

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19022

研究課題名(和文) BSAゲルと脂質二分子膜を複合した高感度酵素センサーおよび薬物放出システムの開発

研究課題名(英文) Development of enzymatic sensor and drug release system based on BSA gel and lipid bilayers

研究代表者

山口 央 (Yamaguchi, Akira)

茨城大学・理工学研究科(理学野)・教授

研究者番号：10359531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BSAヒドロゲルと脂質二分子膜の特性を組み合わせた『高感度・高ダイナミックレンジな酵素センサー』を新たに設計し、次世代の非侵襲的酵素センサー開発を第一の目的とした。さらに、設計するセンサー系を応用し、新しい『基質応答型の薬物放出システム』の創出を第二の目標とした。前者については、目的とする体液や尿中グルコース計測が可能な検出限界、繰り返し再現性を持つセンサー開発に成功した。後者については、グルタチオンの添加による明瞭な薬剤放出挙動を示すシステムの構築を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

簡易診断技術は予防医療・テーラーメイド医療の進展を支える基盤技術の一つである。酵素センサーは、酵素の基質選択的触媒特性を利用した信頼性の高い簡易診断技術であるが、センサー応答(感度・ダイナミックレンジ)や長期安定性に関する技術的障壁がある。本研究では、適切なナノ材料を複合化したセンサーを開発し、実用化への展望を実証することができた。また、用いた複合材料については、ガン治療などで開発が進む薬物送達システム(DDS)への適用性も確認された。

研究成果の概要(英文)：The primary purpose of this study is development of new-generation non-invasive glucose sensor composed of BSA hydrogel, lipid bilayers, glucose oxidase, and mesoporous silica. Our developed sensor exhibited good reproducibility, large dynamic range, and high sensitivity, for the detection of glucose in various non-invasive samples. In addition, a hybrid material composed of BSA hydrogel and mesoporous silica nanoparticle could be applied for drug release system upon addition of a biological substance.

研究分野：分析化学

キーワード：酵素センサー BSAゲル メソポーラスシリカ

1. 研究開始当初の背景

グルコースセンサーは糖尿病の診断と予防に必要不可欠であり、採血型の従来法から呼気やだ液を対象とする非侵襲型センサーへの転換が求められている。呼気やだ液中のグルコース濃度は血液の1/100程度であるため、高感度・長寿命が非侵襲型センサーの重要な開発項目である。これまでに、酵素を利用しない分光学的、電気化学的な非侵襲型センサーは多数報告されているが、計測の基質選択性に乏しく、診断の正確性を担保するためには、基質選択性に優れた酵素を認識・信号変換系としたデバイスの誕生が望まれている。

天然の酵素は、一般的に物理的・化学的に不安定なために、酵素を利用したグルコースセンサーの寿命は短い。家庭などでの簡易診断においては数ヶ月以上の長期間にわたるセンサー性能の安定性が求められるため、酵素機能の長期安定性を確保する方法論も必要である。メソポーラスシリカの均一ナノ空間に閉じ込められたタンパク質は、その構造と機能が長期安定化すると報告されている。従って、酵素をメソポーラスシリカ内に包摂させた複合材料は、長寿命センサーへの適用性を有する。

2. 研究の目的

本研究では、『高感度・高ダイナミックレンジなグルコースセンサー開発』から次世代の非侵襲的酵素センサー創出を第一の目的とした。具体的には、グルコースオキシダーゼ(GOD)を利用したグルコースセンサーの設計、構築を行った。開発目標としては、だ液、汗、尿を対象とした微量グルコース計測が可能な感度とダイナミックレンジを兼ね備えたセンサー開発である。ここでは、均一ナノ空間を有するメソポーラスシリカ(MPS)粒子を用い、このMPS細孔内にGODを閉じ込めたGOD/MPS複合体を用いることで、GODの長期安定利用を狙った。さらに、構築するセンサー系を応用し、新規ドラッグデリバリー系の開拓を指向した『基質応答型の薬物放出システム開発』を第二の目標とした。

3. 研究の方法

各研究課題において以下の研究を遂行した。

(1) 高感度・高ダイナミックレンジなグルコースセンサー開発

本研究課題では、GOD/MPS複合体をBSAゲル(ウシ血清アルブミンの熱変性によって形成するヒドロゲル)内に埋め込み、ゲル内での酵素反応を利用したセンサー開発を行った。研究当初は、固体基板上的BSAゲル膜にGOD/MPS複合体を埋め込み、発色試薬を利用したセンサー開発を進めたが、発色試薬を用いない電気化学計測型センサーの方が安定性や感度に優れていることが分かった。そこで、電気化学計測とGOD/MPS複体内包BSAゲル膜を組み合わせたセンサー開発について集中的に検討した。

(2) 基質応答型の薬物放出システム開発

BSAゲルは、ジスルフィド結合を架橋点とするヒドロゲルである。従って、適当な量の還元剤によってジスルフィド結合が切断されるとゲルは膨潤し、還元剤が無くなると再びジスルフィド結合が形成され、ゲルは収縮する。この性質を利用して、グルコース応答型の薬物放出システムの創出を狙った。本研究内では、BSAゲルの膨潤と収縮を利用した薬剤応答のモデルシステムとして、還元剤であるグルタチオンに反応する薬物放出系について検討した。具体的には、直径100nmのMPSナノ粒子を合成し、粒子表面へのBSAゲルの被覆を行った。このBSA被覆MPSナノ粒子を用いて、ナノ粒子細孔中に吸着させたポルフィリンの放出について検討した。

4. 研究成果

(1) 高感度・高ダイナミックレンジなグルコースセンサー開発

本研究の遂行の中で、BSAゲルの特性を利用した自律駆動、目的とする感度とダイナミックレンジ、良好な繰り返し安定性、といった特性を有するセンサー開発に成功した。グルコース溶液をセンサーに通液させた際の典型的な電流応答を図1に示す。通液では、シリッジポンプなど送液デバイスを用いずに、センサー表面へのピペッティングを行っている。ピペッティング後、速やかな電流値の増大とゆるやかな減少が確認された(図1)。この電流応答は、試料溶液が自律的にセンサー内部に取り込まれ、取り込まれたグルコースのGOD/MPS複合体での酵素反応、反応生成物である過酸化水素の電極表面への自律的な輸送が起こっていることを意味する。ピペッティング後の電流応答の時間積分(総電荷量)を試料溶液中のグルコース濃度に対してプロ

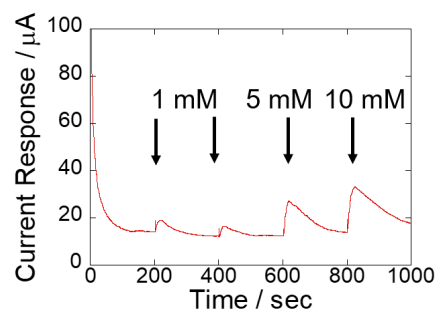


図1 濃度の異なるグルコース溶液の通液に対するセンサー応答例

ットすると、良好な直線性を示し（図 2）、目的とするダイナミックレンジが達成されたことを確認した。センサー各部の作製条件を適正化したところ、繰り返し再現性は 5.7 %rsd であり、検出限界 (0.0072 mM)、定量限界 (0.022 mM) となった。これらのセンサー性能は、尿 (~5 mM)・だ液 (~0.3 mM)・汗中 (~0.1 mM) に含まれる低濃度のグルコース計測に対して十分適用可能なものであり、目的とする高感度センサーの試作に成功した。

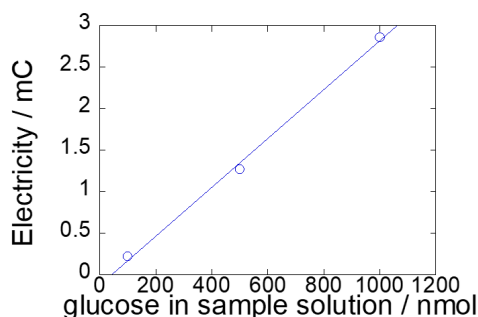


図 2 電流応答とグルコース濃度の相関

また、メソポーラスシリカ細孔内に閉じ込められた酵素の構造や機能についても検証を行い、モデル物質を用いた系で細孔サイズによって構造安定性や機能が異なることも分かった。この結果は、今後のメソポーラスシリカ細孔と酵素の複合化に対する設計指針となりうるものと考えている。

(2) 基質応答型の薬物放出システム開発

MPS ナノ粒子への BSA ゲルの被覆について、適切な溶液 pH と被覆時の BSA 濃度、および MPS ナノ粒子表面のアミン修飾の影響について精査した。その結果、アミン修飾をしない MPS ナノ粒子に対して、BSA の等電点より若干高い pH が至適であること、BSA 濃度は 1 mM 程度が至適であることを確認した。至適条件では、BSA 5 分子程度が凝集・積層したゲル膜が MPS ナノ粒子表面に形成していることが、吸着量から推定された。

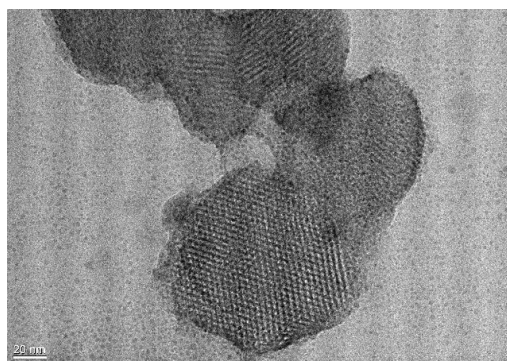


図 3 メソポーラスシリカナノ粒子の TEM 画像

BSA 被覆 MPS ナノ粒子について、粒子細孔内にカチオン性ポルフィリンを包摂させ、ジスルフィド結合を切断可能なグルタチオンの有無、温度変化に対するカチオン性ポルフィリンの放出挙動を計測した。図 3 に MPS ナノ粒子の TEM 画像を示す。カチオン性ポルフィリンは、TEM 像で観察される細孔内に吸着しており、この粒子の周囲に BSA ゲル膜が形成している。実験の結果、図 4 に示す通り、グルタチオンの添加による顕著な放出が確認された。また、温度が高いほど放出量が高いことも分かった。この他に、異なる還元剤を用いた放出実験や、放出挙動の塩濃度依存性実験などを行った。その結果、ジスルフィド結合の切断によってゲルが膨潤したことでカチオン性ポルフィリンが放出されたことが示唆された（図 3）。以上の結果は、目的とする BSA ゲルの膨潤・収縮を利用した薬剤放出システムが構築可能であることを示す。

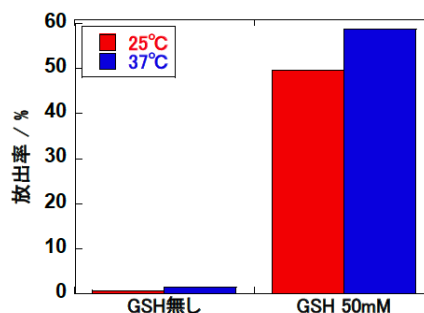


図 4 グルタチオン添加によるカチオン性ポルフィリンの放出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jun Kijima, Yuuta Shibuya, Kazuya Katayama, Tetsuji Itoh, Hiroki Iwase, Yoshiaki Fukushima, Minoru Kubo, Akira Yamaguchi	4. 巻 122
2. 論文標題 Structural characterization of myoglobin molecules adsorbed within mesoporous silica	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. C	6. 最初と最後の頁 15567-15574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.8b04356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsubasa Masuda, Yuuta Shibuya, Shota Arai, Sayaka Kobayashi, Sotaro Suzuki, Jun Kijima, Tetsuji Itoh, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa, Akira Yamaguchi	4. 巻 34
2. 論文標題 Effect of cavity size of mesoporous silica on short DNA duplex stability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5545-5550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b00437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akira Yamaguchi, Kazuhiro Taki, Jun Kijima, Yurie Edanami, Yuuta Shibuya	4. 巻 34
2. 論文標題 Characterization of Myoglobin Adsorption into Mesoporous Silica Pores by Differential Scanning Calorimetry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 1393-1399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18P371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuji Itoh, Yuuta Shibuya, Akira Yamaguchi, Yasuto Hoshikawa, Osamu Tanaike, Tatsu Tsunoda, Taka-aki Hanaoka, Satoshi Hamakawa, Fujio Mizukami, Akari Hayashi, Takashi Kyotani, Galen D. Stucky	4. 巻 5
2. 論文標題 High-performance bioelectrocatalysts created by immobilization of an enzyme into carbon-coated composite membranes with nano-tailored structures	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Mater. Chem. A	6. 最初と最後の頁 20244-20251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7ta04859a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Shibuya, K. Katayama, K. Akutsu-Suyama, A. Yamaguchi	4. 巻 4
2. 論文標題 Continuous mesoporous aluminum oxide film with perpendicularly oriented Meso-ore channels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 17890-17893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b02797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 A. Yamaguchi, Y. Edanami, T. Yamaguchi, Y. Shibuya, N. Fukaya, T Kohzuma	4. 巻 93
2. 論文標題 Effect of Cavity Size of Mesoporous Silica on Type 1 Copper Site Geometry in Pseudoazurin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 630-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 山口央
2. 発表標題 ナノ多孔性材料とタンパク質を複合化した生体触媒材料の開発
3. 学会等名 2019年度日本分析化学会東北支部若手交流会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口央
2. 発表標題 メソ空隙に閉じ込められた機能性生体高分子の構造と安定性
3. 学会等名 GIC第57回研修セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 央
2. 発表標題 小角中性子散乱と熱分析を利用したナノ空間内タンパク質の構造評価
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 央
2. 発表標題 小角中性子散乱を利用したタンパク質/ナノ多孔複合材料の評価
3. 学会等名 2018年度量子ビームサイエンスフェスタ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 央、 洪屋 祐太
2. 発表標題 生体高分子の高次構造と閉じ込め空間サイズの相関
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学理学部山口研究室 http://anal.sci.ibaraki.ac.jp/yama/yamalab.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----