

Title	グルコースオキシダーゼに親和性を持つレドックス活性ペプチドの電気化学
Author(s)	伊藤, 元
Citation	
Issue Date	2001-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2751
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二, 材料科学研究科, 修士

グルコースオキシダーゼに親和性を持つレドックス活性ペプチドの電気化学

伊藤 元 (横山研究室)

【目的】

電気化学バイオセンサーにおけるメディエーターは種類や電子伝達能において課題は多い。そこで、分子認識能を有するレドックス活性ペプチドに着目した。酵素に対して特異的親和性を持つレドックス活性ペプチドを用いることで電子伝達能が向上するとともに、ペプチド配列を変化させることにより様々な酸化還元酵素への適応が期待できる。メディエーターそのものに分子認識能を付与した報告例はなく、新規のバイオ素子としての利用においても大変有効であると考えられる。一方、当研究室では近年人工抗体の作製や特異的結合能をもつペプチドのスクリーニングの手段として注目されているファージ提示系に注目し、GOx に対して部位特異的に結合するペプチドをスクリーニングしてきた。そこで本研究では、GOx を部位特異的に認識し結合するレドックス活性ペプチドをメディエーターとして、レドックス活性ペプチド-GOx 間の電気化学反応における基本特性の評価を目的とした。

【方法】

固相法によるレドックス活性ペプチドの合成 GOx の活性中心である FAD 近傍に位置する 7 残基の配列(52-58,GSYESDR)に対して、特異的親和性を示す 3 種のペプチド HPPMDFHKAMTR、APWSPSPHYLKD、QIPLMKGPYMY を、自動ペプチド合成機を用いて Fmoc 固相法により合成した。次に、合成したペプチドの N 末端、C 末端、ペプチド鎖中央部に配した Lys 残基の側鎖または α -アミノ基に対して、固相上で PyBOP を用いてフェロセンカルボン酸を修飾した。続いてトリフルオロ酢酸を用いて側鎖の脱保護およびクリーブを行った。合成後のフェロセン修飾レドックス活性ペプチドは HPLC により分離し、MALDI-TOF 質量分析装置を用いて m/z を確認した。

電気化学的キャラクタリゼーション 合成したレドックス活性ペプチドをメディエーターとして GOx-グルコース系におけるサイクリックボルタンメトリーを行った。レドックス活性ペプチド-GOx 間の擬一次反応速度定数に相当するものとして、酸化電位におけるカタリティックおよびノンカタリティックピークの比 I_k/I_d により電気化学的特性評価を行った。

【結果】

GOx に対し特異的親和性を示すレドックス活性ペプチドは特異的親和性のないコントロール配列のものに比べて高い I_k/I_d 値が得られ、速い電子伝達速度を示した(Fig. 1)。すなわち、分子認識能を有するレドックス活性ペプチドの利用は酵素-電極間の電子伝達に貢献するものであることが明らかになった。また、フェロセン修飾位置および修飾数を変化させた種々のレドックス活性ペプチドと GOx 間の電子伝達能の違いにより、ペプチドによる分子認識に対する知見が得られた。

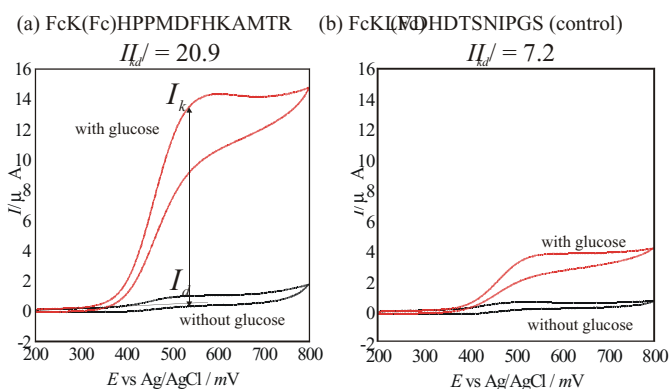


Fig.1 Catalytic electrochemistry of GOx with redox active peptide. Cyclic voltammograms were carried out in 0.1M phosphate buffer (pH7.0) containing 0.2 mM redox active peptide and 1.5 mg / ml GOx with and without 0.1 M glucose. Scan rate was 5 mV / s. (a) peptide with specific affinity, (b) control.

B19p6

Keyword : biosensor, mediator, phage display random peptide library, ferrocene.