

細胞内電子フラックス制御を実現する電子伝達ポリマー

石川 聖人¹・橋本 和仁²・中西 周次^{3*}

はじめに

生細胞代謝は多数の酸化還元反応（電子移動反応）の連鎖から成り立っている。たとえば、一般的な好気代謝（好気呼吸）では、有機物の酸化分解を経て細胞内に取り込まれた電子は、解糖系やクエン酸回路でのNADHの生成を経て電子伝達系へと流れ込む。最終的には、酸素の水への還元を介して電子は細胞外へと排出され、好気呼吸過程が完結する。また酸素発生型の光合成では、水の酸化反応を介して細胞内に取り込まれた電子が光合成電子伝達系を流れる過程の中で、NADPH（還元力）とATP（化学エネルギー）が生成し、これらを基にCO₂が有機物へと還元・固定化される。

生物工学的観点からは、医療・環境・化学など目的は何であれ、細胞内の電子フラックスの自由な制御に対するニーズは高い。本誌の読者の中にも、「いま、ここに電子があれば……」「この電子をこちら側に流すことができれば……」などと思った経験をお持ちの方も多いのではないだろうか。そのような場合において、電子移動反応（酸化還元反応）を操ることに長けた電気化学的手法の利用は、一つの有効なソリューションである。その対象が生細胞内の化学種である場合にも、細胞膜透過能を有する電子メディエーターを用いれば、電気化学的手法が使える場合が多々ある^{1,2)} (図1)。

従来、電子メディエーターとしては疎水性小分子が一般的に用いられてきた。しかし、疎水性小分子は細胞膜を透過することはできるものの、水溶性培地に高濃度に

溶解し得ない。疎水性メディエーターを親水性レドックス小分子と組み合わせて使用することでメディエーター濃度を実質的に上げることはできるが³⁻⁵⁾、この方法は、メディエーターによる細胞毒性が顕著になるという副作用を伴う場合が多い。こうした背景の下、筆者らは、細胞親和性の高い両親媒性電子伝達ポリマーをメディエーターとして使用することで、電子フラックス、ひいては生細胞代謝が電気化学的に制御可能であることを示してきた⁶⁻⁸⁾。この電子伝達ポリマーは細胞親和性がきわめて高いことに加え、疎水性レドックス活性ユニットを高濃度に可溶化することができる。本稿では、この電子伝達ポリマーを用いた筆者らの研究の一例として、光合成電子伝達系における電子フラックスの電気化学的変調と、それによるシアノバクテリア概日リズムの制御について紹介する。

電子伝達ポリマー

電子伝達ポリマーの基本的な分子構造を図2に示す。本分子はホスホリルコリン基を有する親水性ユニット(MPC)⁹⁾と、レドックス活性を有する疎水性ユニットからなる両親媒性コポリマーである。レドックス活性部位は、細胞内電子の排出や細胞内への電子注入など、目的に合わせて分子設計することができる。分子量や親水性/疎水性部位の相対比なども制御可能であり、他にも、共重合を介して光機能や蛍光標識など第3の機能を付与することも可能である。

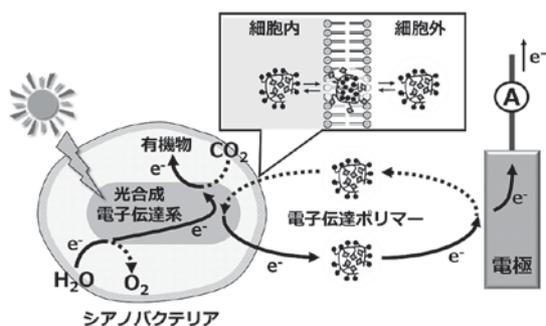


図1. 電子フラックス電気化学制御の概念図

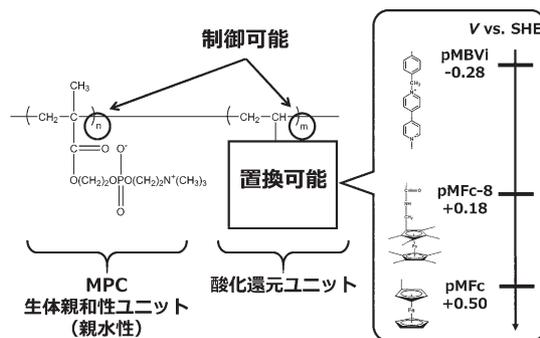


図2. 電子伝達ポリマーの分子構造

著者紹介 ¹名古屋大学大学院工学系研究科 (助教), ²物質材料研究機構 (理事長)
³大阪大学太陽エネルギー化学研究センター (教授) E-mail: nakanishi@chem.es.osaka-u.ac.jp

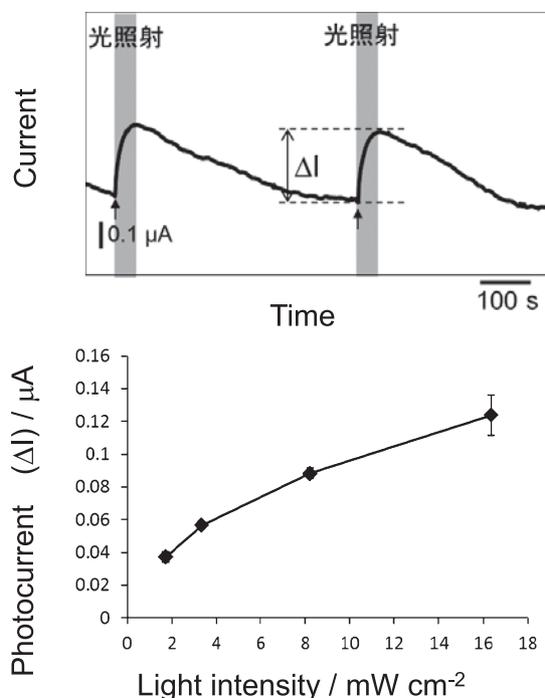


図3. (上) *Synechococcus elongatus* PCC7942 が生ずる光電流、矢印のタイミングで20秒間光を照射。電極電位: +0.6 V, (下) 微生物光電流の照射光強度依存性。

電子フラックスの電気化学制御

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 がこの電子伝達ポリマーを介して生ずる光電流を図3に示す。なお、この実験では、光合成電子伝達系を流れる電子フラックスを一部電極へと導く(排出する)ことを目的に、比較的高いレドックス電位を有するポリマー(pMFC, 図2)を使用した。光照射により電気化学系に流れる電流が増加し、またその大きさは照射光強度に依存した。こうした電流の増加は、系内に微生物と電子伝達ポリマーの両方が存在するときのみ観測され、このことは、電子伝達ポリマーにより細胞内電子が細胞外電極へと導かれたことを意味している。

では、この電子伝達ポリマーは、シアノバクテリア細胞内のどこから電子を引き抜いているのだろうか? そのレドックス活性部位(フェロセン)は疎水性であることから、この電子伝達ポリマーは生細胞中の疎水性な環境中に存在する酸化還元活性種と主に反応しやすいと推測される。光合成電子伝達系において光化学系II(PS-II)と光化学系I(PS-I)の間に存在するプラストキノン(PQ)は疎水性脂質膜中に位置し、またその酸化還元電位は+0.1 V付近に位置することから、pMFCと反応する細胞内化学種の一つの有力候補である。実際、

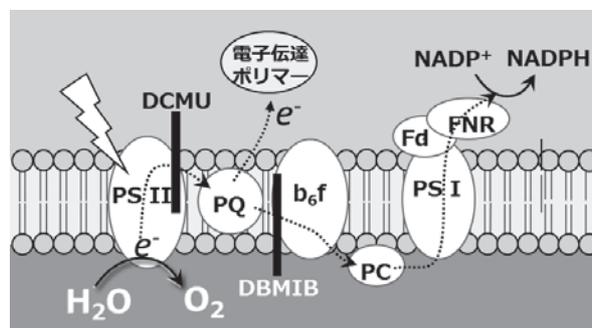


図4. 光合成電子伝達系と電子伝達ポリマーとの電子交換の説明模式図

PQの上流、あるいは下流をそれぞれ阻害するDCMU(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)とDBMIB(2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone)を加えた場合において、細胞外電極により測定された開放電位が、それぞれ正側および負側へと逆方向にシフトした。この結果は、図4に模式的に示すように、この電子伝達ポリマーがPQと主に電子交換したことを意味している。

シアノバクテリア概日時計の電気化学制御

シアノバクテリアは、地球の自転に伴う約24時間周期の明暗サイクルに適応するために、体内に概日時計システムを有している。シアノバクテリアは光強度依存的にPQのレドックス状態が変化することを利用して昼夜を認識し、その情報を基に、体内時計の位相を環境の明暗周期に引き込ませ、適切な時に適切な代謝を働かせる¹⁰⁾。

前節で述べたように、筆者らが用いている電子伝達ポリマーは、光合成電子伝達系のPQと主に電子交換する。したがって、たとえ明るい条件下に置かれていたとしても、本来PQからPS-Iへと流れる電子のフラックスを、一部、電子伝達ポリマーにより細胞外電極へと導けば、PQは酸化状態になり、シアノバクテリアは「いまは夜である」と認識するであろう。したがって、自然環境の明暗サイクルを模倣するようにPQのレドックス状態を電気化学的に24時間周期で変調すれば、シアノバクテリアの概日時計がそれに引き込まれ、ひいては時計の支配下にある代謝プロセスも制御されると期待される。

シアノバクテリア概日リズムは、多くの場合、24時間周期で生物発光を示すよう遺伝子操作の施された変異株を用いて観測される。ただし、シアノバクテリアは概日時計の位相を互いに合わせる機能を持っていないので、多数の菌が存在する系では異なる位相の多数の発光リズムが足し合わさり、巨視的な観測では24時間リズム

ムが認められない。したがって、通常は、多数の菌の生物時計を同じ明暗サイクルに引き込ませる(位相をそろえる)操作を施す。この明暗サイクルを電気化学サイクルで置き換えた際に、同様の現象が観測されれば、上記の仮説が検証されたことになる。

本実験で使用した電子伝達ポリマー (pMFC) の中点電位は+0.5 V vs. 標準水素電極 (SHE) に位置する。したがって、電極電位をこの中点電位よりも高い値 (たとえば+0.6 V) に設定すれば、pMFCを介してシアノバクテリアのPQから電極へと電子を引き抜くことができる。一方、電極電位を中点電位よりも低い値 (たとえば+0.2 V) に設定すれば、電子の引き抜きは起こらないので、シアノバクテリアは何も感じない。電気化学的なサイクルに概日時計を引き込ませた結果を図5示す。この実験は恒明条件で行われており、最初の3日間は12時間ごとに+0.6 Vと+0.2 Vとの間で電極電位が切り替えられている。繰り返しになるが、これが通常の明暗サイクルを模倣したステップとなっている。この最初の3日間において、+0.6 V、あるいは+0.2 Vを与えている際には、それぞれ、生物発光強度が次第に増加、あるいは減少していることが分かる。注目すべきは、恒明条件かつ電気化学摂動も与えない4日目以降の結果であって、最初の3日間の位相を引き継ぐ形で24時間周期の発光リズムが観測される。このように、電子伝達ポリマーを介して光合成電子伝達系の電子フラックスを周期的に変調することにより、シアノバクテリアのPQのレドックス状態、ひいては概日時計が電気化学的に制御できることが示された。

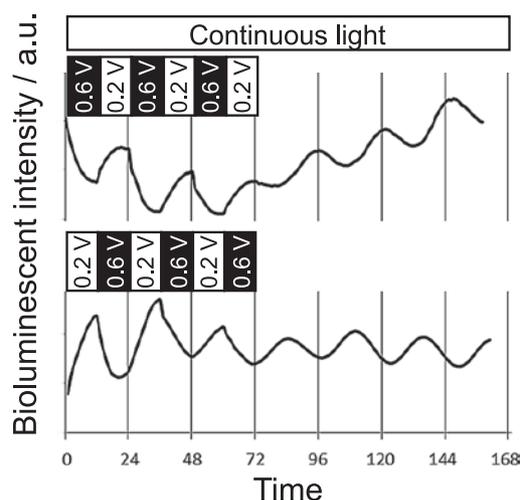


図5. 電気化学的な周期摂動によるシアノバクテリア概日リズムの制御

おわりに

本稿では、シアノバクテリアの概日時計制御を一つの具体例として、電子伝達ポリマーによる細胞内電子フラックスの電気化学制御に関する筆者らの研究を紹介した。この電子伝達ポリマーは、構造の自由度が高く、目的に応じた分子設計が可能である。誌面の都合上、ここでは紹介できないが、筆者らは、レドックス準位 (電子排出/電子注入) や細胞膜透過性能などが異なる種々の電子伝達ポリマーを設計・合成し、大腸菌への電子注入や、ラレストニア菌における電子引き抜きによるバイオプラスチックPHBの生産性向上⁷⁾、またメタン資化菌の体内レドックス計測などを実現してきた。これらは、電気化学、合成化学、生物学などの総力をあげた取り組みである。

昨今、種々の網羅的解析、バイオインフォマティクス、合成生物学などが次第に身近なものになりつつあり、それとともに、細胞内電子フラックスの自由な制御に対するニーズも益々高まっている。現状、その要求に満足に応える手法は確立されていないが、これが「超えなければならぬ壁」であることは間違いない。本稿で紹介した筆者らの電気化学的手法は、こうした方向性の研究の進展に大きく貢献できるものと期待している。

謝 辞

本稿で紹介した研究に多大なご助言、ご協力賜りました東京大学の石原一彦教授、産業技術総合研究所の加藤創一郎博士に心より感謝申し上げます。本研究は科学研究費補助金 (特別推進 2100010) の支援を受け、東京大学・工学系研究科・応用化学専攻、および大阪大学・太陽エネルギー化学研究センターにて行われました。

文 献

- 1) 加納健司: 生物学, **91**, 273 (2013).
- 2) 松本伯夫: 生物学, **91**, 281 (2013).
- 3) Braonian, K. H. R. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 108 (2002).
- 4) Zhao, J. *et al.*: *Anal. Chim. Acta*, **597**, 67 (2007).
- 5) Rawson, F. J. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 5216 (2014).
- 6) Nishio, K. *et al.*: *ChemPhysChem*, **14**, 2159 (2013).
- 7) Nishio, K. *et al.*: *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **1**, 40 (2014).
- 8) Lu, Y *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **23**, 2208 (2014).
- 9) Ishihara, K. *et al.*: *Mater. Sci. Eng. C*, **6**, 253 (1998).
- 10) Kim, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 17765 (2012).