

## 審査の結果の要旨

氏名 サイピン タナッチャサイ

生体物質の高度な分子認識機能を利用し、測定が迅速・簡便であるバイオセンサーは、医療、食品工業、環境など様々な分野に応用できる。現在、高性能で安定性の高いセンサーの設計、生体材料とトランスデューサとの結合力改善、センサー応答を支配する因子の解明が求められている。本研究は、導電性ポリマー薄膜にレドックス酵素を包括したバイオセンサーの最適化を主眼に、応答を支配する重要因子となる固定化酵素の定量法を確立し、固定化酵素量と応答特性との相関解明を目的にしたもので、全五章から成る。

第1章は序論で、バイオセンサーの構成と機能、研究の歴史的背景と現状について概説し、本研究の目的を述べている。

第2章は、固定負電荷をもつ共重合ポリピロール薄膜を酵素包括マトリックスとした過酸化水素センサーに関する。一般に包括固定化法は、調製時の酵素失活は少ないものの、酵素-電極間の結合力が化学結合法や架橋法より弱いため、酵素の脱離による応答低下が欠点だった。電解重合法で、3-位にスルホン酸基を導入したピロール (PS) とピロール (Py) の共重合膜に酵素西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を SnO<sub>2</sub> 電極表面に包括固定化した HRP/Py-PS 電極を作製し、ポリピロール膜センサー (HRP/PPy 電極) と比較している。HRP/Py-PS 電極は、再現性にすぐれ、感度は HRP/PPy 電極と同程度ながら、応答のダイナミックレンジが拡大し、安定性が格段に向上した。Py-PS 共重合膜に導入した負電荷と酵素の正電荷との静電相互作用により固定化酵素量が増え、かつ固定化酵素の脱離が抑えられたと解釈し、過酸化水素センサー作製の最適条件を提案している。

第3章では、電極表面に固定化された酵素の定量法を検討している。ごく微量の酵素を定量する従来法には、放射性元素標識法、QCM, SPR を用いた方法、FAD ストリッピング法などがあるが、汎用性・簡便性に問題が多い。固定化酵素量を迅速かつ簡便に測定できる新しい定量法として、薄層電解セル内で電解重合を行ったのち、高感度なタンパク質定量法の一つである CBB 色素結合法を用いる分光吸収計測を行う手法を開発した。電極の有効面積 2 cm<sup>2</sup>, 電解溶液層の厚み 2 mm, 溶液量 400 μL の薄層セルを用いた場合、電解重合前後の酵素濃度変化を再現性よく計測できることを見出している。本法を HRP/Py-PS 電極および HRP/PPy 電極に適用した結果、

HRP/Py-PS 電極は HRP/PPy 電極より酵素の固定化密度が高いと判明し、膜マトリックスへの負電荷導入の有効性を確認している。

第 4 章では、前章で開発した固定化酵素定量法に基づき、HRP/Py-PS 電極の固定化酵素量と、作製条件および応答特性との相関を詳細に検討している。具体的には、電解重合時の電気量、電流密度、および電解重合溶液の pH が固定化酵素量と応答電流にどう影響するかを調べた。

①重合電気量の影響については、 $300 \text{ mC cm}^{-2}$ まで直線的に固定化酵素量が（膜厚に比例して）増加し、酵素分子が膜内にほぼ均一に固定化されることを示唆する結果を得た。応答電流は  $50 \text{ mC cm}^{-2}$ で頭打ちとなり、酵素反応速度律速（薄い膜）から基質の拡散律速（厚い膜）への遷移だと解釈している。

②電流密度の影響については、電流密度が小さい（電解重合速度が遅い）ほど酵素固定化量が大きいこと、約  $0.05 \text{ mA cm}^{-2}$ 以下では逆に固定化量が減少することを見出した。電流密度が小さいほど膜の均質性は上がり、包括酵素量も増えるが、重合速度が遅すぎると水溶性の PS が重合・不溶化の前に溶液バルクへ溶け出し、重合の電流効率が下がるためと解釈している。電流密度によるセンサー応答の変化は、固定化酵素量の変化とよく対応し、酵素固定化量がセンサー感度の重要な因子であると結論している。

③電解重合液の pH の影響については、pH が低いほど酵素固定化量が大きくなる傾向を見出し、HRP の等電点 (7.2) をもとに議論している。センサー応答も同様な pH 依存性を示すことより、上記と同様、応答を支配する重要な要因の一つが酵素固定化量であると解釈した。

こうした知見を総合し、酵素とポリマー膜との静電相互作用、および作成条件により制御可能な固定化酵素量が、導電性ポリマー薄膜を用いたバイオセンサーの応答特性に重要な影響を及ぼすことを明らかにし、センサー作製条件の最適化に資する指針を得ている。

第 5 章では以上の結果をまとめ、導電性ポリマー薄膜を用いたバイオセンサーに関する研究の今後の展望を述べている。

以上要するに本研究は、酵素を用いる電気化学バイオセンサーの実用化にとって有用な新規知見を得たものであり、生体機能化学、工業物理化学の発展に資するところが大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。