

目的別テーマ：生体材料を用いたバイオミメティックス材料の開発

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) metabolizes a lot of drugs in a human liver. Therefore, an immobilization of CYP on the electrode without denaturation is expected to create a drug-detection sensor. However, CYP 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). A carboxyl groups were introduced in the CNF surface, and then cyt.c and CYP were bound to the CNF. The CNF/cyt.c and CNF/CYP were immobilized on glassy carbon (GC) electrode, and the GC/CNF/cyt.c and GC/CNF/CYP electrodes 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、これらの薬物の半分以上を代謝している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した。初めに、ヘムタンパク質の電気化学的な研究例の最も多いシトクロム C (Cyt.c) 固定化条件の最適化とその電極活性を調べ、CNF の固定化単体としての有用性を検討した。次に、疾病の際、体内に投与される薬物の半数以上を代謝している CYP の固定化電極を作製し、新規バイオセンサーとしての有用性に言及した。

### 5年間の研究内容と成果

CNF は、直径 50~200 Å と 500 Å の 2 種類を使用した。グラッシーカーボン (GC) 電極に CNF を固定化することで、補酵素として知られる FAD 溶液の電極応答は著しく向上した (図 1)。これは、GC 電極に CNF が固定化されることで、電極面積が増大したことに起因する。しかし、FAD 溶液の代わりに Cyt.c 溶液を用いても、顕著な電極応答は見られなかった。そこで、次に既報に従って CNF を硫酸：硝酸=3：1 で酸処理することで、CNF にはカルボキシル基を導入した。CNF へのカルボキシル基の導入量は、酸処理 CNF に octadecylamine を結合させ、NMR 測定により求めた。その結果、CNF の C 原子約 27 個に 1 個カルボキシル基が導入されていることを確認した。カルボキシル基の導入した酸処理 CNF を GC 電極に固定化し、Cyt.c 溶

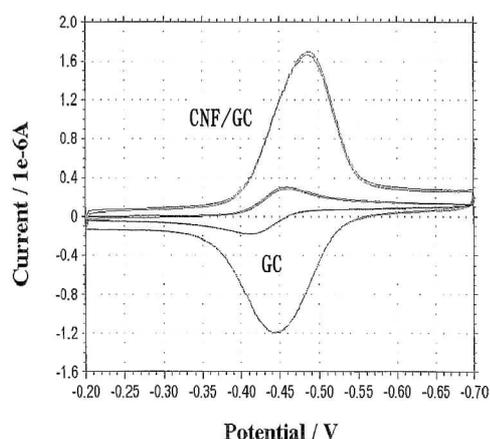


図1 CNF 固定化による FAD 溶液の電極活性の向上

液を測定したところ、Cyt.c の酸化還元応答が観察された (図2)。これは、カルボキシル基へ塩基性タンパク質である Cyt.c が静電的に吸着し、電極表面の濃度が増加したためと考えられる。次に、直径の異なる CNF を用いて FAD 及び Cyt.c 溶液を測定した結果、FAD では顕著な差異がなかったのに対し、Cyt.c では、50~200 Å の CNF の方が良い電極応答を示した。これは、Cyt.c の分子サイズが CNF の大きさと関与している可能性を示している。

Cyt.c を静電吸着させた酸処理 CNF/GC 電極を電解質中で繰り返し測定すると、電極応答が消失した。これ

は Cyt.c が酸処理 CNF から脱離したためである。そこで、次に共有結合による Cyt.c の固定化を試みた。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 Cyt.c をアミド結合させ、GC 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3)。また、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が明らかになった。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% へと著しく増大できた。Cyt.c を固定化の際、酸処理 CNF のカルボキシル基に炭素数の異なるアルキル鎖 (スペーサー) を導入し、電極応答の相違を検討した。その結果、スペーサーの有無に関わらず、電極応答が得られた。さらに、測定を繰り返すことでスペーサーを介さずに直接固定化した電極では、還元電流が著しく増加した (図4)。これは測定の繰り返しにより溶存酸素量が増え、自動酸化された Cyt.c 量が増加したためと考えられる。

次に、Cyt.c の固定化条件を参考にし、CYP の酸処理 CNF への固定化を行った。それを GC 電極に固定化し、電極応答を測定した結果、Cyt.c よりも顕著な酸化還元電流が観察できた (図5)。また、CYP の場合、Cyt.c と異なり、繰り返し測定による酸化還元電流の変化は見られなかった。同じヘムタンパク質にも関わらずこのような差異が生じたのはタンパク質中のヘムの存在状態が異なることに起因している可能性が考えられる。まだ、基質特異性など詳細な研究は進行中であるが、この結果は目的でも述べた新規バイオセンサーの開発へと近づいたことを強く示唆している。

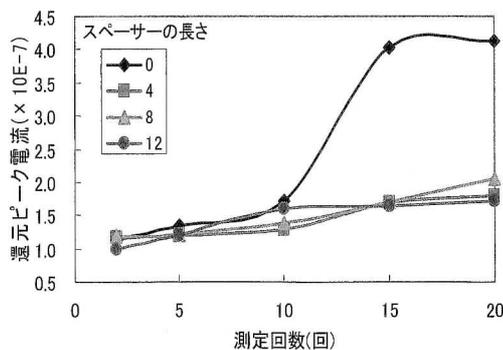


図4 スペーサー長の異なる Cyt.c 固定化電極の繰り返し測定の影響

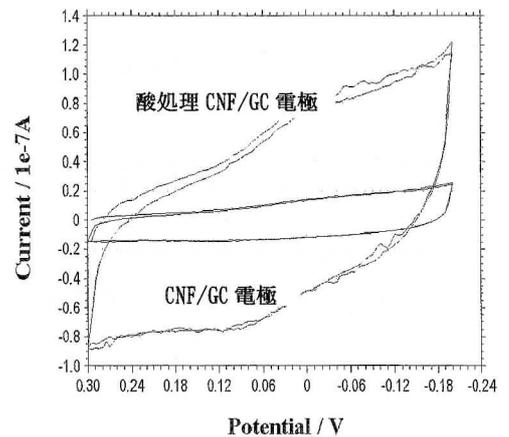


図2 酸処理 CNF/GC 電極による Cyt. C 溶液の電極活性の向上

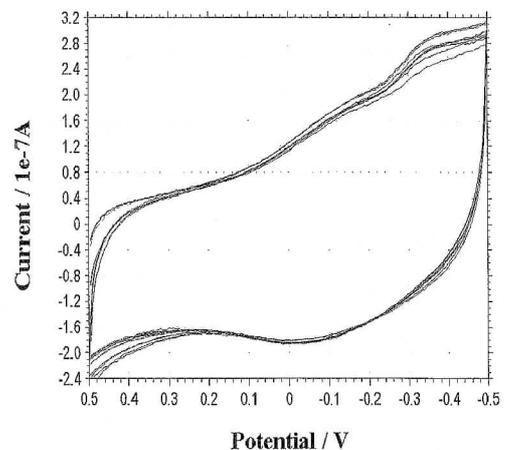


図3 Cyt. C 固定化 CNF/GC 電極のサイクリックボルタモグラム

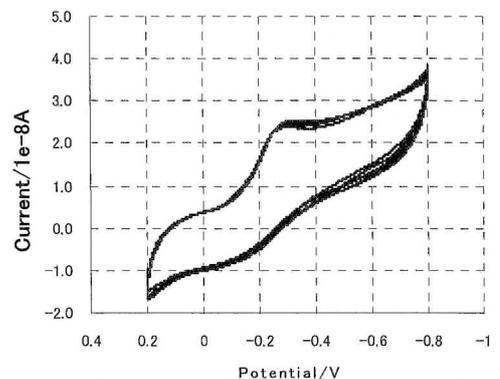


図5 CYP 固定化 CNF/GC 電極のサイクリックボルタモグラム