ノ ー ト

ポリエチレンイミン/ウリカーゼ交互累積膜の調製及び酵素活性

斉木 秀和*, 星 友典*, 安斉 順一®*

Preparation of multilayer films composed of poly(ethyleneimine) and uricase and their catalytic activities

Hidekazu SAIKI, Tomonori HOSHI and Jun-ichi ANZAI*

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578

(Received 28 June 2002, Accepted 8 October 2002)

Multilayer films composed of poly(ethyleneimine) (PEI) and uricase were prepared by an alternate deposition of PEI and uricase on the surface of a platinum (Pt) electrode for developing amperometric uric acid sensors. PEI and uricase were successfully built into a multilayer film, and the loading of uricase in the film was evaluated using a quartz-crystal microbalance. The Pt electrode coated with the PEI/uricase multilayer film functioned as an amperometric biosensor sensitive to uric acid. The output current of the sensor depended linearly on the number of PEI/uricase layers in the film.

Keywords : multilayer film; uricase; poly(ethyleneimine); amperometric sensor.

1 緒 言

バイオセンサーは、医療分析、環境分析、及び食品工業等多方面への利用を目的として、活発な研究開発が行われている。高性能バイオセンサーを開発する上で、タンパク質固定化技術は特に重要であり、これまでに多くの方法が提案されている。著者らを含めて、多くのグループが合成高分子とタンパク質との静電的相互作用や、タンパク質とリガンドとの特異的相互作用を利用して、ナノメートル程度の厚さを持つ酵素薄膜や抗体薄膜を、電極表面に被覆する方法を検討してきた^{1)~5)}。

ウリカーゼは尿酸をアラントインに変換する酵素で、その際に過酸化水素 (H_2O_2) が生成される。これまでに H_2O_2 の酸化電流を検出する型の尿酸センサーが報告されているが、 H_2O_2 を酸化する電位に設定された電極で尿酸も直接酸化されるので、妨害電流を与える⁶⁾。一方、著者らは、電極表面を高分子交互累積膜で被覆すると、尿酸存在下でも H_2O_2 を選択的に検出できることを報告している⁷⁾⁸⁾。更に電極表面にポリアリルアミン (PAA) とウリ

カーゼを用いて交互累積膜を作製すると、尿酸センサーが作製できることを報告した⁹⁾。しかし、PAA とウリカーゼの交互累積膜は、(1) 製膜時にウリカーゼが一部脱離するために、酵素膜中の正確な酵素含量を評価できない、及び (2) 酵素膜中の基質 (尿酸) 透過性が良好でなく、膜厚を増すと応答電流が抑制される、という欠点を有していることが明らかになった⁹⁾。そこで、本研究では陽イオン性高分子として PAA の代わりにポリエチレンイミン (PEI) を用いて、PEI/ウリカーゼ交互累積膜を作製し、膜中のウリカーゼ含量及び尿酸センサーとしての応答性を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

PAA (分子量; 約 10000, 30% 水溶液, 日東紡製), PEI (分子量; 60000~80000, 30% 水溶液), ポリビニル硫酸カリウム (PVS, 分子量; 242000, 以上, ナカライトスク製) 及びウリカーゼ (EC 1.7.3.3., 5.42 U/mg, 東洋紡製) は市販品をそのまま使用した。PAA, PEI 及び PVS の化学構造を Fig. 1 に示した。なお、PAA と PVS は直鎖状高分子であるが、PEI は一級アミン : 二級アミン : 三級アミ

* 東北大学大学院薬学研究科: 980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

Fig. 1 Chemical structures of polyelectrolytes used

$n = 1 : 2 : 1$ の割合で含有する分岐状高分子である。そのほかの試薬は、市販品の特級を用いた。

2.2 交互累積膜の作製と評価

水晶振動子マイクロバランス (QCM) による測定は QCA-917 (セイコー EG&G 製) にて、白金 (Pt) 電極で被覆された 9 MHz AT-カット水晶振動子を用いた。よく水洗した水晶振動子を 1.5 mg ml^{-1} PEI 水溶液 (8 g l^{-1} NaCl を含有する) に 15 分間浸して PEI を吸着させ、水洗後空气中でよく乾燥して振動数を測定した。次に、この振動子を 0.1 mg ml^{-1} ウリカーゼ溶液 (100 mM ホウ酸緩衝液, pH 8.5) に 15 分間浸して表面にウリカーゼを吸着させた。同様に水洗後、乾燥させた状態で振動数を測定した。この操作を繰り返すことにより、振動数変化の値から累積膜中の各層の PEI とウリカーゼの吸着量を求めた。

尿酸センサーとしての特性を評価するためには、既報⁹⁾に従ってあらかじめ PAA と PVS の交互累積膜 (各 2 層) を被覆した Pt ディスク電極 (直径 3 mm) の表面に PEI/ウリカーゼ累積膜を被覆した。なお、Pt 電極に累積膜を被覆する際には乾燥操作は行っていない。

ウリカーゼと PEI の交互累積膜の作製過程を模式的に Fig. 2 に示した。

2.3 電気化学測定

電気化学測定には、ポテンシオスタット・ガルバノスタット NPGF-2501A (日厚計測製) を用いた。参照電極には銀/塩化銀電極、対極には Pt 線を用いた。尿酸に対する電流応答を測定する際には、電極電位は 0.6 V に設定した。なお、すべての測定は約 20°C にて行った。

Fig. 2 A schematic illustration of a layer-by-layer deposition of PEI and uricase on a solid surface

Fig. 3 Typical QCM frequency changes for the formation of PEI-uricase multilayer film as a function of the number of layers

3 結果及び考察

PAA とウリカーゼの交互累積膜を作製すると、膜中でウリカーゼは触媒活性を保持していることを著者らは既に報告したが、交互累積膜作製時に PAA を吸着させる段階で、膜表面のウリカーゼの一部が PAA 溶液中に脱離するため、膜中の酵素含量を求めることができなかった⁹⁾。一方、PEI とウリカーゼの交互累積膜では、酵素が脱離する現象は観察されず、QCM を用いた測定から膜中の各層の酵素含量を求めることができた。

Fig. 3 に PEI とウリカーゼの交互累積膜を水晶振動子表面に作製したときの振動数変化の一例を示す。なお、図の横軸の層数で奇数は PEI の累積、偶数はウリカーゼの累積を示している。累積層数が増大するにつれて振動数が減少しており、累積操作ごとに PEI 又はウリカーゼが交互に累積固定化されていることが分かる。ウリカーゼの等電点は 4.6 と報告されている¹⁰⁾ので、実験条件下 (pH 8.5) ではウリカーゼは負電荷を有しており、主に PEI の正電荷との静電的相互作用によって交互累積膜が形成されたものと考えられる。一方、これとは対照的に、PAA を用いた場合には PAA 吸着時に振動数は増加した⁹⁾。PEI と PAA は共に pH 8.5 において高分子鎖の一部に正電荷を有する

ことは明らかであるが¹¹⁾, ウリカーゼとの交互累積膜を作製する際に, PEI が PAA と異なる挙動を示す理由は現時点では明らかではない. しかし, Fig. 1 に示したように, PAA は直鎖状高分子であるのに対して, 本研究で使用した PEI は分岐高分子であることを考慮すると, 両者は累積膜中での高分子鎖の充填状態がかなり異なるために, ウリカーゼとの累積膜を作製する際に異なる挙動を示すのではないかと推定される.

Fig. 3 のデータから, 累積膜中の PEI 及びウリカーゼの含量を算出した. 実験に使用した QCM では, 水晶振動子表面に 1 ng の物質が吸着すると振動数が 0.91 Hz 減少する¹²⁾. Fig. 3 の振動数変化は, 累積層数に対して完全な直線とはいえないので, 1~10 層と 11 層以降の二つの領域に分けて, それぞれの平均の振動数変化を算出した. 1~10 層では, 1 回の積層当たり PEI は ~ 72 Hz, 及びウリカーゼは ~ 82 Hz の振動数変化が観察された. 11 層以降の振動数変化は, PEI が ~ 120 Hz, 及びウリカーゼは ~ 140 Hz であった. これらの値からウリカーゼの表面密度を計算すると, 1~10 層では 1.7×10^{-12} mol cm $^{-2}$, 及び 11 層以降は 3.3×10^{-12} mol cm $^{-2}$ となった. ウリカーゼの分子サイズ (直径約 5.0 nm) から見積ると, 累積膜の各層におけるウリカーゼの表面被覆率は約 26% (1~10 層) 及び 49% (11 層以降) であった. 静電相互作用に基づく高分子交互累積膜を作製する際に, 基板との強い相互作用などのために, 最初の数層では吸着量が少ない傾向がこれまでも報告されている¹³⁾.

次に Pt 電極表面に PEI/ウリカーゼ交互累積膜を被覆して, 尿酸に対するウリカーゼの触媒活性を検討した. 被覆した PEI/ウリカーゼ膜層数を 2, 4, 6, 8 及び 10 とした 5 種の Pt 電極を作製した. これらの電極を穏やかにかくはんした緩衝液に浸し, 濃度が 0.1 mM になるように緩衝液中に尿酸を添加すると, 電流がすばやく増大し 3 秒程度で一定値に達した. この電流応答は, 式(1)に従い電極表面に固定化されたウリカーゼにより尿酸が酸化された際に生成した H₂O₂ が, Pt 電極により電解酸化されたことによる電流である. 尿酸添加時の電流変化の速さ (応答時間) は, 累積膜層数の多少にはほとんど依存しなかった. これは酵素膜中で尿酸や H₂O₂ が迅速に拡散していることを示唆している.

Fig. 4 に PEI/ウリカーゼ累積膜被覆電極の 0.1 mM 尿酸に対する応答電流値を累積膜層数に対してプロットした. 比較のため PAA を用いた場合のデータも示した. PAA を用いて累積膜を作製した場合には, 累積膜層数に

Fig. 4 The output current of the Pt electrodes coated with PAA-uricase (○) and PEI-uricase films (●) as a function of the number of layers

Sample: 0.1 mM uric acid in 0.1 M borate buffer (pH 7.4).

応じて電流値は増大するものの, 8 層及び 10 層では電流値は 6 層の累積膜とほぼ同程度であった. これに対して, PEI/ウリカーゼ累積膜では電流値自体は PAA を用いた累積膜よりやや低い値であったが, 6 層以降も電流値はほぼ直線的に増大した. これは両者の累積膜の尿酸に対する透過性の差異によるものと考えられる. PAA 累積膜は尿酸の透過性が十分ではないのに対して, PEI 累積膜中では尿酸が迅速に拡散しているものと推定される. これに関連して, PAA-PVS 交互累積膜は PEI-PVS 交互累積膜よりも尿酸の透過性が低いことが明らかになっている⁹⁾. Fig. 4 の結果では, PEI を用いた場合よりも PAA を用いたほうが応答電流値が高かった. 既に述べたように, PAA/ウリカーゼ累積膜中の酵素量は正確には評価できないが, 10 層の PEI/ウリカーゼ累積膜は, QCM 測定時の振動数変化が約 2000 Hz である (Fig. 3) のに対して, 10 層の PAA/ウリカーゼ累積膜では, 約 5000 Hz であった⁹⁾ことを考慮すると, ウリカーゼの固定化量が PAA 膜のほうが多いのではないかと推定される. なお, Fig. 4 のデータは 0.1 mM 尿酸に対する電流応答値であるが, 更に高濃度の尿酸に対しては, これらの電極で 4~5 µA 程度の高い応答電流が観察されるので, Pt 電極による H₂O₂ の電解酸化反応が律速になっている訳ではないことは明らかである.

Fig. 5 に PEI/ウリカーゼ累積膜の層数を 2, 4, 6, 8 及び 10 層としたときの, 電極の尿酸に対する検量線を示した. また, PAA-PVS 膜だけを被覆して酵素累積層を被覆していない電極の尿酸に対する応答性も合わせて示した. 応答電流は酵素累積層が増加するにつれて増大したが, 応答濃度範囲には大きな変化は観察されなかった. また,

Fig. 5 Typical calibration graphs of the Pt electrodes coated with PEI-uricase multilayer films

The number of PEI-uricase layers is shown on the graphs. The calibration graph for the electrode without PEI-uricase layer is shown by 0 (zero). Sample solutions were prepared in 0.1 M borate buffer (pH 7.4).

PAA-PVS 膜を被覆した電極が尿酸を直接酸化する際の電流はほとんど無視できることは Fig. 5 から明らかである。

4 結 論

ウリカーゼと陽イオン性合成高分子を用いて交互累積膜を作製する際に、PEI を用いて作製した膜は PAA の場合とはかなり異なる性質を示すことが明らかになった。PEI を用いると、製膜時にウリカーゼの脱離が見られず、膜中の酵素含量を求めることができた。また、PEI 累積膜を用いて作製したアンペロメトリック尿酸センサーの 0.1 mM 尿酸に対する応答電流値は、1～10 層まで累積膜の層数に応じて増大した。PAA を用いて作製した累積膜とは異

なり、PEI 累積膜中を尿酸が迅速に拡散していることが示唆された。

本研究で作製した PEI/ウリカーゼ累積膜は、尿酸センサーに利用するためには安定性などにまだ問題があり、更に性能を向上させる必要がある。しかし本研究から明らかのように、酵素を含有する交互累積膜を作製する際に使用する高分子電解質の化学構造の違いが、累積膜の性能に大きな影響を与えることもあるので、注意が必要である。

文 献

- 1) J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi: *Anal. Chem.*, **70**, 811 (1998).
- 2) J. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, M. Nishimura, T. Hoshi: *Langmuir*, **15**, 221 (1999).
- 3) T. Hoshi, H. Saiki, J. Anzai: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 1239.
- 4) Y. Lvov, Z. Lu, J. B. Schenkman, X. Zu, J. F. Rushling: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4073 (1998).
- 5) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J. M. Savnt: *Acc. Chem. Res.*, **29**, 529 (1996).
- 6) A. Markas, T. Gilmartin, J. P. Hart: *Analyst* (London), **119**, 933 (1994).
- 7) T. Hoshi, H. Saiki, S. Kuwazawa, Y. Kobayashi, J. Anzai: *Anal. Sci.*, **16**, 1009 (2000).
- 8) T. Hoshi, H. Saiki, S. Kuwazawa, C. Tsuchiya, Q. Chen, J. Anzai: *Anal. Chem.*, **73**, 5310 (2001).
- 9) 斎木秀和, 星 友典, 安斉順一: 第 34 回化学センサー研究発表会要旨集, p. 142 (2002).
- 10) H. Nishimura, K. Yoshida, Y. Yokota, A. Matsushita, Y. Inada: *J. Biochem.*, **91**, 41 (1982).
- 11) J. Hodak, R. Etchenique, E. J. Calvo: *Langmuir*, **13**, 2708 (1997).
- 12) G. Sauerbrey: *Z. Phys.*, **155**, 206 (1959).
- 13) F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong, Y. Okahata: *Langmuir*, **13**, 3422 (1997).