

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26280053

研究課題名(和文) 匂い成分を認識触媒する多様なNADH系酵素を用いた高感度な生化学式蛍光ガスセンサ

研究課題名(英文) High sensitive bio-fluorometric gas sensors using NADH-dependent enzymes catalyzing odorous chemicals

研究代表者

三林 浩二 (Mitsubayashi, Kohji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：40307236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：匂い成分の高感度計測を目指し、高輝度UV-LEDを励起光源とした補酵素NADH蛍光検出系を脱水素酵素に組合せ、生化学式蛍光ガスセンサを開発した。本センサにて、アルデヒド脱水素酵素による加齢臭成分ノネナル、アルコール脱水素酵素の逆反応によるアセトアルデヒド、ホルムアルデヒド脱水素酵素を用いたホルムアルデヒドの各ガス計測(ppb・sub-ppbレベル)を実現し、新規な人工嗅覚の構築の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Several biochemical gas sensors were developed using an NADH fluorometric unit with a UV-LED excitation and several dehydrogenase enzymes for high sensitive detection of odorous chemicals. As the results, the sensors allowed to monitor the concentration of volatile chemicals (nonenal by ALDH, acetaldehyde by ADH and formaldehyde by FALDH, respectively), thus showing the possibility of novel artificial nose.

研究分野：情報学

キーワード：生化学式蛍光ガスセンサ NADH 脱水素酵素 還元酵素 光計測

1. 研究開始当初の背景

視覚や聴覚などの知覚情報が高度化し産業化されるなか、嗅覚情報に相当する匂い(揮発性化学情報)の情報化は進んでおらず、社会が求めるニーズにはほど遠いレベルにある。もちろん匂いセンサとして、半導体ガスセンサや、QCM、SPR等の研究が進められ、匂い成分の認識、可燃性危険物の検出、食品工程への匂い評価などへの応用が行われている。加えて生体臭による疾病スクリーニングや代謝診断が急務であり、匂いの情報化は21世紀において極めて重要な課題である。研究代表者らは医療用バイオセンサの技術を用い、これまでに生体認識素子(酵素や抗体)を利用し、多様な生化学式ガスセンサ(バイオスニファ)を開発してきた。このバイオスニファは、生体素子の認識機能により極めて高い選択性を持つことから、他のガス成分や湿度の影響を受けない、さらに電気化学や光計測などの多様な検出系との組み合わせが可能で、高感度化や広いダイナミックレンジを実現できる利点がある。例えば、飲酒後の呼気のアルコールガスやアセトアルデヒドガスを、口臭等に影響されることなく、検知・定量することが可能である。つまり、センサがガス成分に高い選択性を持ち、匂い成分を情報化することが可能である。

さらに研究代表者らは酵素や抗体などの生体反応を介して、匂い成分を高感度に光学計測することに成功した。近年、開発が進んでいる紫外線領域の発光ダイオード(UV-LED)を励起光源として用い、匂い成分をモニタリングできることを示し、低検出限界:750pptを達成し、嗅覚閾値(800ppb)より1000倍以上の高感度化を可能とした。この蛍光計測ではホルムアルデヒド脱水素酵素を用い、その際に補酵素である酸化型NADは電子受容体として機能し、匂い成分を分解する。その反応において、酸化型NADが電子を受容することで還元型NADHが生成される。この還元型NADHは蛍光特性を有しており、339nm近傍の励起光を照射することで、可視光領域の491nm近傍にて蛍光を発する。この蛍光を光検出器で捉えることで、匂い成分を検知し、その蛍光強度で成分濃度を測定することができる。そこで、UV-LED(335nm)を励起光源として導入し、波長のズレを光学フィルタで補うことで、安定したNADH計測系を開発した。そして脱水素酵素と組み合わせることで、小型かつ低消費電力の高感度(sub-ppbレベル)の光学式匂いセンサを開発した。このセンサでは他の脱水素酵素へと交換するだけで多様な成分計測が可能である。

しかし、NADHのUV-LEDによる蛍光計測には幾つか問題点がある。LEDは波長特性に優れる故に、LEDのピーク波長(335nm)のズレはNADHの励起(339nm)にロスを生じ、そのズレを補正するために光学フィルタ(バンドパスフィルタ)を用いることで、さらに光学強度にロスを生む。また生体触媒を用いた蛍光計

測では、緩衝液や補酵素の影響により、NADHの励起波長が各測定系にて影響を受け、NADHの励起波長は一定でない。また生体触媒を光ファイバに固定化する高分子材料に自家蛍光がありノイズを与える。他に、現有のUV-LEDは出力が小さく、デバイス間のバラツキが大きい等の問題がある。つまり、NADHの蛍光計測系はまだ最適状態でなく、最適化を図ることで、NADHの検出感度は更に向上し、これまでの匂い計測系の感度も向上させることができる。加えて、NADHの高感度計測は他の酵素系を使ったセンサ開発が可能となる。これまで脱水素酵素の反応生成物であるNADHの検出を進めてきたが、NADHの高感度計測が可能になることで、酵素反応で基質となるNADHの消費(減少)を高感度に捉えることで新しい匂いセンサが開発できる。NADHを基質とする酵素には、多様な還元酵素系があり、多様な匂い成分を対象とした匂いセンサの開発が可能となる。

そこで、最適化されたNADH蛍光計測系を構築することで、高感度(ppt及びsub-pptレベル)の光学式匂いセンサを開発し、さらに脱水素酵素系だけでなく、NADHを基質とし還元酵素系を用いることで多様な匂い成分を対象としたセンサを構築する。本センサシステムは「匂い情報を光情報へと変換」できることから、空間を拡散する匂い成分をモニタリングする新しい人工嗅覚システムへと展開できる。

2. 研究の目的

本課題では五感情報の中でも、最も研究と産業化が遅れている匂い情報について、代表者らが開発した「生化学式ガスセンサ」を高感度化(ppt及びsub-pptレベル)し、そして多成分へ対応化し、匂いセンサの新たなブレークスルーを成すことを目標とする。研究ではまず多様な脱水素酵素系や還元酵素系での補酵素であるNADH(又はNADPH)について、その蛍光(em. 339nm近傍、flu. 491近傍)を高感度に蛍光計測するため、励起蛍光スペクトル解析にて最適条件を求める。その結果をもとに最適波長の高輝度UV-LEDを導入し、高感度なNADH計測系を構築する。さらに新規な高感度フォトマルチプライアや自家蛍光を抑制した高分子を独自に合成し酵素の固定化に用いることで、その反応生成物(又は基質)であるNADH(又はNADPH)を蛍光測定し、極低濃度レベル(ppt及びsub-ppt)での匂い成分モニタリングが可能で新規な人工嗅覚へと発展させる。将来は、高輝度UV-LEDはアレイ化することで、匂いの可視化(二次元、三次元情報)へと発展可能な研究である。

3. 研究の方法

初年度は既製品である340nmのピーク波長を有する高輝度UV-LEDを購入し、既存の光源ユニットに組み込むことで励起光源を作

製し、NADH 蛍光計測系を構築した。本センサに各種の脱水素酵素を用い、一般的なアルコール類（エタノール）などの匂い成分を対象とする蛍光式匂いセンサを試作した。次に、NADH を基質とする還元反応を触媒する酵素として、キラル（不斉）合成酵素であるエノン還元酵素(enone reductase)を用いて、加齢に伴う生体臭である trans-2-ノネナールを蛍光測定するセンサを構築した。エノン還元酵素はケトンやアルデヒドと共役した炭素-炭素二重結合を還元することから、この酵素を用いることでノネナールを、NADH を補酵素として還元触媒することで、ノネナールガス用のセンサを構築した。また NADH を基質とする還元反応を触媒する酵素として、脱水素酵素（ADH）の逆反応を利用したセンサの試作を進め、溶液中のアセトアルデヒドの測定を可能とし、気相でのアセトアルデヒドガス計測に展開した。次年度にはガスセンサにおいて、脱水素酵素ならびに還元酵素の補酵素である還元型 NADH を高感度に蛍光計測するために、高輝度 UV-LED と高感度フォトマルチプライアを導入し、自家蛍光を抑制した酵素固定化用のポリマーの合成を進めた。酵素固定化では、担持膜として蛍光特性が少ない親水性 PTFE 膜を選択し、包括固定化用の高分子材料 PMEH を独自に合成し、作製した脱水素酵素膜を先端感応部に装着して用いた。次にガス計測では、感応部にガス成分やその代謝産物が蓄積を防ぐため、嗅覚の粘膜層に相当する自作の洗浄セルを光ファイバ先端に取り付け、NADH 溶液の循環システムを組み込んだ。最終年度では、酸化還元酵素による計測対象を増加させると共に、これまでに構築した高感度な蛍光式匂いセンサシステムについて、計測条件の最適化を実施した。

4. 研究成果

研究代表者らは加齢臭成分である trans-2-ノネナールについて、ケトンやアルデヒドと共役した炭素-炭素二重結合を還元するキラル（不斉）合成酵素であるエノン還元酵素(enone reductase)を利用することで NADH を補酵素として還元触媒し、その触媒反応での NADH の消費を高感度な NADH 計測系で捉えることで、新たにノネナールガスの検知を可能とした。また脱水素酵素を用いた反応系では、正反応での NADH の増加を観察し、アルデヒド（ノネナール）溶液の逆反応での NADH 減少の検出による測定の可能性を見出した。次に、光学系において高輝度 UV-LED と高感度フォトマルチプライアの導入を行い、また酵素固定化において蛍光特性が少ない親水性 PTFE 膜を担持膜として選択し、生体適合性ポリマー MPC を改良することで包括固定化用の高分子材料 PMEH を独自に合成し、導入した分光蛍光光度計にて特性を調べた後に、脱水素酵素膜を作製し先端感応部に装着して用いた。また嗅覚の粘膜層に相当する

自作の洗浄セルを光ファイバ先端に取り付けたガスセンサを構築し、本システムにアルコール脱水素酵素（ADH）を適用し、酸性環境下での逆反応によるアセトアルデヒド溶液の蛍光測定に供した結果、逆反応での至適 pH が pH6.5 であることを見出し、逆反応における NADH の減少を蛍光検出することで、2-1000 μ M の範囲でアセトアルデヒド溶液の測定を実現した。なお定量特性は初期の NADH 濃度に依存する知見が得られた。なお、感応部にガス成分やその代謝産物が蓄積を防ぐため、嗅覚の粘膜層に相当する自作の洗浄セルを光ファイバ先端に取り付け、NADH 溶液の循環システムを組み込むことで、アセトアルデヒドガスの連続計測に成功した。また、代表的な揮発性有機化合物(VOC)の一種として知られ、国際がん研究機関において「発がん性が認められるグループ 1」に分類されている「ホルムアルデヒド」についても、UV-LED を用いた光学系とホルムアルデヒド脱水素酵素（FALDH）を隔膜とするフローセルを組み合わせることで、sub-ppb である 0.75 ppb から 10 ppm の濃度範囲でホルムアルデヒドガスの定量を可能とし、当初の目標と達成した。なお高感度化を図るため、センサ用の気液セルに送液する緩衝液の作製のため、超純水製造装置を導入した。次に多様な匂い成分が混合した複合臭気でのセンサ特性（選択性）評価を実施した結果、酵素の基質特異性に基づき、極めて高いガス選択性でホルムアルデヒドガスを検知かつ連続モニタリングできることを確認した。以上のように、多様な酸化還元酵素の正反応・逆反応を利用することで、ホルムアルデヒド、エタノール、アセトアルデヒド、アセトン、イソプロパノール、ノネナールなどの光学連続計測を可能として計測対象を増加させることに成功した。また、酵素の種類を変更することで多様な揮発性成分の計測が可能であることを見出し、新規な人工嗅覚の構築の可能性を示すことができた。

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 2 件)

(1) Po-Jen Chien, Ming Ye, Takuma Suzuki, Koji Toma, Takahiro Arakawa, Yasuhiko Iwasaki, Kohji Mitsubayashi, Optical isopropanol biosensor using NADH-dependent secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH), *Talanta* 159 (2016) 418–424. 査読有り
doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.036

(2) Suzuki Y, Ye M, Miyajima K, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, A fluorometric biochemical gas sensor (biosniffer) for acetaldehyde vapor based on catalytic reaction of aldehyde dehydrogenase, *Sensors and Materials*, 27 (2015) 1123-1130. 査読有り

〔学会発表〕(計 4件)

(1) 三林浩二、日常医療のためのキャピタス(体腔)センサと生体ガスのバイオ計測(光スニファ&探嗅カメラ)、応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会講習会「バイオセンシングの新展開」、主催：有機分子・バイオエレクトロニクス分科会、日時：2016年11月7日(月)、会場：東京理科大学 森戸記念館(東京都、新宿区)。

(2) 簡 伯任、叶 明、當麻浩司、荒川貴博、工藤寛之、三林浩二、ホルムアルデヒド用バイオスニファ(生化学式ガスセンサ)と環境浄化評価への応用、第47回化学工学会秋季大会、2015年9月9-11日、北海道大学札幌キャンパス(北海道、札幌市)。

(3) 森英久、叶明、當麻浩司、荒川貴博、三林浩二、加齢臭成分 trans-2-ノネナールの気相バイオセンシングに関する研究、平成27年電気学会全国大会、2015年3月24-26日、東京都市大学(東京都、世田谷区)。

(4) Jen Chien P, Miyajima K, Munkhjargal M, Toma K, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, Highly sensitive fiber-optic formaldehyde gas sensor (biosniffer) for food-sample detection, International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications (Bio4Apps) 2014, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai, China), November 17-19, 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/inst/inst-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三林 浩二 (MITSUBAYASHI, Kohji)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号：40307236

(2) 研究分担者

荒川 貴博 (ARAKAWA, Takahiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師
研究者番号：50409637

當麻浩司 (TOMA, Koji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40732269