

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510127

研究課題名(和文)高機能デバイス構築のための分子配向生体触媒とカーボンナノチューブ複合体の構造制御

研究課題名(英文)Oriented enzyme immobilization on the electrode for biodevice

研究代表者

末 信一郎(Suye, Shin-ichiro)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90206376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性古細菌由来マルチ銅オキシダーゼ及びPQQ依存性グルコース脱水素(PQQ-GDH)を触媒とした電極を作製し、長期安定性に優れたバイオ電池の構築を目指した。アノードでは分子配向性を制御して酵素を固定化し、カソードではナノ材料であるカーボンナノチューブ(CNT)を固定化に用いた。アノード電極にはN末端にHis-Tagを導入したPQQ-GDHを銅を介して配向性を持たせて固定化した。それぞれ作製した電極を組み合わせることで電池を構成し、電池性能を評価した結果、分子配向性を制御した電極で構成した電池の方がランダムに固定化した電極で構成した電池よりも22倍の出力を得ることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The biodevice which could achieve an efficient enzyme reaction and electron transfer on the electrode surface was improved using the molecular orientated immobilization of enzyme. Both high-stable PQQ-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) for bioanode and multicopper oxidase for biocathode from hyperthermophilic archaeon. In order to immobilize enzyme onto the electrode with orientation, His-tag was introduced to C-terminal of PQQ-GDH by genetic technique. Copper molecules were deposited on the electrode electrochemically, and then the enzyme was immobilized on the electrode by its affinity between His-tag and Cu atoms. The biofuel cells were constructed with both electrodes and the biofuel cell output a maximum power density of 15 microA/cm². The results in the present study represent a potentially promising finding for the application to practical biofuel cells.

研究分野：新複合領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオデバイス 分子配向 配向制御 バイオ電池 ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

バイオデバイスによる分子変換は、医療分野・環境分野・食品分野などで、その迅速・簡便性からバイオセンサへの応用がなされてきた。また新しいエネルギーの創出という面で、バイオデバイスのバイオ電池への応用へ期待は非常に大きいものがある。また一方では、センシングデバイスの感度向上としてはナノテクノロジーの適用に注目が集まっている。その中でも、特にカーボンナノチューブ(CNT)は、その特性として強度が高くかつ柔軟であること、化学的に安定であること、重量に対して表面積の割合が高いこと、高い導電性を持ち、構造の変化により半導体的になることなどが挙げられ、これらの特性を利用して、各種高機能デバイスがすでに開発されている(Maehashi et. al., Anal. Chem. 79, 782, 2007 等)。しかし、これらはCNTの電極基盤の修飾によりデバイス自体の性能向上を図ったものである。よって、CNTという優れた素材を用いても、最終的な形態としては各種デバイスと生体触媒(酸化還元酵素)の組み合わせによる電気化学的な物質変換であったり、酵素反応などに伴う電子授受を検知する第二世代のバイオセンサに依然として留まっているのが実状であり、CNT本来の持つ特性が生体触媒の分子レベルでの相互作用にまで活かされていない。生体触媒の側からデバイス上での反応を見ると直接電子移動型の酵素機能電極反応では基質との触媒反応部位と、電極と電子授受できる別の酸化還元部位があり、酵素内の酸化還元中心と電極間の距離が短いことや電子を通しやすいこと、酸化還元に関する再配向エネルギーが小さいことが要求されるが、天然の酵素でこれらの因子を制御することは非常に困難である。よってデバイス上での酵素分子配向が重要となるが、その制御については申請者の例を含め成功例は僅少である。そこで、酵素の遺伝子レベルでアミノ酸置換などの分子設計を行うことで配向性を有する生体触媒を創成し、並行してCNTをデバイスと生体触媒との間で位置制御しながら介入させることで電極表面のナノオーダーでの構造制御を試みる。本研究の目的は、酵素分子が位置制御された状態でのCNTとの相互作用による電子授受について詳細な情報を明らかにすることで酵素分子とCNTを介した直接的な電子伝達の間を電極基板上に形成することにある。最終的には、生体触媒素子と電極との高効率で直接的な電子授受を行うことのできる第三世代を超えた次世代バイオセンサやバイオ電池を酵素-CNTハイブリッド複合体を用いて構築する。

2. 研究の目的

(1) これまでの経過

我々は、これまでに平成18-19年度科研費により超好熱菌由来の色素依存性L-プロリンデヒドロゲナーゼの4つのそれぞれのユ

ニットにヒスチジンタグを遺伝子工学的手法により導入し、酵素分子の向きを制御しながら基板上に固定化することに成功した。その結果、酵素分子の電極上での向きによって、その基質に対する電流応答性が大きく異なることがわかった。これは、酵素分子内の電子伝達の流れを反映したものと考えられた。我々は、この成果に基づいて、酵素分子内の位置制御と電子伝達の流れを考慮しながら、生体触媒分子-CNT-電極間の効率の良い直接電子授受の場の創成することを考えた。

(2) 研究期間内に明らかにすること

脱水素酵素に関して酵素分子の外殻に位置するアミノ酸残基をメチオニンに置換し、分子表面にSH基を導入することで、この改変酵素を金電極に配向固定化する。またHis-tagの導入による分子配向なども検討する。次に、酵素電極反応の応答を評価することで、酵素分子の基質結合部位、補酵素結合部位などの電極に対する方向と応答性の関係を考察し、酵素分子のCNTへの配向性を決定する。

CNTと酵素分子との間の電子授受を行う場を電極基板上に形成させるために、酵素分子とCNTの位置制御を伴った結合法を検討し、さらに位置制御と酵素電極反応に関する知見をまとめ、高感度バイオセンシングシステムの設計指針を確立する。

3. 研究の方法

位置制御に適した生体触媒の創成 外殻部分の活性に影響のないアミノ酸残基を選択し、配向に適したアミノ酸残基と置換する。位置制御をしたままCNTへ固定する具体的な方法について検討した。

CNT修飾電極の設計 最適な反応場形成のためにCNTや高分子補酵素の基盤上への固定化方法について交互積層法をはじめ共有結合法などを検討。電極応答性および自己電子伝達能の評価を行い、最適なCNT/高分子化補酵素系を選択する。電子伝達場を有する分子デバイスの構築について、電極基板表面のCNT酵素複合体による被覆修飾を吸着法によって行った。

バイオデバイスの応用としてバイオ電池やDNAバイオセンシングシステムの構築を行った。

4. 研究成果

新しいエネルギーとして、酵素を電極触媒とするバイオ電池が近年注目されている。バイオ電池の反応系は非常に穏和な条件での作動が可能となり、また、適切な酵素を選択することで、エタノールや糖などのバイオマス資源を直接燃料として発電することができる。しかし実用化に向けては安定性、出力などといった課題が残されている。作製した電極の安定性や出力を決める要因としてとして、酵素の固定化方法が重要である。そのため、酵素を電極表面に修飾する際にナノ材

料を用いることで電極と酵素間の電子移動距離を短くしたり、単位面積当たりの酵素の固定化量の増加を期待することができ、出力を向上することができる。また、酵素の配向性を制御することで電子移動効率が向上されることや、適切なメディエータを用いることで出力の向上が見込める。しかし、作製した電極を長期保存する際に酵素が変性したり、電極表面から酵素が脱離することがあり、長期安定性については問題が多かった。そこで、本研究では超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) をカソード触媒、同じく *P. aerophilum* 由来 PQQ 依存性グルコース脱水素 (PQQ-GDH) をアノード触媒として用いて電極を作製し、長期安定性に優れたバイオ電池の構築を目指した。さらに、アノードでは分子配向性を制御して酵素を固定化し、カソードではナノ材料であるカーボンナノチューブ (CNT) を固定化に用いることでより出力の高いバイオ電池の構築を試みた。

まず、McoP の精製を行い、得られた精製 McoP を用いてバイオ燃料電池のためのバイオカソードの構築を試みた。物理吸着で McoP を電極に固定化し、作製した電極を用いてサイクリックボルタンメトリー (CV) にて電気化学的挙動を測定した結果、反応溶液を酸素飽和した時に還元波の増大が確認された。しかしながら、反応開始電位が 0 V 付近と低い電位であり電池として利用するにはより高い電位で反応を開始する必要があるため、電極材料として CNT を用いて電極を作製した。CNT は 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) を用いることで分散することができ、これらを電極材料として用いた際、CNT を用いなかった電極と比較して酸素の還元に基づく電流値は増大し、このことから CNT が酵素と電極間の電子伝達を効率化していることがわかった。この方法で電極上に酵素を固定化したのをバイオカソード電極とした。

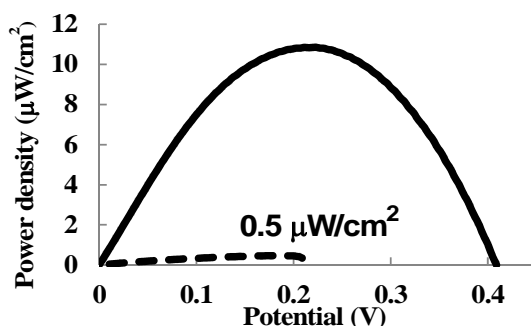


図 1 PQQ-GDH を銅を介して配向固定したアノード (実線) と化学結合によってランダムに固定したアノード (破線) を用いて構成したバイオ電池の出力評価

次にバイオアノード電極の構築のために N 末端に His-Tag を導入した PQQ-GDH の精製を行った。酵素を配向性を持たせて固定化するために電極表面に銅を電析させ、Cu-His-tag のアフィニティを利用した酵素配向固定化を行った。本電極の酵素反応によるグルコース酸化に伴う PQQ の酸化波の増大を確認された。この方法で電極上に酵素を固定化したものをバイオアノード電極とした。

それぞれ作製したバイオアノードとバイオカソードを組み合わせて電池を構成し、電池性能を評価した。アノード側溶液には基質であるグルコースを含む 0.1 M HEPES buffer、カソード溶液側には 0.1 M MES buffer に酵素を 10 分間通気した。その結果 $11 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の出力を得た (図 1)。比較としてアノード、カソードそれぞれの酵素をランダムに固定化した電極を組み合わせ、電池の評価を行ったところ $0.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であった。このことから分子配向性を制御した電極で構成した電池の方がランダムに固定化した電極で構成した電池よりも高い出力を得ることができた。次に長期安定性について評価したところ、室温で 14 日間経過しても 70% の出力を維持することができた。

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 9 件)

A. Koto, S. Taniya, H. Sakamoto, T. Satomura, H. Sakuraba, T. Ohshima, S. Suze
Efficient Direct Electron Transfer for a Highly Oriented PQQ-GDH Immobilized Electrode for Bioanode.
J. Biosens. Bioelectron., 5:1 (2014).

H. Sakamoto, H. Asakawa, T. Fukuma, S. Fujita, S. Suze
Atomic force microscopy visualization of hard segment alignment in stretched polyurethane nanofiber prepared by electrospinning.
Sci. Technol. Adv. Mater., 15 01500 (2014).

K. He, X. Wang, X. Meng, H. Zheng, S. Suze
Amperometric Determination of Hydroquinone and Catechol on Gold Electrode Modified by Direct Electrodeposition of Poly (3,4-ethylenedioxythiophene)
Sensors and Actuators, B 193212– 219 (2014).

H. Zheng, J. Zhou, Y. Okezaki, S. Suze
Construction of L-Lysine Sensor by

Layer-by-Layer Adsorption of L-Lysine Dehydrogenase and Ferrocene-Labeled High Molecular Weight Coenzyme Derivative on Gold Electrode
Electroanalysis, 20(24), 2685-2691 (2013).

K. He, X. Wang, H. Zheng, S. Suye
Construction of Nano Coenzyme and Enzyme Multilayer Film on Gold Electrode by Self-assembly Method
Advanced Materials Research, 788, 69-72. (2013)

W. Zheng, H. Zheng, T. Sun, P. Liu, S. Suye
Catalytic Oxidation of NADH on Gold Electrode Modified by Layer-by-Layer Self-assembly of Thermostable Diaphorase and Redox Polymer
Materials Science Forum, 675-677, 231-234 (2011).

T. Sun, H. Zheng, W.-w. Li, P. Liu, Y. Ruan, S. Suye
Construction of Biosensor Based on Glassy Carbon Electrode Modified by Composite Film of Multi-Walled Carbon Nanotubes and Poly(ethylenimine)
Materials Science Forum, 675-677, 235-238 (2011).

W. Zheng, H. Zheng, Y. Li, X. Wang, S. Suye
Electrochemical Determination of Inorganic Phosphate
Advanced Materials Research, 339, 435-439 (2011).

X. Wang, P. Liu, H. Zheng, H. Hu, W. Zheng, S. Suye
Preparation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube and Its Application to Dehydrogenase Biosensor
Advanced Materials Research, 298, 121-127 (2011).

〔学会発表〕(計9件)

末信一朗, 谷屋早紀, 坂元博昭, 里村武範, 藤田 聡
2E04 バイオ燃料電池のための超好熱菌由来酵素を用いたアノード電極の構築
25年度繊維学会秋季研究発表会 9/5

末信一朗, 内井俊貴, 坂元宏昭, 里村武範, 藤田聡, 櫻庭春彦, 大島敏久
2E02 バイオ電池への応用を目指したバ

イオデバイスの構築
平成 25 年度繊維学会年次大会 6/13

〔図書〕(計2件)

末 信一朗
バイオセンサの迅速・簡易・高機能化技術と課題解決書、技術情報協会(2014)
印刷中

末 信一朗
酵素を使って測るセンサーがあるの？
生物工学会編 ひらくひらく「バイオの世界」分担執筆、化学同人(京都)p90-91
(2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)
名称: エネルギー変換用繊維材料及びそれを用いたアクチュエータ
発明者: 坂元博昭, 末信一朗, 藤田聡
権利者: 福井大学
種類: 特許
番号: 特願2013-127969
出願年月日: 平成25年6月18日
国内外の別: 国内

名称: プローブ修飾ナノ粒子を用いた有害微生物の高感度バイオセンシングシステム
発明者: 末 信一朗, 里村武範, 坂元博昭
権利者: 福井大学
種類: 特許
番号: 特願2013-108792
出願年月日: 平成25年5月23日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/bioen/g/suye/index.html#intro>

6. 研究組織

(1)研究代表者 末 信一朗
(SUYE, Shin-ichiro)
福井大学大学院工学研究科・教授
研究者番号: 9 0 2 0 6 3 7 6

(2)研究分担者 里村 武範
(SATOMURA, Takenori)
福井大学大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 5 0 4 1 2 3 1 7

(3)研究分担者 坂元 博昭
(SAKAMOTO, Hiroaki)
福井大学テニユアトラック本部・講師
研究者番号: 7 0 5 5 2 4 5 4

(4)海外研究協力者 鄭 海涛
(ZHENG, Haitao)
中国 天津工業大学材料化工学院・副教授