

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06932

研究課題名（和文）バイオ燃料電池に有益な機能を高度に集約した燃料電池用スーパー大腸菌の開発

研究課題名（英文）Development of Escherichia coli for fuel cells that highly integrates useful functions for biofuel cells

研究代表者

東 雅之（Azuma, Masayuki）

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20285282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、バイオ燃料電池の性能向上に伴いその実用化に強い期待が寄せられている。本研究ではその鍵となる微生物触媒の開発に取り組んだ。具体的には、モデル生物である大腸菌を対象に染色体改変技術を用いて有用な機能を集約した。燃料に用いるグルコースの中央代謝経路に関わる遺伝子に着目し、出力向上につながる変異を見出し、それらを重ねて5重遺伝子欠損株（ $\Delta 5$ ）を構築し、出力および燃費に相当するクーロン効率の改善に成功した。中央代謝とは別に、内膜や外膜の機能に関わる遺伝子についてもその欠損と出力の関係性を評価し新たな候補遺伝子を見出した。今後 $\Delta 5$ の発電律速となる箇所の解明から出力改善が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物燃料電池（MFC）に関する研究は、廃水や廃棄物からの発電と廃棄物の減容や、木質系バイオマスを燃料にした地産地消の再生可能エネルギー開発などにも繋がり、社会的にも重要な課題でもある。また、MFCは有機物から細胞内の代謝を介して電子を取り出す装置であり、微生物触媒に関する研究は「細胞内での電子生成および電子伝達メカニズムの理解」「電子の生成や流れを人為的に制御する手法の確立」などに関わり、生命現象を電子の流れで理解し応用展開する新たな「電子生命工学分野」の発展にも貢献する。また、電子の供給から物質生産性を高める電気培養分野にも有益な情報を提供するなど、学術的にも意義深い研究である。

研究成果の概要（英文）：In recent years, with the improvement of the performance of biofuel cells, its practical application is strongly expected. In this research, improvement of the microbial catalyst, which is the key point of its development, was promoted. Specifically, using Escherichia coli, which is a model organism, as a catalyst, useful functions were highly integrated using a chromosome modification technique. We focused on mutations in genes involved in the central metabolic pathway of glucose used as fuel. From among these, we found a mutation that leads to an improvement in performance, constructed a strain with 5 gene defects ($\Delta 5$) by stacking them, and succeeded in improving the power and coulombic efficiency. We also found a new candidate mutation by evaluating the relationship between performance and the defects of genes related to the functions of the inner and outer membranes. In the future, improvement is expected from the elucidation of the part of $\Delta 5$ that limits power generation.

研究分野：生物学

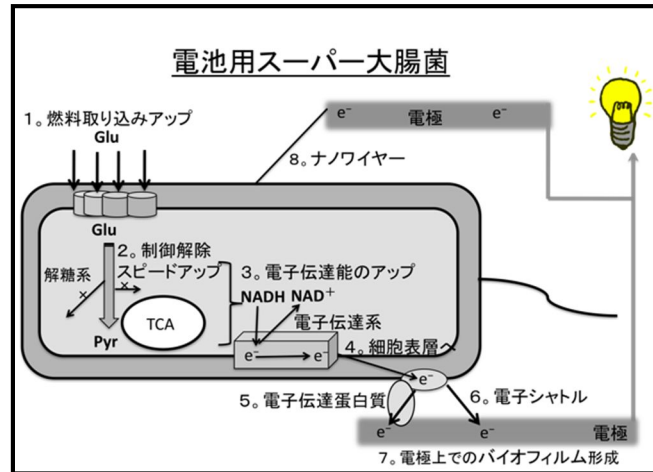
キーワード：バイオ燃料電池 微生物燃料電池 微生物触媒 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料電池は、バイオマス由来の有機物が持つ化学エネルギーを電気エネルギーへ変換するシステムで、再生可能なクリーンエネルギーとしても注目されている。微生物からの微弱な電気の検出に関する報告に端を発し(引用1)、近年になり電池構成要素の改善が進み、2000年以降にその性能は大きく向上した。触媒には酵素あるいは微生物が用いられる。電池容積当たりの最高出力は、ソニー(株)が酵素燃料電池で報告した5000 Wm⁻³が最も高く(引用2)、携帯用電源として音楽プレーヤーを可動するレベルに達している。また、μLスケールの超小型燃料電池の検討も進められ(引用3)、生体内の有機物を燃料とする体内埋め込み型電源への応用も期待されている。現状では酵素に比べ微生物触媒で得られる出力は低いが、微生物触媒では有機物を完全酸化できるという利点もある。また、微生物を用いた廃水や廃棄物からの発電は、有機性廃棄物の減容に繋がり、下水処理場での応用も注目を集めている。

本研究では、バイオ燃料電池のさらなる性能向上に向け、その鍵となる触媒の開発に取り組んだ。微生物触媒には、「グルコースを二酸化炭素と水まで完全酸化できる」「酵素を抽出精製する必要がない」「補酵素を必要としない」などの利点がある。ここでは、高出力を可能とする微生物触媒の開発に注力した。現在までに、種々の微生物触媒が使用され、発電に適した機能が見いだされている。例えば、鉄還元菌には細胞表面に細胞外へ電子を伝達する蛋白質が存在し、それらの機能が徐々に明らかにされている(引用4)。しかし、一つの細胞に発電に有効な機能を集約した例はこれまでにない。ここでは、細胞への機能集約から電池用スーパー触媒微生物の開発を目指した(右図参照)。



これまでに、食に使用され安全なパン酵母を触媒に用いて燃料電池の検討を行い、mLスケールの微生物電池としては比較的高い出力を報告してきた(引用5,6)。また、グルコース代謝において解糖系からエタノール発酵やグリセロール発酵に分岐する経路を阻害すると出力が向上することを示し、呼吸(電子伝達系)からの電子獲得が出力向上に重要であることを報告した(2013年度日本生物工学会発表)。しかし、細胞で発生した電子を細胞外に取り出すには、電子伝達系をミトコンドリアに持つ酵母より、細胞膜に持つ細菌のほうが電池に適している。そのため、2014年度から大腸菌燃料電池の開発に取り組み始めた。モデル生物でありものづくりにも利用されている大腸菌を用い、大腸菌に適した電池構成要素の検討と、染色体改変技術を用いた発電に適した機能の集約を目指し研究を開始し現在に至っている。

2. 研究の目的

本研究では上記で述べたように、バイオ燃料電池の性能向上を目指し、高出力を可能とする微生物触媒の開発に注力した。具体的には、大腸菌を触媒とし、一つの細胞に発電に有効な機能を集約した電池用大腸菌の開発に着手した。例えば、燃料に用いるグルコースの中央代謝経路に関わる遺伝子を標的として、変異と出力の関係から候補遺伝子を選抜し、それら変異を重ね合わせることで、出力の向上を目指した。また、燃料電池の形状なども検討し、研究期間内に酵素型と同レベルである平均出力0.77mW/mL(最終ページ表参照)を目指した。また燃費に相当するクーロン効率、酵素型よりは高い50%以上を目標とした。目標値は携帯用電源としての検討が可能なレベルに相当する。

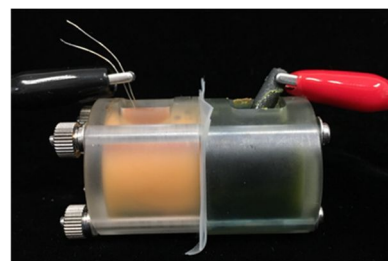
3. 研究の方法

触媒微生物の構築

MFCの触媒微生物には *Escherichia coli* BW25113(DE3)株を親株(WT)とした改変株を用いた。Keio collectionの遺伝子欠損株または本研究室で以前に構築した染色体組換え株を用い、P1ファージを用いて形質導入を行うことで、一つの菌株に様々な遺伝子欠損を重ねた株(以降、多重欠損株と表記)を構築した(引用7)。また、遺伝子の過剰発現をそれら多重欠損株に重ねた組換え株も構築した。なお、過剰発現を目的とした染色体組換え株は、T7プロモーター下流で発現する系を用いた。

MFCの測定

前培養、本培養、追加培養を行った菌体を電池測定時のOD₆₀₀が32もしくは64となるように回収した。菌体をリン酸緩衝液で洗浄した後、アノード溶液に懸濁し、このアノード溶液と別途調整したカソード溶液を用い電池を構成した。37℃、内部抵抗100Ω、18時間での出力を測定した。使用した実際の電池を右図に示す。アノード溶液(右図の左側、溶液量7.5 mL)には、グルコース、2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン(HNQ)、炭酸水素ナトリウムを、カソード溶液(右図の右側、溶液量7.5 mL)にはヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いた。

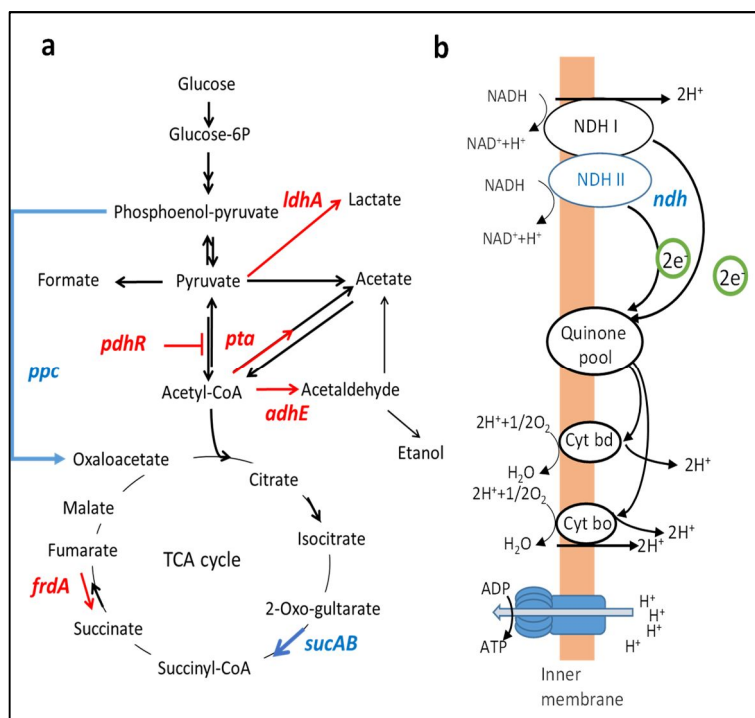


HPLC分析

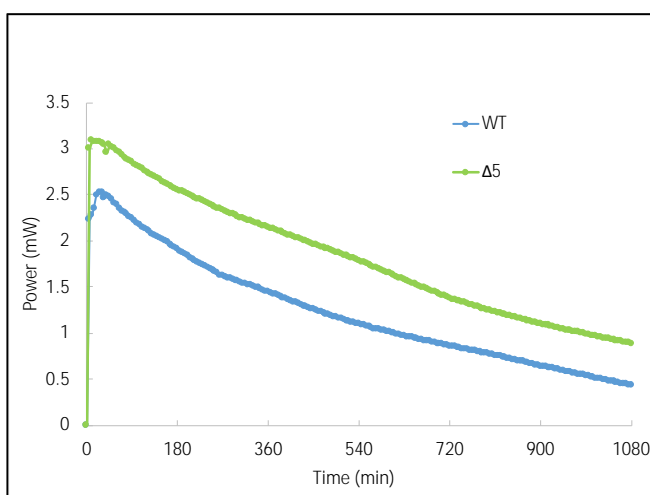
MFC測定前後のアノード液をサンプリングし、HPLC(ULTRON PS-80 Nカラム、RI検出器を使用)を用いてグルコース消費量や蓄積した有機酸量を測定した。グルコース消費量とMFC測定の電流値からクーロン効率を算出した。クーロン効率は、グルコース1分子から24個の電子が得られた場合を100%と定義した。

4. 研究成果

大腸菌のグルコース代謝と内膜での電子伝達系の概要を右図に示す。遺伝子欠損により、解糖系やTCAサイクルにおける代謝がより進むように、また解糖系からTCAサイクル以外の経路への分岐反応を抑制するように考え、欠損の対象とする遺伝子を選択した。右図aの赤字で記した5種類の遺伝子の欠損では出力の向上が見られた。具体的には、解糖系やTCAサイクルでの代謝を抑制している遺伝子 *frdA*、*pdhR* や、解糖系からTCAサイクル以外の乳酸、アセトアルデヒド、酢酸への分岐反応を促進する遺伝子 *ldhA*、*adhE*、*pta* を欠損することで出力の改善につながる事が分かった。



次に、これら5つの遺伝子欠損を重ねた多重欠損株(5)を構築し出力を測定した(右図参照)。グルコース消費は抑制されたが、平均出力はWTの約1.5倍である1.82 mW、クーロン効率はWTの約2.6倍の21.3%となり、欠損を多重化することにより性能改善が進んだ。電池測定系の状態とは異なるが、5のNADH量を測定した。その結果、WTに比べ約8倍のNADHが細胞内に蓄積していることがわかった。5では、解糖系から乳酸、アセトアルデヒド、酢酸への分岐反応を抑制し、解糖系やTCAサイクルでの代謝を促進する方向に変異を重ねたため、NADH/NAD⁺が高くなったと考えられる。NADHからメディエーター(HNQ)への電子の流れを改善するとさらに出力が上がると予想される。

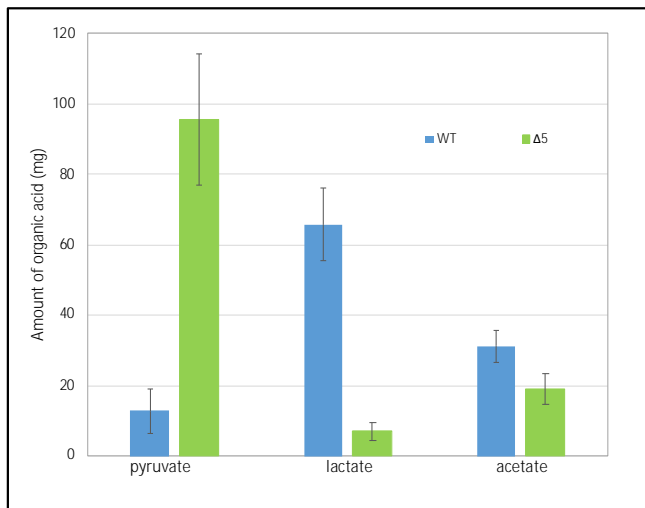


5における有機酸の蓄積を評価した結果、WTに比べ乳酸は減少しているが、ピルビン酸が多く蓄積していることが分かった(次ページ図参照)。また、酢酸はわずかに減少していた。さらに、解糖系からの分岐反応を抑制あるいはTCAサイクルでの代謝を促進するように働く遺伝子 *pf1B*、*poxB*、*arcA* の欠損を5に重ねた6を構築し出力を評価したが、それらの株で5を超

えるような出力の改善は見られなかった。

5 のピルビン酸の蓄積を解消し TCA サイクルへと代謝を進めることによりさらなる出力向上が見られるかを評価するため、5 に過剰発現を組み合わせた株を構築し評価した。前ページの代謝図の中で青字で示した 3 種の遺伝子を過剰発現の対象とした。

NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-) の機能を相補する形で働く NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-) をコードする *ndh* を過剰発現した株では、蓄積した NADH から電子を奪い、細胞膜の電子伝達系に電子を流すことにより、出力の向上が期待されたが、グルコースの消費は少し増加したものの、ピルビン酸の蓄積量は期待



に反して増加した。また、平均出力およびクーロン効率は、少し低下する傾向が見られ改善には繋がらなかった。また、TCA サイクルの代謝を活性化するため、サイクル内の律速と予想される反応を触媒する酵素の遺伝子 *sucAB* を過剰発現する株を構築した。しかし、*ndh* の過剰発現と同様に、平均出力およびクーロン効率の改善は見られなかった。

さらに、解糖系からアセチル CoA を介して TCA サイクルに流入する経路以外の流入経路を増やすために、ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼをコードする *ppc* を過剰発現して評価した。この株では、グルコース消費が 5 に比べ極端に低下し、ピルビン酸蓄積量も大きく低下した。また、平均出力は 5 の半分程度まで低下したが、クーロン効率は 50% を超え極端に増加した。5+*ppc* 株の出力を改善するために、*ndh* の過剰発現を加えた 5+*ppc*+*ndh* 株を構築した。*ndh* の過剰発現により、グルコース消費は増加し、平均出力は 5 と比べわずかに低い程度にまで増加したが、クーロン効率は 50% を大きく下回り 5 より少し高い程度に低下した。ここでも、*ndh* を過剰に発現するとグルコース消費を高めることができることを確認できた。しかし、平均出力は 5 を上回るまでには至らなかった。これらのことから、細胞質でのグルコース代謝後の NADH からの電子の受け渡し、内膜での電子伝達系の反応以降に何らかの律速があると考えられた。

上述の律速反応を明らかにするために、大腸菌の内膜に関わる遺伝子に注目し、単独遺伝子欠損が出力やクーロン効率に与える影響について検討した。以下の観点から対象とする遺伝子を絞り込んだ。

内膜内外のプロトン濃度勾配が低下すれば、細胞内のエネルギー (ATP) 量が低下し、代謝全体が活性化する。それに伴い出力が向上する。

メディエーターにはキノン化合物である HNQ を使用しているため、内膜のキノン化合物と電子の奪い合いが生じている。内膜キノン量を減らせば、HNQ への電子の流れが増加する。それに伴い出力が向上する。

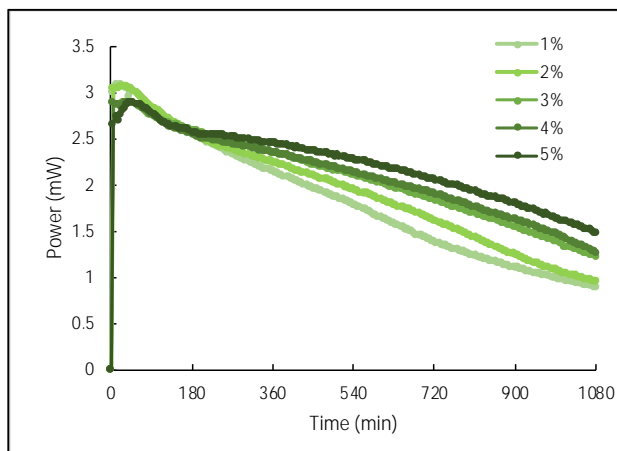
に関しては、細胞内から細胞外へのプロトン輸送を伴う酵素反応に関わる遺伝子を対象としてその欠損株の評価を行った。ユビキノール酸化酵素 (Cytbo) の変異株 *cyoA* と *cyoB* で最大出力が増加し、平均出力とクーロン効率がごくわずかであるが増加する傾向が見られた。NADH デヒドロゲナーゼ (NDH-) の変異株 *nuoA* と *nuoF* ではわずかにクーロン効率が増加する傾向が見られた。変化はわずかであったが、予想通りプロトン濃度勾配の低下が中央代謝の活性化に繋がり改善につながることを示唆された。に関しては、ユビキノン合成の初期段階に関わる UbiC の欠損株 *ubiC* で、平均出力およびクーロン効率の上昇が見られ、内膜のキノン系化合物の減少に伴い、メディエーターに用いた HNQ へ流れる電子量が増加した可能性が考えられた。とは別に、嫌気条件で膜内外のプロトン輸送を伴わない NADH デヒドロゲナーゼ の働きを抑制すると言われている *Fnr* の欠損株 *fnr* においてもごくわずかに平均出力が増加する傾向が見られた。

次に、メディエーターの移動にも関わる外膜について検討した。外膜タンパクの欠損株によりメディエーターの外膜透過性が変化することを期待し各種変異株を評価した。その結果、疎水性小分子の輸送に関わる OmpW の欠損株 *ompW* では平均出力が WT の 1.2 倍に増加した。一方、OmpC の欠損株 *ompC* では、最大出力およびクーロン効率の低下が見られた。OmpC がメディエーターの輸送に関わっている可能性が考えられたため、OmpC の過剰発現の影響を調べたが、出力改善には至らなかった。その他にもペリプラズムタンパク質についても検討を行い、プロテアーゼの一種である DegP を欠損した株でもわずかに平均出力とクーロン効率が増加する傾向が見られた。

以上の結果から、細胞表層に関与する遺伝子の中で平均出力およびクーロン効率で改善傾向が見られた 5 つの遺伝子 *ompW*, *ubiC*, *cyoA*, *fnr*, *nuoA* を選び、5 に欠損を重ねた 6 重欠損株を構築した。さらに、それらに *ndh* の過剰発現を導入した 6+*ndh* も構築し、その出力とクーロン効率を調べた。しかし、これらの株でも 5 とほぼ同様の平均出力とクーロン効率を示し、触媒性能の改善には繋がらなかった。以上をまとめると、単独遺伝子欠損では WT に比べ触媒性能

改善に繋がる変異が細胞表面関連遺伝子の中に複数見られるが、これらは 5 の律速となっている因子ではないと考えられた。

微生物触媒以外の観点から検討した 3 つの結果を記す。正極側には過剰量のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを加えており、正極が出力の律速になることは考えにくかったが、念のため正極側の溶液だけが 2 倍容量になる電池を作製し出力を確認した。予想通り、容量を増やしても出力はほとんど変化しなかった。このことから、正極側の反応が律速になっていることはないと判断した。次に、大腸菌の膜構造を弱めることでメディエーターの移動が促進されると考え、負極側に各種界面活性剤を添加し出力を評価した。そのほとんどで出力が変化しないもしくは低下したが、Tween80 やアニオン性界面



活性剤の混合液では、測定初期では無添加に比べ出力は高くなるが、中盤から低下し最終的には平均出力は無添加より低くなった。界面活性剤によって一時的に効果が見られるが、時間とともに界面活性剤の影響を受けて細胞が弱まるため出力が低下すると考えられた。最後に、5 を用いて、pH 調整剤として用いている炭酸水素ナトリウム添加量について検討した。標準として用いてきた 1% の添加では、測定終了時の pH は 5.1 まで低下していたが、添加量の増加とともに最終 pH の低下は抑制され、5% の添加ではその低下を pH6.8 までに抑えることができた。出力は 5% の低下により測定後半の低下が抑制され (上図参照) その時のクーロン効率は 10.4% まで低下したものの、その平均出力は 2.21 mW まで増加しこれまでの最高値を示した。グルコースデヒドロゲナーゼを用いた酵素型電池でスケールや測定時間が比較的似ている実験系で結果と比較すると下表のようになる。燃費に相当するクーロン効率については、微生物型の方が明らかに優れているが、出力面では 5 を用いることで改善は進んだものの、目標にしていた酵素型にはまだ届いていない。現状の 5 では、NADH が細胞内に溜まっているにも関わらず、NADH dehydrogenase を過剰に発現させても出力が上がらない状況にある。また、界面活性剤で処理すると一時的に高い出力が見られる場合がある。これらのことから、内膜以降の電子移動のどこかに律速があると考えられる。また、複数の律速となる要素が存在すると考えると、今回はまだ構築できなかったが、内膜、ペリプラズム、外膜で少しも効果が見られた遺伝子欠損の重ね合わせが出力の向上には必要かもしれない。今後の細胞表面変異と出力の解析から触媒性能の改善が期待される。

触媒	負極容積 cm ³	操作時間 h	平均出力 mW	容積あたりの平均出力 mW/cm ³	クーロン効率 %
Glucose dehydrogenase	6.5	16.6	4.98	0.77	3.7
BW25113(DE3), 1%NaHCO ₃	8.3	18	1.23	0.15	8.2
Δ5, 1%NaHCO ₃	8.3	18	1.82	0.22	21.3
Δ5, 5%NaHCO ₃	8.3	18	2.21	0.27	10.4

< 引用文献 >

- 1 M. C. Potter, Proceedings of the Royal Society London, B, 84, 260 (1911).
- 2 H. Sakai et al., Electrochemistry, 82(3), 156(2014).
- 3 S. Choi et al., J. Lab Chip, 11(6), 1110 (2011).
- 4 高妻篤史 他, 環境バイオテクノロジー学会誌, 9(2) 105 (2009).
- 5 脇坂知行 他, 高温学会誌, 35(5), 283 (2009).
- 6 H. Kaneshiro et al., BEJ, 83: 90-96 (2014).
- 7 D. Koma et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 93(2):815 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ojima Yoshihiro, Kawaguchi Taichi, Fukui Saki, Kikuchi Ryota, Terao Kazuma, Koma Daisuke, Ohmoto Takashi, Azuma Masayuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Promoted performance of microbial fuel cells using Escherichia coli cells with multiple-knockout of central metabolism genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioprocess and Biosystems Engineering	6. 最初と最後の頁 323 ~ 332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00449-019-02229-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口太一, 菊池亮太, 駒大輔, 大本貴士, 尾島由紘, 東雅之
2. 発表標題 種々の遺伝子改変の組み合わせが微生物燃料電池の出力に与える影響
3. 学会等名 日本生物工学会大会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東雅之, 五十嵐幸一, 尾島由紘
2. 発表標題 木質系バイオマスを燃料にした微生物発電
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2018, 東京ビッグサイト（大学組織展示）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 太一, 福井 早紀, 駒 大輔, 大本 貴士, 尾島 由紘, 東 雅之
2. 発表標題 大腸菌の代謝や細胞表層電子伝達系の改変が微生物燃料電池の性能に与える影響
3. 学会等名 日本生物工学会大会平成29年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryota Kikuchi, Taichi Kawaguchi, Daisuke Koma, Takashi Omoto, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
2. 発表標題 Construction of superior catalyst suitable for microbial fuel cell and effect of anode composition on power of the fuel cell
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB2019), Tamsui, Taiwan (2019年7月) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Azuma Masayuki, Ojima Yoshihiro	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 19
3. 書名 Current Topics in Biochemical Engineering, Catalyst Development of Microbial Fuel Cells for Renewable-Energy Production	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾島 由紘 (Ojima Yoshihiro) (20546957)	大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授 (24402)	