

氏名	つじむらせいや 辻村清也
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第 2636 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Studies on Energy Conversion Systems Based on Bioelectrocatalytic Reactions (生体触媒電極反応に基づくエネルギー変換系に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 加納 健司 教授 清水 昌 教授 坂田 完三

### 論 文 内 容 の 要 旨

環境保全、資源循環、脱石油の実現に向けた省エネルギー・環境調和型社会システムの構築は極めて重要な今日の問題である。その中で、化石資源以外のエネルギー源として、バイオマスへの関心が益々高まってきている。体内の血糖、飲食物、環境中の有機物など多種多様なバイオマスから直接電気エネルギーを獲得する方法のひとつが、生体内エネルギー変換系にならない、酸化還元酵素を利用した燃料電池型エネルギー変換デバイス(バイオ電池)である。バイオマスを還元剤として、酸素を酸化剤として用い、その酸化還元反応で生じるエネルギーが電気エネルギーに変換される。

本論文では、生体触媒電極反応に基づいたエネルギー変換系の基盤形成を目指して、1) バイオ電池への応用、特に酸素還元反応を強く意識した酸化還元酵素の機能評価、2) その酵素特性および生体触媒電極反応理論に基づいた酵素修飾電極の設計・製作・機能評価、3) 様々なバイオ電池の作動原理の実証およびその出力特性評価に関する研究を行った。

第1章では、マルチ銅酵素の一種であるピリルビンオキシダーゼ(BOD)に着目し、中性条件下での電気化学的な酸素の4電子還元反応の特性評価を行った。BODが中性条件下でピリルビン以外の様々な電子供与体を利用できることを見だし、その中で2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)を電子伝達メディエーターとして用いることで、少ない過電圧で大きな触媒電流を得ることに成功した。さらに、電池を最適化することを目指し、酵素触媒電極反応の特性を精査し、触媒電流を制御している因子を明らかにした。すなわち、式量電位の異なる様々なシアノ金属錯体を電子供与体に用い、酵素-基質間および酵素-酸素間の電位差に注目し、それらが酵素反応速度に及ぼす影響を調べた。ここで、電子受容体である酸素の式量電位は、溶液のpHにより変化させた。得られた酵素反応速度に及ぼす錯体の電位および溶液のpHの影響は、①錯体から酵素への電子移動、②酵素分子内の電子移動、③酵素から酸素への電子移動の3つの過程が直列の関係にあり、さらにOH<sup>-</sup>阻害も考慮したIso Ping Pong Bi Bi酵素反応機構に基づき統一的に解釈できることを明らかにした。この反応機構に基づき、電位と速度の両方の観点から最適なメディエーターを選択し、効率の良い酸素還元系を構築することを可能にした。さらに、正味で負に荷電しているシアノ金属錯体およびBODを、カチオン性ポリマーとの静電相互作用により電極表面に固定することにより、拡散律速での酸素の触媒還元反応を実現した。その酵素修飾電極の電気化学応答は、酵素固定化膜内での物質輸送、酵素反応速度、膜厚、電極反応速度などの因子により決定されることを明らかにした。さらに、三次元構造を有するカーボンフェルトを固定化担体とした場合において、4000 rpm, 0.25 Vにて17 mA cm<sup>-2</sup>というきわめて高い電流密度を得ることに成功した。

第2章では、BODと様々な炭素電極との直接電子移動反応を実現し、得られた酸素還元触媒電極反応の電流-電圧曲線を解析した。酵素単分子層を電極上に形成し、ボルタンメトリーにより酵素-電極間の直接電子移動反応を観察した。基質の枯渇が無い条件で得られた電流-電圧曲線は、電位に対しシグモイド型を示す。この挙動を理論的に検討し、それを表面酵素濃度、酵素の触媒活性、酵素の酸化還元電位、酵素-電極間の電子移動反応速度定数の関数として説明できることを示した。また、酵素をpoly-L-lysineで電極上に高濃度に固定化した結果、直接電子移動系としては非常に大きな触媒電流密度(約1 mA cm<sup>-2</sup>)を実現した。この場合、酵素が酵素固定化膜内を拡散するという反応層理論に基づいた解析式でボル

タモグラムを解析できることを示した。

第3章では、NAD 依存性デヒドロゲナーゼと共役させるための燃料酸化反応系の構築を行った。すなわち、ジアホラーゼによる NADH 酸化反応系の電極反応との共役を目指し、酵素—メディエーター間の速度および電位のロスを最小にし、かつ固定化を容易にするメディエーターの設計を行い、polyvinylimidazole に Os(2, 2'-dipyridylamine)<sub>2</sub>Cl を配位させたレドックスポリマーを合成し、NADH 酸化のための酵素機能電極を作製した。

第4章では、BOD を用いたバイオカソード反応系を利用し、中性で作動する様々なバイオ電池のプロトタイプを作製し、作動原理およびその出力特性についての基礎検討を行った。まず、水素酸化触媒能を有するヒドロゲナーゼを多く含む硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) をアノード触媒として用い、水素—酸素バイオ電池を作製した。Methylviologen をメディエーターとして用いることにより、開回路電圧は水素 / 酸素の標準酸化還元電位差 1.23 V に近い値 (1.17 V) を達成できた。グルコース—酸素バイオ電池では、グルコースデヒドロゲナーゼを、オスミウム錯体を配位させたレドックスポリマーとともに電極上へ固定化し、無隔膜型バイオ電池を作製した。また、*Synechococcus* 属の藍藻細胞を用い、光合成反応によって励起された電子を電極に渡す反応と酸素還元反応を組み合わせた光エネルギー変換系を考案した。これら電池特性を評価するにあたり、定電流条件下での電流—電圧曲線をバイオエレクトロカタリシス反応理論に基づき解析することで、電池の出力制御因子を明らかにし、その定量的解析を可能にした。基質の供給が十分である条件下での電池の出力 (電流—電圧曲線の形状) を決める因子は、主として酵素反応速度、電極と直接反応する分子の酸化還元電位、電極反応速度であることを示し、今後のバイオ電池設計指針の方向性を明示した。

第5章では、酵素反応特性評価において重要なパラメーターとなる酵素の酸化還元電位測定方法について、無隔膜全電解法という新規概念に基づく電解方法を考案し、少量のサンプルで迅速かつ簡易に電位決定できる方法を開発し、BOD の電位を決定した。

## 論文審査の結果の要旨

生体関連物質からの発電は、単に資源の問題のみならず、将来的な情報通信端末や医療分野での応用が期待され、今後ますます重要な課題となることが予想される。そのエネルギー変換システム (バイオ電池) の可能性については古くから指摘されていた。しかし、酵素—電極間の電子移動反応をも含めた作動原理や、電池出力の定量的な評価に対する基礎研究が十分でなく、また、適切な酸素還元反応系がなかったために、これまで大きな進展はなかった。

本論文は、エネルギー変換系の基盤形成を志向した、酸化還元酵素反応およびその電気化学反応の基礎および応用研究を行ったものであり、評価できる点は以下の通りである。

1. BOD を用いた中性条件下での電気化学酸素 4 電子還元反応系を構築した。本反応系は、速度論的にも熱力学的にも非常に優れている。酵素反応速度の電子供与体の式量電位および pH 依存性から、酵素反応を 3 つの素反応に分けて解釈することが妥当であることを示し、それぞれの速度パラメーターの決定因子を明らかにした。

2. 酵素機能の特性評価を適切に行い、その酵素特性を活かした修飾電極を作製した。この修飾電極を用いることで、酸素の拡散が律速過程となる非常に速い酵素電極反応を実現した。この方法論は酵素修飾電極研究の新たな指針を示すものである。また、電極素材の三次元空間を利用することで電流密度を飛躍的に増大させることに成功した。

3. BOD が電極と直接反応することを見だし、さらにその電流—電圧曲線を解析した。酵素—電極間電子移動を決定する因子を特定し、酵素—電極間直接電子移動反応特性を定量的に解析し、電池への応用に向けた反応系の改良の指針を示した。

4. 生体触媒を用いることで、水素、糖、光など様々なエネルギー源を利用できるエネルギー変換システムを構築できることを実証した。従来の発電システムでは困難とされた非常に穏やかな条件下で本システムを作動させることに成功し、また、これらバイオ電池の作動原理を明らかにした。さらに、バイオ電池の定量的特性評価を行い、出力を決定している因子を特定し、電池性能の向上や劣化対策に資する知見を得た。

5. 酵素電極反応の特性や電池の出力特性を決める重要因子の 1 つである酵素の酸化還元電位の決定方法を考案した。本方法は、従来法に比べ、測定精度や操作性が向上しただけでなく、他の各種分光測定法と組み合わせた同時測定を容易にし、

分光電気化学測定法の可能性を広げるものである。

以上のように本論文は、酵素電極反応について、その基礎的な知見を積み重ねることでエネルギー変換系への展開という新たな可能性を示したものであり、電気化学、分析化学、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、平成19年1月18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。