

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420797

研究課題名(和文)大腸菌への機能集約によるバイオ燃料電池に最適な微生物触媒の開発

研究課題名(英文)Development of the microbial catalyst suitable for a bio-fuel cell by integrating superior functions in *Escherichia coli*

研究代表者

東 雅之(AZUMA, Masayuki)

大阪市立大学・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、バイオ燃料電池の性能が高まりつつある。本研究では、その鍵を握る微生物触媒の開発に取り組んだ。これまでに、種々の微生物触媒が検討され、各々の微生物で発電に適した機能が見いだされてきた。ここでは、それらの機能を集約した細胞を構築し、電池用スーパー微生物触媒の開発について検討した。単純なモデル生物であり、遺伝子組換え操作も容易な大腸菌を対象に、染色体改変技術を用い、そこに有益な機能を集約させた。結果として、大腸菌への機能集約や大腸菌に適した電極材料の選定により、グルコースやキシロースを燃料とする大腸菌燃料電池において、出力およびクーロン効率が改善された。

研究成果の概要(英文)：In late years performance of bio-fuel cells has been improved. In this study, the microbial catalyst that becomes a key point of the development was researched. Until now, various kinds of microbial catalysts were examined, and several superior functions that lead to improvement of the performance have been found. Here, the development of the super microbial catalyst suitable for the fuel cell was performed by the construction of the microbial cells in which those functions were integrated. *Escherichia coli* is a simple model organism and the genetically-modified operation were easy. Therefore, *E. coli* was used here, and the useful functions were integrated by using a chromosome modification technology. As a result, the power and coulomb efficiency were improved in the fuel cell using glucose or xylose as a fuel. In addition, they were improved by selection of fuel cell components suitable for *Escherichia coli*.

研究分野：生物工学

キーワード：バイオ燃料電池 微生物燃料電池 微生物触媒 微生物発電 バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料電池は、バイオマスから得られるグルコースなどの炭水化物の化学エネルギーを電気エネルギーへ変換するシステムで、再生可能なクリーンエネルギーとしても注目されている。バイオ燃料電池の研究は、1911年に微生物から微弱な電気を検出したことに端を発している。近年になり電池構成要素の技術開発が進み、とくに最近の10年でその性能は向上した。携帯用電源としても期待され、酵素を用いた燃料電池では音楽プレーヤーを可動するレベルにまで達し、実用化に近づきつつある。また、 $\mu\text{L}$ スケールの超小型燃料電池の検討も進められており、生体内の有機物を燃料とする生体内埋め込み型電源への応用が期待されている。その他にも、廃水や廃棄物からの微生物を用いた発電は、有機性廃棄物の減容に繋がり、注目を集めている。

本研究では、バイオ燃料電池のさらなる性能の向上のため、その鍵を握る触媒の開発に取り組んだ。触媒には酵素や微生物が用いられ、現状の微生物触媒では、酵素触媒に比べ得られる出力が低い。しかし、「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」などの利点がある。ここでは、改善の余地が多く残されている微生物触媒の開発に取り組んだ。現在までに種々の微生物が触媒に使用され、発電に適した機能が見いだされてきた。例えば、*Geobacter* 属や *Shewanella* 属では、細胞表層に細胞膜から細胞外へ電子を伝達する蛋白質が存在し、それらの機能が徐々に明らかにされている。しかし、一つの細胞にそれらの優れた機能を集約した例はない。本研究では、電池に適した機能の集約から、電池用スーパー微生物触媒の開発を目指した。

我々のグループは、これまでにパン酵母を触媒に用い、 $\text{mL}$ スケールの小型微生物燃料電池としては比較的高い出力を得、さらにその改良を続けてきた。また、グルコース代謝において、解糖系からエタノール発酵やグリセロール発酵に分岐する経路を阻害すると、出力が向上することを明らかにし、呼吸経路（電子伝達系）からの電子獲得が出力向上に重要であることを示唆する結果を得てきた。パン酵母を触媒に用いた理由は、酵母を材料に様々な研究を進めてきた経緯と、食経験があり安全で糖の取り込み能力が高い点にある。しかし、細胞で発生した電子を細胞外に取り出すという観点からは、電子伝達系を細胞内のミトコンドリアに持つ酵母より、細胞膜に持つ細菌のほうが適していると考えられた。

ここでは、単純なモデル生物で遺伝情報も解明され、遺伝子組換え操作も容易な大腸菌（安全性が確認されている K12 株系統）を対象に、染色体改変技術を用い、発電に適した

機能を系統立てて集約し、微生物燃料電池の出力向上を目指した。

## 2. 研究の目的

近年、バイオ燃料電池の性能が高まり、実用化に向けた研究が進められている。本研究は、その鍵を握る微生物触媒に着目した。これまでに、種々の微生物が検討され、各々の微生物で発電に適した機能が見いだされてきた。ここでは、それらの機能を集約した細胞を構築し、電池用スーパー微生物触媒の開発を目指した。大腸菌を対象に、染色体改変技術を用い、そこに有益な機能を集約することを目指した。大腸菌への機能集約と代謝制御物質の活用、電極上でのバイオフィルムの形成、大腸菌に適した電極材料の選定により、大幅な出力の改善が期待された。

大腸菌への機能集約については、「対象遺伝子の選定」と「遺伝子操作手法の選択」が重要と考えた。前者については、「グルコース代謝速度の向上」、「呼吸以外の経路への代謝の抑制」、「細胞膜上の電子伝達系から電極への電子伝達能力の向上」に関わる遺伝子などを選定し、出力の改善を目指した。後者については、大腸菌の染色体に効率的に順次多くの遺伝子を挿入する必要があり、大阪市立工業研究所の駒らが開発した染色体挿入技術を用いた (Koma D, et. al. Appl Microbiol Biotechnol, 93, 815-829, 2012)。これにより、遺伝子導入後に選択マーカーを除去でき、同じ選択マーカーを繰り返し使用し、染色体上へ複数遺伝子の導入が可能となった。以上、微生物燃料電池の触媒機能の改善から電池性能の向上に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

目標とする微生物電池の出力レベルを達成するために、まず「大腸菌に適した電池構成成分」「代謝阻害剤の添加が出力に与える影響」「大腸菌の電極上でのバイオフィルム形成」について検討した。それらの結果を踏まえ、大腸菌の染色体上での改変を進めた。遺伝子改変は、1つの細胞に順次重ねる必要がある。組み換える遺伝子を選定し、構築した組換え株は、出力やクーロン効率を測定し、有望と判断すればそれをベースに次の組換え操作を行なった。以下に実験に用いた主要な方法を記す。

### (1) 燃料電池構成成分の検討

これまでに、酵母の検討で用いた負極溶液量  $7.5 \text{ mL}$  の2槽型小型電池を使用した。正極と負極を陽イオン交換膜（例：GORE-SELECT）で仕切り、負極では緩衝液中に含まれるメディエーターが、細胞から電極への電子の運搬を担う。正極では負極から外部回路を回ってきた電子を鉄イオンで受け取り、さらにその電子と酸素と陽イオン交換膜を通過してきたプロトンが反応し水が生

成する。ここでは、酵母で最適化してきた電極液の成分組成を参考に、大腸菌での最適な成分組成を決定した。

#### (2) 出力測定条件

パソコンに接続した電流/電圧計を用い、経時的に出力を測定した。基本的にはグルコースが完全には消費されない時間内で測定を行った。測定条件は 100 の抵抗を接続した回路で温度は 37 °C とし、測定時間は 18 時間とした。電極は、通常の測定では正極に炭素棒を負極に炭素繊維を用いた。また、必要に応じて測定終了後の負極槽のグルコースやキシロースの濃度を高速液体クロマトを用いて測定し、クーロン効率を算出した。グルコースからのクーロン効率は、消費グルコース 1 分子から 24 分子の電子が獲得できた場合を 100% とし、得られた電流値と消費グルコース量からその値を算出した。また、キシロースの場合は、消費キシロース 1 分子から 20 分子の電子が獲得できた場合を 100% として算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 燃料電池構成成分の検討

これまでにパン酵母を用いて検討してきた燃料電池の構成要素を基準として、大腸菌でグルコースを燃料にした時の最適条件を検討した。その結果、負極槽に添加するメディエーター (2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン) の最適添加量は、パン酵母の最適条件と比べ 1/5 量程度でよいことが分かった。また、負極溶液への硫酸や尿素などの窒素源の添加を検討した結果、例えば硫酸 0.02% 程度の添加により、出力測定時の後半の出力低下がある程度抑制されることが分かった。また、大腸菌でのリン酸緩衝液 (pH8.0) の濃度は、0.5 M が最適であった。その他の構成要素は、パン酵母とほぼ同程度でよかった。これらの結果を踏まえて大腸菌での出力評価を行う時の電池構成要素を確定した。

#### (2) ジニトロフェノールの添加の影響

大腸菌において ATP 合成酵素の変異が、解糖系や TCA サイクルに関わる酵素の細胞内活性を高めることが以前に報告されていた。我々も、NBRC から ATPase に変異を持つ大腸菌 (Keio Collection) を購入し、出力などを評価した。その結果、購入した 9 種類の ATPase 変異株の全てで、野生株と比べ出力の変化はごくわずかだったが、上昇傾向にはあることが分かった。ジニトロフェノールは、細胞膜に作用して膜内外のプロトン濃度勾配をなくし、ATPase による ATP 合成能力を低下させることが知られている。その添加がグルコースを燃料とした時の出力に与える影響を検討した。その結果、極微量の添加により、測定時の総出力が上昇することが分かった。

上記の結果から、大腸菌において細胞内のグルコース代謝を高めることにより、出力の

改善に繋がることが強く示唆された。

#### (3) 大腸菌の電極上でのバイオフィーム形成が出力に与える影響

電極として用いる炭素棒、炭素繊維、炭素 (カーボン) クロス、活性炭シートなどの炭素材料を用い、それら材料上に大腸菌のバイオフィームを形成させた。バイオフィームの形成はクリスタルバイオレットを用いて評価した。検討した中では、カーボンクロスが最もバイオフィーム形成量が多かった。次に、新たに大腸菌を添加せずに電極上で形成したバイオフィームのみを用いて出力測定を行った。しかし、出力が極端に低く、安定した評価が行えなかった。材料表面に結合した大腸菌の量を評価した結果、最も形成量が多い場合でもこれまでの測定で負極液に添加してきた大腸菌量の 1/60 程度と推察された。従って、バイオフィームの影響については「さらなるバイオフィーム形成量の増加」や「遺伝子組換えによる細胞表面への電子移動機構の導入」などの検討が必要であり、今後への継続課題とした。

#### (4) 遺伝子欠損株の評価

NBRC より遺伝子欠損株 (Keio Collection) を購入し、一つの遺伝子の欠損が出力やクーロン効率に与える影響について調べた。グルコース代謝が上昇することが期待される 13 種類の遺伝子欠損株を選び評価した結果、いずれの株も大幅な出力変化は見られなかった。従って、一つの遺伝子欠損だけで大きな改善を望むのは難しいと判断された。13 種類の結果を細かく評価すると、測定期間の総出力について、わずかだが上昇傾向が見られた株は 4 種類、わずかに減少傾向が見られた株は 3 種類で、残りの 6 種類は野生株とほぼ変わらなかった。クーロン効率については、出力が低下しなかった 10 種類の株の中で、野生株と比べその効率が上昇するもしくはほぼ同じである菌株が 9 種類存在した。従って、出力の大幅な改善は見られなかったが、これら 9 株の欠損遺伝子は、今後遺伝子導入を行う場所として有望であると判断した。また、わずかな上昇であったが、そこから考察すると、TCA サイクルでの代謝を促進することや解糖系の分岐反応の抑制が出力改善に繋がる傾向が見られた。

#### (5) 遺伝子導入による評価

次に lac プロモーターの下流に、目的遺伝子を導入したプラスミドを構築し、そこからさらにそれら発現系を染色体上に組み換えた株を構築した。それらを用い遺伝子導入が出力に与える影響を検討した。例えば、細胞質の NADH から電子を奪い、電子伝達系へ電子を受け渡す酵素で細胞膜内外のプロトン勾配の形成は生じない NADH デヒドロゲナーゼ (NDH ) の遺伝子を (4) の結果で選ばれた候補であるフマル酸還元酵素のサブユニットの遺伝子上に導入した。その結果、18 時間での総出力もクーロン効率もどちらも上昇することが分かった。また、TCA サイク

ルの律速箇所を触媒すると考えられているイソクエン酸脱水素酵素の遺伝子を(4)から選んだ候補である乳酸脱水素酵素遺伝子に導入した。この場合も同様に両者が上昇する結果が得られた。この他にも、TCA サイクルへの代謝を促進する目的で、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸を合成するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼや、ピルビン酸からオキサロ酢酸を合成するピルビン酸カルボキシラーゼ (*Rhizobium etli* 由来) の遺伝子を導入した。また、*Shewanella* 属由来で大腸菌にはない細胞膜から細胞外へ電子を伝達する蛋白質の遺伝子の導入なども検討した。

これら結果を踏まえて、P1 ファージを用いて複数の変異を重ね合わせた株を構築し、出力などを評価した。ある条件で野生株を用いた 18 時間測定では、総出力が 1250 mW で、クーロン効率は 6.6% であった。それに対して、同じ測定条件で 5 種類の遺伝子導入を重ね合わせた有望変異株 1 では、総出力が 1720 mW でクーロン効率が 11% となった。また、6 種類の遺伝子導入を重ね合わせた有望株 2 では、総出力が 1660 mW でクーロン効率は 14.3% であった。どちらの株も総出力とクーロン効率ともに有意に改善された。しかし、遺伝子導入の重ね合わせによる顕著な相乗効果は見られておらず、結果として大幅な改善と言えるまでには至らなかった。おそらく、細胞から電子を奪う上で、律速となっている箇所の改善がまだ進んでいないことが要因と考えられた。

#### (6) キシロースからの発電について

当初の実施計画にはなかったが、グルコースと同様に木質系バイオマスから得られるキシロースを燃料とした場合の発電についても検討した。野生株では、グルコースを燃料に用いた場合と比べ、得られる総出力は低かった。しかし、クーロン効率はグルコースの場合より高かった。燃料の消費についてグルコースとキシロースが同濃度で共存した場合で測定した。両者とも測定開始時から減少する傾向が見られたが、消費速度は圧倒的にグルコースの方が速かった。

キシロース代謝を高めるため、その代謝に関わる遺伝子をプラスミド上で過剰発現させた株で測定を行った。その結果、キシロースからキシロースを合成する XylA、キシロースからキシロース 5-リン酸を合成する XylB をともに過剰に発現させると、キシロースの消費速度は高まり、総出力も上昇した。同量の糖量を含む系で測定した場合、これら遺伝子導入により、グルコースが 100 分前後でほぼ消費されるのに対し、キシロースは 500 分前後で半減する程度までキシロース代謝が改善された。

また、遺伝子欠損がキシロースを燃料とした時の発電に与える影響についても検討し、グルコースの場合と同様に、TCA サイクルを逆回転にまわすフマル酸還元酵素のサブユ

ニット FrdA の欠損で、総出力が上昇する結果が得られた。今後、木質系バイオマスのようにグルコースとキシロースが共存する状態でも高出力と高クーロン効率を維持できる菌株の構築も重要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

東雅之、細胞から電子を奪う微生物燃料電池に適した触媒の開発、化学工学会 Newsletter、査読無し、No.39 June, 2015 年、p.11-14.

〔学会発表〕(計 7 件)

福井早紀、川口太一、駒大輔、大本貴士、尾島由紘、東雅之、微生物燃料電池の性能改善に向けた触媒開発、第 1 回有機・バイオニクス研究会招待講演、2017 年 3 月 22 日、摂南大学(大阪府・寝屋川市)

東雅之、バイオ燃料電池に適した触媒微生物の開発状況、日本農芸化学会中部支部第 177 回例会ミニシンポジウム招待講演、2016 年 9 月 24 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

福井早紀、駒大輔、大本貴士、尾島由紘、東雅之、大腸菌グルコース燃料電池の出力向上を目指した糖代謝と呼吸鎖の改変、第 67 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 29 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

橋本一俊、張凱、立花太郎、東雅之、大腸菌を触媒とするキシロース燃料電池の特性、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26 日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

福井早紀、寺尾和磨、駒大輔、大本貴士、立花太郎、東雅之、代謝変異が大腸菌グルコース燃料電池の出力に与える影響、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26 日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

東雅之、微生物を触媒にしたバイオ燃料電池 - その仕組みと実用化への道 -、日本応用細胞生物学会第 12 回大会招待講演、2014 年 12 月 6 日、京都市国際交流会館(京都府・京都市)

寺尾和磨、立花太郎、東雅之、大腸菌を用いた微生物燃料電池における細胞内代謝と出力の関係、第 66 回日本生物工学会大会、2014 年 9 月 11 日、札幌コンベンションセンター、(北海道・札幌市)

〔その他〕ホームページ

<http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bie/masa/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 雅之 (AZUMA Masayuki)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20285282

(2) 研究分担者 なし