

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630381

研究課題名(和文) わずかな通電で酵素活性と遺伝子発現をそれぞれ制御可能なON/OFFスイッチの開発

研究課題名(英文) Development of switch controlling enzymatic activity triggered by electricity

研究代表者

福田 秀樹 (Fukuda, Hideki)

神戸大学・その他部局等・その他

研究者番号：30263396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：代謝改変微生物を用いた有用物質生産は、バイオリファイナリーの重要分野の一つである。本研究では「通電」を新たなスイッチとして用いるために、酵素工学及び電気化学における基礎的知見を集積するとともに、遺伝子発現のツールとしての可能性を見出すことを目指した。本研究では、遺伝子発現スイッチのモデルとして、セロピオースなどの多糖に反応して酵素活性を生じる系を構築した。これらのオリゴ糖に反応して酵素活性を生じる系を構築するとともに、そのシグナルを増大させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Useful compound production is one of the important issues of biorefinery. Here, we examined enzymatic properties under electrical stimuli, based on bio-fuel cells. As a model, we developed biofuel cells responded to oligosaccharides and generate electricity. In addition, enhancement of enzymatic signals could be achieved by two-stage oxidations.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオ燃料電池

### 1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。バイオリファイナリーは、巨大な市場を創出して工業及び農林水産業を活性化しながら、化石資源への全面依存から脱却して低炭素社会を構築することができるグリーン・イノベーションである。このグリーン・イノベーションは、資源・エネルギー安全保障を確保し、地球温暖化防止に大きく貢献する重要性の高い研究分野である。

代謝改変微生物を用いた有用物質生産は、上記バイオリファイナリーの重要分野の一つである。研究代表者は、大腸菌やコリネ菌に新しい代謝経路を導入し、有機酸やジアミンなどを生産する技術の開発に成功してきた。しかし、物質生産は可能であるが、その生産量を大幅に向上させることは難しい。単純に「代謝経路を強化すればよい」というものではなく、「代謝経路全体を通してチューニングする必要性」があることが分かってきた。ところが、現状では代謝経路を調節するためのツールがほとんどない。プロモータの強化による遺伝子発現量の調節がよく用いられるが、物質生産に関する遺伝子発現、酵素活性をリアルタイムで強めたり弱めたりするツールは皆無である。そこで本研究では、「通電」を新たなスイッチとして用いるために、酵素工学及び電気化学における基礎的知見を集積するとともに、遺伝子発現のツールとしての可能性を見出すことを目指した。

### 2. 研究の目的

上述の通り、本研究では「通電」を新たなスイッチとして用いるために、酵素工学及び電気化学における基礎的知見を集積するとともに、遺伝子発現のツールとしての可能性を見出すことを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、遺伝子発現スイッチのモデルとして、セロピオースなどの多糖に反応して酵素活性を生じる系を構築した。バイオマス分解酵素をスイッチとして用い、セロピオースなどを供給することでそれらのオリゴ糖が単糖にまで分解され、それにより酸化酵素が活性化され、結果的に酸化反応が起こり電子が取り出される。その電子はバイオ燃料電池を組み立てることで容易に検出ができるため、本研究ではバイオ燃料電池をモデルとして、

これら遺伝子発現のためのツールの基礎となる基礎的検討を行った。

### 4. 研究成果

はじめに、検出感度を向上させるためにカーボンナノチューブ(CNTs)に酵素を固定化した電極を作成した。メディエーターとしてフェロセン(Fc)を用いて電極を作成し、調製したCNTs-Fcあるいは単独のFcをメディエーターに用いた際のCVの結果を図に示す。図1の結果より、Fcを単独で固定化した場合と比較して、CNTs-Fcを用いた場合において大幅な電流値増大を観測した。以上の結果より、CNTsへのFc修飾の有用性を示すことができた。

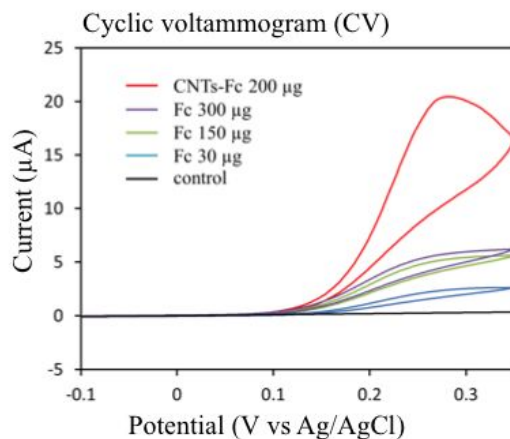


図1 CNTs-Fcのサイクリックボルタモグラム

続いて、グルコースデヒドロゲナーゼ固定化電極を作製した。サイクリックボルタモグラムの結果を図2に示す。このとき、グルコースを基質とした際には電流値の増大を観測することができるが、セロオリゴ糖を基質とした際にはBGLを固定化していないため、電流値の増大を観測することはできなかった。これは、スイッチがOFFの状態ということができる。

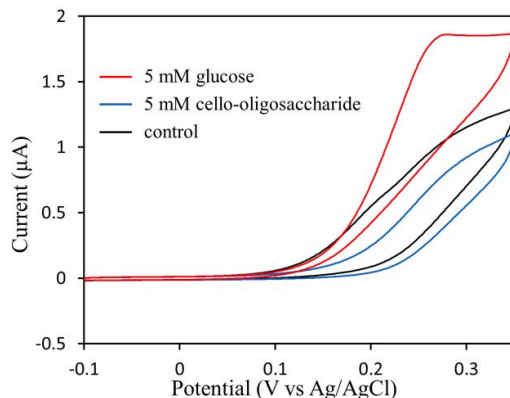


図2 GDH電極のサイクリックボルタ

## モグラム

続いて、BGL-GDH 固定化電極の作製を行い、同様に CV を測定した (図 3)。このとき、グルコースあるいはセロオリゴ糖のどちらを基質とした場合においても、電流値の増大を観測することができた。一方、GDH 固定化電極において、セロオリゴ糖を含む緩衝液中に BGL を添加した溶液を燃料として CV 測定を行ったが、電流値の増大を確認することはできなかった (data not shown)。この結果より、電極への BGL 固定化がセロオリゴ糖から効率的に電子を取り出すために有効であるということが示された。さらに、BGL-GDH 固定化電極をアノード、3-2 で述べる BOD 固定化電極をカソードとしてバイオ燃料電池を組み立て、LSV を測定した結果 (図 4)、セロオリゴ糖を燃料とする系において最大電力密度  $3.05 \mu\text{W} / \text{cm}^2$  を観測した。このとき、グルコースを燃料とする系の最大電力密度は  $4.73 \mu\text{W} / \text{cm}^2$  であった。

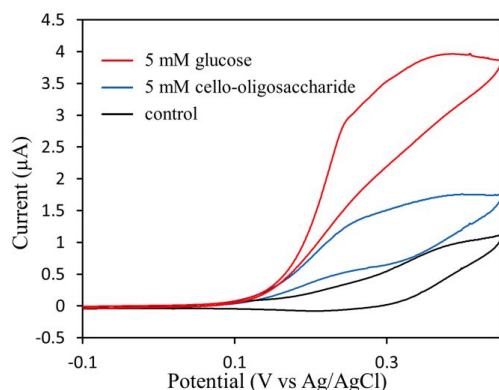


図 3 GDH-BGL 電極のサイクリックボルタモグラム

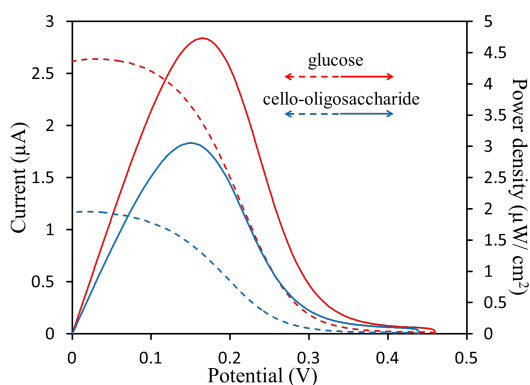


図 4 GDH-BGL 電極の LSV

さらに、電流密度の増大を目指すことで、シグナルの感度増大を試みた。まず実験で用いる Ga5DH をスクリーニングしたところ、*Xanthobacter autotrophicus* Strain Py2、*Gluconobacter oxydans*、*Streptococcus pyogenes* 由来の Ga5DH 3 種のプラスミド構築に成功した (図 5)。

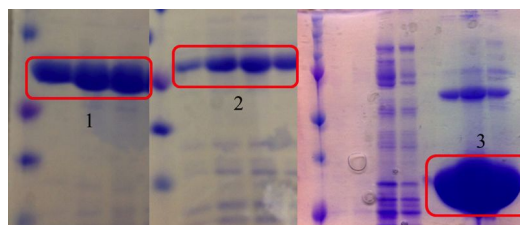


図 5 : SDS-PAGE; lane 1; Ga5DH from *Xanthobacter autotrophicus*, lane 2 Ga5DH from *Gluconobacter oxydans*, lane 3; Ga5DH from *Streptococcus pyogenes*.

続いて精製した Ga5DH の活性測定を行った。このとき、*Xanthobacter autotrophicus* Strain Py2 及び *Streptococcus pyogenes* 由来の Ga5DH の 2 種において活性があり、特に *Xanthobacter autotrophicus* Strain Py2 由来の Ga5DH の活性が高いという結果を得た。

これらの酵素を用いて、NAD 依存酵素である GDH と Ga5DH の 2 種類の酵素の働きを利用して、グルコースから二段階で電子を取り出すことの出来る新たな電極の開発を目指した。

初めに、DI の有用性について示す。GDH や Ga5DH の働きにより、 $\text{NAD}^+$  は  $\text{NADH}$  へと変換されるが、変換された  $\text{NADH}$  から直接電子を取り出し、電極へと輸送を行うことは難しい。そこで、 $\text{NADH}$  を  $\text{NAD}^+$  へと変換することの出来る DI を介入させることによって、 $\text{NADH}$  から電子を取り出し、電極へと電子を輸送することのできる系の構築を目指した。図 6 に Ga5DH-DI 固定化電極の CV の結果を示した。

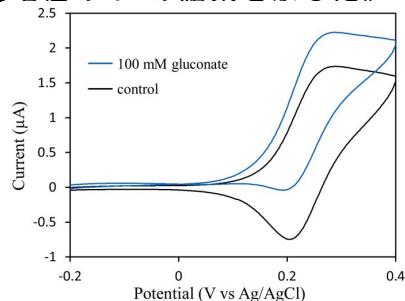


図 6 Ga5DH-DI 固定化電極の CV

また同様に、GDH-DI 固定化電極の結果を図 7 に示す。このとき用いた Ga5DH は、*Streptococcus pyogenes* 由来の Ga5DH であった。これらの結果から、DI を介した電極では酸化電流を観測できた一方で、DI を介さない電極では酸化電流を観測することはできなかった。以上より、DI による NADH 酸化系が必要であるということが示された。

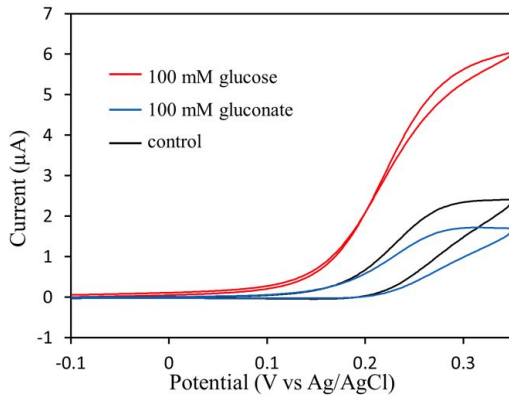


図 7 GDH-DI 固定化電極の CV

次に、GDH-DI 固定化電極と GDH-Ga5DH-DI 固定化電極について比較した。GDH-DI 固定化電極では、GDH による一段階酸化が行われ、GDH-Ga5DH-DI 固定化電極では GDH と Ga5DH による二段階酸化が行われるため、GDH-Ga5DH-DI 固定化電極でより多くの電流値が観測できると予想される。それぞれの CV の結果を図 8、図 9 に示す。GDH-DI 固定化電極では、グルコースでのみピークが観測され、GDH-Ga5DH-DI 固定化電極ではグルコース及びグルコン酸どちらにおいてもピークが観測された。さらに、グルコースのピークだけを重ねた結果を図 10 に示す。この結果から分かるように、GDH-Ga5DH-DI 固定化電極において GDH-DI 固定化電極よりも大幅な酸化電流の増大に成功した。これにより、酵素反応を用いたシグナル増強の可能性が示された。

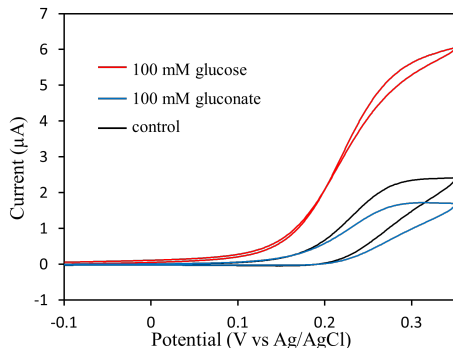


図 8 : GDH-DI 固定化電極の CV

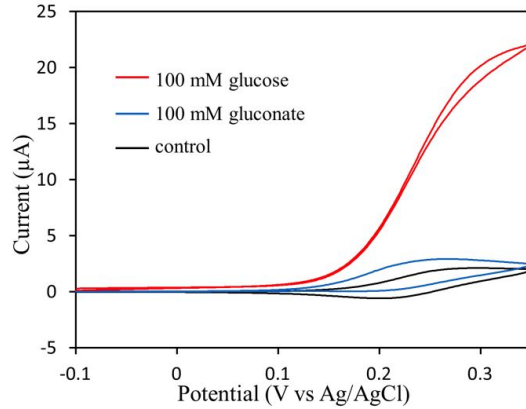


図 9 : GDH-Ga5DH-DI 固定化電極の CV

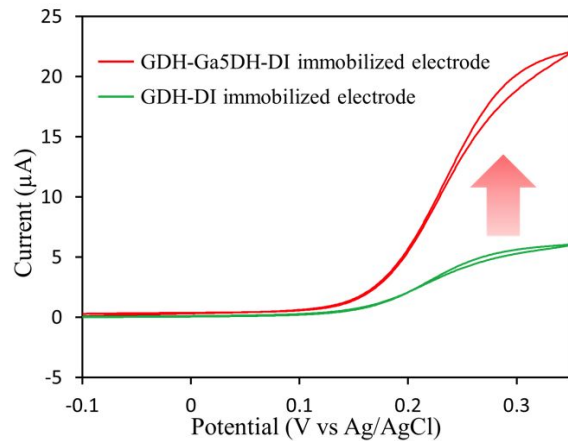


図 10 : グルコースピークの重ね合わせ

## 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 1 件 )

Matsumoto, T., Shimada, S., Yamamoto, K., Tanaka, T.\*, Kondo, A. (2013) Two-stage oxidation of glucose by an enzymatic bioanode., *Fuel Cells*, **13(6)**, 960-964

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

嶋田 翔太 ・ 松本 拓也 ・ 田中 勉 ・ 近藤昭彦 「 酵素同時固定化によるグルコースからの多段階酸化電極の開発 」 第 65 回日本生物工学会大会 2013.9.18-20. 広島

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 秀樹 (FUKUDA Hideki)  
神戸大学 学長  
研究者番号：30263396

### (2) 研究分担者

田中 勉 (TANAKA Tsutomu)  
神戸大学大学院工学研究科 准教授  
研究者番号：90436551

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：