

新規な機能性電極の開発とバイオセンサーへの応用

高橋成周[†]

Development and Biosensor Applications of Novel Functional Electrodes

Shigehiro Takahashi[†]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University;
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.*

(Received June 27, 2016)

Phenylboronic acid (PBA) derivatives have been used as alternatives to enzymes in the development of sugar-sensitive systems because the optical and electrochemical properties of these derivatives are significantly modulated upon sugar binding. This article reviews the voltammetric properties of sugar sensors prepared using dithiobis (4-butyrylamino-*m*-phenylboronic acid) (DTBA-PBA)-modified electrodes and PBA-appended layer-by-layer film-modified electrodes. In addition, the redox properties of reduced graphene oxide (rGO)-modified glassy carbon electrodes (GCEs) are discussed. The surface of a gold electrode was modified with a monolayer of DTBA-PBA to prepare sugar-sensitive electrodes. The modified electrodes exhibited attenuated cyclic voltammograms for $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in the presence of sugars at neutral pH as a result of their binding to DTBA-PBA on the electrode. Useful calibration curves were obtained for determining 3–300 mM D-glucose and 0.3–30 mM D-fructose. Similarly, gold electrodes coated with multilayer films composed of PBA-modified poly(allylamine hydrochloride) and carboxymethylcellulose exhibited a sugar-dependent response at neutral pH. The dynamic range of these modified electrodes was 0.1–300 mM for D-glucose and D-fructose. The surface of GCE was modified with rGO to evaluate the electrochemical response of the modified GCE to hydrogen peroxide (H_2O_2). The rGO-modified electrodes exhibited significantly higher responses in the redox reactions of H_2O_2 compared with the response of an unmodified GCE.

Key words—biosensor; phenylboronic acid; graphene; electrochemistry

1. バイオセンサー

バイオセンサーは生体物質が持つ特異的な分子認識能を利用した化学センサーで、¹⁾ 分子認識素子と分子認識素子の反応を電流などの信号に変換するトランスデューサーから構成される (Fig. 1). 分子認識素子としては酵素、^{2,3)} 抗体、⁴⁾ 微生物⁵⁾ 及び DNA⁶⁾ などの生体物質が用いられており安定性、反応の再現性及び高い選択性が求められる。一方、トランスデューサーには電極、⁷⁾ 水晶振動子、⁸⁾ 表面プラズモン共鳴装置⁹⁾ 及び光ファイバー¹⁰⁾ など様々な装置が用いられている。

バイオセンサーは食品分野における製造工程の品

質管理、¹¹⁾ 環境分野の微量環境汚染物質の検出、¹²⁾ 医療分野での薬物モニタリングシステム¹³⁾ などの用途が検討されている。特に医療分野におけるこれまでの検査法は煩雑な測定操作や前処理が必要であり、また高価な試薬を使い捨てとするために検査料も高額となり患者への負担も問題となってきた。一方、バイオセンサーによる分析は従来の測定方法に比べ迅速な測定が可能であり、測定時間の短縮や測定コストの大幅な削減が期待できる。しかし、バイオセンサーはタンパク質などの生体分子を利用するため変性による失活などの問題があり、長期間使用することが難しい。さらに、センサーに固定化された酵素の触媒活性は日々低下するため、常にキャリブレーションが必要になる。これは、すべてのバイオセンサーに共通する本質的な欠点と言える。

本稿では、筆者が研究してきた電気化学的検出法を用いた高耐久性バイオセンサー、^{14–19)} 及び貴金属を利用しない炭素材料を用いた機能性電極のバイオ

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

現所属：[†]高崎健康福祉大学薬学部 (〒370-0033 群馬県高崎市中大類町 37-1)

e-mail: takahashi-shi@takasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 27 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

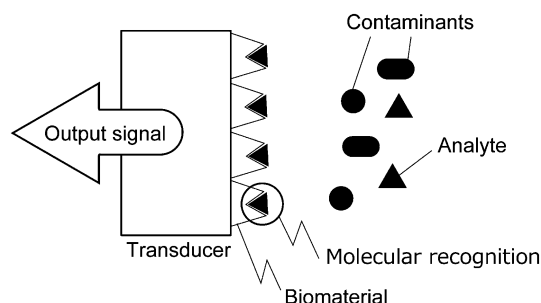


Fig. 1. Schematic Illustration of Biosensors

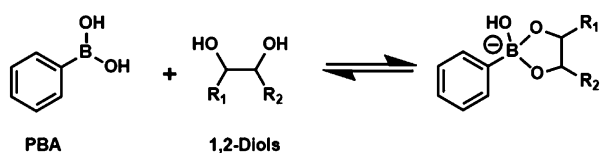


Fig. 2. Equilibrium between PBA and 1,2-Diols at Neutral pH

センサーの応用²⁰⁾ 等について紹介する。

2. フェニルボロン酸誘導体単分子膜修飾電極

酵素や抗体といった生体分子に替わる分子認識素子をデザインして化学合成することが試みられている。²¹⁾ 筆者が使用したフェニルボロン酸 (phenylboronic acid; PBA) も人工分子認識素子の 1 つであり、1,2-ジオールと結合するため化学センサーのグルコース認識素子として応用が期待されている。^{22,23)} PBA は中性条件で 1,2-ジオールと結合するとホウ素原子に水酸化物イオンが結合して負電荷を持つ (Fig. 2)。PBA を固定化した電極表面では糖の結合によって電極表面の電荷密度が変化し、負電荷を持つヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答が糖濃度に依存して抑制され糖の検出ができると考えられる。

筆者は、ジチオビス (4-ブチリルアミノ-*m*-フェニルボロン酸) (dithiobis 4-butyrylamino-*m*-phenylboronic acid; DTBA-PBA, Fig. 3) を合成して PBA 誘導体単分子膜修飾電極を作製した。^{14,15)} 金とチオール化合物は強固に結合して単分子膜を形成することが知られている。²⁴⁾ PBA 誘導体単分子膜修飾電極を用いて D-フルクトースの存在下及び非存在下におけるヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンのサイクリックボルタンメトリを検討した (Fig. 4)。D-フルクトース非存在下ではピーク間電位差 (ΔE) が 125 mV であったが、10 mM D-フルクトース存在

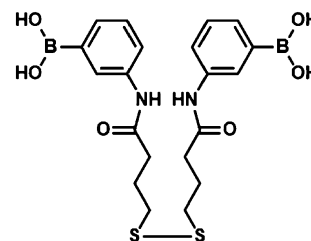


Fig. 3. Chemical Structure of DTBA-PBA

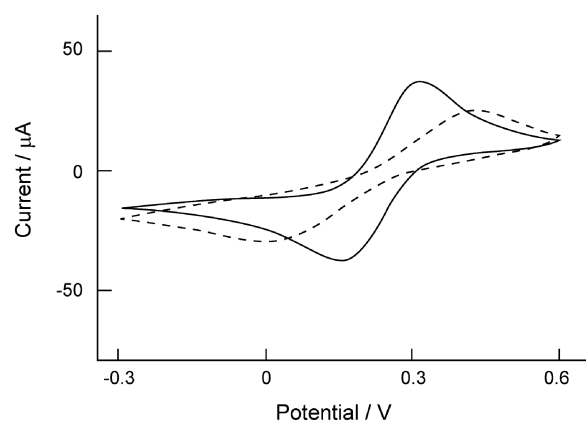


Fig. 4. Cyclic Voltammograms for $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ on the DTBA-PBA Monolayer-modified Electrode in the Absence of D-fructose (solid line) and in the Presence of 10 mM D-fructose (dashed line)

A 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.6) was used. The scan rate was 50 mV s^{-1} . Reprinted with permission from Ref. 15). Copyright 2006 American Chemical Society.

下で 425 mV となり、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電極応答が抑制された。これは、電極表面においても均一系と同様に、糖の結合によって水酸化物イオンが電極表面の PBA と結合したために負電荷を持ち、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答が抑制されたと推察される (Fig. 5)。また、作製した DTBA-PBA 単分子膜修飾電極を用いて、D-グルコース及び D-フルクトースの濃度変化とヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答の関係を調べた。Figure 6 は pH 7.6 における糖濃度とピーク電流値 (i_p) の関係を示している。D-グルコース及び D-フルクトースの濃度に依存し i_p が減少して、D-グルコースが 3–300 mM 及び D-フルクトースが 0.3–30 mM の濃度範囲で検出できることがわかった。D-フルクトースと比較して D-グルコースによるヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答変化が小さかったのは、D-グルコースと PBA の結合定数が D-フルクトースと比較して小さいためである。

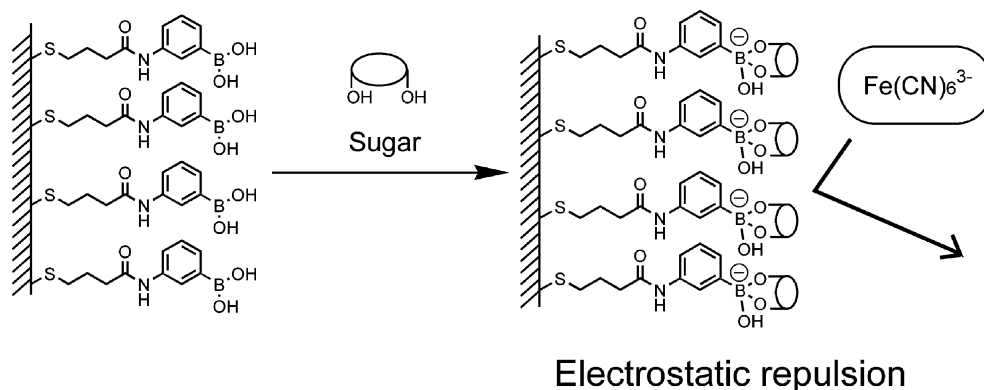


Fig. 5. Schematic Illustration of Detecting Sugar at Neutral pH Using a DTBA-PBA Monolayer-modified Electrode
Reprinted with permission from Ref. 15). Copyright 2006 American Chemical Society.

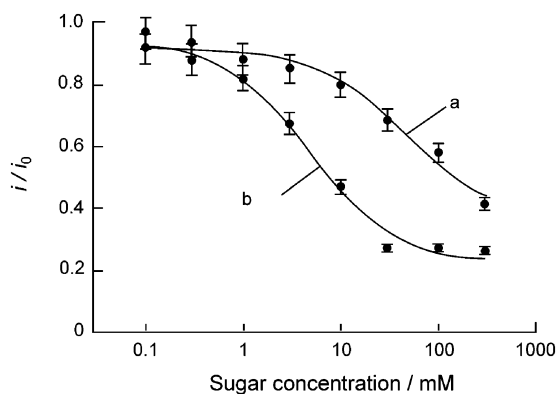


Fig. 6. Calibration Curves of the DTBA-PBA Monolayer-modified Electrode for D-glucose (a) and D-fructose (b)

The ratio i/i_0 shows the ratio of the peak current in the presence of sugar to that observed in the absence of sugar. A 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.6) was used. The scan rate was 50 mV s^{-1} . Reprinted with permission from Ref. 15). Copyright 2006 American Chemical Society.

DTBA-PBA 単分子膜修飾電極は乳酸¹⁷⁾ やヌクレオシド¹⁹⁾ に対しても応答することがわかった。これらは、乳酸の α -ヒドロキシ酸部位及びヌクレオシドのリボース残基が PBA とエステル結合を形成することによる。このように、DTBA-PBA 単分子膜修飾電極は糖などを検出できることがわかったが、測定時に試料中へヘキサシアノ鉄(III)酸イオンを添加する必要があるやや煩雑である。一方、フェロセンボロン酸のように電気化学活性なボロン酸誘導体を試料中に試薬として添加して糖などを検出することも広く検討されているが、^{25,26)} 電極への固定化には至っていない。今後、PBA と同時に電極活物質を電極表面へ固定化することができればバイオセンサーとしてさらに有用であろう。

3. フェニルボロン酸含有交互累積膜修飾電極

交互累積膜法は Decher によって開発された方法

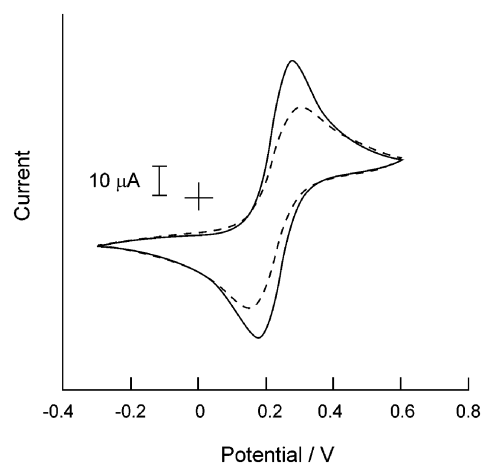


Fig. 7. Cyclic Voltammograms for 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ on the (PBA-PAH/CMC)₄/PBA-PAH Film-modified Electrode in the Absence of D-fructose (solid line) and in Presence of 30 mM D-fructose (dashed line)

The 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.0) was used. The scan rate was 50 mV s^{-1} . Reprinted with permission from Ref. 18). Copyright 2007 Japan Society for Analytical Chemistry.

で、カチオン及びアニオン性高分子電解質間の静電的相互作用を利用した薄膜作製法である。²⁷⁾ 交互累積膜法は、基板をカチオン及びアニオン性高分子電解質溶液に交互に浸すことによりナノメートルレベルの薄膜を作製できる。また、使用する材料には合成高分子、²⁸⁾ タンパク質、²⁹⁾ DNA³⁰⁾ 及びナノ粒子³¹⁾ など電荷を持つものならば容易に応用することが可能で、電気化学センサーの表面修飾、³²⁾ pH やイオンなどの刺激応答、³³⁾ ミクロカプセルの作製³⁴⁾ 及び薬物放出制御^{35,36)} などが検討されている。

筆者は PBA を含有する交互累積膜を電極表面に作製して、糖に対する応答性を調べた。ポリアリルアミン塩酸塩 [poly (allylamine hydrochloride) ;

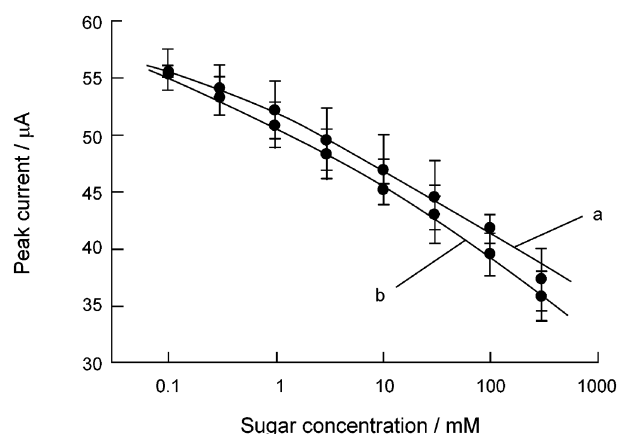


Fig. 8. Calibration Curves of the (PBA-PAH/CMC)₄/PAH-PBA Film-modified Electrode for D-glucose (a) and D-fructose (b)

A 10 mM phosphate buffer containing 100 mM KCl (pH 7.0) was used. The scan rate was 50 mV s⁻¹. Reprinted with permission from Ref. 18). Copyright 2007 Japan Society for Analytical Chemistry.

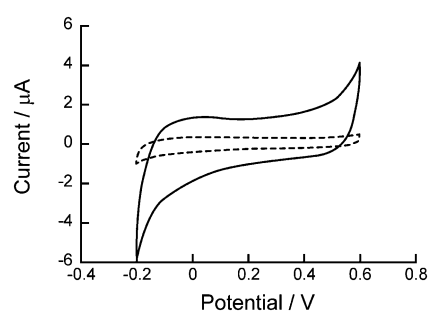


Fig. 9. Cyclic voltammograms for 3 mM H₂O₂ on the Unmodified GCE (dashed line) and rGO-modified GCE (solid line) in 0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4)

Scan rate was 0.1 V s⁻¹. Reprinted from Ref. 20). Copyright 2013 MDPI.

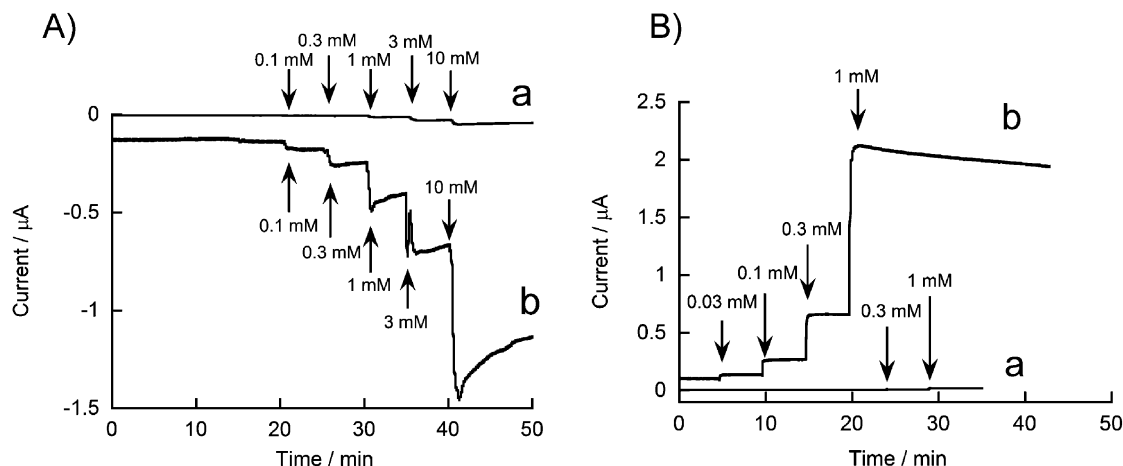


Fig. 10. Amperometric Responses of the Unmodified GCE (a) and rGO-modified GCE (b) to H₂O₂, Recorded at -0.1 V (A) and +0.6 V (B)

Reprinted from Ref. 20). Copyright 2013 MDPI.

PAH] に 4-カルボキシフェニルボロン酸を脱水縮合してフェニルボロン酸修飾ポリアリルアミン塩酸塩 (PBA-PAH) を合成した。合成した PBA-PAH と様々なポリアニオンを用いて PBA 含有交互累積膜を金電極上に作製した。本稿では、PBA-PAH とカルボキシメチルセルロース (CMC) を材料として作製した交互累積膜修飾電極を用いた糖の分析について紹介する。¹⁸⁾

PAH/CMC 交互累積膜は透過性が高いことが報告されており,^{37,38)} 交互累積膜表面及び内部の PBA と糖が結合することにより電極表面が負電荷を持ち、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの応答が糖濃

度依存的に変化すると考えられる。Figure 7 は、(PBA-PAH/CMC)₄/PBA-PAH 修飾金電極の D-フルクトース共存下及び非共存下のヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンのボルタモグラムを示している。糖が存在しないとき ΔE は 103 mV であったが、30 mM フルクトース存在下では 153 mV となり、糖の添加によってヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答の阻害が確認された。この結果から、PBA-PAH/CMC 交互累積膜修飾電極においても膜表面及び内部の PBA と糖が結合して負電荷を生じ、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答が抑制されることがわかった。Figure 8 は、

(PBA-PAH/CMC)₄/PBA-PAH 交互累積膜修飾電極の糖濃度とヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの i_p の関係を示している。糖濃度に依存してピーク電流値の減少が観察されて、D-グルコース及びD-フルクトースともに 0.1–300 mM 程度の範囲で測定できることが示された。PBA と D-グルコースの結合定数は D-フルクトースと比較すると極めて小さいため、PBA 単分子膜修飾電極では D-グルコースの選択性が得られなかったが、PBA-PAH/CMC 交互累積膜修飾電極を用いることにより D-グルコースへの選択性が改善された。

4. 還元グラフェンオキサイド修飾電極

電気化学的測定法を利用したバイオセンサーでは、電極素材として高価な貴金属が利用されることが多い。このため、安価なバイオセンサーの作製には高感度に電気信号を検出できる炭素素材を使用した電極の作製が重要である。³⁹⁾ 近年、注目されている炭素素材としてグラフェンが知られている。グラフェンは炭素が sp^2 結合で整列したハニカム格子状の物質で、表面積が大きく高い伝導性を示す。さらに、単純な構造で安価に作製できるため、バイオセンサーのトランスデューサーとして注目されている。⁴⁰⁾

グラフェンオキサイド (graphene oxide; GO) はグラファイトを酸化することにより作製できる。⁴¹⁾ しかし、GO にはエポキシ基やカルボキシル基が合成過程で導入されるため電気伝導性が低下するので、高い伝導性を得るためにはこれらの官能基を還元する必要がある。⁴²⁾ 筆者は、GO 懸濁液中で電位掃引を繰り返すことにより還元及び電極上への固定化を行って、還元グラフェンオキサイド (rGO) をグラッシーカーボン電極 (GCE) 上に作製した。様々な掃引回数で作製した rGO 修飾電極を用いてヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンの電気化学応答を CV で評価した。この結果、8 掃引以上でピーク間電位が広がるため 7 掃引のとき良質な rGO 修飾電極が作製できることがわかった。

作製した rGO 修飾電極を用いて過酸化水素 (H_2O_2) 応答を検討した。Figure 9 は未修飾の GCE 及び rGO 修飾電極を用いたときの 3 mM H_2O_2 溶液のボルタモグラムの示している。未修飾の GCE ではほとんど応答がみられなかったが、rGO 修飾電極では -0.2 V に還元電流及び $+0.6$ V に酸化電流がみ

られた。これは rGO を修飾することで過酸化水素の酸化及び還元が促進されたものと推察される。次に、未修飾電極及び rGO 修飾電極の -0.1 V 及び $+0.6$ V における H_2O_2 の応答を検討した (Fig. 10)。

CV の結果と同様に未修飾の GCE では応答がほとんど得られなかったが、rGO 修飾電極では H_2O_2 に依存して酸化電流及び還元電流が増加して、0.1 mM の H_2O_2 を検出できることがわかった。このように、rGO 修飾電極を用いることにより H_2O_2 に対して高感度の応答が得られた。 H_2O_2 を生成するグルコースオキシダーゼなどの酵素と rGO 修飾電極を組み合わせることにより高価な貴金属を使用しないバイオセンサーへの応用が期待できる。

5. まとめ

酵素を使用しないバイオセンサーは、高耐久性で安価に作製することができるため非常に有用である。また、rGO 修飾電極は貴金属の電極と比較すると安価に作製でき高感度の電気化学応答を得ることができる。これらの手法を組み合わせることにより酵素や貴金属を利用しない高耐久性バイオセンサーの作製が期待できる。

謝辞 本稿で紹介した研究はすべて東北大学大学院薬学研究科で行われました。これらの研究に関して御指導頂きました安斉順一教授に御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Das P., Das M., Chinnadayyla S. R., Singha I. M., Goswami P., *Biosens. Bioelectron.*, **79**, 386–397 (2016).
- 2) Chen X., Matsumoto N., Hu Y., Wilson G. S., *Anal. Chem.*, **74**, 368–372 (2002).
- 3) Matsumoto N., Chen X., Wilson G. S., *Anal. Chem.*, **74**, 362–367 (2002).
- 4) Makaraviciute A., Ramanaviciene A., *Biosens. Bioelectron.*, **50**, 460–471 (2013).
- 5) Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A., Wang J., Chen L., *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 433–437 (2001).
- 6) Lim S. A., Ahmed M. U., *Anal. Sci.*, **32**, 687–693 (2016).

- 7) Myler S., Collyer S. D., Bridge K. A., Higson S. P. J., *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 35–43 (2002).
- 8) Osyova A., Thakar D., Dejeu J., Bonnet H., Van der Heyden A., Dubacheva G. V., Richter R. P., Defrancq E., Spinelli N., Coche Guérente L., Labbé P., *Anal. Chem.*, **87**, 7566–7574 (2015).
- 9) Iwasaki Y., Horiuchi T., Niwa O., *Anal. Chem.*, **73**, 1595–1598 (2001).
- 10) Choi J. W., Kim Y. K., Lee I. H., Min J., Lee W. H., *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 937–943 (2001).
- 11) Mizutani F., Sawaguchi T., Sato Y., Yabuki S., Iijima S., *Anal. Chem.*, **73**, 5738–5742 (2001).
- 12) Gulla K. C., Gouda M. D., Thankur M. S., Karanth N. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1597**, 133–139 (2002).
- 13) Suzuki H., Arakawa H., Karube I., *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 725–733 (2001).
- 14) Takahashi S., Kashiwagi Y., Hoshi T., Anzai J., *Anal. Sci.*, **20**, 757–759 (2004).
- 15) Takahashi S., Anzai J., *Langmuir*, **21**, 5102–5107 (2005).
- 16) Takahashi S., Anzai J., *Sens. Lett.*, **3**, 244–247 (2005).
- 17) Ishizuka K., Takahashi S., Anzai J., *Electrochemistry*, **74**, 688–690 (2006).
- 18) Takahashi S., Anzai J., *Bunseki Kagaku*, **56**, 951–955 (2007).
- 19) Takahashi S., Kurosawa S., Anzai J., *Electroanalysis*, **20**, 816–818 (2008).
- 20) Takahashi S., Abiko N., Anzai J., *Materials*, **6**, 1840–1850 (2013).
- 21) Norrild J. C., Sørensen I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 303–311 (2002).
- 22) Camara J. N., Suri J. T., Cappuccio F. E., Wessling R. A., Singaram B., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 1139–1141 (2002).
- 23) Shoji E., Freund M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12486–12493 (2002).
- 24) Schreiber F., *Prog. Surf. Sci.*, **65**, 151–257 (2000).
- 25) Takahashi S., Abiko N., Haraguchi N., Fujita H., Seki E., Ono T., Yoshida K., Anzai J., *J. Environ. Sci.*, **23**, 1027–1032 (2011).
- 26) Takahashi S., Haraguchi N., Abiko N., Ono T., Yoshida K., Anzai J., *Sens. Lett.*, **9**, 1845–1848 (2011).
- 27) Decher G., *Science*, **277**, 1232–1237 (1997).
- 28) Shiratori S. S., Rubner M. F., *Macromolecules*, **33**, 4213–4219 (2000).
- 29) Takahashi S., Sato K., Anzai J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 1749–1758 (2012).
- 30) Trimaille T., Pichot C., Delair T., *Colloids Surf. A*, **221**, 39–48 (2003).
- 31) Mamedov A. A., Belov A., Giersig M., Mamedova N. N., Kotov N. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7738–7739 (2001).
- 32) Sato K., Takahashi S., Anzai J., *Anal. Sci.*, **28**, 929–938 (2012).
- 33) Hashide R., Yoshida K., Hasebe Y., Takahashi S., Sato K., Anzai J., *Colloids Surf. B*, **89**, 242–247 (2012).
- 34) Antipov A. A., Sukhorukov G. B., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **111**, 49–61 (2004).
- 35) Sato K., Yoshida K., Takahashi S., Anzai J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 809–821 (2011).
- 36) Takahashi S., Aikawa Y., Kudo T., Ono T., Kashiwagi Y., Anzai J., *Colloid Polym. Sci.*, **292**, 771–776 (2014).
- 37) Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G. D., Schaaf P., Voegel J. C., Lavalle P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12531–12535 (2002).
- 38) Hübsch E., Fleith G., Fattison J., Labbé P., Voegel J. C., Schaaf P., Ball V., *Langmuir*, **21**, 3664–3669 (2005).
- 39) Rivas G. A., Rubianes M. D., Rodriguez M. C., Ferreyra N. F., Luque G. L., Pedano M. L., Miscoria S. A., Parrado C., *Talanta*, **74**, 291–307 (2007).
- 40) Yang W., Ratinac K. R., Ringer S. P., Thorndarson P., Gooding J. J., Braet F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2114–2138 (2010).
- 41) Li D., Müller M. B., Gilje S., Kaner R. B., Wallace G. G., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 101–105 (2008).
- 42) Loh K. P., Bao Q., Eda G., Chhowalla M., *Nat. Chem.*, **2**, 1015–1024 (2010).