

電子伝達機能を有するタンパク質と合成高分子のハイブリッド化によるバイオエレクトロニクス素子の設計

Design of bioelectronic devices by hybridization of electron-transfer proteins with synthetic polymers

代表研究者	東京工業大学生命理工学部教授 Prof., Fac. of Bioscience and Bioengineering, Tokyo Institute of Technology Toshihiro AKAIKE	赤池敏宏
	職業訓練大学校教授 Prof., The Institute of Vocational Training Ryoichi AOGAKI	青柿良一
	東京農工大学工学部技官 Res. Assoc., Fac. of Tech., Tokyo Univ. of Agriculture and Technology Megumi KUNO	久能めぐみ
	東京農工大学大学院生 Grad. Student, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology Tatsuaki SUZUKI	鈴木達明
	(財)神奈川科学技術アカデミー Kanagawa Academy of Science and Technology Takahiro DAIDO	大道高弘

Bioelectrochemical devices are expected to function as biosensors and biocatalytic electrode in biomedical field including artificial organs and cells. In order to design those devices, we studied electron transfer between the electrode and redox protein such as cytochrome *c*. Horse heart cytochrome *c* was immobilized on $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$ electrode whose surface was coated with poly-(glutamic acid) derivatives. That polymer forms a gelled polyanion membrane in the aqueous solution. Thereby the redox reaction of cytochrome *c* could be successfully controlled.

Since several electrochemical properties of cytochrome *c*-immobilized electrode were closely dependent on ionic strength, it was suggested that the interaction of cytochrome *c* molecules with polyanion gel was supported by electrostatically attractive force. The coupling reaction of the cytochrome *c*-immobilized electrode with oxidoreductase, *e.g.*, cytochrome oxidase and diaphorase were also examined.

Reduction current of cytochrome oxidase on cytochrome *c*-immobilized ITO electrode was measured in -0.2 V vs. SCE . The current corresponds to continuous reduction of oxygen in solution and cytochrome *c* molecules are rapidly reduced at that potential. It was indicated that apparent cathodic currents of cytochrome *c* decreased with ionic strength, however that cathodic current per molecule increased with ionic strength. Moreover the electron transfer activity of an immobilized cytochrome *c* molecule closely correlated to apparent diffusion constant of the electron (D_{app}). On the other hand immobilized cytochrome *c* could also react with diaphorase which is classified to NADH dehydrogenase. As the redox reaction of immobilized cytochrome *c* could be regulated by the electrode potential, it is thought that electrochemical NADH oxidation result from mediation of immobilized cytochrome *c*.

In this study, the interactions between IgG and the monolayers of dioleoylphosphatidylcho-

line (DOPC) and stearylamine mixed with various ratios were also investigated.

We observed that behavior of IgG adsorption to various monolayers were different according to the contents of DOPC and stearylamine, showing that an affinity of IgG to the mixed monolayers increases with the content of cationic component, stearylamine. And it was suggested that F(ab')₂ fragment has higher affinity to cation-rich monolayer than Fc fragment.

All the abovementioned research suggests that biomolecular assembly systems might make contributions to highly functional devices for medical technology as well as electronics and chemical industry.

研究の目的

21世紀の情報・エレクトロニクス分野や医療分野において、その活躍が期待されているバイオチップ（バイオエレクトロニクス素子）とは、タンパク質などの高度に特異的かつ能率的な生体高分子を、金属、半導体、高分子材料のような人工材料とハイブリッド化し分子レベルの情報処理機能を発揮させようとするものである。期待される機能は、センシング、スイッチング、メモリー、情報の伝達や変換、増幅、整流、エネルギー貯蔵、エネルギー産生等々多岐に及ぶが、実際に生体高分子を利用するデバイス作りは、バイオセンサー分野で酵素や抗体を固定化した電極が設計される研究を除いて、近年に到るまでアイデアの域を越えるものではなかった。

本研究は、人工臓器、人工細胞の超マイクロ化・高性能化を担うバイオチップを重点的に、工学的に有用なバイオエレクトロニクス素子を設計・製作することを目的としている。すなわち、チトクローム*c*など生体内で電子伝達機能を担うタンパク質を合成高分子膜や合成脂質単分子膜に固定し、その電子移動機能と他分子との共役反応をコントロールすることによって前述のバイオエレクトロニクス素子として期待される諸機能を具体的に発現させるだけでなく、医学・工学分野で実際に利用可能な安定性を獲得することを追求した。

さらに、生体高分子の中で最も汎用性の高い分子識別素子とも言える抗体分子を高分子・合成脂質膜へ固定化制御しバイオエレクトロニクス機能を有する分子素子を立体特異的に組み立てる手段として抗体を利用できる道も併せて追求した。

このような研究の進展により、体内で長期にわ

たって情報を検知・伝達するのみならず判断・命令機能さらにはその駆動エネルギーを産出する機能をも有する理想的な人工細胞、人工臓器、人工神経システムなどの開発につながるものと期待した。

研究経過および研究成果

チトクローム*c* (Cyt. *c*, 分子量約 12,500) は、ミトコンドリア呼吸鎖においてタンパク質複合体間の電子伝達を担っており、その効率的なエネルギー交換システムの一部を形成している (図 1)。

これら電子伝達成分の中でも、Cyt. *c* は本来ユニークな特徴を有しており、実験上の取り扱いやすさや構造的情報の充実度などの面からも研究対象として興味深い分子である。筆者らは、将来人工細胞や人工臓器に組み込まれて認識・情報伝達・記憶・エネルギー産出などの役割を担うような生体内デバイスの開発を志向する立場から、Cyt. *c* の固定化電極における機能制御に関する研究を行ってきた。すなわち、native な活性を失うことなく Cyt. *c* を固定化する手法を見いだしてきた。本研究ではさらに酵素に対するメディエーター機能に注目し、固定化 Cyt. *c* の電極反応と酵素反応が共役するような系のデザインについて研究した。

チトクローム*c* (Cyt. *c*) は通常利用される多くの電極との間では可逆的な電子授受は行わないが、電子伝達のメディエーターにすらならない親水性高分子料によって電極を修飾し Cyt. *c* との相互作用を制御すると、電子授受が可能となることが判明した。例えば、ポリグルタミン酸誘導体をキャスト法により薄膜被覆したネサガラス電極を用いると、そのポリアニオンゲル中に Cyt. *c* が

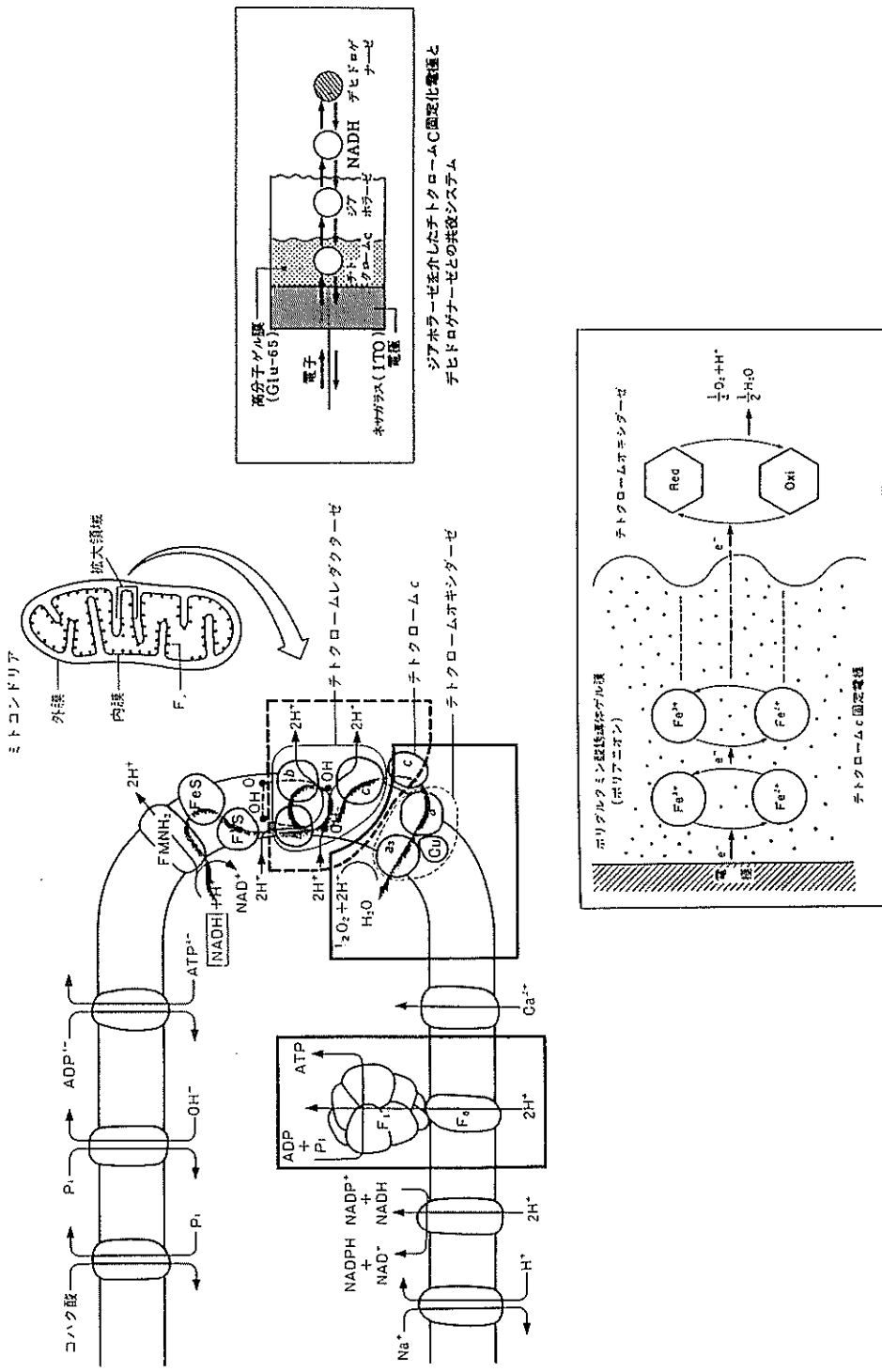
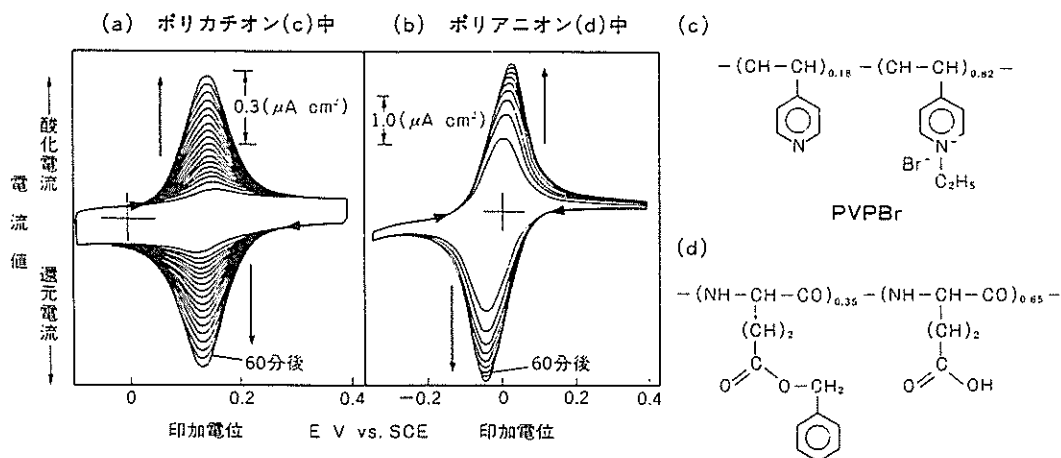


図 1. ミトコンドリア内膜中の電子伝達系タンパク質の配置とモデル化へのアプローチ.



チトクローム *c* 濃度: $40\mu\text{M}$, リン酸緩衝液: $\text{pH}7.4$, 0.05M , 掃引速度: 5mV 秒

Glu-65

図2. ポリカチオン, ポリアニオンの親水性ゲル膜中に固定化されていくウマ心筋のチトクローム *c* のサイクリックボルタモグラム ((a)(b)) と親水性ゲルの分子構造 ((c)(d)).

静電的に取り込まれたタイプの Cyt. *c* 固定化電極を調製することができる。

図 2(b) に, ポリアニオンゲル中に Cyt. *c* が固定化されていく様子を表すボルタモグラムを示す。これは図 2(a) で示した部分四級化ポリ 4-ビニルピリジンのようなポリカチオンゲル内での Cyt. *c* の電子授受の挙動とは明確に異なっている。つまりピーク電流の値, その電位の位置 (標準酸化還元電位と対応), 波型に大きな差異が観察され, Cyt. *c* と各ポリマーゲルとの相互作用に顕著な違いのあることが明らかである。結局ポリアニオンゲル内に固定された Cyt. *c* が native な状態に近い生理活性を保持することが示唆された。

次に, イオン強度を変化させて Cyt. *c* の固定量に対応するピーク電流値 (ipa) の変化を検討した結果, ipa はイオン強度の平方根に反比例することが判明した。このことは, Cyt. *c* とアニオンゲル間の相互作用が主としてイオンのなものであることを示唆している。コートする厚みを変えることによりアニオンゲルの量を増加させていくと, Cyt. *c* の固定量はある程度の範囲までは比例的に増加させうることも確認されている。

さらに, 円二色性 (CD) スペクトルのような分光学的観測からは, このアニオンゲル内に固定さ

れた Cyt. *c* には立体構造変化は確認されず, 生理的な固定状態が実現しているものと判定された。

以上示してきた現象は, ネサガラス電極以外のグラッシーカーボン, 白金, 銀など電極をポリアニオンで被覆した場合にも観察される。すなわち, 従来 Cyt. *c* との反応に対し電子移動能が全くないとされていた電極でも, その電極表面をポリアニオンで被覆することにより, 安定な Cyt. *c* 固定化電極を調製できるということが判明した。

このように調製された Cyt. *c* 固定化電極は, バイオエレクトロニクス素子への応用のみならず, その本来の機能を利用したメディエーター電極, 触媒電極, さらにセンサーとしての機能も期待されている。そこで, この Cyt. *c* 固定化電極のメディエーター機能として, 生体内における Cyt. *c* の酸化側パートナーであるチトクロームオキシダーゼとの電子移動を検討し効果的な相互作用の生ずることを見いだした。

ポリアニオンゲル膜に固定された Cyt. *c* は, 電子の自己交換反応を通じて, 電極側から液相側に存在するチトクロームオキシダーゼに容易に電子を伝達するものと考えられた。つまり, このアニオンゲル修飾電極により, 電極 \longleftrightarrow Cyt. *c* \longleftrightarrow チトクロームオキシダーゼの電子授受反応が共役したことになる。結局, 電極から電子を定電位

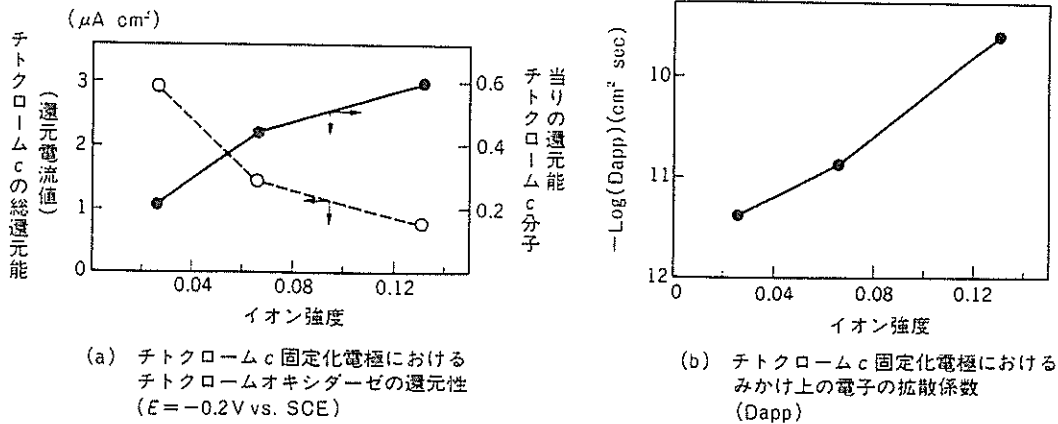


図3. チトクローム *c* 固定化電極の機能の強度依存性。

●, ジアホラーゼ, チトクローム *c* 固定電極; ▲, チトクローム *c* 固定電極 (ジアホラーゼは溶液状態)。

(-0.2 V vs. SCE) で送り続ける限り、液相側で酸素分子 (O_2) 定電位還元を継続させることが可能である。これは一種のバイオキャタリスト電極とみなすこともできる。

また、ミトコンドリア内膜の電子伝達系システム (図1参照) の後半のプロセスをモデル化したものとも考えられる。

ところで低イオン強度の条件下において、多量の Cyt. *c* を固定した電極の方が、少量の Cyt. *c* しか固定できない高イオン強度の条件下でのものより、大きな還元電流が流れ、効率よくチトクロームオキシダーゼを還元することが判明した (図3(a))。

しかしながら、Cyt. *c* の固定化量当たりの還元能に注目すると、反対に高イオン強度条件下のものの方が大きいことが判明した (図3(a))。

さらにこの傾向は、その膜内でのみかけ上の電子の拡散係数値 (D_{app}) と対応していることもわかった (図3(b))。

すなわち、ポリアニオンゲルと Cyt. *c* との静電的相互作用が強い低イオン強度の条件下ほど、そのゲル内での固定化 Cyt. *c* の自由度は失われ、膜内での電子移動速度が低下するものと思われる。このような特徴は、電極を修飾するアニオン性のゲルの種類を変えることにより微妙に変化するこ

ともわかった。要するに Cyt. *c* 固定化担保の構造、さらにはその溶媒環境を制御することにより、固定化 Cyt. *c* の機能を容易にコントロールすることが可能であると期待される。

以上述べてきたように、Cyt. *c* 固定化膜は、その膜内のアニオンサイトと Cyt. *c* のカチオンサイトとの静電力により、Cyt. *c* を固定化しつつ、しかもその Cyt. *c* のある程度の運動性を利用して電子伝達を行っている。このメカニズムは、ミトコンドリア膜における Cyt. *c* の電子伝達が首振りのメカニズムで行われているのであろうとの推定と対応しており、前述したミトコンドリア膜の部分的なモデル膜としての特徴がよりいっそう強く現れている (図1参照)。

さらに、筆者らは好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来で熱安定性に優れたディアホラーゼ (DIA) を還元側のパートナーとして、利用すると電極 \longleftrightarrow Cyt. *c* \longleftrightarrow ジアホラーゼ \longleftrightarrow NADH 間のそしてさらにはデヒドロゲナーゼ間の電子授受反応が共役する事実を見いだした。

実験は、DIA と Cyt. *c* が本来の生理的なレドックスパートナーでないことから、まず溶液系における両者の反応性について調べた上で、Cyt. *c* 固定化電極系での反応との比較を行うという方針で、固定化 Cyt. *c* と DIA の共役条件の解析を

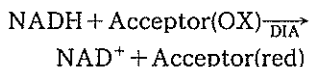
表 1. ジアホラーゼによる NADH の酸化反応における電子受容体 (Acceptor) の基質特異性と反応活性
—チトクローム *c* と低分子基質 (DCIP, INT) の比較—

Acceptor	Cyt. <i>c</i> *	DCIP	INT
K_m^{acceptor} (mM)	0.03	0.015	0.40
K_m^{NADH} (mM)	0.21	0.50	0.07
Optimum pH	>8.0	8.0	7.5
Activity (U/mg)	0.70	1200	290

* 反応に用いた溶流

10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.4, $I=0.026$).
DCIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; INT,
iodonitrotetrazolium violet.

行った。DIA の仲介する反応式は下記のように表せる。



つまり、特異的に NADH に作用して電子を奪い、その電子を電子受容体 (主に低分子色素) へ受け渡す働きをする。そこでウマ心臓由来の Cyt. *c* が、*B. stearothermophilus* 由来の DIA の電子受容体となるかどうかを分光学的手法を用いて検討し、DIA により NADH から奪われた電子が、酸化型 Cyt. *c* へ移動しうることを明らかにした。

DIA の Cyt. *c* に対する反応性を評価するために、酵素反応の速度論的パラメーターを求めた。表 1 に Cyt. *c*, NADH を基質としたときの結果を他の基質を用いた場合の結果と比較して示す。

反応速度に対するイオン強度の影響を調べたところ、溶液系ではイオン強度の増加につれて、反応速度は一様に減少した。しかし固定化電極系では、ベル型の挙動をとった。これはイオン強度が、Cyt. *c*-DIA 間の複合体形成を支える静電的引力へ影響を及ぼしただけでなく、被覆膜内への Cyt. *c* の固定能力や拡散速度の変化などの要因へ複合的に影響した結果であると考えられる。

次にこの共役システムを利用して NADH の電気化学的酸化反応を検討した。図 4 には、NADH 濃度の対数と酸化電流値との関係を示した。両者の間にはよい直線性が認められ、NADH がタンパク質固定電極によって電気化学的に酸化されて

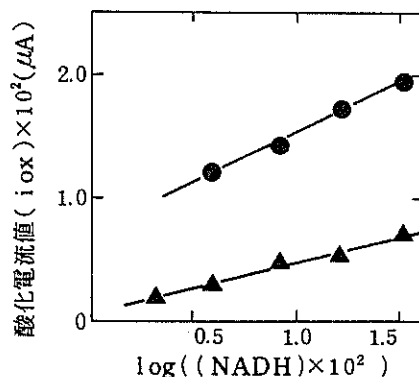


図 4. チトクローム *c*-ジアホラーゼ固定化電極システムによる NADH 酸化反応 (NADH 濃度と酸化電流値との関係)。

いることが示された。

この共役システムにさらに脱水素酵素 (グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) を作用させることによりグルコース-6-リン酸の酸化も追求し、その結果 (ジアホラーゼ-Cyt. *c*) 固定化電極によって酸化された NADH が基質とその脱水素酵素の添加により元の NADH に戻ることが確認された。すなわち、NADH は本電極システムによって NAD^+ に酸化され生じた NAD^+ の酵素との共役システムが電極上で再現されることがわかった。結局図 1 で示したミトコンドリア内膜の還元側共役システムの電気化学的機能制御の実現が酸化側共役システムと同様に、期待できるようになった。

以上 Cyt. *c* 固定化電極の応用例の一つとして、オキシダーゼ系とレダクターゼ系に対するメディエーター機能を検討した結果について述べた。

さて、ポリアニオンであるポリグルタミン酸誘導体をキャスト方によりゲル膜上に被覆したネサ電極を用いると、そのポリアニオンゲル中に Cyt. *c* 固定化電極を調製することができることは、本研究の出発点とも言える実験事実である。この Cyt. *c* 固定化電極のエレクトロニクス素子への応用の可能性についても検討を加えた。この電極は、Cyt. *c* によって着色しており、その電極電位を制御することにより、酸化型のオレンジ色と還元型のピンク色との間の可逆的な色の変化が起こ

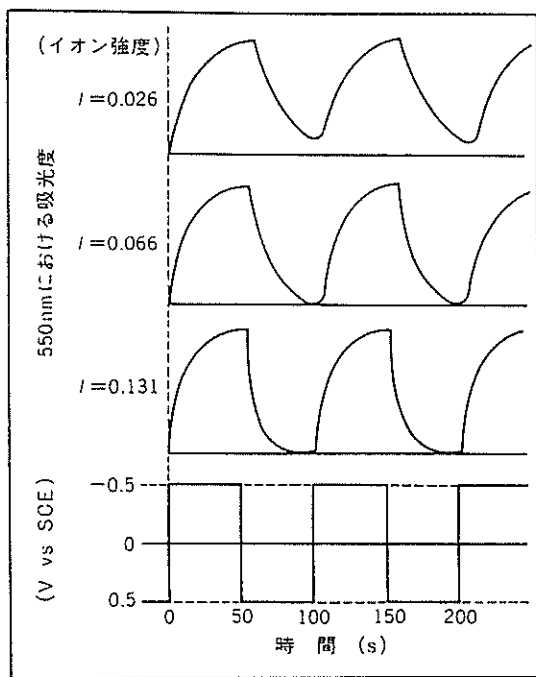


図5. チトクローム *c* 固定化電極においてスイッチング応答するチトクローム *c* 吸光度の変化とそのイオン強度依存性。一

る。すなわち、この Cyt. *c* 固定化電極は、エレクトロクロミックな表示素子としての利用が考えられるようになった。この素子の応答性は、Cyt. *c* の固定化量、さらには溶媒環境（イオン強度）などを制御することにより、ある程度のコントロールが可能である。さらに、Cyt. *c* の酸化状態と還元状態の違いを利用したメモリー素子への応用も期待されている。印加電位をステップ状（+0.5V ← -0.5V）に変化させると、固定化 Cyt. *c* 電極の 550 nm の吸光度が応答して変化することがわかった（図 5）。この応答性は、溶液のイオン強度が大きいほどシャープである。この現象は、本システムがエレクトロクロミック素子として作動していることをより明確に示している。吸光度の山を '1'、谷を '0' の状態に見立てることにすると、この膜はメモリー素子として応用できるであろう。すなわち、現行のリソグラフィ技術のマイクロ化、あるいはレーザー処理などにより、極微小ドメインごとに 1 ビットの情報をインプットす

ることは十分可能であると思われる。電氣的な ON-OFF 操作により、スイッチング素子と見なすことも可能である。

以上のチトクローム *c* を用いたバイオ素子設計と並行して、配向制御された抗体単分子膜の調製をめざす実験も行った。

まず、抗体 (IgG) 分子の固定化制御を目的として、各種アミノ酸及びジペプチドを側鎖に有するポリメタクリル酸誘導体を合成し、抗体 (IgG) 分子との相互作用を、我々の開発したマイクロファイアカラム法で解析した。吸着量を測定するのみならず吸着配向性を推進するために、IgG の F(ab')₂、Fc 各フラグメントの吸着挙動も検討した。ポリメタクリル酸の-COOH 基周辺の親水性、疎水性を種々変化させることにより IgG 分子の吸着量、配向性をある程度制御することができることが判明した。芳香族側鎖を有するアミノ酸の結合により、IgG 分子の吸着量や Fc ドメイン優先の吸着配向性を高めることができた。さらに、アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの導入により、一段とこの傾向が強まった。すなわち、IgG 分子を多量にかつ Fc サイドで吸着固定しやすい材料の設計、さらにはバイオエレクトロニクス素子の組立手段の確立の可能性が見いだされた（図 6）。

そこで次に、免疫グロブリン G (IgG) 固定化のための素材として、合成脂質の単分子膜に注目した。特に、脂質単分子膜中のカチオン分子の存在比を変化させ、膜の荷電分布の違いによる IgG の吸着挙動を解析した。単分子膜は、分子として荷電を持たないジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC) とカチオンサイトを有するステアリルアミン (StN) を混合することにより荷電分布を変化させた。IgG の吸着は各混合単分子膜を一定の表面圧に調整した後、IgG 溶液上に移動させることにより行った。その結果、IgG の吸着は、単分子膜中の StN の存在比、すなわちカチオン分子の導入比が高まるにつれ強まることがわかった。さらに、F(ab')₂ フラグメントの方が Fc フラグメントよりもカチオン膜に対する親和性が高いことが示唆された。このことをふまえて Fab フラグ

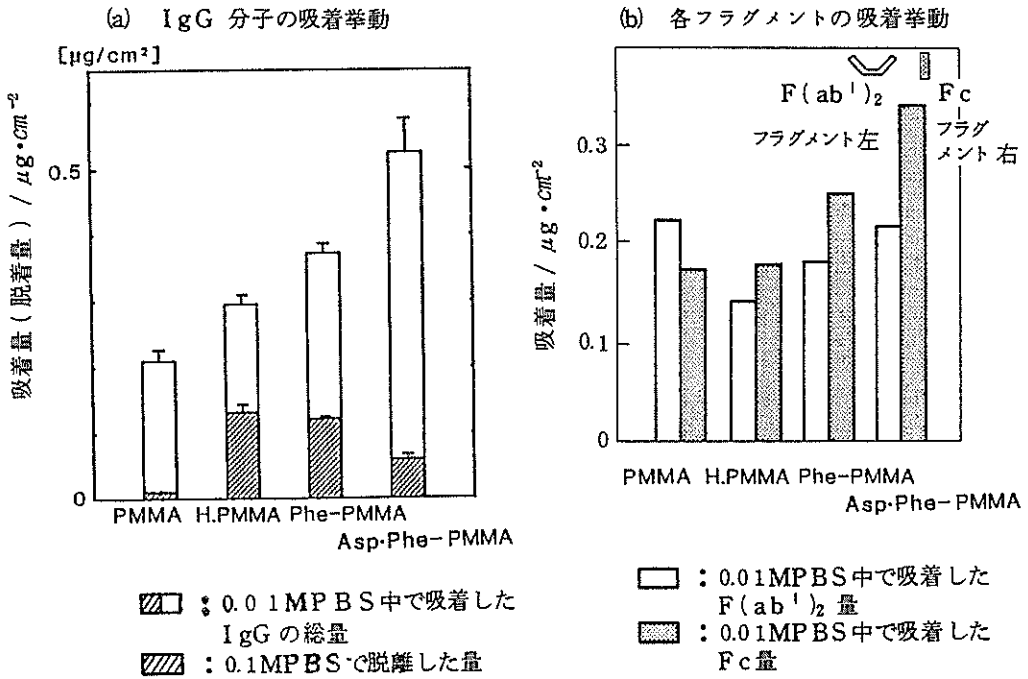


図6. 各種アミノ酸で修飾したポリメタクリル酸誘導体に対するIgG分子とその $F(ab')_2$, Fcフラグメントの吸着特性.

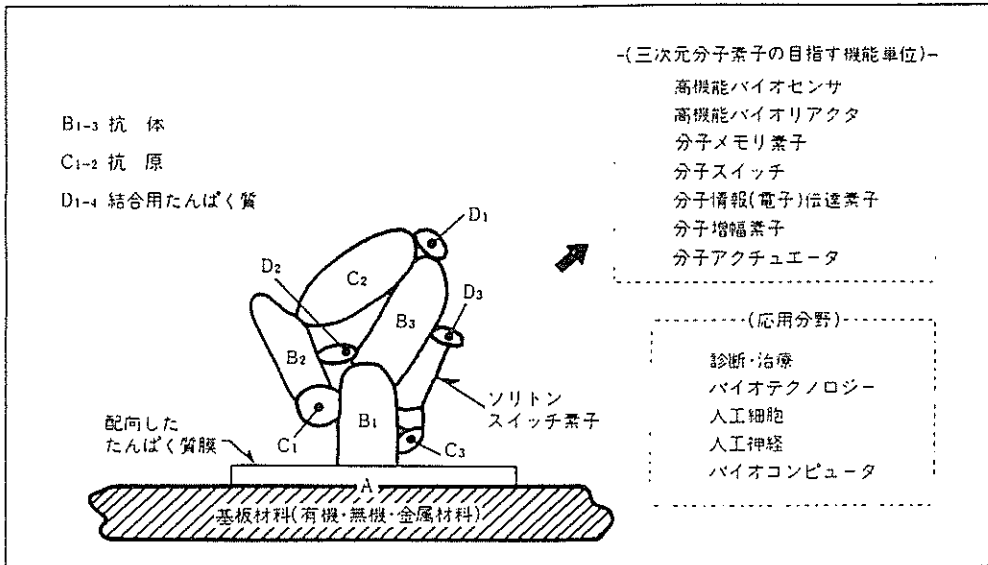


図7. タンパク質の三次元アセンブリ (分子積み木) から成る未来型ハイブリッドエレクトロニクス素子.

メントの共有結合に基く位置特異的固定膜を設計した。

以上の研究により、タンパク質の固定化に際し、吸着量、コンホメーション、配向性すべてを同時に最適制御することは現時点では不可能であるが、このような吸着制御は材料側の表面構造がより緻密に設計されるにつれ、しだいに高度なものになっていくと期待される。

例えば、さらに構造のよく制御された各種単分子膜を用いることにより配向制御を進展させ、種々の夢多き用途のある“2次元結晶膜”が達成できることが期待できると思われる。

今後の課題と発展

Cyt. *c* の役割は、本来膜タンパク質間の電子の媒介であり、また生命の維持に不可欠なタンパク質であることから、動植物の進化の過程においても比較的互換性のあるパーツとして利用されてきた。したがって、Cyt. *c* を用いた電極は一つの基本モデルと考えられ、その手法に遺伝子組み替えやタンパク質工学などの新しい技術が加われば耐熱性をはじめとする安定性の向上、配向制御性の向上などが達成され、将来バイオエレクトロニクスの分野において、より積極的なデバイスデザインへの展開も期待される。

また抗体分子の薄膜化に際して本研究で追求したような吸着量と配向性の制御が、さらに精度よく実現するようになれば、その上であたかも分子積み木を組み立てたかのように分子アセンブリーが達成され、バイオ素子として、人工細胞、人工臓器の超マイクロ化、高性能化に貢献するものと思われる(図7)。

発表論文

著書

赤池敏宏, 品川嘉也: 「1. バイオ素子への期待」 pp. 3~9 (「バイオ素子開発と設計」品川嘉也, 赤池敏宏

監修, ミマツデータシステム, 1989)。

赤池敏宏: 「生体分子に学ぶバイオ素子設計」 pp. 13~30 (同上)。

赤池敏宏: 「タンパク質の固定化制御とバイオ素子設計」 pp. 81~100 (同上)。

赤池敏宏: 「検査・診断用高分子材料における課題」 pp. 101~114 (「高分子と医療」明石満, 砂本順三, 竹本喜一編, 三田出版会, 1989)。

総説

赤池敏宏: バイオエレクトロニクスポリマー: 日本エム・イー学会誌, 1(2), 86-93(1987)。

赤池敏宏: 免疫グロブリンの固定化制御: 高分子, 36(5), 368(1987)。

赤池敏宏: バイオエレクトロニクス材料の表面科学—人工ミトコンドリアと高機能人工臓器素子へのアプローチ—: 表面科学, 10(2), 102-108(1989)。

オリジナル論文

Y. Tanaka, K. Yamamoto, T. Suzuki, T. Daido, and T. Akaike: Coupled reaction of cytochrome *c*-immobilize electrode with oxidoreductase for biomedical applications, *Annual Research Report of Surface & Multiphase Engineering Res. Lab.*, 4, 37-40 (1988)。

T. Akaike, T. Daido, Y. Tanaka, K. Yamamoto and T. Suzuki: Approach to artificial mitochondria and highly functional artificial organ devices. Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (1989), p. 11.

鈴木達明, 山元宏一, 田中靖之, 大道高弘, 赤池敏宏: チトクローム *c* を用いたバイオ素子の設計—チトクローム *c* 固定化電極のメディエーター機能—: 膜, 14(5), 319-328 (1989)。

K. Ikeda, Y. Ogoma, T. Fujii, A. Hachimori, Y. Kondo, T. Hayakawa, M. Iwatsuki, and T. Akaike: Conformation of polyamino acids containing fluorine. *Polymer*, 31, 344-347 (1990)。

T. Daido and T. Akaike: Evaluation of electron transfer of immobilized cytochrome *c* to polyanion-gel coated electrode. Reports of Progress in Polymer Physics in Japan, in press.