

酵素電極触媒型 **NADPH** 酸化反応を共役したペントースリン酸経路の再構成
Re-construction of Pentose Phosphate Pathway Coupled with a Bioelectrocatalytic NADPH Oxidation System for Bioanodes of Biofuel Cells

酒井 秀樹^a, 戸木田 裕一^a, 辻村 清也^b, 白井 理^c, 加納 健司^{*c}

Hideki SAKAI^a, Yuichi TOKITA^a, Seiya TSUJIMURA^b, Osamu SHIRAI^c, Kenji KANO^{*c}

a ソニー株式会社 (〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1 厚木 TEC)

Sony Corporation, Atsugi Tec. No.1, 4-14-1 Asahichou, Atsugi-shi, Kanagawa, 243-0014, Japan

b 筑波大学数理物質系物質工学域 (〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

University of Tsukuba, Division of Materials Science, Faculty of Pure and Applied Sciences, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan

c 京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻

(〒606-8502 京都市 左京区 北白川追分町)

Kyoto University, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Sakyo, Kyoto, 606-8502, Japan.

Corresponding author: kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp

ABSTRACT

Biofuel cell is a next-generation energy device that generates the electricity from renewable fuels such as glucose using redox enzymes as electrode catalyses. We re-constructed *in vitro* pentose phosphate pathway for 24-e oxidation of glucose-6-phosphate (G6P) into CO₂ and linked it to mediated bioelectrocatalytic NADPH oxidation system in order to improve the energy density of biofuel cells. The electrolysis efficiency reached to 40% in the G6P oxidation by adjusting the composition of the enzymes in the pathway.

Keywords : Biofuel Cell, Bioelectrocatalysis, Pentose Phosphate Pathway, Diaphorase

1. 緒言

バイオ電池は、生体エネルギー変換システムを利用した次世代エネルギーデバイスであり、理論的には身近で再生可能なエネルギー源(glucose 等)から高いエネルギー容量密度で発電できるため、安全・クリーンな電池として期待されている¹。バイオ電池は、生体触媒として微生物内にある酵素を単離して用いる酵素電池²と、微生物をそのまま用いる微生物電池³とに分類される。前者は太陽電池並みの出力密度を実現できており、医療機器等の小型機器の電源として；また後者は微生物が利用する多種多様な物質を燃料として利用できるため、廃棄物処理・発電としての応用が期待されている。ただし、実用化に向けて出力、容量、耐久性といった面でいくつかの課題がある。

これまで我々は、glucose を燃料とした酵素電池に関して、特に出力の向上に注力し、電極及び電解溶液についての技術開発を進め⁴、世界に先駆けて 10 mW/cm² の出力密度を達成した^{5,6}。また容量及び耐久性に関しても、酵素及び電極材料について開発を行い、それらの成果を報告してきた^{5,7,8}。

本論文では、容量に焦点を当てる。Glucose 1 分子の完全酸化により、理論的には 24 電子を取り出せる。しかし現状の glucose/O₂-酵素電池では、1 つの酵素 (glucose dehydrogenase 等)を用いて 2 電子分だけの電気量を取り出すのが一般的である。この系に gluconate-5-dehydrogenase を連結させることで、4 電子の取り出しが報告されているが⁵、さらに実効的な電解電子数を増加することは困難である。これに対して、生体内に存在する代謝系を人工的に構築する試みがある。例えば、tricarboxylic acid cycle (TCA 回路)を再構成し、酵素触媒型 NADH 電解酸化系と共役することによって、乳酸の 12 電子反応系で電子回収率 70%を実現されている⁹。ただし、glucose を燃料とする場合には、この TCA 回路の上流に解糖系を連結する必要がある。他に利用できる代謝系として、pentose phosphate pathway (PP 経路) (Fig. 1)が挙げられる。本経路では、glucose-6-phosphate (G6P) 1 分子が、2 つの不可逆な酸化段階と多数の可逆な非酸化過程により 24 電子酸化

され、式(1)のように還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 12 分子が生成される.



これまで、PP 経路構成酵素と hydrogenase を用いた glucose 等の H_2 へ変換系に関する報告¹⁰⁻¹³はあるが、電極反応系で定量的に電子回収率を議論した例はない. そこで本論文では、G6P を燃料とした 24 電子酸化反応系の構築を目的として、PP 経路を用いた電解反応を行った結果について報告する.

2. 実験

2.1. 試薬

PP経路に関わる酵素はFig. 1に示すとおりであり、以下、図中の酵素番号を用いて示す. これら酵素群は(株)耐熱性酵素研究所より購入した. Diaphorase (DI) は天野エンザイム(株); NADP^+ , G6P, 及びPP経路反応中間体はシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した. 電子メディエータとして用いた2-carboxy 3-amino-1,4-naphthoquinone (ACNQ, $E^\circ = -0.27 \text{ V vs. Ag|AgCl|KCl (sat.)}$, pH 7)は文献¹⁴に従って合成した.

2.2. 電解実験

バルク電解は、電気化学測定装置(ALS630A)を用い3電極式で行った. カーボンフェルト(東レ製 BO050, 厚さ 750 μm , 直径 6 mm)を3枚重ねて作用極とし、直径 0.5 mm の Pt ワイヤをリード線とした. 直径 0.8 mm の Pt ワイヤを対極、 $\text{Ag|AgCl (sat. KCl)}$ を参照電極とした. 対極及び参照電極は KCl 塩橋で作用極から隔離した. 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7, 総量 150 μL)を電解液とし、所定の酵素、補酵素、電子メディエータを加えて、Ar 置換後、スターラーで攪拌下 0.2 V, 25

°C にて電解した．理論クーロン数を $Q_t = nFN$ (n : 酸化反応過程の電子数, F : ファラデー定数, N : 物質質量), 実験的に得られるクーロン数を Q とするとき, 電子回収率は Q/Q_t , 見かけの電子数は Q/FN として表す.

2.3. キャピラリー電気泳動/質量分析(CE/MS)

PP 経路反応中間体の CE/MS 測定は(株)住化分析センターに依頼した．Agilent Technologies CE/MS システムにて, コーティングキャピラリー(ナカライテスク SMILE (+), 内径 50 μm , 長さ 100 cm)を用い, 泳動液 50 mM ammonium formate (pH 8.5), 温度 20 °C, 印加電圧 30 kV (negative mode)にて分離し, イオン化電圧 100 V で Fig. 1 に示す $m/z = 169, 199, 229, 259, 289$ のイオンを選択的に検出した.

3. 結果及び考察

3.1. G6P を燃料とした電解実験

PP 経路では, 脱水素酵素 **1** と **3** の反応により NADPH が生ずる．NADPH の電極酸化反応の過電圧は非常に大きいので, 本実験では DI を触媒とするメディアータ型酵素電極触媒反応を利用した．つまり DI により ACNQ を還元し(式 2), 還元型 ACNQ を電極で再酸化する(式 3).

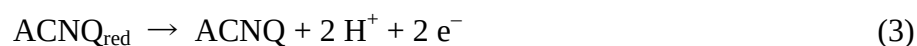
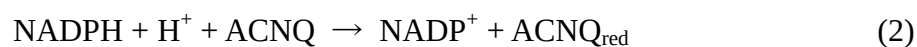


Figure 1 に示す酵素 **1**~**8** 及び DI と, NADP^+ 4.7 mM, ACNQ 30 μM を添加し, 燃料としての G6P を $N_{\text{G6P}} = 4 \mu\text{mol}$ 加えバルク電解した時の結果を Fig. 2 に示す．測定溶液に G6P を注入直後, 酸化電流の鋭い立ち上がりが観測された．この電流は PP 経路で生成された NADPH の酸化反応(式(2), (3))に由来する．バルク電解の電流 - 時間曲線は, 15 min ほどまでの急速な減少と, それに続く非常に穏

やかな減少からなる 2 相系を示した. 本条件では, PP 経路の反応速度に比べて, 式(2), (3)の反応速度が極めて大きくなるよう設定したので, 観測される酸化電流は PP 経路の脱水素酵素(1, 3)による NADPH 生成速度の和を反映する. 従って, 15 min ほどまでの急速な電流減少は, G6P の枯渇によるものと考えられる. 0~15 min の電解では見かけの電子数 $Q/FN_{G6P} = 1.9$ となったことから, この電流は主に脱水素酵素 1 の反応で生じた NADPH の電解酸化に起因する. また, 0~2 h で $Q/FN_{G6P} = 3.8$ となることから, 15 min 以降の酸化電流は, 主に脱水素酵素 3 の反応で生じた NADPH の電解酸化に起因すると推察した.

一方, 2~6 h の電流は極めて小さくその間では $Q/FN_{G6P} = 0.3$ にしか至らなかった. これらの結果から, 本条件では酵素 3 までの反応は比較的速いがそれ以降は非常に遅く, 酵素 8 の反応で生成される G6P 量は極めて少ないことが示唆された.

3.2. Ribulose-5-phosphate (Ru5P)を燃料とした電解実験

上記の考察を実証するために, 初発酸化物として G6P の代わりに Ru5P を用い, その他の条件は 3.1 節と同一にして電解実験した($N_{Ru5P} = 4 \mu\text{mol}$). Figure 2 の inset (a)に示すように, Ru5P 添加後, G6P を燃料とした場合のような鋭い電流増加は見られず, 時間と共に徐々に増大し, 1 h ほどでピークとなり, その後緩やかに減少した. この緩やかな電流増加は, PP 経路による G6P の生成を反映していると推察した. しかし, 0~6 h の電解でも $Q/FN_{Ru5P} = 0.6$ であり, 緩やかな電流現象がみられることも含めて, 時間とともに酵素活性が低下していると思われる.

続いて反応中間体の解析を行うために, 電解 6 h 後の溶液を回収し, 除タンパク後 CE/MS 測定を行った. Figure 1 に示すそれぞれの反応中間体の m/z に対応するエレクトロフェログラムを Fig. 3 に示す. Ru5P からの反応中間体としては特に, sedoheptulose-7-phosphate (S7P)のピーク面積が他と比較して大きいことがわかる. このことは, 本条件では, 酵素 7 の活性量が他の酵素と比較して小さ

いために、中間体としての S7P が蓄積し、それ以降の反応が遅いことを示唆している．ただし反応中間体として、fructose-6-phosphate (F6P)，glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)が観測されていることから、一連の G6P 再生反応は非常に遅いながらも進行していることが支持された．

3.3. G6P を燃料とした電解条件の検討

上記の考察より、PP 経路で迅速に G6P を生成させるために、酵素 7 の活性量を 10 倍に増加して再検討した．他の条件は 3.1 節のそれと同じで、G6P を初発酸化剤とした電解反応の結果を Fig. 2 の inset (b)に示す．この結果、電解開始直後に $Q/FN_{G6P} = 3.5$ に達し、電解 6 h で $Q/FN_{G6P} = 9.6$ にまで達した．酵素 7 の活性量を増加させることにより、初期脱水素酵素(1, 3)の反応速度も増加したように見える．これは、後続反応の促進により、中間体による生成物阻害が低減されたことに起因するのかもしれない．反応時間 0.1～0.7 h では Q/FN_{G6P} は時間にはほぼ比例して増加している．これが、この条件での PP 経路の定常的速度を反映していると推察できる．それ以降では、 Q/FN_{G6P} の増加速度が小さくなってきたが、これは酵素活性の低下によると考えた．

4. 結論

本研究では PP 経路を人工的に構築し、DI による NADPH の酸化系を組み込むことにより G6P の電解酸化を行った．構築した PP 経路の酵素群の中で律速段階にある酵素反応の活性を増強することで、G6P 再生反応を向上できることを確認した．G6P を燃料とした 24 電子反応に対して電子回収率 40% ($Q/FN_{G6P} = 9.6$) を達成した． $m/z = 229$ のイオンに由来する ribose-5-phosphate 及び xylulose-5-phosphate の蓄積も観測されているので、より高速な PP 経路を構築するためには、酵素 7 に加えて酵素 6 の活性の増強も有効であろう．また、多酵素連結系の反応速度を向上するにはリポゾーム等の微小空間での反応が有効で

あることが示されている^{15,16}ので、今後、多種酵素および補酵素を扱う場合、それらを含むリポゾームの電極固定法の開発も重要な課題となるであろう。

今回の成果は、**glucose** を燃料とした酵素電池の高容量化の可能性を広げるヒントになると考えられる。現時点ではまだ予備的知見であり、実用的なレベルへの展開には、酵素組成の更なる最適化や酵素の耐久性の向上が必要である。

文献

1. K. Kano (supervising editor), *Recent Progress in Biofuel Cells*, CMC Publishing (2011). [in Japanese]
2. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1793 (2007).
3. K. Watanabe, M. Miyahara, T. Shimoyama, and K. Hashimoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92** (6), 1307 (2011).
4. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2** 133 (2009).
5. H. Sakai, T. Nakagawa, H. Mita, H. Kumita, and Y. Tokita, *217th Electrochemical Society Meet. Abstr. - Electrochem. Soc.*, **1001**, 396 (2010).
6. T. Nakagawa and H. Sakai, *Nenryou Denchi*, **10** (3), 12 (2011). [in Japanese]
7. H. Kumita, H. Sakai, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Takahashi, and T. Sugiura, *238th American Chemical Society National Meet., Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc. Div. Fuel Chem.*, **54** (2), (2009).
8. K. Murata, S. Fujita, S. Yamanoi, H. Sakai, and Y. Tokita, *221th Electrochemical Society Meet. Abstr.*, **1201**, 1428 (2012).
9. S. Tsujimura, J. Fukuda, O. Shirai, K. Kano, H. Sakai, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *Biosens. Bioelectron.*, **34**, 244 (2012).
10. J. Woodward, S. M. Mattingly, M. Danson, D. Hough, N. Ward., and M. Adams, *Nature Biotechnol.*, **14**, 872 (1996).
11. J. Woodward, K. A. Cordray, R. J. Edmonston, M. Blanco-Rivera, S. M. Mattingly, and B. R. Evans, *Energy Fuels*, **14**, 197 (2000).
12. J. Woodward, M. Orr, K. Cordray, and E. Greenbaum, *Nature*, **405**, 1014 (2000).
13. Y.-H. P. Zhang, B. R. Evans, J. R. Mielenz, R. C. Hopkins, M. W. W. Adams,

PLoS ONE, **2**, e456 (2007).

14. Y. Goto and Y. Tokita, Japan Patent Kokai 2008-303149. [in Japanese]
15. R. Matsumoto, M. Kakuta, Y. Goto, T. Sugiyama, H. Sakai, Y. Tokita, T. Hatazawa, S. Tsujimura, O. Shirai, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 13904 (2010).
16. S. Fujita, R. Matsumoto, K. Ogawa, H. Sakai, A. Maesaka, Y. Tokita, S. Tsujimura, O. Shirai, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 2650 (2013).

Figure Captions

Figure 1. The pentose phosphate pathway for glucose-6-phosphate (G6P) oxidation. Enzyme **1**; G6P dehydrogenase (EC 1.1.1.49), **2**; 6-phospho gluconolactonase (EC 3.1.1.31), **3**; phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44), **4**; ribose-5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6), **5**; ribulose-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1), **6** and **6'**; transketolase (EC 2.2.1.1), **7**; transaldolase (EC 2.2.1.2), **8**; G6P isomerase (EC 5.3.1.9).

Figure 2. Current (i , solid curve) and apparent number of electron (Q/FN , broken curve) as a function of the electrolysis time (t) for electrolysis of 4 μmol G6P ($N_{\text{G6P}} = 4 \mu\text{mol}$). The total activities of the enzymes (**1** to **8** and DI) were **1**: 6.4 U, **3**: 7 U, **4**: 0.3 U, **5**: 11.2 U, **6**: 0.2 U, **7**: 0.1 U, **8**: 26.5 U, and DI: 40 U. The electrolysis was done at 0.2 V and at 25 °C in phosphate buffer (pH 7.0) containing NADP^+ (4.7 mM) and ACNQ (30 μM). Inset (a) shows i and Q/FN vs. t for electrolysis of 4 μmol Ru5P ($N_{\text{Ru5P}} = 4 \mu\text{mol}$). The other conditions are identical with those in Fig. 2. Inset (b) shows the time course of Q/FN in mediated bioelectrocatalysis of G6P ($N_{\text{G6P}} = 4 \mu\text{mol}$). The broken curve shows that in Fig. 2. The electrolysis conditions of the solid curve were identical with those in Fig. 2 except enzyme **7**, of which the total unit is 10 times larger than that in Fig. 2.

Figure 3. The electropherograms using selected ion-monitoring technique in CE/MS. The sample was taken from the 6 h-electrolysis solution shown in inset (a) of Fig. 2. The target analyte of each electropherogram is (a) m/z ; 259 (glucose-6-phosphate and fructose 6-phosphate), (b) m/z ; 229 (ribulose 5-phosphate, ribose 5-phosphate and xylulose 5-phosphate), (c) m/z ; 199 (erythrose 4-phosphate), (d) m/z ; 169 (glyceraldehyde-3-phosphate), and (e) m/z ; 199 (sedoheptulose-7-phosphate).

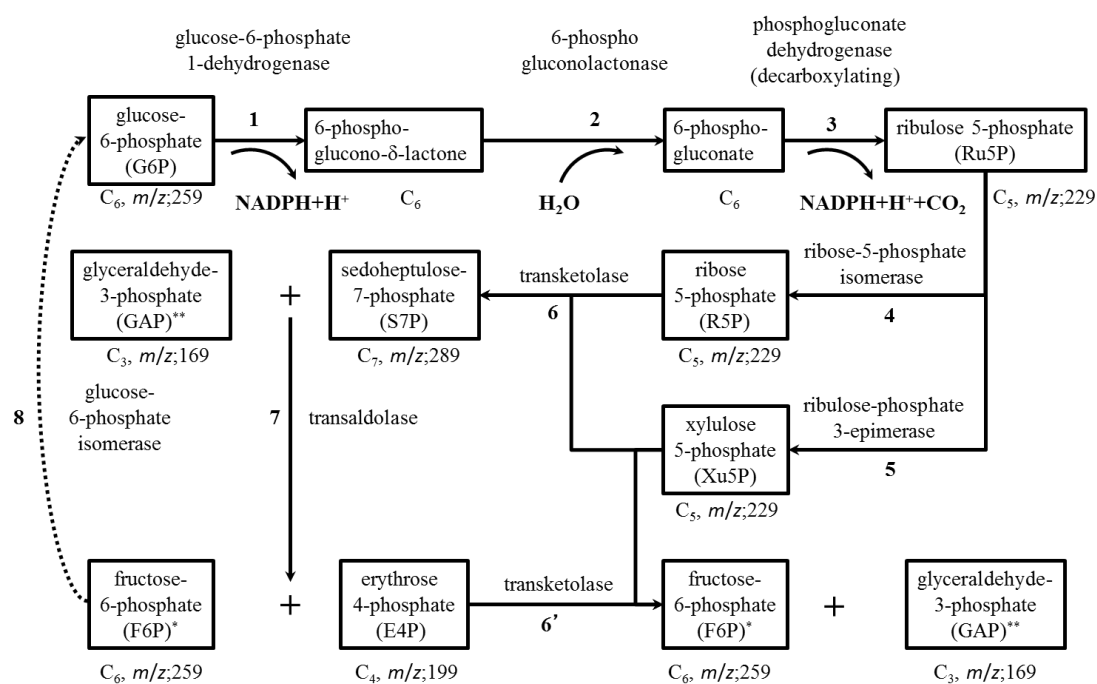


Figure 1

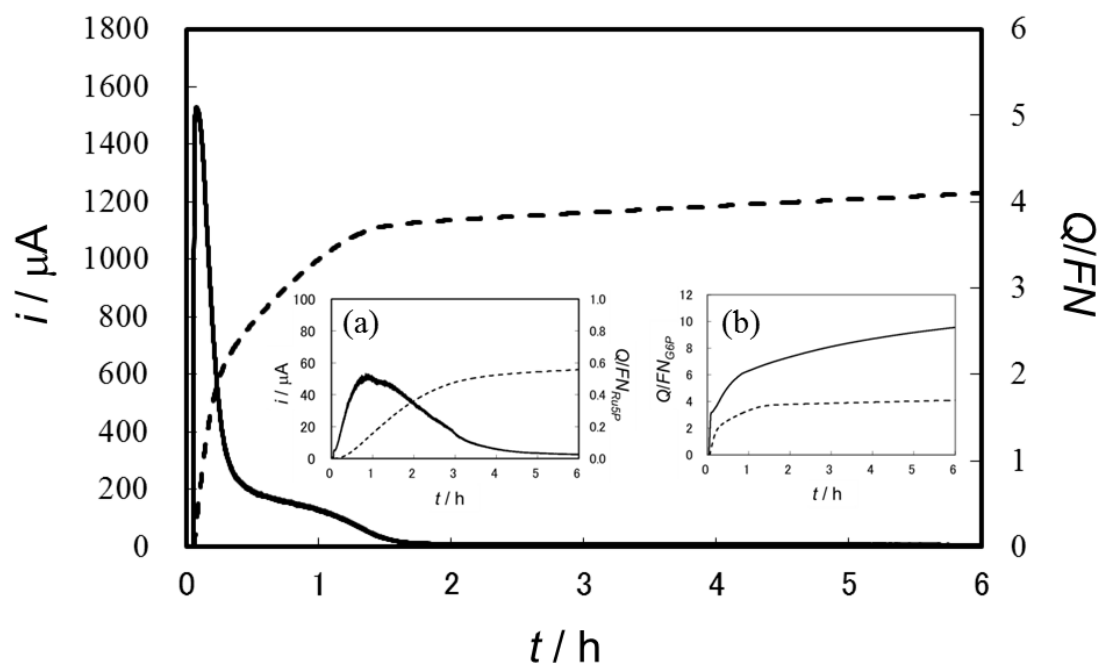


Figure 2

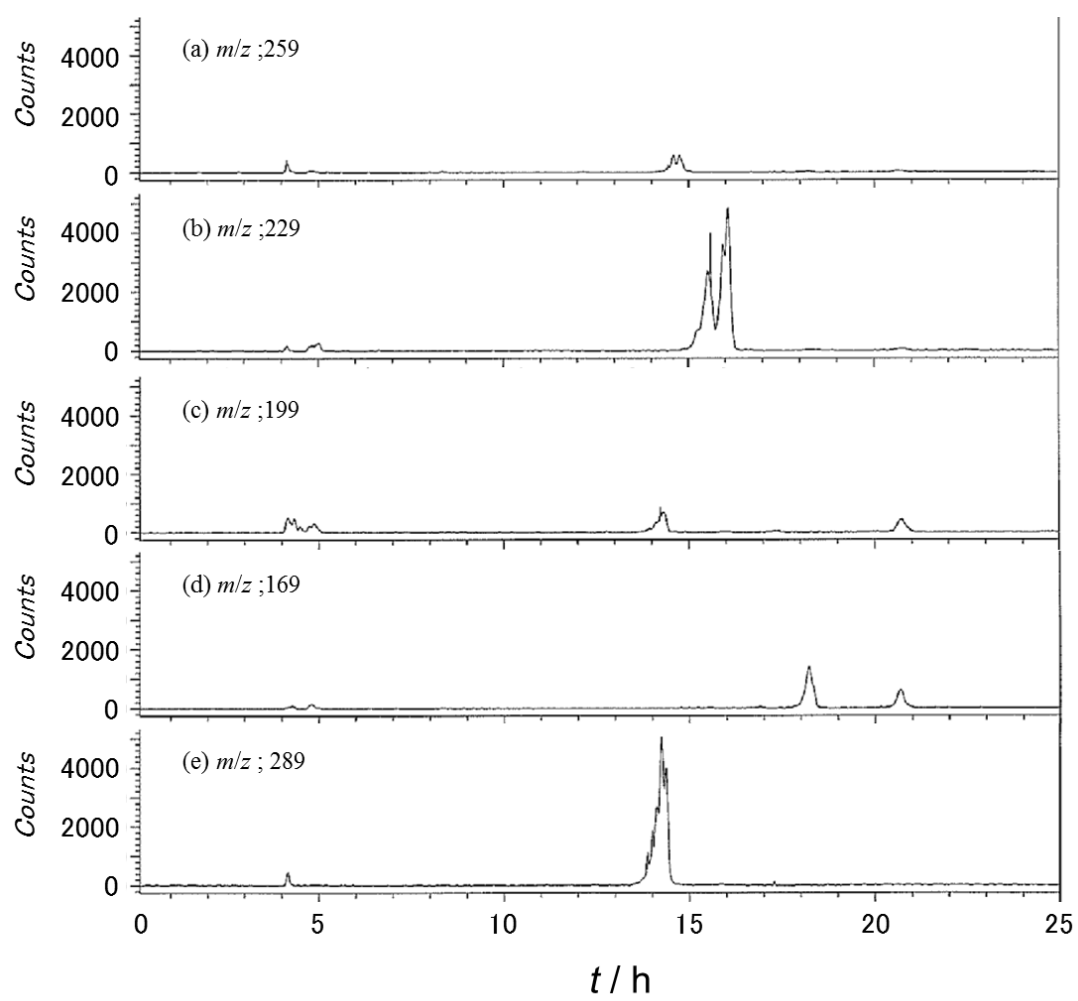


Figure 3