

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656508

研究課題名(和文) バイオ電池に有用な酸化還元酵素の効率的なスクリーニング技術の開発

研究課題名(英文) Development of an efficient screening technique for oxidoreductases used for biofuel cells

研究代表者

土居 信英 (DOI, Nobuhide)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：50327673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：酸化還元酵素はバイオ電池などに広く利用されているが、さらなる機能向上が求められており、そのためには、酸化還元酵素の効率的なスクリーニング技術が必要である。そこで本研究では、導電性ダイヤモンド電極を用いて、低濃度の酸化還元酵素の活性を、短時間で、定量的に測定できる条件を検討し、この電極を組み込んだマイクロ流体デバイスを世界で初めて構築した。これにより、極微量の多検体の酸化還元酵素のライブラリーをハイスループットにスクリーニングすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although oxidoreductases are widely used in many applications, such as biofuel cells, improvements in the function of existing oxidoreductases or the discovery of novel oxidoreductases with greater activities is desired. To increase the activity of oxidoreductases by directed evolution, a powerful screening technique for oxidoreductases is required. Here, we demonstrate the utility of boron-doped diamond (BDD) microelectrodes for quantitative and potentially high-throughput measurement of the activity of oxidoreductases. We confirmed that BDD microelectrodes can quantify the activity of low concentrations of oxidoreductases with a measuring time of 1 msec per sample, and fabricated a microfluidic device containing a BDD electrode for the first time. Our results imply that the combination of a BDD microelectrode and microfluidics can be used for screening of an oxidoreductase library containing a large number of samples, each with a small (nanoliter) sample volume.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：酵素 進化 バイオマス 電気材料 マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

有機物を直接電気に変換できるバイオ電池(図1)は、環境負荷が小さい新しいエネルギーデバイスとして期待されている。バイオ電池が実用化されれば、我が国の年間3億トン以上の生物系廃棄物から100万世帯以上の年間電力を賄えるという試算もある。しかし、天然の酸化還元酵素を用いるため出力や寿命が限られており、実用化にはまだ多くの課題がある。

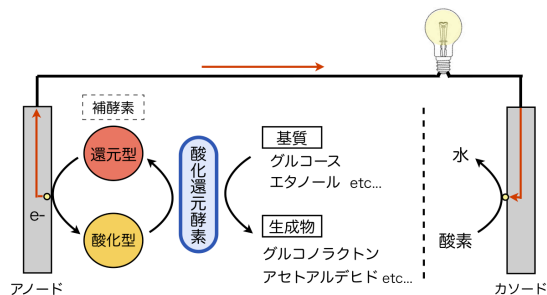


図1 酵素バイオ電池の原理

2. 研究の目的

そこで本研究では、遺伝子工学(タンパク質の進化分子工学;土居)、電気化学(導電性ダイヤモンド微小電極;栄長)、および、集積回路・微細加工技術(MEMS;松本)という異分野の融合により、バイオ電池の高出力化・長寿命化に役立つ、高い活性と安定性をもつ酸化還元酵素を汎用的かつ効率的にスクリーニングできる新しいシステムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、スクリーニング系の汎用性を検証するために、複数のタイプの酸化還元酵素をモデルとした。具体的には、様々な生物系廃棄物からの生産が可能で比較的入手が容易なグルコースを用いたバイオ電池に用いられているグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)や、バイオエタノールからの効率的な発電が期待できるバイオ電池も視野に入れてアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)について検討した。

(2) 酸化還元酵素遺伝子のクローニングおよび酸化還元酵素の発現・精製:上記の複数のタイプの酸化還元酵素のうち、既に立体構造が決定されているタンパク質を中心に選び、それらの遺伝子を各種微生物よりクローニングした。アフィニティー精製のポリヒスチジンタグなどをコードするDNA配列を付加した融合遺伝子を作成し、大腸菌発現系または無細胞タンパク質合成系を利用して酸化還元酵素を調製し、アフィニティー樹脂を用いて精製した。それぞれの酵素ごとに従来の測定法を用いて、酵素活性を保持していることを確認した。

(3) 導電性ダイヤモンド微小電極による酸化還元酵素の活性測定条件の検討:まず、マイクロ波プラズマCVD装置を用いて、基盤となるタングステン針の表面上に、ホウ素を高濃度にドーピングした導電性のダイヤモンド(BDD)薄膜を形成させ、微小電極を作製した。このBDD微小電極に連続的に変化する電位をかけてピーク電流を測定するサイクリックボルタンメトリーにより、(2)で調製した種々の酸化還元酵素の活性を簡便かつ高感度に測定できる条件を検討した(図2)。

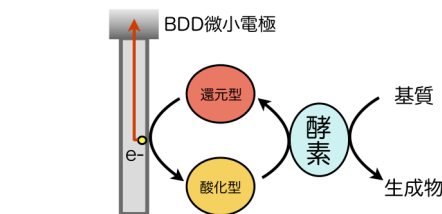
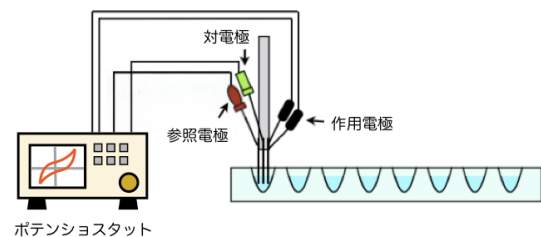


図2 BDD微小電極による電気化学測定の実験

(4) BDD微小電極を組み込んだマイクロデバイスの作成:フォトリソグラフィによる標準的な集積回路・微細加工技術を用いて、ダイヤモンド微小電極とその検出回路を組み込んだマイクロ流路デバイスを試作し、多数の変異体酵素の活性を連続自動測定できる計測システムを構築した。具体的には、BDD微小電極と信号処理用の回路を組み込んだ反応槽に、酵素と酵素反応に必要な共通の基質を供給するマイクロ流路とマイクロポンプを連結した。酵素を固定したビーズをマイクロ流路に順番に流し、電極を組み込んだ反応槽の中で、ビーズ上の酵素の活性により生じる電流値を測定した。ビーズへの酵素の固定には、すでに当研究室で方法を確立している水/油型エマルジョン内でのPCRおよび無細胞タンパク質合成(Nucleic Acids Res., 2004)を用いた(図3)。

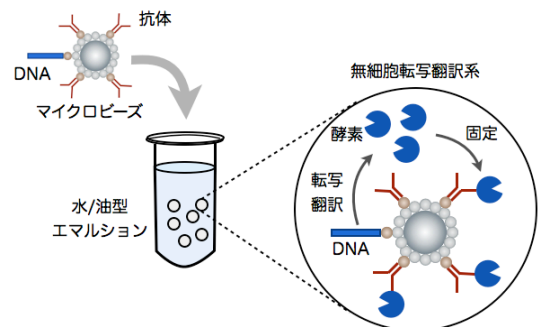


図3 酵素のマイクロビーズディスプレイの原理

#### 4. 研究成果

(1) まず、モデルとなる酸化還元酵素遺伝子をクローニングし、アフィニティー精製のタグなどを付加した融合遺伝子を作成し、大腸菌発現系または無細胞タンパク質合成系を利用して酸化還元酵素を調製した。それぞれの酵素ごとに従来の測定法を用いて、酵素活性を保持していることを確認した後、BDD 微小電極を用いた電気化学測定により、酸化還元酵素の活性を定量した (図 4)。その結果、従来法と本手法により同等の活性値が得られたことから、BDD 微小電極が酸化還元酵素の定量的な活性測定に利用できることが示された。

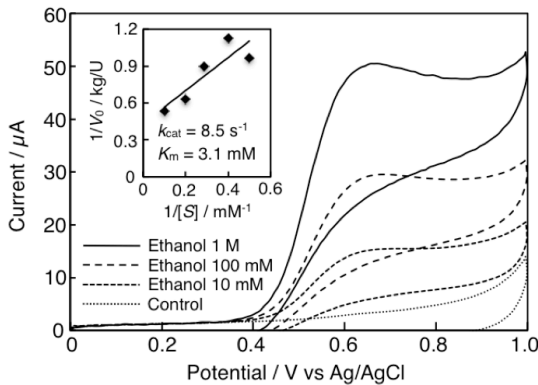


図 4 BDD 微小電極による ADH 活性測定

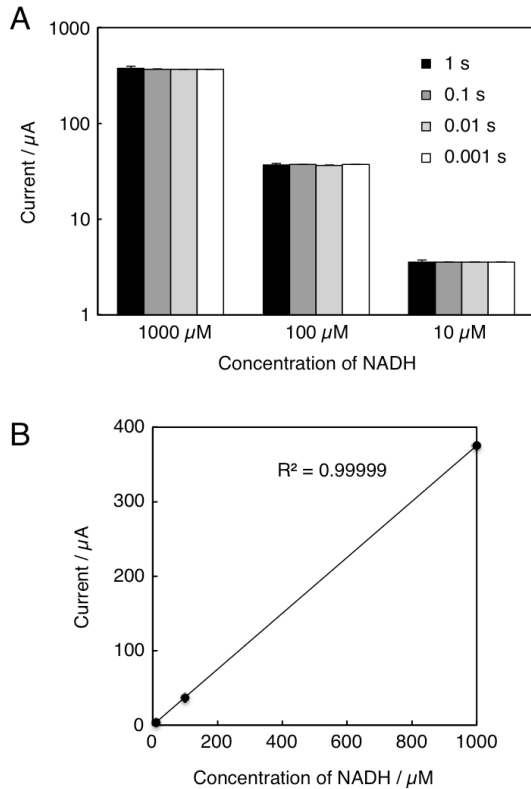


図 5 BDD 微小電極による測定時間の短縮

(2) そこで、酵素活性測定の高スループット化に向けて、測定時間をどこまで短縮できるか、また、酵素サンプルの濃度をどこまで

少なくできるかについて検討をおこなった。その結果、使用したポテンショスタットの設定限界である 1 ミリ秒まで測定時間を短縮しても、電気化学測定の精度には影響がなく (図 5)、低濃度の酸化還元酵素の活性を定量的に測定できることが分かった。

(3) タンパク質を含む溶液の電気化学測定では、電極表面にタンパク質が非特異的に吸着することで測定電流値が低下する現象が知られている (電極の被毒)。BDD 電極は他の炭素電極などと比べてタンパク質の吸着が少ないことが特徴であるが、BDD 電極においても高濃度の酵素存在下では、測定を繰り返すにつれてわずかながら電流値の減少が観察されたので (図 6 左)、それを防ぐための条件についても検討した。具体的には、酵素反応バッファの組成、最適濃度・pH の検討、測定ごとの微小電極の洗浄方法などについて検討した結果、BDD 電極の被毒を抑える条件を確立することができた (図 6 右)。

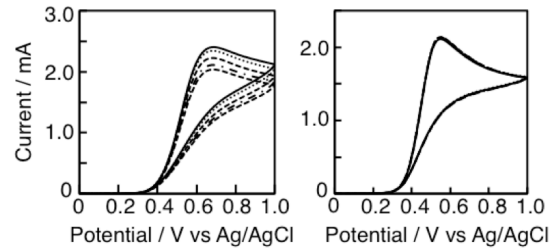


図 6 BDD 微小電極の被毒の低減

(4) BDD 微小電極による酸化還元酵素のハイスループットな活性測定条件を確立することができたので、次に、BDD 微小電極を組み込んだマイクロ流体デバイスを作成することとした。具体的には、酸化還元酵素およびその遺伝子を固定したマイクロビーズをマイクロ流路に順番に流して活性を測定できるハイスループットなスクリーニング系を構築するために、無細胞タンパク質合成系を利用したマイクロビーズディスプレイ法の検討、および、3 種類のマイクロ流体デバイスの構築をおこなった。

(5) マイクロビーズディスプレイの条件検討は、酵素バイオ電池によく用いられているグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) をモデルとしておこなった。HA タグを融合した GDH 遺伝子 DNA 1 分子と抗 HA 抗体を固定したマイクロビーズ 1 個を水/油型エマルションのミセル内に封入し無細胞転写翻訳をおこなうことで、合成された酵素をマイクロビーズに固定した。その結果、1 個のマイクロビーズに最大約 15 万分子の酵素を固定できることが分かった。また、DNA を約 1 分子固定したマイクロビーズ上で合成・固定された GDH の活性を電気化学的に測定することに成功した。

(6) まず、電気化学的に酵素活性を評価する「活性測定デバイス」として、BDD 微小電極を組み込んだマイクロ流体デバイス（図7）を世界で初めて構築した。

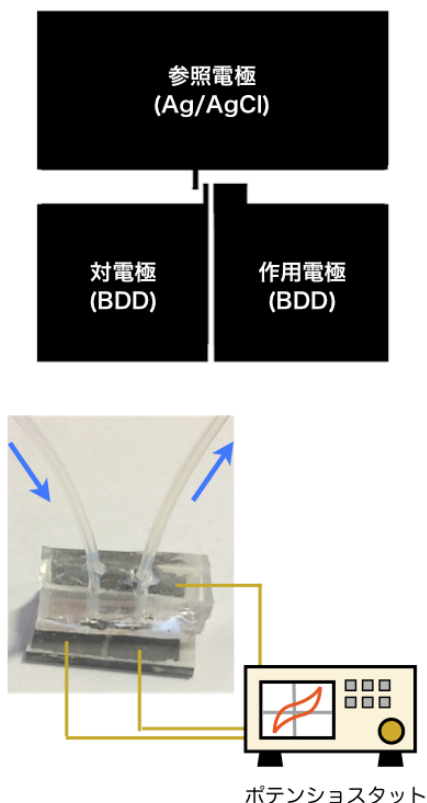


図7 BDD電極を含むマイクロデバイスの作製

(7) さらに、酵素を固定したマイクロビーズを1個ずつ極微量の酵素反応液に区画化するための「区画化デバイス」、および、活性の高い酵素を固定したマイクロビーズのみを回収する「選別デバイス」を作成した。それぞれの性能評価をおこなった後、活性測定デバイスで検出したデータを自動解析して、その結果に基づきアナログ電圧信号を選別デバイスに出力する「解析・制御システム」を構築し、これらを組み合わせたスクリーニング系全体の動作確認をおこなった結果、系全体が正常に動作することが確認できた。

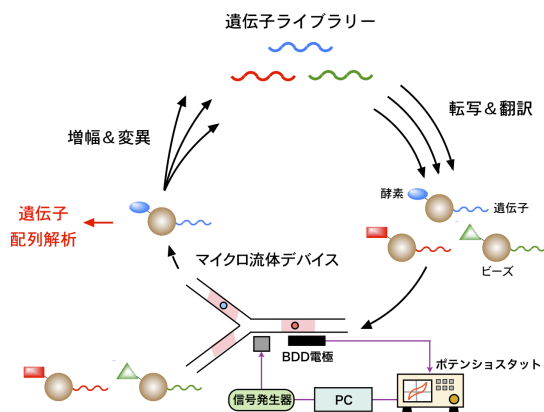


図8 本手法を応用した酸化還元酵素の進化工学

(8) 今後、本システムを発展させることで、既存の酸化還元酵素の進化工学（図8）による活性・安定性の向上や、メタゲノムライブラリーからの新規酸化還元酵素の探索など、様々な応用が期待できる。

#### 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）

〔学会発表〕（計2件）

- ① 及木遼, 片山道信, 加藤太亮, 杉谷藍, 渡辺剛志, 栄長泰明, 松本佳宣, 堀澤健一, 土居信英: 酸化還元酵素のハイスループットなスクリーニング系の構築. 第36回日本分子生物学会年会（神戸, 2013. 12. 5）
- ② 高谷祐介, 堀澤健一, 土居信英: ペプチドおよび酵素の大腸菌表層ディスプレイに関する比較研究. 第36回日本分子生物学会年会（神戸, 2013. 12. 4）

〔図書〕（計1件）

- ① 土居信英, 柳川弘志: 進化分子工学による新規タンパク質の創出とプロテオミクスへの応用. 「進化分子工学 ～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～」(伏見譲編) NTS 出版, pp. 275-286 (2013)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

土居 信英 (DOI, Nobuhide)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 50327673

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

栄長 泰明 (EINAGA, Yasuaki)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号: 00322066

松本 佳宣 (MATSUMOTO, Yoshinori)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号: 60252318

##### (4) 主な研究協力者

及木 遼 (OYOBIKI, Ryo)  
慶應義塾大学・理工学部・大学院生

設楽 俊也 (SHITARA, Shunya)  
慶應義塾大学・理工学部・大学院生

下木原 翔太 (SHIMOKIHARA, Shota)  
慶應義塾大学・理工学部・学部生