

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4444917号
(P4444917)

(45) 発行日 平成22年3月31日 (2010. 3. 31)

(24) 登録日 平成22年1月22日 (2010. 1. 22)

(51) Int. Cl. F I
BO 1 D 71/74 (2006. 01) BO 1 D 71/74
BO 1 D 69/02 (2006. 01) BO 1 D 69/02
BO 1 D 71/80 (2006. 01) BO 1 D 71/80
BO 1 D 71/38 (2006. 01) BO 1 D 71/38
BO 1 D 71/40 (2006. 01) BO 1 D 71/40

請求項の数 26 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-505595 (P2005-505595)	(73) 特許権者	505036076
(86) (22) 出願日	平成15年7月28日 (2003. 7. 28)		エムティ・テクノロジーズ・インコーポレ イテッド
(65) 公表番号	特表2006-512204 (P2006-512204A)		MT TECHNOLOGIES, IN C.
(43) 公表日	平成18年4月13日 (2006. 4. 13)		アメリカ合衆国07661ニュージャージ ー州リバー・エッジ、リー・アベニュー3 64番
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/019879		
(87) 国際公開番号	W02004/011600	(74) 代理人	100100158
(87) 国際公開日	平成16年2月5日 (2004. 2. 5)		弁理士 鮫島 睦
審査請求日	平成18年7月25日 (2006. 7. 25)	(74) 代理人	100107180
(31) 優先権主張番号	60/398, 784		弁理士 玄番 佐奈恵
(32) 優先日	平成14年7月29日 (2002. 7. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/438, 784		
(32) 優先日	平成15年1月9日 (2003. 1. 9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体模倣膜

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然生体膜および天然タンパク質の環境を模倣したトリブロックコポリマー・マトリッ
クス、および

膜／タンパク質複合体を形成するように前記トリブロックコポリマー・マトリックス内
に組み込まれた膜タンパク質
を有して成る生体模倣膜。

【請求項 2】

膜／タンパク質複合体は、組み込まれた膜タンパク質の機能を有するデバイスを構成す
る、請求項 1 に記載の膜。

【請求項 3】

タンパク質の機能には、バルブ、チャンネル、センサー、検出器、ポンプおよびエネル
ギー変換器が含まれる、請求項 2 に記載の膜。

【請求項 4】

前記膜タンパク質は、水分子のみを輸送するように選択されており、そのため、前記生
体模倣膜が水フィルターとなる、請求項 1 に記載の膜。

【請求項 5】

前記膜タンパク質はタンパク質のアクアポリンファミリーから選択されている、請求項
4 に記載の膜。

【請求項 6】

前記マトリックスは不透水性であり、前記膜タンパク質が、加圧下で水分子を通すことができるように選択されている、請求項 5 に記載の膜。

【請求項 7】

前記マトリックスが水精製デバイス内で支持され、前記デバイスが第 1 チャンバーと第 2 チャンバーとに分けられており、前記膜タンパク質によって、前記チャンバー間で水だけが流れることができる、請求項 6 に記載の膜。

【請求項 8】

前記膜タンパク質が遺伝子操作されたタンパク質である、請求項 1 に記載の膜。

【請求項 9】

2 種類の異なる膜タンパク質が、前記マトリックス内に組み込まれている、請求項 8 に記載の膜。

【請求項 10】

前記膜タンパク質が、エネルギー変換タンパク質である、請求項 9 に記載の膜。

【請求項 11】

前記マトリックスは、薄いファブリック内に組み込まれている、請求項 1 に記載の膜。

【請求項 12】

前記膜タンパク質は、光エネルギーが電気エネルギーに変換されるように、前記マトリックス内に埋設されたバクテリオロドプシンおよびシトクロムオキシダーゼを含む、請求項 11 に記載の膜。

【請求項 13】

前記電気エネルギーを受けるように、前記ファブリックの対向する面に第 1 電極および第 2 電極を更に含む、請求項 12 に記載の膜。

【請求項 14】

前記マトリックスは、バイオソーラーセルが形成されるように、配向されたバクテリオロドプシンおよびシトクロムオキシダーゼを受容している、請求項 1 に記載の膜。

【請求項 15】

前記マトリックスの対向する側面に電極を更に含む、請求項 14 に記載の膜。

【請求項 16】

前記マトリックスは、プロトンに対して不透性を有する生体適合性ポリマーである、請求項 14 に記載の膜。

【請求項 17】

トリブロックコポリマー・マトリックス、および

前記トリブロックコポリマー・マトリックスに埋設された相互に異なる第 1 膜タンパク質および第 2 膜タンパク質を有して成るハイブリッド有機／無機電源。

【請求項 18】

薄いファブリック材料を更に含んでおり、前記マトリックスが前記ファブリック内に埋設されている、請求項 17 に記載の電源。

【請求項 19】

前記膜タンパク質は、天然の生体タンパク質である、請求項 18 に記載の電源。

【請求項 20】

前記タンパク質は、光エネルギーが電気エネルギーに変換されるように、バクテリオロドプシンおよびシトクロムオキシダーゼを含んで成る、請求項 19 に記載の電源。

【請求項 21】

前記電気エネルギーを受けるように、前記ファブリックの対向する面に電極を更に含む、請求項 20 に記載の電源。

【請求項 22】

生体膜を形成する方法であって、

トリブロックコポリマー・マトリックスを形成すること、および

前記トリブロックコポリマー・マトリックスに、天然の膜タンパク質または遺伝子操作

10

20

30

40

50

された膜タンパク質を挿入すること
を含んで成る方法。

【請求項 2 3】

前記膜タンパク質を前記マトリックス内で配向させることを更に含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

対応する膜機能が生じるように、前記タンパク質を選択することを更に含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記マトリックス内に 2 種類の異なる膜タンパク質を挿入することを更に含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記マトリックスに光を当て、電気エネルギーを前記マトリックスに発生させることを更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、米国仮特許出願第 60 / 398784 号（出願日：2002 年 7 月 29 日）および仮特許出願第 60 / 438784 号（出願日：2003 年 1 月 9 日）に基づくパリ条約上の優先権を主張する。当該出願に開示された内容は全て、この引用により、本明細書に含まれるものとする。

【0002】

発明の背景

本発明は、生体膜および膜タンパク質の特性および機能を有する人工デバイスを形成する方法、ならびにかかるデバイスの構造に関する。

【0003】

生体膜タンパク質は多くの種々の機能を有しており、特に、ポンプ、チャンネル、バルブ、エネルギー変換器、機械センサー、熱センサーおよび電気センサー等として生体膜タンパク質は機能する。このようなタンパク質はナノメートルのサイズであり、非常に効率の良いものであるので、人工デバイスに使用するのに非常に魅力的である。しかしながら、それらの天然脂質膜環境は、強度が低いという欠点があり、また、水性環境を必要とし、化学的または生物的に劣化しやすいという問題点があった。

【0004】

発明の要旨

手短かに言えば、本発明の 1 つの要旨において、天然の膜タンパク質または遺伝子操作された膜タンパク質がブロックコポリマー・マトリックス内に組み込まれており、流体間で化合物を選択的に透過および／または濾過する等の種々の固有の機能を有するように膜が形成されている。特定の性質を有するタンパク質が選択されることによって、静電気力、電磁気力および化学的な力で分子スケールの処理することにより特定の機能を有する膜を作ることができる。

【0005】

本発明のブロックコポリマーは、必要に応じて次のような機能を有するように設計および形成することができる。例えば、所望の厚さの膜を形成する機能、所望の化学組成物から成る膜を形成する機能、高い強度を有する膜を形成する機能、予め形成されている膜の強度を随意に増加させる機能などである。このような膜の最も重要な特性の 1 つは、機能的な状態で天然の生体膜タンパク質を収納できることであり、得られる複合膜が丈夫で耐久性を有することである。なぜなら、生体膜タンパク質をかかるポリマー膜に挿入することによって、タンパク質の特性および機能を有するデバイスが得られるからである。膜タンパク質の上半分と下半分（底側半分）とを分ける膜であって、タンパク質が適当に配向される際にタンパク質の天然の機能を損なうことなくタンパク質を容易に挿入できる天然

10

20

30

40

50

の脂質膜に似た膜を形成できるポリマーが適当である。このような条件を満たすポリマーとしては、親水性外側ブロックおよび疎水性内側ブロックの一般的な性質を有するトリブロックコポリマーが含まれる。

【0006】

本発明の1つの要旨は、2種類の異なるタンパク質を含む複合膜の形成に関しており、協働して機能して光から電気を生じるデバイス（「バイオソーラーセル」）を形成する複合膜に関する。本発明の別の要旨として、水輸送タンパク質が、任意の水源を浄水（水精製）できるように利用されている。以下において、上述の要旨の説明を行う。

【0007】

技術革新に伴うデバイスの小型化によって電子機器が小型化・軽量化・高効率化しているものの、それらのデバイスに対する電源はそれほど急速には進展していない。21世紀の電源は、サイズおよび重量が減少しているにも関わらず増加するデバイス数に対してエネルギーを供給しなければならないという課題に直面している。更に、ナノテクノロジーおよびバイオテクノロジーを用いた未来の製品には、形状または機能の点で現在使用されているものとは似ても似つかぬ電力供給が必要とされるであろう。

10

【0008】

新たに現れる種々の広範な用途に対して、より軽量でコンパクトな電源が早急に求められている。そのような電源は、電力密度を最大限にして、所定の電力を得るのに必要とされる重量を最小限にするので、現在の電池技術で達成し得る多くの目的を果たすことになるであろう。従来の燃料源では、燃料源がデバイスの近くになければならず、流動性を有する場合では移動しなければならないため、重量条件はシビアである。また、燃料の排出が考えられるので、燃料供給を補充しなければならない。このため、ユーザーの範囲および移動が制限されることになる。

20

【0009】

現代の科学では、ナノバイオテクノロジーの開発で裏付けされた興味深い可能性が示されている。無駄な原子を含まない要素が用いられるデバイスを製造すると、最高のレベルの効率化および小型化がもたらされる。電源に関する最近の技術開発は期待されているものの、既存の技術に付加的な改良が行われているにすぎない。次世代のデバイスに理想的に適する電源には、その機能にナノバイオテクノロジーが用いられており、高レベルの性能となるように現世代のデバイスに電力を供給することが可能となるであろう。

30

【0010】

最近になって、第1ナノテクノロジー・デバイスを開発するのに必要な技術および知識が利用されるようになってきており、生化学燃料ATPによってエネルギーが供されるナノメートル・スケールの有機／無機ハイブリッド・デバイスの技術および構成に関して報告がされている（サイエンス（Science）第290巻、第1555頁～第1558頁、2000年（ソーオング・アール・ケイ（Soong, R. K.）、バチャンド・ジー・ディー（Bachand, G. D.）、ネベス・エイチ・ピー（Neves, H. P.）、オルクホベツ・エー・ジー（Olkhovets, A. G.）、クライグヘッド・エイチ・ジー（Craighead, H. G.）、モンテマグノ・シー・ディー（Motemagno, C. D.））。このようなデバイスに使用されるATPを発生させることや、このようなデバイスを他の機器に電力を供するように用いることは、マクロ・スケールとナノメートル・スケールとの間での電力移送や、異なる種類のエネルギーへの相互交換に関心が向けられている。

40

【0011】

本発明の別の要旨では、電子／プロトンの輸送で電氣的なエネルギーと化学的なエネルギーとの間の変換が可能となるように、種々の機能を有する他のタンパク質を用いることができ、そのようなタンパク質を機械バルブおよびセンサーとして機能させることができる。

【0012】

本発明の好ましい態様では、バイオソーラーを動力源とした材料およびファブリック（

50

f a b r i c) を供するために膜が用いられている。バイオソーラーを動力源とした材料およびファブリックは、光エネルギーを電気エネルギーに変換して、その電気エネルギーを外部加重に送るようなバクテリオロドプシン（または細菌ロドプシン）およびシトクロムオキシダーゼ（またはシトクロム酸化酵素）という2つのエネルギー変換タンパク質が埋め込まれた生体適合性ポリマー膜を含む薄い構造から成っている。薄いポリマー膜（ $1\mu\text{m}$ よりも薄いポリマー膜）が使用されており、電源で燃料を運ぶ必要がないため、重量が大きく軽減される。従って、ありふれた材料から成る生地およびその表面内に組み込むことができるシステムを開発することが可能であり、それによって、ソーラー・セルで達成できる以上の効率を有しつつエネルギー源の重量が効果的に減じられることになる（即ち、 $1\text{kg}/\text{m}^2$ より少ない重量）。従って、バイオソーラーを動力源とした材料を用いることによって、光からエネルギーを得るハイブリッド有機／無機電源が形成されることになる。

10

【0013】

本発明の方法は、光エネルギーを電気エネルギーに変換して、そのエネルギーを外部加重に送るバクテリオロドプシンおよびシトクロムオキシダーゼという2種類のエネルギー変換タンパク質が埋設された生体適合性ポリマーから成る薄いファブリックの製造に関する。このようなタンパク質は、光エネルギーおよび電気エネルギーを電気化学エネルギーに変換するように、何百万年以上にも及ぶ自然淘汰（または自然選択）によって分離され最適化されたものである。そのようなタンパク質がデバイスに組み込まれると、制限なく有益な量の電力が生じることになる。そのようなデバイスは、十分に軽量で小型であり、

20

【0014】

バクテリオロドプシンは、光を吸収した際に、細胞膜を通してプロトン（または陽子）を輸送させる細菌タンパク質である。シトクロムオキシダーゼは、高エネルギー電子を使用してプロトンを移送させる膜タンパク質である。これらのタンパク質が組み合わせて用いられることによって、光エネルギーが電気化学的プロトン勾配に変換され、その電気化学的なプロトン勾配が外部に仕事を行う起電力に変換される。デバイスは常套的なソーラーセル（または太陽電池）の生物学的なタイプであるので、電源（または電力供給）と共に「燃料」を用いずに済み、電力密度が相当に増加することになる。更に、太陽が出ている限りは又はデバイスが作動する限りは、かかるデバイスから理論的に取り出すことが可能な最大限のエネルギーに制限はない。最終的なデバイスの質量密度は $100\text{g}/\text{cm}^2$ より小さいと見積もられるので、ソーラーセルで達成できる効率以上の効率を有しつつエネルギー源の重量を効率的に減らしている。このようなバイオソーラーセルの材料組成および寸法は、最終的に電源密度が大きくなり（ $250\text{W}/\text{kg}$ より大きい電源密度）、エネルギー密度も大きいので（3時間では $800\text{Whr}/\text{kg}$ 、3日では $9500\text{Whr}/\text{kg}$ 、10日では $32000\text{Whr}/\text{kg}$ となるエネルギー密度）、体積および重量を事実上ほとんど占めることなく多くの機器に電力供給するには十分である。更に、バイオソーラーセルの作動に起因した音特性、熱特性および電子特性は極わずかな程度である。

30

【0015】

本発明の電源と従来のソーラーセルとの間には重要な違いがある。なぜなら、本発明の電源は、量産されたタンパク質および通常のポリマーから形成されるので軽量で可撓性かつ耐久性に富んでおり、低コストな大量生産が可能となっているからである。このデバイスに関連する長さスケールとしては、パッケージングの厚さが $1\mu\text{m}$ よりも小さい。このような酵素が通常存在する膜は、 5nm 厚さを有している。バイオソーラーセルが積層したシートは、何れにせよ、すり減らされることになるから重量コストがかからないように生地および他の表面に組み込むことができる。ファブリック内に発電セルが適当にモジュール設計されることによって、電力源を有するファブリックが損害を被った場合でも機能を依然保持できることになる。電気エネルギーと生物化学エネルギーとを相互に変換する性能に起因して、生物化学燃料を電気へと変換することができ、電力を供給するバイオ・

40

50

デバイスが形成される。電気形態、生物化学形態および光形態と任意の形態間でエネルギーが変換されることに起因して、入力エネルギーの種類によっては制限を受けないナノバイオ・デバイスを設計および製造することが可能となる。

【0016】

本発明の上述の目的、特徴および利点、ならびに付加的な目的、特徴および利点は、添付の図面を参照することによって、以下の本発明の好ましい態様の詳細な説明から理解されよう。

【0017】

好ましい形態の説明

本発明の1つの形態において、バクテリオロドプシンとシトクロムオキシダーゼとが組み合わされることによって、微少形成された電極と接触した生体適合性ポリマー膜を得ることができる。バクテリオロドプシン、シトクロムオキシダーゼおよびそれらが脂質膜およびポリマー膜に組み込まれることを理解すると、提案されたデバイスの動作（または操作）をより良く理解することができる。バクテリオロドプシン、シトクロムオキシダーゼおよびそれらが脂質膜およびポリマー膜に組み込まれることは、広く研究されており、それらの合成および機能に関しては多数の文献が存在する。

【0018】

バクテリオロドプシン（BR）は、最も広く研究されているイオン輸送タンパク質である。バクテリオロドプシン（図1の10で示される）は、分子量26 kDのプロトン輸送体であって、明るく光に照らされた塩水および湿地で成長するハロバクテリウム属サリナリウム（即ち、好塩性古細菌）の細胞膜内で見られるものである。BRによってハロバクテリウム属サリナリウムは嫌気性環境でも生存することができる。つまり、呼吸プロセスに不十分な酸素量であっても、BRがその代わりになる役割を果たす。図2に示すように、BR12の細胞は、プロトン14を細胞膜16を通して輸送させており、緑色光（ $\lambda = 500 \sim 650 \text{ nm}$ ）の光子18を吸収すると細胞から汲み出すようにプロトンを輸送させる。各々のBR分子は、光学的に励起されるので種々の電子中間状態を経ることによってプロトンを輸送させている。BRが元の初期状態に戻るのに要する時間の総計は、3ミリ秒のオーダーであり、エネルギー移送にとっては最も短い時間スケールとなっている。

【0019】

プロトン14が細胞12から汲み出されるので、電荷およびpHの勾配（低 H^+ ～高 H^+ ）が細胞膜16に形成され、電気化学ポテンシャルが形成されることになる。このようなポテンシャルによって、ATPシンターゼ（ATPアーゼ）に電力を供するエネルギーが生じることになる（20で示される）。プロトン14が膜を戻るように通って移送される際に、ATPシンターゼは電気化学エネルギーを使用して、アデノシン三リン酸フォスフォターゼ（ATP）を図2の22で生成することになる。ATPは一般的な生物燃料であり、生命に不可欠な細胞プロセスの大部分にエネルギーを供給する。このような天然の生体系は、脂質小胞内にBRとATPアーゼから成る系を構成することによって実験室において複製されてきた（イウ・ジェイ・バイオケム（Eur. J. Biochem）第235巻、第769頁～第788頁、1996年（ピタード・ビー（Pitard, B.）、リチャード・ピー（Richard, P.）、ドゥナーチ・エム（Dunarch, M.）およびリガード・ジェイ（Riguard, J.））。文献によると、40℃の温度でBRを作り、小胞境界で1.25のpH差となるように維持することが可能である。また、20℃では、 $\Delta \text{pH} = 2$ を得ることができる。プロトン勾配に起因してBRがフィードバック阻害されることによって、より高いpH差は達成されない。更に、プロトン勾配は、ATPを発生させるのに用いられており、系内の酵素の性能を測定するのに用いられている。このような研究では、リポソーム膜内に負に帯電したリン脂質が添加されると、BRとATPアーゼとの間のカップリング効率が增加することが示されている。

【0020】

BRは、デバイスに組み込むのに理想的な物質である。なぜなら、タンパク質が細胞膜

10

20

30

40

50

内で2次元的な結晶として高い濃度で存在することができるからである。これは、レチナールタンパク質の中でも独特な性質である。このような形態は「紫膜」と呼ばれ、脂質25%に対してタンパク質7%の質量比（タンパク質当たり10より少ない脂質分子）を有している。このような紫膜の小径のサイズは、0.5 μm 以上であることが確認されている。このようなタンパク質凝集体は、高い濃度で安定に存在するので（また、自然に存在するので）、エネルギー収量が増加し、余剰分がデバイスに供給され、工学的には安全となる。更に、ハロバクテリウム属サリナリウムは、長時間、大きい光束の下、高い温度で操作することが可能であるので、ハロバクテリウム属サリナリウムを進化させることによってBRの機能が最適化される。

【0021】

10

上記で引用したピタードらの研究では、小さい脂質膜（150 nm）で相当に希釈されたBRが使用されており、ATP生成速度がBR／脂質質量比に反比例することが示されている。紫膜のBR／脂質質量比のデータによると、BR 1 mg当たり1分間にATPが320 nmol生成することが推定される。ATPアーゼによってADP（図2の24で示す）からATPが合成され、無機リン酸塩（35 kJ/molのエネルギーを有する）が増加することになる。紫膜および脂質のみの質量を考慮すると、光を動力源としたATP合成系は、140 W/kgの密度で電力を供給する。ATPシンターゼがBRと同じぐらい迅速にプロトンを汲み出す場合、生じる電力は180～280 W/kgにまで増えることになる。

【0022】

20

BR、そのロバストネスおよび寿命に関する多くの知見により、BRを能動的な光デバイスの光要素として用いる開発やコンピューターメモリー用途に用いる開発に多くの関心が集まっており、それについて多くの取り組みがなされている。紫膜は、光照射によって、活性を何年もの間有することが示されており、有機溶剤の存在下、0～12のpH値で180℃までの温度のポリマー・マトリックス（十分に脱水されている場合）で安定に存在する（ブセボロドヴ・エヌ（Vsevolodov, N.）、1998年、バイオモレキュラー・エレクトロニクス（Biomolecular Electronics）：アン・イントロダクション・ピア・フォトセンシティブ・プロテインズ（An Introduction via Photosensitive Proteins）、第125頁、バーカウザー（Birkhauser）、ボストン）。科学協会および工学協会が注目する結果、ハロバクテリウム属サリナリウムの余剰に生産された菌株でBRの生成および単離を行うプロトコルが開発された（ローバー・ビー（Lorber, B.）およびデルカス・エル・ジェイ（DeLucas, L. J.）、1990年、エフ・イー・ビー・エス・レット（FEBS Lett.）261巻、第14頁～第18頁）。抽出および精製の手法、ならびに紫膜を多量に処理およびハンドリングする手法は公知である（例えば、スチュアート・ジェイ・エイ（Stuart, J. A.）；ボウト・ビー・ダブリュ（Vought, B. W.）；シュミッド・イー・ジェイ（Schmidt, E. J.）；グロス・アール・ビー（Gross, R. B.）；タレント・ジェイ・アール（Tallent, J. R.）；ディウエイ・ティー・ジー（Dewey, T. G.）；バージ・アール・アール（Birge, R. R.）、近刊のアイ・イー・イー・イー・イー・エム・ビー・エス（IEEE EMBS）。非生物材料と組み合わせた実験では、BRを、ポリ（ビニルアルコール）およびポリ（アクリルアミド）などの一般のポリマーに対して使用するのに適していることが示されている（バージ・アール（Birge, R.）、ジレスピー・エヌ（Gillespie, N.）、イザグイアレ・イー（Izaguirre, E.）、クスネットゾウ・エー（Kusnetzow, A.）、ローウレンス・エー（Lawrence, A.）、シング・ディー（Singh, D.）、ソング・ダブリュ（Song, W.）、シュミッド・イー（Schmidt, E.）、スチュアート・ジェイ（Stuart, J.）、シーサラマン・エス（Seetharaman, S.）、ワイス・ケイ（Wise, K.）、1999年、ジェイ・フィズ・ケム・ビー103（J. Phys. Chem. B103）、第10746頁～第10766頁）。

30

40

50

【0023】

第2酵素であるシトクロムオキシダーゼ(COX)は、電子およびプロトンの輸送タンパク質であり、呼吸を引き起こす4つの酵素のうちの最後の酵素である。図3Aの30は、COXの主鎖のリボン構造から成る膜を示している。図3Bは、「孔」またはプロトン輸送チャンネルを領域34として星印で図示した細胞質を示している。呼吸に際して、NADH(最初はグルコースの酸化によって生じる)の高エネルギー電子が O_2 に移送され、 O_2 が還元されるので H_2O が生じることになる。

【0024】

COXは、呼吸プロセスの前段階からシトクロムcによって運ばれる電子を受容し、その電子を2つの内部のヘムグループ(鉄イオンおよび銅イオンを含む)に移動させる。ヘムグループは、シトクロムcからの電子によって還元され、一方のヘムに結合する O_2 分子へと電子が移動した後で脱酸素化されることになる。電子が加えられた O_2 は、周りのプロトンとの水性反応に対してターゲットになり、その反応後にヘムから解放されることになる。これらの高エネルギー電子は輸送されるので、460mVの電圧降下によって得られるエネルギーが、ミトコンドリアのスペースにプロトンを輸送するのに用いられる(ニコルス・ディー(Nicholls, D.)、1982年、バイオエナジェティックス(Bioenergetics):アン・イントロダクション・トゥー・ザ・ケミオズモティック・セオリー(An Introduction to the Chemiosmotic Theory)第123頁、アカデミック・プレス(Academic Press)、ロンドン)。なお、1つのプロトンと輸送される1つの電子とが典型的な比になるように、プロトンがミトコンドリアのスペースに輸送される(リー・エイチ(Lee, H.)、ダス・ティー(Das T.)、ロウセアウ・ディー(Rousseau, D.)、ミルズ・ディー(Mills D.)、ファークソン・ミラー・エス(Ferguson-Miller, S.)、ジェニス・アール(Gennis, R.)、2000年、バイオケミストリー(Biochemistry)第29巻、第2989頁~第2996頁)。また、1つのプロトンと輸送される1つの電子とその他の比についても論じられており(パパ・エス(Papa, S.)、ロルツソ・エム(Lorusso, M.)、キャピタニオ・エヌ(Capitanio, N.)、1994年、ジェイ・バイオエネーグ・バイオメンブル(J. Bioenerg. Biomembr.)第26巻、第609頁~第617頁; ミシェル・エイチ(Michel, H.)、ベハア・ジェイ(Behr, J.)、ハレンガ・エイ(Harrenga, A.)およびカント・エイ(Kannt, A.)、1998年、アン・レブ・バイオフィズ・バイオモル・ストラクト(Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.)27巻、第329頁~第356頁)、一般的に膜電位の機能が論じられている(マーフィー・エム(Murphy, M.)およびブランド・エム(Brand, M.)、1988年、イウ・ジェイ・バイオケム第173巻、第645頁~第651頁)。

【0025】

プロトンがミトコンドリアのマトリックスから汲み出されるので、電気化学的なプロトン勾配が形成される。このプロトン勾配は、ATPアーゼによって使用されてATPを生じることになる。BRとCOXとは、プロトン勾配が結果的に生じるという点で相互に似ている。BRの場合では、光によってプロトン勾配が形成され、COXの場合では、化学エネルギーによってプロトン勾配が形成されることになる。このことは図2に示されており、BR12の代わりにCOXを用いる場合では、緑色光の光子18の代わりにシトクロムcからの高エネルギー電子が用いられ、酸素から水への還元が加えられることになる。実際、BRとCOXとがハロバクテリウム属サリナリウムにおいて同じ目的のために用いられており、呼吸に必要な酸素および有機体に有益なCOXが十分に存在していないハロバクテリウム属サリナリウムではBRが用いられている。

【0026】

図4Aおよび図4Bで示されるように、固体基質が支持されている脂質膜40にCOXが組み込まれることは、電子輸送の測定が可能であると共に、プロトン輸送の電氣的制御

10

20

30

40

50

が可能であることを示している（ナウマン・アール（Naumann, R.）、シュミット・イー（Schmidt, E.）、ジョンクジク・エー（Jonczyk, A.）、フェンドラー・ケイ（Fendler, K.）、カデンバッヒ・ビー（Kadenbach, B.）、レーバーマン・ティー（Liebermann, T.）、オフエンハウザー・エー（Offenhausser, A.）、クノール（Knoll）、1999年、バイオセンサー・アンド・バイオエレクトロニクス（Biosensors & Bioelectronics）14巻、第651頁～第662頁）。このような実験では、金フィルム44に取り付けられたチオール化ペプチド鎖42を、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）から成る脂質膜単層46に対する基質として機能するように用いている。COXおよびシトクロムcがリボソーム小胞48内に取り込まれており、図4Aの50で示されるペプチド表面上に融合することになる。電気測定では、電子が金基質からCOXを介するように輸送されたり、COXを介して金基質へと輸送されたりすることが示され、加えられた電流によりプロトンの輸送が制御されることが示される。

【0027】

インビトロ実験では、膜に結合したタンパク質の自然な環境が最大限に正確に再現されているものの、そのような条件は、他の細胞プロセスによって分かりにくくされ得る現象の測定または実験の時間スケールで希に生じる現象の測定にはあまり寄与しない。更に、タンパク質を能動素子として使用する有益なデバイスの製作では、使用および製造を容易にしつつ、タンパク質を変性させずにできる限り試験管内のタンパク質に似たタンパク質の機能を維持するサポートが容易に製造できて維持される必要がある。実験室での試験では、好都合な実験回数に対して酵素機能が維持されるような状態で多くの生物酵素が人工脂質膜に組み込まれている。本発明は、脂質膜とポリマー膜との双方を使用して光を動力源としたBR/COXデバイスを形成することを対象としている。

【0028】

ホスファチジルコリンまたはDMPEから形成される人工脂質膜は、天然の細胞膜の両親媒性組成が反復して形成されたものである。トリトンXまたは硫酸ドデシルナトリウム等の界面活性剤を添加することによって膜タンパク質を可溶化させており、タンパク質/脂質溶液を穏やかに音波処理することによって膜タンパク質をリボソーム内に組み込んでいる。リボソームは、小胞形態で維持することができる（ピタードら、1996年）。あるいは、リボソームは、フラットな基質の存在下で平らな面状に形成することも可能である（ナウマンら、1999年、およびスタインバーグ・ユフラフ・ジー（Steinberg-Yfrach, G.）、リガウド・ジェイ（Rigaud, J.）、デュランティニ・イー（Durantini, E.）、ムーア・エイ（Moore, A.）、ガスト・ディー（Gust, D.）、ムーア・ティー（Moore, T.）、1998年、ネイチャー（Nature）第392巻、第479頁～第482頁）。タンパク質の生物学的機能は維持されており、試験管内での濃度よりも数千倍高いタンパク質濃度を得ることができるので、実験感度および実験精度が良くなっている。また、高いタンパク質濃度は、個々の分子事象の集合効果を利用する電源およびセンサーの形成には必要である。

【0029】

BRの特性を考慮すると、BRおよびCOXを利用して電気を発生させるデバイスから得られる電力を見積もることができる。1秒間で地球表面1m²あたりおよそ7.5×10²⁰個の緑領域の太陽光子が入射している。即ち、BR分子の面積（25nm²）あたり1.9×10⁴個の緑領域の太陽光子が入射することになる。BRの吸収係数は、66000/モル/cmであり（ブセボロドヴ・エヌ、1998年、バイオモレキュラー・エレクトロニクス：アン・イントロダクション・ピア・フォトセンシティブ・プロテインズ、第125頁、バークウサー、ボストン）、BRの単層当たり約4.4×10⁻⁴である。BRの量子効率、0.7であり、3.08×10⁻⁴のプロトン輸送確率がもたらされることになる。それゆえ、日光の照射では、BR1分子当たり1秒間で約5.8輸送事象を予想することができる。

【0030】

1 m²の面積では、BR : COX比が57 : 1であれば、プロトン（1つ）が定常状態のプロトン移送速度となる。このような比では、単層1 m²当たり 3.9×10^{16} のBRが存在することになる。COXでは1つのプロトン当たり1つの電子が輸送されるので、単層1 m²当たり37 mAの電流が得られることになる。単層が1000個積層したものは、光の36%だけしか利用できないものの、電流が760 mVで37 A/m²まで増加し、28 W/m²が得られることになる。このような電流レベルおよび電圧レベルは全デバイスに対しては適当となり得ないものの、デバイスの電気出力を高く設定することができるので、いずれの電気出力に対しても電圧と電流との広範な組合せが可能となる。この系でのタンパク質および脂質（または同等物）の質量は、2.3 g/m²である。金電極およびポリビニルアルコールから成る同じ厚さ（5 nm）のポリマー層では、105.3 g/m²の質量密度が得られ、265 W/kgを超える電力密度が得られることになる。このようなデバイスから得られるエネルギーは3時間で795 Whr/kgであり、3日間で9540 Whr/kgであり、10日間で31800 Whr/kgである。エネルギーは日光から得られるので、取り出されるエネルギーは、日光に照射される継続時間に直接的に比例して増加する。

【0031】

このような電力密度およびエネルギー密度は、電極材料およびポリマー材料を代替的に取り替えることによって増加し得るが、層厚さを種々に選択すると付加的な重量および光散乱によって減少することになる。電極材料およびポリマー材料に起因する光散乱効果は、以下の理由から無視してもよい：（1）使用されるポリマーは、 $\lambda = 500 \sim 650$ nmと僅かな活性を有するように選択されている；（2）金属電極は、デバイスの最初の層を透過しなかった僅かな光でも吸収することがなく、仮にそのような光が電極と相互作用する場合であってもデバイス内で単に反射し、最終的にはBRによって吸収される。

【0032】

上述のように、BRおよびCOXは双方ともプロトン輸送体であり、それぞれ光および高エネルギー電子からのエネルギーをプロトン勾配へと変換しており、それによってATPアーゼおよびATPの生成が促進されることになる。COXを逆に作用するように用いると、プロトン勾配を起電力（EMF）に変換することができ、エネルギーが電子に伝えられることになる。酸素およびシトクロムcが排除され、それらが外部加重に接続された電極と置き換えられることによって、仕事を行うようにEMFを形成することができる。電極が重ねられた膜にBRおよびCOXを組み合わすことによって、図5に示すようなプロセスおよび構造が得られる。なお、図5では、緑色光の光子68を吸収すると、バクテリオロドプシン62がプロトン64をポリマー膜66を通過するように輸送させるバイオソーラーセル60が模式的に示されている。このため、膜の上側70のプロトン濃度は増加し、シトクロムオキシダーゼ（黄色）72が逆に作用することになる。その結果、下側74に輸送されるプロトン64から電気化学エネルギーが得られ、そのエネルギーによって、膜の上側の上方電子78から膜の下側の下方電子80へと電子76が輸送されることになり、電極に起電力が生じることになる。なお、起電力は、外部の仕事をするのに用いられることになる。

【0033】

電子の移送が完了すると、系はその初期状態に戻る（即ち、COXが還元されて再度酸化される。また、ポリマー膜66の両側のプロトン濃度が変化しない。更に、電極が正味荷電を得たり消費したりすることがない）。EMFは外部に対して仕事を行い、光子が吸収されることになる。系は、次の光子の光エネルギーを電気エネルギーに変化する準備が整うことになる。

【0034】

プロトン駆動力を起電力に変換させるのに中心となるプロセスは、逆向きにCOX72が作用することを経ることになる。F₀F₁-ATPアーゼおよびイオン輸送体等の可逆エネルギー変換タンパク質に関しては多くの例が文献に記載されている。F₀F₁-ATPアーゼに関する文献としては、ハンメス・ジー（Hammes, G）のトレンズ・バイ

10

20

30

40

50

オケム・サイ (Trends Biochem. Sci.) 第8巻の第131頁～第134頁 (1983年) があり、イオン輸送体に関する文献としては、ニコルス・ディー (Nicholls, D) のバイオエナジェティックス：アン・イントロダクション・ツー・ザ・ケミオズモティック・セオリーの第123頁 (ロンドンのアカデミック・プレス (Academic Press)) がある。しかしながら、逆向きに作用しないエネルギー変換タンパク質も存在する。例えば、バクテリオロドプシンは、プロトン勾配に応じて緑色光を発することはない。

【0035】

ウィクストロム (ウィクストロム・エム (Wikstrom, M)、1981年、プロク・ナトル・アカド・サイ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第78巻、第4051頁～第4054頁) の研究では、ATPが添加されたミトコンドリアでは、COXにおいて電子の一部が逆に流れることが確認されている。F₀F₁-ATPアーゼは、可逆プロトン・ポンプであり、ATPの形成の際にATPアーゼが外部のプロトンをミトコンドリア・マトリックスに移送したり、逆にATPを消費してプロトンを汲み出すことができるような機能を有している。ウィクストロムによって説明されているように、ATPが添加されると、ATPアーゼによって、COXと同時に、プロトンが膜を横切るように移送することになる。このような反応によって、膜の外側でプロトン濃度が高くなり、COXに逆向きの電子-膜プロトン圧力勾配が形成されることになる。このような条件が生じると、吸収スペクトルのシフトが観察され、典型的なプロセスとは逆で水からヘムへと電子が移送することが示されることになる。このような現象が生じる理由は、次の解析で例示される。

【0036】

電気化学において、反応の進行に伴うエネルギーの余剰分または不足分は、次の式で示される (例えば、デ・バウト・ディー (De Vault D.) のバイオチミ・バイフィズ (Biochim. Biophys.)、公式記録226、第193頁～第199頁 (1971年) を参照) :

$$-\Delta E = \Delta G / nF$$

ここで、 ΔE は電子供与の前後のレドックス電位の変化、 ΔG は反応の自由エネルギー変化、 n は移送される電子の数、および F はファラデー定数である。COXによって電子がシトクロムc (還元電位=+220mV) から移送されるに際して、電子は連続的にその自由エネルギーを減少させ、最終的には、O₂ (還元電位=+860mV) を還元してH₂Oを生成する。移送される1つの電子当たりの自由エネルギーは、-14.8kcal/molである。このエネルギーは、プロトンを移送させ、電気化学的勾配を形成するのに用いられる。ウィクストロムは、外部プロトン濃度を十分に増加させており、 ΔG がCOXの通常的作用に対して正になるので、プロトンの前方向へのポンピング (または輸送) では、O₂の還元が供し得るよりも多くのエネルギーが必要とされる。「還元緩衝」を用いることによって、シトクロムcの還元電位が一定に維持される。これは、 ΔG が変化するにつれ、H₂O/O₂の還元電位が変化することを示唆している。外側のプロトン濃度が十分に高くなるので、電子の移送が逆方向に進行し、水から電子が受容されて、COXにその電子が供与されることになる。しかしながら、O₂が生じないので、電子の逆方向の移送が十分とはなっていない。

【0037】

本発明の系では、図5に示すように、COXは、初期の電子供与体、シトクロムc、最終的な電子受容体、またはウィクストロムによって説明される系のO₂の何れも有していない。電子源は水でなく電極78なので、H₂Oの820mVと比較して電子を取り出すコストは最小限となっている。電子は、ヘムa₃に到達すると+380mVと正の還元電位を経ることになり、それによって、外部に対して仕事が行われることになる。この電位は、ヘムに向かって140mV～+240mV減少しており、プロトン勾配からのエネルギー入力を必要とする。電位は更に銅a (Cu a) に向かって50mV～+190mV減少し、最終的には0Vにおいて電極80に移送される (これもまた、エネルギーの入力

を必要とする)。初期電極 78 からヘム a_3 への電子の移送は、還元電位が増加 (自由エネルギーが減少) するので、このような反応が自発的に生じることになる。 a_3 から対電極への電子の移送は、380 mV と還元電位が減少するので、外部からエネルギーが入力されなければならない (即ち、プロトン駆動力が必要とされる)。BR62 を使用し、膜 66 を適当にドーブで処理すると、プロトン駆動力をより大きく形成することができる。電極が電子供与体であるので、電極から電子を得ることは、 H_2O から電子を得るよりも相当に容易であって、水と酸素との間の化学中間体が回避されている。

【0038】

膜の表面上ではイオンの拡散が大きくなっており、膜組成物を適当に選択することによってイオンの拡散をより大きくすることができるので、膜表面自体は、バイオソーラーセルの優れた機能が必要とされる (ピタードラ (1996 年))。膜 40 または多くの生体適合性ポリマー・マトリックスから成る膜等の脂質膜は、タンパク質を含んでおり、タンパク質バリアーとして機能している。このようなポリマー・マトリックスは、非常に一般的であって、

(a) タンパク質の上半分と下半分を分ける膜を形成すること、

(b) タンパク質を適当な方向で膜内に容易に挿入することができるように、天然脂質膜に十分に類似する環境を形成すること、

(c) タンパク質が受けるポリマー膜の局所的な化学環境に起因してタンパク質が広がり変形し、それによってタンパク質の天然の作用が損なわれることがないこと

が求められる。このような条件を満たすポリマーには、限定するわけではないが、外側に親水性ブロックおよび内側に疎水性ブロックから成る一般的な性質を有するトリブロックコポリマーが含まれる。BR62 および COX72 は、ポリマー膜 66 内で方向付けられて組み合わされることになり、膜が電極 78 および 80 で覆われることになる。

【0039】

図 2 には、F1-ATPアーゼを動力源としたナノ機構のデバイ스에燃料を連続的に供給することができる光駆動 ATP 生成系の構成が示されており、その実施および評価も示されている。図 5 に示されるように、本発明は、緑色光からのエネルギーを用いて ADP から ATP が連続的に生じるように配向された BR および ATP アーゼを含んだリポソーム小胞 66 の構成に関する。バクテリオロドプシン (BR) の大量生産および精製する系は、過剰生成するハロバクテリウム属とは切り離されており、ゲル濾過クロマトグラフィー (図 6 の曲線 90) を用いて精製が行われることになる。

【0040】

本発明では、上記で説明した手法 (ピタードラ (1996 年)) に従って、精製されたホスファチジルコリン、ホスファチジン酸およびコレステロールを用いることによって、リポソームを再構成した。リポソームは、溶液中に 200 nm よりも小さいリポソームが残されるように、0.45 μm および 0.2 μm のフィルターを用いてサイズを順次選択した。ATP アーゼおよび BR の組込みは、トリトン X-100 の存在下で行った。確実にリポソームが形成されるように、pH 検知計として、蛍光顕微鏡検査法を用いて視覚的に評価するピラニンを組み込んだ。これによって、20 $^{\circ}C$ において 1.5 という大きい pH 勾配が達成されることが示された (図 7 の線 92 および 94 を参照)。図 7 では、バクテリオロドプシンを含むリポソーム (線 92) およびバクテリオロドプシンを含まないリポソーム (線 94) によって 30 分後に pH 勾配が形成されることが示されている。

【0041】

分析により、図 8 の 96 で示されるように、リポソームによる ATP の生成が示された。図 8 では、種々の量の BR および F₀F₁-ATP アーゼを含むリポソームによって生じる ATP に起因してルシフェリンが発光することが示されている。リポソームは、ADP を溶液に加える前に光の下で 2.5 時間培養された。その目的は、定常状態の ATP 生成速度が上述のレベル (ピタードラ (1996 年)) にまで増加するように、電気化学的勾配を最適化するためである。

【0042】

原子的に鋭い先端を有する中空シリンダー（「ナノシリンジ」）のアレイは、上述のナノスケールのハイブリッド分子デバイスを生きている細胞に注入するのに用いられてきた。このプロセスの第1工程は、中空となっていないナノシリンジを形成することである。図9は、直径が約1 μm のシャフト104および直径10 nmよりも小さい先端102を含むシリコンチップ・アレイ100の一部の顕微鏡写真である。このようなアレイ100は、種々の分子デバイスのサポートとして機能するナノメートルのスケールのニッケル・ドットのアレイを電気化学的に配置するための電極として用いられる。また、このようなアレイによって、ミクロスケールまたはナノスケールの電極をタンパク質が埋め込まれた膜上に直接的に配置することが可能となる。

【0043】

BRの生成および合成は、常套的な操作で行われる。ハロバクテリアを50リットルのバッチ内で発酵させ、発酵後、処理および精製することによって、100 mgよりも多くの紫膜が形成される。これは、およそ60 m^2 のタンパク質単層面積に相当し、プロトタイプデバイスにとっては十分な量である。

【0044】

プロト・エクスプレス・アンド・パー（Prot. Expr., and Pur.）第13巻第326頁～第336頁（ゼーン・ワイ（Zhen, Y.）、クイアン・ジェイ（Qian, J.）、フォルマン・ケイ（Follmann, K.）、ハイワード・ティー（Hayward, T.）、ニルソン・ティー（Nilson, T.）、ダーン・エム（Dahn, M.）、ヒルミ・ワイ（Hilmi, Y.）、ハマー・エイ（Hamer, A.）、ホスラー・ジェイ（Hosler, J.）およびファergusson-ミラー・エス（Fergusson-Miller, S.）、1998年）に記載されているプロトコルは、COXの生成（ゼーンら（1998年））に使用される。この方法は、図10の90で示すように、ロドバクター・スフェロイデスからのCOXの過剰発現および精製に関する。過剰発現プラスミドpRK-pYJ123Hの形成手法は、図示するように、pJS2-X6H2のSma Iサイトをj10を用いてロドバクター・スフェロイデスからpUC19へとシトクロムcオキシダーゼのサブユニットI遺伝子（cox1）をサブクローニングして、pJS3-SHを形成することを含んでいる。His-tagと名付けられた6個のヒスチジンが連なったものが、cox1のC末端に配置されており、pJS3-SHにてpYJ100から特異的なPst IサイトへとPst I/Pst Iフラグメントを付けることによってpYJ124Hが形成される。引き続いて、3つのサブユニット遺伝子は、EcoRIサイトおよびHindIIIサイトを用いて発現ベクターpRK415-1内に配置される。このような手法では、10L培養物当たり過剰発現プラスミドpRK-pYJ123Hが61 mgと多量に生じ、それに伴って単層面積も大きくなっている。

【0045】

BR、およびBRが組み込まれたリポソーム小胞の生成ならびに合成は、常套的な操作で行われる。脂質に挿入する前に電場を一様に加えてBRを配向させることは、球形の小胞では困難となるものの、平面对称性を有する膜では極めて容易となる。図11の120で示されるような測定装置は、インピーダンス分光法に用いられる電気化学セルであり、電子輸送、およびプロトン輸送から生じる電位を測定するように設計されており、平面的な膜に対して用いられる。更に、膜/タンパク質複合体に対しては電場が容易に適用される。このセルは、ナウマンに関して説明したように、ストッパー121、Ag/AgCl/飽和KCl参照電極122、液体出口123、テフロン・スパーサー124、ゴルフ・サポート125、液体入口126および白金対電極127を含んでいる。

【0046】

紫膜（PM）およびBRの配向に関して多くの技術が開示されている。例えば、静電的に層単位でアセンブリすること、電場を高くしてランブミュラープロジェクト・フィルムを形成すること、空気コンデンサーの電場でBRを配向すること、懸濁液に電場を直接的に適用すること、および電場と磁場を組み合わせること等が挙げられる。これらの方法の大部分は、天然の恒久的なPMの大きい電気双極子モーメント（直径1 μm 粒子に対

10

20

30

40

50

して 10^6 デバイ) を利用している。この大きいモーメントは、個々のBRモーメントが合わさることによって生じる(理論的な計算では570 デバイと見積もられており、実験では55 デバイと見積もられている)。膜に対して垂直に加えられる強度が僅か20 V/cm未満の電場は、BRを配向させるのに十分であり、容易に得ることができる。

【0047】

COXの双極子モーメントは、シトクロムcの結合が高められるように、十分に大きくされる。BRと同様に、COXは、膜を介してプロトンを引き寄せたり、はじいたりするのにCOXの内部の双極子を使用する。COXの細胞質タンパク質が親水性であるために、脂質での回転を妨げるバリアーを酵素が有することになる。また、矩形のタンパク質も、そのような動きを妨げることになる。それゆえ、COXが脂質膜内へ取り込まれる前にCOXを方向付ける必要がある。COXの後にPMを加えると、配向のための場が相当に低下し、その結果、COXの配向が乱されなくなる。COXを配向させるのに、他の部分(脂質膜、BR、または水の加水分解など)に対して適合性を有さない電圧が必要とされる場合、対電極は近づくように移動し、加えられる電圧が安全なレベルとなるので、プロセスが乱されることなく、必要な場が確実に形成されることになる。

【0048】

上述の装置は、リポソーム膜内でPMおよびCOXを個々に配向させるために用いられるものであり、BRでのプロトン輸送およびCOXによる電子輸送を測定するためにも用いられる。

【0049】

リポソーム膜内に配向されて組み込まれたBRのみを用いる初期の実験を、図5で説明したような構造を用いて実施した。膜を通るようにプロトンが移動するので、検知可能な信号を容易に得ることができる。このような実験は、COXを用いて繰り返し行った。

【0050】

図5の装置の電極78および80の役割は、デバイスには存在しないシトクロムcおよび O_2 に代わりになるように、電子を供給したり減らしたりすることである。COX72に起因してプロトンが移動して電流が流れるためにプロトンの流束の測定が困難になることがあるので、リポソームBRと共に上述の実験で使用されたのと同様のpH検知蛍光指示計を用いた。COXと接触する電極の性能は、脂質膜にのみタンパク質を配置することによって評価された。上述のBRのプロトン移動をモニターする方法(ナウマンら(1999年))と同様の方法を用いることによって、取り付けられた電極から輸送される電子を用いてプロトンを移動させるといふCOXの性能を調べた。方向づけられた電場を用いた実験とそのような電場を用いていない実験との双方の実験によって、配向が満足のいくものであることが示された。電気的に誘発されたプロトン移動に主に起因して、ATPアーゼをCOXと共に脂質膜内に組み込むことが可能となる。COXを活性化させることによって、プロトン勾配が生じるので、ATPを生じるようにATPアーゼを用いることができる。このことは、ATPが電気的に合成されることを示しており、生物学にとって画期的なことであり、ATPを動力源にしたナノデバイスの更なる開発にとっては大きな意義を有している。

【0051】

膜スペースの一方の側を他方の側よりも酸性にして人工的なpH勾配を形成することによって、酵素の逆の作用が調べられる。プロトン輸送の測定によってCOXの配向が変化すると、プロトン流れが逆方向になるので、COXを流れる電流および電圧が測定されることになる。このような電子流れは、電極が図11に示すような構成になっている場合(即ち、上方電極が膜の上面に近接して配置されている場合)では、生じないことがある。

【0052】

電極をタンパク質により近づける方法が多く存在する。電極グリッドは、電気測定用に外部に接続される薄いワイヤーメッシュの形態で脂質の上部に直接的に配置してもよい。上面の上方の脂質を取り除いた後、アルミニウムまたはニッケルから成る薄い透明な層を膜に直接的に配置して対電極を形成してもよい。別法にて、図9に示す先端のアレイをラ

スタライズすることによって、電極を脂質表面に電気化学的に配置してもよい。このような配置では、膜の上面において何百万ものナノスケールのワイヤーが得られることになる。上述の工程を繰り返し、組み合わせることによって、脂質膜内に含まれるCOXおよびBRが方向付けられることになる。

【0053】

BRおよびCOXを配向させるには2つのシナリオが考えられる。1つは平行双極子配向であり、もう1つは非平行双極子配向である。双極子が平行である場合、単一の磁界を用いて、BRとCOXとの配向を同時に達成できる。双極子が平行でない場合、PMの双極子モーメントの大きい塊が用いられる。高い磁界でCOXをまず配向した後、COXの摂動を回避すべく十分に小さい磁界であるものの、PMフラグメントを操作するのには十分大きい磁界においてPMを配向することによって、適当な配向が達成されることになる。

10

【0054】

電圧測定によって、BRが適当に機能しており、プロトン勾配が形成されていることが示される必要がある。この勾配からもたらされる膜透過電圧は、数100mVであると考えられている。引き続いて電流を測定すると、本発明の概念の成功が示されることになり、膜の電極によって達成される僅かな機能性COXタンパク質が見積もられることになる。

【0055】

COXによってプロトンが逆に移送されるので、BRによって供されるプロトン濃度によって電流が左右され、電流が光量（または光度）に比例することになる。また、COX分子がリポソーム膜内で平行になるように配置されているので、全電流は機能性COX分子の数に比例することになる。上述したように、生じる電圧は一定であり、200mVよりも大きいものである。そのため、光量、および適当な方向に配向されたCOXの正味の数によって、生じる電力が減少することになる。

20

【0056】

電力を最大限にする方法は、COXの配向の最適化、ならびに膜層の適当な選択および変更に重点が置かれる。例えば、高い強度と低い強度とで連続的に照光することや、周期的に照光する等して種々の照光をデバイスに行うと電力が生じることになる。

【0057】

ポリマー膜が使用されることが望ましい。なぜなら、ポリマー膜は脂質膜よりも耐用期間が長いからである。また、ポリマー膜は丈夫であって、電子伝導性、イオン伝導性および透過性等の点で期待どおりの性質を有しているからである。そのような膜の内部は、疎水性かつ弾力性を有するので、天然のタンパク質環境にできるだけ近づくように模倣（シミュレート）することが可能である。

30

【0058】

幅広い種類の生体適合性ポリマーが存在しており、特に、光吸収性、極性、電気伝導性およびイオン伝導性等の幅広い性質を有している。本発明のソーラーセルの特性を高めるポリマーは、タンパク質および電極と適合性を有している必要がある。また、プロトンを通さない性質も重要である。ポリマーの表面をドーピングできるということは、プロトン伝導性および膜コンダクタンスの点で重要な役割を果たすことになるので重要となる。ポリマーの寿命とポリマー内に含まれるタンパク質の寿命とは関連性があり、選択する際のファクターとなる。短い寿命であるものの性能が高いポリマーの選択は、特別な用途で有用となり得る。

40

【0059】

生物学的要素から成る太陽光電源を効率的かつ生産的に形成する上述の方法では、エネルギー変換生体タンパク質と外部デバイスとが一体化することが示されており、種々のデバイスに電力を供給することができるバイオソーラーセルの大量生産が可能となる方向性が示されている。

【0060】

50

本発明の別の要旨において、タンパク質のアクアポリン・ファミリーをトリブロックコポリマー膜内に組み込んで使用することによって、水のみを通過させる安定なフィルムを製造することができる。そのようなフィルムは、水のみを通過させるので、透析によって、水精製、脱塩および分子レベルの濃縮が容易となる。バクテリア、ウィルス、ミネラル、タンパク質、DNA、塩、界面活性剤（または洗剤）、溶存ガス、および水溶液から生じるプロトンを含む全ての汚染物質は、アクアポリンを通過することができないが、アクアポリン分子は、その構造に起因して水を移送させることができる。図12に模式的に示すように、アクアポリン130はいずれも、膜内にタンパク質を繋ぎ止める6個の膜アルファヘリカル領域132~137、およびタンパク質の中心にて頂点同士が一体となった2つの高度に保存されたNPALープ138, 140から成っており、砂時計のような形状を有している。このような砂時計の狭くなっている箇所では、図13の142で示すように、水分子が一行となつて膜を実際に通過することができるようになっている。水の動きが対称的であり、いずれの方向にでも進行できることが示されている。この事実は、このプロセスがエネルギーを消費しないので重要である。水は、水圧または浸透圧に起因して特定の方向に膜を通過することになる。図14に示すように、硬い膜156（その膜の中心はアクアポリンが充填されている）で分けられたチャンバー152および154と2つのチャンバーを有するデバイス150が用いられることによって、水精製／脱塩を達成することができる。この膜自体は、水を通さない性質を有しており、チャンバー154内の精製した水160とチャンバー152内の汚染された水とを分けている。純粋な水だけが2つのチャンバー間を移動することができる。従つて、適当な圧力の下、膜の一方の側に海水または他の汚染された水158が配置されると、純粋な水が他方のチャンバー154内に自然に流れることになる。従つて、飲用に適さない源から精製した水が得られることになる。または、源水が重要な化学物質を含んでいる場合、水が選択的に取り除かれることによって、流入チャンバーで所望の化学物質が高い濃度で得られることになる。しかしながら、重要なことには、アクアポリンは、水に対して排他的な選択を有しているという理由以外の理由でも本発明に適している。このタンパク質ファミリー（例えばアクアポリンZ（AqpZ））から成る多くの膜は、非常に丈夫であり、機能が損なわれることなく、汚染された源水の厳しい条件に耐えることができる。アクアポリンZは、酸、電圧、界面活性剤および熱に曝されることに起因した変性または分解に対して耐性を有している。従つて、別の膜を塞いだり破壊したりするような物質で汚染された源水を精製するために本発明のデバイスを用いることができ、また、連続して高温となる領域に本発明のデバイスを用いることができる。

【0061】

アクアポリンZは変性しやすいものである。このようなタンパク質は、その最終的な形状および機能に影響を与える遺伝子の配列に基づいて宿主細菌で特に発現されるので、その遺伝子コードを容易に変更させてタンパク質の特性を変えることができる。それゆえ、タンパク質の元の機能とは異なるタンパク質を設計して所望の用途を果たすことができる。例えば、システインに対して図13に示す水チャンネル142の中心付近の特定のアミノ酸残基を単に変えることによって、得られるアクアポリンが溶液中で遊離水銀と結合することになるので、閉塞により水を輸送しなくなる。従つて、膜デバイスに使用される変異タンパク質は、毒性物質の濃度が高くなり過ぎた場合、単に透過性を有さなくなるので水サンプル中の水銀汚染の検知が可能となる。

【0062】

本発明の好ましい形態は、常套的なフィルターディスクの形態を有している。なぜなら、そのようにすると最も容易に機能性を評価できるからである。ディスク状にするために、合成トリブロック・コポリマーおよびタンパク質の厚さ5nmの単層が、ラングミュラープロジェクト法を用いて25mmの市販の限外濾過ディスクの表面に配置される。そして、ディスク上の単層を254nmの紫外線光に曝してポリマーを架橋させることによって、耐久性を増加させる。最後に、220nmの孔サイズのPVDF膜をエポキシ樹脂でディスク表面に接着させることによって、安全な操作がもたらされることになり、エッ

ジでのリークが防止されることになる。

【0063】

図14に示すように、加圧により源水が膜を通るようにチャンバー内にデバイスが取り付けられることによって検定が行われることになる。純水のみが膜の一方の側面から通り抜け、汚染溶質が元のチャンバーで濃縮するような場合にはデバイスが機能的であるとされる。純水の自然な傾向に打ち勝って、より多くの溶存粒子を有するチャンバー内に汚染された溶質を移動させるために、汚染された溶質を加圧しなければならない。アクアポリンZ膜は、逆浸透によって汚染溶質から純粋な水を分離する効果を有する。システムのこのような傾向または浸透圧は、ポンド／平方インチ (p s i) で表すことができる。例えば、海水の浸透圧は約360 p s iである。

10

【0064】

このような圧力に耐えることができるようにデバイスを用いる方法は幾つか存在する。種々のポリマーは、他のポリマーよりも固有的に耐久性があり、紫外線光で架橋させて、特別に硬くすることができる。別の方法は、無毒で容易に除去できる高濃度の溶質をフレッシュウォーター・チャンバーに加えて、膜に及ぶ通常の浸透を促進させつつ、チャンバーの加圧によって逆浸透をもたらしている。複数のアクアポリンZデバイスを、封止され接続された一連のチャンバー（汚染物の濃度は徐々に小さくなっている）に用いることによって、逆浸透に必要な圧力を減じることができる。対を成す各々のチャンバーにおいて水の精製に必要な圧力は、逆浸透に必要とされる全圧力の一部となる。それゆえ、各々の膜は小さい圧力にのみ耐えればよく、膜が損なわれる可能性がより低くなる。各々のチャンバー対の間の濃度差が100%でなく、僅か10%である場合、上述の高い圧力の10%が各々の連結部分で源水を精製するのに必要となる。最終的なチャンバーでは、一定の圧力および流れを有する純水が連続的に生じることになる。

20

【0065】

アクアポリン逆浸透膜では、単一の工程で種々の汚染物質を含む水を精製することができる。図15の170で示すような常套的な高純度なシステムでは、軟水装置172、カーボン・フィルター、イオン交換体、紫外線殺菌装置または化学殺菌装置174、および2つの通路を有する逆浸透フィルター・セット176（連結して使用して水（アクアポリンで精製された水ほどきれいではない水）を生成することができる）を含む幾つかの要素が必要とされる。このような精巧なセットアップでは、アクアポリン膜のように、源水から150ダルトンよりも少ない溶存ガスまたは物質を除去することができない。更に、全ての要素はメンテナンスを必要とする。紫外線バルブは取り替えを要し、エネルギーを必要とする。イオン交換体は、それが一杯になった場合に化学的に再生させる必要がある。軟水装置は塩を必要とする。カーボン・カートリッジおよび逆浸透カートリッジは、汚れると取り替えなければならない。単一工程のデバイスは、典型的な精製デバイスよりもスペースを要さず、軽量である。従って、本発明のアクアポリン水精製デバイスは持ち運びが可能である。

30

【0066】

また、アクアポリン膜は、従来のシステムよりも迅速に機能する。従来の高速逆浸透ユニットでは、1分間に約28.4リットル（7.5ガロン）のきれいな水を生成することができる。アクアポリンZで飽和した脂質膜（ 0.0177 mm^2 ）を水分子が $54\text{ }\mu\text{mol/s}$ の速度で通過することができることが現在の研究で明らかにされている（ポール・ピー（Pohl, P.）、サパロフ・エス・エム（Saparov, S. M.）、ボーグニア・エム・ジェイ（Borgnia, M. J.）およびアグレ・ピー（Agre, P.）、2001年、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proceedings of the National Academy of Sciences）第98巻、第9624頁～第9629頁）。従って、 1.0 m^2 の表面積を有する理論上のアクアポリンZ逆浸透膜は1分間に3295リットルの水を濾過することができる。この速度は、通常の精製器よりも116倍以上速いものである。

40

50

【0067】

新しいタンパク質ベースの膜は、高価な製造法を用いなくてもよい。プロセスの中心となるアクアポリンZは、人工的に作り出された大腸菌株からミリグラム単位の量で容易に得られる。平均して、純粋なタンパク質は、それを生じる培養菌（または培養株）1リットルにつき2.5mg得ることができる。約5ドルの培養基から10mgのタンパク質を生成することができる。それは、幾つかの実物大程度のデバイスにとっては十分な量のタンパク質である。また、各々のデバイスに対して、アクアポリンZが組み込まれるポリマーは、安価な化学品が生成される実験室と同じような実験室で形成することができる。アクアポリンZ逆浸透膜は、効率的に水を精製する新規で安価な手段である。

【0068】

10

従って、生物学的要素を利用して、汚れた水、塩を含んだ水または別法にて汚染された水から完全に純粋な水を効率よく得る方法および装置を開示した。本発明では、水輸送生物タンパク質と外部デバイスとの組合せが示されており、水精製デバイスの大量生産を可能にする方向性が示されている。

【0069】

好ましい態様に関して本発明を説明してきたものの、特許請求の範囲に記載されたような本発明の概念および範囲から逸脱することなく、本明細書で開示された方法およびデバイスを種々に変更できることを理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0070】

20

【図1】図1は、バクテリオロドプシンの主鎖のリボン構造を簡単に示した模式図であり、中央の内部チャンネルを介してプロトンが膜を横断するように移送される。

【図2】図2は、ハロバクテリウム属サリナリウムにおいて、緑色光の光子が吸収されると、BRがプロトンをバクテリアから排出して、電気化学的勾配が形成されるプロセスを示しており、ATPシンターゼがプロトンを細胞内に戻し、その電気化学エネルギーを使用してADPからATPを形成することによって、最終的には光エネルギーから化学エネルギーへとエネルギー変換が行われている。

【図3A】図3Aは、膜の図であって、COXの主鎖のリボン構造を示している。

【図3B】図3Bは、細胞質の図であって、プロトン輸送チャンネルとしての特性を有する「孔」と見なされる3つの領域が星印で示されている。

30

【図4A】図4Aは、平面的な固体で支持された脂質二重層内にリボソームが取り込まれる態様を示している。

【図4B】図4Bは、小胞がCOXと共に平面的な膜に取り込まれて合わさる態様を示している。

【図5】図5は、本発明のバイオソーラーセルを模式的に示したものである。

【図6】図6は、精製されたバクテリオロドプシンのクロマトグラムである。

【図7】図7は、バクテリオロドプシンを含むリボソーム(σ)およびバクテリオロドプシンを含まないリボソーム($\square$)によって30分後に形成されたpH勾配をグラフで示している。

【図8】図8は、種々の量のバクテリオロドプシンおよび F_0F_1 -ATPアーゼを含んだリボソームによって生じるATPに起因したルシフェリン発光を示している。

40

【図9】図9は、シリコンチップ(10nm未満のチップ、1 μ m未満のシャフトを有する)のアレイのSEM写真である。

【図10】図10は、COXの過剰発現および精製のプロセスを模式的に示している。

【図11】図11は、COXに起因したプロトンおよび電子の輸送を測定および制御する装置の一部断面を模式的に示している。

【図12】図12は、アクアポリン・タンパク質の概略図である。

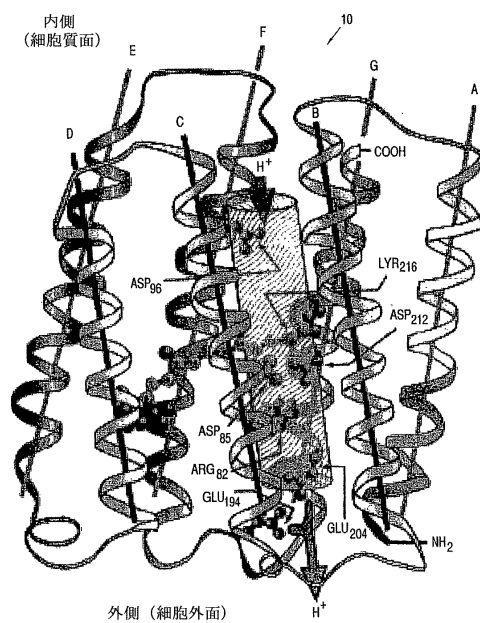
【図13】図13は、図12のタンパク質の一部の拡大図である。

【図14】図14は、アクアポリンが組み込まれた膜が用いられた水精製セルを示している。

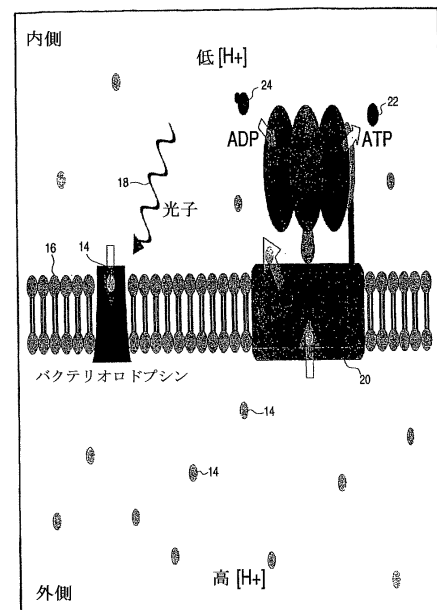
50

【図 1 5】 図 1 5 は、従来の水精製システムの概略図である。

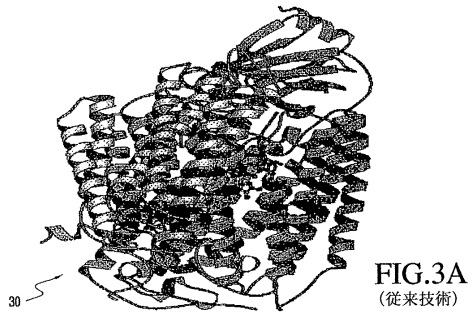
【図 1】



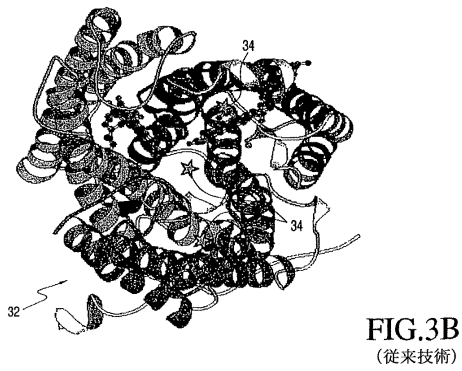
【図 2】



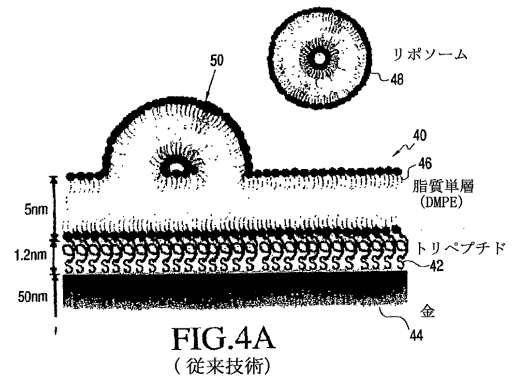
【図 3 A】



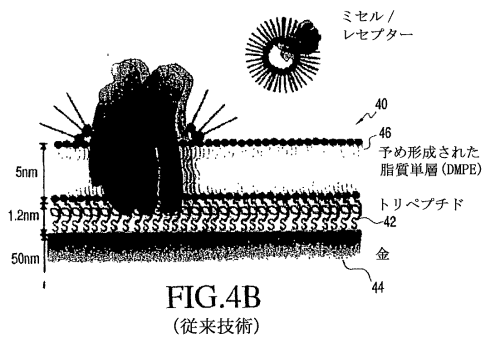
【図 3 B】



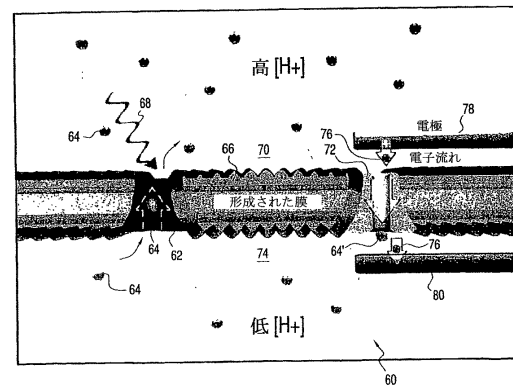
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 5】



【図 6】

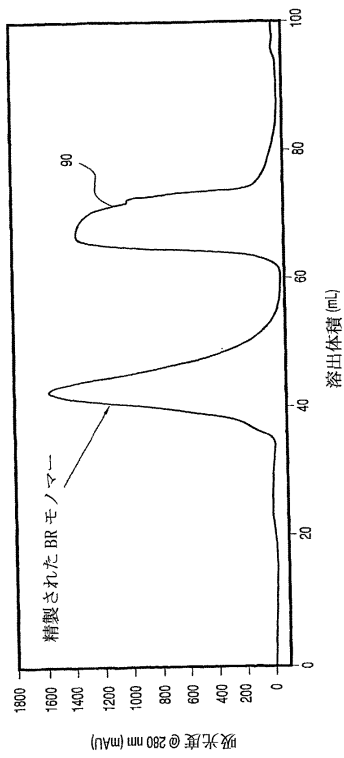


FIG.6
(従来技術)

【図 7】

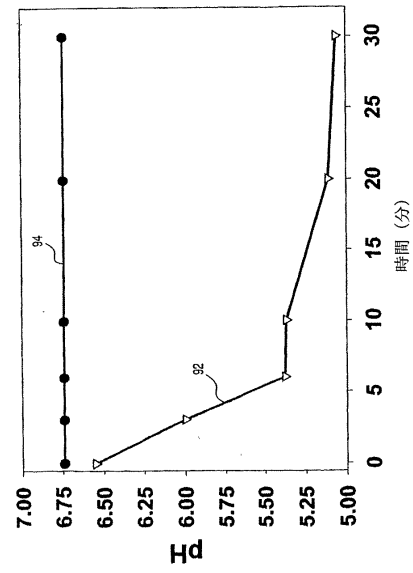


FIG.7
(従来技術)

【図 8】

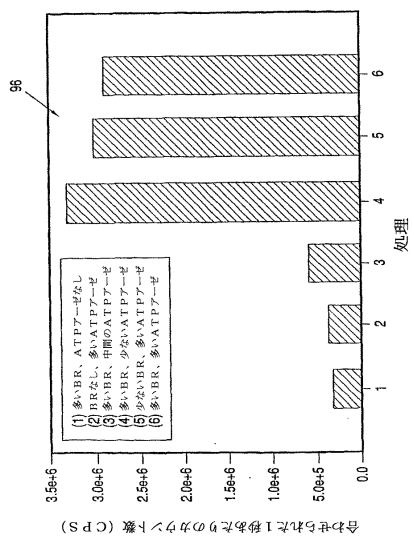


FIG.8
(従来技術)

【図 9】

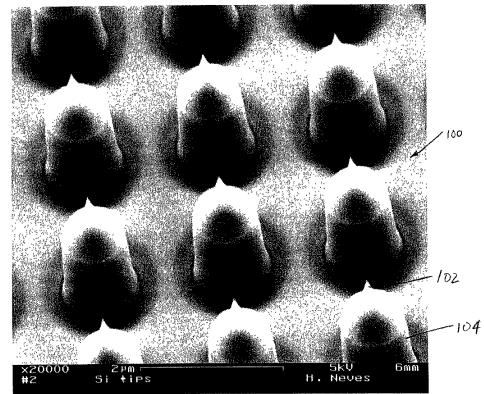


FIG.9
(従来技術)

【図 10】

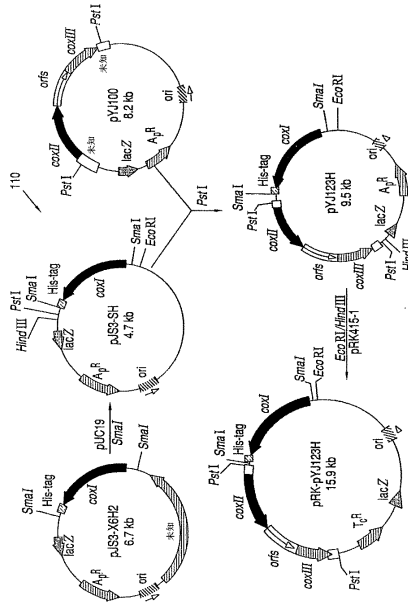


FIG.10
(従来技術)

【図 1 1】

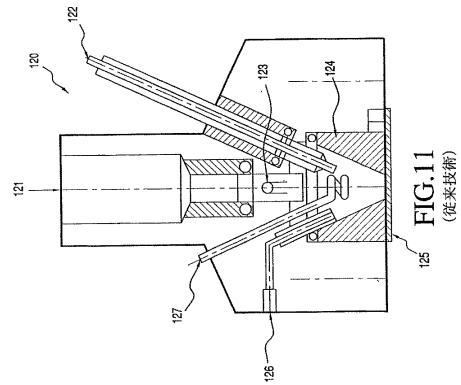


FIG.11
(従来技術)

【図 1 2】

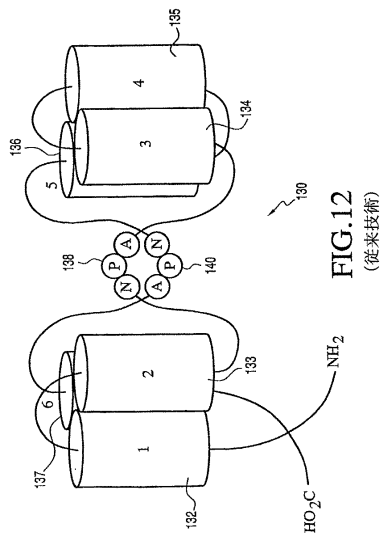


FIG.12
(従来技術)

【图 1 3】

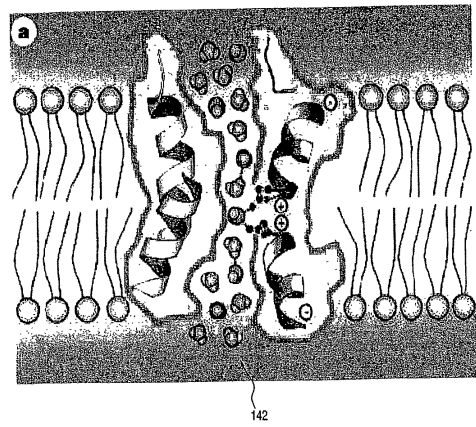


FIG.13
(従来技術)

【図 1 4】

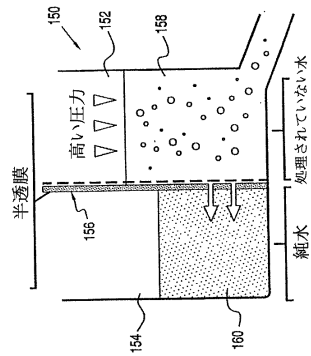
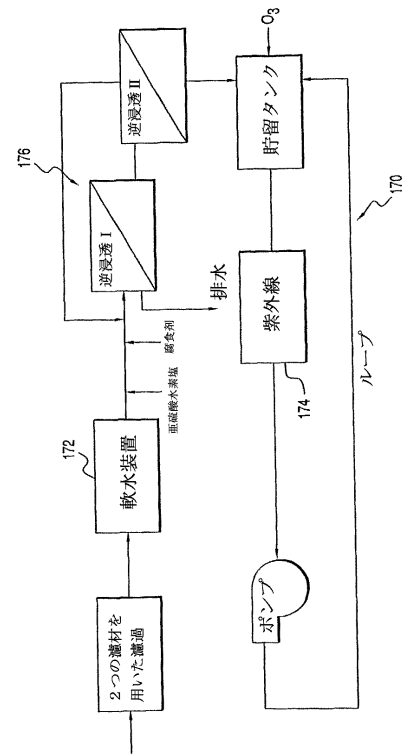


FIG.14

【図 1 5】

FIG.15
(従来技術)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 2 F</i>	<i>1/44</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 2 F</i> <i>1/44</i> <i>H</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>27/416</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>27/46</i> <i>U</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>27/327</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>27/30</i> <i>3 5 3 Z</i>
<i>C 0 8 L</i>	<i>89/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>27/30</i> <i>3 5 5</i>
<i>C 0 8 L</i>	<i>53/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 8 L</i> <i>89/00</i>
			<i>C 0 8 L</i> <i>53/00</i>

(72)発明者 カルロ・ディ・モンテマーニョ
アメリカ合衆国 9 0 0 7 7 カリフォルニア州ロサンジェルス、ムホランド・ドライブ 1 5 2 4 5 番

(72)発明者 ジェイコブ・ジェイ・シュミット
アメリカ合衆国 9 1 4 0 3 カリフォルニア州シャーマン・オークス、サットン・ストリート 1 4 8
1 9 番

(72)発明者 スティーブン・ピー・トッツィ
アメリカ合衆国 0 7 6 6 1 ニュージャージー州リバー・エッジ、リー・アベニュー 3 6 4 番

審査官 目代 博茂

(56)参考文献 特開平 0 2 - 2 4 7 2 3 3 (J P, A)
特開平 0 1 - 2 4 5 8 1 0 (J P, A)
特表 2 0 0 2 - 5 2 7 8 7 4 (J P, A)
特開平 1 0 - 2 7 1 9 9 6 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
B01D61/00-71/82
C02F1/44
C12M1/00-3/10