

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02091

研究課題名(和文)新規融合型酵素によるギ酸からの水素生成系の創生

研究課題名(英文)Hydrogen production from formate by a hydride biocatalyst

研究代表者

尹 基石 (Yoon, Ki-Seok)

九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・准教授

研究者番号：50701497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体触媒を用いたギ酸塩から効率的な水素発生は、環境にクリーンなエネルギー源を生み出す魅力的な方法である。しかし、ギ酸の酸化と水素発生を触媒する酵素は、酸素にその酵素活性が非常に不安定である。本研究では、酸素安定性[NiFe]-ヒドロゲナーゼと[Mo]-ギ酸脱水素酵素を導電性の担体であるカーボンブラックに担持し、天然由来ポリマーなどで固定化し、効率的なギ酸から水素生成系を構築した。アルギン酸ナトリウムとカーボンブラックで固定化した生体触媒は、ギ酸から水素発生反応の安定化に寄与した。本固定化酵素触媒反応系は、顕著な酸素安定性を示し、空気に暴露後にも触媒的に水素生成が確認される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物によるバイオマスを原料とした水素生成では、ギ酸を基質とすることも可能である。実際、様々な通性嫌気性細菌による、ギ酸を基質とした水素生成法がこれまでに報告されている。しかし、酸素安定性酵素を導電性のカーボンブラックに担持し、酵素電極によるギ酸からの水素生成のエネルギー変換系を構築するのは、本研究が初めての例となる。本研究は、異なる生体触媒をカーボン担体に固定することで、水溶性エネルギー変換系を創成するものであり、貴金属触媒を持たない高効率なエネルギー変換系の研究開発に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Efficient hydrogen evolution from formate using biocatalysts is an attractive mean to produce an environmentally clean energy source. However, the biocatalysts for formate oxidation and hydrogen evolution are extremely oxygen-labile. We present an excellent model system for hydrogen evolution from formate using enzymatic reaction by the encapsulated cytoplasmic membrane of *Citrobacter* sp. S-77 containing O<sub>2</sub>-stable [NiFe]-hydrogenase and [Mo]-formate dehydrogenase immobilized on Ketjenblack EC-600JD with sodium alginate. The immobilized biocatalysts lead to stabilization of hydrogen production from formate. Notably, its catalytic H<sub>2</sub> production showed a remarkable O<sub>2</sub>-stability, maintaining its catalytic activity even after air exposure.

研究分野：生体触媒化学

キーワード：エネルギー変換系 水素酸化反応 ヒドロゲナーゼ ギ酸デヒドロゲナーゼ 生体触媒 水素発生

## 1. 研究開始当初の背景

水素は、化石資源の大量消費による地球温暖化などの環境問題から、化石燃料に代わるクリーンエネルギー源として、水素の利用技術開発が精力的に進められている。水素は、気体では体積当たりのエネルギー密度が大変低く、気体のままでの大規模な貯蔵・利用には安定性に問題がある。そこで、安定かつ効率的な貯蔵・運搬可能な液体、または個体の水素キャリアが必要である。その1つとして注目されているのがギ酸である。ギ酸は、常温で安定な水素キャリア (4.4 wt%, 52 kg H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>) であり、水素の貯蔵に適している。そのため、均一・不均一系触媒によるギ酸を水素に変換する研究開発が行われてきた。しかし、高い反応効率を示す合成触媒は、貴金属や有機溶媒を用いる系が多く、コストや環境負荷への観点から課題が残る。

一方、生体には、ギ酸を触媒するギ酸デヒドロゲナーゼと水素を触媒するヒドロゲナーゼが1つに合体した複合体酵素があり、一般的にギ酸—水素リアーゼ (Formate hydrogenlyase) と呼ばれている。この酵素は非常に高い触媒反応性でギ酸から水素を生成する。この優れた触媒作用を化学工業に利用することができれば、環境への負荷が小さい新しい水素キャリア系の構築が可能と考えられる。しかし、ギ酸—水素リアーゼは一般的に酸素に不安定であり、酸素暴露後に失活してしまうという問題がある。

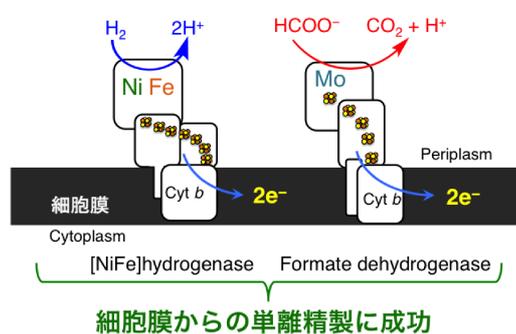


図1 [NiFe]ヒドロゲナーゼと[Mo]ギ酸デヒドロゲナーゼの細胞膜局在性の概略

申請者は、これらの問題点を解決するため、酸素安定性と高い触媒活性を持つ新規酵素の開拓が鍵であると考えた。そして、これまで、「酸素に安定な新規[NiFe]ヒドロゲナーゼと[Mo]ギ酸デヒドロゲナーゼ」を精製し、その生化学的な特性解析を行ってきた(図1)。本研究では、これらの酸素安定性酵素を導電性の物質で融合し、ハイブリッド型ギ酸—水素リアーゼを作製し、ギ酸から安定に水素の生成を行う。

## 2. 研究の目的

本研究はクリーンエネルギー源として注目されている水素に着目し、その効率的な生成法となる新規生体触媒を活用したエネルギー変換系を行う。そこで、申請者らが単離した、酸素に安定な膜結合型[Mo]ギ酸デヒドロゲナーゼと白金触媒の性能を超える[NiFe]ヒドロゲナーゼを、カーボン担体に固定化し、その「人工融合酵素によるギ酸からの水素生成法の開発」を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 細胞膜の調製

*Citrobacter* sp. S-77 は 30°C で、pH 7.0 にて 2 日間培養することで、細胞を得た。その後、10,000 ×g で 10 分間遠心分離して細胞を回収し、10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0)

で懸濁し、洗浄した細胞を得た。洗浄した細胞は緩衝液で懸濁し、超音波 (TOMY SEIKO CO., LTD.)処理によって細胞を破碎した。破碎した細胞は、超遠心分離 (100,000 ×g、60 min)を行うことで、細胞膜を得た。細胞膜は緩衝液で懸濁することで、分離細胞膜を得た。

### 3-2 . 細胞膜固定化ビーズの作製

カーボンブラック (Ketjenblack EC-600JD, LION)を 5%エタノール水溶液に浸漬し、超音波処理をしてカーボンブラックを分散させた。この溶液に細胞膜懸濁液を混合し、3.5% (w/v)アルギン酸ナトリウム水溶液を混合した。その後、0.2 M 塩化カルシウム水溶液にシリンジポンプを用いて滴下することで、細胞膜固定化ビーズを作製した ( 図 2 )。

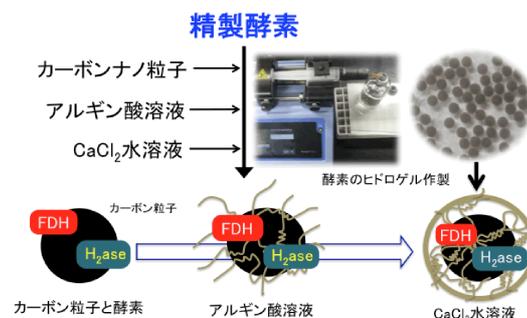


図 2 細胞膜固定化ビーズの作製法

### 3-3 . 固定化酵素による水素生成の測定。

細胞膜固定化ビーズを反応容器に注入し、アルゴンガスで置換した後、30°C の水浴に反応させた。反応後の気相をガスクロマトグラフィー (GC-8A、molecular sieve 5A カラム、キャリアガス: Ar、試料導入部・検出器温度: 120°C、カラム温度: 70°C、検出電流: 60 mA)で測定することで、生成した水素の濃度を検出した。

## 4 . 研究成果

### 4-1 . 細胞膜系によるエネルギー変換系の構築と評価

筆者らが精製した酸素安定性の  $H_2ase$  と  $FDH$  はいずれも細胞膜上に存在するため、細胞膜を用いたエネルギー変換系の構築を行った。本研究では申請者らが単離した新規細菌 *Citrobacter* sp. S-77 からの細胞膜を、導電性の担体であるカーボンブラックに担持し、天然由来ポリマーであるアルギン酸カルシウムで固定化することを特徴としている。シリンジポンプを用いて均一な細胞膜固定化ビーズの調製を行い、様々な反応条件下でギ酸から水素生成を評価した。細胞膜固定化ビーズは、SEM 観察を行い、ビーズの内部表面観察を評価した(図 3)。

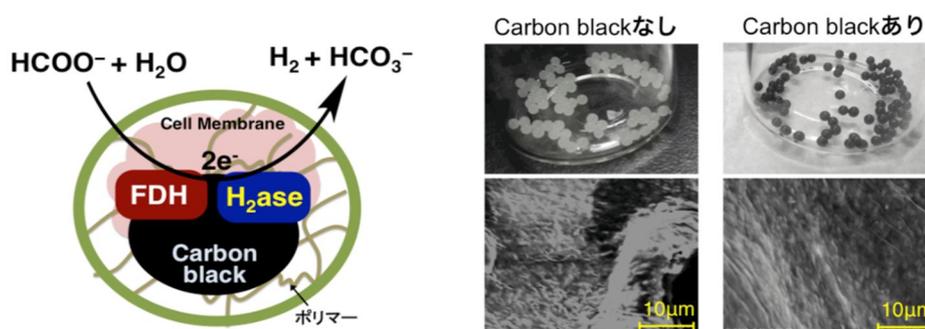


図 3 細胞膜酵素による水素生成系と細胞膜固定化ビーズの SEM 観察

4-2 . 固定化におけるカーボンブラックの効果  
 カーボンブラックの添加の有無による水素生成速度の変化を比較した結果、カーボンブラックの添加により水素生成の初速度が未添加時の1.5倍に向上した(図4)。これはカーボンブラックがFDHとH<sub>2</sub>aseの間の電子伝達を促進したためだと考えられる。

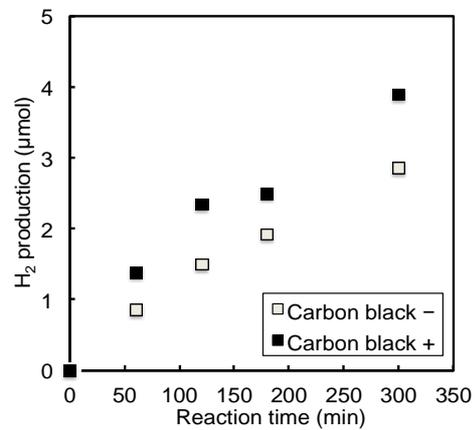


図4 カーボンブラックの添加による水素生成初速度の変化

#### 4-3 . 細胞膜固定化による水素生成の評価

ギ酸の濃度依存での水素生成を評価したところ、本触媒反応系ではミカエリス・メンテン型の基質濃度依存性を示した(図5)。ミカエリス定数  $K_m$  は 10.8 mM、最大反応速度  $V_{max}$  は 648 μmol/h/g-protein と算出された。本触媒反応は、空気下では、水素生成度が減少し、アルゴン雰囲気下の嫌気条件で水素生成度の増大が見られた。これは、アルゴン雰囲気下では還元型のメチルビオロゲンが酵素間の電子伝達を促進することで水素生成の増加されると考えられる。

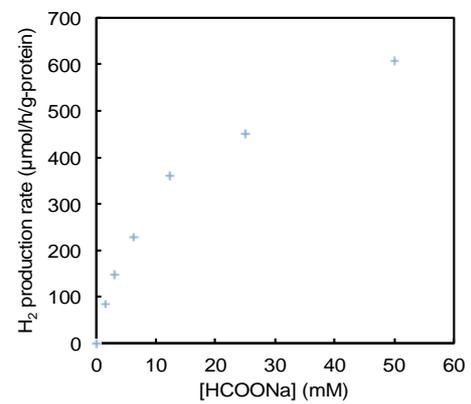


図5 水素生成初速度の基質濃度依存

#### 4.4 . [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素安定性機構の解明

*Citrobacter* sp. S-77 由来の膜結合型 [NiFe] ヒドロゲナーゼは、H<sub>2</sub>酸化反応にて酸素暴露後にも酵素活性の失活しない。そこで、本酵素の構造分析による酸素耐性機構の解明に挑んだ。本酸素安定性酵素は、活性中心に近い[4Fe-4S]クラスターがコンフォメーション変化を行うことで、酸素安定性を示す。これらの構造的特徴は、活性中心を酸素から保護ため、活性中心に近い小サブユニットの[4Fe-4S]クラスターが酸素安定性に重要な役割を果たしていることを始めて明らかにした(図6)。

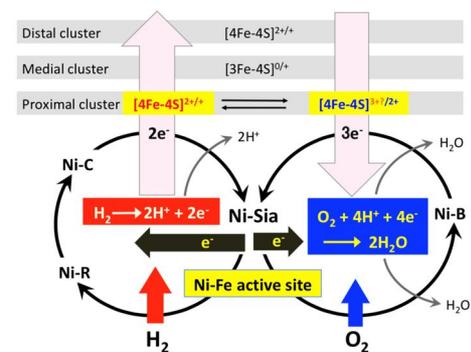


図6 . 活性中心の近位クラスターの構造変化による酸素耐性機構

#### 4.5 . 精製酵素によるエネルギー変換系の構築と評価

本実験系では、カーボン粒子に固定した細胞とカーボンを使用しない両実験系で、同程度のギ酸から水素発生の活性が検出された。しかし、細胞膜を用いた反応系では精製酵素の触媒反応効率と比較すると、その反応効率が著しく低いという問題がある。そこで、精製酵素をカーボン粒子へ担持し、精製酵素を用いたエネルギー変換系の構築とその反応特性を評価した。両精製酵素をカーボンブラックに疎水的に担持することで、両酵素間の局在性を強化させ電子伝達を促進させた。また、酵素分子間の電子

伝達を促進するために、メチルビオロゲンなどの安定な人工電子伝達体を用いて触媒反応性を評価したところ、水素生成効率が2倍ほど上昇した。これまで得た結果を元に、両酵素（[NiFe]ヒドロゲナーゼと[Mo]ギ酸デヒドロゲナーゼ）を用いて、アノード極にはギ酸酵素電極を、カソード極にはヒドロゲナーゼ酵素電極を作製し、ギ酸から直接的な水素生成反応を行うエネルギー変換系の開発に挑んでいる。

本研究の優れた点は、単離細胞膜および細胞膜結合型酵素をカーボンブラックに担持することで、両酵素間の局在性を強化させ電子伝達を促進させた融合型酵素によるエネルギー変換系の構築である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuji, Kohsei; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji.	4. 巻 9
2. 論文標題 Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of Citrobacter sp. S-77 is Post-translationally Modified by CoA (Protein CoAlation) under Oxidative Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 53-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noor, Noor Dina Muhd; Matsuura, Hiroaki; Nishikawa, Koji; Tai, Hulin; Hirota, Shun; Kim, Jaehyun; Kang, Jiyoung; Tateno, Masaru; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji; Kubota, Shintaro; Shomura, Yasuhito; Higuchi, Yoshiki	4. 巻 54
2. 論文標題 Redox-dependent Conformational Changes of a Proximal [4Fe-4S] Cluster in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase To Protect the Active Site from O <sub>2</sub>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 12385-12388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc06261g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takenaka, Makoto; Kikkawa, Mitsuhiro; Matsumoto, Takahiro; Yatabe, Takeshi; Ando, Tatsuya; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidation of Guanosine Monophosphate with O <sub>2</sub> via a Ru-peroxo Complex in Water	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 3180-3184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201801267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori, Yuki; Ando, Tatsuya; Matsumoto, Takahiro; Yatabe, Takeshi; Kikkawa, Mitsuhiro; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji	4. 巻 57
2. 論文標題 Multifunctional Catalysts for H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -resistant Hydrogen Fuel Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201810270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatabe, Takeshi; Tokunaga, Taisuke; Matsumoto, Takahiro; Kikkawa, Mitsuhiro; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji	4. 巻 47
2. 論文標題 A MnI Model for the Photoinhibited Species of Oxygen-Evolving Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.170869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatabe, Takeshi; Kamitakahara, Kazuki; Higashijima, Kaede; Ando, Tatsuya; Matsumoto, Takahiro; Yoon, Ki-Seok; Enomoto, Takao; Ogo, Seiji	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthesis of acetic acid from CO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> I and H <sub>2</sub> using a Water-Soluble Electron Storage Catalyst	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 4772-4774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc04789a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogo, Seiji; Ando, Tatsuya; Thi Minh, Le Tu; Mori, Yuki; Matsumoto, Takahiro; Yatabe, Takeshi; Yoon, Ki-Seok; Sato, Yukio; Hibino, Takashi; Kaneko, Kenji	4. 巻 56
2. 論文標題 A NiRhS Fuel Cell Catalyst-Lessons from Hydrogenase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 11787-11790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc04789a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minato, Takuo; Teramoto, Takamasa; Kakuta, Yoshimitsu; Ogo, Seiji; Yoon, Ki-Seok	4. 巻 10
2. 論文標題 Biochemical and Structural Characterization of a Thermostable Dps Protein with His-Type Ferroxidase Centers and Outer Metal-Binding Sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1219-1229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogo, Seiji; Kishima, Takahiro; Yatabe, Takeshi; Miyazawa, Keishi; Yamasaki, Ryunosuke; Matsumoto, Takahiro; Ando, Tatsuya; Kikkawa, Mitsuhiro; Isegawa, Miho; Yoon, Ki-Seok; Hayami, Shinya	4. 巻 6
2. 論文標題 [NiFe], [FeFe], and [Fe] Hydrogenase Models from Isomers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Adv.	6. 最初と最後の頁 eaz8181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz8181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo
2. 発表標題 New [NiFe]hydrogenases running between H <sub>2</sub> and O <sub>2</sub> molecules
3. 学会等名 The 20th Biocatalysis Symposium of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo
2. 発表標題 Exploring new biocatalysts for hydrogen activation
3. 学会等名 The 4th Korea-Japan Symposium on Hydrogen in Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo
2. 発表標題 New insights of naturally occurring O <sub>2</sub> -tolerant [NiFe]hydrogenase
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry 2018 (ICPAC2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Tahahiro Matsumoto, Seiji Ogo
2. 発表標題 A diversity of Naturally Occurring O <sub>2</sub> -tolerant [NiFe]hydrogenase
3. 学会等名 International Conference on Coordination Chemistry 2018 (ICCC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo
2. 発表標題 Structural genes and hydrogen activation of [NiFe]hydrogenase from Citrobacter sp. S-77
3. 学会等名 The 70th The Society for Biotechnology, Annual Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohsei Tsuji, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo
2. 発表標題 Redox-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Citrobacter sp. S-77 by coenzyme A
3. 学会等名 The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ki-Seok Yoon, Nguyen Khac Hung, Takuo Minato, Seiji Ogo
2. 発表標題 New Formate production from CO <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> with biohybrid catalyst
3. 学会等名 20th Biocatalysis Symposium of Japan (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------