

バイオポリマー “キチン” における酵素を利用したキャリア生成¹

Carrier generation in “chitin” using enzyme

瀬溝 人生¹ 摂南大学大学院理工学研究科博士後期課程
松尾 康光² 摂南大学理工学部生命科学科

SEMIZO, Hitoki Department of Life Science,
Graduate School of Science and Engineering, Setsunan University

MATSUO, Yasumitsu Department of Life Science,
Faculty of Science and Engineering, Setsunan University

Abstract

Biomaterials are focused on as next-generation materials because of being able to solve the issue of microplastics, which has introduced an entirely new phase of plastic pollution on marine ecosystems for this century. Very recently, biomaterials have been used in the electrical devices field, in addition to the medical field. In the present study, we have tried to create a novel bio-proton conductor, which combines the biopolymer "chitin" and enzyme "chitinase", and investigated its property. It was found that the hydrated chitin applied with chitinase (chitinase-chitin) yields extra protons by the hydrolysis reaction of the enzyme. This result indicates that we can introduce the electric carriers (protons) to the chitin by combining chitinase and chitin. As a result, the raised carrier concentration by chitinase is $1.68 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$. Furthermore, we have suggested a new simple method for estimating the carrier concentration and diffusion constant using amperometry. The estimated carrier concentrations in the chitin film and the chitinase-chitin films are $1.83 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ and $1.86 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, respectively, and the diffusion constant in the chitin film is calculated to be $8.59 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

キーワード: バイオマテリアル, 酵素, プロトン伝導, アンペロメトリー

Keywords : biomaterials, enzyme, proton conductivity, amperometry

¹ 【原稿受付】 2021 年 11 月 12 日, 【掲載決定】 2022 年 1 月 26 日

² 【主著者連絡先】 松尾 康光 摂南大理工学研究科 email: ymatsuo@lif.setsunan.ac.jp
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8, 摂南大学 理工学部 生命科学科

1.はじめに

よく知られているように、廃棄されたプラスチックが海へ流れ、結果的に海洋汚染および生態系への悪影響を引き起こす「マイクロプラスチックの流出」が、環境問題の一つとして、問題視されている⁽¹⁻⁴⁾。これはプラスチックが難分解性であることに起因しており、現在では難分解性のプラスチック製ストローを止め、生分解性の紙ストローを使用する飲食店も増えてきている。このように、有機合成高分子から生分解性のある生体由来のマテリアルへの移行は環境問題を解決するうえで重要な流れになっている。生体由来物質は安価で自然界に豊富に存在し、環境に優しい。それゆえ、最近では、生体由来のマテリアルは医療分野だけでなく、電子デバイス分野へも利用されてきており⁽⁵⁻⁸⁾、例えば、電界効果トランジスタの一部を生体由来のマテリアルで置き換え利用する研究も報告されている⁽⁹⁻¹²⁾。一例として、図1にChao Zhongらが作製した生体由来のマテリアルを一部利用した電子デバイスを示す。これは、電荷の流れを、ゲート電圧により制御する電界効果トランジスタの一部を生体由来マテリアルであるキチンに置き換え、キチン内を輸送するプロトンがゲート電圧により制御できるといった素子であり、ゲート電極/SiO₂膜/キチンの三層膜と Pd (パラジウム)ソース・ドレイン電極からなる。このトランジスタは、キチン/SiO₂界面に誘起されるプロトンが多数キャリアとなる Normally-on p-type FETの特性を示すことが報告されているが、このFETでは Pd における水素供給が必要不可欠であるため水素雰囲気中での動作に限定され、また Pd といったレアメタルも使用する必要があるという問題点も含んでいる。より広く電子デバイスとして市場導入されるためには、大気中で使用可能であり、レアメタルを使用しない生体由来の電子デバイスを見出す必要がある。本稿では、生体由来マテリアルであるキチンと酵素を組み合わせ、大気中でかつレアメタルを使用しない新しいプロトン伝導体の創製を試みたのでこれを紹介する。

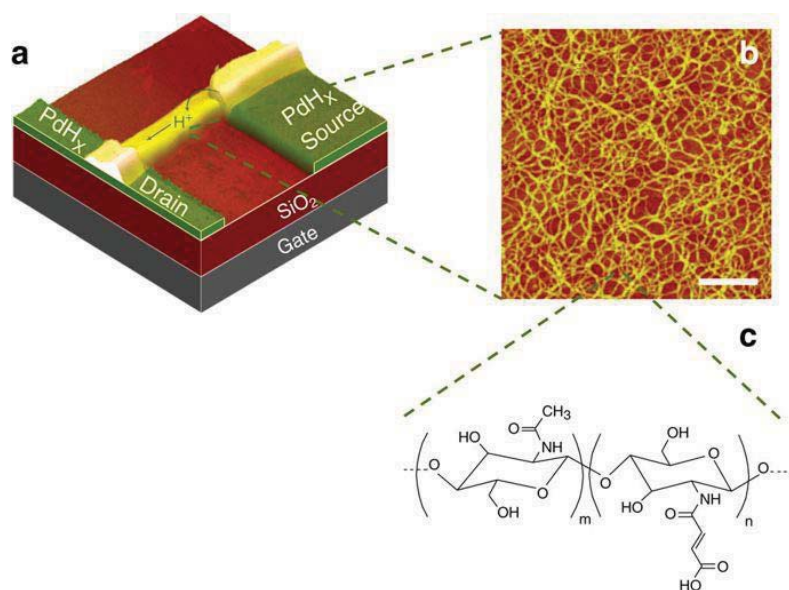


図1 生体由来物質を用いた電界効果トランジスタの一例

また、本稿で紹介する生体由来の材料「キチン」の電荷担体（キャリア）はプロトンであり、生体由来の材料を電子デバイスとして利用する場合にはそのプロトン輸送能が重要となる⁽¹³⁻¹⁵⁾。プロトン輸送能は生体由来材料の構造により決まり、キャリアの拡散定数（移動度）により評価され、拡散定数が大きければ、プロトン輸送能は高く、プロトン輸送を利用する電子デバイスには有利となる。そのため、プロトンの拡散定数の決定は重要であるが、プロトンの重い質量（電子の約 1800 倍）にも起因し、キャリア濃度と拡散速度の両方がプロトン輸送へ寄与するため、両者を分離できず、拡散定数の決定は難しい。本研究では、酵素によるプロトン生成の場合について、電気化学的手法から簡単に拡散定数を見積もる方法についても紹介する。

2.実験

2.1 試料の作成

2.1.1 キチン膜の作成

キチンは、 $(C_8H_{13}O_5N)_n$ の化学式をもつ生体由来材料であり、N-アセチルグルコサミンの長鎖から成っている。キチン膜は、精製されたスギノマシン社製のキチンスラリーを蒸留水で分散し、室温において吸引ろ過により作成した。吸引ろ過では、直径 $0.2\mu\text{m}$ の穴をもつ PTFE 親水性フィルターを使用した。図は作成したキチン膜の写真であり、白濁した力学的に安定したフィルムである。本研究で用いたキチン膜のディメンジョンは $3\text{mm}\times 5\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ である。図 3 はキチン膜のプロトン伝導度と水和数の関係を示している。図 3 に示されるように、キチン膜は水和に伴い、プロトン伝導度が増加する特性を持つことがわかる。この結果は、生体由来材料「キチン」が水和によりプロトン伝導体となることを示唆している。



図 2 キチン膜

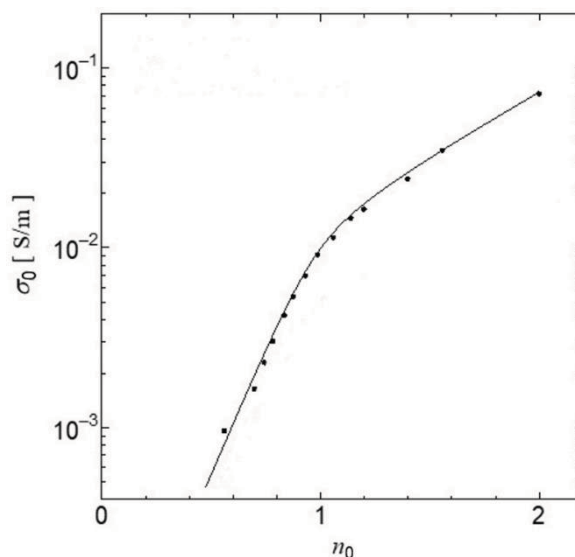


図 3 キチン膜のプロトン伝導度 σ_0 と水和数 n_0 との関係

2.1.2 アンペロメトリーの測定

本研究では、キチン膜へ酵素であるキチナーゼを塗布したときのキャリア生成について調べることが目的である。キャリアの生成と拡散については、様々な方法により調べることができるが、本研究では、簡便で短時間で測定可能であるアンペロメトリーにより評価する。アンペロメトリーはステップ状の電圧を試料に印加したときに生じるキャリア輸送を過渡電流から調べる方法である。図4に示されるように、測定系は非常に簡単であり、ステップ電圧を印加する直流電源、電流量を測定する電流計、これらを制御するコンピュータがあれば十分に測定できる。本研究では、直流電源として、直流安定化電源 (keithley2400) を用いてステップ電圧を印加し、高精度デジタル電流計 keithley2100 により電流を測定した。測定に用いたキチン膜は前節で示したディメンジョンを持つキチン膜を使用し、電極には銀電極を塗布して測定を行った。本研究で使用したキチナーゼは *Pyrococcus furiosus* から得られた 110units/mL の活性をもつキチナーゼであり、本研究で使用している α キチンに対しても、強力な分解活性を示す酵素である。キチナーゼによるプロトン生成はキチナーゼをキチン膜上に塗布することにより行った。

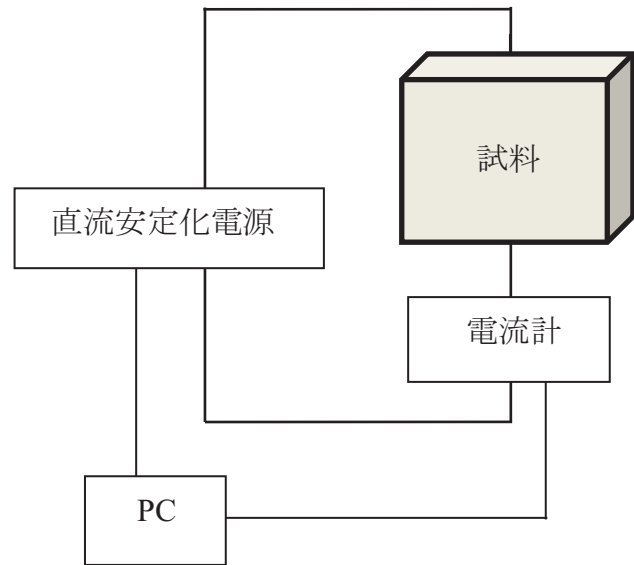


図4 アンペロメトリーの測定系

3. 結果・考察

酵素であるキチナーゼにより、キチン膜にキャリアが生成されるかどうかを調べるために、キチン膜およびキチナーゼを塗布したキチン膜（キチナーゼ・キチン膜）に 0.1V のステップ電圧を印加し、その後の過渡電流を測定したアンペロメトリーの結果を図5に示す。測定試料へのステップ電圧の印加は、内部の電荷を分極させ、伝導キャリアとなる電荷を安定な位置（電極付近）へ輸送することができる。図5に示されるように、キチン膜およびキチナーゼ・キチン膜ともにステップ電圧印加後に、一度電流値が増加し、その後ゆっくりと電流値が減少するいわゆる「過渡電流」が観測されることがわかる。これら両者の過渡電流はよく似ており、キチンとキチナーゼ・キチン膜では同じ機構で過渡電流の減衰が起こると示唆されるが、過渡電流の値がキチナーゼ・キチン膜の方が大きいことを考慮すると、キチナーゼ・キチン膜の方がよりたくさんの電流を生成できるキャリアが存在していることも示唆している。次に、この過渡電流の原因を調べるため、パルス電圧を印加してから200秒程度の時間における過渡電流の減少を拡大した結果を図6に示す。図6に示されるように、両者とも単調的にゆっくりと減衰していることがわかる。これらの減衰は数ミリ秒といった短い時間スケールで減衰する電気二重層の充放電にともなう指数関数的な減衰では記述できない。キチン膜は、図3に示したように、水和に伴いプロトン伝導体となることを考慮すると、この過渡電流はキチン膜およびキチナーゼ・キチン膜におけるプロトンの拡散によ

り生じると示唆される。すなわち、この結果は、この過渡現象が電気二重層の充放電による電流ではなく、キャリアの拡散に由来する電流であると示唆される。キャリアの拡散による過渡電流についてはすでに様々な解析が行われており、拡散方程式を解くことにより、理解できる。

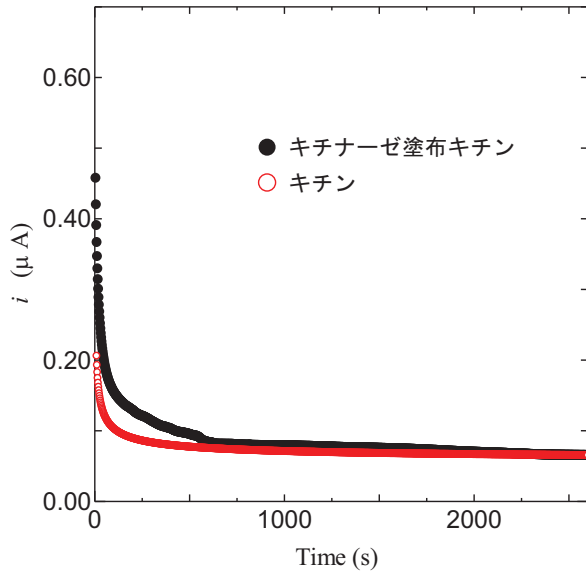


図5 過渡電流の時間依存性

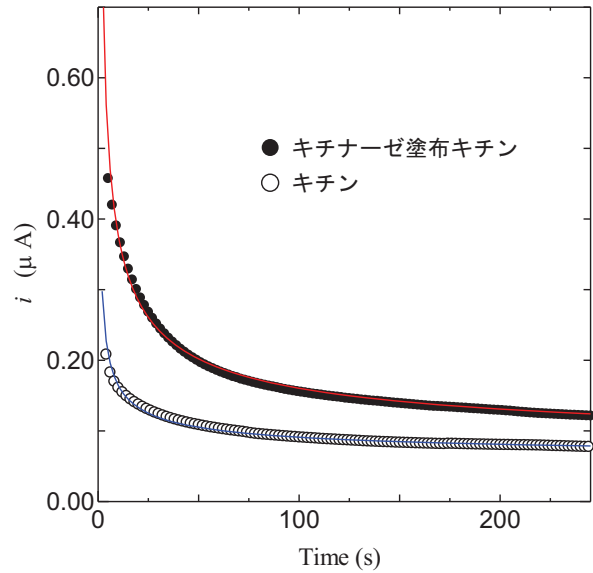


図6 ステップ電圧印加後の過渡電流の時間依存性の拡大図

過渡電流によるイオンの拡散は、Fickの第一法則

$$i = nFAD_o \left(\frac{\partial C_o}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (1)$$

により、記述される。ここで、 n は電荷数、 F はファラデー定数、 A は電極面積、 D_o 、 C_o はそれぞれ拡散定数、キャリア濃度である。 x は電極界面から試料のバルクへ測った距離である。この式のキャリア濃度勾配の部分は拡散方程式を初期条件 $t=0, x \geq 0$ で $C = C_o$ 、境界条件 $x=0$ で $c=0, x \rightarrow \infty$ で $C \rightarrow C_o$ とおくことにより解くことができ、

$$c(t, x) = C_o \operatorname{erf} \left(\frac{x}{2(D_o t)^{1/2}} \right) \quad (2)$$

と誤差関数 erf を用いて得られる。これを微分して、式(1)へ代入すると、

$$i = \frac{nFAD_o C_o}{(\pi D_o t)^{1/2}} \quad (3)$$

が得られる。これはコットレルの式として知られており、平板電極における拡散電流（過渡電流）が時間 t の平方根に反比例することを示している。

そこで、図6の測定結果が、式(3)のコットレルの式で記述できるかどうか調べた結果を、図6の実線で示す。図6の実線のように、キチン膜、キチナーゼ・キチン膜ともに、コットレルの式に従

い、過渡電流が $t^{-1/2}$ で減少することがわかる。この結果は、キャリアの拡散がこの過渡電流の原因であることを示唆している。また、この測定結果を再現する過渡電流の時間依存性を式(3)を用いて求めることにより、キャリア濃度 C_o と拡散定数 D_o を分離して得ることはできないが、これらの積である $C_o D_o^{1/2}$ を得ることができる。この結果から得られるキチン膜とキチナーゼ・キチン膜の $C_o D_o^{1/2}$ はそれぞれ、 8.93×10^{-12} , $9.06 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$ となることがわかった。これはプロトン輸送を決める重要な値であり、拡散定数またはキャリア濃度が他の測定で決まるか、拡散定数とキャリア濃度との関係が新たに得られれば、キャリア濃度と拡散定数をそれぞれ一意的に得ることができることを示している。

よく知られているように、酵素は触媒であり、酵素自身は反応の始状態と終状態では変化せず、反応を促進する役割を果たしている。本研究で使用したキチナーゼは加水分解により、キチン分子間のグリコシド結合を断絶する役割を果たしている。図7 にその模式図を示す。図7 に示されるように、酵素であるキチナーゼがキチンと出会うと、キチン間のグリコシド結合が、断絶されて、水の介入に伴い、グリコシド結合を形成していた C には OH 基が結合する。このように、酵素によるグリコシド結合の断絶は新たな OH 基を生む。よく知られているように、側鎖の OH 基のプロトンは、加湿または溶液中では、この OH 基から離脱して水と配位結合して、オキソニウムイオンとなる。この結果は加水分解酵素であるキチナーゼはキチン内におけるキャリアであるプロトンを新たに生み、プロトン数を増加させる役割を果たしていると示唆している。すなわち、プロトン輸送に対するキチナーゼの主たる効果は、拡散定数の変化ではなく、プロトン数すなわちキャリア濃度を増加にある。

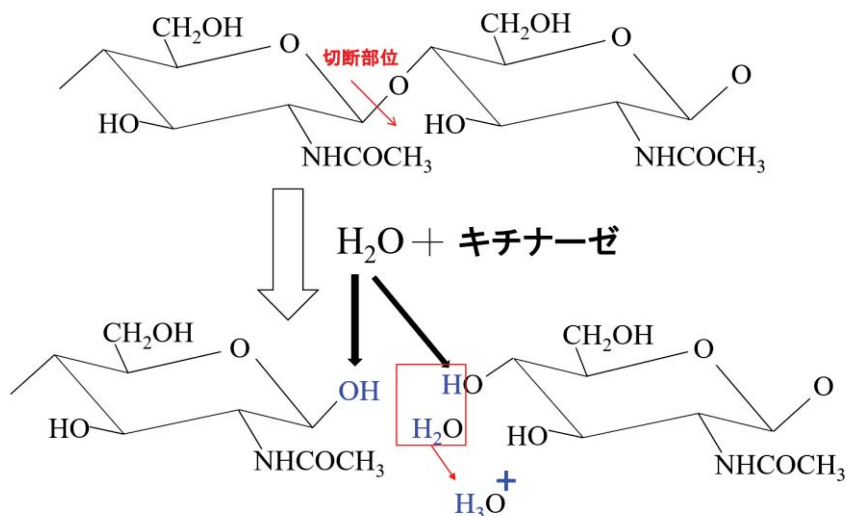


図7 キチナーゼによるキチンの分解反応とキャリア生成

それゆえ、キチナーゼにより拡散定数の変化は無視できるとすると、キチナーゼによりキチン内に生成したキャリア濃度を、図6 の測定結果から概算することができる。キチン膜とキチナーゼ・キチン膜のキャリア濃度と拡散定数の積を、それぞれ $C_{oc} D_{oc}^{1/2}$, $C_{oe} D_{oe}^{1/2}$ とし、拡散定数に対する条件 $D_{oc} = D_{oe} (=D_o)$ を用いると、キチナーゼ・キチン膜において生成されたキャリア濃度 C_{oe} はキチン膜のキャリア濃度 C_{oc} の 10.14 倍となり、酵素の加水分解によりキャリアであるプロトンが約10倍増加することがわかる。また、この結果は、 C_{oc} と C_{oe} に対する別の関係式が得られれば、

C_{oc}, C_{oe}, D_o を一意的に知ることができることも示唆している。そこで、さらに解析を進め、キチン膜とキチナーゼ・キチン膜の過渡電流の差分を求めた。その結果を図8 に示している。図8 に示されるように、キチン膜とキチナーゼ・キチン膜による過渡電流の差 Δi は、時間の経過とともに急速に減少することがわかる。ここで、キチナーゼにより生成される電荷の時間変化は、図8の結果を積分することにより得ることができ、その時間変化は図9 に示されている。このように、電流を生成する電荷はステップ電圧の印加とともに増加し、1300秒付近でほぼ飽和することがわかる。この結果はキチナーゼにより生成されたプロトン輸送により引き起こされていると示唆される。それゆえ、キチナーゼによりキチン膜内に生成されたキャリア数はこの飽和電荷量を電荷素量で割ることにより得ることができ、キチン膜とキチナーゼ・キチン膜のキャリア濃度の差はキチン膜の体積を考慮して $1.68 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ となる。この値を用いると、 C_{oc}, C_{oe}, D_o はそれぞれ $1.83 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}, 1.86 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}, 8.59 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ と見積もることができる。得られた拡散定数は中性子準弾性散乱の測定から得られた拡散定数 $3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ (at 268 K) と同程度であり⁽¹⁶⁾、妥当な値である。

このように、酵素によるキャリア生成においては、過渡電流の差分を詳しく調べることにより、キャリア濃度、拡散定数を見積もることができる。この手法により、生体由来のマテリアルである酵素を利用した新しいデバイスの物性値が明らかになり、生体由来マテリアルの研究および市場導入が少しでも促進されることを期待する。

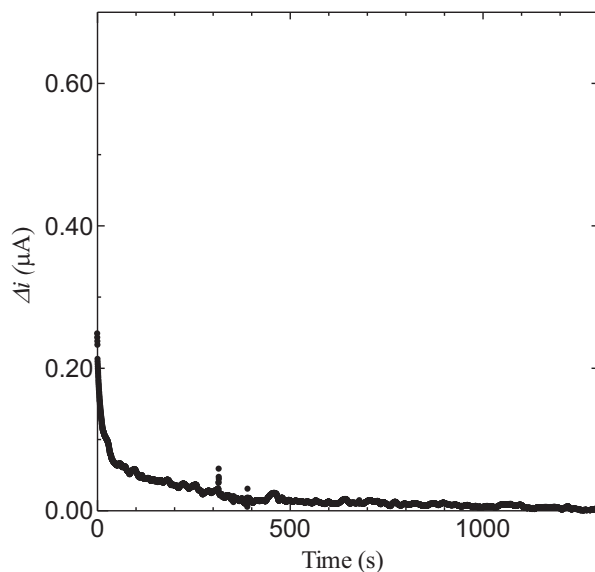


図8 Δi の時間依存性

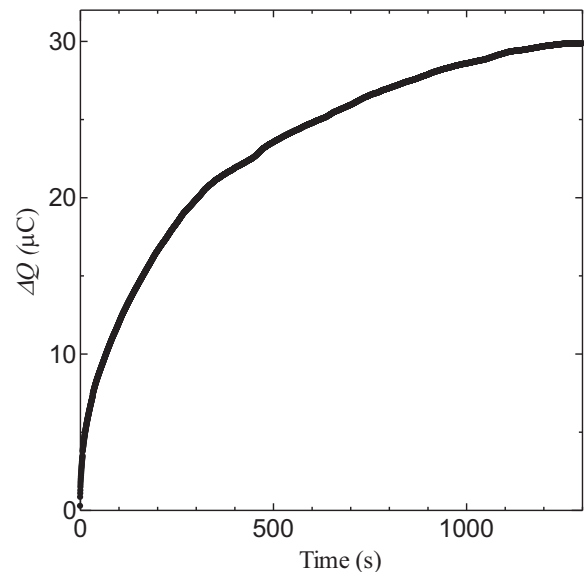


図9 ΔQ の時間依存性

4.まとめ

本研究では、プロトン伝導体という観点から、キチンとその酵素であるキチナーゼを組み合わせた新しい電子デバイスへの可能性とキャリア濃度などの特性評価方法について紹介した。本研究により、優れたプロトン輸送物質である水和キチンに酵素であるキチナーゼを導入することにより、キャリアであるプロトンを生成できることがわかった。この結果は、より高いプロトン輸送能を実現する方法として、加水分解酵素とバイオプロトン伝導体を組み合わせるといった新たな

方法を提起している。すなわち、生体由来物質と酵素の加水分解反応は、プロトンを生成できるプロトンソースになり得ることを示唆している。また、プロトン輸送において重要な物理量である「キャリア濃度」は通常の巨視的測定では「キャリア移動度」と区別できず、単独で得ることが困難であるが、本研究のように酵素を導入し、キャリア濃度のみを増加させる場合において、アンペロメトリーといった簡単な方法でも「キャリア濃度」を見積もることができることを紹介した。これらの結果が、一助となり、新しいバイオデバイスへ生体由来のマテリアルが使用され、次世代の環境にやさしい電子デバイスとして、今後市場へ導入されることを願う。

参考文献

- (1) A, L, Andrady., “Microplastics in the marine environment”, *Marine Pollution Bulletin*, 62(2011), pp.1596-1605.
- (2) A, L, Andrady., “The plastic in microplastics: A review”, *Marine Pollution Bulletin*, 119(2017), pp.12-22.
- (3) L, V, Cauwenberghe., and C, R, Janssen., “Microplastics in bivalves cultured for human consumption”, *Environmental Pollution*, 193(2014), pp.65-70.
- (4) K, L, Law., R, C, Thompson., “Microplastics in the seas”, *Science*, 345(2014), pp.144-145.
- (5) H, Matsui., Y, Matsuo., “Proton Conduction via Water Bridges Hydrated in the Collagen Film”, *Journal of Functional Biomaterials*, 11-61(2020), pp.1-9.
- (6) Y, Matsuo., H, Ikeda., T, Kawabata., J, Hatori., H, Oyama., “Collagen-Based Fuel Cell and Its Proton Transfer”, *Materials Sciences and Applications*, 8(2017), pp.747-756.
- (7) Y, Matsuo., G, Kumasaka., K, Saito., S, Ikehata., “Fabrication of solid-state fuel cell based on DNA film”, *Solid State Communications*, 133-1(2005), pp.61-64.
- (8) T, Furuseki., Y, Matsuo., “Fuel Cell Using Squid Axon Electrolyte and Its Proton Conductivity”, *Journal of Functional Biomaterials*, 11-86(2020), pp.1-12.
- (9) C, Zhong., Y, Deng., A, F, Roudsari., A, Kapetanovic., M, P, Anantram., M, Rolandi., “A polysaccharide bioprotonic field-effect transistor”, *Nature Communications*, 476 (2011), pp.1-5.
- (10) H, Y, Park., S, R, Dugasani., D, H, Kang., G, Yoo., J, Kim., B, Gnapareddy., J, Jeon., M, Kim., Y, J, Song., S, Lee., J, Heo., Y, J, Jeon., S, H, Park., J, H, Park., “M-DNA/Transition Metal Dichalcogenide Hybrid Structurebased Bio-FET sensor with Ultrahigh Sensitivity”, *Scientific Reports*, 6-1(2016), pp.1-9.
- (11) E, Rahman., A, Shadman., Q, D, M, Khosru., “Effect of biomolecule position and fill in factor on sensitivity of a Dielectric Modulated Double Gate Junctionless MOSFET biosensor”, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 13(2017), pp.49-54.
- (12) J, J, Xu., X, L, Luo., H, Y, Chen., “Analytical aspects of FET-based biosensors”, *Frontiers in Bioscience*, 10(2005), pp.420-430.
- (13) T, Kawabata., Y, Matsuo., “Chitin Based Fuel Cell and Its Proton Conductivity”, *Materials Sciences and Applications*, 9(2018), pp.779-789.
- (14) T, Kawabata., Y, Matsuo., “Role of acetyl group on proton conductivity in chitin system”, *Journal of Materiomics*, 5(2019), pp.258-263.

- (15) T, Kawabata., Y, Takahashi., Y, Matsuo., “Anomalous Proton Conductivity in Chitin-Chitosan Mixed Compounds”, *Materials Sciences and Applications*, 11(2020), pp.1-11.
- (16) 廣田夕貴, 富永大輝, 川北至信, 川端隆, 松尾康光, “中性子非弾性散乱によるキチンの水合とダイナミクスの解析(1)”, 日本物理学会 2020 年秋季大会