

フェニルボロン酸薄膜を用いる電気化学的および光学的糖センサー

Electrochemical and Optical Sugar Sensors Using Phenylboronic Acid Films

国立大学法人 東北大学 大学院薬学研究科 助 手 江川 祐哉
YUYA EGAWA (Assistant Professor)

大学院生 高橋 成周
SHIGEHIRO TAKAHASHI (Graduate Student)

教 授 安齊 順一
JUN-ICHI ANZAI (Professor)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

1. はじめに

糖類の検出は重要な課題であり、これまでに種々の糖センサーが開発されている。電気化学的な方法を用いるセンサーとしては、電極に酵素を固定化したセンサーが開発され、すでに製品が市販されて血糖や尿糖の検出に利用されている。しかし、酵素を用いるために製品の規格化が必ずしも容易ではないことや使用寿命が十分ではないことなど、さらに克服すべき問題点もある。

このような問題点を解決するひとつの方策は、合成物質を用いるセンサーを開発することであると考え、われわれはフェニルボロン酸の利用を検討している。以下に述べるように、フェニルボロン酸はジオール構造と強く結合するので、糖を結合することができる。このことを利用して、電極表面にフェニルボロン酸単分子膜を形成した電気化学センサーおよびフェニルボロン酸色素を交互累積膜とした光学センサーの開発を検討してきた。本稿では、これらの研究結果の一端を紹介する。

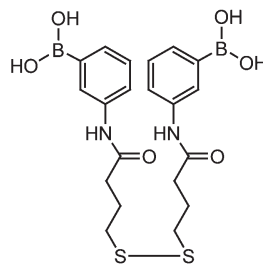
2. フェニルボロン酸単分子膜修飾電極の糖応答性

フェニルボロン酸誘導体は、これまで溶液中の糖検出試薬として使われてきた。また、フェニルボロン酸誘導体を電極や光学素子に固定化して劣化しない糖センサーの開発についても研究が行われている¹⁾。われわれは、金電極にフェニルボロン酸誘導体単分子膜を修飾して、電気化学糖センサーを作製した²⁾。

2-1 フェニルボロン酸単分子膜修飾電極の作製と評価

図1に、使用したフェニルボロン酸誘導体、ジチオビス-(4-アミノフェニルボロン酸) (DTBA-PBA)を示した。金電極は、アルミナ研磨後、5分間の超音波洗浄を2回行い、0.5 M硫酸中で0.2 ~ 1.5 V、掃引速度 100 mV/sで20分間連続掃引して清浄化した。その後、清浄化した金電極をテトラヒドロフラン:メタノール=9:1溶液にて調製した0.5 mg/mL DTBA-PBA溶液にて8時間浸してフェニルボロン酸単分子膜修飾電極を作製した。

作製した修飾電極の表面分子密度は 5.1×10^{-10} mM \cdot cm $^{-2}$ であることがわかり、DTBA-PBAがほぼ単分子膜を形成していることがわかった。



DTBA-PBA

図1 フェニルボロン酸誘導体(DTBA-PBA)の化学構造

2-2 フェニルボロン酸単分子膜修飾電極上でのフェリシアン酸イオンの電極応答

フェニルボロン酸は、塩基性でホウ素原子にOH $^{-}$ イオンが配位してアニオン型となることが知られている(図2)。そのため、溶液のpHに依存して電極表面の負電荷を持つアニオン型フェニルボロン酸密度が変化するので、負電荷を持つフェリシアン酸イオンの電極応答が変化する。

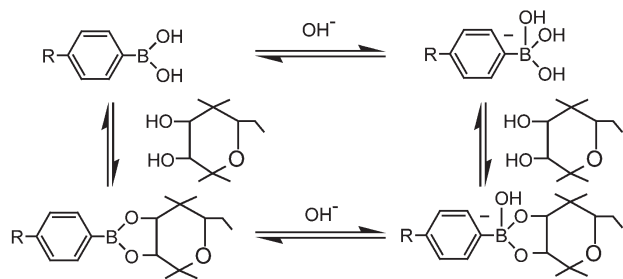
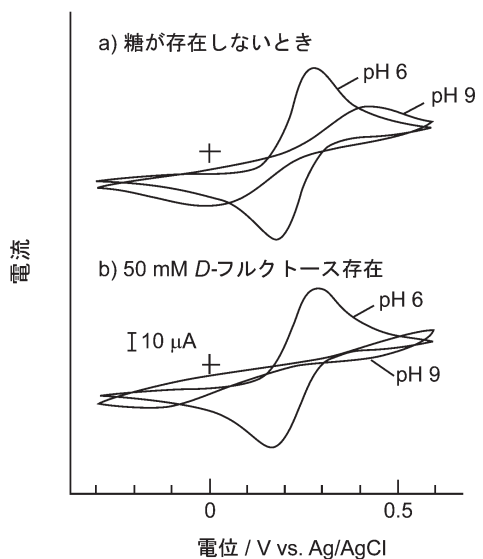
図2 フェニルボロン酸誘導体への糖およびOH⁻イオンの結合

図3に、DTBA-PBA単分子膜修飾電極を用いたときの、50 mM *D*-フルクトースが存在するときとしないときのpH 6および9におけるフェリシアン酸イオンのボルタモグラムを示した。*D*-フルクトースはフェニルボロン酸と強く結合することが知られている³⁾。図3aに示すように、*D*-フルクトース非存在時には、pH 6においてピーク間電位差がおよそ80 mVで、ほぼ可逆的なボルタモグラムが得られた。一方pH 9においては、応答が著しく減少してピーク間電位差がおよそ430 mVを示した。これは、pH 9では電極に修飾されたDTBA-PBAにOH⁻イオンが配位して電極表面が負電荷を持つため、フェリシアン酸イオンが静電的に反発して応答が阻害されたためである。同様の実験を50 mM *D*-フルクトース存在下で測定したところ、pH 6ではほぼ同様のボルタモグラムが得られたが、pH 9では*D*-フルクトース非存在時と比較すると、フェリシアン酸の応答が大きく阻害されることがわかった(図3b)。これは、フェニルボロン酸と*D*-フルクトースが結合することによって

図3 DTBA-PBA単分子膜修飾電極の応答性。
a) 糖が存在しないとき、b) 50 mM *D*-フルクトースが存在するとき

OH⁻イオンの配位が促進されて電極表面の負電荷密度が増加することによって、フェリシアン酸イオンの応答が著しく抑制されたためである(図4)。

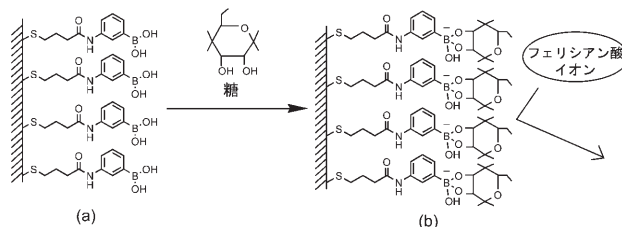


図4 DTBA-PBA単分子膜修飾電極(a)への糖の結合とフェリシアン酸イオンの電極応答の妨害(b)

2-3 フェニルボロン酸単分子膜修飾電極のフェリシアン酸イオンに対する応答へのpHと糖の影響

DTBA-PBA単分子膜修飾電極のフェリシアン酸イオンに対する応答電流(i_p)のpH依存性を調べた。その結果、*D*-フルクトースの有無にかかわらず酸性度が増すと i_p が増加することがわかった。また中性付近においては、50 mM *D*-フルクトース存在下において i_p の遷移曲線が酸性側にシフトすることが確認できた。一般にフェニルボロン酸は糖と結合すると pK_a が小さくなることが知られており、電極表面に固定化されたDTBA-PBAでも同様の現象が起こっていることがわかった。

電極に固定化されたフェニルボロン酸の見かけの pK_a は、負電荷を持ったフェニルボロン酸濃度を[B⁻]、電荷を持たないフェニルボロン酸濃度を[B]として酸塩基平衡を考慮すると(1)式と表すことができる。

$$pK_a = \text{pH} + \log\left(\frac{[B^-]}{[B]}\right) \quad (1)$$

また、各pHにおける i_p は、電極の単分子膜が負電荷を持った部分と中性の部分に覆われている状態での酸化還元反応の和と考えると(2)式で与えられる。

$$i = i_B [B]/([B]+[B^-]) + i_{B^-} [B^-]/([B]+[B^-]) \quad (2)$$

ここで i は、各pHにおいて記録された i_p であり、 i_B および i_{B^-} は単分子膜のフェニルボロン酸がすべて電的に中性のときおよび負電荷を持つときの i_p をそれぞれ表している。結果として、(1)式および(2)式から(3)式を得ることができる。

$$pK_a = pH + \log \left[\frac{(i_B - i)}{(i - i_{B^-})} \right] \quad (3)$$

実験結果を(3)式に基づいて解析することにより単分子膜の pK_a を決定した(表1)²⁾。

表1 DTBA-PBA単分子膜および溶液中での pK_a の比較

D-フルクトース/mM	単分子膜 ^{a)}	溶液 ^{b)}
0	8.0 ± 0.2	8.6 ± 0.1
50	7.1 ± 0.1	6.0 ± 0.1
100	6.4 ± 0.1	5.7 ± 0.1

a) サイクリックボルタンメトリーより決定。

b) メタノール:水(1:9)溶液中で紫外可視吸収スペクトルより決定。

2-4 フェニルボロン酸単分子膜修飾電極の糖応答性

図5に、DTBA-PBA単分子膜修飾電極を用いて0.1 M KClおよび5 mM フェリシアン酸カリウムを含有する緩衝液(pH 7.6)にD-フルクトースを添加したときの、ボルタモグラムを示した。D-フルクトースが存在していない時はほぼ可逆的なボルタモグラムが得られた。僅かに幅広いボルタモグラムが得られたのは、pH 7.6において単分子膜のフェニルボロン酸が部分的に負電荷を持っているため

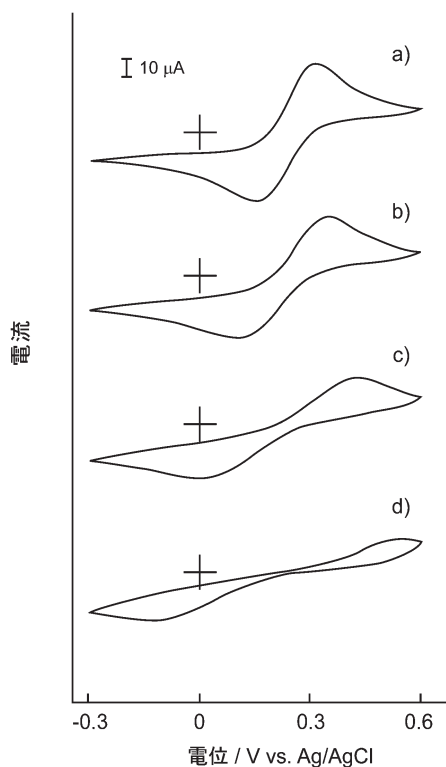


図5 D-フルクトース共存下におけるDT BA-PBA単分子膜修飾電極のフェリシアン酸イオンに対する応答(pH 7.6)。D-フルクトース: a) 0 mM, b) 1 mM, c) 10 mM, d) 100 mM。

と考えられる。一方、D-フルクトース存在下で測定したところ、D-フルクトース濃度依存的にボルタモグラムの形が変化して電極応答が抑制されることが確認できた。これは、pH 7.6においてD-フルクトースが電極表面のフェニルボロン酸と結合して応答を抑制するためである。

図6に、DTBA-PBA単分子膜修飾電極の i_p と試料中のD-フルクトースおよびD-グルコースの濃度の関係を示した。この結果から、D-フルクトースでは0.3~30 mM、D-グルコースでは3~300 mM程度の測定ができることがわかった。

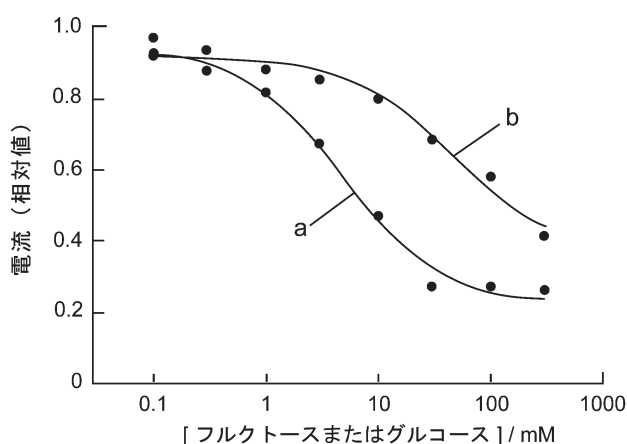


図6 D-フルクトースおよびD-グルコースに対する検量線(pH 7.6)。a) D-フルクトース, b) D-グルコース

3. フェニルボロン酸交互累積膜による光学的糖センサー

すでに述べたようにフェニルボロン酸誘導体は糖と結合するが、結合するだけでは糖センサーとして利用することはできない。糖認識素子として利用するには、フェニルボロン酸誘導体と糖が結合することによってなんらかのシグナル変化が引き起こされ、それを読み取る必要がある。このような研究が開始された当初、フェニルボロン酸誘導体による糖認識は円二色性スペクトル変化に基づくものであった。その後、蛍光を指標とするフェニルボロン酸誘導体についても優れた成果が得られている⁴⁾。しかし、われわれの最も身近で識別しやすい「色」を指標とするフェニルボロン酸の研究は、他の手法に比べて進展が遅れていた。その理由は色調の変化、すなわちシグナル変化が比較的小さいことによるものと推測される。しかし近年になり、優れた色調変化を示す化合物の合成が報告されている(図7、色素1)⁵⁾。これらの化合物を

用いることで目視での簡易的な糖検出が可能となった。われわれはこれら色調変化を示すフェニルボロン酸誘導体の更なる展開として、光学的糖センサーへの利用を試みた。センサーの開発では、検出素子を検出器表面へ固定化する工程が最も重要である。これは従来のバイオセンサー開発でも、酵素を電極表面に固定化したことが開発へのブレイクスルーとなったことからもうかがえる。われわれは光学検出器表面に色素1を固定化することを目的とし、交互累積膜法の利用を試みた⁶⁾。



図7 色素1とポリアリルアミンの化学構造

3-1 交互累積膜法

高分子電解質溶液に固体基板を浸すと、高分子が基板上へ自発的に吸着する。このとき、一種類の高分子電解質溶液に浸しただけでは高分子は単層吸着するのみである。しかし、二種類の高分子電解質溶液を用意し、交互に基板を浸すと高分子が何層にも積み上げられる。これが高分子電解質交互累積膜法と呼ばれる手法である。この手法は高分子機能を固体基板表面で増幅することが可能であるため、センサーの感度増幅などで利用価値が高い。一般的に累積膜の形成の駆動力となるのは静電的相互作用であるため、反対の電荷を持つ二種類の高分子電解質溶液が用いられる。また近年では、高分子同士だけでなく様々な材料で交互累積膜法が作製され、高分子と低分子の組み合わせでも交互累積膜の作製が可能と報告されている。このとき低分子は複数の電荷を持つことが必要であり、電荷の中和と逆転が低分子と高分子の間で起こる。この手法は低分子の機能をそのまま薄膜中に導入できる利点がある。先に述べた色素1はスルホン酸残基由来の二つの負電荷を持つ。そのため、正電荷を持つ高分子と組み合わせることで、交互累積膜法に適用できると考えられる。われわれは、色素1とポリアリルアミン(PAA)を用いて交互累積膜の作製を試みた(図7、8)。

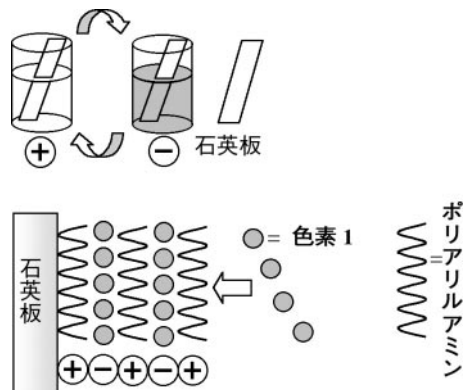


図8 交互累積膜作製方法と色素1含有薄膜の模式図

3-2 色素1含有薄膜の作製

固体基板として石英板を使用した。PAAとの親和性を考慮し、石英板はジクロロジメチルシランによる疎水化を行ってから使用した。PAA溶液(0.10 mg/mL PAA、150 mM NaCl水溶液)と色素1溶液(0.20 mM 色素1、150 mM NaCl水溶液)に疎水化石英板を交互に浸したときの石英板の紫外可視吸収スペクトルを図9に示す。積層操作数に依存して色素1由来の吸収が増加したことから、交互累積膜法により色素1含有薄膜を作製できることが確認された。

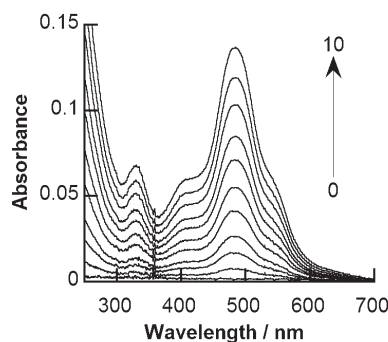


図9 交互累積膜修飾石英板の紫外可視吸収スペクトル、 $(\text{PAA}/\text{色素1})_n\text{PAA}$ ($n = 0-10$)、PAA積層後のスペクトルを表示

3-3 光学的糖センサーとしての評価

3-2で調製した $(\text{PAA}/\text{色素1})_{10}\text{PAA}$ (PAAを11回、色素1を10回積層したもの)について糖応答性を調査した。pH 7.0リン酸緩衝液中に色素1含有薄膜を浸し、ここに糖を添加した。図10はD-フルクトースを添加したときのスペクトル変化である。D-フルクトースの濃度が増えるに連れて、480 nm~600 nm付近の吸収スペクトルの増加が見られた。スペクトル変化は比較的小さいが、明確な濃度依存性も確認された。図11は460 nmと542 nmの吸光

度の比を糖濃度に対してプロットしたものである。血糖値の測定対象となるD-グルコースに対しても濃度依存的な応答が確認された。以上から色素1含有薄膜は糖濃度に応じて吸収スペクトルが変化し、光学的糖センサーに成りうる可能性が示された。

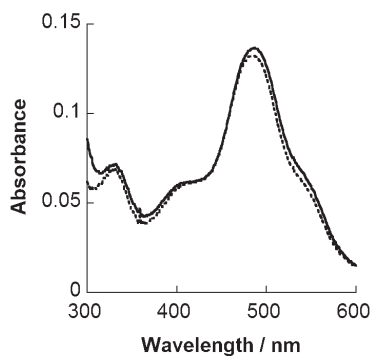


図10 (PAA/色素1)₁₀PAA修飾石英板の紫外可視吸収スペクトル, 破線:糖が存在しないとき, 実線:D-フルクトース 92 mM

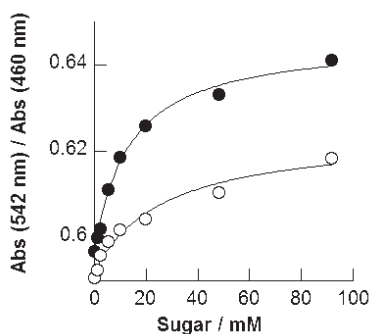


図11 吸光度比の糖濃度に対するプロット。●:D-フルクトース、○:D-グルコース

4. まとめ

以上のように、フェニルボロン酸誘導体を電極表面に単分子膜として被覆すると、糖を検出することのできる電気化学センサーとなることがわかった。また、フェニルボロン酸誘導体のアニオン性色素(色素1)を交互累積膜とすると色調変化を利用する糖センサーとして利用できることが明らかになった。しかし、糖に対する選択性や出力信号の感度など改善しなければならない課題は残っている。今後さらに高性能の糖センサーの開発が期待される。

参考文献

- 1) a) C. J. Davis, P. T. Lewis, M. E. McCarroll, M.W. Read, R. Cueto, R. M. Strongin, *Org. Lett.*, **1**, 331 (1999). b) S. Gao, W. Wang, B. Wang, *Bioorg. Chem.*, **29**, 308 (2001). c) T. Kimura, M. Kakeuchi, T. Nagasaki, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 559 (1995). d) M. Lee, T. Kim, K. Kim, J. Kim, M. Choi, H. Choi, K. Koh, *Anal. Biochem.*, **310**, 163 (2002).
- 2) a) S. Takahashi, Y. Kashiwagi, T. Hoshi, J. Anzai, *Anal. Sci.*, **20**, 757 (2004). b) S. Takahashi, J. Anzai, *Langmuir*, **21**, 5102 (2005).
- 3) a) G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **58**, 5291 (2002). b) J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, **60**, 11205 (2004).
- 4) S. Shinkai, M. Takeuchi, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1250 (2004).
- 5) N. DiCesare, JR. Lakowicz, *Org. Lett.*, **3**, 3891 (2001).
- 6) 江川祐哉, 安斉順一, 日本薬学会第126年会要旨集, P28 [R] pm-153 (2006).