

戦略的国際科学技術協力推進事業
日本－中国研究交流
研究課題「酵素バイオ電池」

研究終了報告書

研究交流期間
平成19年12月～平成23年3月

研究代表者：大坂武男
(東京工業大学・大学院総合理工学研究科 教授)

1. 研究・交流の目的

本共同研究は、生体触媒である酵素を用いる“酵素バイオ燃料電池 (Enzyme-Based Biofuel Cells)”の実用化のための電気化学的および生物電気化学的基礎課題を、日本と中国が交流を通じて相互に取り組むことで解決することを目的とした。具体的には、中国側で開発したナノ構造体電極材料を用いて日本側が電極触媒システムの構築と特性評価を行い、さらにこれに基づいて双方が開発した“バイオアノード”と“バイオカソード”を組み合わせることでより新規なバイオ燃料電池の開発を目指した。

2. 研究・交流の方法

1. バイオアノードの構築とその速度論的評価

NADH補酵素の高効率な電極触媒酸化システムを構築するにあたり、酵素バイオ燃料電池を作動させる条件下（水溶液のpH、電解質、温度などの設定）でのNADH/NAD⁺レドックス対の式量酸化還元電位 (formal potential, $E^{0'}$) の評価およびNADHの酸化反応に対して高い触媒能を有するいくつかの酸化還元触媒系（ニールブルー (Nile Blue)、フェノサフランイン (phenosafranin) など) の探索を試みた。しかもこれらの酸化還元触媒系の触媒能および安定性、そして次に固定するNAD⁺依存型グルコース脱水素酵素 (GDH) の酵素活性は、電極の種類、電極への酸素還元触媒系およびGDHの固定化法や固定量などに大きく依存することを明らかにし、より高い触媒能と安定性を有するバイオアノードの構築のために、電極表面上における酸化還元触媒系とGDHの空間制御を試みた。そこで、中国側によって合成された様々な形状、物性を有するカーボンナノチューブや合目的に表面特性を規制した炭素電極のナノ構造体表面上に、酸化還元触媒系およびGDHの固定化法（共有結合法、電解重合法など）や固定量を分子レベルで制御して導入することによって、グルコース酸化のためのバイオアノードの構築を試みた。これらのバイオアノードにおけるNADHおよびグルコースの酸化反応の速度論的評価を行い、得られた結果をNAD⁺依存型脱水素酵素電極の構築に役立てるため中国側にフィードバックした。

2. バイオカソードの構築とその速度論的評価

炭素電極上にカーボンナノチューブ（中国側が合成したもの）を修飾し、さらにこのカーボンナノチューブの表面にラッカーゼ酵素を固定することによって、ラッカーゼ酵素の直接電極反応の可能性、および酸素の4電子還元能を実現するバイオカソードとして機能するかどうかを検証した。さらに、得られる還元電流密度を大きくし、電極の安定性を向上させるために中国側が合成した様々なカーボンナノチューブへのラッカーゼ酵素の固定化法の検討および固定量の増加を試みた。さらに、安定なラッカーゼ酵素を得るために、民間企業との共同研究を通して好熱菌由来のラッカーゼを探索し、次に遺伝子工学を用いて形質転換・培養し、高温（70～90℃）で機能するラッカーゼ酵素を製造し、バイオカソード触媒に応用した。構築したこれらのバイオカソードでの酸素還元能の速度論的評価・解析を行った。

3. 酵素バイオ燃料電池の電気化学的性能評価

上述の1および2に基づいて、バイオアノードおよびバイオカソードのいくつかの組み合わせにより酵素バイオ燃料電池を試作し、これらの基本的な電池特性（開回路電位、電位-電流曲線（分極曲線）、出力密度-電流曲線、電流-時間曲線など）を評価・解析した。得られた結果を中国側にフィードバックし、酵素バイオ燃料電池の新たな展開に役立てた。

3. 研究・交流実施体制

3. 1 日本側

氏名	所属	役職	学位	役割
(リーダー) 大坂武男	東京工業大学 大学院総合理 工学研究科	教授	工学博士	日本側の研究 の総括、酵素バ イオ電池の電 気化学的評価
(研究者) 岡島武義	東京工業大学 大学院総合理 工学研究科	助教	博士（工学）	NADHの酸化反 応のためのバ イオアノード の構築とその 速度論的評価
(研究者) X. Wang	東京工業大学 大学院総合理工 学研究科	博士研究員	博士（理学）	酸素の還元反 応のためのバ イオカソード の構築とその 速度論的評価、 酵素バイオ電 池の性能評価
(研究者) Farhana S. Saleh	東京工業大学 大学院総合理 工学研究科	大学院博士課 程学生		バイオアノード の構築と酵 素バイオ電池 の性能評価
(研究者) 李 徳安	東京工業大学 大学院総合理工 学研究科	大学院修士課 程学生		バイオカソード の構築と酵 素バイオ電池 の性能評価
(研究者) 北村房男	東京工業大学 大学院総合理 工学研究科	准教授	理学博士	NDAH電極触媒 の探索

3. 2 相手国側

氏名	所属	役職	学位	役割
(リーダー) Lanqun Mao	中国科学院 化学研究所	教授	Ph. D	中国側の研究 の総括、酵素バ イオ電池の構 築
(研究者) Lei Su	中国科学院 化学研究所	准教授	Ph. D	酸素還元のため のラッカーゼ 修飾バイオ カソードの出力 密度向上、ナ ノ構造体のキ ャラクターリゼ

				ーション
(研究者) Ping Yu	中国科学院 化学研究所	助教	Ph. D	バイオ電池の 生物学的評価 と微小化、ナノ 構造体の合成
(研究者) Yuging Lin	中国科学院 化学研究所	助教	Ph. D	バイオ電池の 電気化学的応 用
(研究者) Ningning Zhu	中国科学院 化学研究所	博士研究員	Ph. D	ナノ構造体の 合成・評価

4. 研究成果

4. 1 研究成果の自己評価

- 計画以上の成果がでた 計画通りの成果がでた
 計画とは異なるが有益な成果がでた 計画ほどの成果はでなかった
 いずれでもない

4. 2 研究成果の自己評価の根拠

(日本側)

- ・ニコチンアデニンジヌクレオチド補酵素の還元体 (NADH) のその酸化体 (NAD⁺) への酸化反応に対する新規な電極触媒系として、(i) カルボン酸官能基で機能化した single-walled carbon nanotubes (f-SWCNTs) にニールブルー (NB) レドックス色素をアミド結合を介して共有結合させた複合電極触媒 (NB/f-SWCNTs/GC, GC: グラッシーカーボン電極基板) および(ii) f-SWCNTs 上にポリ (フェノサフラニン) (PPS) 薄膜を電解重合した複合電極触媒 (PPS/f-SWCNTs/GC) の構築に成功した。f-SWCNTs へのレドックス色素の共有結合固定法は、中国側で発見した手法を応用展開した。
- ・フラビンタイプの官能基を有する PPS が NADH/NAD⁺ レドックス系の再生、すなわち NADH の NAD⁺ への酸化反応および NAD⁺ の NADH への還元反応を促進する有効な電極触媒として機能することを見出し、NADH/NAD⁺ レドックス対の式量酸化還元電位を決定した。
- ・NB/f-SWCNTs/GC および PPS/f-SWCNTs/GC 上にさらにグルコース脱水素酵素 (GDH) を導入して構築したグルコース酸化電極 (GDH/NB/f-SWCNTs/GC および GDH/PPS/f-SWCNTs/GC) を用いることで、NADH の酸化反応の開始電位とほぼ同じ電位でグルコースの酸化を行うことに成功し、バイオアノードとして優れた電極機能を有することを明らかにした。
- ・GDH/NB/f-SWCNTs/GC (あるいは GDH/PPS/f-SWCNTs/GC) バイオアノードとラッカーゼ酵素に基づくバイオカソード (中国側で開発したもの) とを組み合わせることにより“呼吸型”バイオ燃料電池の構築に成功した。
- ・好熱菌由来のラッカーゼ酵素および PQQ-依存型グルコース脱水素酵素をそれぞれバイオカソード触媒およびバイオアノード触媒として f-SWCNTs 上に固定することにより、室温から高温 (25~90℃) で機能するバイオ燃料電池の構築に成功し、バイオ燃料電池の新たな展開の可能性を明らかにした。

(中国側)

- ・電極触媒および電極触媒支持体として機能する様々なカーボンナノチューブの作製に成功した。
- ・カーボンファイバー微小電極 (CFME, 直径: 7・μm, 長さ: 1.0~1.5 mm) にメチレングリーン (MG) 修飾 f-SWCNTs および GDH 酵素を固定したバイオアノードおよびラッカーゼ

(あるいはビリルビンオキシターゼ) 修飾 f-SWCNTsを固定したバイオカソードから成る“ミニチュアグルコース/酸素バイオ燃料電池”を構築し、開回路電位として0.70 V、最大エネルギー密度として $58 \cdot \text{W}/\text{cm}^2$ (0.4 Vで)を達成した。

- “ミニチュアグルコース/酸素バイオ燃料電池”のバイオカソードおよびバイオアノードにアスコルビン酸酸化酵素を固定することにより、生理条件下でアスコルビン酸の影響を受けない微小グルコース/酸素バイオ電池を構築し、生体系におけるバイオ燃料電池への応用の可能性を提案した。
- 電極表面上でのその場開環重合および4級化反応によりカーボンナノチューブ上にレドックス活性種(フェロシアンイオンなど)を固定した“集積ナノ構造化電気化学素子”の構築に成功し、バイオ電極(バイオ燃料電池の電極触媒系、バイオセンサなど)への応用を提案した。
- NAD⁺のアデニン部位とmulti-walled carbon nanotubes(MWCNTs)との π - π スタッキング相互作用を利用することにより、容易に再現性良く、“集積化脱水素酵素電気化学素子”を構築することに成功し、NADHの酸化触媒電極として機能することを見出し、バイオアノードへの応用を提案した。
- 本共同研究により、酵素バイオ燃料電池の電気化学的および生物電気化学的基礎課題の多くを解決することができ、さらに酵素バイオ燃料電池の新展開(固体高分子形燃料電池と同じような条件下で機能するバイオ燃料電池や生体系に組み込んだバイオ燃料電池など)を提案した。

4. 3 研究成果の補足

民間企業との共同研究により、好熱菌由来のラッカーゼおよびPQQ-依存型グルコース脱水素酵素を探索し、次に遺伝子工学を用いて形質転換・培養し、高温(70~90℃)で機能する酵素を製造し、これらの酵素を用いた“高温バイオ燃料電池”の構築に成功した。

5. 交流成果

5. 1 交流成果の自己評価

- 計画以上の交流成果がでた 計画通りの交流成果がでた
- 計画ほどの交流が行われなかったが成果はでた
- 計画ほど交流成果がでなかった
- いずれでもない

5. 2 交流成果の自己評価の根拠

(日本側)

- 日本から中国へ3人の研究メンバーが3年間で3回、延べ出張日数15日間訪問し、双方の研究発表および研究打ち合せ(参加者4~6名)を行った。研究発表は公開とし、中国科学院の職員および学生30~50名が参加した。
- メールを通しての研究打ち合せを頻繁に行った。
- 本共同研究の継続研究として、バイオ燃料電池の出力密度の向上および安定性の向上に関する基礎研究を推進する。
- 本共同研究に参画した日本側の博士研究員が中国に帰国し(大連工科大学)、中国科学院の研究者および我々との間で、触媒電極の安定性向上に関して、新たに3機関の国際共同研究を推進する。

(中国側)

- 研究発表会(中国科学院で3回)および研究打ち合せ(中国科学院で3回、中国内で開

催された国際会議中に2回)を行った。

- ・メールを通しての研究打ち合わせを頻繁に行った。

5. 3 交流成果の補足

なし

6. 主な論文発表・特許出願

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、出願番号、出願人、発明者等	特記事項
論文	X. Li, L. Zhang, L. Su, T. Ohsaka and L. Mao, "A Miniature Glucose/O ₂ Biofuel Cell With a High Tolerance Against Ascorbic Acid", <i>Fuel Cells</i> , <u>9</u> , No.1, 85-91 (2009).	アスコルビン酸の影響を受けないミニチュアグルコース/酸素バイオ燃料電池を試作し、生体系への適用が可能なバイオ燃料電池開発のための基本指針を明らかにした。
論文	H. Zhou, Z. Zhang, P. Yu, L. Sun, T. Ohsaka and L. Mao, "Interaction between Adenine and Carbon Nanotubes: A Simple Approach to Surface Immobilization of NAD ⁺ Cofactor for Preparation of Integrated Dehydrogenase-Based Electrochemical Biosensors", <i>Langmuir</i> , <u>26</u> , No.8, 6028-6032 (2010).	NAD ⁺ とカーボンナノチューブとの π - π スタッキング相互作用に基づく“集積化脱水素酵素電気化学素子”の構築、そのNADH酸化触媒、バイオセンサおよびバイオ燃料電池への応用を提案した。
論文	F. S. Saleh, L. Mao and T. Ohsaka, "Development of a Dehydrogenase-Based Glucose Anode Using a Molecular Assembly Composed of Nile Blue and Functionalized SWCNTs and Its Applications to a Glucose Sensor and Glucose/O ₂ Biofuel Cell", <i>Sensor and Actuators B: Chemical</i> , <u>152</u> , 130-135 (2011).	レドックス色素と機能化カーボンナノチューブからなる分子集合体を用いたグルコース脱水素酵素電極の構築およびそのグルコースセンサ、グルコース/酸素バイオ電池への応用を提案した。