

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656155

研究課題名（和文）金属表面機能開拓のための酵素／ナノポーラス金属電極の創製

研究課題名（英文）Enzyme-immobilized nanoporous metals for functionalization

研究代表者

馬淵 守 (MABUCHI MAMORU)

京都大学・大学院エネルギー科学研究科・教授

研究者番号：00358061

研究成果の概要（和文）：

酵素をナノポーラス金属に固定し、酵素／ナノポーラス金属電極を作製した。ナノポーラス金属に固定された酵素は、固定されていない酵素に比べ高い耐熱性を有していた。ナノポーラス金属の表面を自己組織化単分子膜（SAM）で修飾すると、さらに高い耐熱性や耐久性を示した。SAM修飾した酵素／ナノポーラス電極では、SAM修飾していないものに比べ電解液との電子授受が促進された。これらをもとにバイオ燃料電池を試作し、動作を確かめた。

研究成果の概要（英文）：

Enzymes were immobilized on nanoporous metals for stabilization. Laccase immobilized on nanoporous Au exhibited higher thermal stability than free laccase. Decoration of nanoporous Au with self-assembled monolayer (SAM) also enhanced the thermal stability of the immobilized laccase. SAM decoration also facilitated electron transfer between electrolyte and electrode through enzymes. A prototype biofuel cell successfully operated using enzyme-immobilized SAM-modified nanoporous Au electrodes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,900,000	0	2,900,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：金属学

科研費の分科・細目：材料工学、構造・機能材料

キーワード：ナノ材料、酵素反応

## 1. 研究開始当初の背景

nm オーダーの多孔質構造をもつ新素材「ナノポーラス金属」が国内外で注目を集めている。特に近年は作製条件がよく知られているナノポーラス Au が研究対象であり、材料／物理／化学分野においてナノポーラス Au の特性評価研究がさかんである。

他のナノ材料にないナノポーラス金属の特徴は、(1) 熱処理などにより孔径制御を簡

便・広範囲 (3-1000 nm) に行える、(2) 気孔内に物質を含有できる、ことである。一方、酵素 (タンパク質) の大きさはおよそ 3-20 nm であり、ナノポーラス金属の孔径と近い。そこで、ナノポーラス金属と酵素の間に何らかの相互作用が期待できると考えた。酵素をナノポーラス構造に固定することはバイオリアクタ等への応用に必須である。ナノポーラス金属に固定すれば、金属を通じ電位をかけ

て酵素の酸化還元反応を促進・制御でき、新しい応用も期待される。

## 2. 研究の目的

以上を鑑み、本研究ではナノポーラス金属の気孔内に酵素を固定した酵素/ナノポーラス金属電極を作製するとともに、その特性評価（耐熱性など）を行った。その際に、ナノポーラス Au の表面に自己組織化単分子膜 (SAM) 修飾を行い、その影響も明らかにした。

## 3. 研究の方法

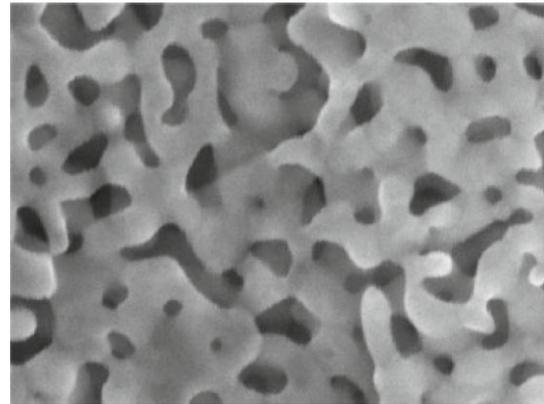
(1) 脱合金化法によりナノポーラス Au (図 1) を作製した。Au-Ag 合金から  $\text{HNO}_3$  により Ag を溶解除去することで、残った Au がナノポーラス構造を自発的に形成する。作製したナノポーラス Au の一部には SAM (4-アミノチオフェノール) による表面修飾を行った。ラッカーゼを分散・懸濁させた緩衝溶液中にこれらのナノポーラス Au 試料を浸漬し、ラッカーゼを固定した。ナノポーラス Au に固定したラッカーゼおよび固定していないラッカーゼを、2,6-ジメトキシフェノール (DMP) を含む緩衝溶液中で攪拌し (35~75 °C で 5 分間)、分光光度計で 470 nm の吸光度を測定することで酵素の活性を評価した。また、高温での保持時間に対する酵素活性の影響を調べるために、50 °C の緩衝溶液中で所与の時間保持したのち室温で 1 時間静置したあとの活性 (35 °C) を上述の手法で評価した。さらに、繰り返し使用に対する耐久性評価のために、10 分間隔で新しい DMP 溶液に変える実験を行い、それぞれの溶液の濃度を測定した。

(2) 上と同様の手法により、グルコースオキシダーゼもナノポーラス Au の上に固定した。SAM (4-アミノチオフェノール) による表面修飾をあらかじめナノポーラス Au に施したものも用いた。ラッカーゼおよびグルコースオキシダーゼを固定したナノポーラス Au を作用電極として使い、緩衝溶液中で電気化学測定 (サイクリックボルタンメトリ, CV) を繰り返し行い、溶液との電子授受挙動を把握した。これらの結果をもとに、ラッカーゼ固定ナノポーラス Au 電極およびグルコースオキシダーゼ固定ナノポーラス Au 電極 (いずれも SAM 修飾あり) を用いてバイオ燃料電池を試作し、性能を確かめた。

## 4. 研究成果

(1) ナノポーラス Au に固定したラッカーゼおよび固定していないラッカーゼの活性の温度依存性を図 2 に示す。45 °C 以上の温度では、ナノポーラス Au に固定したラッカーゼのほうが固定していないラッカーゼよりも高い活性を示した。固定していないラッカーゼ、ナノポーラス Au (SAM 修飾なし) に固

定したラッカーゼ、SAM 修飾ナノポーラス



200 nm

図 1 Au-Ag 合金の脱合金化で作製したナノポーラス Au の走査電子顕微鏡写真

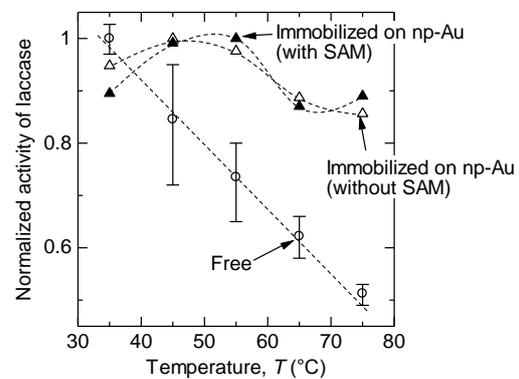


図 2 ラッカーゼの活性と温度の関係に及ぼす酵素固定および SAM 修飾の影響

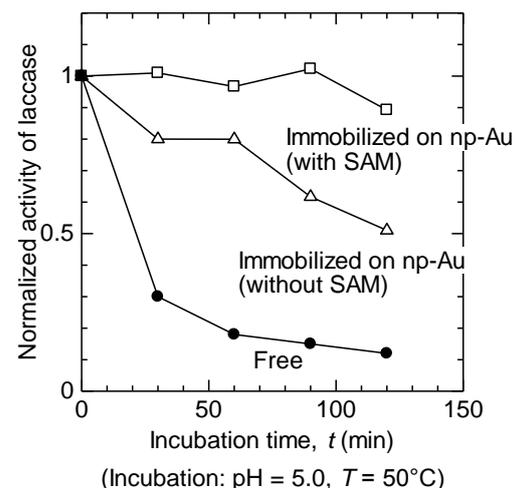


図 3 ラッカーゼの活性と 50 °C での保持時間の関係に及ぼす酵素固定および SAM 修飾の影響

Au に固定したラッカーゼの最適活動温度はそれぞれ 35, 45, 55° C であった。

また、50° C で所与時間保持後の各試料の活性を図 3 に示す。固定していないラッカーゼの活性は 30 分の保持で 7 割減ったが、ナノポーラス Au (SAM 修飾なし) に固定したラッカーゼの活性は 30 分の保持後でも 2 割にとどまり、さらに SAM 修飾ナノポーラス Au に固定したラッカーゼの活性は 30 分の保持ではほとんど失われなかった。2 時間の保持後には、固定していないラッカーゼの活性は保持前の 10% 強にまで落ち込んだが、ナノポーラス Au (SAM 修飾なし) に固定したラッカーゼの活性は 50% 程度保たれており、さらに SAM 修飾ナノポーラス Au に固定したラッカーゼの活性は 80% 強保たれていた。

ナノポーラス Au (SAM 修飾あり・なし) に固定したラッカーゼの繰り返し利用回数と活性の関係を図 4 に示す。どちらの試料でも繰り返し利用により活性が落ちているものの、SAM 修飾を行ったナノポーラス Au に固定したラッカーゼの耐久性は、SAM 修飾を行っていないナノポーラス Au に固定したラッカーゼより向上した。

このように、ナノポーラス Au への固定によりラッカーゼの耐熱性が向上した。これはナノポーラス構造に固定されることによりラッカーゼの立体構造が安定化したことに由来すると推測される。また、ナノポーラス Au に SAM 修飾を行うことにより耐熱性や耐久性はさらに向上した。SAM がラッカーゼの立体構造をより安定化させていることが示唆される。

以上のように、ナノポーラス Au は酵素固定の基材として有望な材料であることが示された。

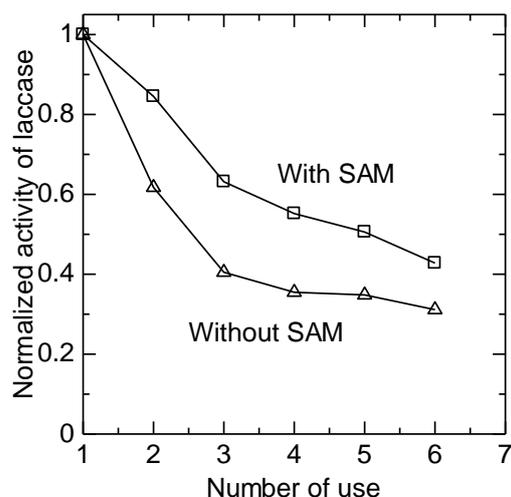


図 4 ナノポーラス Au に固定したラッカーゼの活性と使用回数の関係

(2) ラッカーゼを固定したナノポーラス Au を作用電極として、緩衝溶液中で測定した CV 曲線を図 5 に示す。SAM を用いていない場合 (図 5a)、電極表面での酸化/還元に対応するピーク対が +0.13 V 周辺に表れた。また、100 回の繰り返し電位走査に対し電流応答は変化せず、ほぼ同一の曲線となった。このことから、SAM を用いなくても 100 回程度の電位変化であれば安定して機能することが示唆される。

SAM を用いた場合 (図 5b)、ピーク対が +0.26 V および +0.55 V の 2 か所に表れた。これはラッカーゼの構造内に存在する複数の異なる銅中心での酸化還元反応が起きていることと対応する。つまり、SAM 修飾によりラッカーゼの構造内の異なる銅中心での酸化還元反応を促進できることが明らかになった。100 回の繰り返し電位走査を行うと、繰り返し数の増加とともにピーク電流が増加した。このことは電位走査によってかえって酵素が安定化し、酸化還元反応が効率よく進むようになったことを示している。このことから、ラッカーゼ/SAM 修飾ナノポーラス金属電極の高い耐久性が示された。

一方、図 5b の挿入図は、SAM 修飾を施した (ポーラスでない) 平滑 Au 板表面にラッカーゼを固定した場合の CV 曲線である。電流は 100 回の電位走査繰り返し後減少しており、電位走査の繰り返し中に電極の劣化が進んだことが示唆される。このようにナノポーラス構造を持たせることではじめて電流低下を抑えることができたことから、SAM だけではなく、ナノポーラス構造が表面に吸着したラッカーゼの耐久性を向上させるのに不可欠であることがわかる。

酵素としてグルコースオキシダーゼを用いた場合の測定結果を図 6 に示す。SAM を用いていない場合 (図 6a)、電極表面での酸化/還元に対応するピーク対が表れなかった。これは、SAM を用いていない場合は電子の電解質との授受が行われていないことを示唆する。ただし、100 回の繰り返し電位走査に対し電流応答は変化せず、ほぼ同一の曲線となった。

SAM を用いた場合 (図 6b)、ピーク対が +0.55 V に表れ、また正方向への電位走査時にはそのピーク対より少し低いところに副次的なピークも検出された。これらはグルコースオキシダーゼと電解質で電子の授受が行われていることを示唆する。さらに電位走査の繰り返し数を 100 回まで行くと、繰り返し数の増加とともにピーク電流が増加した。ラッカーゼ同様、電位走査によってかえって酵素が安定化し、酸化還元反応が効率よく進むようになったことを示している。このことから、グルコースオキシダーゼ/SAM 修飾ナ

ノポーラス金属電極の高い耐久性も示され

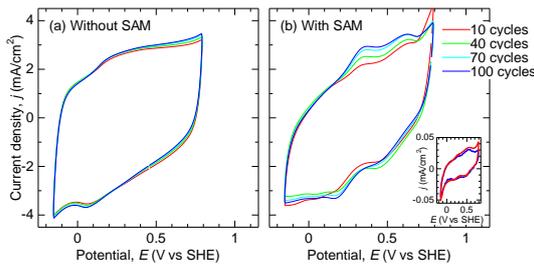


図5 ラッカーゼを固定したノポーラス Au 電極の CV 曲線 (a) SAM 修飾なし (b) SAM 修飾あり (挿入図は SAM 修飾した Au 平板)

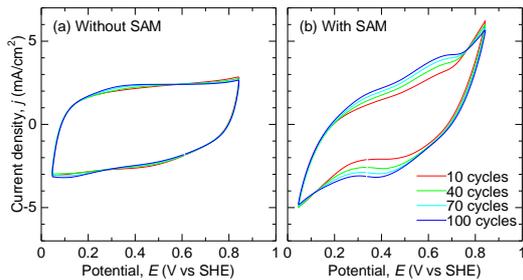


図6 グルコースオキシダーゼを固定したノポーラス Au 電極の CV 曲線 (a) SAM 修飾なし (b) SAM 修飾あり

た。

上記のように、ノポーラス Au が酵素を固定して電極として用いる基材として有望であること、特に SAM 修飾が電子の授受を促進するうえで有用であることがわかった。さらに、平滑面に固定した場合と異なり、繰り返し電位走査に対してピーク電流が増大することから、電位の変化に対する耐久性にも問題ないことが推測された。

上記のラッカーゼあるいはグルコースオキシダーゼを固定した SAM 修飾ノポーラス Au 電極を用い、バイオ燃料電池を試作した。この電池では緩衝溶液中のグルコースがグルコン酸に酸化される一方、酸素が水に還元される。試作したバイオ燃料電池からは電位差 0.21 V で最大出力 52  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  が得られた。今後ノポーラス金属の最適化（金属種・孔径等）や SAM 種、あるいは酵素の種類の検討により、さらなる高出力化ができると考えられる。

## 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 5 件）

- ① M. Hakamada, M. Takahashi, M. Mabuchi, Enzyme electrodes stabilized by

monolayer-modified nanoporous Au for biofuel cells, Gold Bulletin, 査読有, 45 巻, 2012, 9-15,  
DOI: 10.1007/s13404-011-0038-1

- ② M. Hakamada, M. Takahashi, M. Mabuchi, Enhanced thermal stability of laccase immobilized on monolayer-modified nanoporous Au, Mater. Lett., 査読有, 66 巻, 2011, 4-6,  
DOI: 10.1016/j.matlet.2011.08.017

- ③ M. Hakamada, M. Takahashi, T. Furukawa, K. Tajima, K. Yoshimura, Y. Chino, M. Mabuchi, Electrochemical stability of self-assembled monolayers on nanoporous Au, Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有, 13 巻, 2011, 12277-12784,  
DOI: 10.1039/c0cp02553d

- ④ 袴田昌高, 千野靖正, 馬淵守, 合金化/脱合金化法による白金板表面へのノポーラス構造形成, 日本金属学会誌, 査読有, 75 巻, 2011, 42-46,  
DOI: 10.2320/jinstmet.75.42

- ⑤ M. Hakamada, Y. Chino, M. Mabuchi, Nanoporous surface fabricated on metal sheets by alloying/dealloying technique, Mater. Lett., 査読有, 64 巻, 2010, 2341-2343,  
DOI: 10.1016/j.matlet.2010.07.046

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 高橋真生, 平嶋英美, 山本太彦, 袴田昌高, 田嶋一樹, 吉村和記, 千野靖正, 馬淵守, ノポーラス金表面における自己組織化単分子膜の安定性, 日本金属学会 2010 年秋期 (第 147 回) 大会, 2010 年 9 月 26 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬淵 守 (MABUCHI MAMORU)

京都大学・大学院エネルギー科学研究科・教授

研究者番号：00358061

### (2) 研究分担者

中野 裕美 (NAKANO HIROMI)

豊橋技術科学大学・研究基盤センター・准教授

研究者番号：00319500

### (3) 連携研究者

袴田 昌高 (HAKAMADA MASATAKA)

京都大学・大学院エネルギー科学研究科・助教

研究者番号：30462849