

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14715

研究課題名(和文) 酵素反応多段階化によるバイオ燃料電池の飛躍的高容量化

研究課題名(英文) Improvement of capacity of biofuel cells by multiplying enzymatic reactions

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ燃料電池はグルコースなどを酵素で酸化する際に電子を引き抜くことで発電する。これまでのバイオ燃料電池はグルコースを酸化して2電子を引き抜いた後、残ったグルコン酸を捨てていた。本研究では、このグルコン酸をさらに酸化させる酵素を獲得し、酵素反応を多段階化させたバイオ燃料電池を作製した。その結果、グルコースから生じたグルコン酸からさらに電子を引き抜くことが可能となり、バイオ燃料電池の容量を倍増させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic bio-fuel cells, which employ enzymes as catalysts, generate electricity when enzymes oxidize sugars such as glucose. Conventional bio-fuel cells oxidized glucose to extract two electrons and did not use the remaining gluconic acid. In this study, we obtained enzymes that oxidize gluconic acid, and made bio-fuel cells which have multi-step enzymatic reactions. As a result, we succeeded in doubling the capacity of bio-fuel cells.

研究分野：生化学

キーワード：バイオ燃料電池 バイオ電池 酵素利用学

1. 研究開始当初の背景

近年、安全でクリーンなエネルギーの生産が求められている。その中で注目を集めているのがバイオ燃料電池である。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

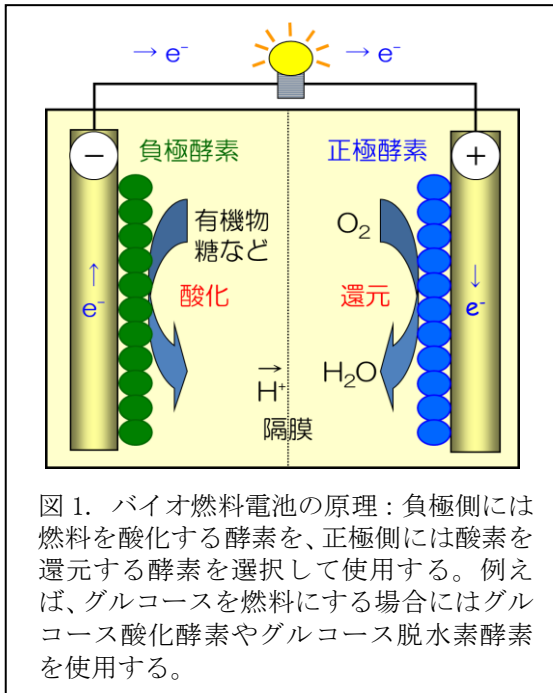


図1. バイオ燃料電池の原理：負極側には燃料を酸化する酵素を、正極側には酸素を還元する酵素を選択して使用する。例えば、グルコースを燃料にする場合にはグルコース酸化酵素やグルコース脱水素酵素を使用する。

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進められている。バイオ燃料電池の実用化に向けて考えるべき案件は大きく分けて2つあり、ひとつはいかに高出力化を図るかであり、もうひとつはいかに高容量化を図るかであった。高出力化については、研究開発時代にアイシン精機と世界トップ性能のバイオ燃料電池の製作に成功しており、その目途は立っていた。そこで、残る課題は高容量化であった。

2. 研究の目的

上述のように、バイオ燃料電池は酵素を電極触媒に利用し、糖などを代謝する過程において発生するエネルギーを電気エネルギーとして電極に取り出す。生命が効率よくエネルギーを生産しているように、グルコースの完全酸化における理論エネルギー密度は3,927 Wh/kgであり、リチウム電池の544 Wh/kgをはるかにしのぐ。現状2電子しか引き抜けないバイオ燃料電池ですら327 Wh/kgであるので、数段階でも負極酵素反応を多段階化させることができればその実用化が現実的になることは間違いない。しかしながら、

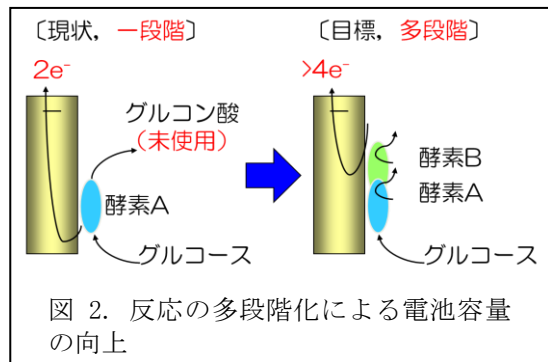


図2. 反応の多段階化による電池容量の向上

現状のバイオ燃料電池ではグルコースをグルコース脱水素酵素でグルコン酸に酸化して2電子を引き抜くだけで酸化反応は終了し、燃料の大部分を使用せずに捨ててしまっている。本研究では、負極での酸化反応を多段階化し、バイオ燃料電池の実用化に対して大きな壁になっているその容量を飛躍的に向上させる技術の確立を目指すことを目的とした(図2)。

3. 研究の方法

(1) グルコース酸化反応の二段階化：4e-を取り出せる系の確立

本研究ではバイオ燃料電池の負極における酵素反応の多段階化を行う。将来的に生体内デバイスへの応用を考え、燃料はグルコースとする。そこで、グルコースがグルコース脱水素酵素で酸化された後に生じるグルコン酸を酸化する酵素の獲得を行い、4e-を取り出せる系の確立を試みる。

① データベースを用いた候補酵素の獲得

そのアミノ酸配列が類似していることから、データベース上にグルコース脱水素酵素やグリセロール脱水素酵素と分類されているものの中にはグルコン酸を酸化する酵素も含まれている。現在までに *Pelagibacterium halotolerans* 由来のグルコース脱水素酵素はグルコン酸を5-ケト-グルコン酸に酸化することを独自に確認しているので、本酵素を獲得し、二段階目の酵素として使用できるかを検討する。

② グルコン酸を酸化する変異グルコース脱水素酵素の利用

第一段階の反応で使用している *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のグルコース脱水素酵素はグルコースしか酸化しないが、その高活性の変異体を調製する際にランダムに獲得した変異体にはグルコン酸を基質として認識するものがある。そこで、グルコン酸を基質として認識する変異体のスクリーニングを再度行い、活性が良い変異体が獲得できた場合は第二段階の酵素として使用できるかを検討する。

(2) グルコン酸を酸化する変異グルコース脱水素酵素の構造解析

実用化に向けた、多段階反応ではそのすべ

での酵素活性が高い必要がある。上述のグルコン酸を酸化する変異グルコース脱水素酵素の構造が明らかになれば、その構造をもとにさらに高機能な酵素がデザインできる可能性がある。そこで、本研究ではこの変異酵素の構造解析も行う。

(3) 4e⁻を取り出せるバイオ燃料電池の評価

実際に負極電極上に多段階反応を行う2種以上の酵素を固定し、実際にバイオ燃料電池を作製する。そして、同じ量のグルコース燃料から実際に多くの電子を引き抜くことができるか、またその容量が増大したかを検証する。

4. 研究成果

(1) *Pelagibacterium halotolerans* 由来のグルコース脱水素酵素の獲得

大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて *Pelagibacterium halotolerans* 由来のグルコース脱水素酵素の大量調製系を確立した。さらに、本酵素がグルコン酸を酸化することを確認した。しかしながら、本酵素はその可溶性に問題があり、実用レベルのバイオ燃料電池にこのまま使用するには難しいと判断した。そこで、本酵素の可溶化を試みることにした。

(2) *Pelagibacterium halotolerans* 由来のグルコース脱水素酵素の可溶化

最初に *Pelagibacterium halotolerans* 由来のグルコース脱水素酵素膜貫通領域を予測した。その結果、N末端領域を削除することにより本酵素の可溶性の向上が見込まれた。そこで、数種の異なる程度N末端領域を削除した変異体の発現系を作製した。これらの内、一種について可溶性画分に単一標品として精製することに成功した。本酵素の大量調製系を確立し、安定に大量に得ることに成功した。しかしながら、その酵素活性を評価したところ、その酸化活性は低く、実用レベルのバイオ燃料電池に使用するには難しいと判断した。本酵素はグルコン酸センサーなどとしての使用であれば全く問題なく使用できるため、異なる用途には広く使用可能だと考えられる。

(3) *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のグルコース脱水素酵素の変異体の獲得

これまでに *Acinetobacter calcoaceticus* 由来のグルコース脱水素酵素のランダム変異ライブラリーが得られている。そして、これらの中からグルコン酸を基質として認識する変異体の選抜に成功した。そこで、本酵素の変異部位を特定し、その大量調製系を確立した。その結果、この変異体はその安定性や可溶性に問題なく、安定に大量に調製できることを確認した。次に、その酵素活性を調べたところ、十分な高活性を示し、本変異酵素は実用レベルのバイオ燃料電池に使用で

きると判断した。本酵素を用いて、グルコースから4e⁻を取り出せる系の確立を試みることにした。

(4) 変異グルコース脱水素酵素の構造解析

(3)で得られた変異酵素がなぜグルコン酸を認識できるのかを調べるために、そのX線結晶構造解析を行うことにした。野生型の結晶化条件を中心にして、沈殿剤濃度やpHを変化させることにより再現性良く結晶を得ることに成功した。本結晶ではあまり分解能があがらなかったため、さらに添加剤を検討したところ、少量のアルコール類が効果的であることが明らかになった。結果として、再現性良く良質の結晶を得る条件を確立した。そして、本結晶を用いてX線結晶構造解析を行った結果、1.4Åの高分解能で本酵素の構造を決定することに成功した。得られた構造から、変異体ではグルコン酸と水溶液中で平衡状態にあるグルコノラクトンが無理なく基質結合部位に入ることが明らかになり、本変異酵素がなぜグルコン酸を基質とできるのかが明らかになった。

(5) 容量が倍増したバイオ燃料電池の作製

一段階目で使用しているグルコース脱水素酵素と上述のグルコン酸を基質とする変異酵素とを組み合わせるグルコースから2電子、その酸化物であるグルコン酸から2電子の計4電子が得られるバイオ燃料電池セルの構築を行った。まず、従来のグルコース脱水素酵素に加えて、グルコン酸を認識する変異酵素をカーボンクロスに固定した電極を作製した。そして、この電極を負極として電池セルを構築し、従来の電池セルとの性能比較を行った。一定電流負荷をかけ、その電池の駆動時間を測定したところ、約2倍の駆動時

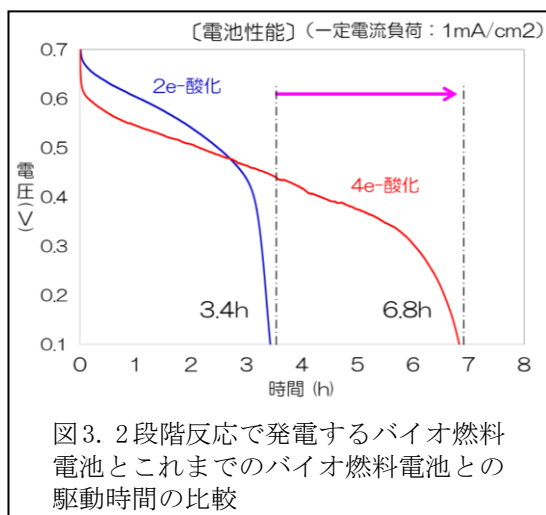


図3. 2段階反応で発電するバイオ燃料電池とこれまでのバイオ燃料電池との駆動時間の比較

間を得られた(図3)。このことから、負極の酵素反応を多段階化することにより、負極では燃料であるグルコースからより多くの電子を引き抜くことが可能になり、その結果として電池容量を約2倍にすることが可能であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

- ① 香川 亜子, 北裏 佳代, 木川 隆則, 美川 務
共培養による活性型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の簡便な調製法の確立
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
2017年12月6日
神戸ポートピアアイランド(神戸市)
- ② 美川 務
バイオ燃料電池の高出力・高容量化に向けて
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
2017年12月6日
神戸ポートピアアイランド(神戸市)
- ③ 高松 光太郎, 美川 務, 辻村 清也, 星 芳直, 四反田 功, 板垣 昌幸
ポリドーパミンによりMgO鑄型炭素上へグルコース脱水素酵素および乳酸酸化酵素を修飾したバイオアノードの作製と評価
電気化学会第84回大会
2017年3月25日
首都大学東京南大沢キャンパス(八王子市)
- ④ 香川 亜子, 北裏 佳代, 木川 隆則, 美川 務
耐熱性PQQ依存性グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)の機能解析
第39回日本分子生物学会年会
2016年12月2日
パシフィコ横浜(横浜市)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 改変型の耐熱性RecA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, 理化学研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/070883

出願年月日: 2015年07月22日

国内外の別: 外国

〔その他〕(計5件)

- ① 美川 務
ポストゲノム時代のタンパク質科学へタンパク質を使って発電できるか?
理研よこはまサイエンスカフェ
2017年12月12日

理化学研究所 横浜キャンパス

- ② 美川 務
ワークショップ1PW18(オーガナイザー)
生命のエネルギー代謝を模倣して発電するバイオ燃料電池 -生命科学の産業応用に向けて-
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
2017年12月6日
神戸ポートピアアイランド(神戸市)
- ③ 美川 務
タンパク質で発電できる?
理研よこはまサイエンスカフェ
2016年3月12日
横浜市都筑図書館
- ④ 美川 務, 重森 康司
バイオ燃料電池の世界初の実用化を目指す
理研ニュース 2015年5月号
- ⑤ 美川 務
バイオ電池
法女サイエンスカフェ
2015年10月26日
法政大学女子高等学校

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