

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750205

研究課題名(和文) 無機層状半導体が形成する2次元層間に固定した酵素分子による高度光化学変換

研究課題名(英文) Photochemical reaction induced by enzymes intercalated into layered semiconductors

研究代表者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)

長崎大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90315284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では無機層状半導体が形成する2次元層間に生体高分子触媒である酵素を固定し、層状半導体への光照射と引き続いて起こる酵素へのエネルギー移動により層間酵素の触媒能を制御するという、新規な光反応系を構築することを目的とした。単層剥離した層状半導体(酸化物)と酵素分子を適切なpHの水溶液中で混合すると、両者の静電的相互作用により自発的に酵素が層間に固定された。この複合物に紫外線を照射すると酵素活性の発現が見られ、紫外線強度と波長に応じて酵素活性が自在に調節可能な新規な無機-バイオ複合材料であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, enzyme biocatalysts were intercalated into two-dimensional space composed of layered semiconductors, and a novel photo-induced enzymatic reaction of the hybrids was investigated. The layered semiconductors interstratified the enzyme molecules through electrostatic interaction in a solution with an appropriate pH. Ultraviolet light irradiation to the obtained hybrids caused activation of enzymes in the interlayer by photoabsorption of semiconductor and subsequent energy transfer. Moreover, the enzymatic activity could be easily adjusted by UV light intensity and wavelength.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・無機工業材料

キーワード：固定化酵素 層状物質 酸化物半導体 インターカレーション 光触媒

1. 研究開始当初の背景

酵素は高度な基質特異性および反応選択性を有する優れた生体高分子触媒である。さらに、タンパク質を主体とする化学構造であるために、たとえ環境に放出されたとしても微生物により容易に分解され、重金属を含む触媒とは異なり環境負荷の極めて少ない触媒といえる。しかし、酵素は生体由来であるために穏やかな生理条件下でのみ高い活性を発現し、非生理的条件下では容易かつ不可逆的に失活する。このため酵素の工業的利用が制限されてきた。

このような問題を克服するために不溶性の無機粒子（あるいは高分子）の表面や多孔質構造内に酵素を吸着させる「固定化酵素」の研究が進展してきた。しかし、ここでの無機材料は単なる酵素安定化担体としてのみ作用し、電気的、磁氣的、光学的など無機材料が示す多様な機能が併せて利用されることは少なかった。

一方、研究代表者らはこれまで層状金属酸化物の層間に酵素や機能性タンパク質などの生体分子を挿入することで、酵素機能の耐久性向上に留まらず、金属酸化物層の組成に応じた磁性や電気伝導性を生体分子に付与し、磁気分離材や電極材としての新たな利用法を検討してきた。このように、無機物質の独自機能との融合により酵素の活用分野は今後ますます拡大していくものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では無機 酵素複合材料のさらなる発展を目指し、光励起可能な無機半導体層間に酵素を固定した無機 バイオ複合体を合成し、これを用いて光制御可能な酵素反応系を構築する。無機半導体は光励起により酸化還元作用を示す電子 - 正孔対を生成するため、これらの電荷キャリアを半導体に結合した酸化あるいは還元酵素に輸送することで酵素反応を誘導する。すなわち、半導体との協奏により「酵素反応の光制御」を行うのである。

3. 研究の方法

固相反応法によりホストとなる層状酸化物半導体粒子を合成し、層間イオンを水溶液中でイオン交換することでナノメートルサイズに単層剥離した層状半導体のコロイド溶液を調整した。これに種々の酵素（酸化還元酵素：ペルオキシダーゼ、加水分解酵素：セルラーゼ）を添加することで、層間に酵素を含む層状半導体の合成を試みた（図 1）。

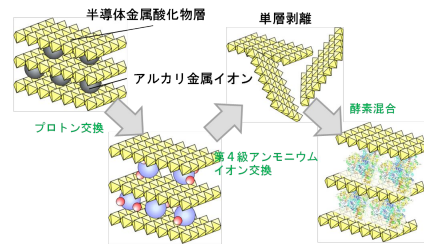


図 1 液相プロセスによる酵素 - 層状半導体の形成

層状半導体の単位重量当たりの酵素吸着量を酵素原液と層状半導体との混合液の遠心分離により複合体を除去した上澄液の紫外可視吸収スペクトルを比較することで定量した。また、層間への酵素の導入はエックス線回折法により層状構造の層間距離の変化を調べることで確認した。

合成した酵素 層状半導体複合体の光励起による酵素活性制御性は次のように評価した。今回、酸化還元酵素である西洋わさび由来ペルオキシダーゼを層間に導入する酵素として選択した。酵素を含む複合体および遊離酵素を pH 6 の緩衝液中に分散させ、ペルオキシダーゼの基質である Amplex Ultrared (AUR) を添加した。この混合溶液に LED 光源からの紫外光（主波長 365 nm）を室温で照射した。AUR はペルオキシダーゼの触媒作用により酸化され蛍光体に変化する。従って、一定時間照射ごとに反応溶液の蛍光強度を測定することで、ペルオキシダーゼによる酵素反応の進行を推定した。

4. 研究成果

(1) 単層剥離した層状半導体を含む溶液に酵素分子（ペルオキシダーゼ、セルラーゼ）を加えると、酵素分子は層状半導体表面に結合して酵素と層状半導体からなる複合体の生成が確認された。この結合は静電的相互作用を介して起こるため、両者の表面電位が互いに反対符号を示す適切な pH の溶液中で混合することが重要であった。本研究で使用した層状半導体（層状チタン酸）は酸性～塩基性の幅広い pH 領域で負の表面電荷を持っている。一方、例えばペルオキシダーゼは pH 5 近傍に等電点を持つため、pH < 5 の弱酸性溶液中で混合することで複合体が形成した。最適 pH（ペルオキシダーゼでは pH 4）における層状半導体の単位重量当たりの結合量は、従来「固定化酵素」の無機担体として用いられてきた材料と比較して大幅に増加した。これは、ナノメートルサイズの厚さの層状半導体が溶液中で巨大な比表面積を持っているためと考えられる。

(2) 酵素を吸着した層状半導体の結晶構造をエックス線回折法により分析した。酵素と結合した複合体の回折角度から求めた層間距離は酵素分子のサイズあるいは結合量とともに増大した。この結果は混合溶液中で剥離した層状半導体が酵素分子を取り込みながら積層し、層状半導体を作り出す2次元層間に酵素が固定されたことを示唆している。すなわち、溶液中での単純な混合により自発的に酵素と半導体層が周期的に配列した積層構造が生成するのである。

(3) 遊離酵素および層間酵素の酵素反応速度を測定することで、層状半導体への固定化が酵素活性に及ぼす影響を調査した。酵素反応生成物の生成速度から求めた活性は層間固定により遊離酵素の約40%まで低下することが分かった。これは、2次元層間に酵素分子が捕捉され、基質との親和性が立体障害により低減したためと考えられた。一方で、固定化した酵素を層間から抽出して活性を評価すると、元の酵素と同等の活性を維持していることが明らかとなった。これは、層間への酵素固定が酵素の本質的な失活をもたらすものではないことを意味している。また、セルラーゼを酵素として用いた場合、高温では遊離酵素と比較して層間酵素が高い活性を示すことがわかり、「固定化酵素」の担体としても層状半導体は有用であることが示された。

(4) 合成した酵素 層状半導体複合材料を対象に、酵素活性の光制御を試みた。

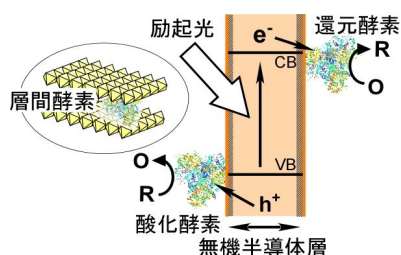


図2 酵素 - 層状半導体による酵素活性の光制御

図2に光制御の予想機構を示している。半導体層のバンドギャップ以上のエネルギーを有する励起光を照射すると、半導体層中に光キャリア（電子、正孔）が生成する。層間に酸化反応を触媒する酸化酵素が吸着していれば、価電子帯に生成した正孔が酸化酵素（本研究ではペルオキシダーゼ）の活性中心に存在する金属イオンを酸化し、酵素は励起状態へと遷移する。引き続き、励起状態の酵素が基底状態へと戻る過程で基質を酸化する（ $R \rightarrow O$ ）。言うまでもなく光照射時のみに酵素反応の起源となる光キャリアが生成す

るため、光エネルギーにより駆動する新しい酵素反応系となりうる。一方、還元酵素であれば、伝導帯に生成した電子を輸送できれば、酵素活性の光制御が可能であろう。本研究では層状半導体にチタン酸、酸化酵素としてペルオキシダーゼ、酸化される基質としてAURを用いて、図2に示される機構の妥当性を検証した。

(5) 遊離ペルオキシダーゼのみ、あるいは層状半導体のみを含むAUR溶液に紫外光を照射した場合、酵素反応生成物の存在を示す蛍光強度の増加はほとんど認められなかった。対照的に、層間にペルオキシダーゼを含む層状チタン酸を含む溶液に紫外光を照射すると、照射時間とともに直線的に溶液の蛍光強度が増加することが明らかとなった。上述のように各単体のみでは反応が起こらなかったことから、層状チタン酸とペルオキシダーゼの協奏効果により酵素反応が進行したと考えられる。また、層状チタン酸の励起には不十分な光エネルギー（長波長光）では反応速度が低下したことから、図2に示す予想機構が妥当であり、かつ層間ペルオキシダーゼ活性が光によって駆動できることが証明された。

(6) 酵素 層状半導体複合材料による酵素活性の光制御に及ぼす種々の要因について検討した結果、以下の知見が得られた。光励起した層状半導体中に生成する光キャリアの密度は光強度に依存するため、照射強度によって層間酵素の反応速度を精密に制御できること。光のオンオフにより酵素活性のスイッチングが可能であること。ペルオキシダーゼ以外の他の酸化酵素でも活性の光制御が可能であること。

(7) 本研究の遂行を通じて、研究目的からは逸脱するが、酵素 層状半導体複合材料に関していくつかの研究結果が得られた。既に述べたとおり層状半導体層間に存在する一部の酵素は耐熱性が向上することが分かったが、同時に層状半導体の光遮蔽能（吸収能）により紫外光に対する安定性も増加することが明らかとなった。また、剥離した層状半導体の積層 剥離挙動が温度という単純な物理的因子によって容易に制御できることが分かった。

(8) 本研究では層状チタン酸のバンドギャップエネルギーを考慮し、紫外線を励起光として層間酵素の活性制御を検討した。長時間の紫外光への露出は酵素分子の活性低下を招きかねない。従って、今後は可視光によって励起可能な層状半導体を用いることで、よ

り長期にわたって駆動可能な酵素反応系へと発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Kai Kamada, Nobuaki Soh, Temperature - Controlled Reversible Exfoliation - Stacking of Titanate Nanosheets in an Aqueous Solution Containing Tetraalkylammonium Ions, RSC Advances, 査読有、Vol.4、No.17、2014、pp.8682-8685

Naoko Fujita, Kai Kamada, Protective Effective of Ceria Nanoparticles on Photo - Oxidative Damage of DNA, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有、Vol.122、No.2、2014、pp.141-145

Kai Kamada, Ayano Moriyasu, Nobuaki Soh, Visible - Light - Driven Enzymatic Reaction of Peroxidase Adsorbed on Doped Hematite Thin Films, The Journal of Physical Chemistry C, 査読有、Vol.116、No.39、2012、pp.20694-20699
Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, Kai Kamada, Soft Surface Modification of Layered Titanate for Biorecognition, The Journal of Physical Chemistry C, 査読有、Vol.116、No.36、2012、pp.19285-19289

鎌田 海, 宗 伸明, 酵素 - 層状セラミックス複合体の合成と融合機能、化学工業、査読無、Vol.63、No.10、2012、pp.39-42

〔学会発表〕(計6件)

鎌田 海, 宗 伸明, 酵素 - 半導体半導体複合材料を利用した酵素反応の光制御、日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム、2013年9月4日~9月6日、信州大学(長野県長野市)

鎌田 海, 小林 寿範, 福田 友, 温度に依存した層状金属酸化物の積層 - 剥離挙動、日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム、2013年9月4日~9月6日、信州大学(長野県長野市)

Kai Kamada, Nobuaki Soh, Visible - Light - induced Enzymatic Reaction of Peroxidase Adsorbed on Hematite Thin Films, The 30th Japan - Korea International Seminar on Ceramics, 2013年11月20日~11月23日、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)

Hisanori Kobayashi, Yu Fukuda, Kai Kamada, Temperature Dependent Reversible Exfoliation - Stacking of

Layered Titanates, The 30th Japan - Korea International Seminar on Ceramics, 2013年11月20日~11月23日、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)

Takaharu Ikeda, Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, Kai Kamada, Layered Iron - Titanate as a Physicochemically Stable Support for Hydrolase, 4th International Congress on Ceramics, 2012年7月15日~7月19日、Sheraton Chicago Hotel & Towers, Chicago, USA
Kai Kamada, Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, Fluorescent Inorganic Titanate Layers as Bioaffinity Reaction Markers, International Symposium on Rare Earths 2012 in Okinawa for the 30th Anniversary of The Rare Earth Society of Japan, 2012年11月7日~11月9日、沖縄ハーバービューホテルクラウンプラザ(沖縄県那覇市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)
長崎大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90315284

(2)連携研究者

宗 伸明 (SOH, Nobuaki)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：90336008