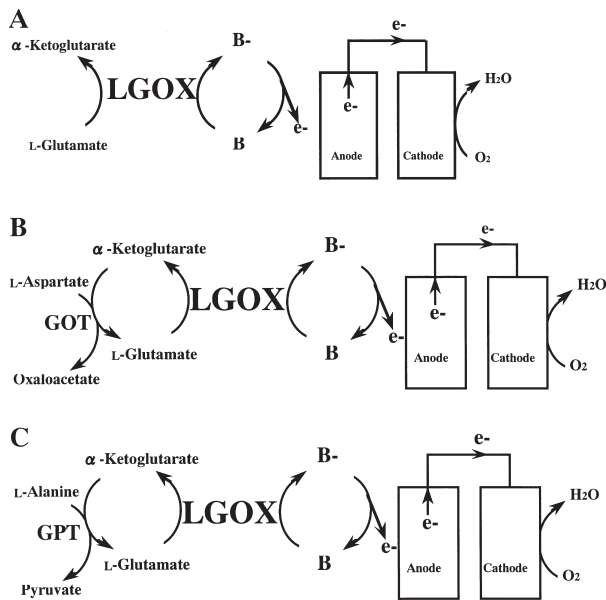


Fig. 1 Principle of reaction. A, L-glutamate sensor ; B, GOT sensor ; and C, GPT sensor. LGOX is L-glutamate oxidase and B is electron mediator.

た。

## 2. L-グルタミン酸オキシダーゼ活性の測定

本酵素活性は、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼとの共役系で赤色キノイミン色素として連続的に測定する4-アミノアンチピリン・フェノール法<sup>8)</sup>を用いた。まず、酵素活性プレミックス溶液(100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4):15mM 4-アミノアンチピリン:50mM フェノール:300U/mlペルオキシダーゼ=21:1:1:1で調整)1.6mlに適当に希釈したL-グルタミン酸オキシダーゼ溶液を0.2ml添加した。25℃で、5分インキュベートした後、0.5M L-グルタミン酸溶液を添加し、Shimadzu UV1200を用いて505nmの吸光度の増加( $\Delta A_{505nm}/min$ )を測定した。本酵素1Uは、25℃1分間に1 $\mu$ molのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酵素量と定義した。

## 3. 酸素電極を用いたL-グルタミン酸測定

酸素電極による測定は、アノードにPb、カソードにPt、そして電解液としてKOHを用いるガルバニ式電極を用いて行った。また酸素電極に取り付ける酵素固定膜は、表面をグルタルアルデヒドで処理したセルロース膜に酵素を浸し、アルデヒド基とリジン残基とで共有結合させ、固定化させることで作製した。

電極上に酸素透過性のテフロン膜を取り付け、その上から酵素固定膜を覆う形で取り付けた。用意した電極を100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中に浸し、酸素電極の出力端子を10kオームの抵抗につなぐことで、基質添加後の抵抗の両端での電圧降下を測定することで酸素電極でのL-グルタミン酸測定を評価した。

## 4. 電子メディエーターの検討

電子メディエーターの検討は酵素固定膜を用い、作用極をグラッシーカーボン電極、参照電極を白金電極、基準電極をAg/AgCl電極を用いた3電極系で測定を行った。また酵素固定膜は、酸素電極での測定の際用いたものを再度利用した。メディエーターを用いた測定は、酵素固定膜をグラッシーカーボンに取り付け、アルゴンガスによる脱酸素したメディエーター溶液中で、0.5Vの電圧をポテンショスタットで印加した後、L-グルタミン酸を添加することで行った。

## 5. 電極チップL-グルタミン酸センサーの作製及びL-グルタミン酸の測定

L-グルタミン酸センサーは図1に示した原理の元、グルコースセンサーにならない、カーボンプリントされた電極チップを用いた2電極系で行った。センサーの作製は電極上に酵素-メディエーター溶液(0.5%カルボキシメチルセルロース、2%フェリシアン化カリウム、1%トリトンX-100、500U/ml L-グルタミン酸オキシダーゼ)を0.8 $\mu$ Lプロットし、30℃で10分乾燥を行った。

L-グルタミン酸の測定はクロノアンペロメトリー法の原理で行った。酵素-メディエーター結晶状に、2 $\mu$ LのL-グルタミン酸試料(0.9% NaCl溶液)を添加し、5分反応を行ったあと、ポテンショスタットで0.5Vの電圧を印加した。電圧印可後5秒後における電流値を記録し、L-グルタミン酸濃度との比例関係性をグラフにプロットすることで求めた。

## 結果及び考察

### 1. L-グルタミン酸オキシダーゼを用いた試験管内でのL-グルタミン酸定量及びGOT/GPTアッセイへの利用

大腸菌より精製したL-グルタミン酸オキシダーゼ前駆体は、Km値が5mMであり、L-グルタミン酸濃度が0.1mM以下の場合、ほとんど反応が進まない結果となった。しかし、この前駆体に対しトリプシン処理を行うと、Km値が0.2mMとなり、微量のL-グルタミン酸存在下においても確実に反応が行われるようになった。そこで、トリプシン処理後の本酵素前駆体を用い、4-アミノアンチピリン・フェノール法の原理でL-グルタミン酸の検量線を作製した(Fig. 2 A)。この結果、L-グルタミン酸濃度と吸光度(505nm)との間に正確な比例関係が得られた。よってトリプシン処理後の本酵素前駆体を用いたL-グルタミン酸定量は可能であり、それはかなり正確な値を示すことが証明された。このことから同じ原理でGOT/GPT活性も測定できると推測し、GOT/GPTアッセイを試みた(Fig. 2 B,C)。GOT活性の測定において、その基質となるL-アスパラギン酸は、本酵素も僅かに基質とする(L-グルタミン酸に対する相対活性は、約0.6)。従ってFig. 2 Bに示されるよう、結果的にGOT非存在下においても吸光度増加が観察された。しかし、単位時間あたりの吸

光度増加をグラフにプロットすることで, GOT 量と吸光度増加との間に比例関係が得られた. GOT は, L-アスパラギン酸以上にシステインスルフィン酸を基質として好むという報告がある<sup>9)</sup>. よってシステイ

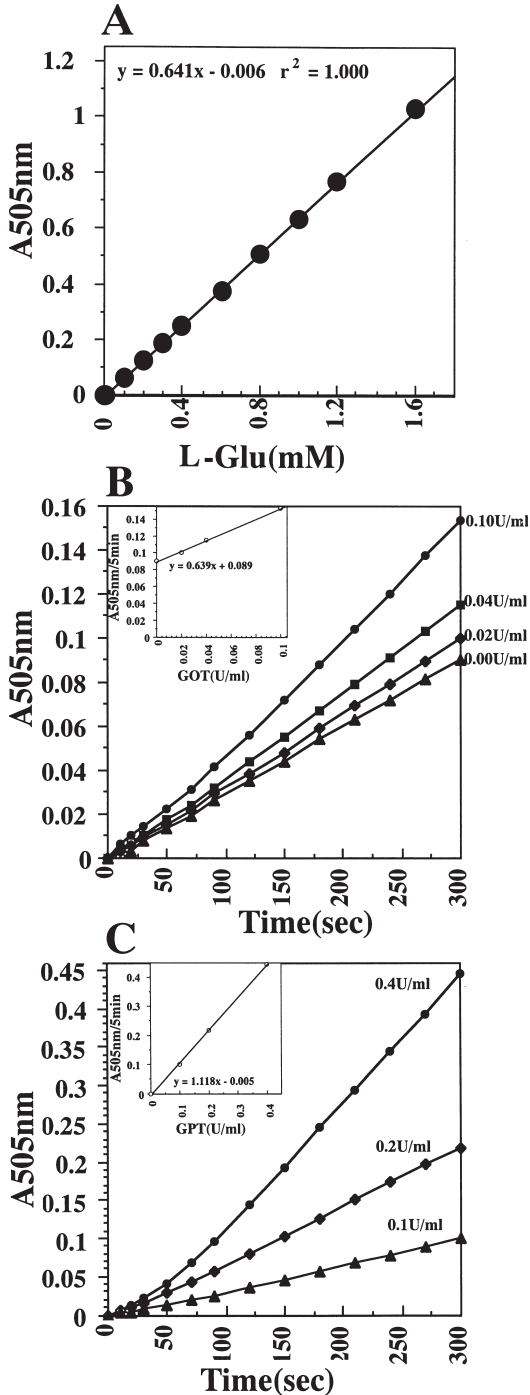


Fig. 2 Calibration graphs for the L-glutamate and GOT/GPT measurement using an L-glutamate oxidase by 4-aminoantipyrine/phenol method. A, L-glutamate standard curve ; B, GOT measurement, and C, GPT measurement.

ンスルフィン酸を用いることで, さらに正確な GOT 測定が可能になることが予測できる. また GPT 活性においては, その基質が本酵素反応に全く影響を及ぼさないことから, GPT 非存在下においても全く吸光度増加は見られず, その単位時間あたりの吸光度増加と GPT 量の間でかなり正確な比例関係が得られることが明らかとなった (Fig. 2 C). よって, トリプシン処理後の L-グルタミン酸オキシダーゼ前駆体は L-グルタミン酸定量に利用でき, またそれを応用することで GOT/GPT 活性も測定できることがここで明らかとなった.

## 2. 酸素電極を用いた L-グルタミン酸オキシダーゼ固定膜の評価

トリプシン処理後の本酵素前駆体は, GOT/GPT 活性測定に利用できることから, さらに L-グルタミン酸センサー及び GOT/GPT センサーに応用することを目的として, 電極での検討を進めた. そこでセンサーを開発するに当たり, 再利用可能な酵素固定膜が利用できることは, コストや作業性の面で工業的にかなり有効である. よって酵素固定膜を作製し, 酸素電極を用いた固定膜での評価を行った. 電極を浸したリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中, 終濃度 0.3–1 mM になるよう L-グルタミン酸を添加し, 反応における電圧降下を測定した. 電圧降下の大きさは酵素反応速度に由来することから, 電圧降下の値を用いて, 酵素固定膜中に存在する本酵素の  $K_m$  値を求めた (Fig. 3). 酸素電極を用いた検討において, 終濃度 0.3–1 mM の基質存在下でははっきりと電圧降下が見られた (Fig. 3 A). しかし, 各基質濃度における応答はかなりの差が見られ, Lineweaver-Burk プロットから求めた  $K_m$  値は約 2.4 mM であり, 固定化されていない酵素とかなりの差が見られた (Fig. 3 B). またデータには示していないが, 終濃度 0.1 mM 以下の基質存在下においては, 全く電圧変化が見られなかった. この結果, 本酵素は固定化されることで基質親和性が下がり, 低濃度での L-グルタミン酸定量は不可能であることが明らかとなった. 今回行った酵素固定化法はセルロース膜の表面にアルデヒド基をつけ, リジン残基とシッフ塩基を形成させる共有結合式の方法である. 固定化酵素において基質親和性の低下が見られたことから, 結合が基質認識に分子レベルで影響を与えているか, または立体構造に何らかの変化を与えている

ことが考えられた。酵素の固定化にはこの方法以外にも、単体にイオン結合的に固定化、酵素同士の架橋での固定化、高分子ゲルの微細な粒子に包み込むか、半透膜性の膜によって被覆する方法などがある。実際これらの方法で固定化された酵素の検討は、装置などの関係上行われていない。しかし、酵素の立体構造などにあまり影響の与えない半透膜性の膜によって被覆する包括法は、本酵素の性質を失わせることなく電極上での反応に用いることが可能であると予測されるため、今後の検討に期待される。

### 3. 電子メディエーターの検討

酵素固定膜の検討において、固定化により基質親和性に影響を受けていることが明らかとなった。そこでL-グルタミン酸センサー及び GOT/GPT センサーの開発において、現在市販されているグルコースセンサーにならない、酵素を固定化せず電極上で反

応を行い、電子を受け取った受容体を測定する方法で実験を行った。そこでまず電子受容体の同定が必要であると示唆されたため、酵素固定膜を用いた3電極系での酵素-基質反応・応答試験を行った。電子受容体として、フェリシアン化カリウム、フェロセンカルボン酸、フェロセンメタノール、ベンゾキノンの4種を用い、脱酸素状態で0.5Vの電圧を印加してそれぞれの酸化電流上昇を測定した。結果、全てにおいて電流上昇が見られた(Fig. 4)。そのことから、通常還元型のFADは酸素へ電子を受け渡すが、これらの化合物は電子受容体としての酸素の代わりとなり得ることが明らかとなった。最も電子受容体特異性の高い化合物はフェロセンカルボン酸であり、また頻繁に使用されているフェリシアンにおいては応答は得られたが、これらの化合物の中では最も特異性が低いことが明らかとなった。これまでにグルコースセンサーに用いられているグルコースオキシダーゼの電子受容体特異性について調べられている<sup>10)</sup>。そのデータから、グルコースオキシダーゼにおいてもフェロセン化合物は電子受容体特異性が高く、フェリシアンの約150倍の値が観察されている。しかし、実際市販されているグルコースセンサーの電子受容体は、フェリシアンが用いられており、十分に正確なセンサーの役割を果たしている。よって、本酵素においてもこれらの4種の化合物は電子受容体として用いることが可能であると考えられた。

### 4. クロノアンペロメトリー法によるL-グルタミン酸測定の検討

電極上でのL-グルタミン酸測定は、固定化されていない酵素を用いたクロノアンペロメトリー法で行った。また電子受容体としてグルコースセンサーにならない、フェリシアンを用いた。測定は0-100mM及び、0-15mMでの範囲で行った。結果をFig. 5に示す。高濃度領域(0-100mM)での測定では、濃度が高くなるに従い、勾配が緩やかになり、また低濃度領域(0-15mM)での測定では、少々ばらついた結果となった。今回の測定では電極上にのせるL-グルタミン酸試料は2 $\mu$ Lであり、乾燥条件も考慮した上で反応時間を5分としたため、高濃度においては時間内において酵素反応が終わらなかったことが考えられた。また低濃度領域の測定では、電極上のフェリシアン及び酵素結晶が空気中の水分を吸収し、水分子とフェリシアンが反応してしまうこと

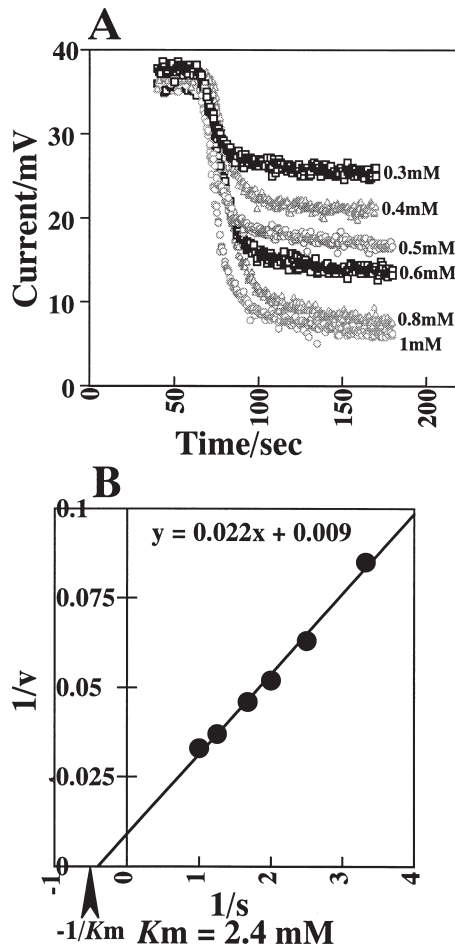


Fig. 3 Sensor response for L-glutamate using an oxygen electrode and enzyme fixed on the cellulose membrane (A), and Lineweaver-Burk plot (B).

や、乾燥時のフェリシアン結晶のでき方の異なり、そして一定した試料の添加条件がないことが、値が一定しない原因として考えられた。酸化還元電流測定において、電極上での試料添加時におけるスポットの形は、電圧印加したときの電流値にかなりの影響を与える。そのことから、必ず一定した添加条件で試料をスポットする工夫が必要とされる。またフェリシアン結晶や酵素の溶解速度や、酵素反応前にすでに存在しているフェロシアンなど、様々な環境の要因に影響することが示唆された。しかしこれらのグラフから、30mM までの範囲において、直線が得られることが示唆された。データはのせていないが、実際、グルコース測定において同様の実験を行ったが、同じ結果として観察された。よって値がばらつくことはそこまで問題点としてあげられるものではないと考えられる。しかし、GOT/GPT 測定におい

ては、さらに低濃度で測定できるシステムが必要とされ(0.1-1.5mM で確実に測定できることが理想)、そのためにはさらに処方最適化による精度向上の検討が望まれる。また、電子受容体の検討において最も応答の高い値が得られたフェロセンカルボン酸での検討が今後必要であると思われた。フェロセンカルボン酸においても、環境によるかなりの影響が考えられるが、電子受容体特異性が高いことから、酵素反応に由来する還元体での酸化還元電流が多く得られると考えている。今後これらの検討を行い、低濃度領域でのL-グルタミン酸測定を可能にし、GOT/GPT センサーへの応用が期待される。

### 要 約

L-グルタミン酸オキシダーゼ前駆体をトリプシン分解することで、成熟酵素と同程度の基質親和性を

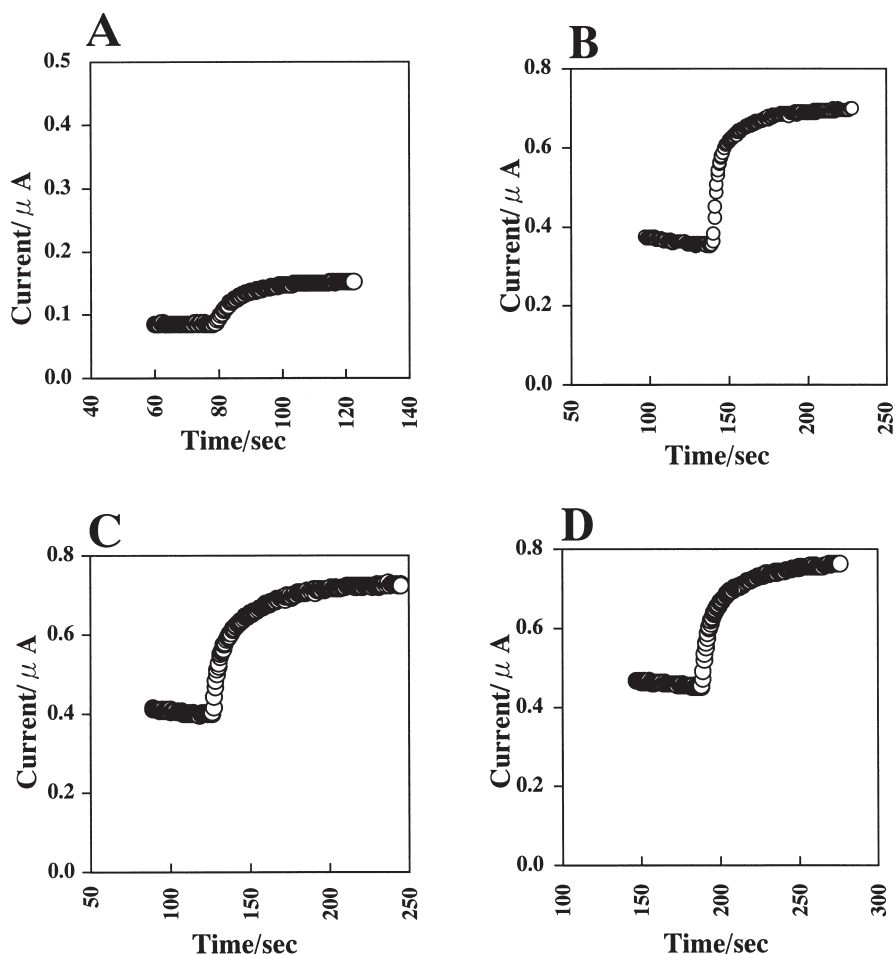


Fig. 4 Responses for L-glutamate with each electron mediator. Responses were measured at +500mV vs. GC electrode in 100mM potassium-phosphate buffer (pH 7.4). A, 10mM ferricyane ; B, ferrocene-COOH ; C, benzoquinone ; and D, ferrocene-methanol.

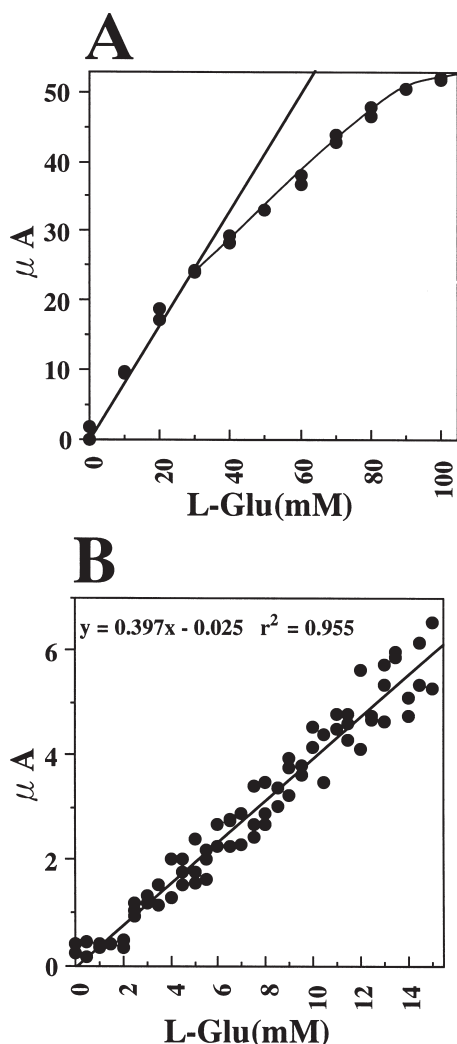


Fig. 5 Calibration graphs for the L-glutamate with carbon printed tip electrode. Enzyme reaction was on electrode presenting 2% ferrocyanide, 0.5% carboxymethyl cellulose, and 500U/ml of L-glutamate oxidase at 5 min. Responses were measured at +500mV vs. carbon electrode. A, 0–100mM L-glutamate; and B, 0–15mM L-glutamate.

持つ酵素を得た。この酵素は L-グルタミン酸を確実に定量することを可能とし、また、GOT/GPT アッセイにおいてもその可能性を示した。しかし酸素電極による固定化酵素の評価では、基質親和性の低下が見られ、L-Glu が高濃度でないと測定不可能であることが示唆された。そこで市販されているグルコースセンサーにならない、クロノアンペロメトリー法による L-Glu の検出に試みた。電子受容体の検討において、フェロセン化合物及びフェリシアンで反応が行われることから、フェリシアンを電子受容体と

して用いた L-グルタミン酸の検量線を作製した。その結果、グルコースセンサーと同程度の検量線が得られたことから、L-グルタミン酸センサーに利用できることが示され、また処方最適化の検討及び電子受容体の変換による GOT/GPT センサーへの応用にも、その可能性が見いだされた。

#### 文 献

- 1) Fosse, V. M., J. Kolstad and F. Fonnum: A bioluminescence method for the measurement of L-glutamate: applications to the study of changes in the release of L-glutamate from lateral geniculate nucleus and superior colliculus after visual cortex ablation in rats. *J Neurochem.* **47**, 340–9 (1986)
- 2) Kusakabe, H., Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka and H. Yoshino: Purification and Properties of a New Enzyme, L-Glutamate Oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 Grown on Wheat Bran. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1323–28 (1983)
- 3) Braunstein, A. E. *The Enzymes* (3rd ed.) **9**, 379–481 (1973)
- 4) Teranishi, H., H. Kagamiyama, K. Teranishi, H. Wada, T. Yamano and Y. Morino: Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of glutamic-oxalacetic transaminase from human heart. Structural comparison with the isoenzymes from pig heart. *J Biol Chem.* **253**, 8842–7 (1978)
- 5) Tanase S., H. Kojima and Y. Morino: Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. *Biochemistry.* **18**, 3002–7 (1979)
- 6) Marcel B. M., R. B. Spokane, J. M. Johnson and J. R. Woodward: Glutamine Biosensors for Biotechnology Applications, with Suppression of the Endogenous Glutamate Signal. *Anal Chem.* **69**, 3674–8 (1997)
- 7) Iida, T., K. Kikumoto and Y. Mori: ISFET-Type Oxaloacetate Sensor Using a Thermophilic Enzyme Malate Dehydrogenase and its Application to Sensing for GOT Activity. *Rep Asahi Glass Found.* **59**, 279–84 (1991)
- 8) Allain, C. C., L. S. Poon, C. S. Chan, W. Richmond and Fu PC: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* **20**, 470–5 (1974)
- 9) Yagi, T., H. Kagamiyama and M. Nozaki: Cysteine Sulfinate Transamination Activity of Aspartate Aminotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **90**, 447–52 (1979)

10) Ikeda, S., T. Yoshioka and S. Nankai : Electrochemistry of Hexacyanoferrate (III) as an Electron Media-

tor for Glucose Oxidase. *Denki Kagaku* **63**, 1145-7 (1995)