

高性能・長寿命酵素センサーの開発

¹(独) 産業技術総合研究所 コンパクト化学プロセス研究センター ²(株) 船井電機新応用技術研究所

伊藤徹二¹ 下村威² 花岡隆昌¹ 小野雅敏² 水上富士夫¹

High-performance enzymatic biosensor with long-term stability

Tetsuji Itoh¹, Takeshi Shimomura², Taka-aki Hanaoka¹, Masatoshi Ono²,
Fujio Mizukami¹

¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

²Funai Electric Advanced Applied Technology Research Institute Inc. (FEAT)

1. はじめに

生体内に含まれるタンパク質は生物活動における高度な機能を発現する分子であり、その中でも酵素は生体内の大半の化学反応を司る重要な役割を担っている。そしてゲノム情報をもとに特定の機能を持つ酵素タンパク質を得、その酵素によって物質を生産するプロセスは、高い選択性と常温付近での反応の進行が可能であることから、エネルギー消費が少なく副生成物(廃棄物)も少ない、環境と調和した低環境負荷型の産業システムを実現する技術として注目されている。しかし、生体内でもっとも効率よく働くように設計されている酵素を生体外に取り出して利用する場合、周囲の環境の違いから必ずしも期待通りの機能を発現できない場合が多く、より安定性の高い酵素を利用する必要性から、遺伝子組み換え技術や固定化技術の利用が

進められてきた。

一方、酵素の持つ極めて高い選択性や低濃度での反応性を利用し、環境中や生体試料中から得られた多成分の試料から特定成分を高精度に定量する方法として、酵素を利用したセンサーの研究が進められている。これらは電極と酵素固定層から構成され、試料中の被測定物質と酵素の反応により生じる物質の変化を、電位や電流の変化量として電気化学的に検出するものである。しかし、酵素は外部環境の変化で活性や選択性が低下することが多いために、非酵素型のセンサーに比べ安定性に欠けて寿命が短くなりやすく、実用化の上で大きな障害となっている。このため酵素の性能を損なわずに高い安定性を実現できる酵素の固定化方法の開発が望まれている。

産業技術総合研究所 コンパクト化学プロセス研究センターでは、シリカを材料とした直径2-10 nm 程度の均一で規則的な細孔(メソポー)を有する多孔体、すなわちメソポーラスシリカの構造精密制御技術の開発に取り組んでき

〒983-8551 仙台市宮城野区苦竹 4-2-1

TEL 022-237-3032

E-mail: hanaoka-takaaki@aist.co.jp

た。メソポーラスシリカの細孔サイズはタンパク質や DNA 等の巨大生体分子と同等の大きさであり、また均一で規則的であるという特徴を持つため、酵素を細孔内へ固定化して安定化する研究をすすめる、有機溶媒中での酵素の反応性や熱安定性の大幅な向上等を実証してきた [1-5]。一方、従来より環境中の有害物質検出用センサーの研究開発を行ってきた（株）船井電機新応用技術研究所は、このメソポーラスシリカ多孔体による酵素安定化技術に着目し、小型・高性能なセンサーデバイスの実現を目指し、高感度で高速測定可能な、高い安定性を有する酵素センサー及びセンシング技術に関する共同研究を開始するにいたった。その中から特に、シックハウス症候群を引き起こす原因物質として生体への影響が危惧されているホルムアルデヒドに注目し、ホルムアルデヒド検出用の酵素センサー計測システムについての研究開発の成果を紹介する。ホルムアルデヒドは発癌性が確認されており、住環境（水中・空气中）における許容濃度が厚生省、WHO（世界保健機関）によって 80 ppb（1 ppb とは 10 億分の 1 の濃度のこと）と極めて低く定められており、測定には非常に高度なセンシング技術が求められている。そのため、開発した技術は、我々の生活や健康を脅かす環境中の極微量物質を素早く高

感度で検出する、「生活環境センシング技術」開発の一環としても重要な意味をもつ。

2. 酵素センサー計測システムの開発

2-1. 酵素複合膜の作製 [6, 7]

ホルムアルデヒドを選択的に検出するセンサーを構築するため、酵素としてホルムアルデヒド脱水素酵素を用いた。酵素センサーの高い安定性を実現させるため、酵素の分子サイズ（8 nm 程度）に合致した細孔径を有するメソポーラスシリカ膜を構成し、その膜に酵素を固定した酵素複合膜の作製を検討した。

酵素固定化用の膜には、①細孔が規則正しく配列していること、②細孔径を精密に制御できること、③基質及び反応生成物が効率良く移動できるよう、メソ細孔が基板と垂直に配向していること、が求められる。しかし、現在合成されているメソポーラスシリカ膜の多くは①及び②は満たすものの、メソ細孔が基板と平行に配向しているために薄膜内の細孔に対する物質の拡散性が悪く、③を満足しない。この問題を解決するため、筆者らは東北大学と共同で、多孔性の陽極酸化アルミナ膜の持つ円柱状の細孔内にメソポーラスシリカチャンネルを形成し、アルミナ膜表面に対して垂直配向（アルミナ膜の細孔に対して平行に配向）した、シリカナノチ

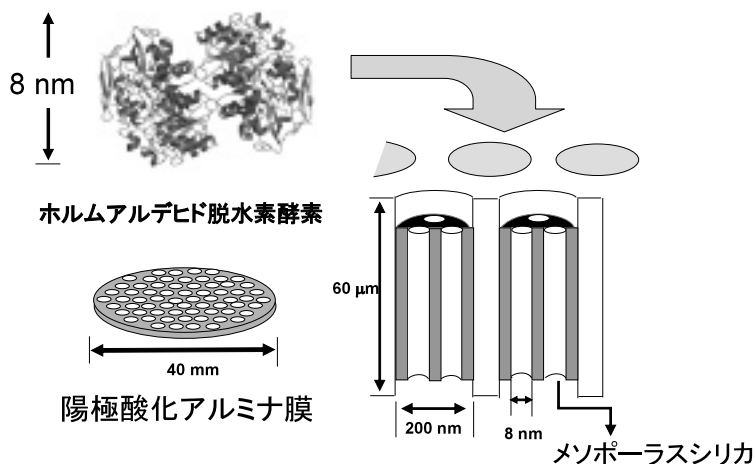


図1 酵素複合膜の作製

チャンネル集合膜の合成に成功した。さらにシリカナノチャンネル内にホルムアルデヒド脱水素酵素を導入することで酵素複合膜を構築することができた (図 1)。

2-2. 水溶液中での酵素センサーの性能 [8, 9]

続いて 2-1 で作製した酵素複合膜に電極と電子伝達物質を組み合わせ、新しい酵素センサー計測システムを開発した。すなわち酵素膜を作用電極上に固定化し、適切な電子伝達物質によって固定化酵素と電極間の電子授受を媒介させる仕組みにより、ホルムアルデヒドに対し高い感度・選択的検出能力と応答速度を示すシステムを得ることが出来た (図 2)。

この酵素センサーによる水中のホルムアルデヒド (25℃) 検出の評価結果を図 3 に示す。時間に対するセンサー応答 (図 3 a) から、応答速度が 1 分以内 (90% 応答) と高速であり、また検量線 (図 3 b) からわかるように、環境基準である 80 ppb を遥かに下回る濃度領域 (サブ ppb 領域 (10^{-11})) でもホルムアルデヒド濃度に比例した出力が得られ、ホルムアルデヒドを超高感度で検出できている。この結果は、メソポーラス膜に固定化することで、酵素の有する能力が最大限に引き出されたことによると考えられる。

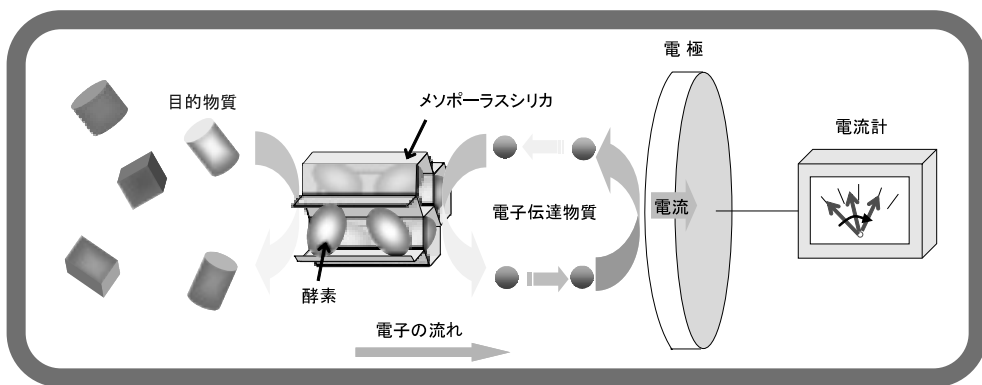


図 2 ホルムアルデヒド酵素センサーによる計測システム

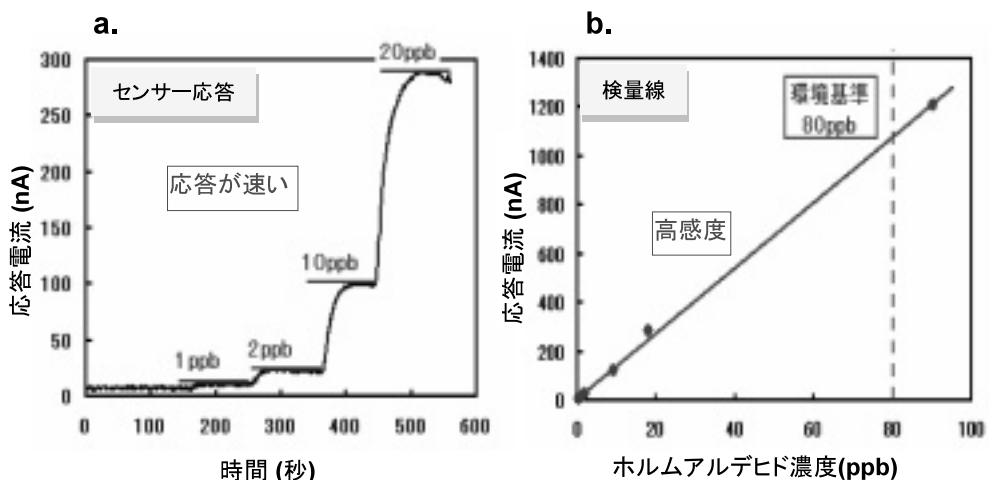


図 3 水中ホルムアルデヒドに対するセンサーの応答性 (a) と検量線 (b)

2-3. 酵素センサーの安定性と選択性

酵素センサーの安定性評価のため、繰り返し測定及び保存期間に対するセンサー応答変化について測定した(図4)。繰り返し安定性では、本センサーで同様の測定を20回以上繰り返して行っても安定な出力を維持することが確認された。一方、アガロースゲルに包括固定化した酵素(ゲルの網目の中に酵素を絡ませて閉じ込めたもの)を使用した場合は、10回の繰り返しの応答が無くなった(図4a)。また溶液中での保存安定性に関しては、未固定の遊離酵素の場合は30日程度で応答が消失するのに対し、本酵素複合膜を使用した場合は100日以上も安定した出力が維持され、飛躍的な安定性の向上が確認できた。

また、本酵素センサーの選択性は非常に高く、ホルムアルデヒドに特異的な応答を示すのに対して、他の物質には殆ど反応しない(図5)。つまり、酵素本来の基質特異性が固定化により全く失われていないことが分かる。

以上より、本酵素センサーが、水中に存在するホルムアルデヒドに対して高い選択的検出能力をもち、高速・高感度で長寿命な性能を有することが示された。

これらの性能は、

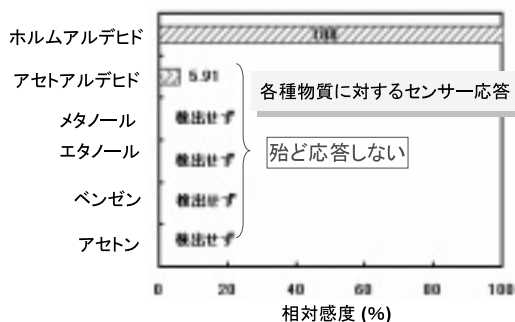


図5 酵素センサーの各種物質に対する選択性

- 1) メソポーラスシリカ多孔体の細孔径を酵素サイズと合致するように制御し、酵素を細孔内部へ固定化することにより、酵素同士の凝集を抑えると共に立体構造の安定性を高め、酵素活性の低下を防ぐ。
- 2) 適切な電子伝達物質(キノン)を用いて酵素と電極間の電子の授受を行うことにより、感度と応答速度を向上させる。

の2つのコンセプトにより実現したと考えられる。

3. ガスセンサーへの応用

3-1. ホルムアルデヒドガスの検出

次に、この酵素センサーにより大気中ホルムアルデヒドを検出する実験を行ない、ガスセン

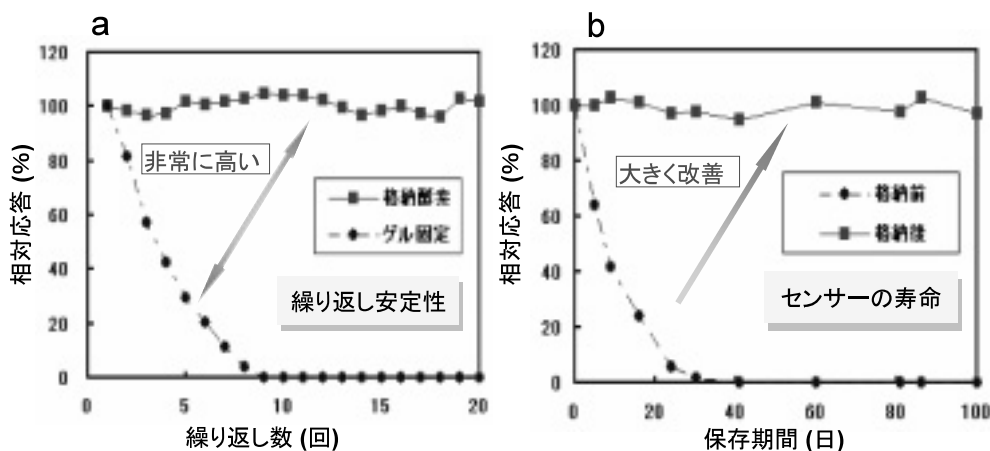


図4 水中ホルムアルデヒドに対するセンサー応答の繰り返し安定性(a)と保存安定性(b)

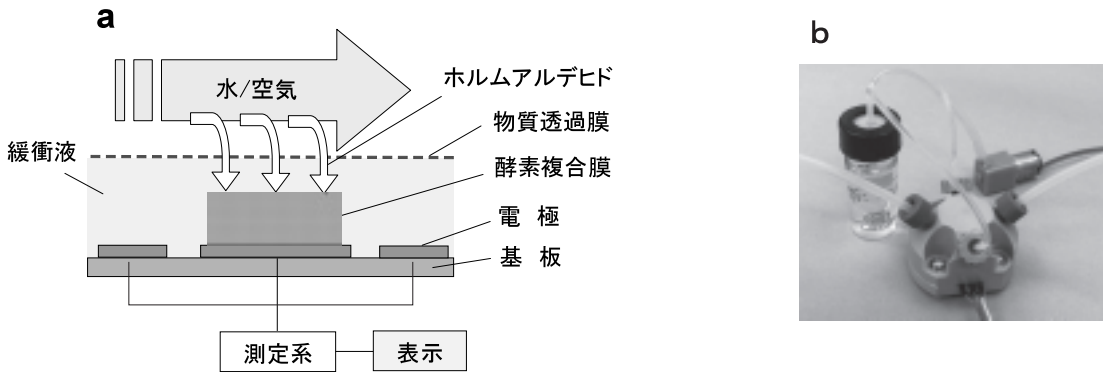


図6 プロトタイプガスセンサーの構造(a)と外観(b)

サーとしての性能を評価した。酵素センサーの構造及び測定システムを図6aに、開発したプロトタイプのガスセンサーの外観を図6bに示す。本酵素センサーは、電極上に酵素固定化膜を形成し、そこに緩衝液を物質透過膜で閉じ込めた構造となっており、大気中のホルムアルデヒドは物質透過膜を介して溶液中に溶解込み、電極で直接検出される。

センサーには、緩衝液の液溜とポンプ、試料の入出力口等が設けてあり、大きさは約4 cm×4 cm×3 cm 程度である。またセンサー評価のためのホルムアルデヒドガスは、独自に開発した極低濃度ガス発生装置により生成し、セン

サー部へ供給した。ガス発生方法の流れは、以下の通りである。ホルムアルデヒド標準ガスを高純度空気と混合・希釈することで極低濃度ガスを発生させる。そして、DNPH 捕集管により試料ガスをサンプリングして抽出後、HPLC 分析によりこのガス濃度を算出・保証する(DNPH-HPLC 法)。目的とする濃度に合わせて混合比を変化させ、所定のガス濃度が得られるまでその操作を繰り返す。ただし、試料ガスのサンプリングと濃度決定には熟練及び長い測定時間を要することに注意する。

このガス発生装置を用いて低濃度のホルムアルデヒドガスを生成し、開発したプロトタイプ

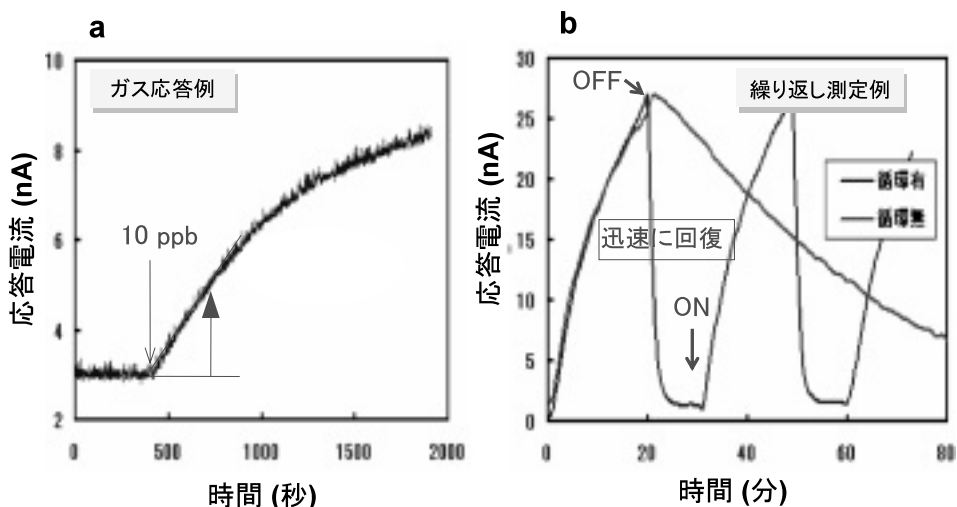


図7 プロトタイプガスセンサーを用いたセンサー応答(a)と繰り返し測定(b)

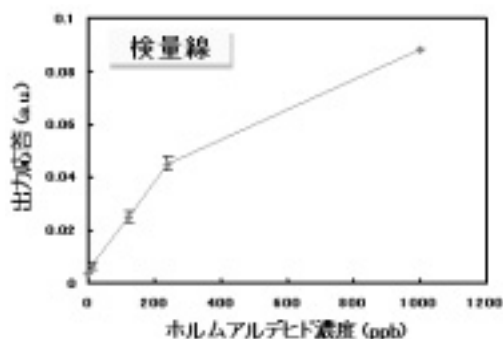


図8 プロトタイプガスセンサーの検量線

を用いてガス中のホルムアルデヒドガスの検出を行った。この場合の感度・応答速度測定及び繰り返し測定例を図7に、検量線を図8に示す。図7aは、濃度10ppbのホルムアルデヒドガスを導入した場合の応答例であるが、ガス導入直後に十分な応答を示している。実際に、サブppbレベルのホルムアルデヒドガスを2分以内で検出することに成功した。現在は、さらに感度を向上させる技術的な目途もついており、犬の鼻に匹敵する高感度が期待できる。また、図7bは濃度100ppbのホルムアルデヒドを導入した場合の、繰り返し測定における緩衝液循環の有無を評価した例である。緩衝液を循環させることで素早くベースラインを回復し、迅速な繰り返し測定が可能となることが分かる。また、検量線は図8のようになり、サブppb～1000ppbの環境測定用としては十分な測定レンジを有するガスセンサーであるといえる。

これらの性能は、2-3に示したコンセプトの1), 2)に加え、

- 3)電極を含むセンサー構造を最適化し、ガスに対する感度・応答速度、測定の再現性を大幅に向上させた。
- 4)緩衝液を循環する方式により、出力信号を測定後に素早く基準値に戻し、繰り返し測定を迅速化することに成功した。

ことにより達成されたものである。なお、本酵素センサーは、電極材料及び電子伝達体の改良

等により、低い印加電圧（+30mV）で動作している。

3-2. 各種ガスへの応用

これまで述べたように、本酵素センサーにより大気中に存在するppbレベル以下の極微量なホルムアルデヒドガスを、2分以内で迅速に検出することができた。本酵素センサーは、酵素の選択とメソポーラスシリカ多孔体の最適化により、他の様々な種類の物質の検出にも応用することが可能である。実際に、飲酒量のチェックとなるアルコール、口臭指標となるアンモニア等のガスセンシングへと応用し、これらの極低濃度ガスの検出にも成功している。さらに、我々の生活や健康を脅かす環境中の極微量濃度の有害物質の高速・高感度検出についても現在取り組んでいるところである。

3. おわりに

メソポーラスシリカのナノ細孔に酵素を固定化することにより、高性能・長寿命な酵素センサーの開発に成功した。これは従来の酵素センサーの課題であった不安定性を克服し、小型で高性能なセンサーの実用化へ大きく前進したもののと言え、高感度・高選択性を可能とする検出方法として、本センサー及びセンシング技術が有望であると考えられる。今後、大掛かりな装置を必要としない小型で高性能なセンシングデバイスの実現、また、それによる安全・安心・快適な暮らし、社会の実現へ向けて大きく貢献することが期待できる。またセンシングデバイスのみならず、本酵素安定化技術を用い、より耐環境性を向上させた超高速反応性・高選択性を有する環境に優しい触媒と、それによる機能性化学品の製造プロセスの実現も目指していきたいと考えている。

謝辞

酵素複合膜作製において研究協力していただいた東北大学大学院理学研究科、山口央助教、

寺前紀夫教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) T. Itoh, R. Ishii, T. Ebina, T. Hanaoka, Y. Fukushima, F. Mizukami: *Bioconjugate chem.*, 17, 236 (2006).
- 2) T. Itoh, R. Ishii, T. Ebina, T. Hanaoka, T. Ikeda, Y. Urabe, Y. Fukushima, F. Mizukami: *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 200 (2007).
- 3) Y. Urabe, T. Shiomi, T. Itoh, A. Kawai, T. Tsunoda, F. Mizukami, K. Sakaguchi, *ChemBioChem* 8, 668 (2007).
- 4) S. Matsuura, T. Itoh, R. Ishii, K. Sakaguchi, T. Tsunoda, T. Hanaoka, F. Mizukami, *Bioconjugate Chem.* 19, 10 (2008).
- 5) T. Itoh, R. Ishii, S. Matsuura, S. Hamakawa, T. Hanaoka, T. Tsunoda, J. Mizuguchi, F. Mizukami: *Biochem. Eng. J.*, 44, 167 (2009).
- 6) A. Yamaguchi, H. Kaneda, W. Fu, N. Teramae: *Adv. Mater.*, 20, 1034 (2008).
- 7) T. Itoh, R. Ishii, Y. Hasegawa, J. Mizuguchi, T. Shiomi, T. Hanaoka, T. Shimomura, A. Yamaguchi, H. Kaneda, N. Teramae, F. Mizukami: *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 57, 183 (2009).
- 8) T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, F. Mizukami, M. Ono: *Sens. Actuator B-Chem.*, 135, 268 (2008).
- 9) T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, F. Mizukami, M. Ono: *Talanta*, 78, 217 (2009).