

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32410

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420837

研究課題名(和文) バイオ機能3次元電極を利用する高性能バイオ発電デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of high performance power-generation bio-devices using bio-functional 3D-electrode

研究代表者

長谷部 靖 (Hasebe, Yasushi)

埼玉工業大学・工学部・教授

研究者番号：20212144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化還元酵素や金属タンパク質を多孔性グラファイト系炭素電極上に安定かつ高活性に固定化し、これらのバイオ機能電極をアノードおよびカソードとして糖や酸素を燃料として発電する酵素タンパク質触媒型バイオ発電デバイスおよび自己発電型バイオセンサの開発を目的とした。より大きな触媒電流や起電力を得るため、タンパク質固定化法、電解液の種類やpH、温度、電子メディエータの種類などを最適化し、バイオ機能電極としての性能を評価した。

研究成果の概要(英文)：To develop highly functional protein-based bio-fuel cells, and self-powered biosensing devices, several redox-proteins and metal-proteins was successfully immobilized on the surface of carbon-felt, which is micro-electrode ensemble of micro carbon fiber (ca. 7 μm in diameter) and possesses a random three-dimensional structure. To obtain larger bioelectrocatalytic current density, various experimental parameters (protein-immobilization method, kinds of buffer, pH, temperature and kinds of electron-transfer mediators) were optimized, and performance of these electrodes were evaluated.

研究分野：バイオエレクトロニクス、生物電気化学

キーワード：バイオ電池 バイオセンサ 酵素 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

エネルギー・環境問題の解決などの観点から、バイオ電池が注目されている。中でもタンパク質触媒である酵素を用いる酵素型バイオ電池は、温和な条件で作動し、生体適合性に優れ、小型化が容易であるため、体内埋め込み型医療機器・モバイル通信機器・マイクロマシン用の電源、さらに電池の原理を応用した自己発電型(自己駆動型)バイオセンサへの展開も期待でき、近年活発に研究が展開されている。

しかし天然の酵素を利用するバイオ電池を実用化するには、安定性(耐久性)および出力(電流密度)の向上が課題となっている。これらの課題を克服するためには、1)固定化酵素の安定性の向上、2)迅速な電子移動プロセスを可能にする新しいバイオ機能界面(バイオインターフェース)の設計・構築が極めて重要である。

2. 研究の目的

カーボンフェルト(CF)は、微小炭素繊維(直径約10 μ m)のランダム3次元集合体で、大きな有効表面積、高い導電性を持ち、電極として用いた場合、各種の電気化学活性種に対して良好な応答を示す。図1にCFの外観およびSEM写真を示す。本研究では、(1)CF表面に酸化還元酵素や金属タンパク質を安定かつ高活性に固定化する新手法の確立、(2)酵素およびタンパク質固定化CFの触媒活性および各種化合物に対する応答特性の評価、(3)酵素およびタンパク質固定化CFのバイオ電池用電極としての評価、を目的とした。より大きな触媒電流密度、および起電力を得るため、タンパク質固定化法、電解液の種類やpH、温度、電子メディエータの種類を最適化した。

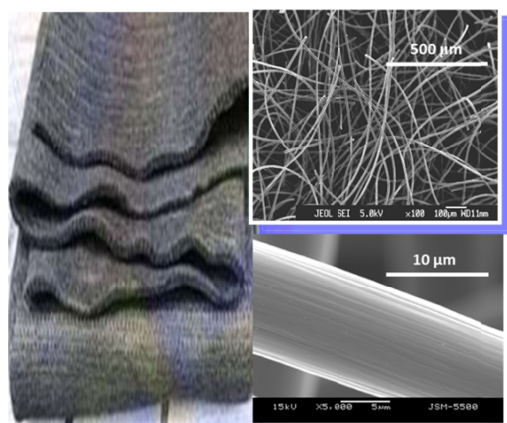


図1 カーボンフェルト(CF)

3. 研究の方法

(1)CF表面グラファイトエッジの官能基を利用する酵素およびタンパク質の化学修飾

図2に示すように、CFのグラファイトエッジ面に存在するOH基を塩化シアヌル(CC)で活性化し、酵素やタンパク質分子のリジン

残基由来のアミノ基や、タンパク質表面に存在する糖鎖由来の水酸基を介して酵素・タンパク質を固定化した。

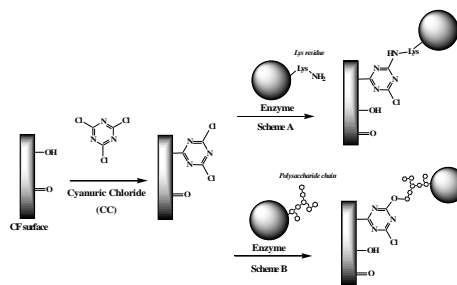


図2 CFへの酵素・タンパク質固定化法(1)

また、図3に示すように、CF表面の水酸基をアミノ基末端を有するシラン剤で修飾し、その後、各種の二官能性試薬を利用して酵素・タンパク質を固定化した。

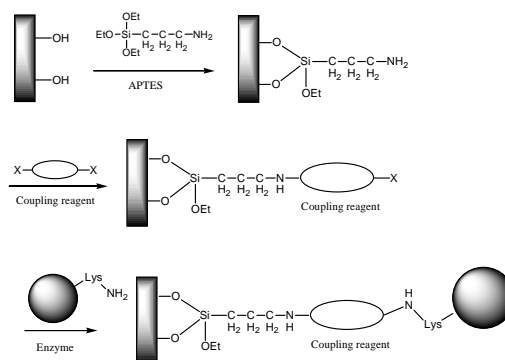


図3 CFへの酵素・タンパク質固定化法(2)

(2)電気化学測定

さまざまな条件で作製した酵素・タンパク質固定化CF(作用極)、白金線(対極)、銀/塩化銀電極(参照極)を構成極とする3電極システムで、サイクリックボルタメトリー(CV)測定を行い、さまざまな測定条件で触媒電流を比較・評価した。

4. 研究成果

いくつかの成果のうち、主にヘムタンパク質固定化CFの直接電子移動(DET)型O₂還元反応と、呼吸毒(CN⁻およびN₃⁻)による触媒活性阻害効果について報告する。

(1)ヘムタンパク質は、活性中心に補欠分子族としてヘム(図4)を持つタンパク質の総称であり、生体内においてO₂の運搬・貯蔵(ヘモグロビン・ミオグロビン)、酸化還元触媒(カタラーゼ・ペルオキシダーゼ)、電子伝達および薬物代謝(チトクロム類)などに関与している。生物電気化学分野でも、ヘム/電極間の直接電子移動(DET)反応に関する研究が活発に展開されている。一般にタ

タンパク質の活性中心は絶縁性のポリペプチド鎖に取り囲まれているため、活性中心の酸化還元活性種と電極間のDETは困難な場合が多い。従って、電子移動を促進させ、DETを実現するためのタンパク質/電極界面(バイオインターフェース)の設計が極めて重要である。

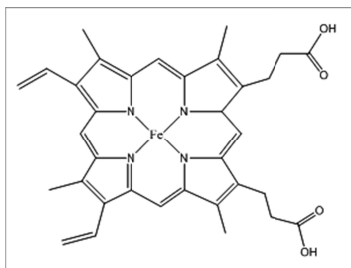


図4 ヘムの構造

本研究では、ヘモグロビン(Hb)やミオグロビン(Mb)をCF表面に固定化すると、特別な電子プロモーターや固定化膜を必要とすることなく活性中心ヘムとCF間の直接電子移動反応が生じ、高活性なO₂電解還元触媒として機能することを見出した。

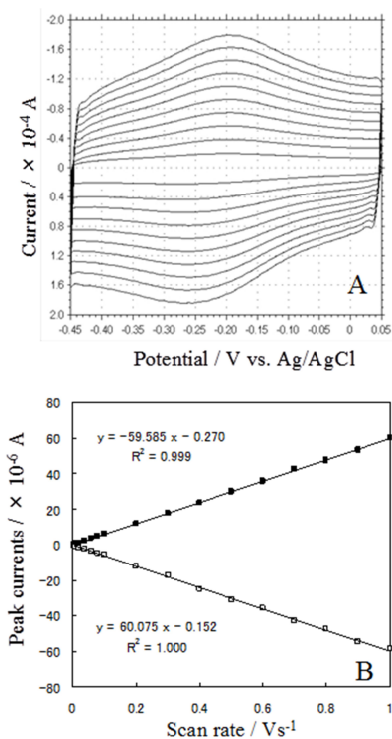
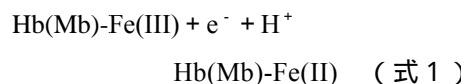


図5 (A) Hb-CFのCV
(B) 電流と電位掃引速度の関係

(2) ヘムタンパク質固定化CFの電気化学特性

図5AにHb固定化CF(Hb-CF)の脱酸素した緩衝液(pH5.0)で得られたサイクリックボルタモグラム(CV)を示す。Hb-CFは-0.2~-0.25V近傍に1対の酸化還元波を示した($E^0' = -0.22V$)。Mb固定化CF(Mb-CF)でも同様の酸化還元波($E^0' = -0.25V$)が観察

された。これらは式1に示すHbやMbのヘム[Fe()/()]の酸化還元反応に基づくものである。



HbおよびMb固定化CFでは、HbやMbの立体構造が変化し、活性中心とCFとの距離が接近した状態で固定化されていることが考えられる。ピーク面積から算出した電気化学的に活性なHbおよびMbの表面密度 Γ は $2.27 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ (Hb)および $3.04 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ (Mb)であった。

図5Bに示すように、ピーク電流値と電位走引速度は良好な直線関係を示し、この酸化還元波が固定種の電子移動反応に基づくものであることが裏付けられた。各スキャン速度におけるピーク電位を利用するLaviron理論により算出した電子移動速度定数 k は 14.6 s^{-1} (Hb)および 15.5 s^{-1} (Mb)であった。この値は、これまで報告されているHb固定化電極(金コロイド修飾金電極, 0.49 s^{-1} ; イオン液体修飾電極, 0.75 s^{-1} ; 親水性ポリマー修飾GC電極, 3.45 s^{-1} ; ZrO₂修飾グラファイト電極, 7.9 s^{-1})やMb固定化電極(Cys自己集積膜被覆電極, 0.39 s^{-1} ; ナフィオンCoナノ微粒子修飾電極, 0.59 s^{-1} ; Mb吸着カーボンナノチューブ電極, 5.4 s^{-1})よりも大きく、ヘムタンパク質とCF間の迅速なDETを実現した初めての例である。

(3) ヘムタンパク質固定化CFのO₂電解還元活性および呼吸毒による阻害効果

これまで、DET特性を示すヘムタンパク質固定化電極は、H₂O₂、O₂、亜硝酸、トリクロロ酢酸の電解還元触媒活性を示すことが報告されている。本研究では、バイオセンサやバイオエネルギー変換システムへの展開を視野に、Hb-CFおよびMb-CFのO₂電解還元触媒活性について検討した。

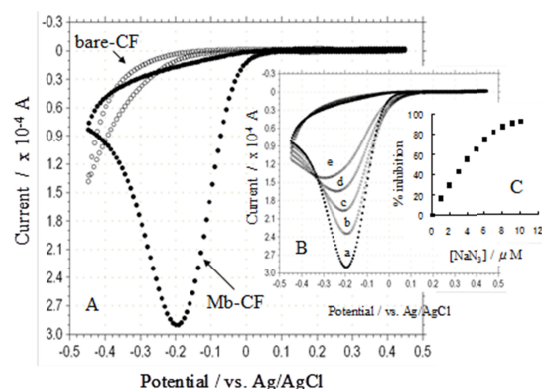


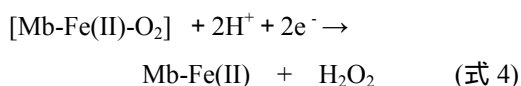
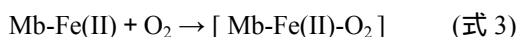
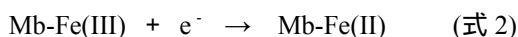
図6 (A) Mb-CFの空気飽和溶液中でのCV
(B) 各濃度のN₃共存下でのCV
(C) 阻害率とN₃濃度の関係

図6AにMb固定化CF(Mb-CF)および未修飾CF(bare-CF)の空気飽和緩衝液(pH5.0)

における CV を示す。未修飾 CF では -0.2V 近傍から CF 電極により直接電解還元に基づく O₂ の還元電流がゆるやかに立ち上がるが、Mb-CF では 0.05V 近傍から急激に還元電流が立ち上がり、-0.2V にピークを示す大きな還元波が観察された。

この応答は Mb-Fe(III) から電気化学的に生じた Mb-Fe(II) (式 2) が分子状 O₂ と反応し (式 3) 生じた酸化型中間体 [Mb-Fe(II)-O₂] が電気化学的に還元される (式 4) ことによるものである。

さらに、この O₂ 触媒還元電流は、電解液中に N₃⁻ を共存させると図 6 B に示すように N₃⁻ 濃度に依存して減少した。% 阻害率 (式 5) と N₃⁻ 濃度の相関関係 (Fig. 6 C) を元に Hughes-Klotz 式 (式 6) に基づいて算出した阻害定数 K_i は Hb-CF で 5.57 μM, Mb-CF で 5.45 μM であった。



$$\% \text{inhibition } (\%In) = (I_0 - I) / I_0 \times 100 \quad (\text{式 5})$$

$$1/\%In = 1/\%In_{\max} + K_i / \%In_{\max} [\text{azide}] \quad (\text{式 6})$$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Y. Wang, Y. Hasebe, Carbon felt-based bioelectrocatalytic flow-through detectors: 2, 6-dichlorophenol indophenol and peroxidase coadsorbed carbon-felt for flow amperometric determination of hydrogen peroxide, *Materials*, 査読有, 7, 1142-1154 (2014)

R. Hashide, K. Yoshida, Y. Hasebe, M. Seno, S. Takahashi, K. Sato, and J. Anzai, Poly(lactic acid) microparticles coated with insulin-containing LbL films and their pH-dependent insuline release, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 査読有, 14, 3100-3105 (2014).

K. Yoshida, Y. Hasebe, S. Takahashi, K. Sato, J. Anzai, Layer-by-layer deposited nano- and micro-assemblies for insuline delivery: A review, *Mater. Sci. Eng. C*, 査読有, 34, 384-392 (2014).

Y. Wang, T. Hosono, and Y. Hasebe, Hemin-adsorbed carbon felt for sensitive and rapid flow-amperometric detection of dissolved oxygen, *Microchim. Acta*, 査読有, 180, 1295-1302 (2013).

H. Matsuhisa, M. Tsuchiya, and Y. Hasebe, Protein and polysaccharide-composite sol-gel silicate film for an interference-free amperometric glucose

biosensor", *Colloids Surf. B*, 査読有, 111, 523-529 (2013).

Y. Hasebe and Y. Wang, Sensitive voltammetric and amperometric responses of respiratory toxins at hemin-adsorbed carbon-felt, *J. Environ. Sci.*, 査読有, 25, 1055-1062 (2013).

〔学会発表〕(計 7 件)

長谷部 靖, 王 月, 関 真一, ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ固定化カーボンフェルトを利用する FIA 式尿酸センサ, 第 60 回化学センサ研究発表会 (大阪大学, 大阪府吹田市), Proceedings of the 60th Chemical Sensor Symposium, 32, A 51-53 (2016 年 3 月).

渡辺崇史, 王月, 長谷部 靖, 二種酵素固定化カーボンフェルトを利用する FIA 式バイオセンサの開発, 第 59 回化学センサ研究発表会 (埼玉工業大学, 埼玉県深谷市), Proceedings of the 59th Chemical Sensor Symposium, 31, B 4-6 (2015 年 9 月).

Yasushi Hasebe, Yue Wang, Yugo Kikuchi, Flow amperometric inhibition type biosensor using tyrosinase-modified carbon-felt, The 19th International Conference on Flow Injection Analysis (19th ICFIA) (ACROS FUKUOKA, 福岡県福岡市), 407 (2014 年 12 月).

奈良和幸, 青木詩織, 王月, 長谷部 靖, チロシナーゼ固定化カーボンフェルトを用いるフロー型バイオセンサ, 第 57 回化学センサ研究発表会 (東京工業大学, 東京都目黒区), Proceedings of the 57th Chemical Sensor Symposium, 30, B, 127-129 (2014 年 9 月).

細野徹, 王月, 長谷部 靖, ヘミン吸着電極の電解触媒活性を利用する溶存酸素および呼吸毒の電気化学センシング, 第 56 回化学センサ研究発表会 (関西大学, 大阪府吹田市), Proceedings of the 56th Chemical Sensor Symposium, 30, A, 16-18 (2014 年 3 月).

〔図書〕(計 1 件)

内山俊一, 長谷部 靖, 浜名浩, 松浦宏昭, 齋藤貴, 吉田泰彦, 石井茂, 藤沼弘, 分子認識を基礎とする分析化学 改定第 2 版, 宣協社 (分担), 161-202 (2015).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sit.ac.jp/user/hasebe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 靖 (HASEBE Yasushi)

埼玉工業大学・工学部・教授

研究者番号: 20212144