

報 文

酵素・メディエーター積層修飾電極における
触媒定常電流の膜厚依存性石井 章夫¹, 辻村 清也^{®1}, 加納 健司¹

メディエーター型酵素修飾電極の設計では、酵素利用効率の向上、酵素固定化膜内電子移動、膜での基質の物質輸送などを念頭においた酵素修飾膜厚の制御が非常に重要な因子となっている。本研究では、酵素固定化膜の膜厚を操作回数で簡便に制御できる静電的相互作用を利用したレイヤーバイレイヤー法に注目し酵素電極を作製し、評価方法の検討を行った。アニオン性である κ -カラギーナンとカチオン性であるピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼとメディエーターであるオスミウム修飾ポリマーから成る酵素・メディエーター積層修飾電極を作製した。バイオエレクトロカタリシス反応の膜厚依存性を触媒定常電流により評価した。膜厚が増えるにつれて触媒定常電流値は増加し、やがて限界値に達した。この膜厚依存性挙動を、酵素反応速度パラメーター、メディエーター及び酵素濃度、メディエーター拡散係数などをパラメーターとする反応層理論に基づいた理論式で解析できることを実証した。

1 緒 言

酸化還元酵素は、酸化還元反応を促進させるが、電子供与体や電子受容体として電極を用いることも可能である。その結果、例えば、投入する試薬の量を軽減できる、得られる電流量によって反応の進行度を随時モニタリングできる、電位設定により反応時間を制御できる、電極上という反応場を規定できる、といった利点が生まれる。したがって、酵素反応と電極反応を共役させ、酵素を電極触媒として利用する酵素電極触媒（バイオエレクトロカタリシス）反応は、古くから関心を集めてきた。酵素機能を付加した電極を酵素機能電極と呼んでおり、本電極を用いることで本来電極活性が非常に低い糖、アルコール、アミンや脂質といった生体関連物質の電気化学反応を非常に穏和な条件下で実現できる。生体関連物質の電気化学的な検出（バイオセンサー）や生体関連物質のもつ化学エネルギーの電気エネルギーへの変換（バイオ電池）、物質変換（バイオリアクタ）等への展開がこれまで検討されてきた^{1)~3)}。

電極と酵素間の電子移動については、直接電子移動系と低分子電子伝達物質であるメディエーターを用いる系に分類される。しかし、直接電子移動が可能な酵素は現在のところ非常に限られており、メディエーター反応系は酵素の種類が限定されず汎用性が高い技術として基礎及び応用の両面から研究が進められてきた。また、酵素機能電極のセンサーやエネルギー変換装置への応用を目指したとき、多

く場合、酵素及びメディエーターを電極上に固定化する必要が生じてくる。メディエーターの固定化には、系からの溶出を防ぐために、ポリマーとともに固定する方法などがとられる。例えば、Heller らは酵素をオスミウム錯体が配位したレドックスポリマーと架橋剤で共有結合することで固定化する方法を考案し、比較的安定でかつ大きな触媒電流密度を得ることに成功している⁴⁾。本法をベースに酵素や電極を変えることで様々な酵素機能電極を作製することが可能である。そのほかにも酵素電極に適した酵素や電極の改善や改良が進められ、酵素機能電極は多様化し応用分野が広がっている⁵⁾。

しかし、これら酵素機能電極の作製は試行錯誤に頼るところが多く、最適化には多くの労力を要する。酵素電極反応に関する理論も幾つかの総説でまとめられているが⁶⁾⁷⁾、電極設計の方針についてまだまだ検討の余地を残している。特に、酵素修飾電極における酵素・メディエーター層の厚みは、酵素膜の構造と並んで、膜内の基質の物質輸送や電子移動、又は酵素利用効率などを反映する重要なファクターであるにもかかわらず、これまで十分に検討されてこなかった。その理由として、実験的に検証する手法が無かったことが挙げられる。

そこで、本研究では、膜厚を比較的容易かつ精密に制御できるレイヤーバイレイヤー（LBL）法に注目した^{8)~10)}。静電的相互作用を利用した LBL 法で調製した酵素電極を作製し、その触媒電流の膜厚の依存性について検討した。本実験では、カチオン性高分子として Os 錯体が配位したポリマーとピロロキノリンキノン（PQQ）依存性グルコ

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻: 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

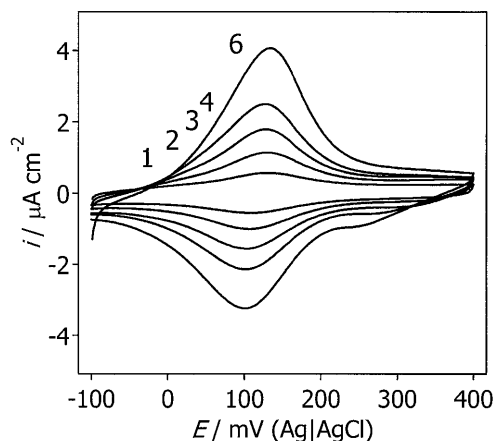


Fig. 1 CVs recorded using LBL-modified electrode with various film thickness in the absence of glucose

The numbers in the figure represents the number of layer. Scan rate was 20 mV s^{-1} .

ースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH, $pI=9.5^{11)}$ を用い、アニオン性高分子として κ -カラギーナンを用いた。グラッシーカーボン電極をそれぞれの水溶液に交互に一定時間浸すことで酵素とメディエーターを修飾した。この修飾電極で得られた触媒電流を、膜厚及び膜内のメディエーターの濃度プロファイルを考慮に入れた理論式で解析した。

2 実験

2.1 試薬

PQQ-GDH ("Amano"5, $4200 \text{ unit mg}^{-1}$) は天野エンザイムより購入したものを用いた。 κ -カラギーナンと D-グルコースは和光純薬製を、3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) はナカライテスク製のものを精製せずにそのまま使用した。また、本研究で用いた poly(*N*-vinylimidazole) に Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) $_2$ Cl を配位させた Os ポリマーは文献¹²⁾に記載の方法に従い合成した。*N*-ビニルイミダゾールモノマー単位に対して、Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) $_2$ Cl が 10 : 1 の割合となるように調製した。

2.2 LBL 法による酵素積層修飾電極の作成

グラッシーカーボン電極 (直径 3 mm, BAS 製) 上に酵素積層修飾膜を次のようにして作製した。グラッシーカーボン電極は直径 1, 0.5 及び $0.03 \mu\text{m}$ のアルミナ粒子により研磨し、水で洗浄後、蒸留水中で超音波処理を数秒間行った。ポテンシostat 制御下で Os 錯体を電気化学的に繰り返し酸化還元させることで、Os 錯体に配位している塩素イオンがポリマーのイミダゾール基と交換される。そのことによりポリマーの一部が架橋され、電極上に網状高分子膜が形成され固定化される¹³⁾。修飾された電極表

面は、全体として正電荷を帯びているので、その電極を冷蔵庫中 (4°C) で κ -カラギーナン水溶液 (2 mg cm^{-3}) に 10 分間浸し、静電的に κ -カラギーナンを吸着させた。次に電極表面を蒸留水で軽く洗浄し、同じく冷蔵庫中で PQQ-GDH 溶液 (1 mg cm^{-3}) に浸漬させた。10 分後引き上げ、表面を軽く蒸留水で洗浄したものを 1 層修飾電極とした。続いて、Os ポリマー (1 mg cm^{-3})、 κ -カラギーナン、PQQ-GDH の各水溶液に冷蔵庫中で 10 分間の浸漬、蒸留水による洗浄を繰り返すことで、層数を増やした。本稿では Os ポリマー、 κ -カラギーナン、PQQ-GDH の層を合わせて一層として表した。作製した電極はすぐに電気化学測定に用いた。

2.3 電気化学測定

ポテンシostat (BAS-50W, BAS 製) を用い、ウォータージャケット付きのガラスセルを用い測定温度を制御し電気化学測定 (サイクリックボルタンメトリー及びポテンシャルステップクロノアンペロメトリー) を行った。対極、参照極には、白金線 (直径 1 mm, 長さ 5 cm), Ag|AgCl|KCl(sat.) 電極を用いた。PQQ-GDH の活性を保つために 3 mM ($M = \text{mol dm}^{-3}$) の塩化カルシウムを含んだ pH 7 の MOPS 緩衝液 (30 mM) 中で測定を行った。電圧の掃引速度は 20 mV s^{-1} とし、グルコース酸化触媒電流は、測定液に D-グルコースの最終濃度が 200 mM となるように調製し測定した。なお、D-グルコース保存液 (2.0 M) は、1 晩放置し、平衡化したものを用いた。

3 結果及び考察

3.1 基質 (グルコース) 非存在下でのサイクリックボルタンメトリー

酵素修飾電極の膜厚を 1 層から 6 層まで増やしたときの、MOPS 緩衝液中で各層数ごとのサイクリックボルタンメトリーを行った結果を Fig. 1 に示す。ピーク電流値は層数に比例して増加した。ボルタモグラムの電流値を積分して得られた 1 層当たりの Os 錯体の固定化量は $1.5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であった。この値は、Os ポリマーと κ -カラギーナンのみで同様に作製した電極で評価した固定化量 ($2.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) よりも小さくなった。酵素の吸着により同じカチオン性の Os ポリマーの吸着が妨げられて、固定化量が減ったためであると考えられる。酸化波及び還元波のピーク電位の間電位は、Os ポリマーだけを固定化させた電極では 140 mV であったが、酵素及び κ -カラギーナンを修飾することで、負側にシフトし 115 mV となった。その電位は層数を増やしてもほとんど変わらなかった。この電位のシフトは、修飾することで膜内のイオン強度が上昇し、正電荷を持つオスミウム錯体同士の静電的な反発が弱まったからであると考えられる。

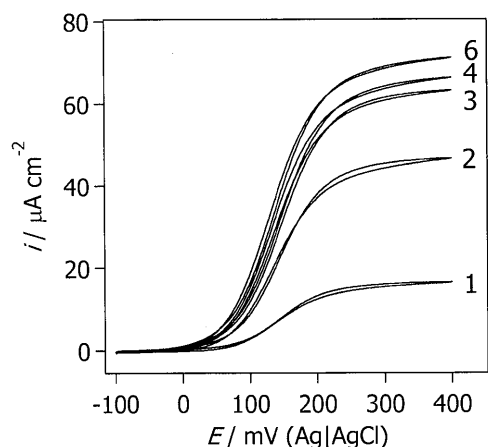
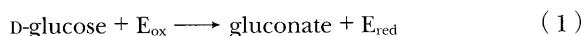


Fig. 2 CVs recorded using LBL-modified electrode with various film thickness in the presence of glucose (200 mM)

Scan rate was 20 mV s^{-1} .

3・2 グルコース存在下での触媒電流

次に、測定液にグルコースを添加した場合の層数の依存性について検討した。グルコース存在下では、典型的なシグモイド型の触媒電流が観察された (Fig. 2)。本酵素反応は式(1)及び(2)で表される "Ping Pong Bi-Bi" 機構に従って進行しているとし、議論を進める。



ここで、E, M はそれぞれ酵素、メディエーターを表す。

得られた触媒定常電流の層数依存性について検討する。1 から 3 層では層数に比例して増加したが、6 層以上ではほとんど触媒電流は増加しなかった。Fig. 2 のサイクリックボルタモグラム (CV) では基質の枯渇の影響は見られず、また、溶液中のグルコース濃度を上げて触媒電流は増加しないことから、膜内のグルコース濃度は酵素のグルコースに対するミカエリス定数 (1.9 mM^{14}) に対して十分高いと考えられる。

次に、酵素・メディエーター膜の層数に対して、得られた触媒定常電流値 (i_{lim}) をプロットしたものを Fig. 3 に示す。膜厚 (L) と i_{lim} の関係について、以下に述べる反応層理論に基づき解析した^{15)~18)}。今回のようにメディエーター濃度 (c_M) が酵素のメディエーターに対するミカエリス定数 (K_M) よりも十分に高い条件下においては、反応層の厚さ (μ) は $\mu = \sqrt{D_{\text{MCat}}/k_{\text{cat}}c_E}$ と表すことができる。 k_{cat} , c_E はそれぞれ、酵素のターンオーバー数、膜内の酵素濃度を表す。 D_M は酵素膜内でのメディエーターの物理的な拡散と電子のホッピングで決まる見掛け上の拡散係数

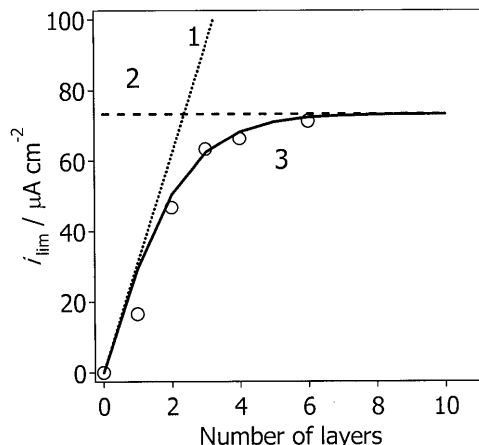


Fig. 3 The film thickness dependence of steady-state catalytic current density, where dot line 1, dash line 2 and solid curve 3 represent the regression curves based on Eqs. (3), (4), and (5), respectively, with the parameters given in the text

である。このとき i_{lim} と L との間には次のような関係式が成り立つ^{15)~18)}。

$$\begin{aligned} \frac{i_{\text{lim}}}{FA} &= \sqrt{4k_{\text{cat}}c_E D_{\text{MCat}}} \tanh\left(\frac{L}{\mu}\right) \\ &= \sqrt{4k_{\text{cat}}c_E D_{\text{MCat}}} \tanh\left(L \sqrt{\frac{k_{\text{cat}}c_E}{D_{\text{MCat}}}}\right) \end{aligned} \quad (3)$$

膜厚が非常に薄い ($L < \mu$) ときには、膜内のメディエーターの濃度分極が生じない。このときの i_{lim} は、

$$\frac{i_{\text{lim}}}{FA} = 2k_{\text{cat}}c_E L \quad (4)$$

と表され、 L に比例する。一方、 L が μ よりも十分に大きいとき、式(3)は次のように簡略化され、 i_{lim} は L には依存しない。

$$\frac{i_{\text{lim}}}{FA} = \sqrt{4D_M k_{\text{cat}}c_E c_M} \quad (5)$$

Fig. 3 のデータをこれら式(3)~(5)を用い解析した結果、1 層当たりの膜厚 (l)、 $k_{\text{cat}}c_E$ 、及び D_{MCat} はそれぞれ、 12 nm 、 $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-15} \text{ mol s}^{-1}$ と求められた。

膜内に固定化された酵素の反応速度定数を求めることは困難であるので、反応速度定数が溶液中と変わらず、また酵素とメディエーター間の電位差で決まると仮定し、今回用いた Os 錯体とほぼ電位が等しい Os 錯体 ([Os(4,4'-

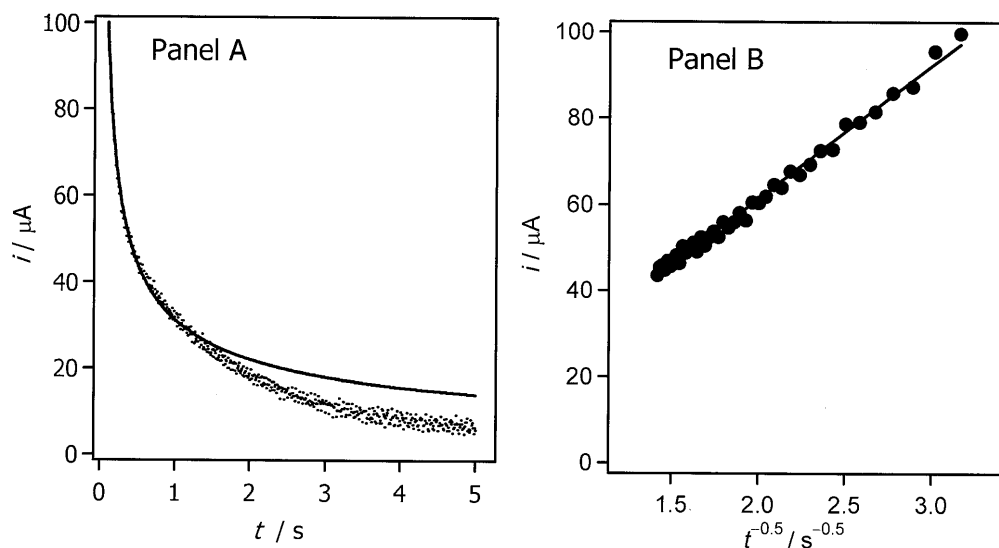


Fig. 4 A) Time dependence of the current response of the 6 layers-modified electrode in the 30 mM MOPS buffer. Dot and solid curves represent the experimental result and regression curve based on Eq. (6), respectively. Potential was stepped from 0 to 300 mV. B) Current from 0.1 to 0.5 s in panel A was plotted against $t^{-1/2}$. The solid line is the one calculated by Eq. (6) with the D_M values in the text

dimethyl-2,2'-bipyridine)₂(4methyl-imidazole)₂]^{2+/3+}, $E^{0'} = 140$ mV) との反応速度定数 (800 s^{-1})¹⁹⁾ とほぼ等しいと仮定した. 得られた $k_{\text{cat}}c_E$ 値から c_E は $3.3 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$ となる. したがって, 先に得られた I 値より, 1 層当たりの酵素固定化量は $4 \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$ と求められる. このことは, 酵素を直径およそ 10 nm の球体と見なしたときに, それぞれの層の断面のおよそ 10% を酵素が占めていることに相当する. サイクリックボルタンメトリーで得られたメディエーター固定化量と L により, c_M を $1.3 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$ と見積もることができる. したがって, D_M は $8 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ となる. Os ポリマー修飾電極で得られる D_M は測定条件や膜構造に大きく依存するが, $10^{-10} \sim 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ の値をとることが知られている²⁰⁾. このような低い見掛け上の拡散係数が得られた理由として, ポリアニオンとして κ -カラギーナンを含んでおり, 架橋法などに比べて濃度が低く電子移動しにくいこと, 含まれている酵素が膜内の Os 錯体の見掛け上の拡散を妨げていることなどが考えられる.

今回得られた拡散係数の妥当性を確かめるために, ポテンシャルステップクロノアンペロメトリーを行い, 次に示す Cottrell 式により拡散係数の算出を行った.

$$\frac{i}{FA} = c_M \sqrt{\frac{D_M}{\pi t}} \quad (6)$$

6 層まで修飾した電極を用い, 0 から 300 mV に電位をステップさせたポテンシャルステップクロノアンペロメ

リーの結果を Fig. 4 の panel A に示す. 溶液中に酸化還元物質が溶解し電流が拡散によって決められているときに得られる電流-時間曲線と似ているが, 本実験で得られた電流-時間曲線が式 (6) と完全に一致しなかった. このことは薄膜内での反応であるために有限拡散となっていることが要因であると考えられる. そこで電位をステップさせた 0.1 秒後から 0.5 秒後までの電解初期段階の電流-時間曲線を理論式にフィッティングさせて拡散係数を求めたところ (Fig. 4, panel B), $1.2 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ となり, 触媒電流より算出した値とほぼ一致した. 得られた拡散係数と式 (6) でフィッティングできた時間 {1.2 s (Fig. 4, panel A)} より, Nernst の拡散層のモデルから膜の厚さ ($L = \sqrt{\pi D_M t}$) を求めると, $L = 75 \text{ nm}$ と求められた. つまり 1 層当たりでは 12.5 nm となり, 先の実験結果とよく一致し, 解析方法の妥当性を示せた.

以上のように, 酵素・メディエーター積層修飾電極における酵素触媒電流の膜厚の依存性について, 反応層理論に基づいて解析できることを初めて実証した. また, その検証方法において, LBL 法によって作製した酵素膜は, 再現性や安定性の観点からも非常に優れていることが分かった.

4 結 言

触媒電流は, メディエーターのフラックス, つまり電極表面からのある厚み内での単位時間当たりのメディエーター濃度変化 ($\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) で決まる. その厚みというのが, 酵素メディエーターの存在する領域の厚みと反応層の

厚みの薄いほうである。したがって、膜厚が非常に薄いときでは、膜内のメディエーターの濃度分極は生まれず、膜厚を大きくすればするほど触媒電流は増える。膜厚が反応層よりも厚くなると、メディエーター濃度分極が生じ、電極表面の反応層内でしか反応は進行しない。しかも膜厚が大きくなりすぎると、膜内での基質の拡散抵抗が大きくなり、電極表面近傍での反応層へ十分量の基質を供給できずに、枯渇現象が観察される可能性がある。また、言い換えると、実際の反応は電極表面近傍の酵素しか反応にかかわらないので、膜の電極表面から遠いバルク側の酵素及びメディエーターは無駄となり、利用効率の低下につながる。

したがって、酵素反応速度パラメーター、メディエーター及び酵素濃度、メディエーター拡散係数など反応層の厚みについての情報が分かれば、物質輸送や酵素利用効率の上での最適な膜厚を設計することが可能となる。本研究で使用了静電的な相互作用を利用した修飾電極に限らず、本理論は幅広く適応できる。今後、本研究で得られた触媒電流と膜厚の関係の知見を基により高効率な酵素機能電極の設計、作製が期待される。

本研究の一部は、関西エネルギー・リサイクル科学技術振興財団の援助によるものである。ここに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) T. Ikeda, K. Kano: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 9 (2001).
- 2) S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov: *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
- 3) T. Ikeda, K. Kano: "Interfacial catalysis", Edited by A. G. Volkov, p. 461 (2002), (Marcel Dekker, New

- York).
- 4) B. A. Gregg, A. Heller: *J. Phys. Chem.*, **95**, 5976 (1991).
- 5) A. J. Bard, M. Stratmann, G. S. Wilson (Eds): "Bioelectrochemistry", (2002), (Wiley-VCH, Weinheim).
- 6) K. Kano, T. Ikeda: *Anal. Sci.*, **16**, 1013 (2000).
- 7) K. Kano, T. Ikeda: *Electrochemistry*, **71**, 86 (2003).
- 8) Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6117 (1995).
- 9) E. J. Calvo, R. Etcheique, L. Pietrasanta, A. Wolosuiuk, C. Danilowicz: *Anal. Chem.*, **1161**, 73 (2001).
- 10) 安齊順一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 585 (2001).
- 11) P. Dokter, J. Frank, J. A. Duine: *Biochem. J.*, **239**, 163, (1986).
- 12) T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller: *Anal. Chem.*, **65**, 3512 (1993).
- 13) Z. Gao, G. Benyamin, H.-H. Kim, S. C. Barton, Y. Zhang, A. Heller: *Angew. Chem. Int. ed.*, **41**, 810 (2002).
- 14) 天野エンザイム株式会社, 製品情報 < <http://www.amano-enzyme.co.jp/> >.
- 15) W. J. Albery, A. E. G. Cass, Z. X. Shu: *Biosens. Bioelectron.*, **5**, 367 (1990).
- 16) P. N. Bartlett, P. R. Birkin, E. N. K. Wallace: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **93**, 1951 (1997).
- 17) 辻村清也: *Rev. Polarogr.*, **52**, 81 (2006).
- 18) P. Delahay: "New Instrumental Methods in Electrochemistry, Reprint edn.", p. 87 (1980), (Krieger, Huntington, NY).
- 19) N. Okumura, T. Abo, S. Tsujimura, K. Kano: *Electrochemistry*, **74**, 639 (2006).
- 20) N. Oyama, T. Ohsaka: "Molecular Design of Electrode Surfaces", Edited by R. W. Murray, p. 333 (1992), (John Wiley & Sons, New York).

Dependence of Steady-State Catalytic Current on the
Thickness of an Enzyme-Mediator-Immobilized Layer Fabricated by
Layer-by-Layer Method

Akio ISHII¹, Seiya TSUJIMURA¹ and Kenji KANO¹

¹ Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawaoiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8502

(Received 14 November 2006, Accepted 27 December 2006)

The dependence of the bioelectrocatalytic current on the thickness of an enzyme-mediator modified layer thickness was investigated. The layer was fabricated by an electrostatic layer-by-layer assembly method. Positively charged enzyme (PQQ-dependant glucose dehydrogenase) and polymer-bounded mediator {Os complex-coordinated poly(*N*-vinylimidazole)} are successively entrapped on the electrode surface with negatively charged polymer (κ -carrageenan). The steady-state catalytic current value increased linearly with increasing the layer thickness, and reached the saturated value. The behavior was successfully interpreted based on the theory of the reaction layer with the enzymatic kinetic parameters, the concentrations of the enzyme and the mediator, and the diffusion coefficient of the mediator.

Keywords : bioelectrocatalysis; enzyme-modified electrode; reaction layer; biofuel cell; biosensor.