

ISFET バイオセンサシステムによる L-グルタミン 定量の可能性の検討

田口 寛・若林 豊・石原 則幸
奥村 克純・嶋林 幸英
三重大学生物資源学部

Investigation of Possibility of Determining L-Glutamine with the ISFET-Biosensor System

Hiroshi TAGUCHI, Yutaka WAKABAYASHI, Noriyuki ISHIHARA,
Katsuzumi OKUMURA and Yoshihide SHIMABAYASHI
Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

A glutamine sensor was constructed by immobilizing L-glutaminase with glutaraldehyde on ISFET (ion selective field effect transistor) to investigate the possibility of determining L-glutamine. The principle of this sensor is as follows. The output voltage from ISFET, which depends on a very minute pH elevation due to the ammonium ion formation according to the enzymic reaction, is amplified with a differential amplifier of our own assembled. The amplified voltage was processed automatically with an on-line personal computer via GP-IB interface on a real-time basis.

The calibration line for L-glutamine was linear from 1 mM to 40 mM and the relation coefficient was 0.967. The sensitivity of this system to L-glutamine was 0.5 mM. The time needed for determining one sample was within 13 min. The substrate specificity of this sensor was strict and L-glutamine was the sole compound responding to this sensor among analogues tested. D-glutamine was completely inactive to this sensor.

It is suggested that L-glutamine can be determined with this newly constructed ISFET-biosensor system with L-glutaminase.

Key words: ISFET, biosensor, glutamine, glutaminase, enzyme immobilization

緒 言

FET (Field Effect Transistor: 電界効果トランジスタ) は、P型半導体上にn型半導体でドレインとソースを形成し、P型半導体のチャンネル上をケイ素酸化物で絶縁し

てゲートを形成したもので、MOS (Metal Oxide Semiconductor: 金属酸化物半導体) 構造を持ったトランジスタの一種である。FETは、ゲートに与える電位によってチャンネルに電子空乏層を生じ、ドレインとソースの間に流れる電流を変化させることができる。

1970年に Bergveld は、MOS-FET のゲート金属を取り去って溶液中に浸すと、ゲート絶縁物/溶液界面にイ

オン濃度に依存した電位が発生することを見出し¹⁾, Ion Sensitive Field Effect Transistor と名付けた。さらに Bergveld は, 1972年に, この FET が Na^+ と H^+ に感受性があることを報告した²⁾。その後, 窒化シリコンをゲート表面上に蒸着することにより, 水素イオンだけに感受性をもつ FET が開発されて, Ion Selective Field Effect Transistor (ISFET) と呼ばれるようになった。

ISFET を初めてバイオセンサに用いたのは, Caras と Janata で, 1980年に ISFET ゲート表面上にペニシリンナーゼを固定化し, ペニシリンの濃度を測定することに成功した³⁾。その後 ISFET は, 種々のバイオセンサのトランスデューサとして用いられ, Collins と Janata によって1982年に免疫センサが作製されたが, 思わしい結果は得られなかった⁴⁾。1983年に鈴木らは, ウレアーゼを固定化した尿素センサを報告した⁵⁾。さらに1984年に Matsuo とも, ウレアーゼを固定化した尿素センサを報告し⁶⁾, 続いて, 尿素センサにおよぼす測定緩衝液の pH や濃度の影響⁷⁾, イオン強度による影響⁸⁾, 尿素センサを用いた血液中の尿素の測定⁹⁾などを報告した。1986年に Karube とも鈴木らと類似の方法で尿素センサを作製し, pH の影響などについて報告している¹⁰⁾。さらに, Nakako らがリパーゼを用いた中性脂肪センサ¹¹⁾を,

Karube らが ATPase を用いた ATP センサ¹²⁾を, 1987年に富田らがグルコキナーゼを用いたグルコースセンサ¹³⁾やグルタミンシンテターゼを用いた L-グルタミン酸センサ¹⁴⁾を, Karube らがアセチルコリンレセプタを用いたアセチルコリンセンサ¹⁵⁾や微生物を用いたアルコールセンサ¹⁶⁾を, それぞれ報告している。

以上のように, ISFET をトランスデューサに用いたバイオセンサの報告が多いことからわかるように, ISFET には利点が多く, センサの小型化, 多機能化, 高感度化というバイオセンサに課せられている要望に最もよく応え得るトランスデューサであると考えられる。

そこで本研究では, ISFET の各種バイオセンサへの応用の一例として, グルタミンセンサを構築し, グルタミン (Gln) 定量の可能性を検討した。Gln は, アミノ酸分析計でも定量できるが, その所要時間や特異性において, バイオセンサの方がはるかに有利であり, さらにプロセスコントロール用などのオンライン・ディテクタとしては, バイオセンサでなければ役に立たない。このように, バイオセンサ法には, HPLC法を含む他の方法では代替できないような利点が多くあるが, その詳細については, 既に述べた¹⁷⁾。

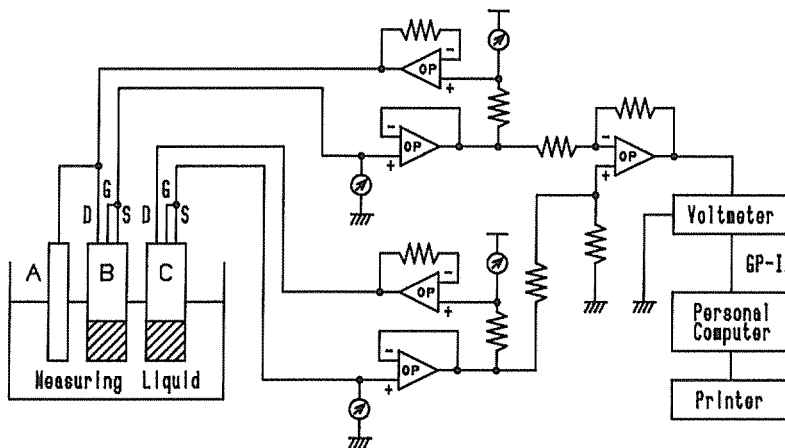


Fig. 1. Outlines of Glutamine Sensor System with ISFET.

A: Reference Electrode, B: Glutaminase immobilized ISFET

C: Albumin immobilized ISFET

D: Drain, G: Gate, S: Source (of ISFET)

OP: Operational Amplifier, model LF356N.

実験方法

1. ISFET 駆動回路

本研究で用いた ISFET 駆動回路は自作品であり、その回路図の概略は Fig. 1 の中央に示した。この ISFET 駆動回路は、定電流回路と差動増幅回路からなり、ソースとドレインの間に常に一定の電流が流れるようにして ISFET のゲート表面上に溶液中の水素イオン濃度変化に応じて生ずる電位の変化を、ソースドレイン間の電圧の変化として直接読み取ることのできるものである。ISFET と共に測定溶液に入れた銀/塩化銀電極は、測定溶液の電位を一定に保つための参照電極であり、酵素を固定化した ISFET と酵素の代わりに牛血清アルブミン (BSA) を固定化した参照用 ISFET を同時に測定溶液に入れ、両方の差動出力を取るることによって酵素反応のみに基づくレスポンスが得られるので、溶液中のイオン強度や温度の変化などによる測定値のドリフトを相殺できる。

2. グルタミンセンサ本体

(株)クラレ製の PH6010 型 ISFET のゲート表面に L-グルタミンナーゼ (EC 3.5.1.2) をグルタルアルデヒド (GA) 架橋法で固定化してグルタミンセンサを作製した。L-グルタミンナーゼは、L-Gln を加水分解して L-グルタミン酸と NH_4^+ を生成する反応を触媒する酵素であり、この反応に基づく微小な pH の上昇を ISFET で検知し、それを電圧の変化に変換して、L-Gln を定量した。

3. センサシステム

本センサシステム全体の概略を Fig. 1 に示した。電圧計は、GP-IB インターフェスを増設した (株)アドバンテスト社の TR-6848 を、パソコンは、NEC の PC-9801VM2 を用いた。データ処理は、オンライン接続したパソコンで、自作のプログラムを使ってリアルタイムに行った。

4. 試薬および材料

L-グルタミンナーゼは、Sigma 社の Grade II (from *Escherichia coli*) を用い、20% (w/w) となるように 10 mM 酢酸緩衝液、pH 4.9 に溶解してグルタミンナーゼ溶液とした。BSA は、Sigma 社の A-4378 を用い、10 mM

HEPES 緩衝液、pH 7.0 に溶解して 10% (w/w) 溶液を調製した。

5. グルタミンセンサの作製

20% L-グルタミンナーゼ溶液：10% BSA 溶液：15% GA 水溶液を 8：1：1 (v/v/v) の割合で混合し、この中に蒸留水でよく洗浄した ISFET を数回入れて酵素膜を形成させ、室温で 10 分間乾燥させてゲル化した。

参照用 ISFET は、酵素溶液の代わりに BSA 溶液を用いた膜を ISFET 上に形成して作製した。銀/塩化銀電極は、 $\phi 0.5$ mm の銀線を 2 M KOH 溶液の中に入れて超音波洗浄し、さらに蒸留水でよく洗浄したものを 0.1 M KCl の中に入れ、 0.4 mA/cm^2 の電流を通じて 30 分間陽極酸化して作製した。

結果と考察

1. 測定方法

本システムの測定方法を種々検討したところ、次のようにすれば良好な結果が得られることが判明した。すなわち、酵素膜を形成した ISFET を室温で 10 分間乾燥してゲル化させた後に、参照用 ISFET、銀/塩化銀電極とともに 37°C に保った 10 mM 酢酸緩衝液、pH 4.0 の測定用緩衝液に入れ、10 分間安定化を行ってから ISFET の駆動回路に接続する。ソースドレイン間には、0.1 mA の電流を流して (このときソースドレイン間の電圧は約 1 V)、10 分間さらに安定化させてから測定を開始する。測定は、バッチ法で行い、1 回の測定終了後に蒸留水でセンサの先端を洗浄し、次の測定用緩衝液の中に入れて 5 分間安定化させ、さらに駆動回路に接続して 5 分間安定化させてから次の測定を開始する。

以下の測定では、すべて 3 連で行い、それぞれの平均値を算出した。

2. L-グルタミンの検量線

グルタミンセンサの検量線は、Fig. 2 に示したように、1~40 mM の範囲で L-Gln のモル濃度の対数値に対してほぼ直線となり、その回帰式は $Y = -7.58X + 24.4$ 、相関係数は 0.967 であった。また、測定限界は 0.5 mM であった。しかし感度においては、アミノ酸分析計と比較すると、はるかに劣っているので、今後改良の余地があ

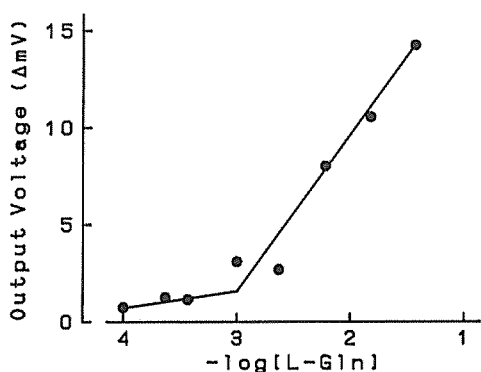


Fig. 2. Response Curve of L-Glutamine to the ISFET Biosensor.

る。

3. L-グルタミン定量の特異性

L-Gln, D-Gln, L-Glu, D-Glu, L-Asn, D-Asn, L-Asp および D-Asp に対する本グルタミンセンサのレスポンスを、それぞれ 1 mM の終濃度において検討したところ、L-Gln 以外には全くレスポンスせず、本センサは非常に特異性の高いものであることが判明した。これは、本研究に用いた酵素自体の性質によるものであろう。

以上のように、ISFET 上に L-グルタミンナーゼを固定化したバイオセンサによって L-Gln 定量の可能性が示唆された。今後は、より活性の高い（高比活性、高 V_{max} 、低 K_m 値の）L-グルタミンナーゼを使用して感度を大幅に上げると共に、測定系の安定化条件を詳細に検討し、さらに速度法で測定して、より短時間に定量できるようにするなどの改良を重ね、本センサシステムを実用的なものにしたい。

引用文献

- 1) BERGVELD, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **17**: 70-71 (1970).
- 2) BERGVELD, P. Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **19**: 342-352 (1972).
- 3) CARAS, S. and J. JANATA, Field effect transistor

sensitive to penicillin, *Anal. Chem.*, **52**: 1935-1937 (1980).

- 4) COLLINS, S. and J. JANATA, A critical evaluation of the mechanism of potential response of antigen polymer membranes to the corresponding antiserum, *Anal. Chim. Acta*, **136**: 93-99 (1982).
- 5) 宮原裕二, 森泉豊栄, 塩川祥子, 松岡英明, 軽部征夫, 鈴木周一: 半導体技術と酵素固定化技術を組み合わせた小型尿素センサ. 日本化学会誌, **1983**: 823-830 (1983).
- 6) ANZAI, J., T. KUSANO, T. OSA, H. NAKAJIMA and T. MATSUO, Urea sensor based on ion sensitive field effect transistor coated with cross-linked urease-albumin membrane, *Bunseki Kagaku*, **33**: E131-E136 (1984).
- 7) ANZAI, J., Y. OHKI, T. OSA, H. NAKAJIMA and T. MATSUO, Urea sensor based on an ion sensitive field effect transistor. II. Effects of buffer concentration and pH on the potentiometric response, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 2556-2559 (1985).
- 8) ANZAI, J., S. TEZUKA, T. OSA, H. NAKAJIMA and T. MATSUO, Urea sensor based on an ion sensitive field effect transistor. III. Effects of enzyme load and ionic strength on the potentiometric response, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**: 4373-4376 (1986).
- 9) ANZAI, J., S. TEZUKA, T. OSA, H. NAKAJIMA and T. MATSUO, Urea sensor based on an ion-sensitive field effect transistor. IV. Determination of urea in human blood, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 693-698 (1987).
- 10) KARUBE, I., E. TAMIYA and J. M. DICKS, A microsensor for urea based on an ion-selective field effect transistor, *Anal. Chim. Acta*, **185**: 195-200 (1986).
- 11) NAKAKO, M., Y. HANAZATO, M. MAEDA and S. SHIONO, Neutral lipid enzyme electrode based on ion-sensitive field effect transistors, *Anal. Chim. Acta.*, **185**: 179-185 (1986).
- 12) GOTOH, M., E. TAMIYA, I. KARUBE and Y. KAGAWA, A microsensor for adenosine-5'-triphosphate pH-sensitive field effect transistors, *Anal. Chim. Acta.*, **187**: 287-291 (1986).
- 13) 川辺 健, 飯田武揚, 野田文雄, 三田村 孝, 勝部昭明, 富田耕右: 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. 日本化学会誌, **1987**: 1719-1724 (1987).
- 14) 飯田武揚, 川辺 健, 野田文雄, 三田村 孝, 永田和彦, 富田耕右: 好熱菌の耐熱性酵素グルタミ

- ナンシンテターゼを用いる ISFET 型 L-グルタミン酸センサ, 日本化学会誌, **1987**: 1817-1821 (1987).
- 15) GOTOH, M., E. TAMIYA, M. MOMOI, Y. KAGAWA and I. KARUBE, Acetylcholine sensor based on ion sensitive field effect transistor and acetylcholine receptor, *Anal. Lett.*, **20**: 857-870 (1987).
- 16) KITAGAWA, Y., E. TAMIYA and I. KARUBE, Microbial-FET alcohol sensor, *Anal. Lett.*, **20**: 81-96 (1987).
- 17) 田口 寛, 石原則幸, 南中 豊, 奥村克純, 嶋林幸英: 乳酸センサシステムを利用したナイアシンのマイクロバイオアッセイ. ビタミン, **62**: 491-495 (1988).