

グリーンナノバイオエレクトロニクスと低炭素戦略

早出 広司

「グリーンナノバイオエレクトロニクス」とは、ナノバイオエレクトロニクスを構成する要素技術を、グリーンテクノロジーの観点から開発する、新規なエンジニアリングの概念を推進するコンセプトを示す造語である。東京農工大学では2009年度文部科学省の「低炭素社会構築に向けた研究基盤ネットワークの整備」事業において、「グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点」を整備し、文部科学省低炭素研究ネットワークのサテライト拠点として、要素技術開発を活用したバイオパワージェネレータの実用化を通して、実社会に還元することにより、低炭素社会の実現をめざしている。本項では、本研究拠点の考え方を紹介するとともに、代表的な研究事例として筆者らが進めている、直接電子移動型脱水素酵素開発および新しいバイオデバイスであるバイオキャパシタのコンセプトについて概説する。

グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点

低炭素化社会実現に向け、“先端技術の粋”であるナノテクノロジーの活用が期待されるなか、文部科学省平成21年度の事業「低炭素社会構築に向けた研究基盤ネットワークの整備」では、環境技術の実用化を加速させるため、ナノテクノロジーを環境・エネルギー技術に適用・融合させた「グリーン・ナノテクノロジー」に関する研究成果・知見を結集し、課題解決型研究ネットワークの基盤が整備された。この事業では、異分野融合によるイノベーション創出のため、ハブ拠点とサテライト拠点という機能と役割分担の異なる2種類の拠点形態が設定され、それぞれに必要な機器・装置を整備するとともに、ハブ拠点を中心にすべての拠点が参画するネットワークが構築された¹⁾。

一方、東京農工大学は、産学官連携によるイノベーション実現にむけて積極的に推進してきた。1988年の共同研究開発センター設立以降、教員1人当たりの民間との共同研究費は常に全国トップ5に位置している。また、東京農工大学大学院工学府は、2002年度から2006年度にかけて、21世紀COEプログラムの「ナノ未来材料」拠点として応用化学、生命工学、電子情報工学の全く異なる3分野からナノテクノロジー研究を遂行してきた。また、バイオエレクトロニクスの国際的研究拠点として

関連研究が精力的に推進されてきた。これらの分野において、各教員がそれぞれの専門分野で世界の最先端研究を推進しており、その独自の先進の科学と技術が企業から高く評価され、上述した強力な産学連携推進の原動力となっている。これまでの産学連携の豊富な実施経験から、民間企業の戦略的産業財産権獲得にマッチングしたシーズの提供・開発が可能であり、ナノテクノロジーおよびバイオエレクトロニクス分野において、多用な社会的ニーズを満たす基礎研究成果としてのシーズの宝庫となっている。そこで、低炭素社会を実現するために、グリーンテクノロジーの観点から、ナノテクノロジーとバイオエレクトロニクスを融合したナノバイオエレクトロニクスの要素技術を開発する、「グリーンナノバイオエレクトロニクス」という新規エンジニアリングを提案し、その研究開発を推進することとして、本事業に参加し、「グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点」をサテライト拠点として整備した(図1)。

本拠点ではバイオパワージェネレータの実現をめざしている。化石燃料からの脱却を目指し、バイオマスの有効利用が叫ばれるようになってからも久しい。カーボンニュートラルを志向した実用化バイオエネルギー生産では、いわゆる糖質廃液を含め、未利用糖質の活用が必須である。このような研究では、生物の糖質の酸化能力に

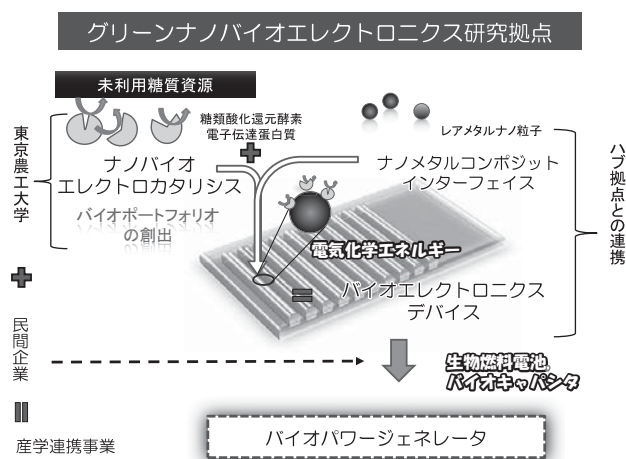


図1. 文部科学省低炭素研究ネットワークのサテライト拠点：「グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点」の構想

基づき、電気エネルギーの生産を目指している。すなわち、酵素や微生物の糖質の資化によって糖質を酸化し、そこで得た電子を酸素に渡すことによって生じる起電力に基づく発電、バイオ燃料電池、あるいは嫌気生物が、糖質利用により発生する水素を燃料電池に供給する生物水素燃料電池などが挙げられる。これらのバイオの力で直接発電するシステムを、バイオパワージェネレータと呼んでいる。バイオパワージェネレータの実用化の鍵は、基質となる広範囲な未利用糖質を有効に酸化して、これを効率的に電子デバイスへと伝達する能力を有する生体分子を元に構築されるナノバイオエレクトロカタリシスの開発である。本拠点では、バイオパワージェネレータの実用化においてカギを握っている、ナノバイオエレクトロカタリシス関連要素技術開発およびポートフォリオ整備に注力している。バイオエレクトロカタリシスとしては、広範囲な未利用糖質資源を基質として酸化し、これを効率的に電子デバイスへと伝達する能力を有するタンパク質分子を遺伝子レベルからデザイン・構築・製造・評価する。すなわち、多様な糖質を中心とする基質化合物を効率的に酸化する能力を有する脱水素酵素をゲノムデータベースから検索し、これらの分子構造をもとにした改良型酵素を開発する。さらに、その酸化還元中心からナノ界面へと電子伝達できるように、タンパク質分子内あるいはこれとの特異的な親和性を有する電子伝達タンパク質ドメイン・サブユニットを遺伝子レベルでデザイン・構築する。その上で、これらを組み合わせたナノバイオエレクトロカタリシスを調製することで、バイオパワージェネレータの実用化のカギとなるナノバイオエレクトロカタリシスを開発する。

直接電子移動能力を有するバイオエレクトロカタリシス

グルコースセンサがClarkによって提唱されてからおおよそ50年が経過した。この間、バイオセンサ開発を中心として生物電気化学に関する研究・開発が進められてきた。特に、産業との接点において、工学的な研究としてのバイオエレクトロニクスに関する研究が生物電気化学において精力的に進められてきた。最初のバイオセンサはグルコース酸化酵素を分子認識素子として用い、消費する酸素の量を電気化学的に計測する電気化学的グルコースセンサの原理であった。初期のバイオセンサのように、酵素本来の電子受容体を用いて酸化還元酵素を分子認識素子に用いる酵素センサの原理が第一世代と呼ばれている。その後、1980年代からは電気化学的検出の有用性の認識と使い捨て型の血糖診断用の電極の普及とともに、大量生産に向けた半導体製造技術やカーボン

印刷電極の台頭により、人工電子受容体（メディエータ）を用いる酵素センサが研究開発の主流となった。このような人工的な電子受容体を用いて酸化還元酵素を分子認識素子に用いる第二世代の酵素センサの原理が90年代の血糖診断用の酵素センサ製品の大半を占めるようになった。分子認識素子にはそれまでの酸化酵素から計測時の溶存酸素の影響を回避できることから脱水素酵素が多用されるようになった。一方で、80年代より第三の酵素センサの原理が注目されるようになっていた。それは酸化還元酵素を用いながら、酸素も人工電子受容体も外部から加えることなく、電極と酵素タンパク質との直接の電子授受によって計測する、直接電子移動型であった。多くの酸化還元酵素は補酵素を含む酸化還元の活性中心がタンパク質分子の内部に存在していることから、電極との直接電子移動はきわめて起こりにくい。そこで、初期の直接電子移動型の酵素センサは、グルコース酸化酵素などを人工電子受容体や天然の補酵素などで化学修飾することで、このような、「メディエータ不要型」の酵素センサが提案されていた。その後、ある種の脱水素酵素が電極と直接電子移動が行えることが報告されるようになった。それらの脱水素酵素は外部の電子受容体に対する電子伝達サブユニットあるいはドメインを有していた。これらの電子伝達サブユニット・ドメインはヘムを含むチトクロムであり、チトクロムが脱水素酵素の触媒サブユニット・ドメインから外部電子受容体への電子伝達を仲介している。90年代終わりから、このような電子伝達サブユニット・ドメインを有する脱水素酵素を用いる直接電子移動型の酵素センサや酵素燃料電池などがバイオエレクトロニクス研究において頻繁に報告されるようになり、第三世代の酵素センサが実用化間近の様相を呈してきた。さらに、近時のナノテクノロジー研究の進展も加わり、カーボンナノチューブ、金をはじめとするナノマテリアルなどとこれらの脱水素酵素が組み合わせられ、直接電子移動型の原理がバイオエレクトロニクスを席卷している。

本研究拠点での研究課題として、直接電子移動能力を有するバイオエレクトロカタリシスのポートフォリオ充実が挙げられている。筆者らの研究グループではこれまでに後述する酵素について、その直接電子移動能力に注目し、近縁タンパク質を検索するとともに、その分子工学に研究を推進している。

セロビオース脱水素酵素（cellobiose dehydrogenase, CDH）は真菌類が細胞外に分泌生産する酵素であり、そのN末端領域にヘムを含む電子伝達ドメインを有する。この酵素はセロビオースをはじめとする未利用多糖

類との反応性が高く、バイオ燃料電池のアノード酵素としても注目されている。さらに、古くから電極との直接電子移動能力を有することが報告されていることから、今回の拠点の合目的な分子として位置づけている。筆者は同酵素を用いるバイオ燃料電池の開発も行っている²⁾が、それとともに、同酵素の基質特異性についての改良研究も精力的に進めている。本酵素の触媒認識部位については詳細な研究が報告されていたが、基質の非還元末端側を認識する領域 (binding site, b-site) 残基と基質認識に関する知見はほとんどなかった。筆者は、同酵素のb-siteへの変異導入により、セロピオースとラクトースに対する基質認識について解析し、ラクトースと反応しないCDHを構築したことを報告した³⁾。また、同酵素の構造的長、すなわち、ヘムドメインを有しながらフラビンタンパク質であることは、大腸菌を用いて組み換え生産することを極めて困難にしている。すなわち、通常、ヘムタンパク質は大腸菌におけるSec分泌系においてアンフォールディング状態でペリプラズムに分泌された状態でヘムと結合するのに対し、フラビンタンパク質は細胞質においてフラビンと結合し、フォールディングする。したがって、大腸菌においてこれら二つのドメインを機能的に同時に発現させることは現時点ではきわめて困難である。CDHを効果的に改良していくことを想定し、筆者らは同酵素のフラビンドメインだけを大腸菌細胞質にて組み換え生産することに成功している⁴⁾。今後、これらの知見をもとにさらに改良型のCDHの開発が進むと期待される。

一方、原核生物においては膜結合性のさまざまな脱水素酵素が報告されている。その中にはFADを補酵素とするものとPQQを補酵素とするものとに大別される。前述のように、FADを補酵素とするようなフラビン酵素は大腸菌などの原核生物では細胞質内においてフォールディングすることから、その膜への分泌においては謎が多く、その組み換え生産も困難であった。筆者らは土壌から耐熱性のグルコース脱水素酵素 (glucose dehydrogenase, GDH) 複合体の単離ならびにその組み換え生産について報告している^{5,6)}。この酵素はチトクロムCを有した電子伝達サブユニットを有することから、電極との直接電子移動が可能である。しかしながら、チトクロムCサブユニットのN末端領域には分泌のためのSec系のシグナル配列が確認されるのに対し、FADが結合する触媒サブユニットには分泌のためのシグナル配列は見あたらない。グラム陰性細菌ではこのように細胞質でフォールディングしたタンパク質の分泌にはtwin arginine translocation (TAT) 分泌系ならびにそのシグナルペプチド

配列が知られている。本酵素のN末端領域にはこのTAT分泌シグナル配列も見いだされなかった。しかし、FADを補酵素とするグラム陰性細菌の膜に存在するチトクロムをサブユニットに有する多くの脱水素酵素には必ず、FADと結合している触媒サブユニットとチトクロムサブユニットの他に、機能不明な小サブユニットが見いだされていた。本酵素においても、小サブユニットが見いだされている。興味深いことに、この小サブユニットにはTAT分泌に特徴的なシグナルペプチドが見いだされている。筆者らは、これらの知見を総合し、この小サブユニットの有無によるFADGDH複合体の大腸菌での組み換え生産について検討し結果、小サブユニットが触媒サブユニットの機能発現には不可欠であることが示された。すなわち、この小サブユニットは他のTAT分泌系で報告されている「ヒッチハイカータンパク質」として機能していることが明らかとなった⁷⁾。すなわち、小サブユニットが触媒サブユニットと結合することで、同酵素をTAT分泌系でペリプラズムへと輸送させる。これまでに報告されているFADを補酵素とし、チトクロムをサブユニットに有する膜結合性の脱水素酵素複合体の小サブユニットにも同様にTAT分泌シグナル配列が見いだされることから、すべて「ヒッチハイカータンパク質」の機能によって分泌されていることと予測される。この事実は、今後、直接電子移動能力を有する脱水素酵素複合体を、大腸菌を用いて組み換え生産するための大きなブレークスルーを提供しており、今後のポトフォリオのさらなる充実が期待される。

これ以外にも本拠点では、FADGDHを用いる直接電子移動型の酵素センサ⁸⁾ならびに酵素燃料電池⁹⁾、PQQを補酵素とする直接電子移動型の脱水素酵素の生命分子工学的アプローチによる構築とその応用¹⁰⁻¹²⁾、直接電子移動能力を有する亜酸化窒素還元酵素の特性検討およびその応用に関する研究なども進めているが、別の機会にご報告したい。

新しいバイオパワージェネレータの形 ～バイオキャパシタ～

バイオ燃料電池はクリーンな電源として注目されており、バイオマスを電気エネルギーへの変換デバイスとして利用できることから、バイオパワージェネレータの筆頭に位置する。またグルコースを燃料に用いる酵素燃料電池は体液中の糖を燃料として利用できるため、生体内で発電できる小型電池の設計に適しており、ペースメーカーに代表される埋め込み型医療機器の電源としても期待されている。また一方で、酵素燃料電池の出力は燃料

とする基質の濃度に依存することから、酵素燃料電池をセンシングシステムとして応用することも可能である。しかし、バイオ燃料電池を埋め込み型機器用電源への応用を考えた場合に出力の低さが問題となる。電圧に関しては、電池単独で得られる電圧がアノード・カソードに用いたメディエータもしくは補酵素の酸化還元電位の差によって決まるため理論的限界があり（グルコース・バイオ燃料電池の場合、最大でもグルコースの酸化電位と酸素の還元電位の差である1.2 V）、バイオ燃料電池単独の電圧では埋め込み型デバイスや、トランスデューサなどを稼動させるには不十分である。バイオ燃料電池から得られる電力を上げるためには、電流を上げる方法として電極面積の拡大、電圧を上げる方法として電池の直列があげられる。ただし、どちらの方法も電池構造の複雑化、大型化を招くため、埋め込み電源やセンシングデバイスへの応用、さらには各種電源としての応用を考えた場合不適当な方法である。

このような背景をもとに、筆者らはこれまでに報告がなかった新しいバイオデバイスを提案するに至った¹³⁾。すなわち1) チャージポンプを用いて酵素燃料電池の電圧を昇圧する、2) 酵素燃料電池から得られた電気をキャパシタに充電する、という二つの方法をとることにより、バイオ燃料電池の構造やサイズを変更することなく、デバイスを稼動させるのに十分な電力を得ることを狙った「バイオキャパシタ」という新原理を筆者は提案している。

バイオキャパシタは、1) 燃料となる基質の濃度に起電力が依存する「酵素燃料電池」、2) 酵素燃料電池から得られる起電力を昇圧する「チャージポンプ」、3) 酵素燃料電池から得られた電気エネルギーを、チャージポンプを介して充放電する「キャパシタ」から構成される(図2)。

このような構成のバイオキャパシタは以下の一連の動作を行う。

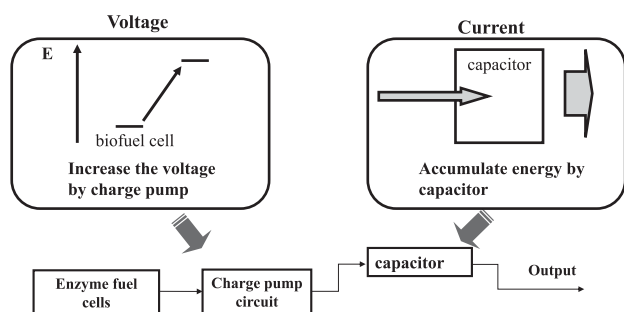


図2. バイオキャパシタの構成と原理

1. バイオ燃料電池から起電力が発生する
2. バイオ燃料電池から得られた起電力をチャージポンプで昇圧する
3. 昇圧された電気エネルギーがキャパシタに充電される
4. キャパシタが一定電圧まで充電される
5. チャージポンプが充電状態から放電状態へ切り替わる
6. キャパシタが一定電圧になるまで放電される
7. チャージポンプが放電状態から充電状態へ切り替わる
8. 以下4~7を繰り返す

このような動作は日本庭園などで見られる、鹿威し(シシオドシ)の動作によく似ている。バイオ燃料電池の起電力を水量、キャパシタを竹筒に例えると、鹿威しで水量を変えると音が生じる間隔が変化すると同様に、バイオキャパシタではバイオ燃料電池の起電力を変化させれば放電の間隔が変化する。バイオ燃料電池の起電力は燃料の濃度に依存することから、放電の間隔または頻度を指標としたバイオセンシングシステムとして動作させることが可能である。さらに、鹿威しにおいて水量を変えず竹筒を大きくした場合、竹筒が満たされるまでに時間を要するため音の間隔は大きくなる。これと同様にバイオキャパシタでもキャパシタの容量を大きくすることによって、放電の間隔が長くなる(頻度が少なくなる)。つまり、バイオキャパシタの放電頻度がキャパシタの容量に依存する。このことはキャパシタの容量により一回の放電で得られるエネルギーを自在に調整できることも示している。

このような動作原理からなるバイオキャパシタの電源としての特性は、1) チャージポンプの昇圧動作により、酵素燃料電池では達成できない高い電圧が得られること、2) またキャパシタへの充電の間は出力電力が回路から供給されない代わりに放電時に出力電力を集中させることが可能となること、である。つまり、バイオキャパシタは高電圧を連続的に出力することも可能であるが、特に間欠的な出力を必要とする場合においてはより効果的に利用できるシステムであるといえる。バイオセンシングシステムとして利用できることとあわせ、バイオキャパシタの出力でトランスデューサ、トランスミッタを稼動できれば、“stand-alone, self-powered wireless biosensing system”が構築可能である。

これまでに報告しているバイオキャパシタはすべて、直接電子移動型のバイオ燃料電池が装備されており、このアノード酵素として電極としては前出の直接電子移動が可能なFADGDHが用いられている。すでにトランスミッタとして赤外線LEDを用いる光学的ワイヤレスグルコースセンサー、さらに発振回路をトランスミッタと

するワイヤレスグルコースセンシングシステムである「バイオラジオトランスミッタ」などを報告している¹⁴⁾。これらのデバイスではシグナル出力に外部電源を用いずバイオ燃料電池から得られる電力のみでセンシング，ワイヤレストランスミッションを行っていることから，stand-alone, self-powered wireless glucose sensing systemであることが示されている。今後は医療分野への応用ばかりでなく，未利用糖質資源を用いた電力供給とデバイス駆動が一体化した新しいタイプのバイオデバイスとして，バイオパワージェネレータの一角を担っていくものと期待される。

おわりに

以上，文部科学省の「低炭素社会構築に向けた研究基盤ネットワークの整備」事業に関連し整備されたサテライト拠点である東京農工大の「グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点」を紹介するとともに，そこでの筆者の研究活動を低炭素戦略として紹介させていただいた。現在推進している「グリーンナノバイオエレクトロニクス」のコンセプトは，バイオマテリアルとの界面を築くナノ界面の研究開発をハブ拠点や他のサテライト拠点の協力のもとで推進することでバイオパワージェネレータが実現する。これに加えて，低炭素戦略においては，低炭素社会の実現が単独の技術によって達成するものではないことは，本科学技術政策においても強調されている。本稿で紹介した技術が，たとえば藻類が生産するバイオ燃料関連化合物などと効率的にカップリングすることで，低炭素戦略の真価が発揮するものと期待する。

最後に，東京農工大において「グリーンナノバイオエレクトロニクス研究拠点」を実現するためにご尽力いただいた多くの関係者に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) <http://www.nims.go.jp/lcnet/>
- 2) Desriani, Hanashi, T., Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K.: *The Open electrochemistry journal*, **2**, 6 (2010).
- 3) Desriani, Ferri, S., and Sode, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 1246 (2010).
- 4) Desriani, Ferri, S., and Sode, K.: *Biotechnol. Lett.*, **32**, 855 (2010).
- 5) Inose, K., Fujikawa, M., amazaki, T., Kojima K., and Sode, K.: *BBA-Proteins and Proteomics*, **1645**, 133 (2003).
- 6) Tsuya, T., Ferri, S., Fujikawa, M., Yamaoka, H., and Sode, K.: *J. Biotechnol.*, **123**, 127 (2006).
- 7) Yamaoka, H., Ferri, S., Fujikawa M., and Sode, K.: *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1757 (2004).
- 8) Yamazaki, T., Okuda-Shimazaki, J., Sakata, C., Tsuya, T., and Sode, K.: *Analytical Letters*, **41**, 1 (2008).
- 9) Desriani, Hanashi, T., Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K.: *The Open Electrochemistry Journal*, **2**, 6 (2010).
- 10) Okuda, J. and Sode, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 793 (2004).
- 11) Okuda, J., Wakai, J., Igarashi, S., and Sode, K.: *Anal. Lett.*, **37**, 1847 (2004).
- 12) Igarashi, S., Okuda, J., Ikebukuro, K., and Sode, K.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **428**, 52 (2004).
- 13) Hanashi, T., Yamazaki, T., Tsugawa, W., Ferri, S., Nakayama, D., Tomiyama, M., Ikebukuro, K., and Sode, K.: *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 1837 (2009).
- 14) Hanashi, T., Yamazaki, T., Tsugawa, W., Ikebukuro, K., and Sode, K.: *J. Diabetes. Sci. Technol.*, **5**, 1030 (2011).