

2P-190 超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum*由来 PQQ 依存型 glucose dehydrogenase を高配向固定されたバイオアノード電極の特性評価

○向富 綾子¹, 谷屋 早紀², 坂元 博昭¹, 里村 武範², 末 信一郎¹
(¹福井大院・工・繊維, ²福井大院・工・生化)
suyeb10@u-fukui.ac.jp

【目的】酵素を触媒とするバイオ燃料電池は、安全性が高い、軽量化・小型化が容易であるといった利点があるものの、電子移動効率や酵素の安定性などの問題から、実用化への道のりは遠いものとされてきた。本研究では *Pyrobaculum aerophilum*由来 PQQ 依存型 glucose dehydrogenase に His-tag を導入し (His-PQQGDH)、金電極上に電析した銅原子を介して酵素分子を一定方向に配向させたアノード電極を開発した。酵素の固定化法の最適化、酵素固定化電極の電気化学特性について検討した。

【結果】His-PQQGDH を精製し、常温での安定性を検討したところ 2 週間で 60 % 以上の残存活性を示した。表面に銅を析出させた金電極を、His-PQQGDH 溶液中に浸漬することで、His-PQQGDH 修飾電極を作製した。電気化学評価は 50 mM HEPES 緩衝溶液 (pH 7.5) 中で、-0.3 V ~ 0.1 V、10 mV/s で電位掃引し、サイクリックボルタンメトリーを行った。その結果、メディエーター (PQQ) 非存在下において基質であるグルコースの添加により、酵素分子中の PQQ による酸化波の増大が確認され、90 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ の電流密度を得た。His-PQQGDH を化学結合により電極上に固定した場合には、酵素-電極間では PQQ の酸化波の増大は見られなかった。よって、His-tag を用いた酵素分子の配向固定により、酵素分子内の PQQ を介して電極との電子授受が効率よく行われたものと推察される。

Characterization of bioanode electrode employing glucose dehydrogenase from the *Pyrobaculum aerophilum*

○Ayako Koutou¹, Saki Taniya², Hiroaki Sakamoto¹, Takenori Satomura², Shin-ichiro Suye¹
(¹Dept. Fiber. Univ. Fukui, ²Dept. Biotechnol. Univ. Fukui)

Key words *Pyrobaculum aerophilum*, bio-fuel cell, bioanode, His-tag

2P-192 LAL 固定化ビーズを用いたエンドトキシンの高感度・迅速測定法の開発と利用 (第 2 報)

戸田 千尋, ○飯島 綾, 清水 愛子, 青柳 秀紀
(筑波大院・生命環境)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】注射薬や輸液などの品質管理において、発熱の代表的バイロジェンであるエンドトキシン (ET) の混入がないことが日本薬局方で義務づけられており、ET の高感度測定は重要である。また、敗血症などの ET ショック症状を示す救急患者に対して血中 ET 濃度の迅速な測定が求められる。我々は、LAL(Limulus amoebocyte lysate) 試薬を表面に固定化させたマイクロビーズを用いた LAL 固定化ビーズ法 (ET 濃度に起因したビーズの凝集に伴い生じる速やかな光透過率の上昇を攪拌比濁法で計測) を開発し、ET の高感度・迅速測定を実現した¹⁾。本研究では開発した LAL 固定化ビーズ法を用いて実際に種々のサンプル中の ET 濃度測定を行い、本法の汎用性と有用性を評価した。【方法と結果】前報¹⁾に従い LAL 固定化ビーズを作成し、LAL 固定化ビーズ法により、ET 測定に影響を与える夾雑物 (ヘモグロビンやイントラリビッド) を含む溶液の ET 添加回収試験を行った結果、従来法では添加した ET 濃度と大きく異なる値を示したのに対し、LAL 固定化ビーズ法では正確な ET 濃度の測定が可能であった。市販の透析液中の ET 濃度測定を行った結果、LAL 固定化ビーズ法では 28.0 min、従来法では 64.8 min で透析液中の ET を検出できた (ET 添加回収試験を実施した結果、従来法では許容範囲外であったのに対し、LAL 固定化ビーズ法では許容範囲内となり、本法の正確性が示された)。本法を活用し大腸菌一細胞あたりの ET 量を算出した結果、10 cells/ml の大腸菌の ET を算出可能であった。1) H24 生物工学会要旨 p.29

Development of a rapid and sensitive method for assessing endotoxin by using LAL-conjugated-microbeads and its application (part 2).

Chihiro Toda, ○Aya Iijima, Aiko Shimizu, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words dialysate, endotoxin, Limulus amoebocyte lysate, *Escherichia coli*

2P-191 二酸化チタン薄膜上での固定化酵素の活性評価

○中村 仁美, 加藤 且也, 増田 佳丈, 加藤 一実
(産総研・先進製造プロセス)
hi.nakamura@aist.go.jp

【背景・目的】近年、生体を持つ分子認識機構を利用または模倣したバイオセンサーに大きな注目が集まっている。これまでも酵素を用いたバイオセンサーが数多く開発・実用化されているが、その酵素を固定する基板材料の結晶性や微細構造が酵素の吸着特性や酵素活性に与える影響についてはあまり研究がなされていない。そこで本研究では、酵素固定化基板として、制御されたナノ結晶構造を持つ二酸化チタン薄膜を用いて、ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FDH) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) の活性評価を行った。

【方法・結果】二酸化チタン薄膜上に 50 μg の FDH または ADH を物理吸着によって吸着させて酵素反応を行い、活性を測定した。その後、測定した基板を洗浄して再度活性を測定することを繰り返し、計 6 回の活性を測定した。その結果、FDH と ADH では基板洗浄後の活性残存率が大きく異なり、ADH の方が基板洗浄後も活性が高いままであることが示された。現在、各酵素の基板表面への吸着特性に関する解析を進めている。さらに結晶性や微細構造を変化させた二酸化チタン薄膜を用いて FDH および ADH の酵素活性の測定も行い、各酵素が示す挙動の違いに関しても解析予定である。

Activity evaluation of immobilized enzyme on titanium dioxide films

○Hitomi Nakamura, Katsuya Kato, Yoshitake Masuda, Kazumi Kato
(AMRI, AIST)

Key words biosensor, titanium dioxide film, formaldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase

2P-193 LAL 固定化ビーズを用いた β -グルカンの高感度・迅速測定法の開発と利用

○清水 愛子, 青柳 秀紀
(筑波大院・生命環境)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 β -グルカンは真菌類の構成多糖であり、その血中濃度は深在性真菌症の診断指標の一つである。我々は、独自に LAL (Limulus amoebocyte lysate) 試薬を表面に固定化させた β -グルカン測定用のマイクロビーズ (LAL ビーズ-BG) を作成し、 β -グルカン濃度に起因したビーズの凝集に伴い生じる光透過率の上昇を攪拌比濁法で計測することで、従来の β -グルカン測定法と比べて迅速かつ高感度な β -グルカンの測定に成功した¹⁾。今回は、本法を用いて種々のサンプル中の β -グルカン濃度測定を行い、本法の汎用性と有用性を評価した。

【方法および結果】前報¹⁾に従い、LAL ビーズ-BG を作製し、攪拌比濁法で β -グルカン濃度を測定した。夾雑物 (エンドトキシンやプロテアーゼなど) を失活させる前処理を行った試料を LAL 固定化ビーズ法で測定した結果、0.1 pg/ml の β -グルカンを 33.5 min で測定できた (従来法では 86 min で検出)。また、前処理では除去できない夾雑物であるヘモグロビンを種々の濃度で含む β -グルカン溶液を作製し、添加回収試験を実施した結果、従来の攪拌比濁法ではヘモグロビン濃度が 300 mg/dl 以上になると試料中の β -グルカン濃度が正しく測定ができなかったのに対し、本法では 500 mg/dl のヘモグロビンの存在下でも許容範囲内 (75~125%) で迅速かつ正確に β -グルカン濃度を測定することができた。また、本法により、NaOH を作用させた際に *Saccharomyces cerevisiae* から遊離する β -グルカンの濃度を高感度に測定することができた。1) H24 生物工学会要旨集 p.30.

Development of rapid and sensitive method for assessing beta-glucan by using LAL-conjugated-microbeads and its application.

○Aiko Shimizu, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words beta-1, 3-glucan, Limulus amoebocyte lysate, *Saccharomyces cerevisiae*