

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660083

研究課題名(和文) バイオ燃料電池の飛躍的高出力化

研究課題名(英文) A new technique which enables the production of biofuel cells with high output

研究代表者

美川 務 (Mikawa, Tsutomu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・専任研究員

研究者番号：20321820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ燃料電池は生命の代謝過程で使用される酸化還元酵素を利用して発電するが、出力の低さからその実用化は難しいと考えられていた。本課題では、バイオ燃料電池の要である使用酵素を結晶化して電極に固定することにより、その電極上での高濃度化、高安定化、また電子のスムーズな移動の実現を介して、バイオ燃料電池の飛躍的な高出力化を試みた。結果として、正極、負極それぞれの電極において5から10倍の電流応答を得ることに成功し、本手法がバイオ燃料電池の実用化に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic biofuel cells, which mimic the metabolic pathway and employ oxidoreductases as catalysts, generate electricity when enzymes metabolize organic compounds. However, there are at least two issues to solve for the application. One is how efficiently enzymes are concentrated on electrodes, and the other is how efficiently extracted electrons are transferred to electrodes. In this study, I tried to resolve these issues by using enzyme crystals, in which enzymes are most concentrated, homogeneously located, and work normally. As a result, I have observed 10 times of current response for anode and 5 times of that for cathode. These results suggest that this new technique enables the production of a biofuel cell with high output.

研究分野：生化学

キーワード：バイオ燃料電池 バイオテクノロジー 酵素利用学

1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、安全でクリーンなエネルギーの生産が求められていた。その中でも近年注目を集めていたのがバイオ燃料電池であった。生命は有機物を摂取し、その代謝過程で驚くべき効率でエネルギーを生産している。具体的には、様々な酸化還元酵素が、主に有機物を酸化、還元することにより巧みに生命活動に必要なエネルギーを生み出している。バイオ燃料電池はこの過程を模倣した電池であり、酸化酵素と還元酵素を組み合わせることにより有機物の化学エネルギーを

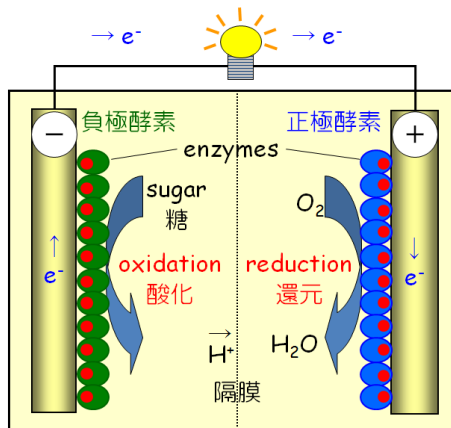


図1 バイオ燃料電池の原理

直接電気エネルギーに転換する(図1)。そのエネルギー転換効率も高く、バイオ燃料電池は安全、クリーン、高効率の未来のエネルギーと言え、その実用化に向けての研究が待たれていた。しかしながら、研究開始当初はブドウ糖を燃料に小さな電子デバイスを駆動する程度の成果は得られるのみで、その実用化にはまだ程遠い状態であった。

2. 研究の目的

本研究課題ではこれまでその低出力のために実用化が遅れていたバイオ燃料電池の出力を飛躍的に向上させることを目的として次の2つの問題の解決に取り組んできた。ひとつは「発電の要である酵素をいかに電極に高密度に存在させられるか?」であり、もうひとつは「酵素の触媒反応で取り出した電子をいかに効率良く電極に受け渡すことができるか?」であった。本問題を解決すべく、当時行われていた主な手法として、多孔性炭素電極などを利用することにより電極と酵素の接触面積を増加させることや電子の受け渡しを仲介するメディエータと呼ばれる低分子の探索や改良があげられるが、どちらの手法も既にその効果は頭打ち状態で、同手法の継続では飛躍的な出力向上を望むことは難しいと考えられた。そこで、本応募課題では、これまでとは全く異なる方法でこれら問題に挑み、同分野でのブレークスルーを試みることにした。

3. 研究の方法

X線結晶解析は目的とする蛋白質を結晶化し、その結晶にX線を照射して得られる回折像をもとに蛋白質の構造を決定する手法である。研究代表者は自身もX線結晶解析を行ってきたため、蛋白質結晶が、多くの水を含むこと、蛋白質が働ける状態であること、最も高密度化された状態であること、すべての分子が均一に整列した状態であることなどに注目し、酵素結晶を電極触媒に利用することを独自に発案した。即ち、使用酵素の高密度化がブレークスルーになりうるバイオ燃料電池において、通常溶液で使用される酵素を結晶の状態で使用するのである。こうして、高密度に均一に整列した酵素結晶を利用することにより、上述の2つの問題の解決を試みることにした。本アイデアは、これまで行われてきた改良法とは一線を画するものといえる。

4. 研究成果

(1) 使用酵素の結晶化

本課題では蛋白質がその機能を保持したまま最も高密度化に均一に配置された状態である酵素結晶を電極触媒として用いる。そこで、既にバイオ燃料電池として実績がある酵素であり、その結晶化条件が既知のアシネトパクター由来のグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)とパチルス由来のCotAラッカーゼの結晶化を試みた。まず、両酵素を大量発現して高度に精製した。そして、既知の結晶化条件をもとに結晶化条件を最適化することにより、両酵素とも1から2週間で再現性良く良質な結晶を得ることが可能になった。

(2) 酵素結晶を使用したマイナス電極の評価

バイオ燃料電池のマイナス極に使用するGDHの結晶を光硬化樹脂でカーボン電極上に固定した。その際、コントロールとして結晶に含まれる酵素と同量の溶液状態の酵素を同様に固定化した電極も用意した。次にこれら電極を用いてグルコースの酸化に伴う電流応答をポテンショスタットで測定することにより、その電極性能を比較した。その結果、コントロールと比較して酵素結晶を使用した電極では約10倍の電流応答が見られた。このことにより酵素結晶を電極に使用することにより飛躍的に電極性能が向上することが示された。

(3) 酵素結晶を使用したプラス電極の評価

バイオ燃料電池のプラス極に使用するCotAラッカーゼの結晶を光硬化樹脂でカーボン電極上に固定し、GDHの時と同様にその電極性能を評価した。その結果、コントロールと比較して酵素結晶を使用した電極では約5倍の電流応答が見られた。このことによりプラス極においても、また異なる酵素においても酵素結晶を電極に使用することにより飛躍的に電極性能が向上することが示

された。

(4) GDH 変異体 I344A の結晶化

高濃度のグルコースは GDH の活性を阻害することが明らかになった。この性質は高濃度の燃料を供給したいバイオ燃料電池には不利である。I344A 変異体はグルコースによる阻害が野生型ほどかからないため、バイオ燃料電池に使用するには都合がよい。そこでその電極に使用することと構造解析によりその機構を明らかにすることを目的としてその結晶化を行った。野生型と同条件では質のよい結晶は得られなかったが、補酵素である PQQ や銅イオンの存在化などで結晶化条件を最適化することにより良質の結晶が再現性良く得られるようになった。

(5) GDH 変異体 I344A の X 線結晶解析

I344A 変異体の X 線結晶解析を行った。その結果、分解能 1.6 Å の構造決定に成功した。I344A の構造を野生型と比較した結果、基質ポケット周辺のループの構造が大きく変化し、I344A では基質ポケットへのアクセスが容易な構造になっていた。このことからグルコースのターンオーバーが容易になり、阻害がかかりにくくなったことが示唆された。さらに本構造をもとにバイオ燃料電池に使用するのに都合のよい新たな変異体のデザインが可能になった。

(6) メタゲノム由来ラッカーゼの結晶化

マイナス極ではグルコースで阻害がかからない I344A を使用することによりその電極性能の向上が見込まれるように、バイオ燃料電池の高出力化には使用する酵素の活性も重要な因子である。そこでプラス極にもより活性の高いラッカーゼを採用することにした。これまでに発酵した堆肥を用いたメタゲノム解析によって発見されたラッカーゼ (MELAC) は安定でその酵素活性も従来のものより高かった。そこで MELAC の結晶化条件の探索を行った。384 の条件を試した結果、5 条件において結晶を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takeshi Shinohara, Shukuko Ikawa, Wakana Iwasaki, Toshiki Hiraki, Takaaki Hikima, Tsutomu Mikawa, Naoto Arai, Nobuo Kamiya and Takehiko Shibata
Loop L1 governs the DNA-binding specificity and order for RecA-catalyzed reactions in homologous recombination and DNA repair
Nucleic Acids Research, **43**, 973-986 (2015)

DOI: 10.1093/nar/gku1364

査読有

Jichuan Zhang, Ruobo Zhou, Jin Inoue, Tsutomu Mikawa and Taekjip Ha
Single molecule analysis of *Thermus thermophilus* SSB protein dynamics on single-stranded DNA
Nucleic Acids Research, **42**, 3821-3832 (2014)

DOI: 10.1093/nar/gkt1316

査読有

Dambarudhar S Hembram, Takahiro Haremaki, Jumpei Hamatsu, Jin Inoue, Hajime Kamoshida, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Tsutomu Mikawa, Nobuhiro Hayashi, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito
An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells
Biochemical and Biophysical Research Communications, **438**, 653-659 (2013)
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.127

査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

飯倉 ゆかり、篠原 起、笠置 原央、山口 祐樹、岩崎 わかな、柴田 武彦、美川 務
RecA の最小機能単位は二量体であり、dATP 存在時に組換え活性が上昇する
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 26 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

篠原 起、飯倉 ゆかり、重森 康司、柴田 武彦、美川 務
組換え活性を向上させた RecA 変異体を利用した高精度な PCR
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 26 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

美川 務

生命の代謝過程を模倣することにより発電するバイオ燃料電池の性能向上
第 4 回モデル生物丸ごと一匹学会
2014 年 9 月 27 日
大阪大学会館 (大阪府・豊中市)

山口 祐樹、飯倉 ゆかり、井上 仁、伊藤 隆、柴田 武彦、美川 務
RecA の二量体蛋白質の NMR による構造機能解析
第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3 日
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

山口 祐樹、飯倉 ゆかり、井上 仁、
伊藤 隆、柴田 武彦、美川 務
RecA の二量体蛋白質の NMR による構
造機能解析
第 13 回日本蛋白質科学会年会
2013 年 6 月 14 日
とりぎん文化会館 (鳥取県・鳥取市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：改変型の耐熱性 R e c A 蛋白質、
該タンパク質をコードする核酸分子、該
タンパク質を用いた核酸の増幅方法、及
び核酸増幅用キット
発明者：重森 康司、柴田 武彦、美川
務、篠原 起、飯倉 ゆかり
権利者：アイシン精機 (株) (独) 理化
学研究所
種類：特許
番号：PCT/JP2015/070883
出願年月日：2015 年 7 月 22 日
国内外の別：外国

名称：改変型の耐熱性 R e c A 蛋白質、
該タンパク質をコードする核酸分子、該
タンパク質を用いた核酸の増幅方法、及
び核酸増幅用キット
発明者：重森 康司、柴田 武彦、美川
務、篠原 起、飯倉 ゆかり
権利者：アイシン精機 (株) (独) 理化
学研究所
種類：特許
番号：特許出願 2014-150962
出願年月日：2014 年 7 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕

理研よこはまサイエンスカフェ
タンパク質で発電できる？
美川 務
2016 年 3 月 12 日
横浜市都筑図書館

理研ニュース 2015 年 5 月号
特集「バイオ燃料電池の世界初の実用化
を目指す」
美川 務、重森 康司

県立川崎図書館 第 41 回 サイエンス
カフェ
< 共催 理研よこはまサイエンスカフ
エ >
ただの栄養素？
世の中が変わるタンパク質研究
美川 務
2015 年 3 月 1 日
神奈川県立川崎図書館

日経産業新聞 2014 年 9 月 11 日

糖類から水素をとりだし電気を起こす
バイオ燃料電池
重森 康司・美川 務

イノベーションジャパン 2014
クリーンで安価な発電技術
重森 康司、美川 務
2014 年 9 月 11 日
東京ビックサイト

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美川 務 (MIKAWA, Tsutomu)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システ
ム研究センター・専任研究員
研究者番号：20321820

(2) 研究協力者

岩崎 わかな (IWASAKI, Wakana)
国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイ
エンス技術基盤研究センター・専任研究員
研究者番号：00332289