電気化学の方法で生物を観る・測る・利用する

加納 健司, 池田 篤治*

電気化学の起こりを尋ねると、ガルバニの“動物電気”の発見にたどり着き、生物現象が電気化学の生みの親ということがわかる。また、生化学の参考書をあらためて眺めると、電気化学に関わる生物現象が数多くあることに気づく。実際、電気化学の方法で生物現象を調べてみると、他の方法では見えにくいような事柄がいろいろ見えてくる。装置は比較的安価(コンピュータ制御方式でも200万円程度)で入手しやすく、操作が簡便なので、生化学系を含め広範囲な分野に電気化学測定を利用する人が増えてきている。

電気化学が関わるのは、電子の出入り(酸化還元反応)やイオンの移動に関係した現象である。ここでは前者に注目する。主な電気化学測定としては、アンペロメトリーとポテンショメトリー(用語解説参照)がある。前者の測定には図1-aのような電解セルを用いる。試料液(S; 1 ml程度で十分)に3本の電極を入れて電圧をかけると、作用電極表面(W)からせいぜい200 μm くらいまでの溶液相(液量2 μl 程度)で反応(電気分解)が起こる(図1-b)。このとき加える電圧によって、電極が還元剤

や酸化剤として機能する。電圧を変化させたときの電流測定法を、特にボルタンメトリー(用語解説参照)と呼ぶ。流れる電流が反応の詳細な情報をもっており、電流の時間変化や、電流と電圧の関係を解析すると、電気分解を受けた物質の酸化還元情報が取り出せる。この特色の一つは電極近傍のごく限られた場所でのみ反応が起こることである。したがって、試料液全体の組成は測定(電気分解)によって実際上変化しない。ポテンショメトリーはガラス電極によるpH測定に代表されるように平衡状態の電気化学測定であり、基本的には図1-aのWと参照電極(R)の間の電位を測定するだけであり、対極(C)は不要となる。またこのとき正味の酸化還元は起こらない。電気化学測定は懸濁あるいは着色による妨害もない利点があり、後で述べる細胞などを対象とする場合、分光法に比べ都合がよい。

電気化学の方法は、低分子化合物から酵素、オルガネラ、さらに生きた細胞までも測定対象とすることができ、また酸化還元電位のような基礎情報から、センサやリアクタへの応用にいたるまで生物現象を様々な角度から観たり、測ったり、利用したりすることを可能にしてくれる^(1~5)。以下、いくつかの項目について筆者らの実験を材料にして具体的に説明していく。

Electrochemistry as a Powerful Technique for Studying Fundamental Properties of Biomolecules and Microbial Cells and Its Novel Applications

*Kenji KANO, Tokuji IKEDA, 京都大学大学院農学研究科

図 1 ■電気化学測定に用いられる試料セル (a) と直接電解 (b) およびメディエータを介した間接電解 (c) の概念図

生体関連物質の酸化還元電位測定

生体物質の酸化還元電位(E_o') (用語解説参照) は、それらの機能を調べる上で大変重要なパラメータの一つである。また、 E_o' の pH 依存性を調べれば、酸化体と還元体の pK_a も容易に求めることができる⁽⁹⁾。 E_o' の直接測定には、ポテンシオメトリーかボルタンメトリーが用いられる。しかし、信頼できるデータを得ることは、必ずしも容易ではない。

ポテンシオメトリーでは正味の酸化還元反応は進行しないので、 E_o' を求めるには、適当な還元剤あるいは酸化剤で滴定する必要がある。したがって、滴定試薬と目的物質との副反応や、還元性物質と酸素との反応性にも留意しなければならない。また、指示電位が平衡に達するのに時間を要する上、その電位が何の平衡を検出して

いるかについて十分吟味する必要がある。たとえば、環境水や培養液のような複雑系の電位測定値の物理化学的意味は大変複雑で、酸素には応答しない電極でも、こうした複雑系では間接的に酸素濃度に依存することもある。一方、タンパク質の場合、その活性部位が電極表面に密接することが難しく、電極と電子のやりとりが起こりにくいため、直接滴定は実際上不可能である。そのため、通常は図 1-c のように、電極と反応性の高い低分子物質(メディエータ)を介在させて滴定し、(1)式の反応を平衡にし、ポテンシオメトリーにより M_{ox}/M_{red} の平衡を介して溶液の平衡電位を、また分光法により P_{ox}/P_{red} の平衡を検出することにより、 E_o' を測定する方法が用いられる。

用語解説

アンペロメトリー, ポテンシオメトリー, ボルタンメトリー

試料液に外から電圧をかけて、流れる電流を測定する方法をアンペロメトリーと呼ぶ。電圧を一定の速度で変化させながら電流測定を行なう方法をボルタンメトリー、さらにある電圧幅の間で電圧を往復して変化させる場合をサイクリックボルタンメトリー(CV)と呼び、電圧を固定して電流の時間変化を測定する方法をクロノアンペロメトリーと呼ぶ。一方、ポテンシオメトリーと呼ぶ方法では、電流が流れないようにして、試料液自身の電圧(基準になる電極(図 1-a の R)の電位と作用電極(図 1-a の W)で測定される溶液の電位との差)を測る。

酸化還元電位 E

1 組の酸化還元対 Ox/Red の酸化還元されやすさを ($2H^+/H_2$ を基準として) 表わした尺度で、 Ox , Red 濃度とはネルンスト式で関係づけられる。

$$E = E_o + (RT/nF) \ln([Ox]/[Red])$$

E_o を標準酸化還元電位という。 E_o の値が正に大きいほど酸化されにくく(すなわち還元されやすい)、負に大きくなるほど還元されにくい(酸化されやすい)。 m 個のプロトン移動を伴う n 電子酸化還元反応 ($Ox + ne^- + mH^+ \rightleftharpoons Red$) の条件酸化還元電位 E_o' は pH に依存し、 $E_o' = E_o - 2.303(mRT/nF)pH$ の関係がある。

図 2 ■ フロー型カラム電解分光法測定系の模式図 (上) と、 $\text{IrCl}_2^{2-/-}$ をメディエータとした POD の間接電解で得られた 3-D 吸収スペクトル (下; メディエータの吸収は時間に依存しないバックグラウンドとなる)

この場合でも、(1)式の反応が平衡状態に達するのに長時間を要する上、滴定によるメディエータの酸化還元に伴う吸収変化が妨害になることが多い。

一方、ボルタンメトリーでは、電極が酸化剤あるいは還元剤としてふるまうので、滴定は不要となり、酸素の影響も除去しやすい利点がある。しかし、ボルタンメトリーできれいな信号を得るには、目的物質と電極との反応速度がある程度速いことが要求され、特にタンパク質の場合はその測定が困難となる。適当な電子移動促進剤(プロモータ)で電極を修飾する方法が有効な場合もあるが、一般性はない。

近年では、光透過性薄層電解セルを用いて、メディエータの機能を利用することにより、タンパク質を間接的に電気分解・平衡化し、分光学的に酸化還元状態を検出して E_0' を求める分光電気化学法が開発されている⁽⁶⁾。しかし、この方法も(1)式の反応の平衡化に長時間を要し、メディエータの吸収変化が妨害になることに変わりはない。

そこで筆者らは、比較的短時間で測定でき、メディエータ吸収変化の妨害を軽減する方法として、フロー型カラム電解分光法を検討している。図 2 に測定系の模式図と、ペルオキシダーゼ(POD)の測定データの一例を示す。これは、適当なメディエータ溶液(酸化還元緩衝液)の電位をカラム電気分解で制御し、そこに注入したタン

パク質とメディエータとの迅速な平衡化を実現し、タンパク質の酸化還元状態を分光的に検出するものである。この系では、メディエータの吸収は時間変化しないので、ほとんど妨害にはならない上、結果として高濃度のメディエータを用いることができるため、短時間に平衡に達する利点がある。ただし、この方法も対象タンパク質ごとに高機能なメディエータを選択することが最も重要で、これには経験と試行錯誤を要する。カラム電気分解では、特にメディエータを用いなくても、タンパク質を直接的に酸化還元できる場合もある⁽⁷⁾。いずれにしても、どのタンパク質とも速い電子移動ができる万能な電極系は、今のところ実現していない。

酵素触媒反応と電極反応の共役系

酸化還元酵素反応は、基本的には次式のように還元性基質 S_{red} と電子受容体 A 間(あるいは酸化性基質 S_{ox} と電子供与体 D 間)の酸化還元反応を促進する。

酵素が電極と電子のやりとりを直接的にかつ速やかに行なうということは、電極自体が A や D として機能することを意味している。このような系は、酵素触媒機能が

付与された電極反応系、つまりバイオエレクトロカタリシス系と呼ばれ、酵素反応の方向と速度を電極電位の設定だけで制御できる利点があり、多方面への応用が期待されている^(1,2,4)。しかし、先にも述べたように、酵素と電極の直接電子移動は一般的には遅いので、まだ実用化には至っていない。

電極との電子のやりとりが速いキノン類などを(3)式のAとし、 $A + ne^- \rightleftharpoons D$ の反応を電気化学系と共役させれば、つまりA/D対をメディエータ(図1-cのM_{ox}/M_{red}に相当)として機能させれば、結果的には直接電子移動型と同様な反応系を構築できる。このようなメディエータ型のバイオエレクトロカタリシスは、ほとんどすべてのNAD(P)非依存型脱水素酵素系に適用できる。また、(H₂O₂生成型)酸化酵素の多くは脱水素酵素活性も有するので、これも対象となる。さらに、PODやラッカーゼのようにS_{ox}としてキノン類などを用いることができる場合には、S_{ox}/S_{red}をメディエータとし、(2)式を電極系と共役させることもできる。PODのバイオエレクトロカタリシス系は、H₂O₂の高感度センサとして機能する。また、ラッカーゼ系はO₂からH₂Oへの反応であるのでクリーンなバイオ電池素子としても期待できる。一方、NAD(P)の電気化学的酸化還元反応は遅いが、NAD(P)HがS_{red}に相当するジアホラーゼ(DI)やフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼ(FNR)を用いると、バイオエレクトロカタリシスによりNAD(P)の酸化還元を電気化学的に容易に制御できる^(3,8)。この系にNAD(P)依存性酵素反応を組み込むことは容易である⁽⁸⁾。NAD(P)酵素の種類は非常に多いので、この反応系の応用性は大変広い。このように、オキシゲナーゼを除くほとんどの酸化還元酵素反応は電極反応と共役できる^(1,2,4)。

メディエータ型バイオエレクトロカタリシス反応では、酵素触媒反応に共役した電流が得られる。したがって、触媒電流の解析から、比較的簡便にこの酵素反応のミハエリス定数やターンオーバー数を求めることができる⁽⁹⁾。また、電極でメディエータの酸化還元状態を規制するだけで、酵素反応速度の制御も可能になる。メディエータと酵素の反応速度は両者のE₀'の差に大きく依存するので、メディエータの選択と電極電位の設定により、反応の方向性も規定できる⁽⁹⁾。DI系とNAD依存性酵素系の共役系の電流特性の詳しい解析からは、NAD依存性酵素反応の熱力学平衡と反応速度の関係についての情報も得られる⁽⁸⁾。この系は生体内酸化還元制御のモデルにもなり、生体代謝を考える上で有用な情報が得られる。

メディエータ型バイオエレクトロカタリシス系で、酵素反応基質を分析対象として考えれば、(第二世代の)バイオセンサとなり、実際、この原理のセンサがいくつか市販に至っている^(1,2,4,5)。PODを用いたバイオエレクトロカタリシス電極では、H₂O₂の高感度分析ができるが⁽¹⁰⁾、これにフェナジンメトサルフェートをメディエータとしたNADHの空気酸化反応を組み込むと、NADHの高感度分析ができることもわかってきた。現在、これらを各種酸化酵素反応やNAD依存性酵素反応と組み合わせ、電気化学臨床分析法を開発中である。また、生成物が有用物質である場合には、バイオエレクトロケミカルリアクタと見なせる。カラム電極などと組み合わせれば、非常に効率のよいリアクタも構築できることがわかっている。

酸化酵素の脱水素酵素活性は、バイオエレクトロカタリシス系の構築には大変好都合であることは先述の通りである。しかし、よく知られている酸化酵素反応とPOD反応を組み合わせた分光的酵素分析法では、この脱水素酵素活性は負の妨害となりうることに留意すべきである。POD反応で酸化された基質が、酸化酵素の電子受容体として機能するからである。したがって、この2つの反応場を分離することが重要になる。電極系とは本来不均一反応系であるので、POD反応だけをこの不均一場で進行させれば、こうした交叉反応による妨害は起こらなくなり、高感度かつ高精度な分析法が構築できる⁽¹⁰⁾。一方、Cu非含有ウリカーゼのように、脱水素酵素活性のない酸化酵素もある。これはバイオエレクトロカタリシス系には適用できないが、生成するH₂O₂による有機物の酸化反応には都合がよい。実際、パラフェニレンジアミン(PPD)にウリカーゼ反応を組み合わせると、大変穏和な条件でPPDの酸化的重合が進行し、染毛に応用できることがわかった⁽¹¹⁾。脱水素酵素活性がある酸化酵素ではPPD酸化体を電子受容体とし再還元するため、重合反応は阻害される。

微生物細胞の代謝活性の測定と利用

大腸菌のような細菌の懸濁液にグルコースと色素を入れると、色が徐々に退色していくことはよく知られている。これは図3のように細菌内の酵素作用によってグルコース(S1)が酸化され、色素(S2)が還元されるためである。電気化学法は分光法と違って試料液が濁っていても影響を受けないので、細胞懸濁液の中での基質や色素の濃度変化を連続的に測定することができる。測定の結果、このような微生物触媒反応も酵素反応解析で用いら

図 3 ■細菌細胞の触媒作用の概念図

れるミハエリス型の速度式で解析できることがわかった⁽¹²⁾。いくつかの微生物についてその触媒活性を表1に示す。 K_{S1} 、 K_{S2} はそれぞれ第1基質S1(電子供与体)と第2基質S2(電子受容体)に対する見かけのミハエリス定数であり、 k_{cat} は細胞1個当たりの触媒定数である。 K_{S1} 、 K_{S2} には、これらの基質の細胞膜透過性の影響が含まれている(図3参照)。

表1のようなデータは筆者らの知る限り、*T. ferrooxidans* の場合を除いて他に測定された例を見ない。興味深いことに、*A. aceti* 細胞の K_{S1} 値 1.8 mM は細胞膜から精製されたアルコール脱水素酵素の K_{S1} 値 1.6 mM とほとんど同じである。*D. vulgaris* の K_{S1} 値 0.16 mM も、この菌から精製されたヒドロゲナーゼの MV^{+} に対する K_{S1} 値 0.12 mM とほぼ等しい。細胞膜透過の影響は大きくないようである。*T. ferrooxidans* の K_{S1} 値は

バクテリアリーチングという実用上の関心から、例外的に古くから多くの測定が試みられているが、その値は 0.2~5 mM と文献によって様々である。これらの値は、表1の K_{S1} 値 37 μ M よりはるかに大きい。従来法では 0.1 mM が測定限界で、それ以下の濃度は測定不可能と思われる。 K_{S2} についてみると、 $Fe(CN)_6^{3-}$ が相対的に大きな値を与える。負の大きな荷電をもつので外膜の透過性の影響が考えられる。また、酸素の K_{S2} 値が大変小さいのが注目される。この場合は細胞の呼吸鎖反応であり、酸素はサイトプラズム側で電子を受け取る。*T. ferrooxidans* の場合、ここに示した $FeSO_4$ の酸素酸化反応がエネルギー供給源であるが、 $Fe(CN)_6^{4-}$ でも同程度の速度で反応が進むことがわかる。その他、 k_{cat} 値からこれらの細胞は1個当たり 10^6 回/秒前後のターンオーバー数を示すことがわかる。人工の電子受容体でも酸素を用いる本来の呼吸反応の速度と遜色はない。

このように、細胞自身の触媒能は大変高いので、センサやリアクタへの応用が十分可能である。たとえば、*A. aceti* 固定化電極はエタノールセンサとして利用できる。遺伝子操作によって目的酵素を大量発現させた菌株を用いれば、感度、選択性に優れたセンサができる⁽¹³⁾。*P. fluorescence* TN5 はニコチン酸を有用な 6-ヒドロキシニコチン酸に変換する。この菌体をカラム電極に固定化して、ニコチン酸を少量の $Fe(CN)_6^{3-}$ の共存下に流し込むと 6-ヒドロキシニコチン酸に 100% 変換されてカラムから出てくる(図4)。酸素のみを電子受容体とする場合より変換速度が速く、精製物の純度も高い⁽¹⁴⁾。*T. ferrooxidans* と *D. vulgaris* の反応はエネルギー変換システムとして興味深い。*D. vulgaris* の反応は逆方向(水素消費反応)にも十分な速さで進むので、両者を組み合

表 1 ■微生物細胞の触媒活性

微生物	S1	S2	K_{S1}/mM	K_{S2}/mM	$k_{cat}/10^6 \text{ s}^{-1}$
<i>A. aceti</i> (IFO3284)	エタノール	Q_0	1.8	0.59	0.74
	エタノール	$Fe(CN)_6^{3-}$	4.9	7.7	1.6
	エタノール	O_2	1.8	<0.02	3.0
<i>P. fluorescence</i> TN5	ニコチン酸	DCIP	0.45	0.89	17.3
	ニコチン酸	$Fe(CN)_6^{3-}$	0.21	7.2	4.6
	ニコチン酸	O_2	0.20	<0.02	10.8
<i>G. industrius</i> (IFO3260)	グルコース	BQ	7.6	1.2	8.2
	グルコース	DCIP	0.41	0.20	0.58
	グルコース	O_2	3.1	<0.06	3.1
<i>E. coli</i> K12 (IFO3301)	グルコース	Q_0	0.58	0.64	1.4
	グルコース	$Fe(CN)_6^{3-}$	0.18	3.2	0.26
<i>T. ferrooxidans</i>	$FeSO_4$	O_2	0.037	<0.03	3.0
	$Fe(CN)_6^{4-}$	O_2	0.001	<0.07	1.5
<i>D. vulgaris</i> (Hildenborough)	MV^{+}	H^+	0.16	—	42.0

Q_0 : 2,3-ジメトキシ-5-メチル-1,4-ベンゾキノン, DCIP: ジクロロフェノールインドフェノール, BQ: 1,4-ベンゾキノン, MV^{+} : メチルビオロゲンカチオンラジカル

図 4 ■細胞固定カラム電極による生物電気化学物質変換の概念図

わすと、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ と MV^{+} をメディエータとする微生物触媒バイオ電池ができる。酸素と水素から水が生成するこの反応はクリーンエネルギー変換系である。現在こうした視点からバイオ電池の基礎研究を進めつつある⁽¹⁵⁾。

細胞の生理現象など、細胞自身に関わる情報を得ることもできる。*E. coli* のグルコース脱水素酵素はアポ型で存在しているので、そのままでは活性を示さない。表1のデータは外液に補酵素ピロキノリンキノン(PQQ)を加えて測定した結果である。*E. coli* を表面に固定した電極を用いると、菌体が外液から PQQ を取り込んで菌体内アポ酵素が活性化していく過程を連続測定することができる。キャピラリー電気泳動は、新しい分析法として生化学の分野でも関心がもたれているが、微生物細胞をキャピラリー電気泳動にかけると、細胞表層の物性に関する情報が得られる。細胞分離にも応用できそうである。泳動相に DCIP (2,6-ジクロロフェノールインドフェノール) のような色素を入れておくと、図5に示すように細胞の生理活性によって DCIP が還元され色が退色していく。細胞は相対的に DCIP よりも泳動速度が遅いので退色した DCIP が細胞を追い越していき、検出部位に先に到達する。そして細胞が検出部位に達するまでこの退色状態が続く。ここで形成された退色バンドから細胞活性が測定できる。細胞自身は短波長側の散乱で同時検出ができる。呼吸阻害剤や抗生物質を添加すると退色が見られなくなり、後者の場合は細胞自身の泳動パターンにも変化が見られる。

総合的研究

これまでに述べてきた電気化学法、およびその考え方を利用すると、生体内酸化還元反応がより理解しやすくなる場合が多い。その一例として、ビフィズス菌増殖促進因子(BGS)の作用機序に関する研究例を紹介する。

BGS 投与によって、ビフィズス菌の NADH オキシダーゼおよび NADH ペルオキシダーゼ活性が増加する。

図 5 ■細胞キャピラリー電気泳動による細胞活性測定の実理図

これら酵素のコファクターはフラビンであり、BGS が直接酵素機能を高めるとは考えにくいので、図6に示したスキームのように、細胞内での NADH から O_2 あるいは H_2O_2 への電子の流れに対して、BGS がメディエータの役割を果たすという仮説を立てた。つまり、DI 活性により NADH から BGS に電子がわたり (NAD^+ の再生)、生成した BGS 還元体は微量の O_2 で酸化される。さらに、BGS 還元体は POD に対して NADH より良好な基質となれば、自動酸化で生成した H_2O_2 を効率よく解毒できる。この NAD^+ 再生過程ではピルビン酸を消費しないので、ピルビン酸由来の生合成過程が促進され、増殖につながると考えた。BGS の E_o' の測定などをもとに、熱力学的にはこのスキームが可能であることが示され、分配係数や pK_a 値から、BGS は細胞膜を透過しやすく、かつ細胞内に蓄積されやすいことも裏づけられた。

スキーム中の各段階での反応を速度論的に追跡するには、菌体あるいは細胞破碎液などを対象として、NADH、 O_2 、 H_2O_2 あるいは BGS の濃度を連続的にモニタする必要があるが、分光法だけでは限界があった。しかし、上で述べた電気化学法あるいはその考え方を取り入れた分光法を駆使することにより、これらの連続モニタリングに成功し、モデルの妥当性を速度論的に示すことができた。