

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22248010

研究課題名(和文) 未利用生物資源を燃料とする酵素電池の開発

研究課題名(英文) Development of enzyme battery using unutilized bioresources

研究代表者

大島 敏久 (Ohshima, Toshihisa)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10093345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食品廃棄物などの未利用生物資源を燃料とする低環境負荷のバイオ燃料電池の開発が注目されている。本研究は未利用生物資源を燃料とし、高出力で且つ、長期安定的に使用できる酸化還元酵素及びその高活性な酵素を有する微生物を素子とする充電型酵素電池の開発を行った。その結果、食品中のタンパク質やその構成成分であるアミノ酸を燃料として耐熱性アミノ酸電池として、L-プロリン脱水素酵素を用いたプロリン燃料電池の基本装置の製作に世界で最初に成功した。さらに、起電力や出力の改良、燃料の多様性を図り、電池セル装置の改善、高活性な酵素の探索と改良、電池用としての高い有用性が期待できる新規酵素の発見に成功した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the development of bio-fuel battery using unutilized bioresources like food wastes have been interesting. In this project, we have been studied the construction of enzyme battery (include microbial battery) using highly active and long-term stable oxidoreductases as the element in a fuel cell. As a result, we succeeded the construction of L-proline-enzyme battery using thermostable due-linked L-proline dehydrogenase. This is the first success in the production of amino acid enzyme battery. In order to improve the battery cell unit for the increase of its output, we have screened more active and novel oxidoreductases based on both genome information and activity based methods, and succeeded in the finding of several stable enzymes including thermostable glutamate dehydrogenase and D-amino acid dehydrogenase.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酵素電池 バイオ電池 脱水素酵素 アミノ酸 未利用生物資源 糖 耐熱性酵素

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や放射能汚染をはじめとする環境汚染に対する危機が広く懸念されるようになった近年、化石燃料や原子力に代替する新しいエネルギー生産システムが望まれている。酵素電池は、糖やアルコールなどの有機物を燃料にし、生体触媒である酸化還元酵素を用いて電気エネルギーを取り出すバイオ燃料電池の一種である(図1)。バイオ電池は食品廃棄物などの未利用資源の利用や、触媒に貴金属を必要とせず、温和な環境での発電が可能なることから、環境負荷の少ない新しい燃料電池として近年注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究では未利用資源である食品廃棄物中のタンパク質、脂質、多糖類などから生成するアミノ酸、グリセリン、脂肪酸、グルコースなどを燃料とする酵素電池の開発を主な目的とした。

その中で、第一に超好熱菌由来の高い耐熱性・安定性を有する脱水素酵素を陰極用素子とし、陽極用には白金電極またはビリルビン酸化酵素を用いる起電力の高い酵素電池の開発を目指した。第二に、電池酵素開発を進めることを目的とした。酵素電池の起電力の改善と多様な未利用生物資源が燃料になる可能性を秘めた酵素電池の開発の目的のために、新規酵素の検索、触媒効率の高い酵素の検索と創製、優れた補酵素や電子伝達体などの検索、酵素の電極への固定化法の改善などを検討した。特に、酵素電池の起電力の改善、多様な未利用資源の燃料化などを重点課題として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) 酵素電池の構築と性能増強のための方法の概要

先ず、安定性が高く、酵素電池として、未開拓であった食品廃棄物中のタンパク質由来のアミノ酸を燃料とするアミノ酸電池の創製に取り組んだ。モデル酵素電池として、我々が既に発見し、機能解析が完了している超好熱アーキアの *Pyrococcus horikoshii* 由来の FAD 依存性 L-プロリン脱水素酵素 (L-PDH) を陰極用素子として用い、コラーゲンなどのタンパク質中に主に含まれる L-プロリンを燃料とするプロリン電池の開発を進めた(図1)。

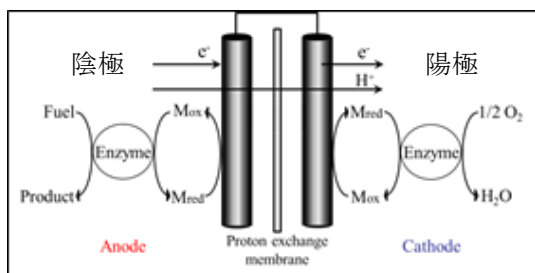


図1. 酵素電池の概略図。Mox, Mred:酸化型及び還元型メディエータ

陽極には、白金電極またはビリルビン酸化酵素を用い、セパレータにプロトン交換膜を用いた。このようなL-プロリン酵素電池をアミノ酸電池の基本形として作製し、酵素の種類・濃度・固定化条件などに加え、基質（燃料）濃度、電池の温度、pH、イオン強度、セパレータの種類、電池容量などの条件を変え、起電力から電池の性能評価を行い、優れた起電力を有する酵素電池の開発を進めた。また、食品廃棄物中の多くのアミノ酸やグリセリンなどの多様な燃料電池の開発のために、様々なアミノ酸、グリセリン、糖などを基質とする脱水素酵素の検索とそれらの陰極用の電池素子としての機能（触媒効率）や構造の解明を進めた。次に、起電力を増強と装置の小型化、及び高い酵素の電極への固定化法の改良を検討した。また、起電力の増強が期待できる酵素触媒効率が高く、安定性も高い酵素のゲノム情報や生化学的活性情報による検索、タンパク質工学的手法による触媒効率や基質特異性の改善なども合わせて行った。

未利用生物資源の高効率な利用のために、未利用生物資源を利用する微生物そのものを酵素素子とする微生物電池についても検討した。

### (2) 電池装置のアノード及びカソードの材質

アノード素材の基本形として、親水性の高い8mm径、0.5mm厚のカーボンフェルトを3枚積層したもの(0.1cm<sup>3</sup>)を用いた。このカーボンフェルトを担体として、導電性の高いKetjen black (KB)、また親水性にも優れたAqua black (AB)を担持したアノードを作製した。さらに、KB電極を酵素溶液に浸漬して酵素固定化アノードも作製した。カソードには燃料電池で一般的に用いられる白金担持カーボンブラックを用いた。セパレータにはNafion膜を用い、カソードとホットプレスによって圧着させた。

### (3) 電池の性能測定

専用の小型電池セルを設計し、チューブポンプを用いて反応液を循環可能なシステムを開発した(九州大学稲盛フロンティア研究センター)。本電池セルを用い、L-プロリンを燃料にしたL-PDH( $\beta_4$ )による常温での発電性能を、ポテンシオスタット/ガルバナスタットによって測定した。コントロールにはL-PDH( $\beta_4$ )のみを除いたものを用いた。ポテンシオスタティックな電流測定では印加電圧の操作を0.05V/sec、ガルバナスタティックな電圧測定では印加電流の操作を1 $\mu$ A/secで行った。

### 4. 研究成果

(1) 色素依存性L-PDHを素子とするL-プロリン酵素電池の創製

本研究では、電池セルは、発電素子にL-PDH

( $\beta_4$ )を用いた酵素遊離型の電池を基本形とし、電池セルは、溶液極のアノード(陰極)と空気極のカソード(陽極)、それらを隔てるセパレータ(プロトン交換膜)から成るものについて検討した(図2)。

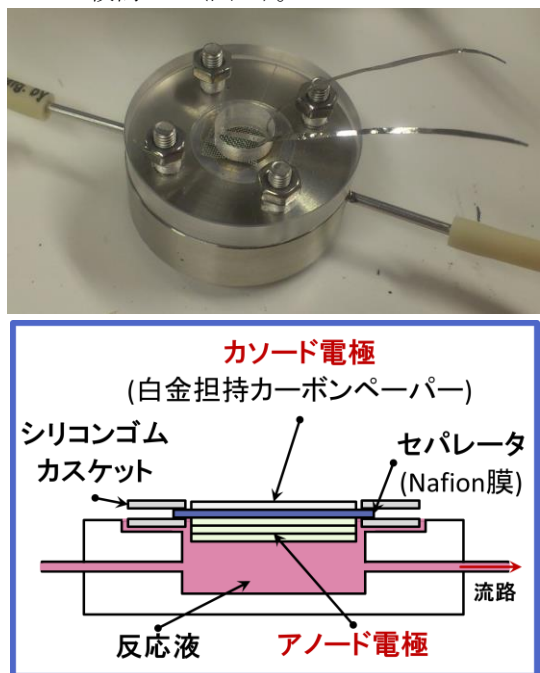


図2. 酵素電池(上)とその模式図(下)。酵素電池の最少液量(左図): 0.550 mL、セルの外径 30mm

先ず、アーキア *P. horikoshii* 由来の FAD 依存性 L-PDH を用いて、L-プロリン電池の開発を進めた。本酵素は $\alpha$ と $\beta$ サブユニットから成る $\alpha_4\beta_4$ のヘテロオクタマー(L-PDH( $\alpha_4\beta_4$ ))構造をとり、 $\beta$ サブユニットは触媒部位、 $\alpha$ サブユニットは電子伝達体タンパク質である。この $\beta$ サブユニットのみから成る組換え酵素の精製に成功し、これを用いた酵素電池を作成した。種々のメディエータ物質(電子伝達物質)の中では、2,6-dichloro indophenol (DCIP) が最も良好であり、L-PDH ( $\beta_4$ ) は L-PDH ( $\alpha_4\beta_4$ ) に比較して約 10 高い比活性 (1.5 U/mg, U; 1 分間に 1  $\mu$ mol の DCIP を還元する酵素量) を示すことが明らかとなった。そこで、4 量体構造を取る *P. horikoshii* の L-PDH の $\beta$ サブユニット酵素 L-PDH ( $\beta_4$ ) を陰極用に用いた L-プロリンを燃料とする酵素電池(酵素は溶液状態)の作成を検討し、世界最初のアミノ酸を燃料とする新規酵素電池の基本型の構築に成功した。L-PDH( $\beta_4$ ) との電子伝達が行われることがわかっているが、DCIP と電極素材間の電子伝達等が原因で、十分安定的な高出力を得るには至らなかった。そこで本研究では、DCIP 等のメディエータにより適合する電極、メディエータを必要としない酵素固定化電極の開発を行うことで電池出力の改善を検討した。その結果、KB や AB を担持させないカーボンフェルト(担体のみ)を電極に用いた場合に最も大きな出力が得られた。酵素を添加しなかったコントロールでは  $0.32 \pm 0.032$  V の起電力と最大

$1.7 \pm 0.12 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  の出力であるのに対し、L-PDH( $\beta_4$ )の添加で  $0.60 \pm 0.018$  V の起電力と最大  $19 \pm 2.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  の出力が得られた。コントロールと比較して大きな出力の増加が確認でき(図3)、L-プロリンを燃料とする酵素反応によって本電池での最大の電流値が得られた。

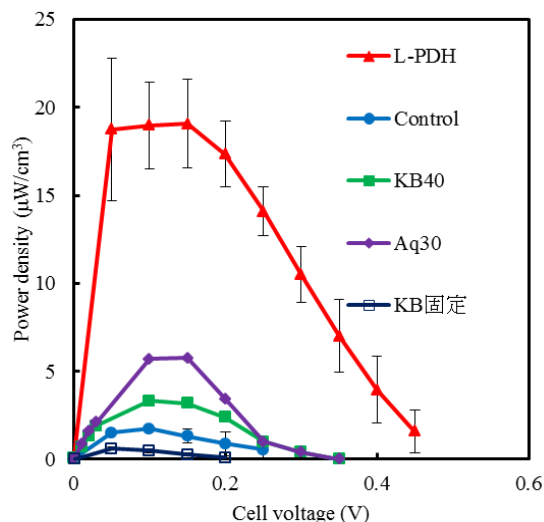


図3. ポテンシオスタットにより測定した種々の陰極の電子密度

既往研究のグルコース電池には  $1 \text{ mA}/\text{cm}^2$  を超えるものもあり、それらと比較して本酵素電池で得られた値は高い値ではない。しかし、食品残渣などに高濃度に含まれるアミノ酸を燃料に用いる新たな酵素電池を開発できたことで、これをベースに今後の研究の発展が期待できる。また、本研究において閉回路電圧(起電力)は安定していたが、閉回路電流はプロトン交換膜の劣化による経時的な減少が観察された。KB や AB で修飾した電極で高い出力が得られなかったことも、緩衝液や Nafion 膜と不可逆的な反応を起こしたと推察できる。このことや内部抵抗の増大があることを考慮すると、メディエータやプロトン交換膜を必要としない酵素固定化電極を使用することが望ましいと予想できる。本研究における固定化電極では、十分な出力が得られていないが、これは酵素と電極間の電子移動が適切に行われていないことが原因と考えられ、配向性を持った酵素固定化法を検討したがまだ良好な成果を得るに至っていない。

結論として L-PDH を用い、L-プロリンを燃料として発電する酵素電池の開発に成功した。これは、既往研究に多く見られる糖やアルコールではなく、アミノ酸を燃料として発電する酵素電池の発展・実用化に大きく寄与するものである。特に、未利用廃棄タンパク質の加水分解物としてのアミノ酸の燃料化が可能になる最初の成果と言える。今後、起電力の増強を図るために DCIP のようなメディエータを必要としない酵素電極と電極へ

の酵素固定化法の開発を行うことで電池出力の改善を図る。また、種々の未利用生物資源を燃料とするためにアミノ酸や糖類などを基質とする新規酸化還元酵素(脱水素酵素)の発見が必要である。

## (2) アミノ酸や糖類などを基質とする新規酸化還元酵素(脱水素酵素)の検索

本研究では、未利用生物資源を構成する様々なタンパク質、糖類、脂質などの高分子化合物と、それらを構成する単位物質であるアミノ酸、糖類、脂肪酸、脂質、グリセロールなどの物質を燃料とする新しいアミノ酸電池やグリセリン電池を開発するために、また、高起電力を得るためには、既知の酵素でも触媒活性の高い酵素が重要であるので、新たな好触媒能力を持つ電池用酵素素子の探索と効率的な探索法の開発も行っている。

これまでに報告のない基質特異性と高活性を併せ持つ新規脱水素酵素の発見のため、①環境土壌中から菌の分離を経ずに土壌混合培養液からの直接活性検出による新規酸化還元酵素を検索する方法(メタ酵素法)を構築した。②ゲノム情報から機能未知で脱水素酵素や酸化酵素と推定できる酵素遺伝子を見出し、その遺伝子を大腸菌で発現させ、発現産物の精製と機能・構造解析を行った。その結果、これまでにメタ酵素法を用いて、土壌からの新規耐熱性 L-ロイシン脱水素酵素の単離・同定、機能解析に成功した。また、同様な方法により新規グルタミン酸脱水素酵素やソルビトール脱水素酵素を土壌から見出すことに成功している。さらに、ゲノム情報からの遺伝子検索から、好熱菌の L-PDH、L-ヒドロキシプロリン脱水素酵素や藍藻の新規トリプトファン脱水素酵素の遺伝子を見出し、それらの遺伝子クローニング、発現産物の精製と機能解析に成功した。今後、これらの酵素を素子とする酵素電池の開発が期待できる。

電池としては、中性よりもアルカリ性や酸性条件下での電池が良好な起電力を得ることが期待できる。しかし、通常アルカリや酸性条件下では酵素は不安定であり、また微生物も増殖しにくい。そのため、アルカリ性や酸性で安定性や活性の高い、酵素や微生物の検索を行った。その結果、60℃、pH 9 で生育できる *Bacillus thermolactis* (16S rRNA の塩基配列の相同性などの特徴から同定) など数種の好熱好アルカリ菌の分離に成功した。今後、アルカリ条件下での本菌を電池素子とする高出力型微生物電池の開発への展開が期待できる。

今後の酵素電池の課題をあげると、単独の酵素反応を用いる酵素電池では、反応生成物をまだ燃料として利用できる。それをさらに利用し、利用効率を上げるためには、第 2、第 3 の酵素を利用する酵素電池が必要とされるが、そのような多酵素電極を持つ電池は現段階では難しい状況である。そこで、微生物

細胞の代謝を利用すると、未利用生物資源の炭酸ガスと水への代謝分解系で生成する NADH や FADH<sub>2</sub> などから電気を取り込む、いわゆる微生物電池が、次の研究対象として重要である。微生物電池の開発では、細胞内で生成した NADH や FADH<sub>2</sub> の電子を如何に効率よく細胞外の電極(陰極)に取り込むかが鍵となりうるのでこの電子伝達の分子機構の解明が、今後、最重要課題であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① H. Sakamoto, T. Uchii, K. Yamaguchi, A.Koto, E. Takamura, T. Satomura, H. Sakuraba, T. Ohshima, S. Suye (2015) Construction of a biocathode using the multicopper oxidase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*: towards a long-life biobattery. *Biotechnol. Lett.* **37**, 1399-1404. doi: 10.1007/s10529-015-1819-z (査読有)
- ② H. Akita, T. Seto, T. Ohshima, H. Sakuraba (2015) Structural insight into the thermostable NADP<sup>+</sup>-dependent meso-diamino pimelate dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus*. *Acta Crystallogr. D.*, **71**, 1136-1146. doi: 10.1107/S139900-4715003673 (査読有)
- ③ T. Satomura, M. Ishikura, T. Koyanagi, H. Sakuraba, T. Ohshima, S. Suye (2015) Dye-linked D-amino acid dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus* JCM 9785: characteristics and role in trans-4-hydroxy-L-proline catabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4265-4275. doi: 10.1007/s00253-014-6263-9 (査読有)
- ④ R. Ogura, T. Wakamatsu, Y. Mutaguchi, K. Doi, T. Ohshima (2014) Biochemical characterization of an L-tryptophan dehydrogenase from the photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Enzyme, Microbial. Technol.* **60**, 40-46. doi: 10.1016/j.enzmictec (査読有)
- ⑤ Y. Kanoh, S. Uehara, H. Iwata, T. Ohshima, H. Sakuraba (2014) Structural insight into glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 1271-1280. Doi: 10.1107/S1399004714002363 (査読有)
- ⑥ R. Kawakami, C. Noguchi, M. Higashi, H. Sakuraba, T. Ohshima. (2013) Comparative analysis of the catalytic components in the

archaeal dye-linked L-proline dehydrogenase complexes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3419-3427. doi: 10.1007/s00253-012-4201-2 (査読有)

⑦ H. Akita, K. Doi, Y. Kawarabayasi, T. Ohshima (2012) Creation of a thermostable NADP<sup>+</sup>-dependent D-amino acid dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 meso-diaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1693-1699. doi: 10.1007/s10529-012-0952-1 (査読有)

⑧ 大島 敏久、若松 泰介、土居 克実、松本 広重、(2012) 廃棄物生物資源を燃料とする酵素電池の開発、岩谷直治記念財団研究報告書、**35** 巻, 50-53 (査読無)

⑨ H. Sakuraba, T. Satomura, R. Kawakami, K. Kim, Y. Hara, K. Yoneda, T. Ohshima (2012) Crystal structure of novel dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *J. Biol. Chem.* **287**, 20070-20080. doi: 10.1074/jbc.M111.319038 (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

① 山崎 晃司、坂元 博昭、里村 武範、櫻庭 春彦、大島 敏久、末 信一郎(2015) 超好熱菌 *Pyrovaculum islandicum* のグルタミン酸脱水素酵素と高分子化補酵素を用いたバイオアノードの構築、日本農芸化学会平成 27 年度大会 2015 年 3 月 29 日、岡山県岡山市

② 高村 映一郎、内井 俊貴、坂元 博昭、里村 武範、櫻庭 春彦、大島 敏久、末 信一郎(2015) バイオ燃料電池のための超好熱菌 *Pyrovaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼを用いたバイオセンサーの構築、日本農芸化学会平成 27 年度大会 2015 年 3 月 29 日、岡山県岡山市

③ T. Ohshima, H. Akita, K. Doi, H. Suzuki (2014) Creation of thermostable NADP-dependent D-amino acid dehydrogenase by site-directed mutagenesis and application, International Conference of D-Amino Acid, Utsunomiya, 2014 年 9 月 2 ~5 日、日本栃木県宇都宮市

④ 吉国 翔一、若松 泰介、土居 克実、大島 敏久(2012) 色素以前性 L-プロリン脱水素酵素を用いた L-プロリン電池の開発、日本生物工学会第 19 回九州支部大会 2012 年 12 月 1 日、大分県別府市

[図書] (計 2 件)

① H. Sakuraba, T. Ohshima (2013) *Thermophiles in Environmental and Industrial Biotechnology, Thermophiles in Industrial Biotechnology, Chapter 34: Heterogeneous Production of Thermostable Proteins and Enzymes*, Springer, pp. 395-412, 2013.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

大阪工業大学 工学部生命工学科 食品微生物学研究室ホームページ

[www.oit.ac.jp/bio/labo/~ohmori/main.html](http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~ohmori/main.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 敏久 (オオシマ トシヒサ)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10093345

(2) 研究分担者

松本 広重 (マツモト ヒロシゲ)

九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・教授

研究者番号：70283413

(3) 連携研究者

櫻庭 春彦 (サクラバ ハルヒコ)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：90205823

土居 克実 (ドイ カツミ)

九州大学・農学研究院・講師

研究者番号：40253520