●特集：バイオリアクター

エレクトロエンザイモロジーとその応用 —生体触媒活性の電気制御—

相澤益男

東京工業大学工学部 生物工学科 〒 152 東京都目黒区大岡山 2-12-1

1. バイオリアクター研究開発の展開

固定化生体触媒を用いたリアクターを、とくにバイオリアクターと称することが多い。しかし、従来のファーマンターをも含めて、バイオリアクターとする考え方もいぜん根強いものがある。言葉の定義にこだわるつもりはない。これまで余り明確ではなかった、リアクターの概念を生物化学反応プロセスに導入することが、バイオリアクター構想の根底にあったと思われる。

バイオリアクター構想は、生体触媒の固定化技術とともに進展してきたともいえる。固定化技術によって、均一系触媒から不均一系触媒に転換し、バッチ方式から連続フロー方式に転換可能な道が開かれたことは、実に画期的であった。当初は、固定化酵素、しかも単一酵素を中心にバイオリアクターの設計が進んだ。やがて微生物にも固定化技術が適用され、固定化微生物によるバイオリアクターも急速に展開した。この時期には、種々様々なバイオリアクターのデザインが提案された。バイオリアクター草創期といえる時期である。

草創期を過ぎると、次第に高機能性がバイオリアクターに求められるようになった。単一酵素系から複数酵素系へ、補酵素が関与する系へ、さらに補酵素再生系までひろがりを示した。バイオリアクター展開期である。

バイオリアクターの稼動にあたっては、リアクター内の最適化が重要である。最適化のためには、リアクター内の諸種のパラメーターを計測しなければならない。バイオリアクターの *in situ* 計測が重要な課題となり、様々な試みが行われた。さらに、ダウンストリームプロセスの重要性もクローズアップされるようになった。この時期は、バイオリアクター支援技術展開期である。以上のように、バイオリアクター技術は急速に展開し、いよいよインテリジェントバイオリアクターを射程内にする段階となってきた (図 1)。インテリジェント

図 1 バイオリアクター研究開発の展開

バイオリアクターとは、種々の計測因子を反映して、最適稼動を維持できる新しいバイオリアクターである。インテリジェントバイオリアクターはまさしく細胞のごとく稼動することをイメージするものであり、この実現には生体触媒の活性制御が必要となる。

生体触媒の活性制御は、通常種々の制御分子によって行われるが、さらに制御容易なファクターによる活性制御法の開発が望まれるところである。エレクトロエンザイモロジーは、酵素と電気とのかかわりをいろいろな立場から追求する領域であるが¹⁾、最近、生体触媒の活性を電気制御できることが明らかにされるようになった。本稿では、酵素および微生物について明らかとなった生体触媒活性の電気制御と実験例を概説する。

2. 生体触媒の活性制御

細胞内の酵素反応は、きわめて精緻な制御系によって統御され、恒常性を維持している。しかし、細胞外では

図2 スピロピラン化酵素の活性の光制御

酵素系の可逆的な制御系を実現することが非常に難しい。種々の阻害因子、選択的なインヒビターおよびアクチベーターなど、酵素活性の制御因子は多い。細胞は、これらの制御因子が可逆的に作用できる機構を備えている。これらの機構を細胞外で構成することが困難なので、細胞外では、化学物質ではなく、物理的制御因子による酵素活性制御の方が効果的であると思われる。

酵素活性の物理的制御については、鈴木らのユニークな一連の先駆的研究が注目される。この研究の主眼は、光異性化分子を酵素あるいは酵素周辺環境に導入し、光照射によって酵素活性あるいは酵素周辺環境に導入し、光照射によって酵素活性を可逆的に制御することであった。スピロピラン化合物は紫外光および可視光照射によって、可逆的に開環・閉環光異性化する。この異性化にともなう、立体的構造変化とともに、疎水・浸水状態の変化が生じる。そこで、アミラーゼあるいは α -キモトリプシンなどの酵素に、スピロピラン化合物が共有結合によって導入された^{2, 3)}。スピロピラン化アミラーゼあるいは α -キモトリプシンは、紫外光照射状態と可視光照射状態では違った酵素活性を示した。酵素活性が光によって可逆的に制御されたのである(図2)。しかし、活性制御の変動幅は20~30%であった。

スピロピラン化合物を導入した担体に、酵素を固定化することによって、酵素活性を光制御する試みも行われた⁴⁾。周辺の分子環境を光によって変化させようとするものである。さらにリボソームに包括した酵素の活性を、リボソームの構成脂質の転移を利用して、温度制御することも可能となった(図3)。

以上の例は、物理的制御因子によって、酵素活性を可逆的に制御する試みである。しかし、これらの活性制御変動は小さく、バイオリクターに応用されるまでには

(1) 光制御

(2) 電気制御

(3) 温度制御

活性状態

不活状態

図3 物理的制御因子による酵素活性の制御

至っていない。

筆者らはエレクトロエンザイモロジーの立場から、酵素反応と電気化学反応のスムーズなドッキングを実現する一連の研究を行ってきた。バイオリクターについても、電気化学反応を導入することによって、新しい方法論を開発できることが明らかとなってきた。

補酵素が関与するバイオリクターでは、補酵素の再生が重要な課題である。たとえば、 NAD^+ あるいは、 NADP^+ 酵素系では、酵素反応後の NAD(P)^+ を元の

(1) 電子メディエータ方式 (2) 電子メディエータ修飾酵素

(3) 電子プロモータ方式 (4) 分子ワイヤ方式

図4 電極表面における酸化還元酵素の電子移動

状態に戻す必要がある。このような補酵素の再生を電気化学的に行えることが示された⁶⁻⁹⁾。

さらにこれらの反応を追求する中で、酵素活性電気制御できる道が拓かれてきた。

3. 導電性酵素膜の合成

酸化還元酵素は、基質分子との電子移動を介して、基質分子の酸化あるいは還元を触媒する。これらの電子移動は、酵素の活性部位で行われ、酵素分子の内部に位置することが多い。そのため、酵素分子の電極表面で、酵素分子の電子移動サイトと電極との間をどのように電子移動させるかが問題である。

電極表面で、酸化還元酵素の電子移動をスムーズに行う試みはいろいろある(図4)。

第1は、電子メディエータの利用である。酵素分子に近い酸化還元電位をもつ電子メディエータは、酵素の電子移動サイトに入り込み、電極表面に固定化したり、酵素分子に結合する試みもある。とくに酵素分子に多数の電子メディエータを導入し、酵素分子内に電子移動パスを形成する方法は効果的である。

第2は、電子プロモータの利用である。電子プロモータは自ら電子移動するのではなく、酵素分子の効率的電子移動の状態を保持する。電極表面に電子プロモータが吸着し、酵素分子が電子移動を行い易い状況を形成するものと推察されている。しかし、見出されている電子プロモータは限定されており、すべての酵素に適用される

図5 グルコース酸化酵素/ポリピロール分子膜の想定図

段階ではない。

第3は、分子ワイヤの利用である。導電性高分子鎖は分子ワイヤとして、電子を誘導できるものと期待されている。筆者らは、酸化還元酵素の電子移動サイトと電極との間を分子ワイヤで接続し、電子移動をスムーズに行う構想を提案した。

分子ワイヤを利用した、酵素の電子移動を実証する系として、グルコース酸化酵素 (glucose oxidase, GOD), ポリピロールが選ばれた。酵素とポリピロールの分子配列方法については種々考えられるが、筆者らは、次のような分子膜を白金表面に形成し、目的とする酵素の電子移動を実現した。

基板電極である白金電極を、GOD 含有水溶液に浸漬する。電極電位を定電位に設定すると、分子は白金電極に徐々に吸着する。吸着速度は溶液の pH, イオン強度、電極電位などに依存して、著しく変化した。GOD 単分子層飽和吸着の約 60% 程度で、定電位吸着を中断し、この白金電極をピロールモノマー含有水溶液に移す。次いで、ピロールの定電位電解酸化を行う。たとえば、0.7 V vs. Ag/AgCl に設定すると、ピロールは重合し、ポリピロール薄膜が白金電極表面の GOD 分子間に析出する。ポリピロール薄膜の膜厚は、通電量によって制御可能である。そこで、GOD 単分子層の半分程度で電解重合を中断した。GOD/ポリピロール膜の状態は図5のように想定される。白金表面からの酵素あるいはポリピロールの脱離は認められなかった。

ポリピロールを介して行われる酵素分子の電子移動

図6 グルコース酸化酵素/ポリピロール分子膜の電子移動

図7 アルコール脱水素酵素/メルドラブルー/
NAD⁺/ポリピロール分子膜の電子移動

は、ディファレンシャルパルスボルタンメトリによって確かめられた。脱酸素した電解質水溶液に GOD/ポリピロール膜被覆白金電極を挿入し、還元反応のディファレンシャルパルスボルタンメトリを行った。その結果、白金電極から GOD 分子方向へのスムーズな電子移動が明確に認められた。ポリピロールが無い状態では、このような電子移動は認められないのである。次いで、還元状態の GOD について、逆方向の電子移動が生じることを確かめた。この状態では、還元型 GOD 分子から電極方向に電子移動するパルスボルタンメトリのアノード電流ピークが測定された。しかも、カソード電流ピークと、

アノード電流ピークの電位はきわめて近接し、GOD 分子中の FAD の酸化還元電位に一致していた。以上の諸結果から、GOD/ポリピロール膜の GOD は、ポリピロールを介してスムーズな電子移動を行うことが明らかとなった(図6)。

GOD/ポリピロール膜は、酵素活性を保持し、しかも導電性を示す新規な機能膜であるので、“導電性酵素膜”と称された。

GOD は、FAD を補欠分子とする酸化還元酵素であり、導電性酵素膜の作製も比較的容易であった。しかし、NAD⁺あるいは NADP⁺を補酵素とする酸化還元酵素については、GOD のように導電性酵素を作ることができなかった。すなわち、酵素、NAD(P)⁺、ポリピロールをいろいろな分子配列で組み合わせても、スムーズな電子移動を実現できなかった。そこで、種々の電子メディエータを介在させることによって、導電性酵素膜を実現した。この膜は電子メディエータ・メルドラブルーが、アルコール脱水素酵素(Alcohol dehydrogenase, ADH)と強固なコンプレックスをつくるという、ふとした発見によって実現した。

ADH とメルドラブルーのコンプレックスは、1 対 2 のモル比で形成され、クロマトグラフィによっても明確に分離された。このコンプレックスと NAD⁺およびピロールを含む水溶液系で、ピロールの定電位電解酸化重

図8 GOD 導電性酵素膜の酵素活性の電位依存性

図9 ADH 導電性酵素膜の酵素活性の電位依存性

合を行うと、ADH コンプレックスと NAD^+ を包括したポリピロール分子膜が白金電極表面上に形成される。この膜は、GOD/ポリピロール分子膜と同様に、酵素活性を保持し、電子移動をスムーズに行う導電性酵素膜であることが明確に示された (図7)。

なお ADH コンプレックス/ NAD^+ /ポリピロール分子膜における電子移動の機序は、次の通りであることも明らかとなった。

$\text{ADH} \rightarrow \text{NAD}^+ \rightarrow (\text{ポリピロール}) \rightarrow \text{メルドラブルー} \rightarrow (\text{ポリピロール}) \rightarrow \text{白金電極}$

メルドラブルーとポリピロールを利用することによって、従来きわめて困難であった NAD 補酵素系と電極とのスムーズな移動も可能となった。

4. 酵素活性の電気制御

導電性酵素膜の実現は、酵素活性の制御法に新しい突破口を開いた。酵素活性を電氣的に制御することが可能になったのである。

GOD/ポリピロール分子膜/白金電極を脱酸素水溶液に接触し、電極電位を 0 V vs. Ag/AgCl に設定する。アノード電流はほとんど流れない。ここにグルコースを酸化し、自らは還元型 GOD となる。溶存酸素がないので、還元型 GOD は再酸化されず、このままにとどまる。したがって酵素反応は進行しない。ところが、電極電位が 0 V vs. Ag/AgCl であれば、還元型 GOD は電極に

電子を移行し、自らは酸化型 GOD に戻ることができる。ポリピロールを介して電子移動が可能なためである。アノード電流の増大は、還元型 GOD の酸化電流である。換言すれば、溶存酸素なしに、電気化学的に酵素反応を進行する系がつくられたことになる。

還元型 GOD の酸化電流は、電極電位に著しく依存して変化することが見出された (図8)。各電位における酸化電流は、GOD の反応速度に対応するから、酵素活性が電位に依存して変化することを示している。

GOD の酸化還元電位よりも、負の電位領域に電極電位を設定すると、酵素活性は認められなくなった。一方、この酸化還元電位よりも、正の電位領域では、電極電位とともに酵素活性が増大した。これらの結果は、還元型 GOD の電気化学酸化によって、酵素サイクルを回転させていることをはっきりと示している。

ADH/メルドラブルー/ NAD^+ /ポリピロール分子膜/白金電極についても、酵素活性の電気制御が実現した。エタノールを基質としたときの酵素活性の電位依存性を図9に示す。この系では、メルドラブルーの酸化還元電位よりも負の電位領域で、酵素活性が認められなくなった。この結果からも、メルドラブルーが電極と電子移動を行うことが示される。

以上の例から明らかのように、導電性酵素膜によって、酵素活性の電気制御が可能となった。酵素活性の制御値は任意に設定でき、しかも可逆的制御が可能である。反応系に何ら化学物質を添加する必要がないことも大きな

魅力である。バイオリアクターに適した導電性酵素膜を設計し、リアクター内で実効的に移動できるようにすることが、今後の課題である。

5. 電気制御発酵

酵素とともに、細胞の機能制御もバイオリアクターの重要な課題である。筆者らは、動物細胞について、増殖速度などの電気制御に関する一連の研究を進めているが、最近、微生物の発酵速度を電気制御できることを見出し、電気制御発酵を提案するに至った。

電気制御発酵の一例として、酵母によるアルコール発酵を取りあげた。*S. cerevisiae* のサスペンションにピロールモノマーを加え、ピロールの定電位電解酸化を行うと、酵母菌体を包括したポリピロール薄膜が白金電極表面に形成される。酵母菌体は生きている状態で包括され、この膜は導電性を保持しているので、導電性酵母膜と呼ばれる。

導電性酵母膜の電位を設定し、常法に従って、アルコール発酵を行ったところ、アルコール生成速度は著しく電位に依存して変動を示した。0 V vs. Ag/AgCl よりも負の電位領域では、アルコールの生成は全く認められなかった。ところが、0 V vs. Ag/AgCl 以上の電位領域では電位とともに、アルコール生成速度は電位変化に追従して可逆的に変動可能であった。これらのことは、電位設定下で発酵を行えば、発酵速度を電気制御できることを示している。電気制御発酵の構想実現を強く支持する実験例である。

6. 結 び

エレクトロエンザイモロジーの中で、急速に進展している生体触媒活性の電気制御に焦点を合わせ、最近の研究状況を概説した。筆者らは“Electro-enzymology, Coenzyme Regeneration”を昨年出版し、エレクトロエンザイモロジーの進展状況を総括した。しかし、その後、筆者らの研究室を中心に、局面がドラスティックに展開した。本書の内容は、すべて出版後の研究成果である。これからもこの分野の研究がダイナミックに展開されることを示唆している。インテリジェント・バイオリアクターへの力強い地歩が固められているともいえる。

文 献

- 1) K. Nakamura, M. Aizawa, O. Miyawaki: “Electro-enzymology, Coenzyme Regeneration”, Springer-Verlag, Berlin (1988)
- 2) K. Namba, S. Suzuki, Chem. Lett., 947 (1975)
- 3) M. Aizawa, K. Namba, S. Suzuki, Arch. Biochem. Biophys., **180**, 41 (1977)
- 4) I. Karube, Y. Nakamoto, K. Namba, S. Suzuki, Biochim. Biophys. Acta, **429**, 975 (1976)
- 5) H. Matsuoka, S. Suzuki, M. Aizawa, Y. Ikariyama, A. Ikegami, J. Appl. Biochem., **3**, 437 (1981)
- 6) M. Aizawa, S. Suzuki, M. Kubo, Biochim. Biophys. Acta, **444**, 886 (1976)
- 7) M. Aizawa, R.W. Coughlin, M. Charles, Biotechnol. Bioeng., **18**, 209 (1976)
- 8) M. Aizawa, R.W. Coughlin, M. Charles, Biochim. Biophys. Acta, **440**, 233 (1976)
- 9) M. Aizawa, Y. Ikariyama, S. Suzuki, J. Solid-Phase Biochem., **1**, 197, 249 (1976)

(受付 1989年5月17日)