

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650107

研究課題名（和文）

細胞ベース起電デバイスの創製

研究課題名（英文）

Preparation of cell-based electron-generator

研究代表者

石原 一彦 (ISHIHARA KAZUHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：90193341

研究成果の概要（和文）：

細胞の固定化が可能なポリマーハイドロゲルの創製を、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を細胞親和性ユニット、ビニルフェロセンを電子メディエーターユニット、さらにビニルフェニルボロン酸を架橋ユニットとする水溶性ポリマー(PMFB)と、このポリマーと可逆的分子間反応を起こす水溶性ポリマーとして、ポリビニルアルコール(PVA)を用いて実現した。このゲル電子移動反応について、電気化学的手法により検討したところ、有効に電子伝達を起こす事を確認した。このゲルに電子産生菌であるシュワネラ菌 (*Shewanella oneidensis* MR-1) を、その活性を維持しながら固定化することができた。シュワネラ菌は、乳糖を与える事により電子を生成し、これを電極で捉える事に成功した。この事は、新しい細胞ベース起電デバイスの開発に結実する。

研究成果の概要（英文）：

The biological and electrochemical properties of redox phospholipid polymer hydrogel containing electron-generating bacterium (*Shewanella oneidensis* MR-1) were investigated herein to understand a fundamental knowledge of materials for developing a microbial fuel cell. A water-soluble and amphiphilic phospholipid polymer, poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-*n*-butyl methacrylate-co-*p*-vinylphenylboronic acid-co-vinylferrocene] (PMBVF), used as one of the components of a hydrogel matrix for encapsulation of bacteria and an electron transfer mediator, was synthesized. The hydrogel was formed spontaneously and encapsulated *shewanella* three-dimensionally when an aqueous solution of PMBVF suspended with the bacterium and an aqueous solution of poly(vinyl alcohol) (PVA) were gently mixed together. Viability evaluation demonstrated that the *shewanella* encapsulated in the PMBVF/PVA hydrogel maintained high viability levels even after long-term storage and the *shewanella* made good metabolism. The amperometric measurement showed that the PMBVF/PVA hydrogel could maintain the electron transfer efficiency even when *shewanella* was encapsulated. Thus, the PMBVF/PVA hydrogel not only provided a mild environment for long-term bacterial survival but also maintained the electron transfer efficiency from the *shewanella* to the electrode. We concluded that the hydrogel/bacteria hybrid biomaterials, such as PMBVN/PVA/*shewanella*, have

promising application to fabricate living cell-based or bacterium-based biodevices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオ起電デバイス、リン脂質ポリマー、自発形成ゲル、電子移動メディエーター、バクテリア

1. 研究開始当初の背景

新しいエネルギー源として期待されているバイオ燃料電池は、主にグルコースを分解する酵素と電子伝達物質を固定化した電極（負極）と、酸素を還元する酵素と電子伝達物質を固定化した電極（正極）で、セパレーターを挟んだ構造を持つ。一部、実用化に近づき、小型のデバイスが試作されている状況にあり、このデバイスの有効性が確認されつつある。一方において、環境の変化に対しても長期間安定して働く酵素が不可欠であり、さらに酵素の寿命を伸ばすことなどが大きな課題として残されている。これまで、酵素活性の維持について検討がなされているが、酵素固定化方法や電子メディエーター系の改善にとどまり、全く根本的な解決が実現できていない。

ここでは、酵素寿命の安定化には限界があると考え、酵素を過剰発現する細胞系を利用した全く新しい考え方により、細胞ベース起電デバイスの創製を目的とする。

研究代表者はこれまでポリマー科学を基盤として、生体親和性ポリマーバイオマテリアルの研究を遂行してきており、細胞を長期にわたり常温にて固定・保存できるハイドロゲルシステムの構築などに成功してきている。また、電極表面へ

のハイドロゲルシステムの固定化、生体親和性と電子伝達能を有する電子メディエーターの合成。さらに、最近、電極表面にナノ構造を作製することで、酵素との電子移動効率が高まることを示した。これらの基盤研究成果と、新たな細胞工学的手法を融合させることで、細胞を利用した起電デバイスの創製を発想するに至った。

2. 研究の目的

バイオマス資源をソースとした新しい細胞ベース起電デバイスの構築を、細胞工学とバイオマテリアル工学の融合により実現する。特異的な酵素タンパク質を過剰発現させた細胞を、活性を維持した状態で電極に三次元的に固定化し、細胞ベース起電デバイスの創製を目的とする。主として、酵素タンパク質からの電子移動反応の効率化、細胞親和性を持ち活性の維持に関与する細胞固定化マトリックスの合成、ナノ構造を導入した電極表面構造の制御法の開拓の観点から研究を進める。

ここでは、細胞表面の酵素タンパク質からの電子移動反応の効率化、細胞親和性を持ち、活性の維持に関与する固定化マトリックスの合成、ナノ構造を導入した電極表面構造の制御法の開拓の観点か

ら研究を進め、細胞ベース起電デバイス創製のための基礎研究を期間内に行う。

3. 研究の方法

本研究計画では、電極表面に細胞を固定化する際に利用する、細胞親和性と電子メディエーター機能を併せ持つポリマー-水素基を導出し、これに対して、光反応性PVAを反応させる。次いで、PMVBF溶液に細胞を分散させてスプレーし、これに対してPVAを積層する。細胞層を数層構築することで、効率の良い酵素反応と電子移動、さらには細胞増殖の制御を行う。酵素反応の電子移動の追跡は、電気化学的手法を利用する。

① 電子メディエーターとして動作する細胞親和性ポリマー-水素基の合成

細胞上に発現した酵素から、電子移動を効率よく行うためには、電極と細胞間に電子移動ネットワークが必要である。ここでは、常温で可逆的な分子間結合が生じるポリマー系を利用し、電極への細胞の固定化を図る。ゲルの生成と解離反応には、ポリマー分子量の影響が大きいことが明らかとなっているために、研究代表者がこれまで行ってきた細胞親和性ポリマー鎖に、電子メディエーターとなるフェロセンユニットを導入したポリマーを、ポリマー組成と分子量を規制して合成する。具体的には、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を細胞親和性ユニット、ビニルフェロセン(VFc)を電子メディエーターユニット、さらにビニルフェニルボロン酸を架橋ユニットとする水溶性ポリマー(PMBVF)を合成する。このポリマーと可逆的分子間反応を起こす水溶性ポリマーとして、ポリビニルアルコール(PVA)あるいは、MPCと糖鎖ユニットを有するメタクリレートとの共重合体を利用する。可逆的ゲル化反応と電子移動反応については、レオロ

ジー手法と電気化学的手法により検討する

② 電極表面への水素基の固定化と細胞の包埋

金を電極として、自己組織化手法で炭化水素基を導入し、これに対して、光反応性PVAを反応させる。次いで、PMVBF溶液に細胞を分散させてスプレーし、これに対してPVAを積層する。細胞層を数層構築することで、効率の良い酵素反応と電子移動、さらには細胞増殖の制御を行う。酵素反応の電子移動の追跡は、電気化学的手法を利用する。

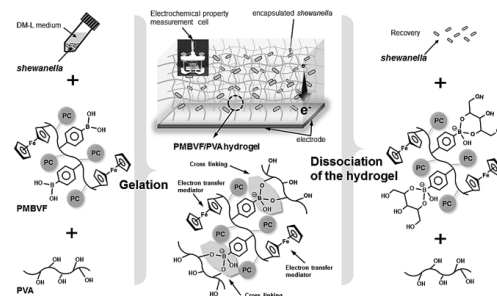


図 1. PMBVF/PVA ゲルの生成とバクテリアの固定化操作

③ 細胞培養系の検討

水素基の固定化と細胞の包埋

④ 細胞ベース起電デバイスの構築

細胞の活性と起電力の関連性を明確にし、デバイス全体の特性を向上させるパラメーターを整理する。さらに最適な基質濃度や耐久性に関する知見も集積する。

4. 研究成果

① PMBVF/PVA ハイドロゲルの特性

対応するモノマーのラジカル重合により、水溶性の PMFB を合成した。各モノマ

一ユニットの組成は、NMRにより分析し、MPC/BMA/VBA/VFc=0.71/0.06/0.12/0.11であった。このPMBVFを水に溶解し、PVA水溶液と混合することにより、ハイドロゲルを得た。このゲル化反応は細胞培養液中においても進行する事が明らかとなった。

② PMBVF/PVA ハイドロゲル内へのシュワネラ菌の固定化

電流発生バクテリアの一つであるシュワネラ菌を、PMBVF溶液に分散させ、PVA溶液と混合する事で、ハイドロゲルの形成とともに内包固定した。ゲルは網目構造を有し、シュワネラ菌の生存に必要な酸素、養分は透過することができる。

金電極表面にゲルを固定化し、この中にシュワネラ菌を内包する事で、細胞ベース起電デバイスとした。シュワネラ菌は固定化後も95%以上の生存率を有していた。

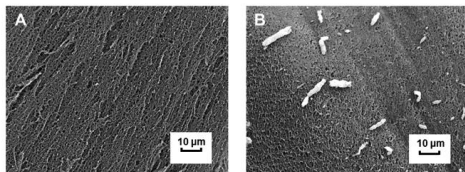


図2. ゲルの網目構造(A)と固定化されたシュワネラ菌(B)

③ PMBVF/PVA ゲルに固定化したシュワネラ菌の電気特性

ゲル内に内包されたシュワネラ菌は、電子伝達系を内部に有し、さらにゲルマトリックスの電子伝達系と連絡する事で、効果的に電極に電子輸送(電流)する事が明らかとなった。ポリマーの各ユニットの効果を検討すると、この電子伝達はフェロセン基を介して生じている事が明らかとなり、PMBVFの分子設計の有効性を確認した。

これらのことから、細胞親和性を有し、電子伝達が可能なポリマーに電流発生菌

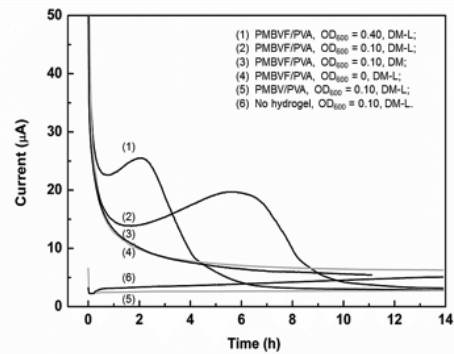


図3. PMBVF/PVA/シュワネラ菌電極の起電特性

を固定化する事で、新しい細胞ベース起電デバイスが得られることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: Enzyme oxidase-immobilized phospholipid polymer microparticles for biofuel cell application, *Trans Mater Res Soc* 36(3), 531-534 (2011)
- ② Z. Li, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: Layer-by-layer building up of redox phospholipid polymer hydrogel electrode for biosensor, *Trans Mater Res Soc* 36(3), 545-548 (2011)
- ③ Z. Li, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: Fabrication of polymeric electron-transfer mediator/enzyme hydrogel multilayer on an Au electrode in a layer-by-layer process, *Biosensor Bioelectron* 34(1), 191-196 (2012)

[学会発表] (計6件)

- ① Z. Li, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, "Layer-by-Layer Building up of Redox Phospholipid Polymer Hydrogel Electrode for Biosensor", 日本MRS学会学術大会(20101221). 横浜
- ② X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, "Oxidase-immobilized polymer microparticles coated with MPC polymer for biofuel cell application", 日本MRS学会学術大会(20101221). 横浜
- ③ X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, "Enzyme oxidase-immobilized phospholipid polymer microparticles for bio

fuel cell application ”, 高分子学会年次大会 (20110525). 大阪

- ④ X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara ” Enzyme Oxidase-immobilized Phospholipid Polymer Microparticles for Biofuel Cell Fabrication ”, 3rd Asian Biomaterials Congress (20110915). プサン (韓国)
- ⑤ Z. Li, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara ” Layer-by-Layer Building Up of Redox Phospholipid Polymer Hydrogel Electrode ”, 3rd Asian Biomaterials Congress (20110915). プサン (韓国)
- ⑥ X. Lin, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara ” Encapsulation of *Shewanella* in the Redox Phospholipid Polymer Hydrogel for Microbial Fuel Cell Fabrication ”, MRS-J年会 (20111219). 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/ishihara/theme/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 一彦 (ISHIHARA KAZUHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：90193341