

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14684

研究課題名(和文)酸化還元酵素のハイスループット電極触媒機能評価

研究課題名(英文)Electrochemical screening of redox enzymes

研究代表者

辻村 清也 (TSUJIMURA, Seiya)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30362429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：酵素電極反応に最適な細孔構造とモロフォロジーを有する酸化マグネシウム鑄型多孔質炭素を開発し、酸化還元酵素の電極触媒活性計測へ応用した。メソ孔は酵素担持量を増やし、個々の酵素電極活性を高め、マクロ孔は物質輸送効率を高める。多孔質炭素を修飾した電極は、酵素が少量であっても活性評価でき、酵素のスクリーニングへの応用が可能である。様々な電極触媒特性評価もできる。高性能・高耐久性酵素の開発のさらなる加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hierarchically structured carbons composed of mesoporous and macroporous were developed for enzyme electrode: the large surface area of mesoporous materials can increase the enzyme loading and electron transfer efficiency, and the macropores enable the efficient mass transport. The porous carbon electrode allows the development of highly efficient screening system of redox enzymes for the application of electrocatalyst.

研究分野：生物電気化学

キーワード：酸化還元酵素 酵素電極 多孔質炭素 スクリーニング 電極触媒 ハイドロゲル メソ孔 マクロ孔

## 1. 研究開始当初の背景

酵素の触媒機能と電極反応を組み合わせる“酵素電極反応”はバイオセンサやバイオ燃料電池などといったバイオエレクトロニクスデバイスへの応用が期待されている。申請者は反応の律速段階を理解し、酵素修飾方法、電極構造などを改善することにより、無機触媒をはるかに超える高い電流値を穏やかな条件で得ることができることを発表し注目を集めている (*J. Am. Chem. Soc.*, 136, 14432, 2014)。酵素電極のさらなる性能向上にむけて、高活性・高耐久性・高選択性を有する酸化還元酵素のスクリーニングを進めていく必要がある。

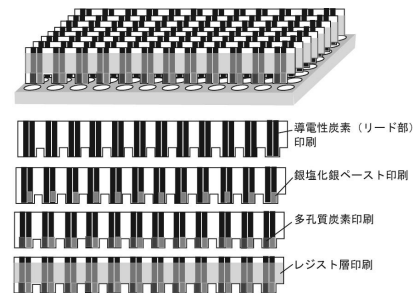
脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）のスクリーニングにおいて、酸化還元色素をインディケータとして使い、酸化還元反応に伴う色素の脱色（あるいは発色）反応を、吸光度あるいは蛍光度変化を計測することにより酵素の活性を計測し、有望な酵素を選別する。しかし、この方法はあくまで酵素と色素との反応により評価するものであり、見出された酵素が期待通りに電極上という特殊な環境下で電極触媒活性を実際に示すとも限らない。実際に酸化還元色素に対して不活性な酵素が電極とは非常に高い反応性を示す事例もある (*Chem. Lett.*, 36, 132 (2007), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431, 393 (2013), *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 20585 (2013) )。高効率スクリーニングを達成するには、電気化学応答計測に基づいた簡便かつハイスループットな酵素評価方法の確立が必要である。

一方で、申請者らは多孔質炭素を印刷した電極が、酵素担体および酵素反応場としてよく機能することを発見し、高い電気化学応答を得ることに成功している (*Chem. Commun.* 49, 11110 (2013) )。この技術を活用し、以下の「2. 目的」に述べる電気化学的酵素スクリーニング活性評価システムの構築に展開できるという着想に至った。タンパク質の工学的な開発技術の進展は目覚ましいが、酵素の評価方法の原理は変わっておらず改善の余地を残す。本研究課題にて新規“高電極活性酵素”のハイスループットスクリーニング方法を開発することで、今後の高活性・高耐久性酵素の開発が加速することが予想される。こうした新規酵素を活用することにより、バイオエレクトロニクスデバイスの新展開が期待される。

## 2. 研究の目的

酵素を含む電解液に多孔質炭素を含む電極を挿入し、電気化学計測を行い、酵素の電極触媒活性を評価するシステムを構築する。従来、用いられている平板電極では、実効表面積が小さく、界面での酵素との相互作用や酵素以外の分子の非特異的吸着の影響が大きく作用するため、一般に酵素自身による電

気化学シグナルを得ることは困難である。そこで直径 10-100 nm 程度の均一な細孔を有し、高い導電性を有する多孔質炭素を電極として用いる。多孔質炭素電極表面に酵素を吸着させて幾何面積当たりの酵素修飾量を高める（濃縮する）ことで、酵素希薄溶液でも十分なシグナルが得られる。さらに、96 穴型プレートでの評価を目標として、同時計測が可能となるような電極のアレイシステムおよび多チャンネル同時計測電気化学計測装置により、新規スクリーニング系を提案する。



## 3. 研究の方法

### 平成 27 年度 多孔質炭素の選択

酵素のサイズを考慮し、印刷したときに 10-100 nm の細孔直径を有するような多孔質炭素を選別する。研究当初の材料候補として、ケッチエンブラックや VulcanXC などの数十ナノメートルの一次粒子径を有するカーボンブラックや多層カーボンナノチューブを検討した。同時に、細孔サイズが制御された酸化マグネシウムを鋳型とする炭素についても検討した。10-150 nm の細孔直径を有するメソ孔炭素がいくつかの酵素の担体として優れた特性を示すことを見いだした。

### 3 電極式電極チップの作成（多孔質炭素の印刷）およびその評価

多孔質炭素のみでは電気伝導度が低いので、下地として導電性炭素インクを塗り、その上に多孔質炭素インクを塗った。多孔質炭素を有機溶媒（N-メチルピロリドン）、および炭素同士を結び付ける高分子（ポリフッ化ピリリデンなど）と混ぜインクした。対極として炭素、参照極として銀塩化銀電極を印刷した。

### 電気化学応答の確認

市販のポテンショスタットを用い、得られた電極が電気化学測定に用いることが可能かどうかをサイクリックボルタンメトリにより評価した。酵素の含まれない溶液での測定より、電気化学的に有効な比表面積を評価した。酵素および基質を加えることにより、触媒電流応答が観察されるかどうかを調べた。モデル酵素として、市販のフルクトースデヒドロゲナーゼ（東洋紡）、ピリルピノキシンダーゼ（天野エンザイム）を用いた。多孔質炭素はそのままでは疎水的であるので、

プラズマ処理や UV オゾン処理の他、酵素活性に影響を及ぼさない程度の微量の界面活性剤の添加による親水化処理を行った。

#### 酵素活性の評価

応答電流の酵素濃度の依存性を計測した。酵素濃度を 1, 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125  $\mu\text{M}$  と変えた溶液を準備し、電極を挿入し、一定電圧を印加することで、得られる触媒電流値により評価した。酵素が浸透しやすく、ノイズの小さくする電極構造を検討した。

#### 2 次スクリーニング、酵素機能評価（阻害剤・温度、pH の効果の評価法への応用）

酵素を修飾した電極アレイを用意し酵素特性を網羅的に評価した。基質選択性、濃度依存性や pH 依存性、共存イオンの効果、反応阻害剤の効果などの多項目評価をマイクロプレートで同時に計測した。ピリルピノキシダーゼにおける活性安定性に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

平成 27 年度

1) 多孔質炭素の構造設計：スクリーニングに最適な多孔質炭素材料として最終的に“酸化マグネシウム鑄型炭素”に注目した (Carbon 2016)。KB などのカーボンブラック材料にくらべ再現性よく電極を作製することができ、また目的とする酵素に応じて細孔サイズを調整することができる。メソ孔サイズが酵素サイズと同程度の場合は酵素の熱安定性の向上が観察され、細孔サイズが大きい場合は炭素粒子の内側のメソ孔まで利用できることで酵素担持量が増加し高い電流値が得られることがわかった。酵素のスクリーニングの観点では、細孔サイズが小さいほど電極浸漬時間が 1 時間以内で高い電流が得られた。

2) 多孔質炭素の表面設計：キノンや酸化還元色素 (ABTS) が酸化マグネシウム鑄型炭素の表面に安定に吸着すること、さらにメディエータとして機能することわかった。これにより、直接電子移動活性のない酵素にも本スクリーニング系が適用でき、スクリーニングの対象となる酵素のバリエーションが増した。(Electrochim. Acta, 2015)

3) スクリーニング：酸化還元酵素と酸化還元ポリマーからなる水凝胶修飾電極における最適化条件のスクリーニングに応用し、応答電流値に及ぼす電解質の影響を調べた。電流生成効率に影響する酵素とレドックスポリマー間の相互作用、酵素とメディエータ間の相互作用を電解質の濃度及び種類の依存性を調べることで判別できることがわかった。得られた知見をもとに、ポリマーや酵素表面改質の設計指針を得ることが

できた。(Electrochim. Acta, 2016)

4) 酵素を電極触媒として利用する場合、酵素-電極間電子移動メカニズムによって酸化還元メディエータを介した反応系(本研究ではレドックス水凝胶型修飾電極)と、それを用いない直接電子移動系に分類することができる。本研究では、いずれのタイプの酵素反応系にも適用できる適用範囲の広いスクリーニングシステムの構築を目指した。

本多孔質炭素修飾電極を用いた一つの例として、不活性状態で精製されてきた新規酵素(メタゲノム由来のラッカーゼ)の電気化学的活性化プロセスを検討することができた。酵素に電位を印加し、酵素を還元することで活性化されることを明らかにした (Chem. Lett., 2015)。

レドックス水凝胶電極に関しても、これまで限られた酵素でしか報告されていなかった水凝胶修飾多孔質炭素電極におちても、グルコースオキシダーゼを用いた電極で条件を最適化することで  $50 \text{ mA cm}^{-2}$  の大きな電流が得られた。(Bull. Chem. Soc. Jpn, 2016)。また、酵素電極の長期的な連続作動に向けた、性能向上に関わる因子の検討を同時に行うことができた (Chem. Lett., 2015)。電極構造のみならず、電解質が安定性向上に重要な役割を果たしていることがわかった。

5) 印刷電極のデザインおよび多孔質炭素インクの調整：多孔質炭素を印刷するためのインク調整方法や成分、条件の最適条件を見出した。また、メディエータを炭素インクに添加することで、均一かつ効率よく修飾することができ、印刷電極を調整した際にも、その活性は失わないことが分かった。さらに本一連の研究で得られた印刷電極技術を電池に応用した。(Chem. Lett 2017)

平成 28 年度

1) 多孔質炭素のさらなる改良：酵素が炭素の限られた空間しか利用できていないことが分かった。したがって本年度において、多孔質炭素微粒子の表面のみならず内部に形成された細孔も有効活用できる構造を有する多孔質炭素をデザインし、その機能評価を行った。具体的には物質輸送に適した 150 nm の細孔と酵素の担持に適した 40 nm の細孔を有する炭素材料を開発し、その炭素を修飾した電極における酵素電極活性を評価した。(Sci. Rep. 2017)

2) 印刷電極への多孔質炭素の修飾：1) の成果により、適切な細孔を有する多孔質炭素を塗布した電極を用いることで、酵素吸着量が短時間で増加し、大きな応答電流を得ることに成功した。

3) 電気化学的酵素のスクリーニング: 酵素液に電極を一定時間浸漬し, 酵素の電気化学活性をモニタリングすることで非常に薄い酵素液 (1/125  $\mu\text{M}$ ) においても十分な酵素活性を観測することができた. また酵素濃度の依存性を電気化学応答の強度により判別できた.

4) 酵素の電気化学活性プロファイルの調査 (イオン種の影響): このシステムを応用することにより, 酵素の電気化学的活性に及ぼす温度, 塩濃度, pH などの影響を調査することができた. 一例として, ビリルビンオキシダーゼは, ある塩を共存させることによりその熱耐性が向上することが明らかになった.

5) メディエータのスクリーニング: 本システムは直接電子移動型酵素電極反応のみならずメディエータ型反応にも応用できることが分かった. 非常に少ない酵素量で様々な酸化還元分子 (メディエータ) との反応性を調査することができた. 酵素・メディエータ溶液で触媒電流を観察することで酵素とメディエータ間の 2 分子反応速度定数を評価した. ターゲットなる FAD 依存性のグルコース脱水素酵素のメディエータについて様々なキノンや有機酸化還元色素を適用し, 反応速度に影響を及ぼす因子について検討した. (Int. J. Mol. Sci., 2017)

#### <まとめ>

本研究において, 電気化学法による酵素の電極触媒活性計測を新たに開発した. その開発の鍵を握るのは多孔質電極材料である. 想定される酵素量に対して高い比表面積 (メソ孔表面積) を有している多孔質炭素を電極材料に用いる. 酵素濃度が nM レベルであっても十分検出可能なレベルの応答電流が得られた. このことは電極のコンパクト化, 簡便な計測機器での検出が可能とする. 酵素電極反応は電極の表面組成よりも細孔構造 (= 酵素のサイズとの相対的な関係) と細孔のモロフォロジー (マクロ・メソ孔のバランス) が支配的に影響する. 新規多孔質炭素電極を開発し, 多様な酵素へ対応を可能にした. さらに 96 穴型マイクロプレートでのハイスループット計測を実現するために, 多孔質炭素電極アレイをプラスチック基板上にスクリーン印刷により作製した. 得られる電流応答は電極反応を直接反映しているので, 電気化学デバイスへの応用に直結する. また酵素量と触媒活性の情報を含んでいる電気化学応答を連続的にモニタリングすることで電極上の酵素の経時変化を観察することができる. また, 酵素反応の基質依存性, 活性の温度依存性や pH 依存性, 阻害剤添加による酵素活性の変化に関する様々な情報を電気化学計測では簡便に得ることができ, 特性評価が容易にで

きるようになった. 本電極アレイシステムの基礎的な知見をもとに, 高性能・高耐久性酵素の開発のさらなる加速が期待される.

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 14 件)

Bimolecular Rate Constants for FAD-dependent Glucose Dehydrogenase from *Aspergillus terreus* and Organic Electron Acceptors

Tsuruoka, N., Sadakane, T., Hayashi, R., Tsujimura, S.

Int. J. Mol. Sci., 18(3),604 (2017) (査読有)

Lowering the potential of electroenzymatic glucose oxidation on redox hydrogel-modified porous carbon electrode

Suzuki, A., Mano, N., Tsujimura, S.

Electrochim. Acta, 232, 581-585 (2017) (査読有)

Screen-printed, Paper-based, Array-type, Origami Biofuel Cell

Shitanda, I., Kato, S., Tsujimura, S., Hoshi, Y., Itagaki, M.,

Chem. Lett., 46, 726-728 (2017) (査読有)

Hierarchical meso/macro-porous carbon fabricated from dual MgO templates for direct electron transfer enzymatic electrodes

Funabashi, H., Takeuchi, S., Tsujimura, S.

Sci. Rep., 7, 45147 (2017) (査読有)

Redox-Polymers Enable Uninterrupted Day/Night Photo-Driven Electricity Generation in Biophotovoltaic Devices

Darus, L., Sadakane, T., Ledezma, P., Tsujimura, S., Osadebe, I., Leech, D., Gorton, L., Freguia, S.

J. Electrochem. Soc., 164(3), H3037-H3040 (2017). (査読有)

Templated mesoporous carbons: Synthesis and applications

Inagaki, M., Toyoda, M., Soneda, Y., Tsujimura, S., Morishita, T.,

Carbon, 107, 448-473 (2016). (査読有)

Hofmeister effects on the glucose oxidase hydrogel-modified electrode

Suzuki, A., Tsujimura, S.

Electrochim. Acta, 201, 228-232 (2016). (査読有)

Long-term continuous operation of FAD-dependent glucose dehydrogenase hydrogel-modified electrode at 37°C

Suzuki, A., Tsujimura, S.

Chem. Lett., 45(4) 484-486 (2016). (査読有)

Redox hydrogel of glucose oxidase on MgO-templated carbon electrode  
Suzuki, A., Murata, K., Mano, N., Tsujimura, S. Bull. Chem. Soc. Jpn., 89, 24-26 (2016). (査読有)

Electrochemical Oxygen Reduction Catalyzed by Bilirubin Oxidase with the Aid of 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) on a MgO-template Carbon Electrode  
Tsujimura, S., Murata, K. Electrochim. Acta, 180, 555-559 (2015). (査読有)

Electrochemical Activation of a Novel Laccase, MELAC, Isolated from Compost  
Murata, K., Shigemori, Y., Tsujimura, S. Chem. Lett., 44(5), 654-655 (2015). (査読有)

Effect of pore size of MgO-templated carbon on the direct electrochemistry of D-fructose dehydrogenase  
Funabashi, H., Murata, K., Tsujimura, S. Electrochemistry, 83(5) 372-375 (2015). (査読有)

Electrochemical Impedance Simulation of Branch Structure Porous Carbon Electrode using Transmission Line Model  
Shitanda, I., Tsujimura, S., Yanai, H., Hoshi, Y., Itagaki, M., Electrochemistry, 83(5), 335-338 (2015). (査読有)

Electrochemical Impedance Study of Screen-printed Branch Structure Porous Carbon Electrode using MgO-templated Carbon and MgO Particle and its Application for Bilirubin Oxidase-immobilized Biocathode  
Shitanda, I., Nakafuji, H., Tsujimura, S., Hoshi, Y., Itagaki, M., Electrochemistry, 83(5), 329-331 (2015). (査読有)

[学会発表](計 35 件)

(招待講演 計 9 件)

Tsujimura, S., Enzyme-based biofuel cell (Invited), The Japan-America Frontiers of Engineering 2016 (日米先端工学シンポジウム, JAFOE), Irvine, CA, USA, 2016 年 6 月 17 日 (Best Speaker Award 受賞)

Tsujimura, S., Enzymatic biofuel cell based on MgO-templated carbon (Invited), Seminar, Bioenergetique et Ingenierie des Proteines, Marseilles, France, 2016 年 8 月

29-31 日

Tsujimura, S., Enzymatic biofuel cell based on porous carbon materials (Invited), France-Japan Meeting on (bio)-functionalization of nanostructured carbon and (bio)-electrocatalytic applications, University of Grenoble-Alps, Grenoble, France, 2016 年 9 月 1-2 日

Tsujimura, S., Enzymatic biofuel cell based on porous carbon materials (Keynote), PRiME2016, Honolulu, HI, USA, 2016 年 10 月 3 日

辻村清也, 「酵素型バイオ燃料電池の最新動向」, 電気化学セミナー 最先端電池技術 2017、タワーホール船堀 東京都江戸川区, 2017 年 1 月 20 日

Tsujimura, S., Recent advances in carbon electrodes for the development of enzyme-based biofuel cell, SMOBE-2015, Univ. Antwerpen, Belgium, 2015.8.19

Tsujimura, S., Enzymatic biofuel cell based on porous carbon materials, MANA-RSC symposium Materials for Energy Generation and Storage, Tsukuba, 2015.10.15

(一般講演 計 26 件)

Tsujimura, S., Biocathode based on a MgO-template carbon electrode modified with ABTS and bilirubin oxidase, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Taipei, 2015. 10.5.

Suzuki A., Murata K., Tsujimura, S., Characterization of Glucose Oxidase-Redox Hydrogel on MgO-templated Carbon Electrode, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Taipei, 2015. 10.5. (Best poster award 受賞)

Seiya Tsujimura, Aimi Suzuki, Hofmeister Effects on Glucose oxidase-Redox Hydrogel Electrode, 19th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry "Electrochemistry at Modified Interfaces" 17- 20 April 2016, The University of Auckland, Auckland, New Zealand

Seiya Tsujimura, MgO-templated mesoporous carbon for enzyme electrode, Elec nano7 2016 年 5 月 23-26 日、Lille University, Lille, France,

Seiya Tsujimura, Ayumu Niiyama,

Glucose/O<sub>2</sub> enzymatic biofuel cell beased on MgO-templated porous carbon ,67th ISE meeting 2016年8月21-25日、World Forum, The Hague, The Netherlands

Hiroto Funabashi, Seiya Tsujimura, Designing macro-meso pore structure of MgO-templated carbon for DET-based Enzyme electrodes , PRiME2016 Honolulu, HI, USA , 2016年10月3日

Ayumu Niiyama, Seiya Tsujimura , Glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell constructed from MgO-templated carbon modified carbon cloth , PRiME2016 Honolulu, HI, USA , 2016年10月3日

新山 歩, 村田 一樹, 辻村 清也, 多孔質炭素カーボンをクロス複合電極を用いた酵素燃料電池の開発 2015年電気化学秋季大会, 埼玉工業大学(埼玉県、深谷市), 2015年9月11日~2015年9月12日

梶原 和法, 安立 翼, 辻村 清也, 電解質のイオン特性を利用したグルコース脱水素酵素の安定化 2015年電気化学秋季大会, 埼玉工業大学(埼玉県、深谷市), 2015年9月11日~2015年9月12日

安立 翼, 梶原 和法, 村田 一樹, 辻村 清也, グルコース脱水素酵素のメデイエータ型電極反応に対する電解質の影響, 2015年電気化学秋季大会, 埼玉工業大学(埼玉県、深谷市), 2015年9月11日~2015年9月12日

鈴木 愛未, 辻村 清也, ドックスハイドロゲル修飾多孔質グルコース酸化電極の高出力化・安定化 2015年電気化学秋季大会, 埼玉工業大学(埼玉県、深谷市), 2015年9月11日~2015年9月12日

12. 新山 歩, 村田 一樹, 辻村 清也, 多孔質炭素 - カーボンをクロス複合電極を用いた酵素燃料電池の開発, 第5回CSJ化学フェスタ, タワーホール舟堀(東京都、江戸川区), 2015年10月13日~2015年10月15日

船橋 広人, 辻村 清也, 多孔質炭素修飾酵素電極における細孔構造の検討, 第5回CSJ化学フェスタ, タワーホール舟堀(東京都、江戸川区), 2015年10月13日~2015年10月15日(優秀発表賞受賞)

船橋 広人, 辻村 清也, メソ・マクロ階層構造を有する多孔質炭素を用いた酵

素機能電極の特性評価, 電気化学会第83回大会, 大阪大学(大阪市、吹田市), 2016年3月29日~2016年3月31日

辻村 清也, 鈴木 愛未, レドックスハイドロゲル型グルコース酸化電極に対する電解質の影響, 電気化学会第83回大会, 大阪大学(大阪市、吹田市), 2016年3月29日~2016年3月31日

安立 翼, 梶原和法 辻村清也, FAD依存性グルコース脱水素酵素と電子受容体との反応に及ぼす電解質の影響, 第62回ポーラログラフィーおよび電気分析討論会、宮古島市中央公民館大ホール、2016年11月19-20日

船橋広人、竹内聖詞、辻村清也, マクロメソ階層構造を有する酸化マグネシウム鑄型炭素の酵素電極への応用, 第84回電気化学会大会 2017年3月25-27日 首都大学東京 東京都八王子市

〔図書〕(計 2件)

Functional Electrodes for Enzymatic and Microbial Bioelectrochemical Systems. Flexer, V. and Brun, N. (Eds.). Imperial College Press. Chap.10, Carbonaceous electrodes featuring tunable mesopores for use as enzyme electrodes. Tsujimura, S.

"ヘルスケア・ウェアラブルデバイスの開発 (Advances in Healthcare Wearable Devices)", 監修: 菅沼克昭, シーエムシー出版(2017/03/10) ISBN 978-4-7813-1239-2

第4章 電源・電池、5 ウェアラブル電源としてのバイオ電池(pp.133-140)

辻村清也、四反田功

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 発電デバイス、発電方法及び濃度測定方法

発明者: 四反田功, 辻村清也

権利者: 東京理科大 筑波大

種類: 特願

番号: 2016-195054

出願年月日: 2016年9月30日

国内外の別: 国内(国外申請中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻村 清也 (TSUJIMURA, Seiya)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号: 30362429