

機関番号：32714

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20550085

研究課題名（和文）通電式計測システムによる微量重金属イオンの特異的分析

研究課題名（英文）Specific Analysis for Trace Heavy Metal Ions Using a Measuring System Armed with an Electrolytic Device

研究代表者

佐藤 生男（SATOHI IKUO）

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：20148125

研究成果の概要（和文）：微量重金属イオンをフローインジェクション方式で簡易に計測する通電デバイスを備えたシステムの開発を行った。酵素法による重金属イオンの微量計測を実現するため、研究代表者の創案にかかる「アポ酵素活性化法」に基づく計測法を適用する事とした。既に、金属酵素を等電点の状態に置き、2 mA 程度の直流電流を通じると、酵素の活性部位に配位した重金属イオンを引き抜き、除去し、アポ酵素に変換できることを報告した。ここでは、通電に伴う印加電圧の増大を可及的に低減可能な、流通式の酵素リアクターの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：A flow-injection microdetermination system armed with an electrolytic device for trace amount of heavy metal ions was developed. A unique analytical method based on the apoenzyme activation originally created by the author was applied to realize microanalysis of heavy metal ions with use of enzymatic methods. Use of applications of 2 mA direct current across two tubular platinum electrodes set between an inlet and also outlet of the enzyme column, and also of which pH controlled at the isoelectric point, showed that removal of heavy metal ions coordinated in the active site of the enzymes was positively done and then, the enzymes could be converted to the corresponding apoenzymes. Fabrication of a flow-through reactor armed with an electrolytic device in combination with a planar type of immobilized enzymes, suffering from no increase in terminal voltage due to application of direct currents, could be successfully realized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：酵素工学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー、アポ酵素、フロー計測、通電システム、金属酵素、微量計測、重金属イオン、固定化酵素

1. 研究開始当初の背景

微量の重金属イオンの定量は、医療・食品・発酵はいうに及ばず環境計測等の分野において主要課題の一テーマである。この重金

属イオンを高感度で計測するには、原子吸光分析や ICP 発光分析を利用するのが一般的である。しかし、これらの機器分析装置は高価にして、排出ガス、水の処理問題が含まれ、

また計測機の設定場所の環境をも考慮せねばならない。これに対して、酵素分析法による計測は、比較的簡易な計測器で感度良く、手軽に計測できる長所がある。重金属イオンの計測においては従来、酵素反応に対する重金属イオンによる阻害に着目し、その阻害度から定量する方法が専ら採用されていた。

代表者らは阻害度の測定に変えて、活性化度を新たに指標とする計測法を提唱した。

2. 研究の目的

金属酵素と呼ばれる一群の酵素は、その活性部位に重金属イオンが配位、結合することが触媒活性の発現に不可欠である。この活性の発現に必要な重金属イオンの欠けたいわゆるアポ酵素は触媒活性を発揮できないが、重金属イオンに対する親和性は保持されている。つまり、アポ酵素を特定の重金属イオンの検知素子として捉え、金属イオンの再結合（再生）に伴う活性化現象に着目すれば、新規な計測法を創案できる。

(1) アポ酵素活性化法の確立

アポ酵素の簡易的な変換法として、錯化剤（キレート化試薬）が通常、利用される。アスコルビン酸オキシダーゼは銅(II)イオンを活性の発現に必要とする酵素で、銅酵素とも分類される。錯化剤を用いたアポ酵素の変換と、生成したアポ酵素を(II)イオン識別素子とし、カロリメトリーを触媒活性のモニタリングする計測法を確立することとした。

(2) 通電式リアクターの製作

重金属イオンと錯化剤との反応で形成される錯体は一般に水難溶性であるため、酵素固定化物の表面への付着や吸着が起これ、金属イオンの検出素子である固定化酵素の活性低下を招き易い。そこで、新たに、当該酵素の当電点で微弱な直流電流を印加することにより、アポ酵素に変換する方法を着想するに至った。この通電システムを備えた酵素リアクターの試作、性能試験を実施することとした。

3. 研究の方法

(1) 酵素リアクターの調製

① 単位質量当りの表面積が比較的大きく、通液特性に優れ、通電に伴う活性制御や金属イオンの吸・脱着も制御可能な金製網上に金属酵素であるアルカリホスファターゼ（亜鉛酵素）やアスコルビン酸オキシダーゼ（銅酵素）をそれぞれ別個に、共有結合的に固定化する。なお、従来の固定化用担体として利用した微細孔性ガラス微粒子上にも固定化を念のため、行った。

② 筒形リアクターとは別個に、二枚のプラスチック製のホルダーに矩形状の白金板を取り付け、通電用の電極とした。この白金板の間に、網状に成形された矩形の純金から

成る酵素固定化物をスプレーヤーとしてのナイロン網を介して組み込んだ。この平形の酵素リアクターを用いると、たとえキャリアーの電解に伴って気体成分が発生しても、容易に除去できるものと予期され、さらに電解法によるアポ酵素への変換も簡易に果たされるものと予期した。

(2) 酵素触媒活性の確認

① 分光測光法の適用

アルカリホスファターゼ活性のモニタリングには、基質としてリン酸 *p*-ニトロフェニルを用い、加水分解反応で遊離される *p*-ニトロフェノールをホトメトリーにより、405 nm で感度良く検出、定量することとした。

② 電気化学的計測法の適用

アスコルビン酸オキシダーゼ活性の追跡には、酸化反応で消費される溶存酸素量をポーラロ式酸素電極で簡易に行える。プラスチック製の流通式セルに装着した電極を適用することとした。

③ カロリメトリーの適用

どの酵素触媒反応にも多少の熱量変化が伴うので、汎用性に優れた本計測法は活性の客観的診断法として優れている。市販の準断熱式カロリメーターを適用し、反応に伴い観測される発熱変化量を求めた。そのため、酵素充填カラムを温度プローブに取り付け、フロー方式で継続的に温度の時間変化を追跡した。

(3) アポ酵素変換条件の確立

筒形と平形の双方のリアクターを別個に使用し、アポ酵素変換条件を検討した。すなわち、錯化剤を用いるアポ酵素への変換では、① その種類に加えて、②濃度、③pH、④通液量が主な指標と成るので、これらについて逐一検討を加える。勿論、錯化剤を通液した後では、補因子としての金属イオンを添加し、錯化剤の通液以前の触媒活性を発現できる状態に復帰することを確認することが必須である。

(4) 重金属イオンのフロー計測

アポ酵素に変換した状態で、①計測範囲、②通液量依存性、③選択性、④予め希釈済みの実際の試料液を使用しての回収率の計測を行うものとする。

4. 研究成果

本研究で得られた主な成果を年度順に列記する。

(1) 2008年度

① 固定化アスコルビン酸オキシダーゼの調製：本酵素を多孔質ガラス（細孔径：202.3 nm, 粒子径：120-200メッシュ, 表面積：12.8 m²/g)に73%の取率で固定化することができ、この固定化物をプラスチック製のミニカラムに充填し（充填量：0.3 mL）、フローインジェ

クシオンカロリメトリーに基づく計測システムに取り付けた(図1)。

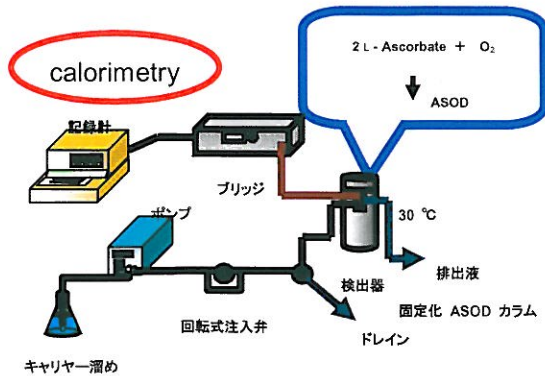


図1. カロリメトリーに基づく計測システム

② 酵素固定化物の触媒活性の確認：本計測システムに、L-アスコルビン酸液 (0.2 mM, pH5.60, 0.1 mL)を注入すると、顕著な発熱応答 (ΔT) が示され、3%未満の相対標準偏差(n=10)で再現性良く定量出来た。酵素カラムの触媒活性を以後、10 mM, pH 5.60, 0.1 mLの件で計測する事とした。

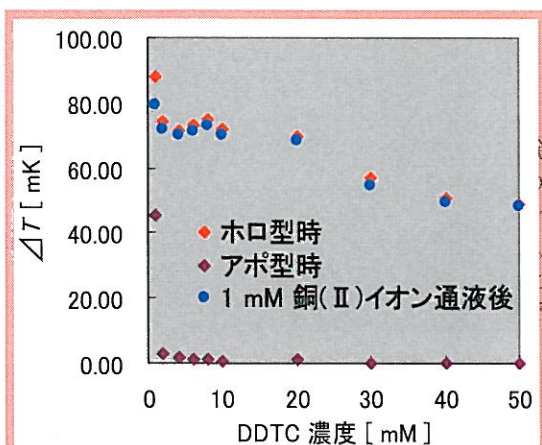


図2. ASOD 活性に及ぼす錯化剤の影響

錯化剤を用いたアポ酵素への変換条件を検討した結果、30mM,pH 8.0, 0.5 mLの DDTC(N,N-ジエチルジチオカルバミン酸塩)液を導入することで、目的を果せた(図2)。引き続き、銅(II)イオンの計測を行ったところ、0.1 μM ~ 1.0 mM の範囲で測定できた。

(2) 2009年度

① キレート化剤によるアポ酵素への変換と再確認：計測システムにおいてキレート剤を用いるアポ酵素への変換には、30mM, pH 8.0, 0.5 mLの DDTC液を導入すればよいことを再確認した。引き続き、本提唱法に基づく銅(II)イオンの計測を行ったところ、0.1μM ~ 1.0 mM の範囲で測定可能とされた。

② アクリル樹脂からなる電解デバイス付きのフローセルを試作した結果、数ボルト以下の低電圧の負荷で直流電流を印加できることに成功した。このフローセルには、所定の流速(mL/min)で各種試薬類を通液できることも確認された。一方、金製の酵素固定用ネットを本フローセルに取り付けることを目的として、このネットに酵素を約 11%の収率で固定化できることも示された。

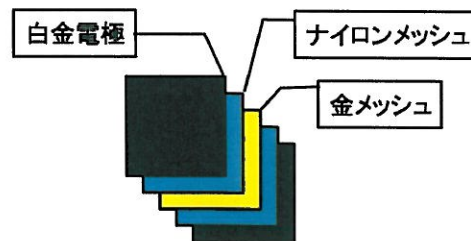


図3. 試作した酵素リアクターの内容物

(3) 2010年度

① 改良式フロー形リアクターの製作：昨年度にアクリル樹脂から成る電解デバイス付きのフローセルを製作し、数ボルト以下の電圧でも、十分な電流を通電できることを例証した。このフローセル内でのキャリアの円滑な通液状況の改善を目的として、改良式リアクターの再製作を果たした(図4)。

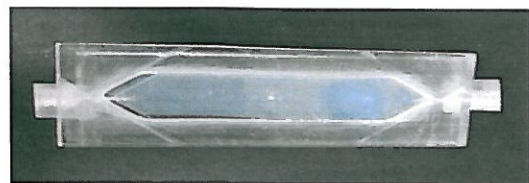


図4. 改良形フローセル

② 種々検討した結果、活性の発現に必要な金属ネットでは表面積が不足することが示され、多孔性の炭素繊維を適用し、これに金酸溶液を滴下、風乾後、常温での水素ガスによる還元で高触媒活性の固定化酵素用シートを得る事に成功した。

(4) 今後の展望

錯化剤を用いたアポ酵素への変換はほぼ定量的に進行することが再現性良く、確かめられた。これに対し純金製の網の表面を化学修飾した担体では必ずしも、酵素の固定化に十分な表面積が得られないことが認められた。これに関しては、新たに担体基盤材料として用いた、多孔性の炭素繊維からなる細片が有効であり、この細片上に金の薄膜を形成させ、アルカンチオール処理後、グルタルアルデヒドを介して酵素タンパク質を、計測素子用として十分に固定化できることを見出した。

一方、フローセルの改良を試行し、通液特性に優れ、しかも 2.0 mA 程度の直流電流を印加しても、気体の発生が認められないことを確認した。

ここに得られた知見は、本研究の今後の展開に大いに有用である。

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 9 件)

本研究課題

- ① Ikuo SATOH, Kenji ONDA, Seiya MURAKOSHI and Yasuhiro IIDA: “A Flow-through Reactor Armed with Immobilized Metalloenzyme Preparations”, *Proceedings of the 51st Chemical Sensors*, **27**, Supplement A, pp.13 - 15, 2011.(査読無).
- ② Ikuo SATOH, Seiya MURAKOSHI, Kenji ONDA and Yasuhiro IIDA : “Fabrication and Testing of an Enzyme Reactor Armed with an Electrolytic Device”, *Proceedings of the 50th Chemical Sensors*, **26**, Supplement B, pp.7 - 9, 2010. (査読無)
- ③ Daisuke NOJIMA, Ikuo SATOH and Yasuhiro IIDA: “Development of Cobalt Responsive Alkaline Phosphatase and Application of the Enzyme to Biosensing as a Recognition Element”, *Proceedings of the Chemical Sensors*,

26, Supplement A, pp.94 - 96, 2010. (査読無).

- ④ Ikuo SATOH , Yoshiki KOBAYASHI and, Yasuhiro IIDA: “Calorimetric Biosensing of Copper(II) Ions Using Immobilized ASOD-Preparations”, *Proceedings of the Chemical Sensors*, **25**, Supplement A, pp. 85 - 87, 2009. (査読無)
- ⑤ 佐藤生男:「カロリメトリックバイオセンサ」, マテリアルインテグレーション, **21**, No.05-06, pp.181-186, 2008. (査読無)

関連研究

- ① Ikuo SATOH, Akiko YAGISHITA, and Shin-ya ARAI : “Glycogen Phosphorylase *b* as Sensing Materials for Effectors”, *Proceedings of the Chemical Sensors*, **25**, Supplement B, pp.10 - 12, 2009. (査読無)
- ② Yasuhiro IIDAIkuo SATOH*Proceedings of the Chemical Sensors*, **25**, Supplement B, pp.22 - 24, 2009. (査読無)
- ③ Ikuo SATOH and Akiko YAGISHITA : “Photometric Biosensing of Effectors Using a Column Packed with Glycogen Phosphorylase *b* Immobilized Preparations”, *Proceedings of the Chemical Sensors*, **26**, Supplement A, pp.187 - 189, 2010. (査読無)
- ④ Ikuo SATOH and Shin-ya ARAI : “Biosensing of Effectors Using an Immobilized-Glycogen Phosphorylase *b* Column”, *Proceedings of the Chemical Sensors*, **25**, Supplement A, pp.97 - 99, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 佐藤生男村越誠也, 恩田健司, 飯田泰広 : 「金属酵素固定化物を装備した流通式リ

- アクター」, 社団法人電気化学会 第 51 回化学センサ研究発表会, 2011 年, 3 月 29 日, 横浜.
- ② Ikuo SATOH: “Microdetermination of heavy metal ions in flow streams with use of immobilized apoenzymes chemically or physically regenerated from their corresponding metalloenzymes”, PACIFICHEM 2010 Congress, Analytical, Advances in Flow-based Analytical Techniques (#207), December 20, 2010 Honolulu, HAWAII, USA.
- ③ 佐藤生男, 村越誠也, 恩田健司, 飯田泰広: 「電解デバイスを備えたフロー式酵素リアクターの試作」, 社団法人電気化学会 第 50 回化学センサ研究発表会, 2010 年, 9 月 2 日, 厚木.
- ④ 佐藤生男, 柳下明子: 「グリコーゲンホスホリラーゼ *b* 固定化物充填カラムを用いたエフェクターのホトメトリックバイオセンシング」, 社団法人電気化学会 第 49 回化学センサ研究発表会, 2010 年, 3 月 31 日, 富山.
- ⑤ 野島大佑, 佐藤生男, 飯田泰広: 「コバルト応答型アルカリホスファターゼの作製とセンサへの応用」, 社団法人電気化学会 第 49 回化学センサ研究発表会, 2010 年, 3 月 30 日, 富山.
- ⑥ Y. IIDA, R. YOSHIMURA, A. THEPCHAK, K. NAGASHIMA and I. SATOH: “Development of Ammonia Analysis System for Enzyme Sensor with use of Pyocyanine as a Coloring Reagent”, Flow Analysis IX, September 17, 2009, Pollensa, Mallorca, SPAIN.
- ⑦ I. SATOH, S. ARAI and A. YAGISHITA: “Use of Glycogen Phosphatase *b* as a Recognition Element for an Effector in Combination with a FIA Technique”, Flow Analysis IX, September 15, 2009, Pollensa, Mallorca, SPAIN.
- ⑧ I. SATOH, Y. KOBAYASHI, K. OGAWA and Y. IIDA: “Flow Injection Calorimetric Microdetermination of Copper(II) Ions Based on an Apoenzyme Reactivation Method”, Flow Analysis IX, September 14, 2009, Pollensa, Mallorca, SPAIN.
- ⑨ D. NOJIMA, I. SATOH and Y. IIDA: “Development of Flow Injection Analysis System for Determination of Metal Ions with Use of Alkaline Phosphatase as a Multi Metal Recognition Element”, Flow Analysis IX, September 14, 2009, Pollensa, Mallorca, SPAIN.
- ⑩ 飯田泰広, 佐藤生男, 前角典男: 「固定化チロシナーゼを用いたチロシナーゼ阻害剤の特性評価」, 社団法人電気化学会 第 48 回化学センサ研究発表会, 2009 年, 9 月 10 日, 東京.
- ⑪ 佐藤生男, 柳下明子, 新井慎也: 「エフェクターのセンシング材料としてのグリコーゲンホスホリラーゼ *b*」, 社団法人電気化学会 第 48 回化学センサ研究発表会, 2009 年, 9 月 10 日, 東京.
- ⑫ 佐藤生男, 新井慎也: 「固定化グリコーゲンホスホリラーゼ *b* 充填カラムを用いたエフェクターのバイオセンシング」, 社団法人電気化学会 第 47 回化学センサ研究発表会, 2009 年, 3 月 30 日, 京都.

- ⑬ 佐藤生男, 小林由樹, 飯田泰広:「ASOD 固定化物を用いた銅(II)イオンのカロリメトリックバイオセンシング」, 社団法人電気化学会 第47回化学センサ研究発表会, 2009年, 3月29日, 京都.

[図書] (計2件)

- ① 佐藤生男:「化学効果とセンサ」, 藍光郎 監修, 室英夫・大和田邦樹・佐取朗・石垣武夫・石森義雄 共編「次世代センサハンドブック」pp.11-14. 培風館, 2008年7月.
- ② 佐藤生男:「バイオセンサー」, 猪飼篤, 伏見譲, 卜部格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄 共編, 「タンパク質の事典」, pp. 700 - 702, 朝倉書店, 2008年7月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 生男 (SATOHI IKUO)
神奈川工科大学・工学部・教授
研究者番号: 20148125

(2) 研究分担者

飯田 泰広 (IIDA YASUHIRO)
神奈川工科大学・応用バイオ科学部・
准教授
研究者番号: 40329305