— 論 文 —

(日本化学会誌, 1987, (9), p.1719~1724)

© 1987 The Chemical Society of Japan

好熱菌の耐熱性酵素グルコキナーゼを用いる

ISFET 型グルコースセンサー

(1987 年 3 月 17 日 受理)

川 辺 健・飯田武揚*・野口文雄・三田村 孝

勝部昭明**・富田耕右***

好熱菌由来の耐熱性酵素グルコキナーゼとイオン感応性電界効果トランジスタ (Ion Sensitive Field Effect Transistor: ISFET) とを組み合わせたグルコースセンサーを試作した。本センサーにおいて、グルコースに対する応答を測定した結果、グルコース濃度 5~50 mg/dl の範囲でグルコースの定量が可能であることがわかった。応答時間は、このとき 4~9 分であった。また、各種の糖に対する応答を調べた結果、グルコースのみに応答が得られた。グルコキナーゼはヘキソキナーゼの中でもグルコースへの特異性が高い酵素であるため、グルコキナーゼを用いることにより、グルコースに対して高い選択性をもつセンサーを構築することができた。本センサーの同時再現性においては、変動係数 6.5 % で再現性が得られた。保存安定性では 15 日までは安定した応答が得られたが、20 日目から初期出力の約 50 % に低下することがわかった。また、グルコキナーゼはグルコースと ATP を基質としているため、グルコースのみならず ATP の検出定量が可能となる。そこで、ATP に対する応答においても測定した結果、ATP 濃度 50~500 mg/dl の範囲で ATP の定量が可能であることが明らかになり、ATP センサーとしても応用することができることがわかった。

1 緒 言

好熱菌由来の酵素は耐熱性であり、さらに pH および化学的変性剤に対しても高い耐性をもっている。したがって、これをセンサーのレセプターとして用いることによりセンサーの性能および寿命の向上が期待される¹⁾²⁾。また、最近センサーの微小化、多機能化という点から、センサーのトランスデューサーとして半導体素子を用いたマイクロバイオセンサーの研究が盛んに行なわれている。その中でもイオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) を用いたセンサーが数多く研究されており、ペニシリン³⁾、尿素⁴⁾、グルコース⁵⁾などを検出する ISFET 型バイオセンサーが報告されている。さらに、集積化という点から尿素とグルコース⁶⁾⁷⁾、グルコースとトリオレイン⁸⁾を同時測定可能なワンチップ

FET 型バイオセンサーの報告もされている。また、ISFET 型バイオセンサーの理論的検討も行なわれており、Janata ら^{9)~11)}は理論モデルから数値解析することにより、実験的な応答特性が理論モデルから説明できることを示している。著者らは、好熱菌由来のトレオニンデアミナーゼを用いた ISFET 型トレオニンセンサーを報告した¹²⁾。本報では、臨床検査上、主として糖尿病の診断の指標に利用されるグルコースを検出定量するために好熱菌由来の酵素グルコキナーゼを用い、これと ISFET とを組み合わせたセンサーを研究した。ここで、グルコキナーゼ (GK) は次式に示す反応を触媒する。

埼玉大学工学部応用化学科, 338 浦和市下大久保

** 埼玉大学工学部電子工学科, 338 浦和市下大久保

*** ユニチカ株式会社中央研究所, 611 宇治市宇治小坂

1) T. Iida, S. Machida, N. Iijima, T. Mitamura, Proc. 1st Int. Meet. on Chem. Sensors, Fukuoka, 631 (1983).

2) T. Iida, T. Kawabe, M. Hisatomi, T. Mitamura, Proc. 2nd Int. Meet. on Chem. Sensors, Bordeaux, 592 (1986).

3) S. Caras, J. Janata, *Anal. Chem.*, **52**, 1935(1980).

4) 宮原裕二, 森泉豊栄, 塩川祥子, 松岡英明, 軽部征夫, 鈴木周一, 日化, 1983, 823.

5) Y. Hanazato, S. Shiono, Proc. 1st Int. Meet. on Chem. Sensors, Fukuoka, 513(1983).

6) Y. Miyahara, T. Moriizumi, *Sensors and Actuators*, **7**, 1(1985).

7) T. Kuriyama, S. Nakamoto, Y. Kawana, J. Kimura, Proc. 2nd Int. Meet. on Chem. Sensors, Bordeaux, 568(1986).

8) Y. Hanazato, M. Nakako, M. Maeda, S. Shiono, Proc. 2nd Int. Meet. on Chem. Sensors, Bordeaux, 576 (1986).

9) S. Caras, J. Janata, D. Saupe, K. Schmitt, *Anal. Chem.*, **57**, 1917(1985).10) S. Caras, D. Petelenz, J. Janata, *ibid.*, **57**, 1920(1985).11) S. Caras, J. Janata, *ibid.*, **57**, 1924(1985).12) 川辺 健, 飯田武揚, 飯島 昇, 三田村 孝, 原 正史, 勝部昭明, 電化, **53**, 514(1985).

この反応により、生成する H^+ を ISFET で検出することによってグルコースが定量できる。また、この酵素は ATP を基質としているため、グルコース存在下で ATP 測定も可能なことから、このグルコキナーゼを用いた ISFET 型グルコースおよび ATP センサーの構築を行ない、その特性について検討した。

2 実験

2.1 酵素の固定化

中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来のグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2, 320 units/mg protein, ユニチカ(株)製) 15 μ l (11.5 units), 50 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩 (以下 Tris-HCl と略記する) 緩衝液 pH 8.5 に溶解した 25 wt% ウシ血清アルブミン溶液 5 μ l および 1% グルタルアルデヒド水溶液 15 μ l を混合した。その混合液 4 μ l をマイクロシリッジにより ISFET (日立製作所から提供) のイオン感応膜上に滴下し、4°C で一昼夜反応させ酵素固定化膜を形成した。ここで、形成した固定化膜の膜厚は光学顕微鏡を用い、焦点のずれから測定を行なったところ約 70~80 μ m であった。

2.2 酵素活性の測定

グルコキナーゼの活性は通常の活性測定法、すなわち生成物であるグルコース 6-リン酸をグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼとニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP $^+$) を用いて、340 nm の吸収の増加によって測定した¹³⁾。

2.3 差動出力の測定方法

測定に使用した回路を図 1 に示す。図 1 から、この測定回路では、酵素固定化膜を形成した ISFET と参照用として酵素固定化膜を形成していない ISFET の 2 個の ISFET を用いた。また、溶液の電位を一定にたもつため Ag/AgCl 電極を用い、pH 変化による ISFET の界面電位変化を Source follower 回路により測定

Fig. 1 Schematic diagram of the measuring circuits for the sensors

1: Ag/AgCl electrode, 2: ISFET with immobilized membrane, 3: ISFET without immobilized membrane, 4: Thermostat, 5: Stirring bar, 6: Magnetic stirrer, 7: Recorder

し、それを 2 個の ISFET の差動出力としてレコーダーに記録させた。温度は 30°C 一定とし、かきまぜはマグネチックスターラーにより 200 rpm で行なった。グルコース定量に用いた測定溶液は 4 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ ATP, 20 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ MgCl $_2$ を含む 20 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ Tris-HCl 緩衝液 pH 9.0 であり、ATP 定量の場合は 4 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ ATP を 12 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ グルコースにかえて行なった。

3 結果および考察

3.1 ISFET の pH 応答

まず、予備実験として ISFET の pH 応答を測定した。測定溶液は 10 mmol $\cdot$ dm $^{-3}$ リン酸緩衝液を用い、水酸化ナトリウム溶液で pH を順次変化させ測定を行なった。その結果を図 2 に示す。図 2 から、pH 5~11.5 の範囲で pH に対して直線的な応答を示し、pH 感度は約 47~51 mV/pH であった。また、2 個の ISFET を用いて差動出力を行なったところ図 2 に示したように pH に対する応答は相殺され、このことから溶液全体の pH に対する出力は補償されることがわかった。

3.2 酵素固定化膜の pH 応答への影響

ISFET に固定化膜を形成させたときの pH 応答への影響を研究した。測定には pH 4.01 のフタル酸塩標準液と pH 9.14 のホウ酸塩標準液を用い、ステップ状に pH を変化させた。そのときの応答曲線を図 3 に示す。図 3 から固定化膜を形成させた ISFET の方が固定化膜を形成していない ISFET にくらべて出力が安定するのに長時間を必要とし、定常に達する時間は 6~10 分であった。これは、固定化膜中への水素イオンまたは水酸化物イオンの拡散が遅速であることを示唆している。

3.3 グルコースセンサーの特性

3.3.1 時間応答: 測定溶液に最終濃度 50 mg/dl となるようにグルコース溶液を添加したときの差動出力の典型的な時間応答曲線を図 4 に示す。グルコース添加後、出力は正の方向へ変化した。このことは、反応によって水素イオンが生じたことを意味している。応答はグルコース添加後、約 8 分で定常に達した。ほか

Fig. 2 pH Dependence of the gate potential of ISFETs measured at 30°C

○: Single output
△: Differential output

13) H. Hengartner, H. Zuber, *FEBS Lett.*, 37, 212(1973).

Fig. 3 Effect of the immobilized membrane on the time response of ISFET at 30°C

(a): ISFET without the immobilized membrane
(b): ISFET with the immobilized membrane

Fig. 4 Typical time response curve for the glucose sensor at 50 mg/dl glucose concentration, pH 9.0 and 30°C

の濃度においても同様な挙動を示し、応答時間は 4~9 分であった。

3.3.2 グルコースセンサーの検量線：測定溶液に所定濃度となるようにグルコース溶液を添加し、各濃度における応答を測定した。グルコース濃度と出力電圧変化との関係を図 5 に示す。図 5 から、グルコース濃度 5~50 mg/dl の範囲でグルコースの定量が可能であることが認められた。

3.3.3 グルコースセンサーの pH に対する影響：測定溶液の pH を変化させたときのグルコースに対する応答を調べた。グルコース濃度は 50 mg/dl とし、各 pH での応答を測定した結果を図 6 に示す。図 6 から、溶液の pH がアルカリ性になるにしたがい応答は増大した。これは用いた 20 mmol·dm⁻³ Tris-HCl 緩衝液の緩衝能の影響によるものと考えられる。固定化酵素自体の至適 pH は図 7 に示すように pH 9.0 であり、広い pH 範囲で活性を保持していることから、酵素活性のみによるものとは考えられ

Fig. 5 Calibration curve for the glucose sensor measured at pH 9.0 and 30°C

Fig. 6 Effect pH on the response of the glucose sensor at 30°C

The glucose concentration : 50 mg/dl

ない。そこで、用いた Tris-HCl 緩衝液の緩衝能を考えると、この Tris の pK_a は 7.9 であるので Tris-HCl 緩衝液は有効 pH 範囲 7.2~9.4 であることが知られている¹⁴⁾。よって、pH 8.0 以上では緩衝液の緩衝能力が低くなり、また、溶液中の水素イオン濃度も低くなるため応答が大きくなったものと考えられる。また、pH 7.0 近辺の中性では同様な考察から pH 7.0 の方が pH 8.0 よりも応答が大きくなったものと考えられる。以上のことからセンサーの pH に対する応答特性は酵素活性、緩衝液の緩衝能力などによって影響されるということがわかった。

3.3.4 グルコースセンサーの温度に対する影響：測定温度を 25~50°C と変化させ、各温度でのセンサーの応答を測定した結

14) 今堀和夫, 山川民夫監修, “生化学辞典”, 東京化学同人 (1984) p.884.

Fig. 7 Effect of pH on the activity of immobilized glucokinase from *B. stearothermophilus*

○: Native enzyme, ●: Immobilized enzyme

果を図8に示す。なお、グルコース濃度は 20 mg/dl とした。応答は温度の上昇とともに増加し、50°C の高温においてもセンサーの出力低下は観測されなかった。このことから本センサーは50°C の高温においても使用可能であることが示された。

3.3.5 グルコースセンサーの基質選択性: 測定溶液に各種の糖を添加し、センサーの基質選択性を研究した。各糖濃度は 1.5 mmol·dm⁻³ とし、各糖における応答を測定した結果を表1に示す。その結果、グルコースのみに応答が得られ、ほかの糖については応答が得られなかった。グルコキナーゼはヘキシキナーゼの中でもグルコースへの特異性が高い酵素であることから、グルコキナーゼを用いてセンサーを構築することにより、グルコースに対して高い選択性を得ることができるものと考えられる。また、グルコースのジステレオマーである α-D-グルコースおよび β-D-グルコースについても同様な出力応答が得られることがわかった。一般のグルコースセンサーに実用化されているグルコースオキシダーゼは、β-D-グルコースのみを基質にする酵素であるため、グルコキナーゼを用いるグルコースセンサーはグルコースオ

Fig. 8 Effect of temperature on the response of the glucose sensor measured at 20 mg/dl glucose concentration and pH 9.0

Table 1 Selectivity of the glucose sensor to various sugars at pH 9.0 and 30°C

Kind of sugar	Output voltage (mV)
Glucose	7.5
Fructose	0
Galactose	0
Mannose	0
2-Deoxy-D-glucose	0
Sucrose	0
Maltose	0
Lactose	0

The sugar concentration : 1.5 mmol·dm⁻³.

キシダーゼを用いるセンサーより利点があると考えられる。

3.3.6 グルコースセンサーの同時再現性: グルコース濃度 20 mg/dl とし、12 回の連続測定を行なった結果を図9および表2に示す。連続 12 回の測定における変動係数は 6.5% となり、ほぼ安定した応答が得られた。

3.3.7 グルコースセンサーの保存安定性: 本センサーを 20 mmol·dm⁻³ KCl を含む 50 mmol·dm⁻³ Tris-HCl 緩衝液 pH 9.0 中、4°C で保存し、センサーの保存安定性を測定した。グルコース濃度は 10, 20, 50 mg/dl とし、各濃度における応答を測定した結果を図 10 に示す。図 10 から、保存 20 日目において初期出力に対して約 50% の低下が観測された。それ以後、30 日目まではいじりしい出力低下は観測されず、一定した出力応答が得られた。また、検量線の勾配を計算したところ 30 日経過後におい

Fig. 9 Reproducibility of the response of the glucose sensor measured at 20 mg/dl glucose concentration at pH 9.0 and 30°C

Table 2 Precision of the glucose sensor at pH 9.0 and 30°C

Parameter	
Mean (mV)	9.2
SD (mV)	0.6
CV (%)	6.5
n=12	

SD : Standard deviation.

CV : Coefficient of variation.

The values are calculated from the data in Fig. 9.

Fig. 10 Storage stability of the glucose sensor, stored in 50 mmol·dm⁻³ Tris-HCl buffer, containing 20 mmol·dm⁻³ KCl at pH 9.0 and 4°C

The glucose concentration: (□) 10 mg/dl, (△) 20 mg/dl, (○) 50 mg/dl

ては初期勾配の 37% まで低下していた。ここで、保存 20 日目の出力低下はグルコキナーゼの活性の低下、ISFET の劣化などが考えられる。グルコキナーゼをグルタルアルデヒドで橋かけ固定化した膜の活性は 4 か月以上まったく失活が認められないことから、本センサーの酵素の安定性はかなり低下していることになる。この原因として考えられるのは ISFET のイオン感応膜上に酵素を固定化していること、ISFET を作動させるために ISFET のゲート上に電圧を印加していること、固定化膜にタンパク質のウシ血清アルブミンを使用していることなどがあげられる。そのために、ISFET 上に固定化してある酵素は過酷な条件下で反応を進めており、失活が急速に起こったものと解釈できる。したがって、センサーの安定性の向上をはかるには酵素の固定化法および固定化材などの検討が必要であると考えられる。

3.4 ATP センサーの特性

3.4.1 時間応答: 測定溶液に最終濃度 300 mg/dl となるように ATP 溶液を添加したときの差動出力の典型的な時間応答曲線を図 11 に示す。ATP 添加後、出力は変化し、約 8 分で定常に達した。また、ほかの濃度においても応答時間はグルコースの場合と同様 4~9 分であった。

3.4.2 ATP センサーの検量線: 一定濃度のグルコースの存在下で溶液に所定濃度となるように ATP を添加し、各濃度における応答を測定した。ATP 濃度と出力電圧変化との関係を図 12 に示す。ATP 濃度 50~500 mg/dl の範囲で ATP 濃度の対数と出力電圧変化との間に直線関係が認められた。これから、この濃度範囲で ATP の定量が可能であり、本センサーは ATP センサーとしての応用も可能であることがわかった。これまで、ISFET 型 ATP センサーの例として ATPase を用いたものが報告¹⁵⁾¹⁶⁾されているが、ATPase を用いたセンサーでは、ATPase 自体の安定性が低いという問題点があった。このことから、本センサー

Fig. 11 Typical time response curve for the ATP sensor measured at 300 mg/dl ATP concentration, pH 9.0 and 30°C

Fig. 12 Calibration curve for the ATP sensor measured at pH 9.0 and 30°C

を ATP 定量に用いることにより、従来の ATP センサーより安定性を向上させることができるものと考えられる。

4 結 論

好熱菌由来の酵素グルコキナーゼを用いた ISFET 型グルコースセンサーを製作し、その特性についての研究を行なった。その結果、グルコース濃度 5~50 mg/dl の範囲でグルコースの定量が可能であることが明らかとなった。また、一定濃度のグルコース存在下で ATP 定量への応用もでき、ATP 濃度 50~500 mg/dl の範囲で ATP の定量が可能であることがわかった。また、本センサーの応答時間は 4~9 分であった。さらに、本センサーはグルコースに対して高い選択性を持ち、50°C での高温特性も優れていた。同時再現性はグルコースの場合において、変動係数 6.5% で再現性が得られ、保存安定性においては 15 日目では初期出力を保持していたが、20 日目から初期出力の約 50% に低下することがわかった。しかし、ここで安定性についてはまだ問題があり、センサーの安定性を向上させるためには、さらに固定化法を含めた多くの問題の検討が必要であると考えられる。

15) 稲富健一, 花里善夫, 中子真美子, 前田満雄, 日本化学会第 50 春季年会講演予稿集, p. 604 (1985).

16) 後藤正男, 民谷栄一, 軽部征夫, 香川靖雄, 第 4 回化学センサー研究発表会要旨集, p. 7 (1985).

ISFET-Type Glucose Sensor Using Thermophilic Glucokinase from a Thermophile

Takeshi KAWABE, Takeaki IIDA*, Fumio NOGUCHI, Takashi MITAMURA,
Teruaki KATSUBE** and Kosuke TOMITA***

*Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Saitama University;
Shimo-okubo, Urawa-shi 338 Japan*

*** Department of Electronics, Faculty of Engineering, Saitama University;
Shimo-okubo, Urawa-shi 338 Japan*

**** Research and Development Center, Unitika Ltd.; Kozakura, Uji-shi 611 Japan*

An ion sensitive field effect transistor (ISFET) glucose sensor was studied using an immobilized thermophilic enzyme glucokinase from a moderate thermophilic bacterium. The ISFET glucose sensor, on which the glucokinase and albumin were immobilized by glutaraldehyde, was able to determine the glucose concentration in the range of 5~50 mg/dl. The response time of the glucose sensor was about 5 min. The selectivity of the glucose sensor was studied by measuring the responses to various sugars, and the sensor did not respond to other sugars except glucose. Therefore, the glucose sensor was found to have high selectivity for glucose. The sensor also revealed high reproducibility. The coefficient of variation of the sensor was found to be 6.5% for 12 samples containing 20 mg/dl glucose. The storage stability of the sensor was retained for 15 days. However, the output voltage of the sensor decreased to about 50% of the initial output voltage after 20 days.

On the other hand, it is obvious that the glucose sensor is also applicable to an ATP sensor since the glucokinase catalyzes the reaction between glucose and ATP. Then an ISFET glucose sensor was applied to an ISFET ATP sensor using the immobilized thermophilic glucokinase. The ATP sensor was found to determine the ATP concentration in the range of 50~500 mg/dl.

~~~~~