

## メディエータ型酵素センサの試作

小久保弘樹\*1 盛田耕作\*1

### Fabrication of a Redox-mediated Enzyme Sensor

Hiroki KOKUBO and Kosaku MORITA

酵素センサのプロトタイプとしてグルコースオキシダーゼを用いたグルコースセンサを試作した。アルミナ基板に作用極、対極、参照極を設け、グルタルアルデヒドによる架橋反応を用いて作用極上に酵素を約1 U固定した。メディエータとしてはベンゾキノンを用い、パラフィンに溶解させた状態で作用極近傍に固定した。作用極近傍でのメディエータ濃度の安定性について改良の余地を残したが、メディエータを用いることによって、高濃度側でのセンサ応答を改善させることができた。また、酵素活性等のpH依存性を補正するためのpHセンサを検討したところ、釉薬を用いた簡易な方法でセラミックス基板上にpHセンサを作製できることがわかった。

#### 1. はじめに

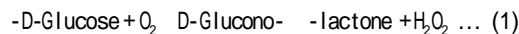
生体関連の物質を利用するバイオセンサは、その高い分子識別能力と急速な発展を遂げている生命科学への関心の高まりから、近年、多くの注目を集めている。特に、酵素を用いたバイオセンサは簡便な取り扱いを実現し易いため、広く普及させることを考慮したものも開発されるようになってきている<sup>1)</sup>。

酵素センサとして利用されるのは主に酸化酵素と脱水素酵素であり、反応形式に基づいて整理すれば表1のようになる。表1の に属する酵素は溶存酸素を用いて基質を酸化させるが、このグループの多くのは酸素以外の適当な分子(例えばベンゾキノン)によっても基質を酸化させることができ、適当な条件下では のグループと同様の脱水素反応が生じる。本研究

では、新規脱水素酵素(表1の に属する。)を使用した酵素センサの開発を目標としているが、本報では、その前段階としてグルコースオキシダーゼ(EC1.1.3.4、和光純薬工業: Aspergillus niger 由来、以下GOD)を用いた酵素センサを試作してその特性を評価したので、そのことについて報告する。また、試料溶液のpHが酵素活性等に影響を及ぼすことから、酵素センサに組み込み可能なpHセンサも試作したので、そのことについても報告する。

#### 2. センサの原理

本研究で用いたGODは次式の反応を触媒する酵素である。



この酵素は、また、酸素が存在しなくてもベンゾキノンの存在下で次の反応を触媒する。



作用極の電位を過酸化水素、または、ハイドロキノンの酸化還元電位よりも高く設定すれば、(1)式、(2)式のそれぞれの場合に応じて次の電気化学反応が進行し、

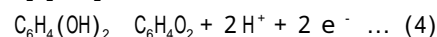
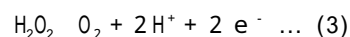


表1 酸化還元酵素の分類

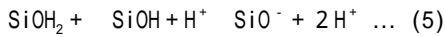
酵 素	反 応
. オキシダーゼ GOD (EC1.1.3.4.)	$S + O_2 \rightarrow P + H_2O_2$
. オキシダーゼ	$S + 1/2O_2 \rightarrow P + H_2O$
. デヒドロゲナーゼ	$S + M_{ox} \rightarrow P + M_{red}$
. デヒドロゲナーゼ	$S + NAD^+ \rightarrow P + NADH$ (NADP <sup>+</sup> ) (NADPH)

S: 基質、P: 生成物、M<sub>ox</sub>: メディエータ(酸化型)  
M<sub>red</sub>: メディエータ(還元型)

\*1 機械電子部

作用極に電流が流れる。この電流値からグルコース濃度を求めるのが、今回、試作した酵素センサの原理であり、特別な電子受容体(メディエータ:本研究の場合ではベンゾキノン)を付与した(2)式と(4)式の組み合わせのものをメディエータ型酵素センサと呼んでいる。

組み込み式のpHセンサとしては、シラノール基の平衡状態が試料溶液のpHに依存して

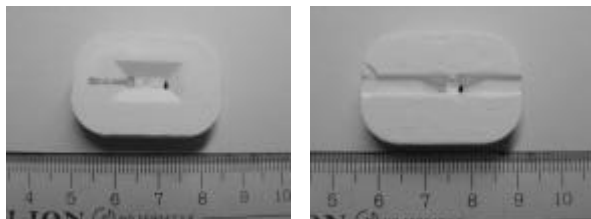


のように変化することを利用した。具体的には、ガラス質で覆った電極を基板上に作製し、参照極との間の電圧測定により、試料溶液のpHを評価した。

### 3. 実験方法

#### 3.1 センサの作製

基板は、アルミナ粉をプレス成形後、焼結して作製した。焼結時に白金ペーストを用いて電極も同時に焼成させ、対極とした(写真1)。作用極は白金線(0.2mm)、参照極は銀/塩化銀線を用い、エポキシ樹脂で基板に取り付けた。また、メディエータは作用極近傍の窪みに、ベンゾキノンを含むパラフィン(融点:42~44)を埋め込む形で固定した(図1)。作用極上への酵素の固定は、牛血清アルブミン(和光純薬工業:和光一級、以下BSA)とグルタルアルデヒド(和光純薬工業:生化学用70wt%、以下GA)を用いた架橋法により行った。具体的には、GOD溶液(0.1M、pH6.1リン酸緩衝液中のGOD濃度が4,000U/mlになるように調整したもの)3μlとBSA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のBSA濃度が110mg/mlになるように調



(a) 基板表面 (b) 基板裏面  
写真1 酵素センサ用セラミックス基板

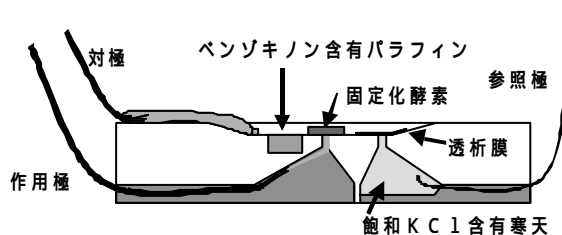


図1 酵素センサの構造

整したもの)30μl、GA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のGA濃度が7wt%になるように調整したもの)4μlを十分に混合し、その混合液3μl(GOD:約1U)を基板上に固定した。酵素膜の基板への付着は良好であり、センサの特性評価中に酵素膜の剥離は一切なかった。

pHセンサは、釉薬(日本フリット:No.400)で白金ペースト電極を覆うことにより作製した(図2)。

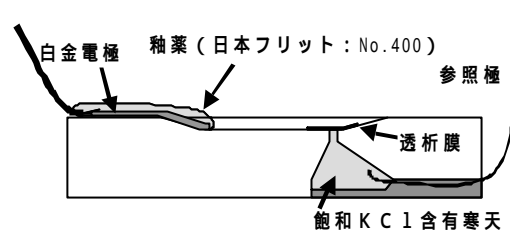


図2 pHセンサの構造

#### 3.2 評価方法

測定では、0.1M塩化カリウムを含むリン酸緩衝液(0.1M、pH7)を基本溶液に用いた。酵素センサの基質に対する特性評価にはこの基本溶液にグルコースを所定量溶かした試料溶液を用い、また、作用極近傍へのメディエータの拡散状況を評価する際には基本溶液のみからなる試料溶液、ベンゾキノン濃度と還元電流の関係を評価する測定では、基本溶液にベンゾキノン(和光純薬工業:和光一級、以下BSA)とグルタルアルデヒド(和光純薬工業:生化学用70wt%、以下GA)を用いた架橋法により行った。具体的には、GOD溶液(0.1M、pH6.1リン酸緩衝液中のGOD濃度が4,000U/mlになるように調整したもの)3μlとBSA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のBSA濃度が110mg/mlになるように調

整したもの)30μl、GA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のGA濃度が7wt%になるように調整したもの)4μlを十分に混合し、その混合液3μl(GOD:約1U)を基板上に固定した。酵素膜の基板への付着は良好であり、センサの特性評価中に酵素膜の剥離は一切なかった。

電流応答の測定に際しては、10pA程度までの検出感度を有するポテンショスタットを作製して行った。酵素センサの電流測定では、作用極電位を参照極(飽和銀/塩化銀電極)に対して+0.6Vに設定し、また、作用極近傍へのメディエータの拡散状況を評価する測定と還元電流のベンゾキノン濃度依存性の測定では、作用極電位をメディエータの酸化還元電位以下の-0.2Vに設定した。

### 4. 実験結果及び考察

図3にメディエータを固定していない酵素センサの応答特性を示す。測定開始直後は充電電流と思われる急激な電流応答が観測されるが、50秒程経過すればほぼ定常値に達する応答特性を示した。但し、基質(グルコース)濃度が3.2mMの場合は僅かではあるが、徐々に電流値が減少していく現象が見られた。これは、

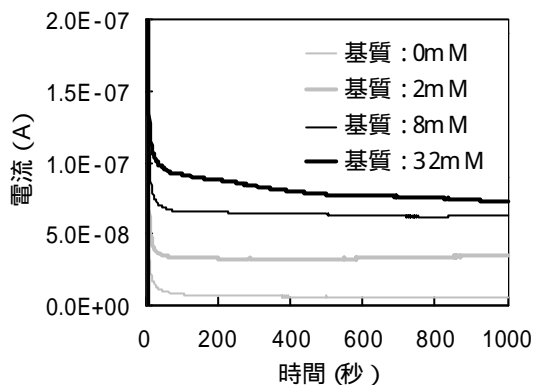


図3 非メディエータ型酵素センサの応答特性

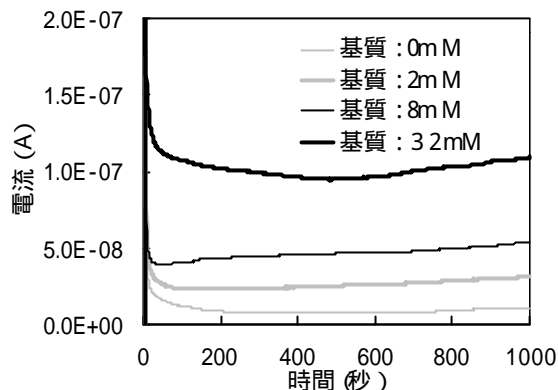
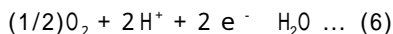


図5 メディエータ型酵素センサの応答特性

(3)式と同時に対極側で生じる反応



により溶液中の溶存酸素が減少し、(1)式の酸化反応が妨げられたためと思われる。基質濃度依存性の再現性については、種々の基質濃度で合計20回以上の測定を行ったが安定した特性が得られた(図4)。

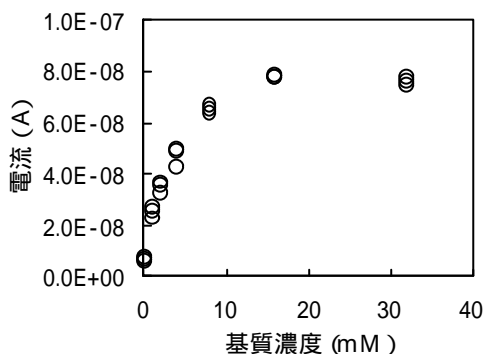


図4 非メディエータ型酵素センサの基質濃度依存性 (測定開始後1000秒経過時)

メディエータ固定後の酵素センサの応答特性を図5に、その後、メディエータを除去して再測定したときの基質濃度依存性の変化を図6に示す。基質を多く含む試料溶液の場合にのみ、測定開始から500秒程経過したところで電流値の減少傾向が増加傾向に転じ、結果として応答特性の飽和傾向が改善された。作用極近傍へのメディエータの拡散状況を評価するため、メディエータのみを基板に固定し、同一基板で作用極に流れる電流の時間変化を繰り返し測定した(図7)。メディエータと溶存酸素の還元電流を重ねた状態での測定であるが、測定開始から250秒程経過したところで還元電流が増加し始めており、メディエータが作用極表面まで拡散してきたことが推測できる。3回の測定で還元電流の時間変化に大きな差はなく、電流ピークは

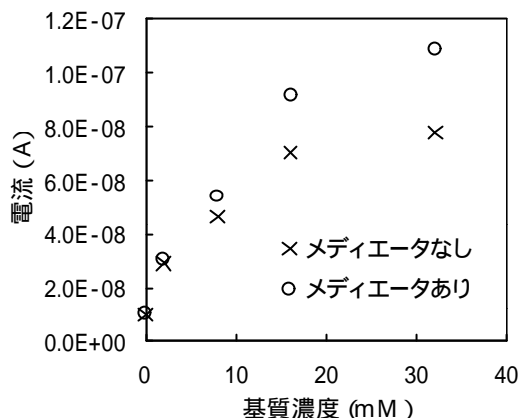


図6 メディエータ型酵素センサの基質濃度依存性 (測定開始後1000秒経過時)

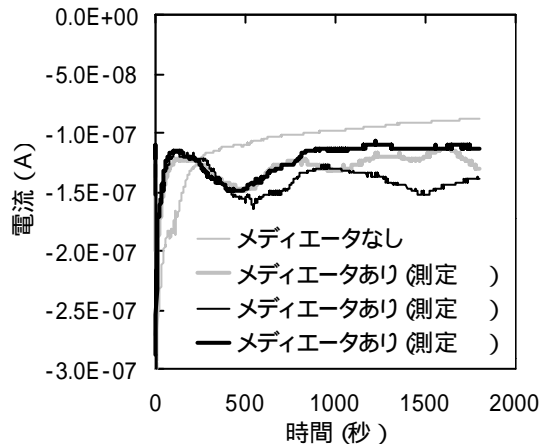


図7 メディエータによる還元電流の時間変化

約500秒経過した時であり、電流値は-150~-170nAであった。酵素を固定したときの応答特性との間に時間のずれが見られるが、これはメディエータが酵素膜を通過するのに余分な時間を要したためと思われる。作用極近傍に拡散してきたメディエータの濃度を見積もるため、様々な濃度のベンゾキノン溶液を用意して、ベンゾキノン濃度と還元電流の関係を調べた(図8)。

図7及び図8から、今回試作したメディエータ型酵素センサの作用極近傍でのメディエータの濃度は最大で0.4mM前後であり、濃度変化もかなり激しいものと推測できる。

様々なpHの0.1Mリン酸緩衝液(0.1M塩化カリウムを含む。)を調整し、pHセンサの特性を評価したところ、図9の結果を得た。35におけるネルンスト応答の値は約-61(mV/pH)であるが、今回の結果は-46(mV/pH)となり、理論的な最大感度に近い値が得られた。

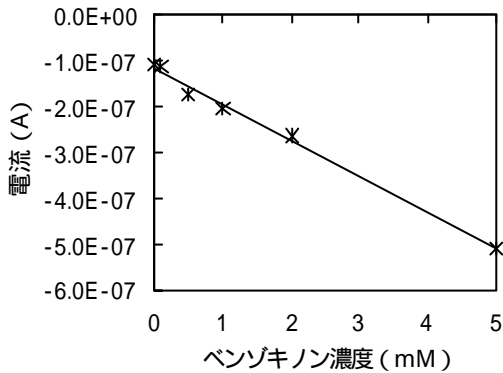
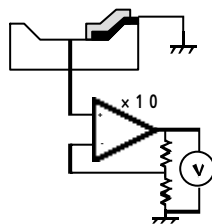
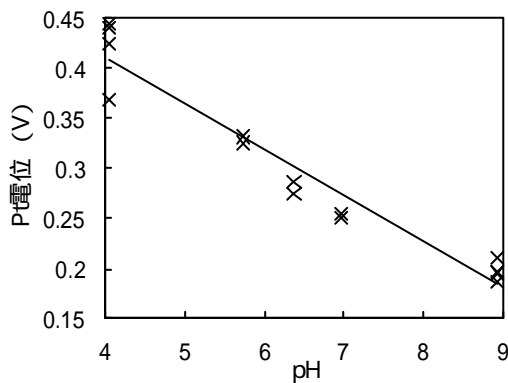


図8 ベンゾキノ濃度と還元電流の関係



(a) 測定系



(b) Pt電位のpH依存性

図9 pHセンサ

## 5. まとめ

本研究では、新規脱水素酵素による酵素センサ開発の前段階として、GODによるメディエータ型酵素センサを試作し、その特性評価を行った。今回のメディエータ固定方式は、酸化酵素をセンサとして用いたときの飽和特性の緩和という点では一定の効果を得たが、脱水素酵素に適用するためには、より高濃度のメディエータを作用極近傍に安定に供給することが必要であり、現在、いくつかの改良品について検討中である。

pHセンサについては、作製法が極めて簡単なことや応答が比較的安定していることから酵素センサの組み込み型として有望であると思われる。

一般に、酵素センサの測定対象とする溶液は、様々な物質を含んでおり、測定に影響を与えるものも少なくない。今後は、尿酸やアスコルビン酸等の実際の被測定物中に含まれると考えられる電極活物質の影響を低減させる方法や蛋白質等の吸着による特性変化の補正法等についても検討していく予定である。

## 参考文献

- 1) 南海ほか：電気化学及び工業物理化学, 63, 592(1995).