

目的別テーマ：生体材料を用いたバイオメテックス材料の開発

16年度研究テーマ

15-3-14：カーボンナノファイバーへのヘムタンパク質の固定化による新規バイオセンサーの作製

ABSTRACT

Cytochrome P450 (CYP) is a heme-protein and plays important biochemical roles, such as drug metabolism, steroid hormone biosynthesis, and so on. Therefore, CYP is very useful for sensing and reacting to important materials as related to the physiological function, but it is difficult to apply as such as a biosensor, because it is unstable against temperature. While carbon nanofibers (CNF) are molecular wires that exhibit interesting structural, mechanical, electrical and electrochemical properties. The purpose of the present study is that the CNF are to use a matrix for immobilizing heme-protein, such as CYP and cytochrome c (cyt.c), for aiming at new biosensor. A carboxyl groups were introduced in the CNF surface, and then cyt.c was bound to the CNF. The CNF/cyt.c was immobilized on glassy carbon electrode (GCE), and the GCE/CNF/cyt.c showed a good electron transfer and stability.

研究目的

花粉症やアトピー性皮膚炎治療における個々の患者に適した薬の投与量を探るため、より高感度かつ簡便な検出用センサーの開発が望まれている。ヘムタンパク質の一種であるシトクロム P450 (CYP) は、これらの薬物代謝の中心的酵素であるため、バイオセンサーとしての活用が期待されている。しかし、安定性に乏しい点がセンサー等のバイオマテリアルとしての活用への障壁となっている。一方、カーボンナノファイバー(CNF)は優れた導電性を有するため、バイオセンシングデバイスのマトリクスとして期待されている。そこで本研究では、CYPをはじめとするヘムタンパク質の安定な固定化担体として CNF を活用し、薬物体内濃度の簡便な検出用バイオセンサーの開発を目的とする。今回は CYP の前段階として、最も研究例の多いシトクロム C の固定化と電極活性を調べた。

一年間の研究内容と成果

CNF は直径 50~200 Å のものを使用し、CNT を硫酸：硝酸=3：1 で酸処理することで、CNF にカルボキシル基を導入した。その後、既報に従って NHS と EDAC の 2 段階反応により、タンパク質分子間の結合を避け、CNF にヘムタンパク質のシトクロム C をアミド結合させ、グラッシーカーボン電極上に固定化した。その結果、共有結合により、溶液応答よりもタンパク質の酸化還元電位が +50mV から -50mV へとシフトし、低電位で電極応答しやすくなった (図 1)。また、溶液応答では、CNF 上へタンパク質が吸着変性し、電極活性が著しく低下していたのに対し、固定化により、少なくとも 1 週間は活性を維持できることを明らかにした。さらに、固定化手法を一部改良することで、タンパク質の固定化量を 1% から 10% へと増大できた。

展望

cyt. c のかわりに CYP や他のヘムタンパク質の CNF への固定化とその電極活性及び基質特異性について検討する。また、固定化状態を TEM や AFM により観察する予定である。

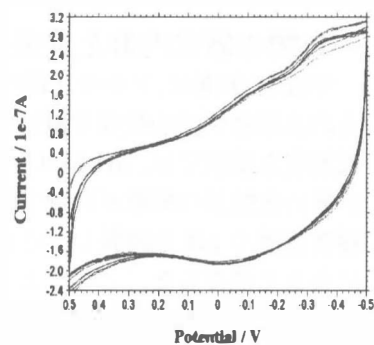


図1 シトクロム C 固定化 CNF 電極のサイクリックボルタモグラム