

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-187449
(P2007-187449A)

(43) 公開日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 1	4 B O 2 9
GO 1 N 27/30 (2006.01)	GO 1 N 27/30 A	
GO 1 N 27/333 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 3 1 M	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 G	
C 1 2 M 1/40 (2006.01)	C 1 2 M 1/40 B	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2006-3229 (P2006-3229)
(22) 出願日 平成18年1月11日 (2006.1.11)

(71) 出願人 504180239
国立大学法人信州大学
長野県松本市旭三丁目1番1号
(72) 発明者 中村 俊夫
長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学理学部内
Fターム(参考) 4B029 AA07 AA21 BB16 CC11 FA12 GB09

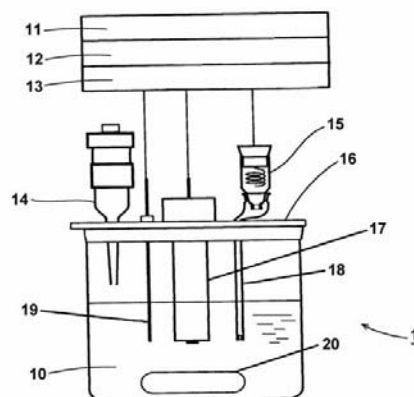
(54) 【発明の名称】 基質感応膜素材およびそれを用いた酵素センサー

(57) 【要約】

【課題】 溶媒中で酵素により反応する基質を検出し、また、当該酵素反応の進行に関わる酵素活性・酵素反応速度等の諸因子の特定を迅速・高感度かつ高精度に行なうことができ、再現性に優れており、簡便な構成の酵素センサーを作製するために使用される原材料となる基質感応膜素材を提供し、このセンサーを有効にするための電気化学測定系を提供する。

【解決手段】 基質感応膜素材は、カルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドの該カルボキシル基およびシクロデキストリンの水酸基でエステル結合している高分子化合物と、基質を反応させる酵素とが、含有されている。酵素センサー1は、この基質感応膜素材で電極基材上に膜状に形成されそこに前記酵素を固定しつつ該酵素と前記高分子化合物とを露出させている基質感応膜により、被覆されている作用電極17と、参照電極15とを有している。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドの該カルボキシル基およびシクロデキストリンの水酸基でエステル結合している高分子化合物と、基質を反応させる酵素とが、含有されていることを特徴とする基質感応膜素材。

【請求項 2】

前記シクロデキストリンが、 α -シクロデキストリンであることを特徴とする請求項 1 に記載の基質感応膜素材。

【請求項 3】

前記カルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドが、ポリ(メタ)アクリルアミドのアミド基の一部加水分解物、または(メタ)アクリルアミドと(メタ)アクリル酸との共重合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の基質感応膜素材。

【請求項 4】

前記酵素が、前記基質を酸化還元反応させるものであることを特徴とする請求項 1 に記載の基質感応膜素材。

【請求項 5】

前記酵素が、チロシナーゼであることを特徴とする請求項 4 に記載の基質感応膜素材。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の基質感応膜素材で電極基材上に膜状に形成され、そこに前記酵素を固定しつつ前記高分子化合物と共に露出させている基質感応膜により、被覆されている作用電極と、参照電極とを有していることを特徴とする酵素センサー。

【請求項 7】

前記基質と有機溶媒とを含む溶液に、前記作用電極と、前記参照電極とが、浸漬されていることを特徴とする請求項 6 に記載の酵素センサー。

【請求項 8】

前記有機溶媒が、非プロトン性溶媒であることを特徴とする請求項 7 に記載の酵素センサー。

【請求項 9】

前記基質が、カテコール、カテキン、ピロガロール、3,4-ジヒドロキシトルエンおよび/またはドーパミンであることを特徴とする請求項 6 に記載の酵素センサー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、溶液中の基質を酵素反応により検知する酵素センサーの原材料である基質感応膜素材に関するものである。

【背景技術】

【0002】

酵素センサーは、医療分野で患者の血糖値等の計測、食品製造分野での品質管理、環境保全分野での環境計測などの際に、様々な測定対象物質の量を検出するためのものである。

【0003】

酵素センサーは、酵素と測定対象物質である基質との特異的な高選択的反応による物理的または化学的变化を、電気信号、光、または熱に変換して検出するというものである。

【0004】

このような酵素センサーとして、例えば、特許文献 1 に、酵素への検体の供給部、酵素への酸素供給部、ポリアクリルアミドゲル状電解質含浸ポリカーボネートと電極との電荷伝達体および酵素を含んでおり、検体中の電極活性物量を酵素反応生成物によって生じる電流で検出する検出部を有するバイオセンサーが、開示されている。また、非特許文献 1 に、アセトニトリル中の基質のカテコールへ反応させる酵素のチロシナーゼを含む非可塑性ポリアクリルアミドメンブランでコーティングした白金ディスク電極が、開示されてい

10

20

30

40

50

る。

【0005】

親水性高分子のポリアクリルアミドが含有する酵素と、非水溶媒のみに溶解している基質との間で起こる酵素反応を検出する非水溶液系の酵素センサーは、水溶液系の酵素センサーに比べ応答速度が遅く、再現性に欠けるという問題があった。

【0006】

【特許文献1】特開2004-101222号公報

【非特許文献1】「アナリティカルサイエンスズ (Analytical Sciences)」、日本分析化学会、2001年9月、第17巻、p. 1055 - 1058

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は前記の課題を解決するためになされたもので、溶媒中で酵素により反応する基質を検出し、また、当該酵素反応の進行に関わる酵素活性・酵素反応速度等の諸因子の特定を迅速・高感度かつ高精度に行なうことができ、再現性に優れており、簡便な構成の酵素センサーを作製するために使用される原材料となる基質感応膜素材を提供し、またこのセンサーを有効にするための電気化学測定系を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記の目的を達成するためになされた特許請求の範囲の請求項1に記載の基質感応膜素材は、カルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドの該カルボキシル基およびシクロデキストリンの水酸基でエステル結合している高分子化合物と、基質を反応させる酵素とが、含有されていることを特徴とする。

20

【0009】

この素材は、酵素がこの高分子化合物によって固定化され、その酵素固定場で酵素反応を起こし易くする疎水性の反応場が構築されるという基質感応性膜の担体を、形成するものである。

【0010】

請求項2に記載の基質感応膜素材は、請求項1を限定するもので、前記シクロデキストリンが、 α -シクロデキストリンであることを特徴とする。

30

【0011】

請求項3に記載の基質感応膜素材は、請求項1を限定するもので、前記カルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドが、ポリ(メタ)アクリルアミドのアミド基の一部加水分解物、または(メタ)アクリルアミドと(メタ)アクリル酸との共重合体であることを特徴とする。

【0012】

請求項4に記載の基質感応膜素材は、請求項1を限定するもので、前記酵素が、前記基質を酸化還元反応させるものであることを特徴とする。

【0013】

請求項5に記載の基質感応膜素材は、請求項4を限定するもので、前記酵素が、チロシナーゼであることを特徴とする。

40

【0014】

請求項6に記載の酵素センサーは、請求項1に記載の基質感応膜素材で電極基材上に膜状に形成され、そこに前記酵素を固定しつつ前記高分子化合物と共に露出させている基質感応膜により、被覆されている作用電極と、参照電極とを有していることを特徴とする。

【0015】

この酵素センサーは、基質感応膜中の疎水性の酵素固定場で特異的な高選択的酵素反応を起こし易くし、その変化を電気信号により高感度で再現性よく検出するというものである。

【0016】

50

請求項 7 に記載の酵素センサーは、請求項 6 を限定するもので、前記基質と有機溶媒とを含む溶液に、前記作用電極と、前記参照電極とが、浸漬されていることを特徴とする。

【0017】

請求項 8 に記載の酵素センサーは、請求項 7 を限定するもので、該有機溶媒が、非プロトン性溶媒であることを特徴とする。非プロトン性溶媒は、例えばアセトニトリル、N, N - ジメチルアセトアミドである。

【0018】

請求項 9 に記載の酵素センサーは、請求項 6 を限定するもので、前記基質が、カテコール、カテキン、ピロガロール、3, 4 - ジヒドロキシトルエンおよび/またはドーパミンであることを特徴とする。

10

【発明の効果】

【0019】

基質感応膜素材は、酵素と、溶液中の基質とりわけ非水溶液にのみ溶解する基質との反応速度が迅速となるものである。この素材で被覆された電極を有する酵素センサーは、応答速度が迅速で、かつ高感度・高精度であり、再現性に優れるので、信頼性が高い。しかも簡便な構成であるので、製造効率が高い。

【実施例】

【0020】

以下、本発明の実施例を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

20

【0021】

基質感応膜素材は、以下のようにして調製される。

【0022】

まず、その原材料であるカルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドは、数平均分子量 20 万のポリアクリルアミドまたはポリメタクリルアミドを、部分的に加水分解することにより合成される。

【0023】

高分子化合物は、重量比で 20 ~ 1 : 10 ~ 1 のカルボキシル基含有ポリ(メタ)アクリルアミドと β -シクロデキストリンとを、エステル結合させることにより合成される。

【0024】

基質感応膜素材は、高分子化合物 20 ~ 50 重量部、および基質であるカテコールに酵素反応する酵素であるチロシナーゼ 1 ~ 2 重量部を、混練することにより得られる。

30

【0025】

この基質感応膜素材を用いた酵素センサー 1 は、実施例に対応する図 1 を参照して説明すると、以下の通りである。

【0026】

酵素センサー 1 は、反応容器を塞ぐポリテトラフルオロエチレン製栓 16 に作用電極 17 と参照電極 15 とが貫通したものである。容器に、カテコールのアセトニトリル溶液 10 が入っている。作用電極 17 と参照電極 15 との先端が、反応容器内へ到達し、この溶液 10 に浸漬されている。

40

【0027】

作用電極 17 は、図 2 に示すとおり、ポリテトラフルオロエチレン製管 23 の内空の下端に、白金製基板である 2 mm 径の白金棒 25 が絞り挿入されている。その基板 25 の最下端に、基質感応膜素材の塗布により形成された基質感応膜 26 が 0.1 ~ 0.2 mm の厚さで被覆されている。この膜 26 から、酵素と高分子化合物中のシクロデキストリンとが、露出し、溶液 10 に接触している。一方基板 25 の最上端で導線であるステンレスリード線 21 が銀含有ペースト 24 で接合されている。ポリテトラフルオロエチレン製管 23 の内空の上端に挿入されたシリコン製栓 22 から、このステンレスリード線 21 が引き出されている。

【0028】

50

参照電極 15 は、図 1 に示すとおり、導線に繋がる Ag / Ag^+ 参照電極であり、塩橋 18 を介して容器内で溶液 10 に接触している。

【0029】

作用電極 17 と参照電極 15 との導線は、検知機器に繋がっている。検知機器は、関数発生機 13・ポテンショスタット 12・X-Yレコーダー 11 に接続されている。

【0030】

基質を含有する非水溶液の少量を滴下するマイクロビュレット 14 がポリテトラフルオロエチレン製栓 16 を貫通し、その先端の滴下孔が、溶液 10 よりも上方にまで達している。また、電気化学測定セルを構成するための対極 19 としての白金線がポリテトラフルオロエチレン製栓 16 を貫通し、その先端が溶液 10 に浸漬されている。

10

【0031】

容器の底に、ポリテトラフルオロエチレンで磁石が被覆された攪拌子 20 が、設置されている。

【0032】

酵素センサー 1 の作用について、酵素反応機構を示す図 3 を参照して説明する。アセトニトリル溶液 10 中で拡散しているカテコールが、基質感応膜 26 から露出している酵素に接触する。すると、カテコールが酵素チロシナーゼ酸化の作用で酸化され *o*-キノンになって電極に拡散され、電極で還元される。この電極反応により電子が電気回路に流れる結果、検出機器で電圧と電流が検出される。カテコールの濃度に応じた電流が検出されるので、その量からカテコールの濃度を算出することができ、また、当該酵素反応の進行に

20

【0033】

アセトニトリル溶液のような非水溶液中のカテコールが、高感度で再現性よく検出されるメカニズムは、詳細が必ずしも明らかでないが、以下の通りであると推察される。基質感応膜にエステル結合した籠状の α -シクロデキストリン（高分子化合物の化学構造式の模式を示す図 4、 β -シクロデキストリンの化学構造式を示す図 5、 γ -シクロデキストリンの略立体構造を示す図 6 を参照）によって包接されている酵素に、カテコールが近接する結果、酵素反応を起こし易くする疎水性の反応場が形成され、チロシナーゼとの疎水的な酵素反応が迅速かつ確実に進行するためであると、考えられる。

【0034】

なお、基質がアセトニトリルに溶解したカテコールの例を示したが、基質が *N,N*-ジメチルアセトアミドに溶解したカテキン、ピロガロール、3,4-ジヒドロキシトルエン、ドーパミンのようなジヒドロキシ芳香族化合物であっても同様である。

30

【0035】

以下に、酵素センサーを試作した例、およびカテコールとチロシナーゼとの酵素反応をアンペロメトリーにより検討し、最大酵素反応速度とミカエリス定数とを特定した結果を示す。

【0036】

(実施例)

1. 高分子化合物の調製

カルボキシル基含有ポリアクリルアミド (Aldrich 社製: 製品番号 19093-4) 2g と、 α -シクロデキストリン (ナカライテスク株式会社製: 製品番号 10032-51) 0.1g とを、リパーゼを触媒として、*n*-ヘプタン中、50℃ で 94 時間反応してエステル結合させることにより、高分子化合物 2g を得た (図 4 参照)。なお、本反応は次の文献に依拠しておこなった。H.H.Pattekhan and S. Divakar, Indian J. Chem., Vol.41B, May 2002, pp.1025-1027.

40

【0037】

2. 基質感応膜素材の調製

この高分子化合物 0.1g と、チロシナーゼ (ナカライテスク株式会社製: 製品番号 208-11531) 0.001g とを、水に溶解することにより、基質感応膜素材を得た

50

。

【0038】

3. 作用電極の作製

基質感応膜素材を、直径2mmの白金ディスク基板に塗布し、窒素ガスで水を気化した後、シリカゲルデシケータ内で2時間乾燥することにより、厚さ約0.2mmの基質感応膜で被覆された白金ディスクを得た。これを用い、図2に示すような作用電極を作製した。

。

【0039】

4. 酵素センサーの試作

この作用電極と、実験ごとに作成したAg/Ag⁺(対銀・銀イオン)参照電極とを用い、図1に示すような測定セルを構成した。

10

【0040】

5. アセトニトリル中でのカテコールのアンペロメトリー

アセトニトリル中のカテコールの濃度を順次増して行き、酵素反応によって生成するカテコールの酸化物が、-0.75V(対銀・銀イオン参照電極)に設定された作用電極の白金表面で還元される際に生じる電流を記録した。その結果を図7に示す。なお図8に比較のため、デキストリンを含まない感応膜を用いた場合のアンペロメトリーの結果を示す。図7から明らかな通り、デキストリンを含有するセンサーがその効力を保持していることが証明された。

【0041】

20

6. カテコールのLineweaver-Burkの逆数プロット

得られた結果から、カテコール濃度の逆数と電流値の逆数との関係をグラフにする。その結果を図9に示す。得られた直線の縦軸との接点と、横軸との接点から、それぞれ酵素反応速度因子が得られる。図9から明らかな通り、酵素反応の速度因子を精度良く、簡便に得られることが証明された。

【産業上の利用可能性】

【0042】

本発明の基質感応性膜素材は、溶液、特に水不含有の溶液中の基質を検出するための酵素センサーの原材料に用いられる。これを用いた酵素センサーは、生体機能物質の酸化還元、電子移動、活性度、触媒能力等の評価に用いることができる高性能センサーであるから、新規な酵素反応系の研究開発、医薬品の研究開発に有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】本発明を適用する酵素センサーの実施の一例を示す概要図である。

【図2】本発明を適用する酵素センサー中の作用電極を示す側面断面図である。

【図3】本発明を適用する酵素センサーが動作する際の酵素反応機構の一例を示す図である。

【図4】本発明を適用する酵素センサーの基質感応膜素材である、カルボキシル基含有ポリアクリルアミドにシクロデキストリンをエステル結合させた高分子化合物の化学構造式の模式図である。

40

【図5】シクロデキストリンの化学構造式を示す図である。

【図6】シクロデキストリンの略立体構造を示す図である。

【図7】本発明を適用する酵素センサーを用い、アセトニトリル中のカテコールのアンペロメトリーを測定したときのチャートを示す図である。

【図8】本発明を適用する酵素センサーと同型で、基質感応膜素材にシクロデキストリンを含まない酵素センサーを用い、アセトニトリル中のカテコールのアンペロメトリーを測定したときのチャートを示す図である。

【図9】本発明を適用する酵素センサーを用いてカテコール濃度変化に伴う電流値変化を測定したときのカテコールのLineweaver-Burkの逆数プロットを示す図である。

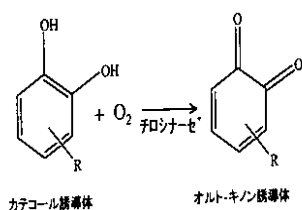
50

【符号の説明】

【0044】

1は酵素センサー、10は溶液、11はX-Yレコーダー、12はポテンシostat、13は関数発生機、14はマイクロビュレット、15は参照電極、16はポリテトラフルオロエチレン製栓、17は作用電極、18は塩橋、19は対極、20はポリテトラフルオロエチレン被覆攪拌子、21はステンレスリード線、22はシリコン製栓、23はポリテトラフルオロエチレン製管、24は銀ペースト、25は白金棒(2mm径)、26は基質感応膜である。

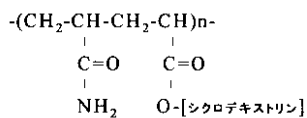
【図3】



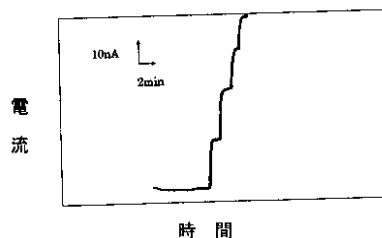
【図6】



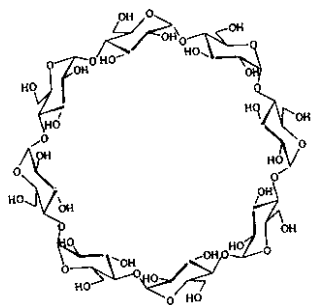
【図4】



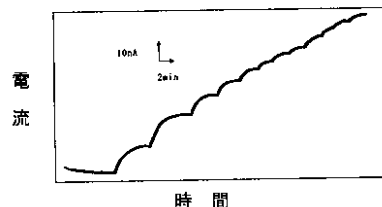
【図7】



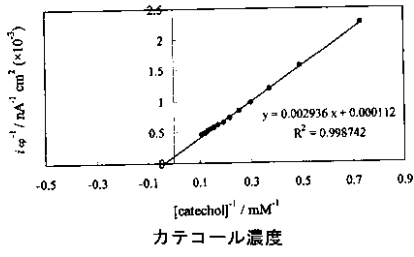
【図5】



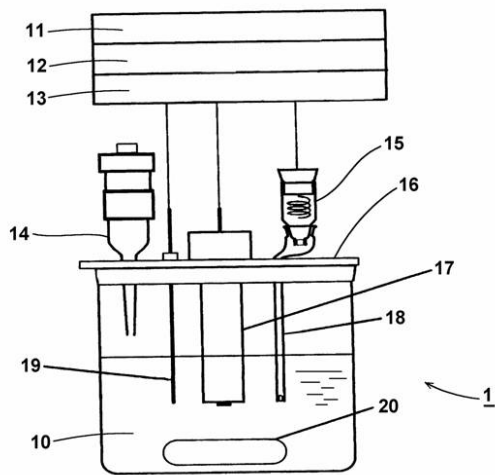
【図8】



【 図 9 】



【 図 1 】



【 図 2 】

