

Letter

Evaluation of enone reductase-based biofluorometric sensor for measurement of *trans*-2-nonenal

ノネナル計測に向けたエノン還元酵素を用いたバイオ蛍光式センサの評価

Rihito INABA* and Hidehisa MORI*

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Institute of Science Tokyo, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8580, Japan

Kenta ICHIKAWA,** Kenta IITANI** and Kohji MITSUBAYASHI**

Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Institute of Integrated Research, Institute of Science Tokyo, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

TEL: +81-3-5280-8091 FAX: +81-3-5280-8094 e-mail: m.bdi@tmd.ac.jp

(Received 20 January, 2025 Accepted 3 March, 2025)

2-nonenal is a volatile chemical component of body odor, known for the correlation between its concentration and the degree of aging. Because the concentration of 2-nonenal changes according to the aging-related metabolism change, measuring 2-nonenal in skin gas has a potential on biochemical evaluation of aging. However, highly selective 2-nonenal sensor has not been developed so far. In this study, we developed a biofluorometric gas sensor (bio-sniffer) that utilize NADPH-dependent enone reductase (ER) for selective detection of 2-nonenal. This sensor detects 2-nonenal by measuring the decrease in autofluorescence of NADPH (ex: 340 nm, fl: 490 nm), which occurs when ER reduces the α , β -unsaturated bond of 2-nonenal. The ER biosensor consists of an ER-immobilized membrane and a fiberoptic NADPH fluorescence detection unit having UV-LED and photomultiplier tube. We evaluated the performance of the ER biosensor using the primary substrate, ethyl vinyl ketone (EVK), and target molecule, 2-nonenal. The selectivity of the ER biosensor on 2-nonenal was also evaluated. The experimental result showed that the ER biosensor can quantify EVK from 100 nM to 1 mM, and it also showed significantly high fluorescence signal on 2-nonenal compared to other aldehydes.

Keywords: 2-nonenal, biosensor, enone reductase

I. INTRODUCTION

生体からは、呼気や皮膚ガスとして種々の揮発性成分が放出されている。その大部分は人間の嗅覚による知覚が難しい一方で、加齢や生活習慣等に関連した独特な臭いを有する分子も存在する。加齢臭の原因物質であるノ

ネナル (*trans*-2-nonenal) は、青臭さと油臭さが特徴の化合物で、¹ ヒト体内において 9-ヘキサデセン酸と過酸化脂質の反応により生成されることが報告されている。

² この 9-ヘキサデセン酸は、若年者では代謝により分解され体外へ排出されることはないが、加齢に伴い基礎代謝が低下することで皮脂腺から分泌されるようになる。

³ したがって、皮膚ガス中ノネナル計測によって、加齢に伴う体臭及び代謝機能の変化を非侵襲評価できると考えられる。しかし、現在の生体ガス計測には、主にガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) や半導体センサが用いられるが、GC-MS は高価、煩雑な操作性、連続計測

* 東京科学大学大学院 医歯学総合研究科

** 東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所

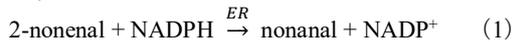
SAS Award was given to this paper presented as Poster Presentation at the 2024 SAS Symposium.

に不向きであり、半導体センサは選択性に課題を有する。以上より、小型・簡便・連続的・選択的なノネナールの計測手法が求められている。そこで本研究では、ノネナールにも存在する炭素-炭素二重結合を認識して還元する酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 依存性エノン還元酵素 (ER) の特性を評価し、ノネナールセンサへの応用可能性を検討した。

II. METHODS AND MATERIALS

II-A. Construction of ER1 biosensor

式 (1) に、予想される ER のノネナールの還元触媒反応を示す。



本センサでは、ノネナールが還元される際に消費される補酵素 NADPH が自家蛍光 (ex: 340 nm, fl: 490 nm) を有することから、NADPH の蛍光減少を検出することによりノネナールを測定した。Fig.1 に、NADPH 蛍光を利用したバイオスニファによるノネナールガスの実験系を示す。実験系は、UV-LED ($\lambda=339$ nm、Sensor Electronic Technology) と蛍光検出のための光電子増倍管 (c9692、浜松ホトニクス) を、バンドパスフィルタ (340 nm、490 nm) 及び二分岐光ファイバを介して光ファイバプローブと接続することで構築した。センサ感応部について、担体となる親水性 PTFE 膜上に ER を包括固定して酵素膜を作製した。作製した ER 固定化膜を光ファイバプローブ先端に取り付け、ER バイオセンサとした。

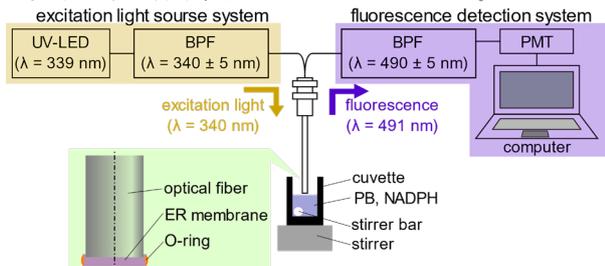


Fig. 1. 2-nonenal measurement setup by using an ER biosensor.

II-B. Evaluation of ER activity for ethyl vinyl ketone

ER を用いたセンサの可能性を検討するため、まず第一基質と知られるエチルビニルケトン (EVK) を用いて基礎特性評価を行った。実験では、ER バイオセンサを用いて、NADPH 溶液を満たしたキュベット内に EVK を滴下した際の蛍光変化を測定した。まず、初期 NADPH 濃度の検討では、溶媒にリン酸緩衝液 (PB, pH 7.5, 100 mM) を用いて NADPH 濃度が 0.05、0.1、1、20 mM となるよう調製し、50% エタノール溶液で濃度調製した EVK 溶液をキュベット内濃度が 1 nM ~ 10 mM となるよう 3分

間隔で滴下し、それぞれの出力応答を比較した。次に、pH の検討では、NADPH 濃度を 100 μ M に固定し、溶媒として用いる PB の pH を 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 と変化させ、EVK に対する出力応答を比較した。

II-C. Evaluation of ER biosensor for 2-nonenal measurement

II-B より得られた測定条件にて、キュベット内に PB (pH 7.0, 100 mM) を用いて作製した NADPH 溶液 (100 μ M) を満たし、最終濃度が 1 nM ~ 1 mM となるよう、80% エタノールを溶媒としたノネナール溶液を順次滴下し蛍光強度変化を測定した。また、生体ガスに含まれる他のアルデヒド成分を含めて ER の基質特異性を調べるため、ER バイオセンサにアルデヒド類 (ヘプタナール、ヘキサナール)、EVK、溶媒として用いるエタノールを終濃度が 10 μ M となるように負荷して得た出力を比較した。

III. RESULTS AND DISCUSSION

III-A. Optimization of ER1 biosensor with EVK

初期 NADPH 濃度 50 μ M ~ 20 mM において EVK を測定した結果を Fig.2 に示す。100 μ M にて、最も広い 100 nM ~ 100 μ M の定量範囲が得られた。それより低い NADPH 濃度では、100 μ M の時よりも低い出力値を示した。また、1 mM 以上の濃度では、EVK 濃度が 1 mM となるまで蛍光減少が観察されなかった。この要因として、補酵素が酵素に対して過多となり、酵素反応を阻害した可能性が考えられる。以上の結果より、最適な NADPH 濃度は 100 μ M と判断した。

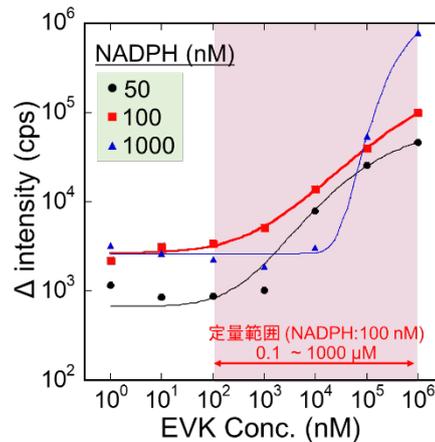


Fig. 2. Calibration curve for EVK at each coenzyme concentration.

NADPH 濃度を 100 μ M に固定し、異なる pH の PB を用いた際の、EVK 負荷に対するセンサ応答の比較を Fig.3(a)に、キュベット内濃度が 60 μ M となるように EVK

を滴下したときの出力に対する pH 依存性を Fig.3(b)に示す。pH 7.0 にて、各濃度の EVK 溶液滴下に対する最も大きい蛍光減少値と広い濃度範囲での EVK 検出が可能であることが示された。(定量範囲: 100 nM ~ 1 mM)。以後の実験では pH 7.0 を用いた。

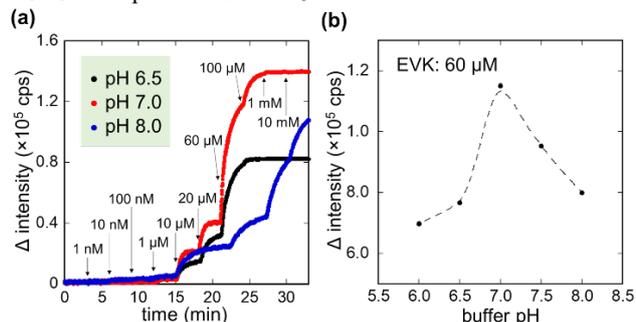


Fig. 3. (a) Responses to EVK at various pH values (pH 6.5, 7.0 and 8.0), (b) pH dependence of EVK Reduction Reaction by ER (EVK conc. 60 μ M).

III-B. Measurement of 2-nonenal using ER biosensor

ER バイオセンサに各濃度のノネナル溶液を滴下し、酵素反応により変化する蛍光出力変化を計測した結果、キュベット内のノネナル濃度増加に伴い、蛍光が減少した。これは ER 固定化膜によりノネナルの還元反応が促進され、NADPH が減少したことを示す。10 μ M ~ 1 mM の範囲において、Fig. 4(a)のように蛍光減少量に対するノネナル濃度依存性が観察された。また、生体に含まれる他のアルデヒド類を含む種々の成分のガス負荷から得た出力比較を Fig.4(b)に示す。ノネナルの蛍光出力を 100%として、他のアルデヒド類に対してはほとんど蛍光減少が観察されず、基質特異性に基づく ER の高い選択性が確認された。

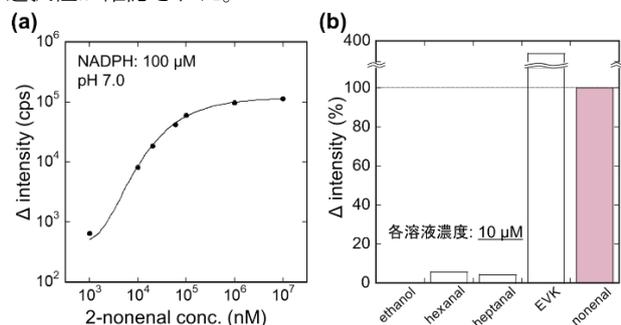


Fig. 4. (a) Quantitative characteristics of fluorescence intensity for 2-nonenal, (b) Results of selectivity of ER biosensor for aldehydes, EVK, and ethanol.

IV. CONCLUSION

本研究では、 α,β -不飽和結合を特異的に触媒するエノン還元酵素 (ER) を用いてノネナル測定が可能なバイオセンサの開発を行った。まず、ER の第一基質である EVK を用いて、液相系における ER バイオセンサの特性評価及び実験条件の最適化を行った。その結果、補酵素 NADPH 濃度 100 μ M、PB pH 7.0 を用いることで、EVK を高感度に測定可能だった。続いて、EVK を用いた計測結果をもとにノネナル溶液に対して ER バイオセンサの特性評価を行ったところ、10 μ M ~ 1 mM の範囲で濃度依存性が得られた。さらに、生体に含まれる他のガス成分などとの出力比較から、ER センサのノネナル選択性を確認した。また、本原理では、他の NAD(P)H 依存性脱水素酵素も利用可能である。今後は、異なる酵素についても応答性及び選択性を評価することでノネナルガスに対する感度と選択性をさらに向上させ、生体ガス計測への展開に取り組む。

ACKNOWLEDGEMENTS

本研究の一部は JSPS 科研費 (JP21H04888, JP22K18416) および生体医歯工学共同研究拠点の支援を受けて行われた。

REFERENCES

- 1 J.R. Santos, *Journal of Chromatography A.*, 985, pp. 395-402 (2003)
- 2 S. Haze, Y. Gozu, S. Nakamura, Y. Kohno, K. Sawano, H. Ohta and K. Yamazaki, *J. Investig. Dermatol.*, 116, pp. 520-524 (2001)
- 3 D. Praticò, *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 50, pp. re5 (2002)