



酸化還元酵素・電極共役系を基盤とした生物電気化学研究の展開

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 加納 健 司

1. はじめに

生物と電気の間には密接な関係がある。発電生物、電気生理現象等々については紀元前から知られていた。Galvaniの動物電気説やそれを基に発見されたVoltaの電堆を経て、人類は電気の利用を積極的に始めた。一方、20世紀半ばまでには、生物が利用するエネルギーはすべて酸化還元反応に起因し、地球上の酸化還元反応(元素サイクル)のほとんどは生体触媒が関与していることも明らかにされていた。その後の更なる生化学の発展や分子生物学の誕生を背景にして、各方面で新しいバイオテクノロジーも急速に発展した。電気化学や分析化学の分野でも、この四半世紀、生物の種々の酸化還元能や電荷移動現象を利用する試みが、国内外で盛んに行われてきた。こうした状況を背景に、我々も、生体関連物質の酸化還元反応に焦点をあて、酸化還元酵素や補酵素等の機能・構造評価と、電極反応解析を軸とした方法論を提案するとともに、酸化還元酵素・電極共役系を基盤とした生物電気化学に関する研究を行ってきた(図1)。本講演では、それらの一部を紹介させていただく。

2. 1e<sup>-</sup>/2e<sup>-</sup>スイッチャーの特性解析

キノンはフラビンと同様、生体内電子移動の1e<sup>-</sup>/2e<sup>-</sup>スイッチャーとして極めて重要な役割を果たしている。Pyrroloquinoline quinone (PQQ)を皮切りに、1996年までに4つのキノンが新規酸化還元補酵素として発見されていた(図2)。これらの特性を知るには、まず酸化還元反応を2段階1電子移動過程として捉えることが重要であると考えた。このため電気化学理論に基づいたシミュレーションと非線形回帰法を組み合わせた電気化学信号の新規解析法や、電解ESRセルを開発した。これらの手法により、多くのキノン系補酵素の酸化還元・酸塩基特性を明らかにし、触媒反応機構や自動酸化反応機構を提言した。さらに研究対象をキノプロテインやフラボプロテインに広げ、多くの研究者との共同研究により、新規なキノヘモプロテインアミン脱水素酵素(QH-AmDH, 図3)の発見や、ヒスタミ

ン脱水素酵素(HmDH)等の構造決定や発現系の構築に携わることができた。また、HmDHの活性中心として、新規キノン補酵素cysteine tryptophylquinone (CTQ, 図2, 3)と出会う幸運にも恵まれた。そしてこれらの酵素活性中心の酸化還元中間体セミキノンラジカルに焦点をあてた特性評価を行い、グルコース脱水素酵素中のPQQとCa<sup>2+</sup>の相互作用、HmDHの6-S-cysteinyl-FMNとFeSの相互作用、フルクトース脱水素酵素(FDH)のFADとヘムCの相互作用等について論じた。

この研究過程で、酸化還元酵素の酸化還元電位の評価が必須となり、カラム電解型セルを用いたバルク電解法による電位評価法と、新規に考案した無隔膜バルク電解法による電位評価法を考案して、熱力学的パラメータの評価を進めた(無隔膜バルク電解セルは市販に至っている)。

こうした研究過程で開発した手法は、関連する種々の課題に適用することができた。水溶液中における吸着状態のキノンの酸化還元反応平衡系において、理想型からのずれが観測されることは知られていたが、当時は、分子間相互作用に基づく理論で説明されていた。詳細な理論解析の結果、このずれの原因は2段階1電子移動過程の特性によるものであることを実証した。また、水溶液中では極めて不安定な芳香族化合物の1電子還元

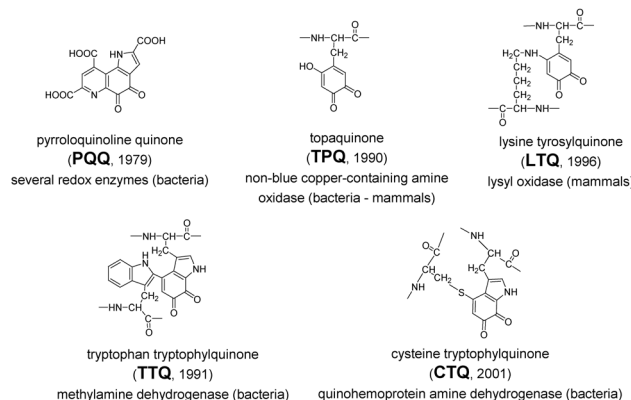


図2 キノン系補酵素

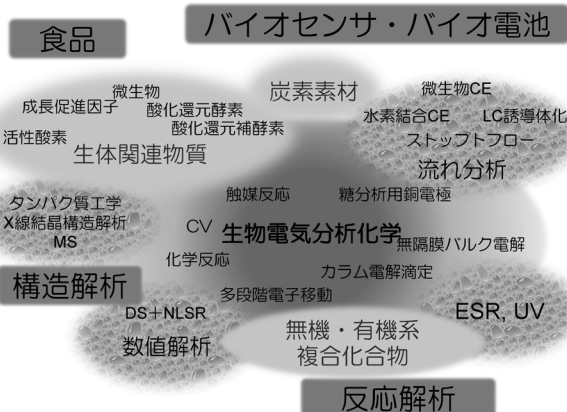


図1 生命科学から物質科学を対象として、基礎から応用という視点で生物電気化学

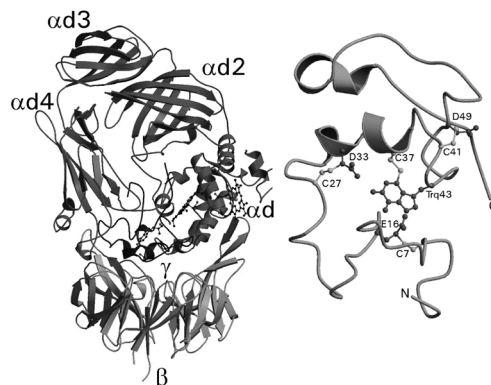


図3 QH-AmDH(左)とCTQを含むγサブユニットの構造

アニオンラジカルをシクロデキストリンで包摂安定化できることを、電気化学的、および ESR 的に実証し、誘起双極子モデルで説明した。ピフィズ菌成長促進因子としてのキノンの役割も提唱した。

### 3. 酵素機能電極反応

酵素反応と電極反応の共役系を酵素機能電極反応という。この反応のうち、電子移動メディエータを用いた電子移動 (MET) 系は、実用的な生物電気化学デバイスの構築において極めて有用である。酵素—メディエータ間の反応速度を決定する因子として、直線自由エネルギー関係 (LFER) と長距離電子移動反応の重要性を指摘し、メディエータ選択の指針を与え、それぞれの酵素に適切なものを探索した。さらに LFER の原理に基づき、NADH/NAD<sup>+</sup>系、(中性付近での) H<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>系、およびギ酸/CO<sub>2</sub>系に関して、電気化学的相互変換を実現できる MET 型酵素触媒系を構築することに成功した。また、各種のメディエータ固定化法も提案し、多酵素連結系においてリポゾーム内で実現することの有用性を示した。

一方、メディエータを用いない直接電子移動 (DET) 系は、将来的な電気化学デバイス創生の鍵となることから、世界中で活発な研究が行われてきたが、実現は容易ではなかった。こうした背景のもと、マルチ銅酸化酵素による中性付近での酸素の 4 電子還元反応、FDH によるフルクトースの 2 電子酸化反応、膜結合型ヒドロゲナーゼによる水素の酸化反応等について、極めて高い電流密度で実現できることを見出した。

電極も含めすべての界面には電気二重層が形成され、その電場は 10<sup>6</sup> V cm<sup>-1</sup> 程度に達する。したがってタンパク質のように電気二重層の厚さよりも大きな分子でも、その局所電荷が電気二重層内に位置すると、非常に大きな電気泳動力を受けることになる。この効果で、電極表面に吸着した酵素は条件によって失活しやすくなると予想し、それを実証した。そして、その効果の回避策として、修飾電極の利用を提言した。

### 4. バイオセンサー

複合酵素系を含む各種のバイオセンサーを示すとともに、反応系やメディエータの問題点を、理論を含めて明示し、問題克服のための解決法や、より良いメディエータの利用を提言した。これらの知見を基に開発した血糖値センサーは市販に至った。特に世界で初めて酸素とマルトースに妨害されない血糖値センサーを開発し、大きな市場を持つに至っている。さらにメディエータの開発により、院内用高性能血糖値センサーへと進化させることができた。またアンペロメトリック・ポテンシオメトリーという新規概念も提案した。

ペルオキシダーゼを用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 測定用光分析法は頻繁に利用されるが、測定液中に、アスコルビン酸 (AsA) やポリフェノール等の還元剤が共存している場合には適用できない。そこで、界面反応である電気化学法の特長を利用することによりこの問題を克服した。この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> バイオセンサーは市販の残留農薬測定装置に組み込まれたほか、カテキンの自動酸化反応を追跡する目的にも用いた。本酸化反応では、カテキンの 1 電子酸化ラジカルが極めて重要な働きをしていることを示し、金属イオンだけでなく、AsA によって、著しく促進されることも明らかにした (図4)。

### 5. バイオ電池

2000年頃に、酵素あるいは微生物を利用したバイオ電池の

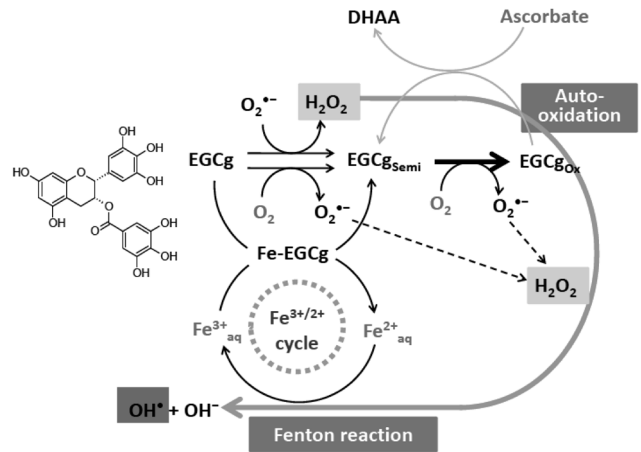


図4 カテキンの自動酸化反応機構 (初発反応)

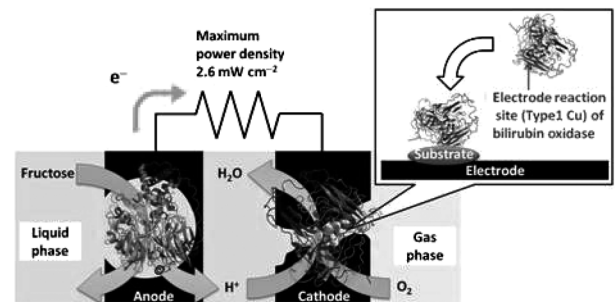


図5 DET型バイオ電池による発電

構想について報告した。その後、これは次世代エネルギー変換系のひとつとして世界的に注目されるようになった。酵素バイオ電池の研究では、電池に適する酵素の探索のみならず、構造生物学的アプローチや部位特異的変異による酵素機能改変を行った。また、LFERに基づいたメディエータ選択や、電極の改造、炭素微粒子の利用、酵素の大きさに合わせた炭素微粒子の創製法の開発、ガス拡散型電極の試作等を行った。こうした学際的研究を基盤に、バイオ電池の性能を飛躍的に向上させ、企業との共同研究の結果、MET型では太陽電池並みの出力を達成した。またDET型でもその1/4程度に迫る世界最高性能を実現した (図5)。

一方、単離酵素のみならず、微生物を触媒とした電極反応系にも注目し基礎研究を展開した。ピフィズ菌の成長促進因子としてのキノンの機能解明を機に、電極電位や最終電子受容体により微生物代謝系を調整できることを示し、微生物バイオ電池や物質生産系創生への展開の基礎研究を行った。さらに藍藻を用いたバイオ太陽電池構想も提言した。

**謝辞** 本研究は主に京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生体機能化学分野において行われたものです。京都大学名誉教授 千田 貢先生と池田篤治先生には、学生時代から長い期間に亘って、電気化学に関するご指導をいただきました。また、研究を進めるにあたっては、非常に多くの大学・企業の教員、学生、そして研究者の方々に、共同研究者としてお加わりいただき、貴重な助言と支援をいただきました。一方、形の上での共同研究ではないにしても、多くの先輩や友人と、研究のことや人生のことを語り合う大切な時間を共有することができました。これまでのすべての関係者に感謝いたします。