

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550078

研究課題名（和文）生体適合複合材料を生体分子間結合の反応場とした電気化学的センサの開発

研究課題名（英文）Development of electrochemical sensor using biocomposite material as the reaction field of binding between biomolecules

研究代表者

菅原 一晴（SUGAWARA KAZUHARU）

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30271753

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体高分子材料の高機能化をはかるために、生体高分子－カーボンならびに生体高分子－生体高分子複合材料を作製した。そして、複合材料中への細菌の封入により生じる生体分子の電気化学的モニタリングや機能性タンパク質によるその表面の改質を行った。また、これらの素材に生体分子を修飾し分子間結合の反応場として用いた。さらに、各素材の特性を解析するとともに、電気化学的に生体分子をセンシングするシステムを構築した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, biopolymer-carbon and biopolymer- biopolymer composite materials were constructed in order to enhance the functionalization of the biopolymeric materials. First, the electrochemical monitoring of biomolecule produced from bacteria enclosed in the material and the surface modification of the composite material covered with a functional protein were performed. Second, the biomolecules were immobilized to the material that was considered as the reaction field of the molecular interaction. Furthermore, the characteristic of each material was analyzed, and the electrochemical sensing systems of the biomolecules were developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体高分子、複合材料、カーボン、タンパク質－タンパク質相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

生体高分子材料は、人工臓器、再生医工学および遺伝子治療などの医療技術や環境を保全するためのバイオエネルギーシステム、生分解性材料の開発に寄与してきた。近年では、生体高分子材料表面上でタンパク質－細胞間

相互作用を評価する試みが報告されている。例えば、ヒドロキシ酪酸－ヒドロキシ吉草酸共重合体あるいはエラスチンをコラーゲンで被覆した複合材料を用いることで細胞適合性や組織再生の向上をはかっている。加えて、生体適合性材料であるポリシアル酸表面上で

の細胞培養に関する研究も行われている。また、それらの官能基を介して特定の機能をもったタンパク質や糖鎖を生体高分子に導入した素材は、生体分子間の結合をモニタリングするための優れた反応場となる。申請者は、これまでに糖鎖あるいは硬タンパク質からなる生体高分子膜を擬似生体環境とみなし、生体分子間結合の反応場として電気化学的分野に応用してきた。具体的には、上述の生体高分子膜の官能基を利用して静電的相互作用や分子認識機能に基づいて幾つかのタンパク質を固定化し、タンパク質-リガンド間結合をボルタンメトリーにより評価している。その結果、電極に取り付けた生体高分子膜はタンパク質の支持体として有用であり、生体分子をセンシングする基板となることを明らかにした。一方、生体高分子-ナノ粒子や生体高分子-金属錯体などの複合材料が電気化学的センサに利用されており、触媒機能と生体適合性を有した素材になっている。申請者も生体高分子と導電性熱分解カーボンあるいはカーボンナノチューブを含有させた素材の開発に取り組んでいる。糖鎖の一つであるキチンを生体分子間結合の反応場として用いる場合には、電極応答を示す生体分子やマーカーの一部が高分子膜によってブロックされる。生体高分子-カーボン複合膜で電極を被覆するならば、電極活性な生体分子の検出感度をカーボンの導電性に基づいて高めることができる。いくつかの生体分子の電極応答は、カーボンを含まない膜での応答と比較して増加が観察され可逆性も改善されることを見いだしている。上記の結果を踏まえ、本研究ではこのようなコンセプトを発展させ“生体高分子-カーボン”や“生体高分子-生体高分子”複合材料を作製し“機能性分子の導入により材料表面の改質”を行い、生体適合性の高い素材を開発する。さらに、その新素材を“生体分子間結合の反応場”とした“生体分子センサの設計”を目的に研究を進めるものである。

## 2. 研究の目的

本研究の内容としては、先に述べた複合材料を支持体とした生体分子センシングデバイスをデザインする。さらに、その素材の特性を評価し実用化を視野に入れた研究を行う。

### (1) 直径7 $\mu\text{m}$ の導電性カーボンファイバー

(12,000本程度)を収束剤(ウレタンなど)により束ねた“チョップドファイバー”をディスプレイ電極として使用し、その表面に生体高分子をコーティングしたセンシングシス

テムの設計を試みる。

(2) 細胞培養用透過性コラーゲン膜表面に熱分解カーボンまたは人造黒鉛を分散させ細胞培養用コラーゲン溶液でその膜をキャストし、“サンドウィッチ構造”の導電性コラーゲン膜を調製する。

(3) “キチン-キトサン膜”に生体分子を修飾し、その分子と選択的に結合するタンパク質を固定化する。そして、電極活性なプローブを用いることで、複合膜表面で起こる分子間結合を電気化学的にモニタリングする。

(4) “生体高分子-カーボン-生体高分子”複合材料を用いた複合膜上で細菌培養を行い、電極応答を示す代謝物のバイオセンシングの高感度化をはかる。

(5) タンパク質/電極活性物質修飾磁性ビーズと糖タンパク質固定化磁性ビーズ間の結合をモニタリングするための電気化学的なアッセイを開発する。特にビーズの粒径に着目し、タンパク質-糖タンパク質間の結合定数を求め、粒径の効果についての知見を得るものである。

(6) カーボンプレートに有機金属錯体を固定化し、リン酸化タンパク質のリン酸基との相互作用を電気化学的マーカーの応答変化からボルタンメトリーにより評価する。その相互作用に伴いカーボン表面上でのタンパク質膜が形成されるため、生体高分子-カーボン複合材料としての可能性も期待される。

生体分子間結合を評価するには蛍光プローブが優れたツールとなっており、表面プラズモン共鳴法やMALDI-TOF MS、原子間力顕微鏡なども広く使われてきている。一方、電気化学的センシングシステムはリアルタイムで生体分子間結合をモニタリングする可能性を有する。特に、細胞近傍の酸化還元応答を示す物質の濃度分布を測定できる電気化学顕微鏡が注目を浴びている。本研究の特長は、熱分解カーボン、人造黒鉛を生体高分子に加えた“導電性生体適合複合材料”を作製し電気化学的測定に適用することである。また、細菌培養の足場としての機能をもつ素材を生体分子センシングの支持体として用いることは、リアルタイムでの高感度・高選択的なセンシング法の開発につながる。チョップドファイバーを電極とすることも新規性が高く、安価でディスプレイ電極となる可能性が高い。また、反応活性なアミノ基を有したキトサンは材料のコーティングや複合材料として利用されている。それに対し、キチンは物理的・化学的性質が安定であるため、酵素や組織の固定化に適している。両素材を複合膜にするならば、化学修飾が容易で安定性の高い

有用な材料を作り出すことができる。すなわち、環境や人間にやさしい生体分子のセンシングの基板となる複合材料を合成するものである。さらに、得られる知見は“疾病診断用デバイスの開発”を推進し、生命科学を理解するための一助となると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ディスプレイなチョップドファイバーを電極とした生体分子のセンシング

耐酸性、導電性を有するチョップドファイバーは、熱可塑性樹脂の強化剤として使用されている。本研究では、その特性と形状を生かし、チョップドファイバーをプレート電極評価セルに取り付け、生体分子を検出するためのディスプレイな電極としての可能性を探る。その際には、ニコチンアミドアデニンヌクレオチドやアスコルビン酸などの生体分子の電極応答を測定し、それぞれウレタン、ポリアミド、ポリエポキシを収束剤としたファイバーの特性を評価する。さらに、生体適合性を向上させるためにコラーゲン溶液でコーティングしたファイバーを反応基板とし生体分子検出におけるその効果も考察する。実際には、6mm x 2mmのチョップドファイバーをガラスプレートとO-リングとで挟み、一端を作用電極として機能させ、もう一端を電気化学的測定の端子とする。この端子部分は、一般的な電気化学的測定用のワニ口クリップで接続ができるものである。このようなチョップドファイバーは、1ピースあたりのコストは数円であり、低コストの電極として期待される。

#### (2) コラーゲン-カーボン-コラーゲン膜被覆電極の特性に関する研究

細胞培養用透過性コラーゲン膜を基板としてガラスプレート上に取り付け、その表面に粒径の異なる熱分解カーボンや人造黒鉛を分散させ、さらに細胞培養用コラーゲン酸性溶液をキャストすることでサンドウィッチ構造の導電性コラーゲン膜を調製する。用いるカーボンとしては平均粒径が数から数十 $\mu\text{m}$ の導電性を示すカーボンを選択する。その際には、白金線やグラッシーカーボン棒を電気化学的測定の端子としてコラーゲン膜中に封入する。そして、各熱分解カーボン/コラーゲン膜あるいは人造黒鉛/コラーゲン膜を用いて、カテキンやカテコールアミンなどの電極応答を測定する。それらの電流値からカーボンの粒径や形状、導電性の影響を考慮することで電極として優れた導電性コラーゲン膜をデザインする。このように生体高分子材料の機能化をは

かることは、生体分子をモニタリングする反応場を構築する上で有用な知見となる。多方面からの検討：ガラスプレートを基板として得られる電極応答が不十分であるならば、基板をグラッシーカーボンプレートに変更し電流値の増大をはかる。

#### (3) キチン-キトサン膜表面の機能化に対する電気化学的評価

キチンに反応活性なアミノ基を有するキトサンを添加したキチン-キトサン膜を作製し、機能性分子を修飾する。そのモデルとして、ビオチン部位を複合膜に導入し、ビオチンに特異的に結合するアビジンを固定化することで複合膜に新しい機能をもたせる。アビジンの固定化の評価にあたっては、電極活性物質でラベル化したビオチン(LB)をプローブとして用いボルタンメトリーによりモニタリングする。アビジンを固定したビオチン修飾膜被覆電極を作製することができるならば、LBの電流値が減少するものと考えられる。複合膜の作製におけるキチン：キトサンの混合比やビオチン部位の修飾量などにも着目し、生体分子間結合をモニタリングするための反応場とする。このコンセプトは、抗原-抗体反応や糖鎖-レクチン間結合にも応用できるものである。

#### (4) 電子伝達媒体修飾キチン-キトサン膜被覆電極による生体分子のセンシング

低融点性タイプのアガロースにキチン・キトサン・カーボン粉末を添加した複合材料を作製して、その材料中で細菌を培養し生成物をボルタンメトリーにより測定することで足場としての可能性を評価する。モデルとして乳酸菌を選択して、代謝物である乳酸を乳酸脱水素酵素によりピルビン酸に変換する。弱酸性溶液ではキチン表面に乳酸脱水素酵素が静電的相互作用に基づいて固定化されると考えられる。また、酵素反応に必要なとされるニコチンアミドアデニンヌクレオチド(NAD)に関しては、アミノ基と結合するスベリン酸ジスクシンイミジルやエチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)のような架橋剤を用いキトサン表面に導入する。その反応下で還元されたNADHからNADの酸化電流を記録することで乳酸菌培養の過程をモニタリングするものである。また、グラッシーカーボンプレートを作用電極とし、電極応答を増加させるためにカーボン粉末を加えている。このように生体適合性の高い素材を組み合わせた複合材料をデザインし、バイオセンシングに応用するた

めの基礎的条件を確立するものである。

#### (5) 磁性ビーズを用いたタンパク質-糖タンパク質間結合の電気化学的アッセイ

コンカナバリンA (ConA) / 電極活性物質修飾磁性ビーズとオボアルブミン (OVA) 固定化磁性ビーズ間の結合をモニタリングするための電気化学的アッセイの開発を目指す。測定原理は、ConAが $\alpha$ -マンオース残基を認識するので、ConAに結合している電極活性部位がOVAによって被覆されることによって生じる電極活性物質の電極応答の減少を利用するものである。また、ConA/電極活性物質-OVA間結合がビーズの粒径に影響されることが予想されるので、サイズの異なるビーズをそれぞれ数種類ずつ調製する。そして、電気化学的測定によりConA/電極活性物質-ビーズとOVA-ビーズとの組み合わせにおける結合定数を求め、粒径の効果についての知見を得るものである。これらの結果は、細胞の粒径の推測に寄与するものであり、細胞表面上のタンパク質-糖タンパク質間結合の評価法として優れた手法となる。加えて、この結合はビーズ表面で起こるものであり、マトリックスから糖タンパク質を有する細胞を分離する目的にも使用できることが期待される。

#### (6) 有機金属錯体修飾カーボン電極を用いたリンタンパク質の電気化学的センシング

ガリウム(III)錯体は、リン酸化ペプチドと相互作用をもつものであり、ルテニウム(III)錯体はDNAのリン酸部位と結合することが知られている。ガリウム(III)錯体を修飾したカーボンプレートを作製するならば、上記の相互作用に基づいてリン酸化タンパク質のプレート表面への固定化が可能となる。本実験においてガリウム(III)の電極応答を得ることは難しいと考えられるのでルテニウム(III)錯体をマーカーとして用い、その電極応答の変化からリン酸化タンパク質のセンシングを行う。測定対象としては、カゼイン、ホスピチン、オボアルブミンなどを選び $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カゼインではリン酸基の数の効果についての評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 強化プラスチックから作られたチョップドカーボンファイバーを用い生体分子をボルタンメトリーにより検出する方法を開発した。一般にチョップドカーボンファイバーはサイジング剤で束ねられているため、電極として使用することは難しい。しかしながら、エタノールと塩酸でその表面を処理する

と、導電性を有するようになることを見いだした。そのファイバーの機能を評価するためにヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムの測定を行い、生体分子としてFAD、アスコルビン酸やNADHの酸化還元応答を記録した。エポキシ、ポリアミド、ポリウレタン樹脂をサイジング剤としたファイバーの中で、各々のピーク電流値はエポキシ樹脂被覆ファイバーで最も大きな値が得られた。その電極応答は市販のグラッシーカーボン電極と比較して電極応答および可逆性とも十分な性能を示した。

(2) 本研究では、生体分子間結合の足場として適した素材であるコラーゲン膜に生体親和性の高い導電性カーボン粉末をコーティングし、さらにコラーゲン溶液で被覆したサンドウィッチ型生体適合材料を作製した。ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムの測定では、コラーゲン膜でグラッシーカーボン電極を被覆すると未被覆の電極応答の70%に減少した。カーボン粉末/コラーゲン膜被覆電極での応答は、それに比較して150%となりカーボン粉末を介して電子伝達がなされることが明らかとなった。また、アスコルビン酸、NADの酸化応答も同様に増加する傾向が見られた。一方、カーボン粉末/コラーゲン膜での各ピーク電位は、未被覆電極で得られた電位に近づいており可逆性が改善された。このような生体適合材料は *in vivo* センサ構築のモチーフとなり、電気化学的分野での生体高分子材料の適用範囲を広げるものとなる。

(3) タンパク質-リガンド間結合を評価するために、細胞外マトリックの一つであるキチン-キトサン複合膜で被覆した電極を作製した。複合膜の主構成成分はキチンであるが、副成分のキトサンに架橋剤を介してリガンドを導入した。リガンドのモデルとして、ビオチン部位を導入し、ビオチンと特異的に結合するアビジンを固定化することで複合膜に新しい機能をもたせる試みを行った。アビジンの固定化の評価には、電極活性物質でラベル化したビオチン(LB)をプローブとして合成しボルタンメトリーにより測定した。アビジンが固定されたビオチン修飾膜被覆では、固定化に関与しなかったビオチンに対するアビジンの結合サイトにLBが取り込まれるためLBの電流値が減少した。従って、複合膜表面でアビジン-ビオチン間結合が起きていることが明確となった。本手法は種々のタンパク質-リガンド間結合をモニタリングする反応場となりうるものと考えられる。

(4) 低融点性タイプのアガロースにキチン・

キトサン・カーボン粉末を添加した複合材料を作製して、キチン表面に乳酸脱水素酵素を静電的相互作用に基づいて固定化した。乳酸菌の代謝物である乳酸を乳酸脱水素酵素によりピルビン酸に変換する際に、酵素反応に必要とされるニコチンアミドアデニンヌクレオチドを架橋剤によりキトサンに修飾し、その電極応答から乳酸菌培養過程をモニタリングする方法を開発した。さらに、カーボン粉末を加えることで感度の向上をはかり生体適合性の高い素材を組み合わせた複合材料をデザインし、バイオセンシングに応用するための基礎的条件の検討も行った。

(5) 磁性ビーズ表面上でのタンパク質-糖タンパク質間相互作用をモニタリングするために、コンカナバリンA(ConA)とオボアルブミン(OVA)間結合の電気化学的アッセイを開発した。電極活性なダウノマイシンでラベル化されたConAが架橋剤を介して6種類の磁性ビーズに固定された(直径: 1.0-8.9  $\mu\text{m}$ )、6種類のOVA-ビーズも同様な手法で作製された。ConAは $\alpha$ -マンノース残基をもつOVAを認識するので、ダウノマイシンが修飾されたConAの酸化ピークを使ってこの結合をモニタリングすることができた。ConA-OVA間結合がビーズ表面で起こると、そのピークはConAの電極活性部位の被覆によって減少した。直径が8.9  $\mu\text{m}$ のConA/ダウノマイシン修飾ビーズと2.5  $\mu\text{m}$ の直径のOVAビーズの組み合わせると、最も大きな電流値の変化が得られた。ConA-OVA間結合はビーズのサイズに依存するので、本手法によって細胞表面でのタンパク質-糖タンパク質間結合を測定できる。

(6) グラッシーカーボン電極にガリウム(III)-アセチルアセトン錯体を固定化し、オボアルブミンとの相互作用を測定した。オボアルブミンのリン酸基は、ガリウム(III)と選択的に結合するため電極表面に濃縮された。電気化学的マーカーのヘキサアンミンルテニウム(III)の応答はオボアルブミンの濃度に依存して減少した。本手法で $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カゼインの測定を行ったところ、それぞれのリン酸基の個数によって影響を受け電極応答が変化することが見出された。さらには、卵白中のオボアルブミンの迅速なセンシングが可能であり、リン酸化タンパク質の検出手法として優れた特性をもっている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ①Kuramitz, H.; Sazawa, K.; Nanayama, Y.; Hata, N.; Taguchi, S.; Sugawara, K.; Fukushima, M., Electrochemical Genotoxicity Assay Based on a SOS/*umu* Test Using Hydrodynamic Voltammetry in a Droplet, *Sensors*, 査読有, 2012, 12, 17414-17432.
- ②Sugawara, K.; Yugami, A.; Kadoya T.; Kuramitz, H.; Hosaka, K., Electrochemical assay of concanavalin A-ovalbumin binding on magnetic beads, *Analyst*, 査読有, 2012, 137, 3781-3786.
- ③Sugawara, K.; Yugami, A.; Kadoya, T., Voltammetric sensing of phosphoproteins using a gallium(III) acetylacetonate-modified carbon paste electrode, *Anal. Sci.*, 査読有, 2012, 28, 251-255.
- ④Kuramitz, H.; Mawatari, Y.; Ikeuchi, M.; Kutomi, O.; Hata, N.; Taguchi, S.; Sugawara, K., Multiplexed Assay for Proteins Based on Sequestration Electrochemistry Using the Protein Binding Electroactive Magnetic Microbeads, *Anal. Sci.*, 査読有, 2012, 28, 77-82.
- ⑤Sugawara, K.; Yugami, A.; Kadoya, T.; Hosaka, K., Electrochemically monitoring the binding of concanavalin A and ovalbumin, *Talanta*, 査読有, 2011, 85, 425-429.
- ⑥菅原一晴、由上麻子、キチン-キトサン膜で被覆された電極を用いるタンパク質-リガンド間結合の電気化学的評価、*分析化学*、査読有、2011、60、353-356.
- ⑦Kuramitz, H.; Miyagaki, S.; Ueno, E.; Hata, N.; Taguchi, S.; Sugawara, K., Binding assay for cholera toxin based on sequestration electrochemistry using lactose labeled with an electroactive compound, *Analyst*, 査読有, 2011, 136, 2327-2378.
- ⑧菅原一晴、竹部拓也、ELISAによるグルコース/グリコアルブミンアッセイ法の開発、*前橋工科大学研究紀要*、査読無、2011、14、93-96.
- ⑨Sugawara, K.; Yugami, A.; Kojima, A., Voltammetric Detection of Biological Molecules Using Chopped Carbon Fiber, *Anal. Sci.*, 査読有, 2010, 26, 1059-1063.

〔学会発表〕(計9件)

- ①今井健一郎、倉光英樹、波多宣子、田口茂、菅原一晴、マンノースとチオニンを修飾した金ナノ粒子被覆磁性マイクロ粒子を用いる大腸菌の電気化学アッセイの開発、日本化学会近畿支部 平成24年度研究発表会、2012.11.17、福井、福井大学文京キャンパス)
- ②馬渡暢子、倉光英樹、波多宣子、田口茂、菅原一晴、タンパク質認識能を有する電極活性磁性マイクロ粒子を用いた大腸菌アッセイの開発、日本分析化学会第61年会、2012.9.19、石川、金沢大学 角間キャンパス
- ③菅原一晴、門屋利彦、倉光英樹、由上麻子、田中俊逸、標識ペプチド-オボアルブミン間相互作用のボルタンメトリーの評価、日本分析化学会第61年会、2012.9.19、石川、金沢大学、角間キャンパス
- ④佐澤和人、倉光英樹、波多宣子、田口茂、菅原一晴、電気化学的変異原性試験法を用いた土壌燃焼物の変異原性評価、日本分析化学会第61年会、2012.9.19、石川、金沢大学、角間キャンパス
- ⑤菅原一晴、倉光英樹、由上麻子、糖質部位をもつ非イオン性界面活性剤を利用したレクチンの電気化学的センシング、第72回分析化学討論会、2012.5.20、鹿児島、鹿児島大学郡元キャンパス
- ⑥菅原一晴、由上麻子、倉光英樹、門屋利彦、ガリウム錯体修飾カーボンペースト電極を用いたリンタンパク質の電気化学的センシング、日本分析化学会第60年会、2011.9.15、名古屋、名古屋大学
- ⑦菅原一晴、由上麻子、倉光英樹、保坂公平、コンカナバリン A-オバルミン間結合の電気化学的モニタリング、日本分析化学会第59年会、2010.9.15、仙台、東北大学
- ⑧池内麻り愛、倉光英樹、菅原一晴、波多宣子、田口茂、分子認識能を導入した磁性マイクロ粒子を用いるタンパク質の電気化学的アッセイの開発、日本分析化学会第59年会、2010.9.15、仙台、東北大学
- ⑨菅原一晴、由上麻子、小島昭、炭素繊維チョップトファイバーを用いた電気化学的センサの試作、第71回分析化学討論会、2010.5.16、島根、島根大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅原 一晴(SUGAWARA KAZUHARU)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30271753

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：