報 文

ビオチン-アビジン生物親和結合を用いる L-グルタミン酸に対する 増幅型リアクターの設計*

八尾 俊男^{®**}, 南條 陽子^{**}

Molecular design of an enzyme reactor involving amplification for L-glutamate using biotin-avidin bioaffinity binding

Toshio YAO and Youko NANJO^{**}

^{**}Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1, Gakuencho, Sakai-shi, Osaka 599-8531

(Received 5 July 2001, Accepted 24 July 2001)

To prepare an enzyme minireactor involving amplification for L-glutamate, multilayer co-immobilization of L-glutamate oxidase (GLOD) and glutamate dehydrogenase (GIDH) onto aminopropyl controlled-pore glass (NH₂-CPG) was carried out stepwise by the alternating binding of avidin and biotin-labeled enzymes. Amplification for L-glutamate is based on substrate recycling between coupled enzymes. The layer-by-layer structure of enzyme molecules immobilized into the pore-space of CPG was geometrically estimated from the immobilized amounts of avidin and biotin-labeled enzymes. The enzyme reactor with a greatest amplification was obtained by the alternating binding of avidin and biotin-labeled enzymes on a monolayer of biotin-labeled GLOD and GIDH crosslinked randomly with glutaraldehyde onto the NH₂-CPG; the amplification factor for L-glutamate was 606 at a flow rate of 20 $\mu\text{l min}^{-1}$, when a 0.1 M ammonium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.75 mM NADPH and 1 mM sodium azide was used as the carrier buffer in a FIA system. The calibration graph for the amplified response was linear over the range $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7}$ M L-glutamate for 10 μl injections. The detection limit was 3×10^{-9} M (30 fmol) for L-glutamate.

Keywords : enzyme reactor; amplification; L-glutamate; multilayer immobilization of enzyme; biotin-avidin binding.

1 緒 言

L-グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系、特に脳内での興奮性の神経伝達物質として働き¹⁾, シナプス伝達, 老化, 学習等の生理プロセスで重要な役割を果たしている^{2)~4)}. このような生理学的に重要な L-グルタミン酸を *in vivo* 計測する方法として, マイクロ酵素電極を直接体内に挿入する方法^{5)~8)}や, マイクロ透析と高速液体クロマトグラフィ

ー (HPLC) を組み合わせたもの⁹⁾¹⁰⁾, マイクロ透析とキャピラリー電気泳動を組み合わせたもの^{11)~13)}等があるが, 生体適合性の問題やリアルタイム計測ができないなどの問題点がある. そこで, マイクロ透析プローブをサンプリング手段とし, オンライン透析されたかん(灌)流液を連続的に酵素リアクターや酵素電極で選択的に自動計測する方法が提案されてきた^{14)~17)}. 著者ら¹⁶⁾¹⁷⁾は, 脳細胞外 L-グルタミン酸をオンライン計測するために, 酵素リアクターを用いたマイクロ透析フロー分析法について検討してきたが, 灌流液流量が数 $\mu\text{l min}^{-1}$ 以下であるので, リアルタイム計測には小さな容量 (例えば, 約 10 μl) のリアクターが望ましい. また, L-グルタミン酸の脳細胞外での濃度

* ビオチン-アビジン生物親和結合を用いる多孔性ガラス細孔内での酵素の連続固定化 (第2報). 前報は八尾俊男, 南條陽子: 分析化学, 50, 603 (2001).

** 大阪府立大学大学院工学研究科: 599-8531 大阪府堺市学園町 1-1

Fig. 1 Enzymatic recycling model of L-glutamate in the co-immobilized L-glutamate oxidase (GLOD)/glutamate dehydrogenase (GIDH) reactor

レベルは数 μM であり、更に透析プローブの透析率（回収率）が 10% 以下であるので、検出系には 10^{-8} M 濃度レベルの感度が必要になる。そこで L-グルタミン酸の計測に、L-グルタミン酸オキシダーゼ（GLOD）とグルタミン酸脱水素酵素（GIDH）を固定化したリアクターを用い、Fig. 1 に示した両酵素間での基質リサイクリング反応により、L-グルタミン酸を増幅して検出することを試みた。

そこで、既報¹⁸⁾で述べたビオチン-アビジン生物親和反応を用い、アミノプロピル化多孔性ガラスビーズ（ NH_2 -CPG）の細孔内に両酵素を段階的、直鎖状に固定化する方法について検討し、孔内部空間での各酵素分子の配向を推定するとともに、基質リサイクリングに基づく増幅型ミニリアクターの最適設計法について検討し、得られた知見を述べる。

2 実験

2.1 試薬

GLOD（EC 1.4.3.11; 22.4 U mg^{-1} , *Streptomyces* sp. 起源）はヤマサ醤油製のものを、GIDH（EC 1.4.1.4; $11,800\text{ U ml}^{-1}$, *Proteus* sp. 起源）は東洋紡製のものを、 β -ニコチンアミドアデニンジスクレオチドリ酸還元型（NADPH）はオリエンタル酵母製のものをを用いた。L-グルタミン酸とアジ化ナトリウムは和光純薬製のものをを用いた。アビジン、ビオチンアミドカプロン酸 3-スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（BAC-sulfoNHS）、グルタルアルデヒド溶液（約 20%, 電子顕微鏡用）と NH_2 -CPG（粒子径 120~200 メッシュ、平均孔直径 53.8 nm、アミン含有量 $98.2\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$ 、表面積 $42.9\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ）は既報¹⁸⁾と同じメーカーから購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま使用した。

2.2 酵素のビオチン標識

GLOD と GIDH の分子量をそれぞれ 14 万、30 万とし、酵素とビオチン標識剤 BAC-sulfoNHS をモル比で 1 : 10 にして、既報¹⁸⁾と同じ方法で反応させた後、同様の方法でビオチン標識酵素を単離した。

2.3 酵素固定化リアクターの作製

内径が 1.5 mm で長さが 10 mm のテフロン管に NH_2 -

CPG を 10 mg 充填し、両端を 300 メッシュのナイロンネットでふさいだカラムを作製して、次のタイプ a, a', b, c の結合様式の異なった酵素リアクターを作製した。

タイプ a と a': 上述のカラムに既報¹⁸⁾と同様の方法で、グルタルアルデヒドを橋かけ剤としてビオチン標識 GLOD（GLOD-b）を固定化し、次いでアビジンを結合させ、更にビオチン標識 GIDH（GIDH-b）を結合してタイプ a のリアクターを作製した。一方、GIDH-b をグルタルアルデヒドを用いて固定化し、次いでアビジン、GLOD-b の順に結合してタイプ a' のリアクターを作製した。ここで、GLOD-b, GIDH-b とアビジンの固定化溶液はそれぞれ 1~2 mg の既知量をリン酸緩衝液（pH 7.2）1 ml に溶解したものを用い、洗浄液には同じリン酸緩衝液を用いた。

タイプ b: タイプ a, a' と同様の手順で、グルタルアルデヒド橋かけ法によりアビジンを固定化し、更に GIDH-b, アビジン、GLOD-b を順次結合してリアクターを作製した。

タイプ c: 同様の手順で、GLOD-b と GIDH-b の混合溶液をグルタルアルデヒドで活性化した上述のカラムに 2 時間循環させ、GLOD-b と GIDH-b を CPG にランダムに同時固定化した。次いで、同様の方法でアビジンを結合し、更に GLOD-b と GIDH-b の混合溶液を同様に循環させて、GLOD-b と GIDH-b をランダムに固定化してリアクターを作製した。この場合、0.5 mg の GLOD-b と 1.5 mg の GIDH-b を含むリン酸緩衝溶液 1 ml を酵素固定化溶液として用いた。この混合溶液中の GLOD-b と GIDH-b は重量比で 1 : 3、モル比で 1 : 1.4、活性の比で 1 : 40 であり、この比率で固定化した場合に最も大きな増幅率が L-グルタミン酸に対して得られた。

2.4 装置と FIA システム

固定化には Gilson 製ペリスタポンプ Minipuls 2 を用い、酵素及びアビジンの固定化量の測定は既報¹⁸⁾と同じ方法で行った。

作製した種々の酵素リアクターの増幅特性の評価は Fig. 2 に示したフローインジェクション分析（FIA）装置を用いて行った。FIA 装置は 2 台のダブルプランジャー型 μl ポンプ（エイコム製）、脱気ポンプ（同社製 Gas Torr），25 μl のサンプルループを備えたサンプルインジェクター（Rheodyne 製 7725 型）、3 極式ポテンショスタットとフローセル（エイコム製 ECD-300 型電気化学検出器；電極部： $\phi 3\text{ mm}$ のクロスフロー白金電極）、記録部（システムインストルメント製 Chromatocorder 21 又は Seconic 製 SS-250F 記録計）、カラムオープン（島津製作所製 CTO-10A 型）を組み立てて用いた。検出器までのフローラインには内径 0.25 mm の PTFE 管を用いて、各ユニットを接続した。

また、Fig. 1 で示したように L-グルタミン酸に対する増

Fig. 2 An FIA manifold used to evaluate characteristics of enzyme reactor

C₁: 0.1 M ammonium phosphate buffer; C₂: 0.1 M ammonium phosphate buffer containing excess of NADPH and 1 mM sodium azide; GT: gastorr; P₁ and P₂: double plunger µl pump; SI: sample injector with a sample loop of 25 µl; E: enzyme reactor; CO: thermostated column oven; D: flow-cell with a cross-flow platinum electrode; P: potentiostat; R: recorder; W: waste

幅応答を得るためには、キャリアー溶液に NADPH とアンモニアの過剰量を必要とする。そこで、キャリアー溶液 C₁ にはリアクター活性に最適な pH の 0.1 M リン酸アンモニウム緩衝液を用い、キャリアー溶液 C₂ には NADPH の過剰量を含む同じ pH の 0.1 M リン酸アンモニウム緩衝液を用いた。更に、市販の GIOD 中には微量のカタラーゼが不純物として含まれていたため、キャリアー溶液が 60 µl min⁻¹ 以下で測定する場合には、キャリアー溶液 C₂ にアジ化ナトリウムを 1 mM になるように加えた。また、P₁ と P₂ の流量比を常に 1:1 とした。試料溶液 (10 µl) はインジェクターから注入し、流路系をカラムオープン内

に入れ、一定の温度で測定した。

3 結果と考察

3.1 酵素固定化量と CPG 細孔内での酵素の分子配向モデル

GIOD と GIDH を分子量 14 万と 30 万の球状の分子と仮定し、既報¹⁸⁾と同様に偏比容 0.74 ml g⁻¹ を用いて計算した酵素の分子直径は、GIOD に対して 6.9 nm, GIDH に対して 8.9 nm であり、アビジンに対して 5.4 nm であった。同様に計算した分子の最大断面積は GIOD に対して 3.74×10^{-17} m², GIDH に対して 6.22×10^{-17} m², アビジンに対して 2.29×10^{-17} m² であった。また、2・3 で作製した各酵素リアクターの各固定化段階での固定化量 (酵素及びアビジン分子) を 280 nm での吸光度から求め、既報¹⁸⁾で示した計算方法によって、各段階での各分子の占有面積率 p 及び断面占有率 P を計算した結果を Table 1 に示す。また、これらの結果から CPG 細孔のある断面での各分子の配向を推定した結果を Fig. 3 に示す。

タイプ a のリアクターでは、3 段階目の GIDH 固定化量が 1 段階目の GIOD のそれよりかなり少ない。逆に分子量の大きな GIDH を先に固定化したタイプ a' のリアクターでは、酵素の固定化比率は 1 に近づく。これらのことから、3 段階目の固定化量は酵素分子の大きさに依存し、本研究で使用した孔直径 53.8 nm の CPG では、分子量 30 万以上の酵素で固定化量が減少し、既報¹⁸⁾のグルコースオキシダーゼ (M_w ≃ 153000) とアルコールオキシダーゼ (M_w ≃ 300000) で得られた結果と同様であった。これは

Table 1 Amounts and percent occupation of biomolecule immobilized onto CPG in GIOD/GIDH multilayer reactor

Type	Reactor	Step	Biomolecule	Amounts ^{a)}		p^b , %	P^c , %
				mg protein	nmol		
a		1	GIOD-b	0.57 ± 0.05	4.1	23.1	48.1
		2	Av	0.20 ± 0.03	3.0	10.2	
		3	GIDH-b	0.38 ± 0.03	1.3	12.2	34.9
a'		1	GIDH-b	0.96 ± 0.08	3.2	30.0	54.8
		2	Av	0.23 ± 0.03	3.5	12.0	
		3	GIOD-b	0.36 ± 0.03	2.6	14.6	38.2
b		1	Av	0.26 ± 0.03	3.9	13.3	36.5
		2	GIDH-b	0.99 ± 0.08	3.3	30.9	55.6
		3	Av	0.19 ± 0.02	2.9	9.9	
		4	GIOD-b	0.39 ± 0.04	2.8	15.8	39.7
c		1	GIOD-b + GIDH-b	1.64 ± 0.13			
		2	Av	0.56 ± 0.05	8.5	25.8	
		3	GIOD-b + GIDH-b	0.47 ± 0.04			

GIOD-b: biotin-labeled L-glutamate oxidase; GIDH-b: biotin-labeled L-glutamate dehydrogenase; Av: avidine; reactor size: 10 mg CPG.

a) Immobilized amounts were average values for the triplicate measurements. b) Occupation (%) of biomolecule in cross-section.

c) Occupation (%) of biomolecule in section.

Fig. 3 Schematic orientation-model of enzyme molecules immobilized onto controlled-pore glass in multi-layer GIOD/GIDH reactors

- : biotin-labeled L-glutamate oxidase (GIOD-b);
- : biotin-labeled glutamate dehydrogenase (GIDH-b);
- : avidin (Av); b: biotin

大きな酵素分子では、限定された孔内部空間での立体障害のため、ビオチン-アビジン生物親和反応が起こりにくいことによると考えられる。

タイプbのリアクターでは、1段階目のアビジンのビオチン結合サイトの位置により、一部のGIDH (2段階目)は2分子のアビジン分子と結合していると考えられるが、固定化量から分子のほとんどがほぼ直鎖状に固定化されていると考えられる。一方、1段階目の固定化量は分子の大きさに依存せず、ほぼ一定 (3.2~4.1 nmol/10 mg CPG)であった。これはグルタルアルデヒド橋かけ法では、CPG表面のアミノ基は固定化分子の500~1000倍多く存在しているため、分子量の大きな酵素分子でも固定化の反応速度にそれほど大きな影響を受けないものと考えられる。

タイプcのリアクターでは、1段階目のグルタルアルデ

ヒド橋かけ法によるGIODとGIDHの固定化量は、タイプaとa'の1段階目のGIODとGIDH量よりもかなり多く、理由は明らかではないが、GIODとGIDHがより近接してCPG表面に結合しているものと考えられる。また、2段階目のアビジンは1段階目の酵素よりも過剰に固定されているが、正電荷を有しているため、その多くは1段階目のGIODとGIDH間に橋かけ分子としてはまりこみ、3段階目の酵素分子を結合できない不活性な配向をとっていると考えられるので、3段階目の固定化量が少なくなる。しかし、タイプcのリアクターの場合、GIODとGIDHの固定化総量はほかのタイプのリアクターの約2倍近くになった。

3.2 増幅特性に影響を与える因子

3.2.1 pHの影響 Fig. 2に示したFIAシステムにおいて、キャリアーC₂に1 mM アジ化ナトリウムと0.75 mMのNADPHを含む0.1 M リン酸アンモニウム緩衝溶液を用い、溶液のpHを6.5から8.5の間で変化させ、キャリアーC₁には同じpHの0.1 M リン酸アンモニウム緩衝液を、それぞれ50 $\mu\text{l min}^{-1}$ の流量で送液した。酵素リアクターにはタイプa'のリアクターを用い、1 μM と10 μM のL-グルタミン酸に対する増幅応答電流を測定した。溶液状態でのGIODは、pH 7~9で高い酵素活性を示すことが報告されている¹⁹⁾が、NADPHを含まないキャリアーC₂を用いた非増幅実験では、検討した全pH範囲でL-グルタミン酸に対する応答はほぼ一定であった。一方、増幅実験では典型的なベル型のpHプロファイルが得られ、pH 7.5で最大応答電流が得られた。このpHはGIODとGIDHによる基質リサイクリング反応の最適pHを示すので、以下の実験ではこのpHのキャリアー溶液を用いた。

3.2.2 NADPH濃度 基質リサイクリングによる増幅反応には、補基質として過剰量のNADPHを必要とする。そこで、キャリアー溶液C₂に添加するNADPHを0から1 mMの濃度範囲で変化させ、タイプa'のリアクターを用いてその影響について検討した。1 μM と10 μM のL-グルタミン酸に対して、増幅応答電流はNADPH濃度がそれぞれ0.25 mMと0.5 mM以上でほぼ一定となった。また、使用したGIDH (EC 1.4.1.4)は特異的にNADPHを補因子とし、NADHをキャリアーC₂に添加してもL-グルタミン酸に対して全く増幅応答を与えなかった。

3.2.3 リアクター温度 タイプa'のリアクターを用い、リアクター温度の影響について検討した。温度の上昇とともに、1 μM L-グルタミン酸に対する感度及び増幅率は徐々に増加し、40℃以上でほぼ一定となった。更に、タイプa, a', b, c*の4種類のリアクターを用い、30℃と40℃でのL-グルタミン酸に対する応答電流と増幅率を比較した結果をTable 2に示す。ここでタイプc*のリア

Table 2 Effect of reactor temperature on enzymatic amplification of L-glutamate

Type of reactor	Response for 1 μ M L-glutamate (10 μ l injections)			
	at 30°C		at 40°C	
	Response current/nA ^{a)}	Amplification factor	Response current/nA	Amplification factor
a	144 $\pm$ 2.6	61	186	79
a'	202 $\pm$ 4.0	86	261	111
b	269 $\pm$ 5.1	115	327	140
c*	272 $\pm$ 5.7	116	348	149

Carrier C₁: ammonium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5); Carrier C₂: ammonium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) containing 0.75 mM NADH and 1 mM sodium azide; Total carrier flow-rate: 100 μ l min⁻¹; Sample size: 10 μ l. Reactor c*: GIOD/GIDH reactor immobilized at only the first step of reactor c shown in Table 1.

a) Seven measurements on each reactor (mean $\pm$ S.D.).

クターは, Table 1 で示したタイプ c のリアクターのうち, 1 段階目だけ固定化されたものである. この中で, タイプ a のリアクターで最も増幅率が低かった. これは, ほかのリアクターでは GIOD と GIDH がほぼ当モル量固定化されているのに比べ, タイプ a のリアクターでは GIDH の固定化量がかなり少ないため, 効果的な基質リサイクリング反応が起こらないことによると考えられる. しかし, 各リアクターの基質リサイクリング反応に対する温度依存性はほぼ同等で, 温度を 30°C から 40°C に増加すると増幅率はどれも 20~30% 増加し, 結合様式の違いによる大きな差異は見られなかった.

3.2.4 キャリヤー溶液流量 低流量ではサンプルゾーンのリアクター内での滞留時間が長いため, 基質リサイクリングのターンオーバー数が増加し, 大きな増幅率が得られることが期待できる. そこで, タイプ c* と a' のリアクターを用い, キャリヤー流量の影響について検討した. キャリヤー流量が 60 から 20 μ l min⁻¹ に減少したとき, 増幅率は c* リアクターで 339 から 606 倍に, a' リアクターで 123 から 196 倍に増加した. また, どの流量でも c* リアクターでの増幅率は a' リアクターそれよりもかなり大きかった. これは同時固定化すると単位断面あたりの酵素の固定化量が増加し, GIOD と GIDH がかなり近接して固定化されているため, 基質リサイクリングのターンオーバー数が大きく, 増幅率が高くなると考えられる. しかし, a' リアクターの場合には, GIOD と GIDH 間にアビジン分子がはまりこむ結果, 基質リサイクリングのターンオーバー数が減少し, 増幅率が小さくなったと考えられる.

3.3 各固定化ステップでの増幅率

GIOD と GIDH をランダムに同時固定化した場合に, 最も大きな増幅率が得られた. そこで, Table 1 に示したタイプ c のリアクターで各固定化段階での増幅率を比較した. キャリヤー溶液流量が 40 μ l min⁻¹ のとき, 固定化が 1 段階の GIOD/GIDH リアクターでは, 増幅率は L-グルタ

ミン酸に対して 485 倍, アビジンを結合した 2 段階目のリアクターでは 233 倍に減少し, 更に GIOD と GIDH を結合した 3 段階目のリアクターでは 645 倍に増加した. これは Fig. 3 の分子配向モデルに示したように, 1 段階目の GIOD と GIDH は非常に近接して CPG 表面に固定化されているため, 効果的な基質リサイクリング反応が起こり大きな増幅率が得られたが, 第 2 段階でアビジンを結合すると不活性なアビジン分子が 1 段階目の GIOD と GIDH の間にはまりこみ, 基質リサイクリングのターンオーバー数が減少する. しかし, 3 段階目の固定化で酵素分子を結合させると, 1 段階目と 3 段階目に結合した GIOD と GIDH の三次元的な空間で基質リサイクリングが起こる結果, 増幅率が増加したと考えられる.

そこで, この最高の増幅率を与えたタイプ c のリアクターを用いて, L-グルタミン酸に対する検量線を試料量 10 μ l, キャリヤー流量 20 μ l で作成した結果, $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7}$ M の濃度範囲で直線関係が得られた {回帰式: $y(\text{nA}) = 4.4 \times 10^5 x(\text{mM}) - 0.67$, 相関係数: 1.000}. 一方, キャリヤー C₂ に NADPH を加えない条件で測定した L-グルタミン酸に対する非増幅応答は, $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4}$ M の濃度範囲で直線関係を示した {回帰式: $y(\text{nA}) = 7.4 \times 10^2 x(\text{mM}) - 2.3$, 相関係数: 1.000}. L-グルタミン酸に対する検出下限 ($S/N=3$) は 1.5×10^{-6} から 3×10^{-9} M (絶対量: 30 fmol) に低下し, 高感度化ができた.

3.4 酵素リアクターの安定性

Table 1 に示したタイプ a, a', b, c のリアクターのそれぞれについて, 安定性に大きな差異はなかった. 作製後 4°C で保存した保存安定性は, 約 3 か月間にわたり感度の低下はほとんど認められなかった. また, ほとんど毎日, 数時間使用した操作安定性は, どのリアクターにおいても 1.5~2.5 か月間活性の低下は認められなかった.

文 献

- 1) F. Fonnum: *J. Neurochem.*, **42**, 1 (1984).

- 2) C. E. Jahr, R. A. Lester: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2**, 270 (1992).
- 3) E. D'Angelo, P. Rossi: *Funct. Neurol.*, **7**, 145 (1992).
- 4) F. Dagani, E. D'Angelo: *Funct. Neurol.*, **7**, 315 (1992).
- 5) Y. Hu, K. M. Mitchell, F. N. Albahadily, E. K. Michaelis, G. S. Wilson: *Brain Res.*, **659**, 117 (1994).
- 6) J. M. Cooper, P. L. Foreman, A. Glidle, T. W. Ling, D. J. Pritchard: *J. Electroanal. Chem.*, **388**, 143 (1995).
- 7) M. R. Ryan, J. P. Lowry, R. O. O'Neill: *Analyst* (London), **122**, 1419 (1997).
- 8) S. Cosnier, C. Innocent, L. Allien, S. Poitry, M. Tsacopoulos: *Anal. Chem.*, **69**, 968 (1997).
- 9) C. E. Lunte, D. O. Scott, P. J. Kissinger: *Anal. Chem.*, **63**, 773A (1991).
- 10) P. Lindroth, K. Mopper: *Anal. Chem.*, **51**, 1667 (1979).
- 11) M. W. Lada, T. W. Vickroy, R. T. Kennedy: *Anal. Chem.*, **69**, 4560 (1997).
- 12) F. Robert, L. Bert, S. Parrot, L. Denoroy, L. Stoppini, B. Renaud: *J. Chromatogr. A*, **817**, 195 (1998).
- 13) R. W. Lada, R. T. Kennedy: *Anal. Chem.*, **68**, 2790 (1996).
- 14) O. Niwa, K. Torimitsu, M. Morita, P. Osborne, K. Yamamoto: *Anal. Chem.*, **68**, 1865 (1996).
- 15) O. Niwa, T. Horiuchi, K. Torimitsu: *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 311 (1997).
- 16) T. Yao, S. Suzuki, T. Nakahara, H. Nishino: *Talanta*, **45**, 917 (1998).
- 17) T. Yao, Y. Nanjyo, H. Nishino: *Anal. Sci.*, **17**, 703 (2001).
- 18) 八尾俊男, 南條陽子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 603 (2001).
- 19) H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka, H. Yoshino: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1323 (1983).

要 旨

L-グルタミン酸に対して基質リサイクリングによる増幅機能を有した酵素リアクターを作製するために、孔直径 53.8 nm のアミノプロピル化多孔性ガラスビーズ (NH₂-CPG) に段階的なビオチン-アビジン生物親和結合により、L-グルタミン酸オキシダーゼ (GOD) とグルタミン酸脱水素酵素 (GIDH) を孔内部空間に直鎖状に固定化する方法について検討した。また、それぞれの段階での酵素の固定化量から、孔内部空間での酵素分子の配向を推定した。最も大きな増幅率は、GOD と GIDH をグルタルアルデヒド橋かけ法により NH₂-CPG にランダム同時固定化した後、更にアビジン分子を橋かけ分子として GOD と GIDH をランダムに同時固定化したリアクターで得られ、キャリアー流量が 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ のときに 606 倍の増幅率が L-グルタミン酸に対して得られた。L-グルタミン酸に対する検量線は $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7}$ M の濃度範囲で直線関係を示し、検出下限 ($S/N=3$) は 3×10^{-9} M (30 fmol) であった。