

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	足立 大宜
論文題目	Development of Direct Electron Transfer-Type Cascade System by Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases (アルコール/アルデヒド脱水素酵素による直接電子移動型カスケード反応系の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>持続可能な低炭素社会の実現に向けて、化石燃料からの脱却と再生可能な新規エネルギーの活用が求められている。生体触媒である酸化還元酵素は、穏和な条件における高い基質選択性と触媒能を有するため、効率的なエネルギー変換触媒として注目されている。また、一部の酸化還元酵素は電極反応という人工の反応系において、酵素-電極間で直接的に電子を授受することによって触媒反応を進行できる。本反応は直接電子移動 (DET: Direct Electron Transfer) 型酵素電極反応と呼ばれ、バイオセンサ/電池/リアクタなどの生物電気化学デバイスへの応用が期待されている。</p> <p>本論文では、再生可能エネルギーであるバイオマスエタノールの DET 型酵素電極反応による酸化を志向し、酢酸菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> 由来の膜結合タンパク質であるアルコール脱水素酵素 (ADH) およびアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) に注目した。酢酸菌は酢酸発酵と呼ばれる呼吸鎖電子伝達系において、ADH と ALDH を用いることで、エタノール→アセトアルデヒド→酢酸という 2 段階酸化反応を触媒する。両酵素はともにヘテロトリマー構造をとっており、ADH はピロロキノリンキノン (PQQ), ALDH はモリブデンコファクター (Moco) を触媒活性中心として基質を酸化する。そして、これらの活性中心で生じた電子が、3 つのヘム <i>c</i> (N 末端より順にヘム 1<i>c</i>, 2<i>c</i>, 3<i>c</i> と呼ぶ) を有する膜結合サブユニットを介して最終電子受容体のユビキノ-10 (UQ₁₀) を還元する移動経路が推定されている。しかし、両酵素の立体構造は不明であり、サブユニットおよびコファクターの位置やその触媒機構の関係は明らかでない。</p> <p>また、既報では ADH の DET 活性が確認されているが、電極材料の適合性や電子移動メカニズムなどの詳細は明らかではない。なお、ALDH に関する電気化学的検討は全く行われていない。そこで本論文では、構造生物学や生物電気化学の観点に基づき、ADH と ALDH による DET 型反応の基礎評価と応用展開を試みた。</p> <p>第 1 章では、ADH と ALDH の構造生物電気化学的特性評価を行った。クライオ電子顕微鏡法による単粒子像解析の結果、両酵素の立体構造を解明し、触媒活性中心から最終電子受容体である UQ₁₀ までの酵素内電子移動経路を考察した。</p> <p>次に、電気化学測定の結果、ALDH の DET 活性を明らかにした。立体構造に基づく速度論的解析により、両酵素の電極反応部位は 3 つのヘム <i>c</i> のいずれかだと推定した。ヘム <i>c</i> の酸化還元電位を変化させるシアン化物イオン (CN⁻) を添加し、両酵素の CN⁻ 配位特性を評価した。その結果、ADH の DET 活性は上昇したが、ALDH の活性は消失した。さらに、CN⁻ 存在下で ALDH は逆反応である DET 型酢酸還元活性を</p>			

示した. このように, CN⁻によるヘム c の電位変化によって酵素内電子伝達特性の違いが明らかになった.

さらに, ADH と ALDH の DET 型反応特性向上を志向し, 種々のピレン誘導体で表面を修飾したカーボンナノチューブ (CNT) を電極基盤として, 酵素配向の制御を試みた. その結果, 負電荷を有する 1-ピレンカルボン酸による DET 特性向上を確認した. また, 酵素の立体構造情報と電気化学データに基づき, 酵素-電極間の静電相互作用に着目することで, 両酵素の電極反応部位をヘム 1c と推定した.

第 2 章では, ADH と ALDH による DET 型カスケード反応系を開発した. まず, 前章で行った評価を踏まえ, 1-ピレンカルボン酸を修飾した CNT を電極基盤として, ADH・ALDH 共修飾電極を作製し, DET 型エタノール酸化電流を測定した. すると, ADH・ALDH 共修飾時に ADH 単一修飾時よりも大きな触媒電流を記録した. これは, 中間生成物であるアセトアルデヒドが ALDH によって酸化されたことを意味しており, 両酵素による DET 型カスケード反応を実証した. さらに, ADH/ALDH 比の最適化のため, 反応モデルの構築を試みた. このとき, カスケード反応による触媒電流について, 電極作製時の酵素濃度比の関数で表した理論式を構築したところ, 実験結果を支持する理論曲線が得られた. さらに, 本反応モデルのパラメータについて検討したところ, 反応中間体の捕捉率を高める酵素-電極界面の設計がカスケード反応効率の向上に特に有効であることが示唆された.

次に, 本カスケード反応を活用したバイオ燃料電池を構築した. 電池の陽極には ADH・ALDH 共修飾電極を, 陰極には DET 型酸素還元触媒のビリルビンオキシダーゼ修飾電極を用いた. 本電池の特性評価の結果, 開回路電圧 0.75 V, 最大出力密度 0.48 mW cm⁻² を記録した. この性能は, エタノールを燃料とするバイオ電池の中で最高のものであり, 既報の 10 倍以上の出力を記録した. また, 本電池によるエタノールの電解で生じた電気量と, 2 段階酸化産物である酢酸の生成量から電解効率を評価した結果, 100 ± 4% という高い電解効率を示した. 以上の通り, 高出力かつ高効率でのエタノール電解を実現した.

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字 × 3 6 行で作成し, 合わせて, 3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は, 4 0 0 ~ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ~ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

生体触媒である酸化還元酵素は、穏和な条件における高い触媒能と基質選択性を有するため、持続可能な社会の実現に向けた効率的なエネルギー変換触媒となり得る。本論文では、再生可能エネルギーであるバイオマスエタノールの効率的な酸化をめざし、酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 由来のアルコール脱水素酵素 (ADH) およびアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の特性評価を行い、両酵素によるカスケード反応系を構築し、その応用展開を試みた。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. ADH と ALDH の精密立体構造を解明し、両酵素の直接電子移動 (DET) 型酵素電極反応特性、シアン化物イオン (CN^-) 配位特性、電極表面における酵素配向を電気化学的に評価した。その結果、触媒活性中心から最終電子受容体であるユビキノン-10 までの酵素内電子移動経路を速度論と熱力学的観点から考察し、 CN^- の配位がヘム *c* を介した電子移動を変化させ、この変化が両酵素で異なることを明らかにした。また、両酵素の電極反応部位をヘム *1c* と推定した。これらの知見を踏まえ、電極材料の最適化を行い、両酵素の DET 型特性向上に成功した。
2. ADH と ALDH による DET 型カスケード反応系を開発した。実験結果を基に両酵素の吸着特性と反応中間体の濃度に着目した反応モデルを構築し、中間体の捕捉率がカスケード反応効率向上における重要なファクターであることを明らかにした。
3. カスケード反応を活用したバイオ燃料電池を構築し、既報の 10 倍以上の出力を実現すると同時に、2 段階酸化の電解効率が 100% 近いという高効率でのエタノール電解を可能にした。

以上のように、本論文では、構造生物学および生物電気化学の観点から ADH および ALDH の特性評価を行い、得られた知見を踏まえて開発した DET 型カスケード反応系を実験的かつ理論的に検証した。また、バイオ燃料電池に適用し、高出力かつ高効率でのエタノール電解を実現し、本カスケード反応系の応用展開に成功した。その成果は、今後の再生可能エネルギー変換技術の開発において有用と考えられ、生物電気化学、材料工学、酵素化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 5 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)