

氏名	かとう 加藤 寛
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1456号
学位授与の日付	平成17年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	酢酸菌を触媒とする生物電気化学エネルギー変換系の基礎検討

論文調査委員 (主査) 教授 池田篤治 教授 清水 昌 教授 加藤暢夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体エネルギー変換に関わる酵素触媒反応を電気化学反応に結びつけることによって、生体触媒反応の特色や利点を備えた生物電気化学変換系ができる。キノン化合物のような物質を媒体(メディエータ)とすることによって、酵素反応と電極反応のこのような共役反応(バイオエレクトロカタリシス反応)を実現することができ、酵素触媒反応の速度解析や、酵素触媒反応に依存した物質定量、物質変換、エネルギー変換を電気化学的に行うことができる。ところで、酢酸菌や大腸菌はそれ自身が酸化還元触媒として働き、菌体をそのまま用いてもバイオエレクトロカタリシス反応が起こることが見出されている。これら細菌の触媒作用は、細胞膜やペリプラスム空間に存在するエネルギー変換に関わる酵素の働きによるものであることが示されている。

本論文は、酢酸菌, *Acetobacter aceti* IF03284, を例にとって、細菌で見られるこのようなバイオエレクトロカタリシス反応を、酵素バイオエレクトロカタリシス反応と同様の手法で解析することを試み、細菌の電気化学触媒能を定量的に評価する方法の確立を目的としたものである。

第1章では酢酸菌懸濁液でみられるエタノール酸化触媒反応を電気化学的な方法で測定・解析することを試みている。緩衝液(pH6.5)に懸濁した酢酸菌が、2-メチル5,6-ジメトキシベンゾキノン( $Q_0$ )存在下でエタノールの電気化学酸化反応の良好な触媒として働くことを見だし、この反応において $Q_0$ がメディエータとして機能し、電極が最終電子受容体となることを示すと同時に、定常触媒電流の理論式が細菌触媒反応の場合にも適用できることを初めて実験的に検証している。さらに、細菌の酸化還元触媒能を評価するパラメータとして $k_{\text{aceti}}/K_Q$ で定義される見掛けの二分子反応速度定数が有用であることを示し、その物理的内容と細胞構造との関係に言及している。このように、通常の分光法では測定困難な細菌による触媒反応が、電気化学法によって簡便に測定でき、定量的な解析が可能であることを初めて明らかにしている。

第2章では酢酸菌を電極に固定した場合のバイオエレクトロカタリシス特性を明らかにすることを目的として、カーボンペースト電極上に酢酸菌を透析膜で被覆固定し、この電極が $Q_0$ 存在下でエタノールの酢酸への酸化に起因する触媒電流を与えることを見出すとともに、電流応答挙動の詳細な解析からこの電流が酢酸菌細胞膜中に存在するアルコール脱水素酵素(ADH)の触媒作用に起因することを示している。ここで、 $Q_0$ とその還元型( $Q_0H_2$ )が共に酢酸菌外膜を自由に透過できることから、細胞内ADHの触媒反応とカーボンペースト表面で起こる電極反応を結びつける大変有効なメディエータとして機能し得ることを実証するとともに、酢酸菌固定電極でのバイオエレクトロカタリシス反応が、酵素固定電極の場合と同様な理論式によって説明できることを明らかにしている。ついで、酢酸菌固定電極のエタノールセンサとしての特性が、ADH自身を固定した電極のセンサ特性と比べても見劣りしないものであることを示すと同時に、ADH欠損株, *Acetobacter pasteurianus* NP2503, および *A. pasteurianus* NP2503 にADH遺伝子を導入してADHを大量発現させた細菌を用いて同様の実験を行い、目的酵素を大量発現させた細菌がバイオエレクトロカタリシス反応における生体触媒として大変有望であることを実証している。

第3章では生物電気化学物質変換・エネルギー変換への利用を視野に入れ、炭素フェルトを電極とした場合のバイオエレクトロカタリシス反応の基礎検討を行っている。炭素フェルトシートで電解を行った場合、外部溶液に加えて、フェルト内部に浸透した溶液も電解を受け、電極の3次元構造を反映した特徴あるポルタンモグラムを与えることを見出しており、その電解挙動が外部液の電解に関係するパラメータ ( $A_{out}$ ) と内部液電解に関係する二つのパラメータ ( $A_{in}$ ) と ( $L$ ) の合計3つのパラメータで特性づけることが出来ることを示し、 $A_{out}$  は電極の実効外表面積に、 $A_{in}$  と  $L$  はそれぞれフェルトを構成する繊維の実効全表面積とフェルト内の平均繊維間距離に相当する量であることを明らかにしている。また、クロノアンペロメトリーがこの3つのパラメータの値を決定する有力な方法となることを示すとともに、求めた  $A_{in}/m$  の値  $0.33\text{m}^2/\text{g}$  ( $m$  はフェルト電極の重量) が炭素フェルト材について重量当たりの表面積として報告されている値にほぼ等しいこと、 $L$  の値が顕微鏡観察で測定したフェルト繊維間の平均距離に近い値であることなどから本解析法の妥当性を検証している。

第4章では酢酸菌固定電極応用の試みとして細菌呼吸作用に基づくエタノールセンサの有用性、ならびに生物電気化学水素発生の可能性を論じている。

以上、酢酸菌を用いた細菌触媒電気化学反応に関する詳細な実験とその機能解析の結果、細菌触媒によるバイオエレクトロカタリシス反応が酵素触媒による場合と同様の手法で機能解析、評価できることを明らかにしている。

### 論文審査の結果の要旨

生体エネルギー変換に関わる酵素触媒反応を電気化学反応に結びつけることによって、酵素反応と電極反応の共役反応(バイオエレクトロカタリシス反応)を実現することができ、酵素反応の速度解析や、酵素触媒作用に依存した物質定量、物質変換、エネルギー変換を電気化学的に行うことができる。また、酢酸菌や大腸菌はそれ自身が生体酸化還元触媒として働き、細菌をそのまま用いてもバイオエレクトロカタリシス反応が起こることが見出されている。

本論文は、細菌で見られるこのようなバイオエレクトロカタリシス反応を、酢酸菌を用いた場合について酵素バイオエレクトロカタリシス反応と同様の手法で解析することを試み、細菌の電気化学触媒能を評価するための定量的方法の確立を目的としたもので、評価できる点は以下の通りである。

1. 酢酸菌懸濁液の触媒反応を電気化学反応に共役させた系のバイオエレクトロカタリシス反応が、酵素触媒反応の場合と同様の手法で機能解析できることを示し、細菌の触媒能を定量的に評価する量として、見掛けの二分子反応速度定数  $k_{aceti}/K_Q$  が有用であることを実証し、その物理的内容を明確にした。
2. 細菌固定電極のバイオエレクトロカタリシス挙動は酵素固定電極の場合と同様の手法で特性づけることが出来ることを酢酸菌固定電極を例として実証した。また、遺伝子操作によって目的酵素を大量発現させた細菌が、バイオエレクトロカタリシス反応における生体触媒として大変有望であることを検証した。
3. 炭素フェルトを電極としたときの電解特性を定量的に解析し、特性を決める三つの量、 $A_{out}$ 、 $A_{in}$  と  $L$  を提案しその評価法を確立した。 $A_{in}$  と  $L$  は一定量の溶液を攪拌下電解するときの電解速度を決める重要なパラメータであり、また  $A_{in}$  は生体触媒を用いるバイオエレクトロカタリシス反応による触媒電流の大きさを決める鍵パラメータとなることを明らかにした。
4. 酢酸菌触媒による生物電気化学エネルギー変換系をエタノールセンサや水素電解生成へ利用する場合について基礎的考察を行い、展望と問題点を明確にした。

以上のように本論文は、酢酸菌を用いたバイオエレクトロカタリシス反応に関する詳細な研究に基づいて、細菌触媒によるバイオエレクトロカタリシス反応が、酵素触媒による場合と同様にして機能解析、評価できることを示すとともに、バイオセンサや生物電気化学エネルギー変換系として有望であることを明らかにしており、分析化学、応用酵素化学、応用微生物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、平成16年12月16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。