

氏 名	かみ たか ゆう じ 上 高 雄 二
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1607 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 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	Characterization of Biofuel Cells Based on Direct Electron Transfer Reaction between Enzymes and Electrodes (酵素電極間直接電子移動反応に基づくバイオ電池の特性評価)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 納 健 司 教 授 植 田 和 光 教 授 宮 川 恒

論 文 内 容 の 要 旨

近代社会における産業の発展、生活の多様化に伴い、エネルギー需要は益々高まってきている。エネルギー資源の中でも化石燃料は枯渇の一途を辿っており、代替エネルギー資源および新規なエネルギー変換システムの開発に期待が寄せられている。バイオ電池は、酵素触媒機能を有する電極反応に基礎をおいた次世代型エネルギー変換システムとして位置付けられている。このシステムでは、糖、アルコール、アミンなど様々なバイオマス資源を燃料とし、それらの酸化反応を酸素の還元反応と組み合わせることで電気エネルギーを取り出すことができる。バイオ電池の基礎となる酵素機能電極反応において、酵素—電極間の電子移動には、メディエータを介する様式と、メディエータを介さず直接進行させる様式の二種類がある。後者の直接電子移動（DET）反応に基づくものは究極の酵素機能電極反応系と考えられている。しかし、そのような電極反応の実現例は少なく、反応特性や反応機構も不明な点が多い。また、DET 反応のバイオ電池への応用はこれまでほとんどなされていない。

本論文では、DET 型でかつ高出力なバイオ電池の構築を目的として、DET 型の酵素機能電極反応系を探索するとともに、酵素—電極間の電子移動機構や電池出力の決定因子について検討し、得られた知見をもとに隔膜の無い一室型のバイオ電池を構築し、その電池特性を評価した。

第1章では、バイオ電池カソードとして、電極に吸着させたマルチ銅酸化酵素（MCO）により触媒される生物電気化学的な酸素の四電子還元反応について検討した。ウルシと白色腐朽菌由来のラッカーゼ、および糸状菌由来ピリルビンオキシダーゼ（BOD）の三種類の MCO について電気化学測定した。いずれの MCO を用いても酵素と電極間での DET 反応に起因する触媒還元電流を観測できることを明らかにした。触媒還元電流はそれぞれのタイプ I 銅部位の酸化還元電位付近から増加しはじめたことから、電極から MCO への電子移動反応はタイプ I 銅を経由していると結論した。また、タイプ I 銅の軸配位子を部位特異的に変異させ、酸化還元電位を変化させた BOD を用い、その電気化学特性を評価した。この変異体 BOD では酸化還元電位が負側にシフトし、触媒電流はその電位付近から増加しはじめた。この結果も DET 反応がタイプ I 銅を経由して進行するという考え方を支持する。得られた触媒電流—電圧曲線を、吸着系の反応モデルから導かれる理論式に基づいて解析した。その結果、電極上に吸着した酵素の触媒反応速度定数は変異体 BOD の方が野生型に比べ大きいと結論した。同様の傾向は、溶液内酵素反応に関する触媒反応速度定数についても観測された。これらの結果から、部位特異的な変異によるタイプ I 銅の酸化還元電位の負側へのシフト（熱力学的反応駆動力の増加）が、酵素内電子移動速度を促進したものと結論した。また、DET 反応と酵素の吸着挙動との関係を明らかにするため、水晶振動子微量天秤法（QCM）により、電極への BOD の吸着挙動を評価した。測定溶液中に BOD を添加すると周波数が減少し、やがて一定値となった。この過程での周波数の減少値から、吸着量は $1 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ 程度と評価され、BOD は電極上に単分子吸着していると結論した。また、金電極を用いて QCM 測定と同時に電気化学測定した結果、吸着量が一定になった以降でも触媒電流値が緩やかに減少した。このことから、少なくとも金電極表面では、吸着した BOD が電極表面上で経時的に失活すると結論し

た。

第2章では、バイオ電池アノードとして電極に吸着したD-フルクトース脱水素酵素(FDH)により触媒される生物電気化学的なフルクトース酸化反応について検討した。分光電気化学法により、ヘムcの酸化還元電位を38 mV (vs. Ag|AgCl)と評価した。FDHを電極に吸着させて電気化学測定した結果、基質であるD-フルクトース共存下では酸化触媒電流が観測され、DET反応が進行することを明らかにした。このとき、触媒電流はヘムcの酸化還元電位付近から増加しはじめたことから、酵素と電極との電子移動反応はヘムcを介して進行すると結論した。電池の高出力化のためには電流密度を向上させる必要がある。一方、酵素吸着型反応モデルを考慮した場合、酵素と電極との反応速度定数、酵素触媒反応定数および電極表面上の酵素の吸着量が電流密度の決定因子となる。そこで吸着量の増大を目的として、ケッチェンブラック(KB)を電極表面に固定化し、単位面積当たりの吸着サイトを増大させた。この電極にFDHを吸着固定させ電気化学測定したところ、KB未修飾の電極と比較して3桁ほど大きな約10 mA cm⁻²の電流密度でD-フルクトースを電解酸化できることを明らかにした。

第3章では、以上の知見をもとに、カソードとアノードの両極ともにDET型酵素触媒反応に基づくフルクトース/酸素バイオ電池を構築し、その電池特性を評価した。アノード触媒としてFDHを用い、これをKB固定化電極に吸着固定した。カソード触媒としては、FDHの至適pHおよび熱力学的な観点から白色腐朽菌由来のラッカーゼ(TsLAC)を選択した。アノードと同様に、KB固定化電極への吸着固定を試みたが、電極との反応性が悪く期待した電流密度は得られなかった。そこで諸条件を検討したところ、TsLACの固定化には粒内に数十nm程度のメソ孔を持つ多孔性の炭素材料であるカーボンゲル(CG)が非常に有効であることを見出した。この酵素修飾法により、回転電極条件下においても酸素の物質輸送が律速となる高性能な触媒還元反応系を実現した。このCGを利用した酵素固定化電極と裸の白金電極とで、酸素還元挙動を比較した。酵素固定化電極では白金電極に比べ約500 mV高い電位において酸素還元触媒電流が観測され、酸素の過電圧を大幅に低減できることを示した。以上の知見をもとにプロトタイプのバイオ電池を作成した。溶液を攪拌し、酸素供給量を増大させた条件下で、開回路電圧790 mV、最大出力850 μW cm⁻²という優れた出力特性を得ることに成功した。

論文審査の結果の要旨

近年、化石燃料の枯渇が危惧される中、代替エネルギー変換システムの開発が期待されている。酵素を電極触媒とするバイオ電池は、バイオマスを利用した新規なエネルギー変換システムとして位置付けられている。既往の研究では、酵素—電極間の電子移動にメディエータを介する反応系を利用したバイオ電池が数多く報告されている。しかしこの原理のバイオ電池では、メディエータの固定化に関する問題点などが指摘されており、期待される電池特性は得られていない。

本論文では、酵素—電極間の直接電子移動(DET)反応による酵素機能電極反応を電気化学理論に基づいて解析し、出力決定因子を検討するとともに、DET型の新規なバイオ電池を構築し、その特性評価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. 各種のマルチ銅オキシダーゼ(MCO)が、酸素の四電子還元反応の電極触媒として機能することを明らかにした。また、酵素の吸着挙動と電気化学信号の解析から、MCOのタイプI銅部位が、DET反応の電子移動部位であると結論した。さらに、酵素中の電極との電子移動部位の酸化還元電位が、電池作動時の端子間電圧の重要な決定因子のひとつとなることを示した。
2. タイプI銅部位に部位特異的変異を導入したビリルビンオキシダーゼの電気化学特性を評価し、電流—電圧曲線を吸着系の反応モデルの理論式により解析し、変異による酸化還元電位の負側へのシフトが酵素内電子移動速度を促進することを示した。
3. 水晶振動子微量天秤法により、酵素が電極上に単分子吸着することを示した。また、電気化学測定と組み合わせることで金電極上における電極反応時の酵素の安定性に関する知見を得た。
4. 燃料酸化のためのDET型触媒としてD-フルクトース脱水素酵素(FDH)に注目し、その酸化還元電位を測定し電気化学信号を解析した。その結果、DET型触媒反応は本酵素のヘムc部位を介して進行することを示した。
5. MCOとFDHを、それぞれ多孔性炭素修飾電極に吸着固定させることにより、それらの触媒電流密度を従来に比べ

て3桁ほど向上させることに成功し、多孔性炭素の重要性を指摘した。このようなカソード反応系の改良により、酸素の物質輸送が律速となる酵素触媒系を実現し、白金触媒以上に酸素の過電圧を低減できることを示した。

6. フルクトースを燃料とする隔膜の無い一室型のバイオ電池を初めて構築し、その電池特性を評価した。既往の研究における電池特性を大幅に上回るバイオ電池を構築した。

以上のように本論文は、酵素—電極間の直接電子移動に基づく酵素触媒電極反応系について電気化学的に解析し、それらの電子移動反応機構と出力決定因子を明らかにするとともに、高出力なバイオ電池を構築することに成功したものであり、電気化学、材料化学、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2月8日、論文なら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。