

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23664

研究課題名(和文) バイオ電池へ向けた人工酸化還元酵素の創製

研究課題名(英文) Design of artificial redox enzyme for biofuel cell

研究代表者

高村 映一郎 (Takamura, eiichiro)

福井大学・学術研究院工学系部門・講師

研究者番号：30843015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長期安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)の直接電子移動型酵素化および電子伝達能向上を目指した。酵素分子表面のリシン残基に対して低分子酸化還元物質を修飾する方法を適用し、PQQ周辺のリシン残基を欠損させた変異体を評価することで野生型における電子伝達経路を推定した。推定された電子伝達経路から、電子伝達の促進が期待される部位へリシン残基を導入したPQQ-GDH変異体を作製した。PQQ-GDH変異体を用いたバイオ電池は野生型を用いたバイオ電池と比較して1.5倍の最大出力を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果の学術的意義は次の2点である。(1)直接電子移動型酵素化したPQQ-GDHにおける電子伝達経路を明らかにした。(2)酸化還元部位-電極間電子伝達経路の特定の部位へ電子メディエータの新規修飾部位を追加することで、直接電子移動型酵素の電子伝達能を向上させられることを明らかにした。この成果は、現在盛んになってきているバイオ電池や生体センサ用酵素の開発に向けた、酵素分子設計指針の一つとして社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to convert pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*, which has long-term stability, into a direct electron-transfer enzyme and to improve its electron transfer ability. The electron-transfer pathway in the wild type was inferred by evaluating mutants lacking lysine residues around PQQ by applying a method of modifying low-molecular-weight redox substances to lysine residues on the surface of the enzyme molecule. The biofuel cell using mutant PQQ-GDH exhibited 1.5-fold higher maximum power than the biofuel cell using wild-type.

研究分野：生物電気化学

キーワード：バイオ電池 酸化還元酵素 アノード 直接電子移動 人工酸化還元酵素

### 1. 研究開始当初の背景

酵素や DNA 等の生体分子を利用したバイオデバイスは、バイオセンサとして発展してきた。その中で、右の図で示すように酸化酵素の触媒反応による酸素の減少を測定することを原理とするバイオセンサが第 1 世代 (図 1A)、低分子の酸化還元物質である電子メディエータを加えることで、溶存酸素の濃度に影響を受けない酵素電極を用いたバイオセンサが第 2 世代 (図 1B) と呼ばれている。実用的バイオセンサは、第 2 世代で完成されている。しかし、再生可能エネルギーの必要性が叫ばれる中で、グルコース等の生物由来資源を燃料として利用するバイオ電池に注目が集まり、メディエータなしで酵素反応と電極反応が共役する第 3 世代のバイオデバイスが求められている。第 3 世代バイオデバイスは、図 1C に示すように酵素の酸化還元部位と電極との間で直接電子の授受が起こる電極である。これまでバイオセンサとして用いられてきたバイオデバイスは、基本的に使い捨てであった。そのため、第 2 世代のように遊離の電子メディエータを用いることに問題は生じてこなかった。しかし、バイオ電池においては、燃料の交換ごとにメディエータを添加しなければならない、添加したメディエータが他方の電極反応を阻害する、といった問題が生じる。その問題を解決するために、メディエータの電極上への固定化も研究されてきたが、系が複雑になることやメディエータの漏出といった問題がある。したがって、バイオ電池にはメディエータを用いない第 3 世代の酵素電極が求められているのである。第 3 世代のバイオデバイスに必要な酵素の条件としては、「基質の酸化還元を行う部位」と「電極との電子授受を行う部位」の 2 個以上の酸化還元部位を有することである。酸化還元部位を 2 個以上有する酸化還元酵素としてはマルチ銅オキシダーゼや、FAD とヘム C を有するフルクトース脱水素酵素などが報告されているが、高い触媒活性や長期安定性を有し、2 個以上の酸化還元部位を有する酵素の報告は少なく、第 3 世代バイオデバイスのバイオ電池への応用が制限されている。そのため、酸化還元部位を 1 個しか有さない優れた酵素をいかに第 3 世代バイオデバイスへ適用させるかが本研究課題の解決する問題である。

### 2. 研究の目的

上記の問題を解決するために、本研究では図 1D に示すように脱水素酵素表面へメディエータを修飾することで電極との電子授受を行う部位を人工的に付与し、直接電子移動が不可能な脱水素酵素をあたかも電極と直接電子授受可能な酸化還元酵素として振舞うように改変することを目的とする。

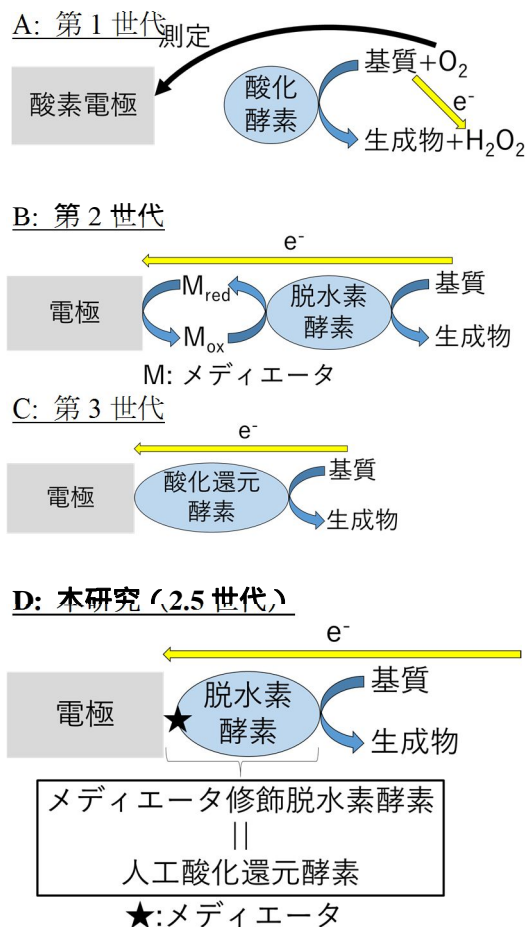


図 1 酵素電極の発展の流れと本研究の目指す酵素電極

### 3. 研究の方法

本研究では、酸化還元部位を1個のみ有する酸化還元酵素の分子表面のリシン残基に対して、アミノ基反応性電子メディエータ (Amine-reactive PES : ArPES) を修飾する方法を適用した。脱水素酵素として、優れた長期安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素 (PQQ-GDH) を用いた。酵素分子の立体構造情報を基に、PQQ-GDH の酸化還元部位である PQQ 周辺の、PES が修飾された場合に電子授受が起こることが予想されるリシン残基をそれぞれ欠損させた変異体を作製し、PES を修飾し、直接電子移動 (direct electron transfer : DET) 型酵素化した (PQQ-GDH-PES) 各 PQQ-GDH-PES 修飾電極を作製し、電気化学的に評価した。リシン欠損変異体の結果から、PQQ - 電極間の電子伝達経路を推定した。電子伝達経路において修飾された PES 間の距離が近くなり、酵素の立体構造への影響が小さい部位への新規リシン残基の導入することで、PQQ - 電極間の電子伝達能が向上する PQQ-GDH 変異体を作製した。作製した新規リシン残基導入 PQQ-GDH 修飾電極を作製および修飾電極をアノードとしたバイオ電池を作製し、それぞれ評価した。

### 4. 研究成果

野生型 PQQ-GDH において、右図 2 の赤色で示されている PQQ 周辺に存在する ArPES と反応する可能性のある酵素分子表面のリシン残基 1 カ所をアルギニン残基に置換し、PES 修飾部位を限定した 5 種類の単一変異体 (K76R, K258R, K319R, K325R, K361R) を作製した後、野生型と同様に PQQ-ASD-PES 配向固定電極を作製し、電気化学的评价を行った。各リシン残基欠損変異体の酵素活性には大きな違いはなかった。図 3 に示すようなサイクリックボルタモグラムからグルコースの酸化に基づく酸化電流を評価したところ、K76、K361、K258、K325 をそれぞれ欠損させた変異体は野生型と比較して、酸化電流値が 50%以下に減少した。そのため、PQQ からの電子は PQQ から 2 nm 以内に位置する K258 および K325 へ初めに伝達されると推定された。そこで、K258 および K325 よりも PQQ との距離が近く、ヘリックスや シートに含まれていない 273 番目のセリンをリシンへ置換した PQQ-GDH S273K を作製し、修飾電極の作製・評価をおこなった。その結果、次ページ図 4 に示すように、グルコースの酸化に基づく電流値が野生型 PQQ-GDH 修飾電極と比較して、1.8 倍増大した。他のリシン残基より PQQ に近い部位へ PES 修飾部位となるリシン残基を導入することで、PQQ と修飾された PES 間の電子伝達効率が向上したためである。

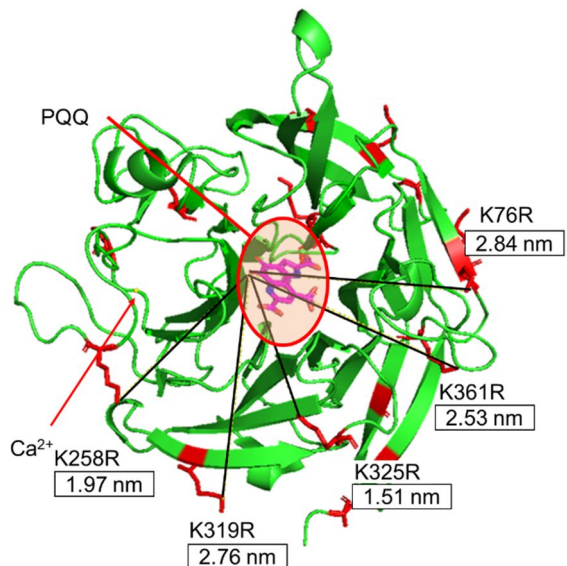


図 2 PQQ-GDH の立体構造と PQQ 周辺に存在する表面リシン残基

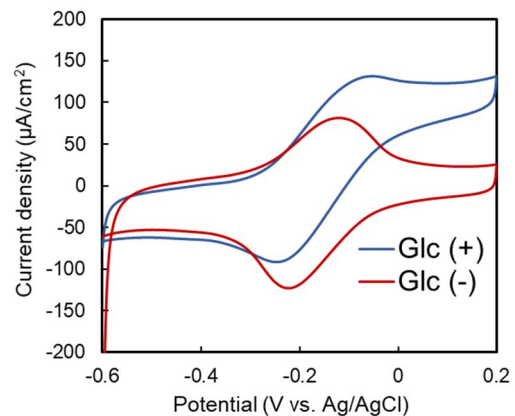


図 3 PQQ-GDH K76R 修飾電極のサイクリックボルタモグラム

最後に、PQQ-GDH S273K 修飾電極をアノードとして用いたバイオ電池を構築したところ、野生型 PQQ-GDH 修飾電極をアノードとした場合と比較して 1.5 倍高い出力密度を示した。そのため、PQQ-GDH S273K はバイオ電池におけるアノード用酵素としての有用性も示された。

以上の結果から、酵素分子表面へ複数個の酸化還元分子（本研究における PES）を付加することで DET 型酵素化させた脱水素酵素においては、PQQ - PES 間の距離を制御することによって、PQQ - 電極間の電子伝達能を向上させることが可能となることが明らかとなった。これは、今後のバイオ電池用電極触媒の設計にとって重要な知見となる。

今後は、電極表面に修飾された酵素の表面に付加された PES 間での電子伝達や、PES-電極間の電子伝達経路についても検討していくことで、脱水素酵素を DET 型酵素化する際の酵素分子設計でなく酵素修飾電極構築のための設計指針も確立していく予定である。

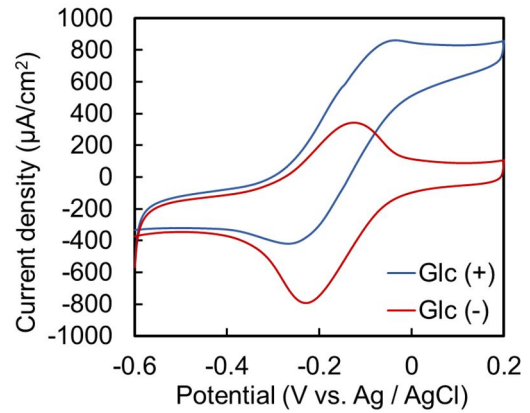


図 4 PQQ-GDH S273K 修飾電極のサイクリックボルタモグラム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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<br>Sakamoto Hiroaki, Shoji Hikaru, Amaya Satoshi, Saiki Tsunemasa, Takamura Eiichiro, Satomura Takenori, Suye Shin-ichiro  | 4. 巻<br>36                    |
| 2. 論文標題<br>Electrochemical characteristics of a hyperthermophilic enzyme in microdroplets stirred and heated by surface acoustic waves  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Biotechnology Progress  | 6. 最初と最後の頁<br>1~5             |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/btpr.2943  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Sakamoto Hiroaki, Fujiwara Ikuya, Takamura Eiichiro, Suye Shin-ichiro   | 4. 巻<br>245                   |
| 2. 論文標題<br>Nanofiber-guided orientation of electrospun carbon nanotubes and fabrication of aligned CNT electrodes for biodevice applications  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Materials Chemistry and Physics   | 6. 最初と最後の頁<br>122745 ~ 122745 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.matchemphys.2020.122745  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Sakamoto Hiroaki, Futamura Rie, Tonooka Aina, Takamura Eiichiro, Satomura Takenori, Suye Shin-ichiro  | 4. 巻<br>37                    |
| 2. 論文標題<br>Biocathode design with highly oriented immobilization of multi copper oxidase from Pyrobaculum aerophilum onto a single walled carbon nanotube surface via a carbon nanotube binding peptide | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Biotechnology Progress  | 6. 最初と最後の頁<br>1~6             |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/btpr.3087  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Takamura Eiichiro, Taki Shunsuke, Sakamoto Hiroaki, Satomura Takenori, Sakuraba Haruhiko, Ohshima Toshihisa, Suye Shin-ichiro   | 4. 巻<br>193                   |
| 2. 論文標題<br>Site-Directed Mutagenesis of Multicopper Oxidase from Hyperthermophilic Archaea for High-Voltage Biofuel Cells   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Applied Biochemistry and Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>492 ~ 501       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s12010-020-03440-5   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Satomura Takenori, Hirano Tatsunari, Inagaki Kohei, Horinaga Kosaku, Takamura Eiichiro, Sakamoto Hiroaki, Ohshida Tatsuya, Ohshima Toshihisa, Sakuraba Haruhiko, Suye Shin-ichiro | 4. 巻<br>325             |
| 2. 論文標題<br>Activity enhancement of multicopper oxidase from a hyperthermophile via directed evolution, and its application as the element of a high performance biocathode                  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>226 ~ 232 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jbiotec.2020.10.019   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Takamura Eiichiro, Ohnishi Taku, Sakamoto Hiroaki, Satomura Takenori, Suye Shin-ichiro  | 4. 巻<br>3                     |
| 2. 論文標題<br>Promoting of direct electron transfer of multicopper oxidase by control of enzyme molecule density on multi-walled carbon nanotube | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Physics: Energy  | 6. 最初と最後の頁<br>014006 ~ 014006 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1088/2515-7655/abcf85  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Mori Saki, Kitta Yohei, Sakamoto Hiroaki, Takamura Eiichiro, Suye Shin-ichiro   | 4. 巻<br>43                |
| 2. 論文標題<br>Electrochemical characteristics of a gold nanoparticle-modified controlled enzyme?electrode contact junction electrode | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Biotechnology Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>1037 ~ 1042 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10529-021-03092-3  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Hiroaki, Futamura Rie, Fujiwara Ikuya, Meboso Taichi, Li Ning, Takamura Eiichiro, Satomura Takenori, Suye Shin-ichiro  | 4. 巻<br>50937       |
| 2. 論文標題<br>Immobilization of multicopper oxidase from Pyrobaculum aerophilum onto an electrospun aligned single walled carbon nanotube surface via a carbon nanotube binding peptide for biocathode | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Applied Polymer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>1 ~ 6 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/app.50937   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Tomonaga Masato, Nakao Shino, Takafuji Makoto, Takamura Eiichiro, Suye Shin-ichiro, Satomura Takenori                              | 4. 巻<br>125                   |
| 2. 論文標題<br>Temperature depending bioelectrocatalysis current of multicopper oxidase from a hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum aerophilum | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Electrochemistry Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>106982 ~ 106982 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.elecom.2021.106982   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀永晃作, 里村武範, 高村映一郎, 坂元博昭, 末信一郎, 櫻庭春彦, 大島敏久 |
| 2. 発表標題<br>酵素カスケードシステムを用いたアミノ酸駆動のメンブレンレスバイオ電池の開発     |
| 3. 学会等名<br>2020年度日本農芸化学会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>菱井和樹, 小松丈紘, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久, 天谷諭, 末信一郎 |
| 2. 発表標題<br>多段階酵素反応型バイオ電池を目指したマイクロフロー型デバイスの構築                    |
| 3. 学会等名<br>2020年度日本農芸化学会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高村映一郎, 鈴木治人, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎 |
| 2. 発表標題<br>電極表面に固定化された酵素の可動性向上によるバイオ電池の性能向上          |
| 3. 学会等名<br>2020年度日本農芸化学会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>菱井和樹, 小松丈紘, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久, 天谷諭, 末信一郎 |
| 2. 発表標題<br>マイクロフローデバイスを用いた多段階酵素反応型バイオアノードの構築                    |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会中部支部第187回例会                                   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三木佑介, 里村武範, 高村映一郎, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎               |
| 2. 発表標題<br>分子進化学による酵素活性が向上した超好熱菌由来ピロロキノリンキノン依存性アルドース脱水素酵素の創製 |
| 3. 学会等名<br>極限環境生物学会2020年度 (第21回) 年会                          |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>里村武範, 堀永晃作, 田中志乃, 高村映一郎, 坂元博昭, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎 |
| 2. 発表標題<br>人工酵素カスケード経路を用いたアミノ酸を燃料としたバイオ電池の構築               |
| 3. 学会等名<br>第30回日本MRS年次大会 (招待講演)                            |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高村映一郎, 鈴木治人, 坂元博昭, 里村武範, 末信一郎  |
| 2. 発表標題<br>電極上の酵素分子の可動性制御による高性能バイオアノードの構築 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本MRS年次大会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                           |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>二村梨絵, 坂元博昭, 天谷諭, 才木常正, 高村映一郎, 里村武範, 末信一朗 |
| 2. 発表標題<br>表面弾性波によって攪拌および温度制御された酵素配向固定バイオデバイスの構築    |
| 3. 学会等名<br>第30回日本MRS年次大会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高村映一郎, 服田充正, 坂元博昭, 里村武範, 末信一朗 |
| 2. 発表標題<br>気相法炭素繊維フェルトを電極材としたバイオ電池の構築    |
| 3. 学会等名<br>2020年繊維学会年次大会                 |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>加藤真海, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 末信一朗 |
| 2. 発表標題<br>バイオデバイス構築のための直接電子移動型酸化還元酵素の創製 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>木村美智子, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一朗        |
| 2. 発表標題<br>NAD <sup>+</sup> -カーボンナノチューブを用いたマルチエンザイム型バイオ電池の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                                   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>里村武範, 堀永晃作, 高村映一郎, 坂元博昭, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎 |
| 2. 発表標題<br>好熱菌酵素を素子としたアミノ酸駆動型高耐久性バイオ電池の開発            |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                           |
| 4. 発表年<br>2021年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高村映一郎, 熊谷玄太, 坂元博昭, 里村武範, 末信一郎                   |
| 2. 発表標題<br>効率的な多段階酵素反応系を目指したDNAの相補性を利用した酵素・メディエータ共固定化電極の構築 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                                 |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上床翔太郎, 大田竹留, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 末信一郎   |
| 2. 発表標題<br>バイオ電池を外部エネルギー源としたリンゴ酸酵素逆反応による炭酸固定化システム |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三木佑介, 里村武範, 高村映一郎, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎                  |
| 2. 発表標題<br>酵素活性が向上した超好熱菌由来ピロロキノリンキノン依存性アルドース脱水素酵素の創製と酵素化学的性質の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                                      |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂元博昭, 橘田洋平, 高村映一郎, 末信一朗        |
| 2. 発表標題<br>酵素-電極界面の吸着接点制御による高出力バイオデバイスの創製 |
| 3. 学会等名<br>2020年度繊維学会年次大会                 |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

〔図書〕 計1件

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>三林浩二              | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版          | 5. 総ページ数<br>300 |
| 3. 書名<br>酵素トランスデューサーと酵素技術展開 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |