

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410244

研究課題名(和文) 酵素および無機層状半導体の集積による協奏的光機能の発現

研究課題名(英文) Synergistic photo-functions of integrated materials composed of enzymes and inorganic layered semiconductors

研究代表者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90315284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：無機層状半導体と生体分子を結合し、両者の機能性の融合を試みた。生体分子として酸化還元酵素を可視光応答性の層状半導体の層間に挿入すると、酵素の触媒活性を可視光照射によって制御できることが明らかとなった。また、可視光応答型半導体光触媒に発光タンパク質を結合させると、発光タンパク質由来の光エネルギーにより半導体を励起可能であることを明らかにした。この結果は、発光生体分子が半導体光触媒の光源として動作することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated synergistic functions of hybrid materials consisting of inorganic layered semiconductors and biomolecules. It was revealed that redox enzymes as biomolecules are intercalated into interlayer space of layered semiconductors with a narrow band gap, then enzymatic activity can be manipulated by visible light irradiation to the hybrids. On the other hand, binding of photoproteins to semiconductors achieved excitation of the semiconductor with bioluminescence, implying that photoproteins can be employed as an internal light source for semiconductor photocatalytic reaction systems without any external one.

研究分野：無機材料化学

キーワード：無機-バイオ複合材料 ナノシート 半導体 光触媒 酸化還元酵素

### 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(例えば、高温、酸性/塩基性)では不可逆的に失活する。このため、酵素の生体外利用が制限されている。

このような問題を克服するために不溶性の無機粒子の表面に酵素を吸着させる「固定化酵素」の研究が進展してきた。この場合、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持つ多様な物性が利用されることはなかった。一方、研究代表者らは固定化担体として多様な機能性を示す無機層状半導体を用い、層間に酵素を挿入した新しいタイプの固定化酵素について検討してきた。この担体を用いると酵素の耐久性向上に留まらず、無機層の組成に応じた磁性や電気伝導性を付与し、磁気分離能や電極機能を持つ酵素として利用できることを証明した。さらに、層間に固定された酵素の活性が紫外線照射に伴う半導体層の励起、および半導体から酵素へのエネルギー移動により酵素活性が光によって制御可能であることを見出してきた。このように、無機層状半導体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ことが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では上述の研究背景を踏まえ固定化担体として光感受性を備えた無機層状半導体を選択し、その層間に酵素を挿入し、この複合材料を利用した「酵素と半導体の協奏機能に基づく新規光反応系」をさらに発展させる

ことを目的とした。

具体的には2種類の反応系、すなわち、  
反応系1「酸化還元酵素 - 無機層状半導体を用いた酵素活性の可視光制御」  
反応系2「発光生体分子 - 無機半導体を用いた自己光源型光触媒の開発」  
の実現に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

上述の反応系1に適用するために可視光応答可能な無機層状半導体として鉄をドーブした層状チタン酸を選択した。塩化鉄およびチタンテトライソプロポキシドのエタノール溶液に水酸化テトラブチルアンモニウム溶液を加え、金属(チタン、鉄)を加水分解することで黄色透明な鉄ドーブ層状チタン酸コロイド溶液を得た。層状半導体と酵素の複合化は両者の水溶液を適切なpHで単純に混合することで行った。ここで、酵素として西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)を使用した。この複合体およびHRPの反応基質としてAmplex Ultrared(AUR)を含む水溶液に可視光(青色)を照射した。無蛍光性AURはHRPにより酸化し蛍光分子へと変化するため、これに対応する反応溶液の蛍光強度の時間変化を測定することで可視光駆動型酵素反応の進行を調査した。

一方、反応系2に適用するための光触媒として白金をドーブしたn型半導体酸化鉄薄膜を光無電解反応により合成した。酸素飽和した塩化鉄と塩化白金酸の混合溶液に白金板を浸し、この表面に可視光を照射した。24hの反応後、黄色透明な薄膜が形成した。これを800°Cで1h焼成することで酸化鉄薄膜を得た。この表面に内部光源としての発光タンパク質としてイクオリンを吸着させた。その後、イクオリンの発光基質となるカルシウムイオンを作用させた。イクオリン由来の発光により酸化鉄の励起は、酸化鉄のバンドギャップ励起により発生した伝導電子を光電流

として測定することで評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 反応系 1 に関して、初めに合成した鉄ドーブチタン酸コロイド溶液の特性評価を行った。コロイド粒径は 10 nm 以下と極めて小さく高い分散安定性を示した。また、光吸収スペクトルを測定すると鉄含有量の増加とともに吸収スペクトルはより長波長側へとシフトし、可視光応答性の増大が示唆された。次に、この鉄ドーブチタン酸コロイドと酸化還元酵素 HRP を結合させた。以前の研究結果より前者は等電点が pH = 2, 後者は pH = 5 近傍であったことから、pH = 4 の pH 緩衝液中で両者を混合した。すなわちこの pH では前者は負に後者は正に帯電するため、両者は静電的に結合（複合化）するのである。

引き続き、この複合体と HRP の基質としての AUR の混合溶液に可視光を照射した。一般的に AUR は HRP と過酸化水素の存在下で酸化し蛍光体へと変化する。一方、本研究では過酸化水素を用いず、鉄ドーブチタン酸（半導体）への可視光照射および HRP へのエネルギー移動により HRP を活性化し AUR を酸化するという酵素反応の可視光駆動を目指した。研究代表者等の以前の研究では同様の複合体に対する紫外線照射により酵素活性が発現することを既に見出している。しかし、紫外線照射は酵素分子の失活を同時に招きかねない。したがって、より穏和なエネルギーを持つ可視光により酵素活性の制御が可能であれば、この複合体の活用分野がさらに広がると考えられる。

複合体と AUR の混合溶液への青色光照射により AUR 酸化由来の蛍光強度が時間とともに連続的に増加した。この結果は予想される酵素活性の可視光制御が実現可能であることを示唆している。また、酵素反応速度は光照射のオンオフあるいは照射波長の長短（エネルギーの大小）により緻密に調整でき

ることを明らかにし、反応系 1 に関する研究目標を達成した。

(2) 反応系 2 に関して、まず光無電解反応により合成した白金ドーブ酸化鉄薄膜の物性評価を行った。ラマン分光測定により得られた薄膜の主相は酸化鉄の熱力学的安定相であるヘマタイト型 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 結晶構造であり、微量のマグネタイト相 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) を含んでいた。また、エックス線光電子分光分析により共存させた白金は 4 価のイオン ( $\text{Pt}^{4+}$ ) として酸化鉄に固溶することを明らかにした。 $\text{Fe}^{3+}$  位置への  $\text{Pt}^{4+}$  の置換固溶により、酸化鉄の電気的中性を維持するため、伝導電子濃度が増加し酸化鉄の電気伝導性が向上し、より活性の高い光触媒として機能することが期待された。

生成した白金ドーブ酸化鉄薄膜を発光タンパク質であるイクオリン溶液に浸すと薄膜表面に物理吸着した。このイクオリン吸着薄膜に基質であるカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を作用させると、イクオリンからの青色発光を酸化鉄が吸収し、結果として生成する光励起電子を電流値として観測することに成功した。この結果は、発光生体分子（タンパク質、酵素）を内部光源とした光触媒反応の実現性をほのめかすものである。

(3) 上述の研究と同時に、酵素および無機層状半導体の複合体に関していくつかの新しい知見が得られた。

酵素あるいは機能性タンパク質が低濃度の領域では層状チタン酸との共存により酵素活性が大幅に向上する。

セリウムをドーブした層状チタン酸自体が高い酵素模倣活性を示す。

種々の金属イオンをドーブした層状ニオブ酸が多色フォトクロミズムを示す。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kai KAMADA, Keiichiro TAKEYAMA, Eri YOSHIDA, Nobuaki SOH, Photoprotein as an internal light source for a photoelectrochemical cell employing a semiconducting oxide electrode, *J. Ceramics Soc. Jpn.*, 査読有, Vol. 125, No. 4, 2017, pp. 190-192.

DOI: 10.2109/jcersj2.16270

Kai KAMADA, Yosuke TANAKA, Motoko TOKUNAGA, Taro UEDA, Takeo HYODO, Yasuhiro SHIMIZU, Multicolour photochromism of colloidal solutions of niobate nanosheets intercalated with several kinds of metal ions, *Chem. Commun.*, 査読有, Vol. 52, No. 16, 2016, pp. 3308-3311.

DOI: 10.1039/C5CC09270A

Kai KAMADA, Akane YAMADA, Misato KAMIUCHI, Motoko TOKUNAGA, Daiki ITO, Nobuaki SOH, Synergistic functions of enzymes bound to semiconducting layers, *Methods in Enzymology*, 査読有, Vol. 571, 2016, pp. 113-134.

DOI: 10.1016/bs.mie.2016.03.002.

Kai KAMADA, Daiki ITO, Nobuaki SOH, Visible-light-induced activity control of peroxidase bound to Fe-doped Titanate nanosheets with nanometric lateral dimensions, *Bioconjugate Chem.*, 査読有, Vol. 26, No. 10, 2016, pp. 2161-2166.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00464

Kai KAMADA, Akane YAMADA, Nobuaki SOH, Enhanced catalytic activity of enzymes interacting with nanometric titanate nanosheets, *RSC Adv.*, 査読有, Vol. 5, No. 104, 2015, pp. 85511-85516.

DOI: 10.1039/C5RA14848K

Kai KAMADA, Nobuaki SOH, Enzyme mimetic activity of Ce intercalated titanate nanosheets, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, Vol. 119, No. 16, 2015, pp. 5309-5314.

DOI: 10.1021/jp512038x

Kai KAMADA, Nobuaki SOH, Enhanced visible light induced photocatalytic activity of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> adsorbing redox enzymes, *J. Asian Ceram. Soc.*, 査読有, Vol. 3, No. 1, 2015, pp. 18-21.

DOI: 10.1016/j.jascr.2014.10.004

Kai KAMADA, Intense emission from photoproteins interacting titanate nanosheets, *RSC Adv.*, 査読有, Vol. 4, No. 81, 2015, pp. 43052-43056.

DOI: 10.1039/C4RA05665E

〔学会発表〕(計 10 件)

Kai KAMADA, Keiichiro TAKEYAMA, Photoelectrochemical reaction of oxide semiconductors induced by bioluminescence, the 18th International Symposium on Eco-materials

Processing and Design (ISEPD2017), 2017.02.18, 沖縄自治会館 (沖縄県・那覇市).

Keiichiro TAKEYAMA, Kai KAMADA, Photoelectroless deposition of Pt-doped hematite thin films for photoanodes, the 18th International Symposium on Eco-materials Processing and Design (ISEPD2017), 2017.02.18, 沖縄自治会館 (沖縄県・那覇市).

Eri YOSHIDA, Takeshi NAGAYASU, Kai KAMADA, Antibacterial effect of ceramic nanosheets adsorbing tetraalkylammonium cations, the 18th International Symposium on Eco-materials Processing and Design (ISEPD2017), 2017.02.18, 沖縄自治会館 (沖縄県・那覇市).

鎌田 海, 上田太郎、兵頭健生、清水康博、バイオルミネセンスを励起源とする光電気化学セル、日本セラミックス協会九州支部秋季合同発表会、2016.11.04、長崎大学 (長崎県・長崎市).

Eri YOSHIDA, Takeshi NAGAYASU, Kai KAMADA, Development of antibacterial titanate nanosheets for medical devices, European Materials Research Society 2016 Fall Meeting, 2016.09.20, Warsaw (Poland).

Kai KAMADA, Enzyme-mimetic activity of inorganic nanosheets including cerium ions, Rare Earths 2016, 2016.06.05, 北海道大学 (北海道・札幌市).

Kai KAMADA, Taro UEDA, Takeo HYODO, Yasuhiro SHIMIZU, Photochemical activity control of redox enzyme bound to semiconducting layers, The 14th International Union of Materials Research Societies-International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM2015), 2015.10.29, Jeju (Korea).

鎌田 海、希土類酸化物ナノ材料の合成手法の開拓と生化学的应用、第 3 2 回希土類討論会、2015.05.24、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市).

Kai KAMADA, Hisanori KOBAYASHI, Taro UEDA, Takeo HYODO, Yasuhiro SHIMIZU, Enzyme mimetic activity of Ce-doped titanate nanosheets, The 31st Korea-Japan Seminar on Ceramics, 2014.11.27, Changwon (Korea).

Kai KAMADA, A novel functional nanohybrid consisting of semiconducting layers and biomolecules, The 2nd Annual Meeting of the Korean Clay Science Society, 2014.07.04, Wonju (Korea).

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号：9 0 3 1 5 2 8 4