

# 高出力バイオ電池のための酸化還元電位シフトを目指した 超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの遺伝子改変

(福井大院・工) ○高村映一郎、坂元博昭、里村武範、末信一郎  
(香川大・農) 櫻庭春彦、(大阪工大) 大島敏久

〔緒言〕 酵素をエネルギー変換素子とするバイオ電池 (Biofuel cell:BFC) は環境負荷のない次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性の低さに由来する電池寿命の短さや、酵素の酸化還元電位および酵素と電極の間の電子伝達効率の低さに由来する電池電圧の低さの問題がある。本研究では BFC の電池電圧の向上を目指している。BFC の開回路電圧は、酵素反応による電位降下が生じることによって低下してしまう。酵素反応による電位降下は、用いる酵素の酸化還元電位によって影響を受ける。我々は、長期安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) を BFC のカソード触媒として用いることで BFC の長寿命化を達成してきた。しかし、McoP は他のマルチ銅オキシダーゼ (MCO) の酸化還元電位 (+0.79 V~+0.39 V (vs. NHE)) に対して、酸化還元電位が +0.40 V であり、酸化還元電位の低い MCO に分類されるため、BFC を構築した際の開回路電圧の低さが問題であった。MCO の酸化還元電位は主に、基質から電子を受け取るタイプ I 銅 (T1Cu) の酸化還元電位によって決定される。McoP の T1Cu の軸配位子がメチオニンであるのに対して、高酸化還元電位の MCO ではロイシンやフェニルアラニンが軸配位子である。本研究では McoP の T1Cu の軸配位子 (M470) を Leu (M470L) もしくは Phe (M470F) へ置換することで McoP の酸化還元電位の正側への上昇を試みた。

〔実験〕 McoP の 470 番目の Met を遺伝子工学的に Leu もしくは Phe へ置換した McoP M470 変異体は組換え体より精製した。精製酵素を用いて各 McoP の酵素化学的性質を評価した。各 McoP の酸化還元電位の評価のために McoP 修飾電極の作製を行った。作製した McoP 修飾電極を作用極とする 3 電極方式によるサイクリックボルタンメトリー (CV) を行った。

〔結果〕 酸化還元電位評価の結果を Table 1 に示す。M470 変異体は M470L、M470L とともに M470 と比較して酸化還元電位が約 90 mV 正側へ上昇した。軸配位子の置換によって T1Cu と軸配位子との間の配位結合が形成されなくなり、T1Cu の配位構造が不安定化した結果、T1Cu の酸化状態が不安定化したためだと考えられる。McoP の特徴である高い安定性に関しては、M470F において熱安定性が 15°C 低下した。側鎖の嵩高いフェニルアラニンに置換されることによって T1Cu 周辺の安定性に関連した構造に影響した可能性がある。今後は、さらなる変異導入による McoP の酸化還元電位シフトおよび変異型 McoP を用いた BFC の評価を行う。

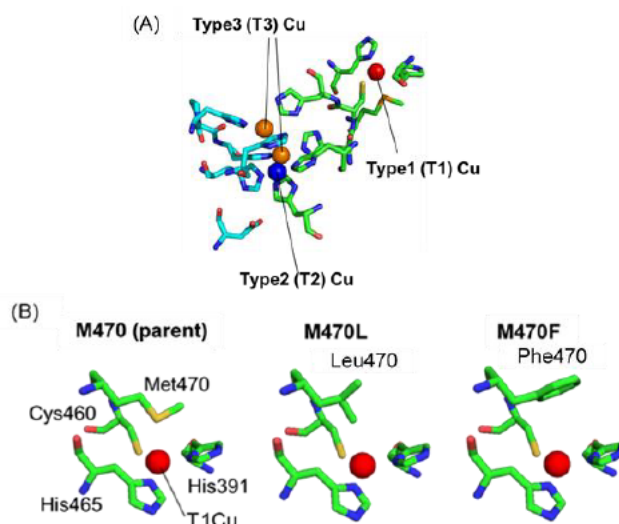


Fig. 1 (A)Details of the active site of McoP. (B)Image of ligand of T1Cu of M470 (parent) and M470 mutants (M470L and M470F).

Table 1 Redox potentials of T1Cu

| McoP  | Redox potential of T1Cu<br>(mV vs. Ag/AgCl) | Shift from M470<br>(mV vs. Ag/AgCl) |
|-------|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| M470  | +189                                        | -                                   |
| M470L | +281                                        | +92                                 |
| M470F | +277                                        | +88                                 |

Site-directed mutagenesis to multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon for high-power biofuel cell, Eiichiro TAKAMURA<sup>1</sup>, Hiroaki SAKAMOTO<sup>1</sup>, Takenori SATOMURA<sup>1</sup>, Haruhiko SAKURABA<sup>2</sup>, Toshihisa OHSHIMA<sup>3</sup>, and Shin-ichiro SUYE<sup>1</sup>: <sup>1</sup>University of Fukui, 3-9-1, Bunkyo, Fukui 910-8507, Japan, Tel: 0776-27-8984, E-mail: [e\\_takamr@u-fukui.ac.jp](mailto:e_takamr@u-fukui.ac.jp), <sup>2</sup>Kagawa Univ. Agric., <sup>3</sup>Osaka Inst. Technol.