

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04796

研究課題名（和文）微生物燃料電池の高出力化に向けた高度に機能集約した大腸菌触媒の開発

研究課題名（英文）Development of Escherichia coli catalyst with highly integrated excellent functions for high performance of microbial fuel cell

研究代表者

東 雅之（Azuma, Masayuki）

大阪公立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20285282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌を触媒とした微生物燃料電池に着目した。燃料をグルコースとした時の出力改善に向けて触媒改善に取り組んだ。先行研究では、野生株に比べて平均出力が高い遺伝子欠損株を見出し、それらの欠損を組み合わせることにより5重遺伝子欠損株（5）を開発した。本研究では、この5株をベースにして有用機能の集約を試みた。その他にも、メディエーターの色の变化から簡易的に有用変異をスクリーニングする方法の開発や、メディエーター耐性株から有用株の選抜を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ燃料電池はバイオマス由来の有機物が持つ化学エネルギーを電気エネルギーへ変換するデバイスであり、再生可能なクリーンエネルギーを生み出すシステムとして注目されている。この変換には酵素もしくは微生物が触媒として用いられる。酵素型では5 mW/mL(電池容量)程度の出力が報告されており、携帯用電源として音楽プレーヤーを可動するレベルに達している。その他にも、汗の成分を燃料にするウェアラブルデバイス用の電源が研究されている。一方、微生物を用いた微生物燃料電池も盛んに研究されており、近年の性能向上に伴い、実用化にも強い期待が寄せられている。

研究成果の概要（英文）：We focused on microbial fuel cells that use Escherichia coli as a catalyst. We carried out improving the catalyst to increase the performance when glucose is used as fuel. In previous research, we found gene-deficient strains that had higher average power than the wild-type strain and developed a quintuple gene-deficient strain (5) by combining these deletions. In this study, we attempted to integrate useful functions using this 5 strain as a base. In addition, we developed a simple method to screen for useful mutations from the color change of the mediator and selected useful strains from mediator-resistant strains.

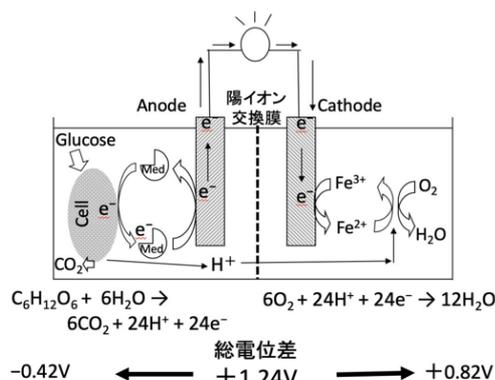
研究分野：生物学

キーワード：微生物燃料電池 微生物触媒 MFC 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

バイオマス由来の有機物が持つ化学エネルギーを電気エネルギーへ変換するバイオ燃料電池は、再生可能なクリーンエネルギーを生み出すシステムとして注目されている。この変換には、酵素もしくは微生物が触媒として用いられる。酵素型では、5 mW/mL(電池容量)程度の出力が報告されており¹⁾、携帯用電源として音楽プレーヤーを可動するレベルにあった。新たな用途として、汗の成分などを燃料にするウェアラブルデバイス用の電源が研究されていた。一方、微生物型すなわち微生物燃料電池 (Microbial fuel cell, 以降 MFC と記載)は、海外を中心に盛んに研究されていた。グルコースを燃料にする場合、微生物触媒では「グルコースを二酸化炭素と水まで完全酸化できる」「酵素を抽出精製する必要がない」「補酵素を必要としない」などの利点があり、コスト面では酵素型より有利になる。MFC 研究の歴史は古く、1911 年の微生物からの微弱な電気の検出に端を発し、近年になり電池構成要素の改善が進み、2000 年以降にその性能は大きく向上した²⁾。しかし、酵素型に比べ平均出力は低く、改善の余地がまだ残されていた。本研究では、MFC の性能向上の鍵となる微生物触媒の改善に取り組んだ。

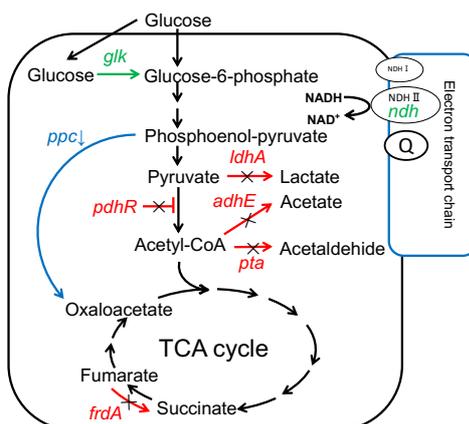
MFC は、①酵素型と同様の小型携帯電源、②廃水や廃棄物からの発電(廃棄物量の減容効果もある)、③水処理工程における有害物質検出センサー、④水田など自然環境下での発電 (エコシステム) などへの応用が期待されていた。ただし、1 セルでは電圧が低く、利用には直列に積層するあるいは昇圧装置を用いるなどが必要となる。燃料に用いるグルコースのエネルギー密度は高く、代謝によりグルコース 1 分子を完全酸化すると 24 分子の電子が得られ、反応の総電位差は 1.24 V になる (右図参照)。しかし、グルコースを細胞内に取り込み、複雑な反応を経て酸化分解するため、反応速度が遅く、得られる平均出力は低い。MFC の多くの研究はかなり低い出力レベルの中での評価にとどまっておらず、酵素型と比較するなどの評価は行われていなかった。また、出力の改善に繋がる優れた因子を系統的に重ね合わせ、触媒微生物を最適化するような育種例はほとんどなかった。従って、その改善には細胞内代謝や電子伝達機構を理解し、律速となる反応の改変を重ねていく必要があった。本研究では、MFC の触媒改変による性能向上に取り組み、グルコースを燃料とした MFC において、高クーロン効率を維持した状態で酵素型レベルの高出力を目指して研究を進めた。



2. 研究の目的

微生物触媒は純粋培養系と土壌や汚泥を用いる複合微生物系に分かれる。純粋培養系では *Shewanella* や *Geobacter* などの鉄還元菌を用いた研究が多い。これらは細胞表層に電子伝達機構を持ち、さらに電極上でバイオフィームを形成する³⁾。そのため、細胞内で生じた電子を人工的なメディエーターの添加なしで電極に移動できる。しかし、メディエーターなしでは出力はかなり低い。一方、モデル生物である酵母や大腸菌は容易に細胞改変できる。発電にはメディエーターの添加が必要だが、微生物触媒の中では比較的高い出力が得られている。電子の移動だけを考えて、細胞内のミトコンドリアに電子伝達系を持つ酵母より、外部環境に近い細胞膜に電子伝達系を持つ大腸菌の方が触媒に適していると予想される。

我々は、パン酵母を用いてグルコース燃料電池の検討を行い、mL スケールの MFC としては比較的高い出力 (負極容量あたりの最高出力が 0.8 mW/mL) を報告した⁴⁾。さらに、パン酵母での経験をもとに、大腸菌を用いて系統立てた機能集約を行い、電池用スーパー微生物の創出に取り組みその成果を報告した⁵⁾。大腸菌の中央代謝経路に関わる遺伝子の欠損を組み合わせて、高い平均出力を示す 5 重遺伝子欠損株 ($\Delta 5$) の構築に成功した。具体的には、乳酸生成に関わる *ldhA*、酢酸生成に関わる *pta*、エタノール生成に関わる *adhE*、ピルビン酸からアセチル CoA への変換に関わる *pdhR*、フマル酸からコハク酸への変換 (TCA サイクルの逆回転) に関わる *frdA* の 5 重欠損では、容積当たりの平均出力とクーロン効率が改善された。また、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸への変換に関わる *ppc* を $\Delta 5$ に導入した株では、



容積当たりの平均出力は WT より低い値まで低下したが、クーロン効率率は WT や $\Delta 5$ より高くなった。本研究ではこれら株の性能を超える触媒の開発を目指した。

3. 研究の方法

MFC は陽イオン交換膜で隔てた二槽型セルを使用し、抵抗 100Ω 、 37°C で電流と電圧を 18 時間測定した。アノード液は、大腸菌、2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン (HNQ)、グルコース、 NaHCO_3 をリン酸緩衝液に加え 7.5mL に調製した。大腸菌は LB 培地で 20 時間培養後、終濃度 5% グルコースを添加して 1 時間培養した菌体を遠心分離で回収し電池に加えた。測定前後のアノード液のグルコース量を HPLC で定量し、グルコース消費量及びクーロン効率を算出した。クーロン効率率は、1 mol グルコースから 24 mol の電子が得られた場合を 100% として計算した。

大腸菌の改変は BW25113(DE3) 株 (WT) 及びそこから構築した上記 5 重欠損株 $\Delta 5$ を用いて行った。以下の 3 つのアプローチで実施した。

- (1) 目的とする標的遺伝子を定め、 λ red 相同組換えと P1 ファージを用いた形質転換を利用して染色体改変を実施し、得られた株の出力評価を行った。
- (2) エチルメタンスルホン酸(EMS)を用いて突然変異を誘発した。得られたコロニーはメディエーター (HNQ) 溶液に加えられ、HNQ 色の変化 (還元されると橙色から無色に色が変化) を目視で判断し一次選抜した。選抜株の出力評価を実施した。
- (3) メディエーターである HNQ は大腸菌の増殖を抑制することから、 $\Delta 5$ 株をメディエーター存在下で継代培養し、その耐性株を取得し出力評価を行った。

4. 研究成果

(1) 組換え操作による改変

先行研究において、 $\Delta 5$ にホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸への変換に関わる *ppc* を導入した株では、 $\Delta 5$ に比べ容積当たりの平均出力は低下したが、クーロン効率率は高くなった。本研究では *ppc* の発現に利用している T7 プロモーターの活性を弱めた株を新たに構築し、その出力を評価した (右図参照)。平均出力は $\Delta 5$ とほぼ同等で、通常の T7 プロモーターを使用した時よりは高くなった。クーロン効率率はわずかに $\Delta 5$ より高く、通常の T7 プロモーターを使用した時より改善された。

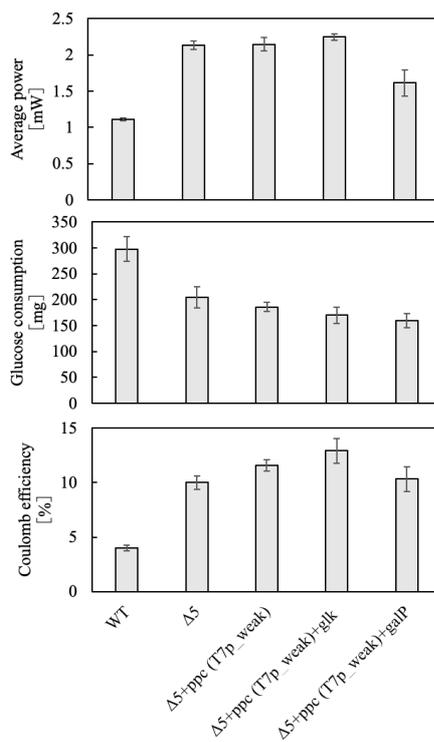
次に、グルコースの取り込みを高める目的で、この株に T7 プロモーター下で *glk* や *galP* 遺伝子を発現するように遺伝子導入し、出力評価を行った (右図参照)。しかし、両方ともグルコース消費の増加は見られなかった。*glk* の導入では、平均出力は導入前に比べて変化はなく、クーロン効率率が少し改善される傾向が見られた。*galP* の導入では、平均出力もクーロン効率も導入前に比べ低下した。

結果は示さないが、その他にも、TCA サイクルを活性化するために、電子伝達系で NADH から電子を奪う酵素をコードする *ndh* や TCA サイクルの一つの反応を触媒する酵素をコードする *sucAB* の遺伝子導入株を構築した。*ndh* では、導入前に比べグルコース消費が少し増えたが、平均出力とクーロン効率は低下した。*sucAB* では、グルコース消費、平均出力、クーロン効率の全てで導入前と比べ変化は見られなかった。

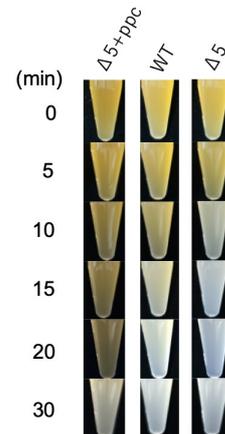
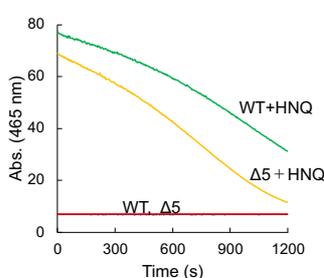
(2) ランダム変異処理とメディエーターの色の变化を組み合わせたスクリーニング

電池の測定は時間を要する上に一度に多くのサンプルを評価するのは難しい。そのため、多くの株の中から有望株を選抜するのが困難である。簡易に有望株を一次スクリーニングできれば、触媒改変が進むことが期待される。そのため、以下について検討した。

大腸菌は代謝により有機酸などを分泌し、培養に伴い培養液の pH は酸性側に变化する。また、メディエーターに使用している HNQ の色 (橙色) は pH の低下に伴い無色に変化する。この色の变化を利用し、HNQ と菌体を混合後に $\Delta 5+ppc$ 、WT、 $\Delta 5$ (平均出力: $\Delta 5+ppc < WT < \Delta 5$) で色の違いが検出されるかを調べた。条件検討した結果、HNQ 濃度を 0.01% とし、大

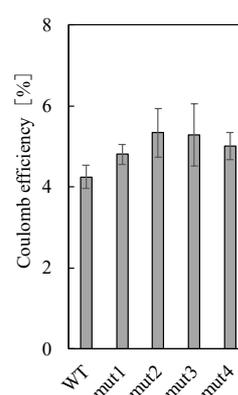
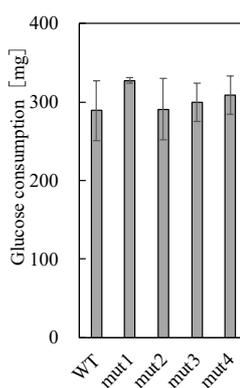
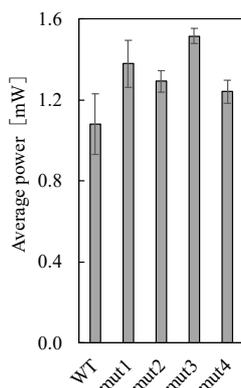
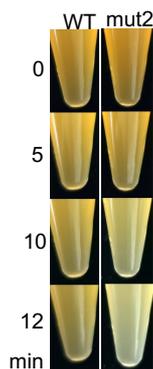


腸菌を OD₆₀₀ が 5.0 にした時に変化が見やすく、その時の色の变化の様子を右図に示す。最も平均出力が低い Δ5 では、30 分後でも完全に無色にはならなかった。次に低い WT では、30 分程度で無色になり、平均出力が高い Δ5 では、15 分後には無色となった。



WT と Δ5 を用い 465 nm の吸光度の経時変化を調べた結果、Δ5 の方が吸光度の減少速度が速かった (右図)。以上のことから、目視による簡易的な評価により、有望株の一次スクリーニングが可能であると判断した。

次に、EMS を用いて WT を変異処理し実際のスクリーニングを試みた。変異処理後に得られた 400 個のコロニーについて色の变化を解析した結果、目視で色の变化が速くなった 4 株 (mut1-4) を取得できた。mut2 の色の变化の違いを下図に示す。12 分後には mut2 の橙色が薄くなり WT と比べ明確な違いが見られた。取得した 4 株の出力評価の結果を下図に示す。4 株の平均出力は、WT に比べて全て高くなっていった。Mut3 では 1.5 倍程度高かった。グルコース消費は全ての株で WT とほぼ同等であった。結果としてクーロン効率は全ての株で WT より高くなった。これらの結果からメディエーター色の变化を指標にして簡易的に有望株を選抜することが可能であることが示された。また、mut3 の全遺伝子配列を解析した結果、グルコース代謝に関わる遺伝子にも変異が導入されており、その中に Δ5 株の 5 つの遺伝子欠損の一つである *ldhA* が含まれていた。このような解析から Δ5 に導入する新たなターゲット遺伝子が見出されることが期待される。Δ5 を変異処理して得られた 300 コロニーについても解析したが、出力が向上する株は得られなかった。今後も継続してスクリーニングを実施することで有望株の取得が期待される。

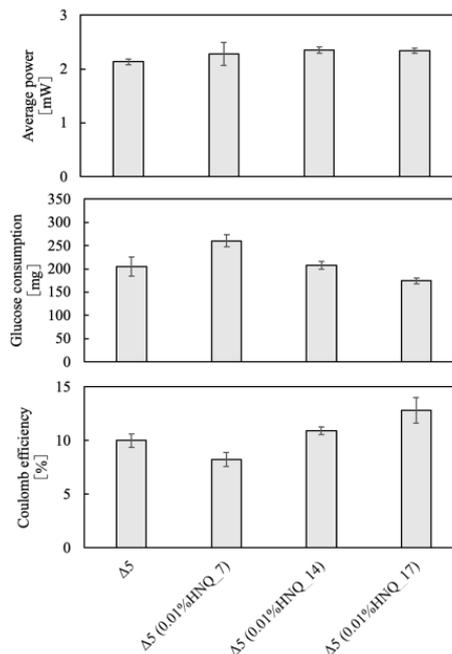


(3) メディエーター耐性株からのアプローチ

メディエーターに使用している HNQ は、その添加により大腸菌の増殖は抑制される。そのため、HNQ に対する耐性を取得することで出力の改善が期待された。Δ5 株を用いて、0.01% の HNQ を含んだ培地に、OD₆₀₀ が 0.01 になるように大腸菌を植菌し、20 時間前後培養する操作を繰り返し行った。1 回目の培養後では、OD₆₀₀ が 1 程度までしか増えなかったのに対し、3 回継代培養することで、培養後の OD₆₀₀ の値は 3 近くに達した。最終的に、17 回まで継代培養を行うことによって、培養後の OD₆₀₀ は 3.5 まで増加した。

7 回、14 回、17 回継代培養した培養液からコロニーを取得し、それらコロニーを培養して出力を評価した (右図参照)。17 回の継代により、平均出力は Δ5 に比べわずかに増加し、クーロン効率は増加することが分かった。

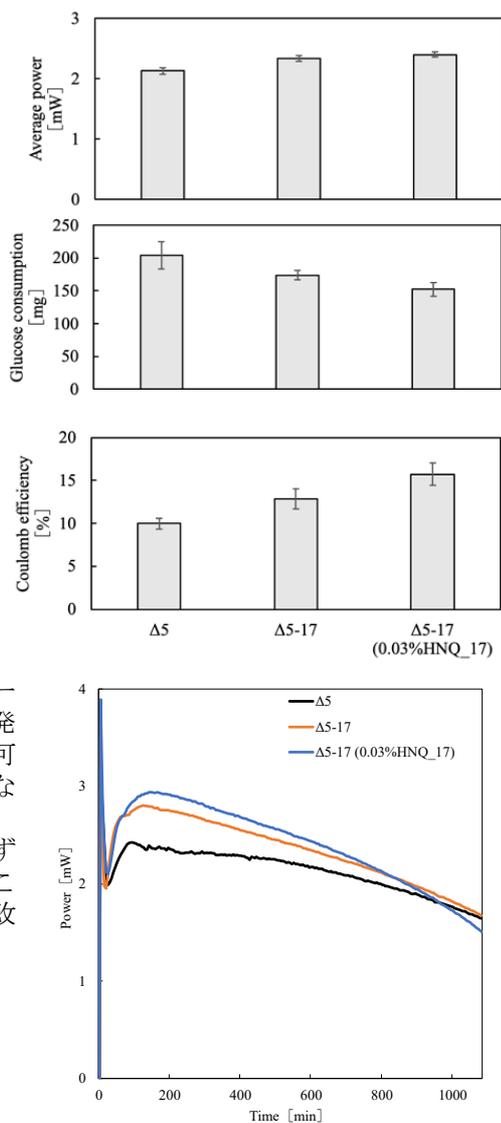
上記の結果から継代により改善が進むことが分かったため、17 回継代培養によって得られた株をもとに、0.03% の HNQ を含んだ培地を用いて、さ



らに継代培養を繰り返した。1回目の培養後では、OD₆₀₀が0.4程度までしか増えなかったのに対し、4回継代培養することで、培養後のOD₆₀₀の値は3近くに達した。最終的に、17回まで継代培養を行うことによって、培養後のOD₆₀₀は5付近まで増加した。17回継代培養した培養液からコロニーを取得し、それらコロニーを培養して出力を評価した(右図参照)。17回の継代により、平均出力は0.01%で17回継代した株と比べ変化はなかったが、クーロン効率は増加することが分かった。

以上のことからメディエーター耐性によりわずかながら平均出力の改善ができ、クーロン効率を高めることが可能であることが示された。なお、平均出力の経時変化を右下図に示す。電池測定の前半は耐性株の出力は有意に高いが、後半に出力が低下していることが分かる。この後半の低下を防止できれば平均出力も向上すると期待される。

以上、3つの取り組みから触媒に用いる大腸菌の改善を試みた。遺伝子組換えではΔ5株に導入した*ppc*遺伝子の発現量を弱めることで、Δ5株のクーロン効率を改善できることが分かった。メディエーターの色の変化を指標にした新たな触媒選抜方法を開発し、WTを用いてEMS変異処理を実施しその選抜が可能であることを実証した。新たな改変ターゲットとなる遺伝子が明らかになることが期待される。最後に、メディエーター耐性株の取得により、平均出力はわずかに改善されないが、クーロン効率は改善されることが分かった。これらの情報をもとにさらに触媒の改善が進むことが期待される。



<引用文献>

1. H. Sakai et al., *Electrochemistry*, 82(3), 156 (2014).
2. M. Azuma, Y. Ojima, *Current Topics in Biochemical Engineering (Book)*, IntechOpen, 2018.
3. 高妻篤史 他, *環境バイオテクノロジー学会誌*, 9(2), 105 (2009).
4. H. Kaneshiro et al., *BEJ*, 83, 90 (2014).
5. Y. Ojima et al., *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 43, 323 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|----------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 東 雅之, 尾島 由紘 | 4. 巻 65(5) |
| 2. 論文標題 代謝改変した大腸菌を触媒とした微生物燃料電池の検討 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 触媒 | 6. 最初と最後の頁 276-281 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 河野雄司、菊池亮太、駒大輔、大本貴士、尾島由紘、東雅之 |
| 2. 発表標題 遺伝子改変による大腸菌燃料電池の出力改善と細胞からメディエーターへの電子供与の簡易評価 |
| 3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤平 萌, 尾島 由紘, 駒 大輔, 大本 貴士, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 メディエーターの色の変化を指標にした大腸菌燃料電池の高出力化に適した変異株のスクリーニング |
| 3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 渡辺一哉 他37名 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 シーエムシー出版 | 5. 総ページ数 245 |
| 3. 書名 微生物を用いた発電および水素生産 担当箇所：中枢代謝経路を改変した大腸菌を触媒として用いた微生物燃料電池 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 尾島 由紘 (Ojima Yoshihiro) (20546957) | 大阪公立大学・大学院工学研究科・准教授 (24405) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|