

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01961

研究課題名（和文）多孔質構造の制御を基盤とする拡散律速型バイオセンシング

研究課題名（英文）Diffusion-limited biosensing based on the porous electrode

研究代表者

北隅 優希（Kitazumi, Yuki）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00579302

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）：クライオ電子顕微鏡法を用いることで、電極との電子移動特性に優れたいくつかの酸化還元酵素の立体構造を解明した。その結果、電気化学バイオセンサの基本反応である酵素電極間の電子移動反応を支配する要因として、電極表面における酵素の配向に加え、酵素内の芳香属性アミノ酸の配置が重要であることを見出した。また、参照電極から流出した重金属イオンによる酵素の失活に対して簡便かつ有効な保護法を確立した。さらに、微小電極バイオセンサの安定性を向上させるための電極設計指針を整理した。また、電極表面から溶液沖合までの電気化学測定系を統一的に表現可能なシミュレーション技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体や環境モニタリングは近年ますます重要度を高めている。その中で、安定性が高く、都度校正の不要な電気化学バイオセンサの構築技術は必須のものである。本研究では、微小電極を用いた拡散律速型バイオセンサの開発を進めてきた。その中で、いかに酵素電極間の電子移動反応を加速するか、が重要であることはすでに知られていた。本研究によって電極との電位移動特性に優れた酵素の立体構造が明らかとなり、電極表面の分子配向と、酵素を構築するアミノ酸の配置の重要性が示された。この一般指針は今後のバイオセンサ開発に伴う酵素探索において欠くことのできないものである。

研究成果の概要（英文）：Three-dimensional structures of several redox enzymes that have excellent electron transfer characteristics with electrodes are determined by cryo-electron microscopy. The results show the importance of the orientation of the enzyme on the electrode surface and the existence of aromatic amino acids within the enzyme to the electron transfer reaction between enzymes and electrodes. We also established a simple and effective method for protecting enzymes at the electrode surface from inactivation caused by heavy metal ions leaked from the reference electrode. Furthermore, we organized the guidelines of electrode design to improve the stability of microelectrode biosensors. We have also developed a simulation model that can uniformly formulate the electrochemical measurement system from the electrode surface to the bulk of the solution.

研究分野：電気分析化学

キーワード：酵素電極反応 酸化還元酵素 分子配向 デジタルシミュレーション バイオセンサ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化還元酵素反応と電極反応の共役系は酵素電極反応と呼ばれる。酵素が電極と直接電子授受を行う場合は直接電子移動型 (DET 型) 酵素電極反応と呼ばれる。酵素の酸化還元中心は絶縁性のポリペプチドに囲まれた構造であるため、電極との電子移動はトンネル現象で生じる。酸化還元中心と電極の距離は電極上での酵素分子の配向によって決まるため、DET 型酵素電極反応において酵素の配向は極めて重要な意味を持つ。これまで様々な酸化還元酵素において DET 型酵素電極反応が報告されてきたが、多くの報告例は多孔質電極を用いたものであり、そして電極表面の化学修飾の影響に関する議論に終始している。しかしながら、多孔質電極の構造に関する議論は乏しく、その理解はいまだに成熟していない。酵素の配向を考慮すると電極上の微細孔の大きさが酸化還元酵素の大きさに近いほど酵素の配向の影響が緩和され、DET 型酵素電極反応に有利になることが理論的に予測されているが、微細孔に酵素は侵入できないといった議論もなされている。このように多孔質電極上での DET 型酵素電極反応に関する議論はいまだ黎明期にあるといえる。

2. 研究の目的

本研究は多孔質電極と酸化還元酵素間の電子授受反応を詳細に解明し、出力および再現性に優れたバイオセンサ構築の基礎となる酵素電極の基礎的解明を目的とする。そのためには、高電流密度で作動する酵素電極を開発する必要がある。酵素配向の制御法と酸化還元酵素の解析技術を改良し、拡散により制限された物質輸送をバイオセンサに応用することで、センサの定常性を向上することができる。また、センサの外乱に対する安定性を向上させることも本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 直接電子移動型の酵素電極反応特性に優れた酸化還元酵素に対してクライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子像解析により立体構造の取得を行った。取得された酸化還元酵素の立体構造に基づき、アミノ酸配列に対して種々の変異を導入した酸化還元酵素を作成し、それぞれの酵素機能電極に対する電気化学測定を実施した。

(2) デジタルシミュレーションに基づく予想をもとに様々な形状の電極を作成し、それらのバイオセンサとしての特性評価を行った。また、電極溶液間の電気二重層から基質の拡散に由来する拡散層までを一貫して評価するためのモデル開発を行った。

4. 研究成果

(1) 生物電気化学と立体構造解析を組み合わせた直接電子移動型酵素の反応機構解明

クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子像解析の技術を用いることで、直接電子移動型酵素電極反応において極めて高い活性をもつ酢酸菌由来のフルクトース脱水素酵素 (FDH) の立体構造を取得した。また、同様に酢酸菌由来のアルコール脱水素酵素 (ADH)、酢酸菌由来のアルデヒド脱水素酵素 (AldDH)、メタノール資化生菌由来のタンゲステン含有ギ酸脱水素酵素 (FoDH1) についても立体構造の取得に成功した。FDH では、これまで存在の知られていなかった鉄硫黄クラスターの存在が明らかになった。そして、立体構造と、生物電気化学的手法による酵素機能電極の特性評価の結果を突き合わせることで、電極と反応していると考えられる酵素内酸化還元中心を特定するに至った。

FoDH はギ酸と二酸化炭素の酸化還元および NAD^+ と NADH の酸化還元を両方向かつ可逆に触媒する酵素である。FoDH は直接電子移動型の酵素電極反応を実現できることからバイオセンサ用の酵素機能電極として大きな魅力を持ち、さらに NAD^+ 依存型酵素と組み合わせることで複合型の酵素機能電極を構築できる極めてバイオセンサ構築に適した酵素である。しかしながらこれまで立体構造がわからず、酵素内電子伝達経路も不明なままであった。そこで、クライオ顕微鏡技術を駆使することで FoDH の立体構造を解明し、また、酵素内部の電子伝達経路を明らかにした。さらに、電極反応部位であろう鉄硫黄クラスターを同定した。そして、FoDH の表面特性を明らかにすることで酵素機能電極の特性をさらに向上させるための知見を得た。これらの構造生物学的かつ生物電気化学的な精査により、FoDH1 は、内部に複数持っている鉄硫黄クラスターのうち酸化的酵素電極反応と還元的酵素電極反応において用いられる電極反応部位が異なる可能性が示され、これは類似の報告のない新たな気づきといえる。

これまで、電極表面に吸着した酵素の配向に関して、電極の表面修飾に基づき酵素内の電極活性酸化還元中心近傍の表面特性を議論していたが、これらの観測が実現したことで、より具体的に電極表面における酵素の配向議論が可能になった。また、さらに、電極活性酸化

還元中心と電極の間に芳香属性のアミノ酸が位置することが、直接電子移動型酵素電極反応を実現するうえで重要な因子であることを見出した。この発見は従来考えられてきた、酵素内の電極反応部位が電極に近いことが、酵素電極反応を実現する上でのカギという概念を更新するものである。本研究により、電極反応部位と電極の間に芳香族性のアミノ酸を持つことが、酵素電極間の電子移動反応を促進することが明らかとなった。これらの知見によって、今後直接電子移動型の酵素電極反応を実現可能性のある酵素のスクリーニングがより効率的に実施可能になる。さらに、構造生物学的なアプローチにより、通常は電極との間での電子移動を実現不可能な酸化還元酵素に適切な変異を導入することで、電子移動を実現できる可能性が生まれた。これは、バイオセンサ開発を大いに加速するものである。

また、ADHの酵素機能電極において生物電気化学的な精査を行ったところ、酵素電極反応の特性がシアニ化物イオンの共存によって大きく変化することを見出した。酵素内部の電子移動について精査したところ、電極に電子授受しているヘムcはシアニ化物イオンに対して感受性がなく、内部にシアニ化物イオン感受性のヘムを含んでいることが明らかになった。さらに、ADHとAIDHを組み合わせることで、一つの電極上でエタノールをアセトアルデヒドに、そして酢酸にまで酸化可能なカスケード型の酵素機能電極の開発に成功した。これは、バイオセンサ的な応用における有用性のみならず、バイオ燃料電池のエネルギー密度を二倍に増強するものである。

電極表面における酵素の配向制御の新たな戦略として、酵素表面の糖鎖修飾を試みた。具体的には、具体的には電気化学バイオセンサにおける酵素機能電極の構成要素として優れた特性を示すビリルビンオキシダーゼ(BOD)表面の糖鎖を除去した変異型BODおよび糖鎖ミミックを結合させた変異型BODについて生物電気化学的な精査を行った。酵素内の電極反応部位が酵素の方を向くために積極的に電極表面を修飾するのではなく、電極反応部位と反対側の酵素表面に大きな糖鎖ミミックを結合させたところ、電極表面におけるBODの配向がより揃うという結果が得られた。この事実より、酵素配向制御の選択肢が広がったことも本研究の成果として挙げられる。

(2) 基質の拡散律速となる条件で作動する電気化学バイオセンサの形状について基質輸送のデジタルシミュレーションに基づいて種々の検討を行い、目的に応じた電気化学バイオセンサの設計指針を確立した。具体的には、気泡付着型電極という新奇な電極反応系を開発した。従来より、気体の液体への溶解速度は気液反応を解析する上で重要な物理量であるが、溶解と拡散の寄与の分離が困難であり、両者の合算のみが評価されてきた。しかしながら、本法を利用することで両者の分離が可能となることが、シミュレーションにより見出した。そしてその実証として、水溶液への酸素溶解速度の決定を行った。多孔質金電極表面に酸素還元活性の高い銅輸送酵素を吸着させることで、きわめて早い酸素還元を実現した。その酵素機能電極の表面に酸素気泡を付着させて酸素還元電流を測定した。そしてシミュレーション結果と突き合わせることで、気泡からの酸素の溶解と拡散を分離して評価することが可能となった。

また、実用的な電気化学バイオセンサは酵素機能電極の近傍に参照電極が配置される。参照電極とくに幅広く用いられる銀塩化銀電極から溶出する銀イオンが、酵素機能電極の活性を低下させること、その不活性化の定量的な評価を実施した。具体的にはBODの直接電子移動型酵素電極反応を追跡することで、銀イオンによる酵素活性低下の速度論的解析を行った。本酵素に対する銀イオンの影響は事実上一次反応とみなして解析できることが明らかとなり、ハロゲン化物イオンの共存による銀イオンの溶出抑制が酵素活性保持において有効であることを実験的に明らかにした。また、逆に銅輸送酵素修飾電極の特性が銅イオンの共存によって向上するメカニズムを明らかにした。

また、微小電極近傍の非線形拡散に基づく定常的な物質供給が校正不要のバイオセンサの基本原則である。しかしながら、微小電極近傍の基質の拡散が溶液の攪拌や揺動に対して不安定であり、センサの特性を低下させるという問題点を見出した。その問題を電極の設計により解決することを目指し、電極設計を行った。具体的には微小電極周囲に形成される反応物質の濃度勾配を阻害することなく、その濃度勾配を変形させる流動の影響を最小限にするような障壁を電極近傍に配置することで、流動に対して安定した応答を与えるような電極を構築した。この障壁の導入により校正不要のバイオセンサを流通系に導入しモニタリングを実施する目的が立った。

また、界面電荷移動反応における界面近傍の電荷分布の状態解明は、バイオセンサに限らず、電気化学一般において極めて重要な命題である。本研究では、互いに交じり合わない二つの液相間でのイオン移動およびイオン分布と電荷分布を一意に解くことのできるシミュレーションモデルの構築に成功した。このモデルは、イオン移動反応における溶液抵抗の影響を定量的に表現可能になったばかりでなく、電気毛管曲線の予測も可能とする。さらに、この成果は、直接的には液膜型のイオンセンサの作動機構解明に対応するものである。さらに、電気化学測定系を統一的に表現することの可能なモデル構築の足掛かりとなるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makizuka Taiki, Sowa Keisei, Katayama Shiori, Kitazumi Yuki, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Shirai Osamu	4. 巻 465
2. 論文標題 An enhanced direct electron transfer-type NAD ⁺ /NADH regenerating system using the diaphorase subunit of formate dehydrogenase 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 142954 ~ 142954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2023.142954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Adachi Taiki, Miyata Tomoko, Makino Fumiaki, Tanaka Hideaki, Namba Keiichi, Kano Kenji, Sowa Keisei, Kitazumi Yuki, Shirai Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Experimental and Theoretical Insights into Biezymatic Cascade for Mediatorless Bioelectrochemical Ethanol Oxidation with Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 7955 ~ 7965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.3c01962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yohei, Makino Fumiaki, Miyata Tomoko, Tanaka Hideaki, Namba Keiichi, Kano Kenji, Sowa Keisei, Kitazumi Yuki, Shirai Osamu	4. 巻 14 March 2022
2. 論文標題 Structural and Bioelectrochemical Elucidation of Direct Electron Transfer-type Membrane-bound Fructose Dehydrogenase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26434/chemrxiv-2022-d7h19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa, T; Makino, F; Miyata, T; Suzuki, Y; Tanaka, H; Namba, K; Kano, K; Sowa, K; Kitazumi, Y; Shirai, O	4. 巻 58
2. 論文標題 Multiple electron transfer pathways of tungsten-containing formate dehydrogenase in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CHEMICAL COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 6478-6481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc01541b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, Y; Itoh, A; Kataoka, K; Yamashita, S; Kano, K; Sowa, K; Kitazumi, Y; Shirai, O	4. 巻 146
2. 論文標題 Effects of N-linked glycans of bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIOELECTROCHEMISTRY	6. 最初と最後の頁 108141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioelechem.2022.108141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi, T; Mazurenko, I; Mano, N; Kitazumi, Y; Kataoka, K; Kano, K; Sowa, K; Lojou, E	4. 巻 429
2. 論文標題 Kinetic and thermodynamic analysis of Cu ²⁺ -dependent reductive inactivation in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis by copper efflux oxidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ELECTROCHIMICA ACTA	6. 最初と最後の頁 140987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2022.140987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishida, S; Sumi, H; Noji, H; Itoh, A; Kataoka, K; Yamashita, S; Kano, K; Sowa, K; Kitazumi, Y; Shirai, O	4. 巻 152
2. 論文標題 Influence of distal glycan mimics on direct electron transfer performance for bilirubin oxidase bioelectrocatalysts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIOELECTROCHEMISTRY	6. 最初と最後の頁 108413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioelechem.2023.108413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ZUSHI Kento, KITAZUMI Yuki, SOWA Keisei, KANO Kenji, SHIRAI Osamu	4. 巻 70
2. 論文標題 Kinetic Analysis of Oxygen Dissolution by Bubble-attaching Electrodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 551 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.70.551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Taiki, Sowa Keisei, Kitazumi Yuki, Shirai Osamu, Kano Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Cyanide sensitivity in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis by membrane-bound alcohol dehydrogenase from <i>Gluconobacter oxydans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 107992 - 107992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioelechem.2021.107992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makizuka Taiki, Sowa Keisei, Shirai Osamu, Kitazumi Yuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of direct-electron-transfer-type bioelectrocatalysis of bilirubin oxidase by silver ions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 907-921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00111-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中西聖嗣、北隅優希、加納健司、白井理
2. 発表標題 酵素修飾金多孔質電極からの酵素除去及び電極再生
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 槇塚太紀、宋和慶盛、北隅優希、白井理
2. 発表標題 電気化学的手法に基づいた銀イオンによる酵素活性変化の速度論的解析とその抑止策の提案
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二階堂貴文、北隅優希、宋和慶盛、白井理
2. 発表標題 直接電子移動型酵素電極反応のpH応答に関する速度論的検討
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北隅優希、宋和慶盛、白井理
2. 発表標題 直接電子移動型酵素電極反応に基づく多孔質電極内部の物質輸送の評価
3. 学会等名 第67回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横塚太紀、宋和慶盛、北隅優希、白井理
2. 発表標題 参照電極からの溶出物による酵素電極活性低下に対する基礎的検討
3. 学会等名 第67回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kitazumi, Keisei Sowa, Osamu Shirai
2. 発表標題 Improvement of the Direct Electron Transfer-type Bioelectrocatalysis at the Porous Gold Electrodes and its Application for Biosensing
3. 学会等名 Materials Research Meeting2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Suzuki, Keisei Sowa, Yuki, Kitazumi, Osamu Shirai, and Kenji Kano Kano
2. 発表標題 Diffusion-limited electrochemical d-fructose sensor by a variant of d-fructose dehydrogenase
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース CO2資源化酵素の電子移動メカニズムを解明 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-05-20-0 Capturing carbon with both hands https://www.eurekalert.org/news-releases/977222 バイオエタノールを電解効率100%で燃焼 バイオと数理の力で拓く生体触媒による2段階カスケード反応 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-06-02-0 バイオメテイクスにつながる異化代謝プラットフォーム 自然に学ぶモノづくりを目指して https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-08-29-0</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白井 理 (Shirai Osamu) (40355011)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------