

紅色光合成細菌由来の光合成蛋白質を用いた光電応答素子

スタンレー電気(株) 筑波研究所
杉野 弘明

1. はじめに

今回紹介する研究は現在進行形のものではなく、一昔前(1990前後の数年間)に、スタンレー電気(株)筑波研究所と工業技術院(現、産業技術総合研究所)の微生物工業技術研究所および電子技術総合研究所で行った共同研究の成果である。

現在のオプトエレクトロニクスは、無機半導体をベースとして成立している。しかし、電子写真プロセスの感光体ドラム・CD-R/RWに代表される記録メディア・有機ELデバイス等には種々の有機材料が使われるようになった。無機素材に比べ軽く、より安価で多様性に富む有機素材への置換は、ひとつのトレンドである。また、このトレンドの背景には、シリコン等の微細加工技術の限界が予想される中、分子そのものをデバイスとして利用する分子エレクトロニクスや分子ホトニクスへの期待が込められている。分子単位での機能発現の典型である“生体分子”の応用や模倣に関する基礎研究も地味ながら着実に進行している。本稿では、紅色光合成細菌由来の光合成蛋白質を用いた光電応答素子に関する研究を紹介する。

2. 紅色光合成細菌と光合成蛋白質複合体

藻類や高等植物は二系統の光化学系を持ち、それらの連鎖で水を水素供与体として利用し二酸化炭素を固定するとともに酸素を放出する(図1)。他方、我々の実験材料である紅色光合成細菌は単一の光化学系をつかった酸素非発生の光合成を営む。紅色光合成細菌は湖沼等の嫌気層に分布し、地上の植物や表層(好気層)の藻類のために可視光がほとんど届かない環境

に棲息しており、より低エネルギーの近赤外光を利用するように適応している(図1)。近赤外

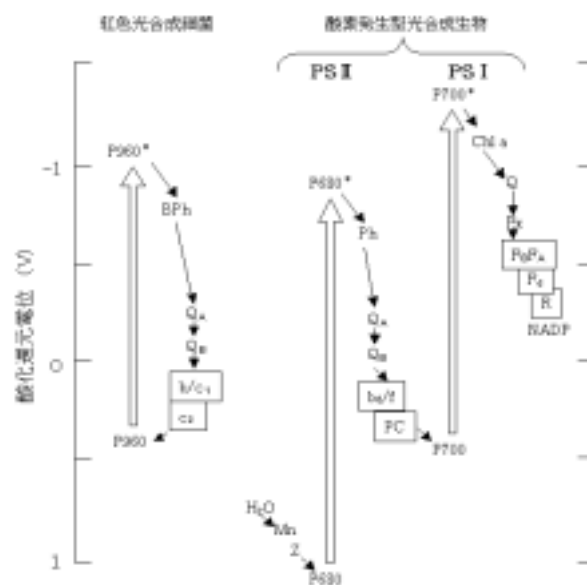


図1. 紅色光合成細菌と高等植物の光合成電子伝達系の比較

光のエネルギーでは、水を分解利用することはできず、各種の有機物を炭素源および水素供与体として利用する光合成従属の生育をする^{1,2)}。

紅色光合成細菌にはラメラ状あるいは小胞状の光合成膜器官が存在する(図2)。菌体を超音



図2. 紅色光合成細菌の形態事例²⁾

波などで破碎し分画遠心分離で得られる光合成膜断片は、クロマトフォア(以下、Chr と略す)と呼ばれる。光合成膜には、光合成蛋白質複合

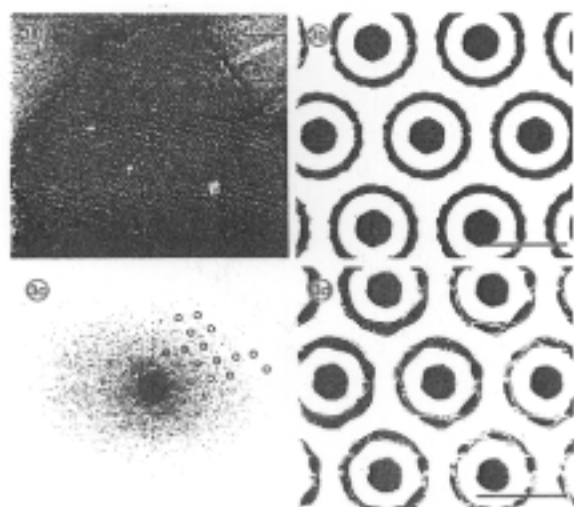


図3. クロマトフォアの電子顕微鏡像(a)/
フーリエ変換像(c)/再構成像(b・d)³⁾

体が密に存在し、準結晶的な規則正しいパッキングを示すものもある(図3)³⁾。クロマトフォアを適当な界面活性剤で処理すると、反応中心蛋白質(以下、RC と略す)あるいは光反応ユニット(反応中心蛋白質と光捕獲蛋白質との複合体; 以下、PRU と略す)を容易に可溶化・精製することができる。

光合成反応の初期過程は、RC が担っている。第一ステップは光量子の吸収に伴う電荷分離反応であり、第二ステップは分離した電荷を空間的に引き離すことで再結合の確率を下げ安定化させる電子移動反応である。光捕獲蛋白質は、反応中心蛋白質を囲む形で配置されアンテナ的な役割を果たし、吸収した光エネルギーを効率良く RC に伝達する。電荷分離反応/電荷移動反応だけに着目するとシリコン太陽電池の動作原理と酷似しており、これこそが光合成蛋白質複合体を光電変換素子に利用しようとした我々の研究の所以となっている。

代表的な紅色光合成細菌であるロドシュードモナス・ビリディス(*Rps. viridis*; ATCC 19567)

の RC は、Max-Planck 研究所の J. Deisenhoffer らによって結晶構造解析がなされていた^{4,5)}。膜蛋白質高分解能解析の最初の事例である。この RC は、H・M・L・Cyt の四つのサブユニットから構成され、バクテリオクロフィル(Bchl)・バクテリオフェオフィチン(Bph)・キノン(Q_A・Q_B)といった光合成色素を厳密な空間配置で保持している(図4)。RC 中のバク

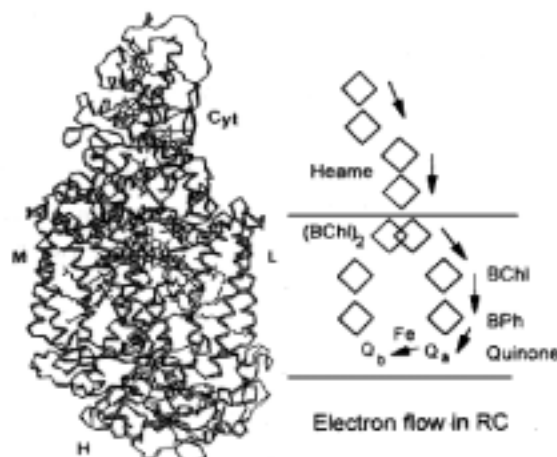


図4. 反応中心蛋白質の構造と光合成色素の空間配置

テリオクロフィル二量体;(Bchl)₂ の光エネルギー励起で生じた電子は、色素のエネルギー順位と空間配置にしたがって ps ~ ns の時定数で順次移動する。菌種が異なると、Cyt (チトクローム) の結合がゆるく RC として H・M・L の三つのサブユニットから構成されるものが単離される場合もあるが、光合成色素は同様の空間配置で固定化されている。以下の事例では、*Rps. viridis* 由来の光合成蛋白質を使用した。

3. Chr 乾燥固化膜を用いた光電応答素子

紅色光合成細菌の光化学系は、その機能および構成から高等植物の光化学系に類似している。高等植物の光化学系は、補欠因子が脱落しやすく非常に不安定で単離後冷却保存しても比較的短期間で失活する。幸いなことに、紅色光合成細菌由来の光合成蛋白質複合体は、植物由来のものと比較すると著しく安定であり、真空乾燥下でもその機能を保持できる。また、熱的

にもかなり安定である⁶⁾。常温生育株でさえこのような安定性を示すことから、高熱株の光合成蛋白質は極めて高い安定性を示すものと思われる。

Chr は、生体の光合成器官そのものであり、光合成蛋白質複合体以外に、共役する酸化還元酵素群や脂溶性補欠因子を含む。最も単純なプロトタイプの光電応答素子として、まず、Chr を ITO (Indium - tin oxide) 透明導電膜付きガラスに塗布乾燥させたものに、真空蒸着で対向金電極を形成したものを作製した(図5)。この

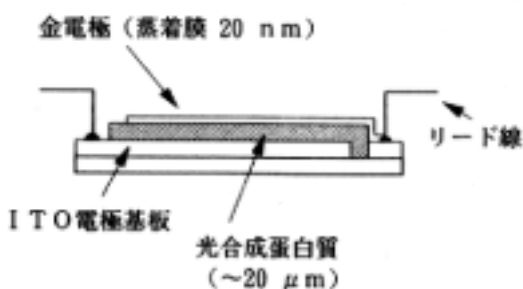


図5. サンドイッチ型素子の模式図

素子を、図6に示したような測定系にセットし近赤外光をパルス照射したところ、過渡的な光誘起開放電圧および光誘起短絡電流が観測され

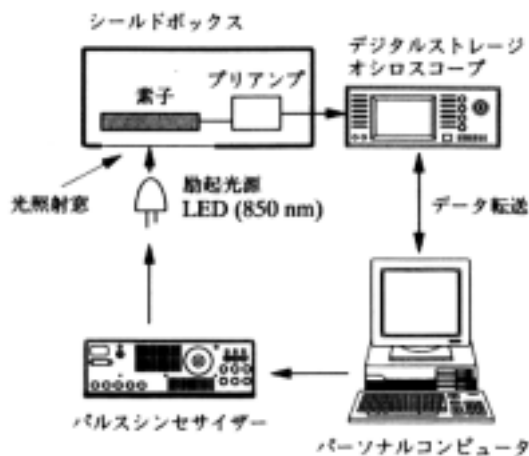


図6. 光電応答測定系の模式図

た(照射時間を延長すると微小ながら定常的応答も観察された)⁷⁾。また、ストロボ光を光学干渉フィルターで単色化し、光電応答出力の波長

依存性を調べたアクションスペクトルは、Chr の吸収スペクトルとよく一致し、これらの光電応答が光合成色素の吸収に基づくことが示唆された。この素子に関する特許(特開平 1-110224号)は、当時の科学技術庁の第49回注目発明に選定されている。この他の初期の取り組みに関しては、別途文献を参照されたい⁸⁻¹⁰⁾。

4. 光合成蛋白質複合体電着固化膜を用いた光電応答素子

生菌では、光合成蛋白質が電子の流れを一方方向に揃えるべく規則正しく光合成膜に埋め込まれており、内部効率がほぼ100%の光電変換機能を実現されている。他方、前節のプロトタイプ素子では配向制御に関する何らの工夫もされていない。したがって、ランダムな電子移動のベクトル和の結果として、一過的で小さな応答しか得られなかったものと考えられる。

配向制御の一環として、電着固定化を検討した事例を紹介する^{11,12)}。

4-1. 試料の調製

紅色光合成細菌 *Rps. viridis* の Chr あるいは PRU を光活性層とした。PRU は、高イオン強度下で Triton X-100 を用いて可溶化し、ゲルろ過法により精製した。この場合、大腸菌由来の天然脂質を用いて透析法でプロテオリポソームに再構成し¹³⁻¹⁵⁾、Chr と同様に扱えるようにした。リポソームは、人工的に調製した脂質二重層からなる小胞で、界面活性剤を含まない水系分散液として安定に取り扱うことができる。

再構成 PRU リポソームでの、PRU の配向極性は、RC の Cyt サブユニットの酸化還元差スペクトルを測定することで評価した。その結果、閉鎖単一膜小胞であると仮定した場合、約70%の PRU が Cyt サブユニットを外側に向けて脂質二重層に埋め込まれていると見積もられた。蛇足ながら、PRU は、ポリエチレングリコール 6000 を用いて蒸気拡散法で結晶化できる精製度のものを使用した。PRU をプロテオリポソ-

ムとして再構成することで、Chr の完全配向にはおよばないものの、ある程度の配向性を取り戻すことができ、他の因子を含まないシンプルなモデル系が構築できた。

4-2.電着法による光電応答素子

Chr あるいは PRU リポソーム分散液を、ITO ガラス電極と金対向電極（電極間隔、0.5 mm）との間に注入し、4.3 V のパルス電圧(1/2duty, 10 Hz)を20秒間印加して電着固定化を行った（図7）。Chr および PRU リポソームは、中性域で全体として負に帯電しており、この場合、

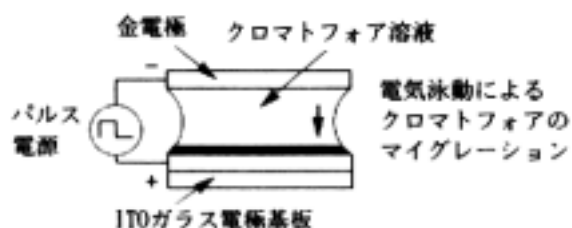


図7. 電着固定化の模式図

正にバイアスされたITO ガラス基板の上に電気泳動され堆積する。堆積した膜（面積、約 8×15 mm）は暗所で乾燥し、その後、真空蒸着で金対向電極（膜厚、約 20 nm）を形成することで図5と類似のサンドイッチ構造の素子を作製した。乾燥後の、光電変換層（光合成蛋白質層）の厚みは、約20ミクロンであった。ITO ガラス基板の上に固定化された膜内での光合成蛋白質の固定角は、偏光吸収異方性の測定

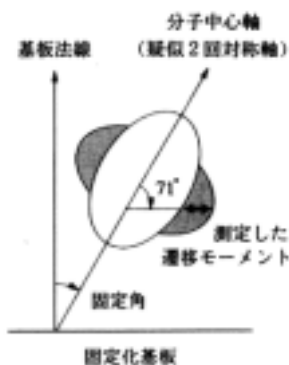


図8. 固定角の定義

から見積もった¹⁶⁻¹⁹。測定は、光捕獲蛋白質に保持される Bchl の Q_y 遷移モーメントの吸収（図8に定義）を指標として実施した。光電荷分離反応により発生した電子は、光合成蛋白質複合体の分子中心軸に沿って流れるため、電極基板に垂直に固定化することが好ましい。また、光合成色素の主な吸収遷移モーメントは、中心軸と直交しているため、光エネルギーの効率的な吸収を満たす観点でも光合成蛋白質の垂直固定化は都合が良い。

測定の結果、Chr の場合は、固定角の平均値として約 17° という値が得られた。他方、PRU リポソームでは、約 5° という結果が得られ、より垂直に近い固定化が達成されている。PRU リポソームでは脂質含量が高く（脂質成分の影響も含めて）より柔らかな膜であるため、堆積される際の変形の自由度が高いことによるものと考えられる。

4-3.光電応答

作製した光電応答素子は、銀ペーストでリード線を取り付け、前述の測定系（図6）にセットした。通常、封止などは一切行わず測定を実施した。この状態でも、室温で外光を遮断しデシケータ内に保存すれば、少なくとも数ヶ月は作製時と同程度の応答を示す。

Chr 電着膜を、光活性層に用いた素子の光電応答例を図9（a, 光誘起開放電圧；b, 光誘起短絡電流）に示す。電圧応答は、励起光照射とともに立ち上がり始め、この測定での照射時間（3秒間）では定常値に至らない。照射を延長すると、100 mV 以上の光誘起電圧が観測される。照射終了後、光誘起電圧は緩やかに減衰する挙動を示す。電流応答は、より速やかに立ち上がり、初期に一過性の電流成分が観察される。ピーク値は、 90 nA/cm^2 程度の値であるものの、素子ごとにバラツキがある。光電変換層の抵抗が低いと、より大きなピーク値を示す。この一過性の電流応答に続く光照射時の光電流は徐々に

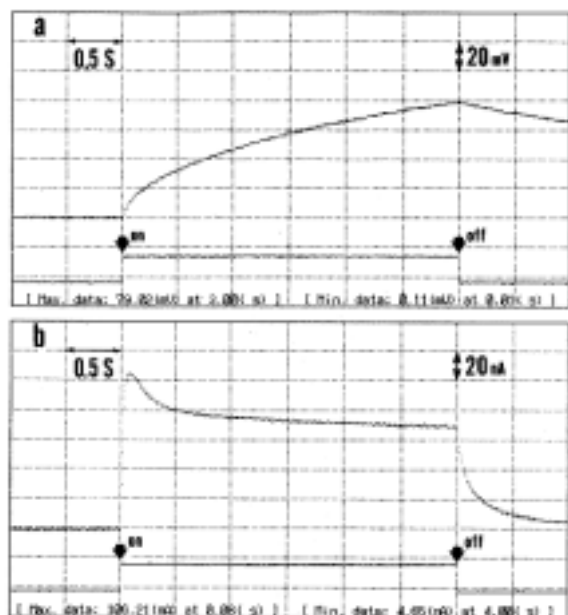


図9 . Chr 電着素子の光電応答

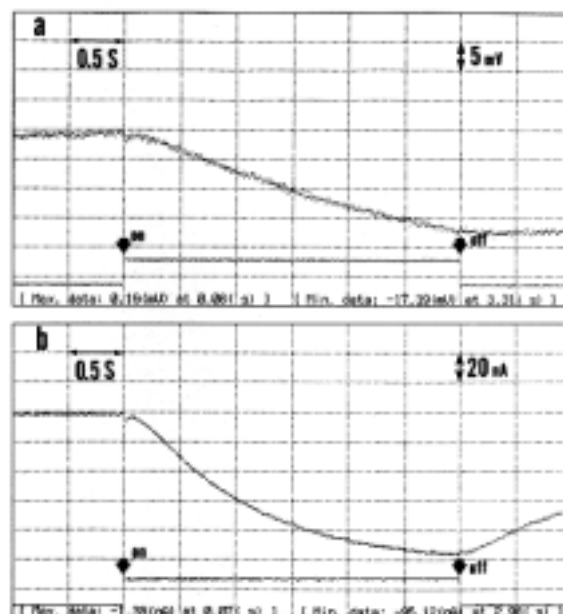


図10 . PRU リポソーム電着素子の光電応答

に減少した。照射終了後は、電圧応答に比べてより速やかにベースレベルに復帰する特性を示した。また、電流の極性から、この素子では、Chr 層で発生した電子はITO電極に流れている。

Chr 電着固定化素子の光電応答特性は、過渡的成分が大部分であった乾燥固化膜素子の特性とは大きく異なり、より大きな出力を示すことから配向制御の効果によるものと考えられる。

PRU リポソーム電着膜を、光活性層に用いた素子の光電応答例を図10(a, 光誘起開放電圧; b, 光誘起短絡電流)に示す。光電圧および光電流の極性は、Chr 素子とは逆で、活性層で生じた電子は金電極側に流れている。このことは、PRU リポソームでの光合成蛋白質の主たる配向が Chr とは逆配向を示すことで説明できる。光電圧特性は、極性は逆であるものの、Chr を用いた素子と同様の特性を示した。光照射を延長した際の定常光誘起電圧は、30 mV 程度である。先に述べたように、PRU リポソームでは、脂質二重層に PRU が正反対の極性で 70:30 の比率で埋め込まれていることを考慮すると、差分の40%が実際の応答に寄与していることとな

り、Chr 素子と比較しても妥当な出力だと思われる。また、光電流応答は、Chr 素子のもとは大きく異なり光電圧応答と類似のパターンを示した。PRU リポソームでは脂質含量が高く素子抵抗も大きいことから、このようなレスポンスが得られたものと解釈される。但し、後述のRC-LB膜で反応中心蛋白質の配向を逆転させた素子の電流応答もそれぞれ類似したパターンを示すことから、素子抵抗の大小よりは光合成蛋白質から電子が流れ込む電極の差異に起因する可能性も残されている。

更に、これらの素子でも、アクションスペクトルが光電変換層の吸収スペクトルと一致することや、電子伝達阻害剤を添加した対照実験では出力が低下することを確認した。

5 . LB法を用いた光電応答素子^{11,20-23)}

5-1.LB(Langmuir-Blodgett)法とは

LB法は、気水界面に両親媒性の物質を展開し、吸着した単分子膜をバリアと呼ばれる仕切板で機械的に圧縮し凝縮膜としたものを、基板上に一層ずつ積み上げる超薄膜形成技術である。その特徴としては、常温・常圧下での薄膜形

成技術、膜厚の単分子膜の厚みレベルでの制御が可能、成膜分子の変性や分解が少ない、

成膜分子の自己組織化能を発揮させやすい等々が挙げられる。LB膜では、上記の特徴から、膜中の機能性分子が一定の配向をとるという秩序性が期待される。また、生体膜のモデルとして研究されることも多い手法である。

5-2. 試料の調製・実験方法

展開試料には、*Rps. viridis* の反応中心蛋白質 (RC) を用いた。Chr を、Lauryl dimethyl amine oxide (LDAO) で可溶化し、ゲルろ過法で精製して RC 画分を得た。RC 溶液中の LDAO 濃度は 0.1% である。RC を展開するサブフェーズ (水相) の組成は、2 mM BaCl₂, 2 mM PIPES/NaOH あるいは 2 mM MOPS/NaOH (pH=7.2~7.6) とした。累積作業中に、RC 分子が光酸化するのを防ぐ意味で、アスコルビン酸などの還元剤を添加したケースもある。水温は、15~20 に制御した。サブフェーズへの展開は、1 mm 程度のガラス棒を伝わせて RC 溶液を静かに垂らしていくことで行った (ガラスロッド法)。通常、垂直浸漬法によって積層を行い、基板上下時の速度を制御して Z 型 (親水化基板を用いて基板引き上げ時のみ凝縮膜を堆積するタイプ) の LB 膜を得る。累積層数は、20~50 層とし、基板には ITO ガラスを用いた。ITO ガラス基板は、目的に応じて、予め親水化処理ないしは疎水化処理を施している。展開分子の表面圧は、電子天秤から吊り下げたろ紙をウィルヘルミープレートとして使用し算定した。

5-3. 表面圧-面積曲線 (π-A 曲線) の測定

LB 法は、比較的穏和な成膜技術であるが、対象が蛋白質のような巨大分子である場合は水の表面張力による変性に対する注意が必要である。高級脂肪酸などの典型的な両親媒性物質とは異なり、一般的に蛋白質を気水界面に展開すると蛋白質の高次構造が壊され、構造変化 (表

面変性) が起こるものと考えられる。特に、可溶性蛋白質の場合には、界面活性剤の希釈に伴い大きな表面張力の変化が生じるものと予想される。従って、RC の表面変性を抑制して高密度の単分子膜を形成することが重要な技術課題となった。

表面圧-面積曲線の測定から単分子膜の圧縮のされ方を調べたところ、RC の充填密度は初期展開密度に著しく依存することが判明した (図 11)。展開密度が低い場合 (初期分子占有面積が大きい場合)、表面圧-面積曲線は緩やか

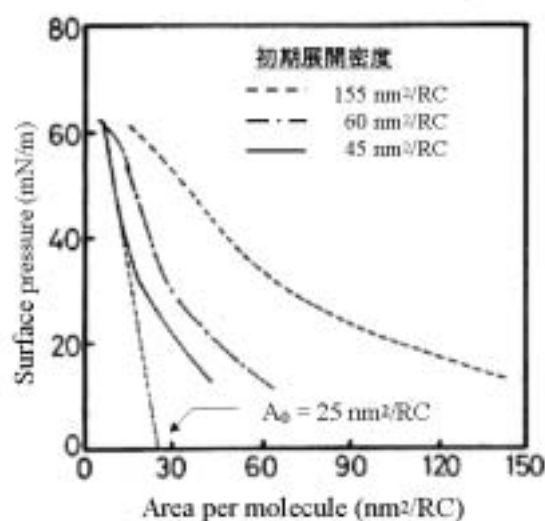


図 11. π-A 曲線の初期展開密度依存性

な曲線となり、圧縮後も高密度には充填されない (図 11、破線)。展開密度を高めていくと、表面圧-面積曲線はより急峻となり、直線的な部分を横軸に補外することで見積もられる極限分子占有面積が小さくなった。即ち、より高密度に充填された RC 単分子膜が得られる。展開密度が低い場合は水の表面張力で RC の高次構造が破壊されて広がり、その後圧縮しても疎にしか充填しない。展開密度を高めると表面変性は抑制され、RC 本来の構造が保持された高密度充填膜が得られるものと解釈した。実際、実線で示した例では、表面圧が 30 mN/m を超えたところから鋭く直線的に立ち上がり、安定した

凝縮膜を形成している。この場合の極限分子占有面積は、 $25 \text{ nm}^2/\text{RC}$ と見積もられ結晶解析モデルの分子断面積とほぼ一致する。

5-4.可視・近赤外吸収スペクトルによる評価

前節に、水面上に安定な RC 凝縮膜を形成できることを示した。次なるステップは、この凝縮膜を基板に移しとる累積膜形成時の条件だしである。

溶液状態で、RC は近赤外域に2つの特徴的な吸収を示す(図 12-b)。(Bchl)₂ に由来する 960 nm にピークを持つ吸収帯と、Bchl モノマーに由来する 830 nm にピークを持つ吸収帯である。変性した RC では、これらの吸収ピーク

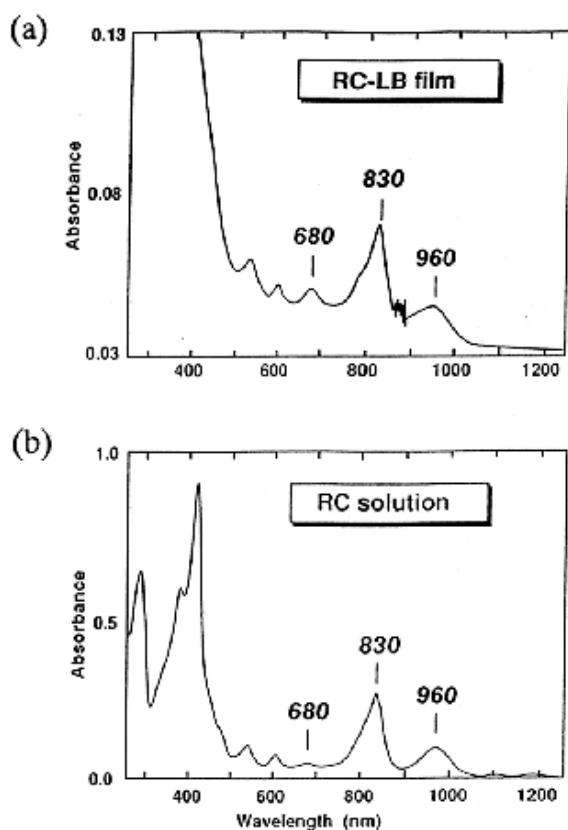


図 12 . RC-LB 膜と溶液の吸収スペクトル

が消失し、新たに波長 680 nm にバクテリオクロフィル水和物の吸収が出現する。これらの吸収を、活性および変性の指標として累積条件(最適表面圧)の検討を行った。図 12-a に、最適条件(高表面圧)で積層した RC-LB 膜の吸

収スペクトルを示す。多層膜の散乱が寄与して短波長側でベースが持ち上がってはいるものの、活性を示す 960 nm と 830 nm の吸収は溶液のものに比べて遜色なく、変性の指標である 680 nm の吸収もほとんど増加していないことが分かる。また、LB 膜の累積状況は安定しており、多層膜積層時の累積比は、ほぼ一定の値を示した。

5-5.RC-LB 膜の光電応答

一般的に、LB 膜のような超薄膜の電気測定は難しい。蒸着等の手法で対向電極を作製すると、膜内ピンホールが存在や蒸着分子の衝撃により短絡する状況にしばしば遭遇する。そこで、RC-LB 膜の電气的評価の多くは誘電的評価技術である変位電流法で行った^{24,25}。その詳細に関しては、別途参考文献を参照されたい^{20,26}。ここでは、これまでと同様に蒸着法で上部金対向電極を形成したサンドイッチ型素子の光電応答を紹介する。

電極蒸着による短絡を防ぐため、44 層の積層(膜厚、約 500 nm)を施した素子の光電応答を図 13(a, 光誘起短絡電流; b, 光誘起開放電圧)

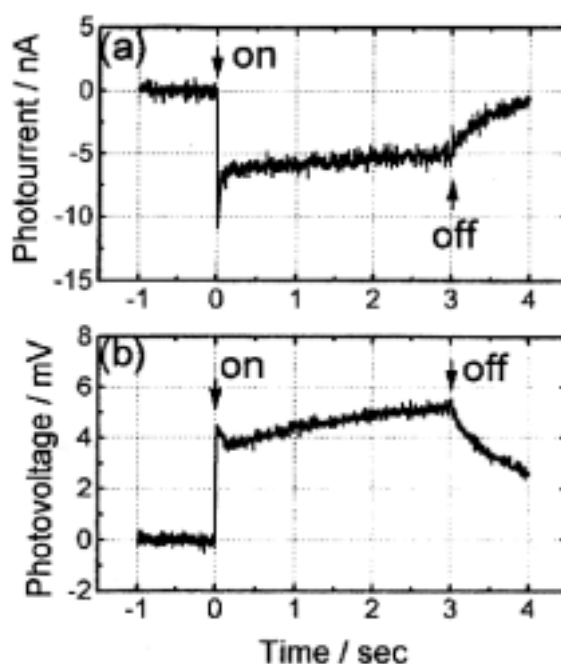


図 13 . RC-LB(44 層)膜の光電応答

に示す。この素子の有効電極面積は、約 1 cm^2 である。RC の光電荷分離 / 電子伝達反応を反映した、光照射直後の光誘起電流の鋭い立ち上がり、それに引き続く定常的な光電流が認められた (図 13-a)。それまでの報告では類似の RC-LB 膜素子で過渡的な光電流応答のみが観測されており²⁷⁾、定常的な光電流が観測された初めての事例となった。但し、電流値はピークで 10 nA/cm^2 ・定常値で 5 nA/cm^2 と期待に反して小さく、更なる膜質の改善が必要であると思われた。光電圧応答 (図 13-b) も電流応答と同様の立ち上がりを示し、光照射中約 5 mV の電圧を発生した。図 14 には、同様の素子で測定したアクションスペクトルを示した。

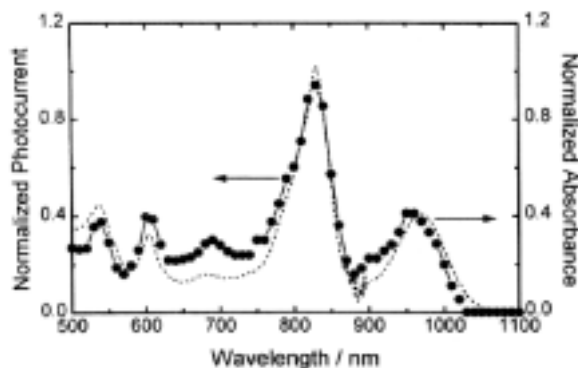


図 14 . RC-LB 膜光電応答のアクションスペクトルと吸収スペクトルとの比較

5-6.LB 法による配向制御

定法として用いている親水性基板と垂直浸漬法による Z 型 LB 膜とは逆の極性を有する RC-LB 膜を作製する目的で、以下の試みを行った。まず、ITO ガラス基板を、シランカップリング剤で処理し疎水化した。この疎水化基板と水平付着法 (“墨流し”のように水面上の凝縮膜を基板に写し取る技法)との組み合わせで、RC の疎水性がより強い表面が ITO 側に向いた積層膜を累積した。それぞれの手法で作製した素子の光電流応答を比較した結果が図 15 である。予想どおり、同一の素子構成であるにも拘わらず、2 つの素子で電流応答の極性が逆転し

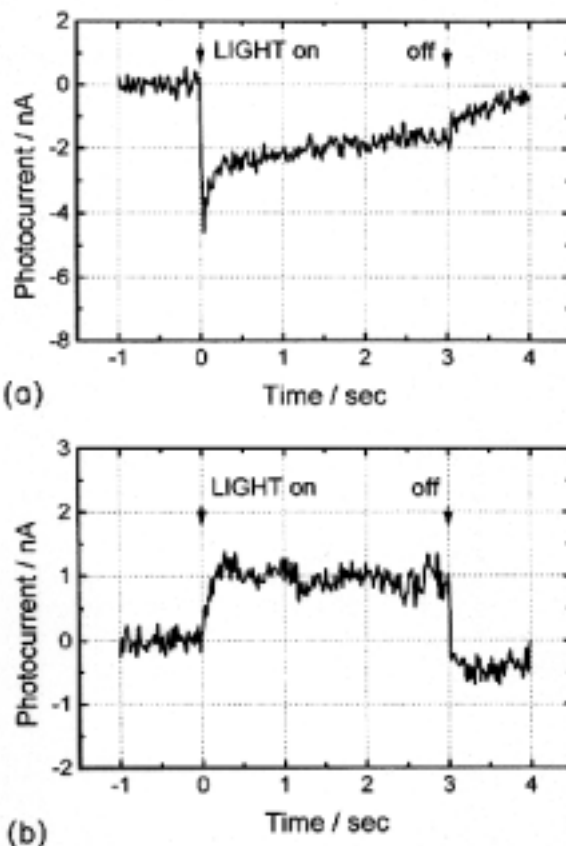


図 15 . 異なる累積様式の RC-LB 膜光電応答の比較

(a), Z 型積層膜 ; (b), X 型積層膜

た。RC の H および Cyt サブユニットのそれぞれと特異的に結合する抗体を利用して、2 種の RC-LB 膜の優先配向を調べた結果でも極性が逆転していた²²⁾。

以上の結果から、基板の表面状態を変えることで、RC の配向方向を制御できることが明示できた。

6 . むすび

これまで紹介してきたように、紅色光合成細菌由来の光合成蛋白質を用いたサンドイッチ型光電応答素子は、分子配向を制御することで特性が改善される。このほかに、半湿式素子等の検討も行った²⁸⁾。我々が例示した配向制御の水準はまだまだ低く、生体膜そのものであるクロマトフォア電着素子の特性すら再現できなかったのが実情である。

当時の時代背景は、今で言う “バブル経済”

の最中であり、遺伝子解析を中核とする第一次バイオームにのり多くの研究機関・企業で種々のバイオ研究が繰り広げられていた。プロテインエンジニアリングも萌芽期にあったが、その後のバブル崩壊に伴う景気低迷によって、我々のケースも含め多くの研究が衰退したことは残念でならない。10年近い月日が流れ、ヒトゲノムの解析も終わり、世はまさに蛋白質の世紀に突入した。この間に、有機EL素子の開発などから有機物-電極間の電子授受の高効率化に関する知見も蓄積されているし、マイクロマニピュレーション・微細加工技術およびマイクロドメインの解析技術も飛躍的に進歩している。今なら、我々が例示した研究に新しい切り口で取り組むことも可能であろう。本報告がそのための一助となれば幸いである。

本報告で紹介した研究の実施者は、小生のほか、安食秀一・安田喜昭・豊玉英樹(以上、スタンレー電気)・原正之・三宅淳(以上、微生物工業技術研究所/当時)および眞島利和(電子技術総合研究所/当時)の各氏である。尚、本研究の一部は、当時の通商産業省工業技術院次世代産業基盤技術研究開発制度の支援で実施された。

【参考文献】

- 1)北村 博,森田茂廣,山下仁平編 “光合成細菌” 学会出版センター(1984)
- 2)堀尾武一,山下仁平編 “蛋白質・酵素の基礎実験法” 南江堂(1981)
- 3)W.Stark *et al.*, *EMBO J.*,**3**:777(1984)
- 4)J.Deisenhofer *et al.*, *Nature*, **318**:618(1985)
- 5)三木邦夫 他, *蛋白質核酸酵素*, **34**:726(1989)
- 6)J.Miyake *et al.*, *Material Sci. Eng.*, **C1**:63(1994)
- 7)T.Majima *et al.*, *Thin Solid Films*, **180**:85(1989)
- 8)T.Tamura *et al.*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26**:117(1991)
- 9)M.Hara *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**:544(1990)
- 10)M.Hara *et al.*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **41**:127(1996)
- 11)杉野弘明 他, *電子写真*, **31**:591(1992)
- 12)S.Ajiki *et al.*, *Material Sci. Eng.*, **C6**:285(1998)
- 13)W.Crielaard *et al.*, *J. Bacteriol.*, **170**:1820(1988)
- 14)W.Crielaard *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**:205(1989)
- 15) W.Crielaard *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **974**:211(1989)
- 16)J.Breton *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**:42(1973)
- 17) G.Paillotin *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **545**:249(1979)
- 18) E.Nabredryk and J.Breton, *Biochim. Biophys. Acta*, **635**:515(1981)
- 19)J.Breton, *Biochim. Biophys. Acta*, **810**:235(1985)
- 20)安田喜昭 他, *テレビジョン学会技術報告*, **17**:No.80 19(1993)
- 21)Y.Yasuda *et al.*, *Thin Solid Films*, **210/211**:733(1992)
- 22)Y.Yasuda *et al.*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **34**:135(1994)
- 23)Y.Yasuda *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **36**:L577(1997)
- 24)M.Iwamoto and Y.Majima, *J. Chem. Phys.*, **94**:5135(1991)
- 25)Y.Majima and M.Iwamoto, *Rev. Sci. Instrum.*, **62**:2228(1991)
- 26)Y.Yasuda *et al.*, *Thin Solid Films*, **292**:189(1997)
- 27)D.M.Tiede *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **681**:191(1982)
- 28)S.Ajiki *et al.*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **43**:71(1997)