

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23646

研究課題名（和文）マイクロ流体デバイスを用いた酵素活性に依存しないバイオセンサの開発

研究課題名（英文）Development of enzyme activity-independent biosensors using microfluidic devices

研究代表者

杉本 悠 (Sugimoto, Yu)

東京大学・工学研究科・特任研究員

研究者番号：30848841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：酵素活性が非常に高い場合の、微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応の解析式を導出することに成功した。導出した解析式より、この系を用いたバイオセンサの性能（基質濃度に対する電流の線形範囲）を向上させる条件を見出した。具体的には、基質の拡散係数と基質に対するミカエリス定数が小さく、メディエータの拡散係数と微小電極半径が大きい場合に電流の線形範囲は拡大する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小電極上におけるメディエータ型酵素電極反応を利用したバイオセンサは、電流値が酵素活性に依存するという、酵素電極が本来持つ弱点を克服した究極のセンサと言える。本研究では解析式導出を通じて、この反応系を完全に理解し、さらにこの系を用いたバイオセンサの性能を向上させる条件を明確に示すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：I have succeeded in deriving an analytical formula for the mediator-type enzymatic electrode reaction at the microelectrode when the enzyme activity is very high. The analytical formula reveals the condition that improves the performance of the biosensor using this system. The linear range of the current expands when the diffusion coefficient of the substrate and the Michaelis constant for the substrate are small, and the diffusion coefficient of the mediator and the microelectrode radius are large.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサ メディエータ型酵素電極反応 微小電極 解析式 球形拡散 定常状態近似

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素電極を用いたバイオセンサは基質特異性が高く、迅速・高感度に測定できる利点を持つ。しかしバイオセンサのシグナルは酵素活性に依存するという問題があった。これまでの研究より酵素活性が非常に高い場合、微小電極を用いることで電極近傍での基質流量をすべてメディエータ流量に変換し、酵素活性に依存しない定常電流が得られることが明らかになった[1]。これは酵素電極が本来持つ弱点を克服した究極のセンサと言える。しかし、この状況を実現できる酵素の数は非常に少ない。一方、マイクロ流体デバイスは極微小サンプルで測定できる、反応速度を上げられるなど、多くの利点を持つ。

研究開始当初はマイクロ流体デバイスを用いて、通常活性の酵素を用いて酵素活性に依存しないバイオセンサを開発することを目標としていた。しかし、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い、2020年4月から研究室への出入りが厳しく制限された。それにより当初予定していた実験研究が実行不可能な状況に陥った。そこで実験研究に代わり、理論研究への路線変更を行った。

2. 研究の目的

微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応は、微小電極による球形拡散と酵素反応を組み合わせたことにより系が複雑化し、直感的に反応を理解することが困難であった。今後この系を用いたバイオセンサの開発を効率的に行うためには、系の詳細な理解が必要であった。そこで本研究では、系の理解とさらなるバイオセンサの性能向上を目的とし、以下2つの研究を行った。

- (1) 微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応の解析式導出
- (2) 解析式に基づくバイオセンサ性能向上に必要な条件の発見

3. 研究の方法

(1) 解析式導出のために図1に示す解析モデルを用いた。微小電極として半球電極を用い、酵素活性が非常に高い(メディエータ濃度に対するミカエリス定数が十分小さい)と仮定した。さらに酵素反応が非常に速いため、メディエータ濃度分布は反応面と呼ばれる位置内部にのみ存在すると仮定した。そして、定常状態近似した球形拡散方程式を適切な境界条件の下で解くことで解析式を導出した。

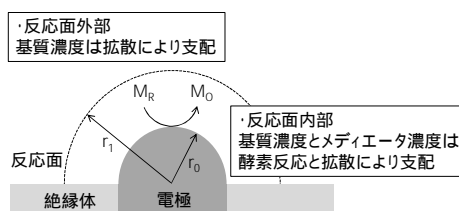


図1 解析モデル

(2) 導出した解析式より、基質濃度に対する電流の線形範囲を広げる条件を探索した。

4. 研究成果

- (1) 微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応の解析式導出

図2に導出した解析式を示す。

$$a = \sqrt{\frac{k_{\text{cat}}c_E^0}{D_S K_S}}$$

$$c_S = \begin{cases} \frac{c_S(\infty)}{ar} \frac{ar_0 \cosh(a(r-r_0)) + \sinh(a(r-r_0))}{ar_0 \sinh(a(r_1-r_0)) + \cosh(a(r_1-r_0))} & (r_0 \leq r \leq r_1) \\ c_S(\infty) \left\{ \left(1 - \frac{r_1}{r}\right) + \frac{1}{ar} \frac{ar_0 + \tanh(a(r_1-r_0))}{ar_0 \tanh(a(r_1-r_0)) + 1} \right\} & (r \geq r_1) \end{cases}$$

$$c_{M_0} = \frac{r_0}{r_1 - r_0} \left(\frac{r_1}{r_0} - 1 \right) c_M^0 - \frac{D_S}{D_M} \left[\frac{r_0 r_1}{r_1 - r_0} \left\{ \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{r_1} \right) + \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r_1} \right) \frac{ar_1}{ar_0 \cosh(a(r_1-r_0)) + \sinh(a(r_1-r_0))} \right\} c_S(r_1) - c_S \right]$$

$$I = I_{\text{all-reacted}} - I_{\text{unreacted}}$$

$$I_{\text{all-reacted}} = 2\pi n F D_S r_1 c_S(\infty)$$

$$I_{\text{unreacted}} = 2\pi n F D_S a^{-1} c_S(\infty) \frac{ar_0 + \tanh(a(r_1-r_0))}{ar_0 \tanh(a(r_1-r_0)) + 1}$$

図2 導出した解析式

メディエータ濃度に関する解析式において、右辺第1項は反応面の位置をバルクとみなした場合の球状拡散によるメディエータ濃度プロファイルを表していた。右辺第2項は、 r_0 r r_1 に残った基質が酵素反応によって消費(または生成)することで生じるメディエータ濃度プロファイルを表していた。基質濃度に関する解析式が複雑なため解釈が難しいが、図示すると r_1 で変

曲点を持った。すなわち、基質濃度プロファイルは r_0 r r_1 では下に凸で、 r r_1 では上に凸であった。この変曲点の発生は数値シミュレーションで得られた結果と一致した[1]。電流は $I_{\text{all-reacted}}$ と $I_{\text{unreacted}}$ の2つで構成されていた。 $I_{\text{all-reacted}}$ は r_1 ですべての基質が反応した場合の電流であり、球形拡散によって制御される限界電流と一致していた。 $I_{\text{unreacted}}$ は r_1 で反応しきれずに残留した基質に由来する電流と考えられた。

さらにこれらの解析式から、電流の各パラメータ依存性を調べた。

電流の基質濃度依存性 (図3 (A))

基質濃度が 5 mM 以下の場合、 $I_{\text{unreacted}}$ が小さく電流は球形拡散による限界電流 (実線) と一致した。一方、基質濃度が濃くなると基質フラックスの増加により $I_{\text{unreacted}}$ が大きくなった。このため電流は球形拡散による限界電流より小さくなり、基質濃度に対する線形性が減少した。

電流のメディエータ濃度依存性 (図3 (B))

電流はメディエータ濃度が薄い領域で増加し、メディエータ濃度が濃い領域で減少した。この傾向は数値シミュレーション結果[1]と同様であり、解析式から次のように説明できた。メディエータ濃度が薄い領域では、メディエータフラックスの増加のため電流が増加した。一方メディエータ濃度が濃い領域では、メディエータフラックス増加効果よりも、バルクでの酵素反応による基質濃度減少効果が大きいいため電流が減少した。

電流の酵素濃度依存性 (図3 (C))

酵素濃度が 0.05 mM から 0.5 mM の範囲で電流はほぼ一定の値となった。この結果は数値シミュレーション結果[1]と同様であった。数値シミュレーションでは電流の酵素濃度非依存性を説明できなかったが、本研究では導出した解析式からこの電流を次のように説明することに成功した。まず $I_{\text{all-reacted}}$ は、バルクでの酵素反応による基質濃度減少効果により減少した。また $I_{\text{unreacted}}$ も酵素濃度の増加により減少した。これら2つの減少が互いに相殺されることにより、酵素濃度が変化してもトータルの電流は変化しなかった。さらに基質の拡散係数を小さくした場合の電流の酵素濃度依存性も計算した。この場合の電流変化は 0.01 mM から 0.5 mM の範囲で小さかった。酵素使用量の削減はバイオセンサのコスト面で有用であり、基質の拡散係数を下げることが効果的であること見出した。

(2) 解析式に基づくバイオセンサ性能向上に必要な条件の発見

解析式より基質濃度に対する電流の線形範囲を広げるためには、 $I_{\text{unreacted}}$ を小さくすればよいことが分かった。 $I_{\text{unreacted}}$ の解析式より、基質の拡散係数と基質に対するミカエリス定数を小さくし、メディエータ濃度、メディエータの拡散係数、微小電極の半径、酵素反応速度定数、酵素濃度を大きくすることが必要であることを見出した。一方、メディエータ濃度をやみくもに大きくしても $I_{\text{unreacted}}$ にはほとんど影響しないので、メディエータ濃度は適切な値に設定する必要がある。これらパラメータにおいて、実験で調整しやすいパラメータは電極半径である。そこで微小電極の半径を図3 (A) の2倍の大きさに設定し電流の基質濃度依存性を再計算したところ、基質濃度 15 mM まで線形範囲を広げること成功した。

新型コロナウイルス感染症の影響で、本研究は当初の予定とは大きく異なるものとなってしまった。しかし解析式導出を通じて、微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応を完全に理解したことは学術的に大きな成果である。またバイオセンサ性能向上の条件を明確に見出すこともできた。今後は半球電極だけでなく、円筒電極やディスク電極におけるメディエータ型酵素電極反応の解析式導出にも取り組み、今回の系以外にも電流が酵素活性に依存しない条件が存在しないか探索する予定である。

< 引用文献 >

Y. Kitazumi, T. Noda, O. Shirai, M. Yamamoto, K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 8905-8910 (2014)

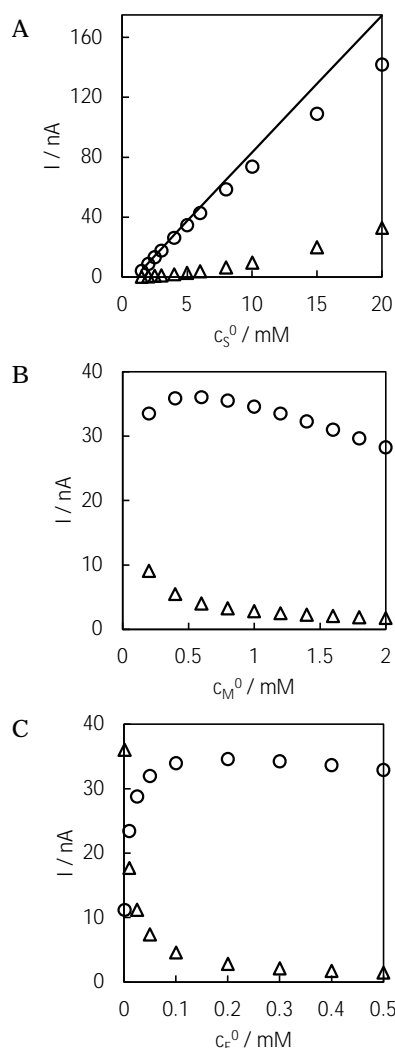


図3 電流の (A) 基質濃度、(B) メディエータ濃度、(C) 酵素濃度依存性。 $I_{\text{all-reacted}} = I_{\text{unreacted}}$ 、実線は球形拡散による限界電流を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugimoto Yu	4. 巻 888
2. 論文標題 Understanding of the fast mediated bioelectrocatalytic reaction on microelectrodes based on an analytical formula	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Electroanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 115211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jelechem.2021.115211	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本悠
2. 発表標題 微小電極におけるメディエータ型酵素電極反応の解析式導出の試み
3. 学会等名 第66回ポーラログラフィーおよび電気化学分析討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------