

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19550091

研究課題名（和文） 耐熱性酵素を用いたアミノ酸センサーの高機能化

研究課題名（英文） Development of an amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable enzymes

研究代表者 本仲 純子 (JUNKO MOTONAKA)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40035811

研究成果の概要：

アミノ酸と健康との関わりは深く、生体内アミノ酸濃度が肝炎などの指標として利用されている。酵素を電極上に固定化した酵素電極は小型かつ簡易に選択的な分析が可能である。酵素固定電極は高価な酵素を繰り返し利用可能であり、基質を添加するのみで分析できる。しかし、一般的に常温菌由来の酵素は環境変化に弱く、電極作製過程、長期使用時などの酵素の失活が問題となる。近年では酵素電極の耐久性の向上を目的とした研究が行われており、極限環境微生物（超好熱菌、超好酸菌、超好アルカリ菌など）由来の酵素を識別素子として酵素電極に適用する試みが行われている。これらの極限環境微生物由来の酵素は環境の変化に対して耐性があり、センサの利用可能環境の拡張が可能となるため、非常に注目されている。

そこで、耐熱性酵素を用いた D-アミノ酸の高選択性を有する長期安定な酵素センサーの構築を行った。Pyrobaculum islandicum 由来の D-プロリン脱水素酵素(D-Proline dehydrogenase；D-Pro DH)を寒天で固定した電極を作製した。その結果、尿中の D-アミノ酸の定量に成功した。さらに、感度向上を目指して、電極固定剤にカーボンナノチューブゲルを利用したセンサを試作した。その結果、感度が 10 倍向上した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：アミノ酸、耐熱性酵素、酵素センサ、寒天、カーボンナノチューブ、超好熱菌

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸と健康との関わりは深く、生体内アミノ酸濃度が肝炎などの指標として利用されている。生体中のアミノ酸は一般的にL体がほとんどの構成成分として知られていたが、D-アミノ酸の生命活動への関与が近年の研究により徐々に明らかになってきている。例えばD-セリンは脳内でグルタミン酸作動性神経の調節に関与し、またD-アスパラギン酸は内分泌器官中での高濃度の存在が確認され、各種ホルモンの分泌の制御との関連が取りざたされている。またD-プロリン、D-ロイシンなどもマウスにおける存在が確認されている。

D-アミノ酸を測定する方法として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィー(GC)などが用いられている。しかし、装置が大型であることや試料の前処理が煩雑などの問題がある。HPLCやGC以外にアミノ酸を測定する方法としては、酵素を電極上に固定化した酵素電極が用いられている。酵素電極は迅速かつ簡便に測定可能あり、生体物質の選択性に優れている。これまでD-アミノ酸を電気化学的に測定するセンサーとして、D-アミノ酸酸化酵素やD-フルクトース脱水素酵素を用いた例がある。しかし、酵素電極の作製時や、長期使用による酵素の失活が酵素電極の実用化には大きな問題となっている。

近年では酵素電極の耐久性の向上を目的とした研究が行われており、極限環境微生物(超好熱菌、超好酸菌、超好アルカリ菌など)由来の酵素を識別素子として酵素電極に適用する試みが行われている。これらの極限環境微生物由来の酵素は環境の変化に対して耐性があり、センサの利用可能環境の拡張が可能となるため、非常に注目されている。

そこで、耐熱性酵素を用いたD-アミノ酸の高選択性を有する長期安定な酵素センサーの構築を行った。

2. 研究の目的

本研究では、大島・櫻庭・里村らにより新規に精製された超好熱性古細菌(*Pyrobaculum islandicum*)のD-プロリン脱水素酵素(D-Pro DH)を電極の生体素子として利用した。D-Pro DHは耐熱性の膜酵素であり、またD-アミノ酸の一種のD-プロリンに対して高い活性を示す。D-プロリンは人間の唾液や胃液、マウスの脳内や血清、メープルシロップ、銀杏など様々な物質に存在している。しかし生理学的作用などに関しては不明な点が多い。酵素電極を用いてL-アミノ酸

を定量した報告は多いが、D-アミノ酸を酵素電極により測定した報告例は少なく、安定性のある耐熱性酵素を固定化し測定を行った報告例は皆無である。D-pro DHのような生体膜と結合した膜酵素は水に難溶であるため、電極への有効な固定化法が開発されておらず、酵素電極への利用には制限があった。酵素電極の機能は酵素の固定状態に強く依存するため、酵素活性を維持しつつ酵素を安定に固定化できる方法の開発が必要である。

本研究では、D-Pro DH固定化電極を作製し、電極の評価にはサイクリックボルタメトリーを用いた。酵素固定の確認、酵素固定量の算出、表面形状顕微鏡による寒天膜厚の測定などを行った。またpH、温度依存性、D-Pro DHの基質特異性、酵素電極の長期安定性などについて評価した。

3. 研究の方法

本研究ではD-Pro DHの耐熱性に着目し、我々は固定化担体に寒天を用いるの試みを行った。寒天は天然高分子の一種で基本骨格はガラクトースから構成され、高温のゾル状態ではランダムコイル構造であり、冷却後は三次元のダブルヘリックス構造のゲルを形成する。またゲルを用いる酵素の包括固定はきわめて簡便であり、基質に対する親和性も高い。

D-Pro DHを高温溶液中で寒天と均一に混合し、電極上に添加することでOne-processによる簡便かつ包括的にD-Pro DHの固定化が可能になる。耐熱性膜酵素を寒天により電極上に固定化した報告はなく新規の固定化法である。耐熱性酵素のD-pro DHと高温溶解性の寒天を均一に混合し、電極上に塗布することで簡便かつ安定なD-pro DHの固定化が可能になると推測した。

電子メディエーターとして2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)を用い、寒天膜内への固定化の確認、寒天濃度、メディエーター濃度などの諸条件の検討、および温度依存性、電流応答の再現性、安定性などの酵素電極の電気化学特性評価を行った。

なお、D-Pro DH固定化電極の作製は、簡便に均一薄膜を形成させるためにスピコート法を用いた。スピコート法の概要としては、洗浄後のGC電極を4000 rpmで回転させ、6.4 units 0.429 mg/ml D-Pro DHを含む1.5%寒天含有溶液(70°C)をGC電極上に塗布した。

4. 研究成果

Fig. 1に示したように、寒天膜への酵素固

定化の確認に関しては D-プロリン添加に伴う触媒酸化波が確認できた。測定温度が 40°C 以上においても電流値の上昇が確認され、基質特異性については D-プロリン以外の数種類の D-アミノ酸の検出にも有効であることが示された。

電流応答の再現性については相対標準偏差 6.2%と良好な値が得られ、安定性は電極作製時より 80 日後においても応答電流値を 90%以上保持した。これまでの D-アミノ酸オキシダーゼや、D-フルクトース脱水素酵素をカーボンペーストにより固定化した電極では 30 日前後、またポリメルカプトベンゾキノンポリマーの電解重合により D-アミノ酸オキシダーゼを固定化した例では 1 週間程度の安定性であり、本電極はこれらの従来法に比べ高い安定性を示した。これは、寒天が他の固定化担体より長期にわたって強固に膜構造を保持すること、さらにこの D-Pro DH の安定性が他の D-アミノ酸酵素より優位であることに基づくものである。

さらに、感度向上を目指してカーボンナノチューブ(CNT)とイオン液体で作製した CNT ゲルと耐熱性の D-プロリン脱水素酵素(D-Pro DH)を組み合わせて電極を作製した。

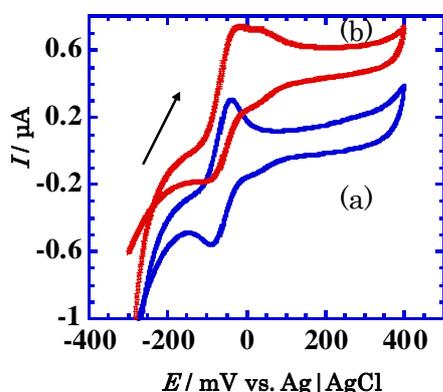


Fig. 1 Cyclic voltammograms of electrocatalytic oxidation of D-Proline with an agar / D-Pro DH immobilized GC electrode

Sample 10 ml pH 8.0 PBS containing 0.5 mM DCIP , 0.1 M KCl without (a) and with (b) 20 mM D-Proline at 50°C
Scan rate was 1 mV s⁻¹ in the both measurement.

CNT ゲルを修飾した D-Pro DH 固定化電極は、他の炭素材料(ケッチェンブラック、カーボンパウダー)と比較して D-プロリンに対してもっとも高い感度を有していることが判明した。この CNT / D-Pro DH 固定化電極では食品試料(アルコールおよび香酢)中数

百~数十 μmol dm⁻³レベルの D-アミノ酸の定量が可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①. Y. Tani, K. Tanaka, T. Yabutani, Y. Mishima, H. Sakuraba, T. Ohshima, and J. Motonaka, Development of a D-amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable D-Proline dehydrogenase within agar gel membrane
Anal. Chim. Acta, **619**, 215-220, (2008).

[学会発表] (計 9 件)

①. Y. Shoda, Y. Tani, T. Yabutani, Y. Hayashi and J. Motonaka
Electrochemical Behavior of Direct Oxidation of Amino Acids on Various Electrodes
Chemistry and the Biosphere Conference, p.136, 2008/12/01, Dunedin

② 山田 洋平, 和田 知賀博, 谷 裕児, 林 由佳子, 藪谷 智規, 本仲 純子, 酒瀬川 信一, 櫻庭 春彦, 大島 敏久
Bacillus Subtilis 由来 CotA のバイオセンサーへの利用, 2008 年日本化学会西日本大会, 2008 年 11 月 15 日, 長崎大学

③ J. Motonaka, T. Yabutani, H. Murotani, A. Sano, Y. Tani, Y. Hayashi and M. Yasuzawa
Electrochemical Characterization of biosensors based on immobilization of enzyme in amino acid N-substituted polypyrrole formed by electropolymerization,
AMDP 2008 (International Conference on Advanced Materials, Development and Performance 2008), 2008/10/15, Beijing

④ Y. Tani, K. Nishi, C. Wada, Y. Shoda, T. Watanabe, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Hayashi, T. Yabutani and J. Motonaka,
Characterization and application of thermostable D-proline dehydrogenase and carbon nanotube gel immobilized electrode,
AMDP 2008 (International Conference on Advanced Materials, Development and Performance 2008), 2008/10/15, Beijing

⑤. 田中 勝人, 谷 祐児, 藪谷 智規, 三島有二, 櫻庭 春彦, 大島 敏久, 本仲 純子
耐熱性ジアホラーゼ固定化電極の作製とその NAD 依存性酵素センサーへの応用
第 5 3 回ポーラログラフィー及び電気分析化学討論会, 平成 19 年 11 月 25 日, 神戸大学

⑥ Y. Tani; T. Yabutani; Y. Mishima; H. Sakuraba; T. Ohshima ; J. Motonaka,
Electrochemical characterization of a
thermostable D-prolinedehydrogenase
immobilized electrode under aqueous and alcohol
solvents

The 9th Asian Conference on Analytical
Chemistry, 2007/11/5, Jeju,

⑦ 和田 知賀博;田中 勝人;谷 祐児;藪谷 智
規;本仲 純子

高感度-Reagentless センサーのためのカーボ
ンナノチューブ/イオン性液体ゲルを用いた
メディエーター/酵素固定化電極の作製

2007 年日本化学会西日本大会, 平成 19 年 11
月 10 日, 岡山大学

⑧. 和田 知賀博, 田中 勝人, 谷 祐児, 藪谷
智規, 本仲 純子

カーボンナノチューブ/イオン性液体ゲルを
用いた酵素固定化電極の作製, 第 13 回日本
分析化学会中国四国支部若手セミナー, 平成
19 年 8 月 17 日, 玉野市

⑨. 田中 勝人・谷 祐児・藪谷 智規・三島
有二・櫻庭 春彦・大島 敏久・本仲 純子

NAD 依存性酵素センシングのための耐熱性
ジアホラーゼ固定化電極の作製とその応用
日本分析化学会第 56 年会, 平成 19 年 9 月 19
日, 徳島大学

6. 研究組織

①研究代表者

本仲 純子 (JUNKO MOTONAKA)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研
究部・教授

研究者番号: 40035811

(2)研究分担者

①大島 敏久 (TOSHIHISA OHSHIMA)

九州大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 10093345

②櫻庭 春彦 (HARUHIKO SAKURABA)

香川大学・農学部・教授

研究者番号: 90205823

③藪谷 智規 (TOMOKI YABUTANI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研
究部・講師

研究者番号: 80335786