

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23560947

研究課題名(和文) 二酸化炭素を燃料化する光捕集分子 - 人工補酵素 - ギ酸脱水素酵素複合体の設計と創製

研究課題名(英文) Design and Development of Complex with Light-harvesting Molecule, Artificial Co-enzyme and Formate Dehydrogenase for Carbon Dioxide Fuelization

研究代表者

天尾 豊 (AMAO, YUTAKA)

大阪市立大学・複合先端研究機構・教授

研究者番号：80300961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、二酸化炭素の分子変換機能を有する「光捕集機能分子 - 人工補酵素 - 酵素複合体」の設計と創製を目的とし、以下の研究成果を得た。

(1) ギ酸脱水素酵素を触媒として用いた二酸化炭素からギ酸への変換反応に最適な人工補酵素分子を設計・合成し、人工補酵素の分子構造とギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性との相関を解明した。

(2) 光捕集分子と人工補酵素とを複合化した機能分子を設計し・合成し、光エネルギーによる高効率電子移動過程を実現した。

研究成果の概要(英文)：In this study, design and development of complex with light-harvesting molecule, artificial co-enzyme and formate dehydrogenase for carbon dioxide fuelization were studied. The results are as follows.

(1) The suitable artificial co-enzyme for formate dehydrogenase was designed and synthesized.

Relationship between the catalytic activity of formate dehydrogenase and chemical structure of artificial co-enzyme was clarified.

(2) The complex with light-harvesting molecule and artificial co-enzyme was designed and synthesized. Photochemical and physical properties of the complex were clarified using fluorescence spectroscopy.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：人工光合成 二酸化炭素還元 人工補酵素 ソーラー燃料生成 酵素反応速度論 ギ酸脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

科学技術の発展と共に温室ガスなどによる地球環境汚染、大量の産業廃棄物処理および石油・石炭などの化石エネルギーの枯渇という重大な問題が発生してきており、これらを早急に解決しなければならない。つまり21世紀は地球環境を保全し、次世代のエネルギーを開拓することが必要となる。地球環境保全のためには環境低負荷型エネルギー循環システムの構築、有害物質を有効利用するエネルギー変換システムの開発および低炭素社会の構築が必須である。新エネルギーを創製し低炭素社会を築き上げていくためには、石油に依存しない再生可能な太陽光エネルギーやメタノールなどの低炭素燃料の利用があげられる。また2009年9月に開催された国連地球変動サミットで「2020年までに1990年比で25%の温室効果ガスを削減する」と明言されたことから、二酸化炭素を大幅に削減する科学技術開発が急務である。太陽光エネルギーの有効利用、特に実質的に二酸化炭素の排出ゼロを実現しつつ、太陽光エネルギーから次世代型低炭素燃料を生成する人工光合成の極意は天然の光合成に学び、模倣し、超越する斬新な技術が必要となる。高等植物の光合成は、太陽光エネルギーの助けを借りて、水と二酸化炭素から酸素と糖を生成する反応であり、これは本研究で目標とする二酸化炭素を還元しメタノール等の次世代型低炭素燃料を生成する人工光合成技術の重要な手本となる。

本研究では二酸化炭素を有用な有機分子に変換する人工光合成系を構築するために以下の研究を進めた。

(1) これまでに解明されていない、ギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元活性に対する人工補酵素分子の構造・機能相関を世界に先駆けて明らかにする。

(2) 人工補酵素分子とギ酸脱水素酵素とを複合化させるという新しい考えを取り入れ、二酸化炭素からギ酸への反応効率を格段に向上させる。

(3) 光捕集分子、人工補酵素とギ酸脱水素酵素とを複合化し光エネルギーによる二酸化炭素からギ酸への変換効率を向上させる。

これまで二酸化炭素の光還元反応の高効率化は一酸化炭素生成までが限度であったが、本研究によって得られる成果によって、これをギ酸にまで拡張することができ、最終的には低炭素燃料の代表であるメタノール生成までつながり革新的な技術が達成されることになる。

2. 研究の目的

二酸化炭素を還元しメタノール等の次世代型低炭素燃料を生成する人工光合成システムの確立を目指し、光エネルギーで駆動する二酸化炭素の分子変換機能を持つ光捕集分子・人工補酵素・ギ酸脱水素酵素複合体を設計・創製する。これまで二酸化炭素の光

還元反応は高効率なものでも一酸化炭素生成が限度であったが、本研究によって得られる成果によって、さらにギ酸生成にまで拡張することができ、最終的には低炭素燃料の代表であるメタノール生成までつながる画期的なものである。

3. 研究の方法

本研究では、二酸化炭素の分子変換機能を有する「光捕集機能分子-人工補酵素-酵素複合体」の設計と創製を目的とし、以下の研究項目を重点的に進める。

(1) ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素からギ酸への変換反応に最適な人工補酵素分子を設計・合成し、人工補酵素の分子構造とギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素還元活性との相関を解明する。

(2) 人工補酵素分子とギ酸脱水素酵素とを複合化し、より二酸化炭素からギ酸への反応が加速する要因を明らかにする。

(3) 光捕集分子、人工補酵素それにギ酸脱水素酵素とを複合化し光エネルギーによる二酸化炭素のギ酸への高効率光還元反応系を確立する。

4. 研究成果

(1) 光捕集分子-人工補酵素二元複合体の設計、合成及びその特性

1-メチル-4,4'-ピピリジニウム(1.0 mmol)と1,*n*-ジプロモアルカン($n=3\sim6, 10$ mmol)をアセトニトリル 100ml に溶かし、300ml ナスフラスコに入れ、90 で 24 時間加熱還流した。析出した黄色の固体(1-プロモアルキル-1-メチル-4,4'-ピピリジル)を吸引る過で回収した。次に、1-プロモアルキル-1-メチル-4,4'-ピピリジニウム(1.0 mmol)、イミダゾール(1.0 mmol)、ナトリウムエトキシド(2.0 mmol)を *N,N*-ジメチルホルムアミド 100ml に溶かし、300ml ナスフラスコに入れ、90 で 24 時間加熱還流し最終目的生成物として黒色の粘性固体を得た。続いて光捕集部位としてクロリン *e6* 三ナトリウム塩に亜鉛を配位させたものを使用した。光捕集部位(亜鉛クロリン *e6*)と人工補酵素部位とを混合し、配位結合を介した二元複合体を合成した(図1)。二元複合体形成及び光化学的特性は蛍光分光測定により調べた。

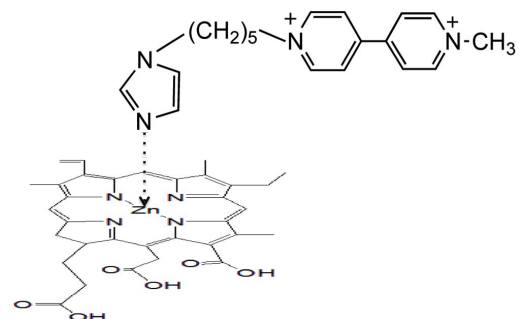


図1. 光捕集分子-人工補酵素二元複合体の分子構造(一例としてメチレン鎖長5のものを示す)

亜鉛クロリン e6 分子とイミダゾール部位を有するピオローゲン分子とを配位結合を介した二元複合体の亜鉛クロリン e6 部位の蛍光強度に対する配位したピオローゲン分子の濃度効果を調べた。その結果、配位したピオローゲン分子の濃度が高くなるにつれて亜鉛クロリン e6 部位の蛍光が消光されることを見出した(図2 例としてメチレン鎖長5 のものを示す)。このことは、二元複合体中の亜鉛クロリン e6 部位の励起状態からピオローゲン部位へ光誘起電子移動が進行していることを示唆している。

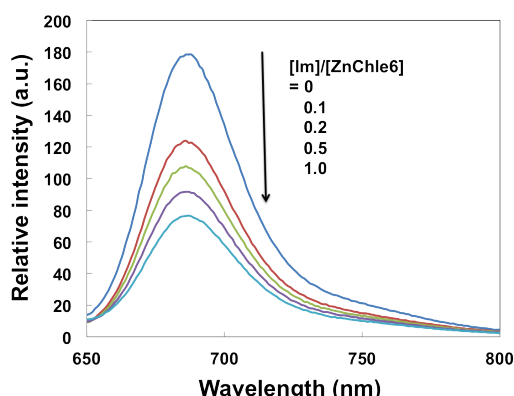


図2. 配位ピオローゲン濃度変化による二元複合体中の亜鉛クロリン e6 部位からの蛍光スペクトル変化

次に亜鉛クロリン e6 とピオローゲン間のメチレン鎖長を変化させた場合について検討した。亜鉛クロリン e6 とピオローゲン間のメチレン鎖長に関わらず、配位ピオローゲンの濃度が増すにつれて、亜鉛クロリン e6 の蛍光強度が減少した。また、亜鉛部位と配位しているイミダゾールとピオローゲン部位との間の炭素数が少ないほど亜鉛クロリン e6 とピオローゲン間の距離が短く電子移動が起こりやすく、亜鉛クロリン e6 からの蛍光が減少する傾向が見られた。しかしながら n=6 の人工補酵素を用いると n=5 の場合より亜鉛クロリン e6 からの蛍光の減少率が増加した。これは n=6 の人工補酵素を用いた場合には亜鉛クロリン e6 のカルボキシル基と人工補酵素のピリジル部位とがイオン結合し、立体構造的に両者の距離が近くなり亜鉛クロリン e6 から人工補酵素への光誘起電子移動が効率的に進行し亜鉛クロリン e6 の蛍光が減少したと考えられる。亜鉛クロリン e6 のカルボキシル基と人工補酵素のピリジル部位とのイオン結合に加えて、亜鉛クロリン e6 の亜鉛部分と人工補酵素のイミダゾール部分が配位結合することにより効率的に亜鉛クロリン e6 から人工補酵素への光誘起電子移動が進行し亜鉛クロリン e6 の蛍光が減少したと考えられる。以上のことからイミダゾール部位を持つ人工補酵素と亜鉛クロリン e6 はイオン結合及び配位結合によって複合体を形成し、効率的に亜鉛クロリン e6 から人工補酵素への光誘起電子移動が達成できた。

(2) ギ酸脱水素酵素が触媒する二酸化炭素-ギ酸変換反応を加速させる人工補酵素の開発

本研究では、ギ酸脱水素酵素とジアルキルピピリジニウム塩との相互作用を解明し、加えて光合成色素とを複合化した「二酸化炭素を活性化する光合成色素-電子伝達-ギ酸脱水素酵素三元複合体」を設計・創製することで二酸化炭素の高効率光還元反応系を達成することを目的としている。ここでは二酸化炭素の高効率光還元反応系を達成するためにギ酸脱水素酵素と人工補酵素であるジアルキルピピリジニウム塩との相互作用について検討した結果を報告する。

具体的には二酸化炭素からギ酸への変換効率の向上を目的として、4,4'-ピピリジンに様々なイオン性置換基を付加した人工補酵素及び 2,2'-ピピリジンを基盤とした人工補酵素を開発し、ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に対する人工補酵素の化学構造と機能相関について調べた。合成した 4,4'-及び 2,2'-ピピリジンを基本骨格とした人工補酵素の化学構造を図3 に示す。

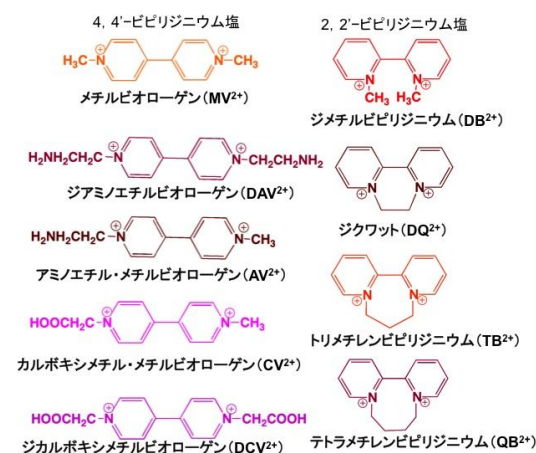


図3. 4,4'-及び 2,2'-ピピリジンを基本骨格とした人工補酵素の化学構造

最初に合成した 4,4'-ピピリジンを基盤とした人工補酵素の第一還元電位を測定した結果、いずれの場合も -0.60 ~ -0.67 V であり、従来人工補酵素として用いてきたメチルピオローゲン (MV²⁺) とほぼ同じ値になった。このことから 4,4'-ピピリジンに置換基を導入しても酸化還元電位には大きな影響を与えないことが分かった。次に人工補酵素とギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応を検討した。人工補酵素をジチオン酸ナトリウムで化学的に還元した後、気相を二酸化炭素で置換、ギ酸脱水素酵素を添加し反応を開始した。生成したギ酸はイオンクロマトグラフで定量した。MV²⁺を基準に考えるとギ酸生成量は陽イオン性のアミノ基を付加した正電荷が多い人工補酵素 DAV²⁺ 及び AV²⁺を用いたときに増加した。これに対して陰イオン性のカルボキシ基を付加した人工補酵素 CV²⁺及び DCV²⁺を用いたときにはギ酸生成量は減少した。それぞれの人工補酵素

の酸化還元電位に差がないことを考慮に入れると、本反応系でのギ酸生成量は人工補酵素の化学構造に依存しており、陽イオン性の化学構造を持つことによりギ酸脱水素酵素との相互作用が強くなったと考えられる。

一方 2,2'-ピピリジニウム塩を基盤とした人工補酵素を用いた場合には、ギ酸生成量の序列は TB^{2+} 、 DQ^{2+} 、 QB^{2+} 及び DB^{2+} の順となった。さらに 2,2'-ピピリジン骨格を有する人工補酵素はメチルピオローゲンや 4,4'-ピピリジニウム塩を基盤とした人工補酵素と比較して二酸化炭素-ギ酸変換反応に適していることが示唆された。さらにこれらの人工補酵素を用いることによって天然の補酵素 NADH を用いたときと比べ、ギ酸脱水素酵素の触媒活性を飛躍的に向上させることができた。

次にギ酸脱水素酵素を触媒として用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応を酵素反応速度論的に解析した。得られた結果を表 1 にまとめる。

表 1. ギ酸脱水素酵素を触媒として用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応における各種人工補酵素に対する速度パラメータ

補酵素	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)
NADH	2087	3.6	0.4	1.9
MV^{2+}	120	13.9	1.49	12.4
DAV^{2+}	17.1	39.7	4.3	250
DCV^{2+}	371	3.2	0.3	9.3
DQ^{2+}	78.4	17.3	1.85	23.6
TB^{2+}	142	29.2	3.17	21.8
QB^{2+}	165	4.36	0.467	2.84
DB^{2+}	220	4.05	0.434	1.97

いずれの人工補酵素を用いた場合でも天然の補酵素 NADH を用いた場合と比べてギ酸脱水素酵素の触媒活性が向上していることがわかった。また MV^{2+} より DQ^{2+} の方が小さくなった。このことから 2,2'-ピピリジン骨格を持つ DQ^{2+} はギ酸脱水素酵素と酵素基質複合体を作りやすいといえる。

触媒効率を示す k_{cat} では MV^{2+} よりも DQ^{2+} 及び TB^{2+} の方が大きく、酵素基質複合体の解離速度が速くなった。

人工補酵素 DQ^{2+} と TB^{2+} では DQ^{2+} の方が酵素-基質複合体を形成しやすいが、複合体の解離速度は TB^{2+} の方が大きいことが分かった。

一方 4,4'-ピピリジンに様々なイオン性置換基を付加した人工補酵素を用いた場合には 2 つのアミノ基を導入した DAV^{2+} は非常に効率的にギ酸脱水素酵素の触媒活性を向上させることが明らかになった。また 2 つのカルボキシル基を有する DCV^{2+} を人工補酵素として用いた場合にはギ酸脱水素酵素の触媒活性は著しく低下することも明らかになった。

以上のことから 2,2'-ピピリジニウム塩を基盤とした人工補酵素を用いた場合には、分子内でのピリジン環同士のねじれ角の小さ

い DQ^{2+} 及び TB^{2+} が有効であることを見出した。また、4,4'-ピピリジンに置換基を導入した人工補酵素では、より陽イオン性の高い 2 つのアミノ基を有する人工補酵素が効果的であることを見出した。

本研究では、人工補酵素分子の化学構造によりギ酸脱水素酵素の二酸化炭素還元触媒活性を、天然の補酵素 NADH を用いたときと比べ、約 8 倍向上させることができた。本研究の成果は、エネルギー源の多様化によるエネルギー安全保障の強化、低炭素社会の創出を同時に実現できる人工光合成の実用化のため非常に有用である。また、酵素活性を補酵素分子の化学構造により制御できることを明らかにし、酵素利用技術の新たな展開につながる成果である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Yutaka Amao, Akemi Tadokoro, Miki Nakamura, Naho Shuto, Ayumi Kuroki "Chloroplast from *Spinach* adsorbed nanocrystalline TiO_2 electrode for photovoltaic conversion device toward artificial photosynthesis system" *Research on Chemical Intermediates*, 2014, 40, 3257-3265 査読有 DOI: 10.1007/s11164-014-1831-2

Yutaka Amao, Naho Shuto "Formate dehydrogenase-viologen immobilized electrode for CO_2 conversion toward the development of artificial photosynthesis system" *Research on Chemical Intermediates*, 2014, 40, 3267-3276. 査読有 DOI: 10.1007/s11164-014-1832-1

Yutaka Amao, Satomi Takahara, Yuka Sakai "Visible-light induced hydrogen and formic acid production from biomass and carbon dioxide with enzymatic and artificial photosynthesis system" *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39, 20771-20776 査読有 DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.06.135

[学会発表](計 4 5 件)

天尾豊 「ソーラ燃料生成のための Artificial Leaf デバイスの創製(招待講演)」第 10 回 有機太陽電池シンポジウム 2014 年 7 月 17-18 日 京都大学黄檗キャンパス(京都府・宇治市)

天尾豊 「二酸化炭素を分子変換する酵素触媒を基盤とした人工光合成系(招待講演)」第 66 回日本生物工学会大会 シンポジウム「光合成微生物等を用いたバイオエネルギー生産と CO_2 固定」2014 年 9 月 9-11 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

天尾豊 「二酸化炭素を資源化する人工光

合成系の構築:バイオマス利用への展開
(依頼講演)第114回触媒討論会 2014
年9月25-27日 広島大学東広島キャン
パス(広島県・東広島市)

Yutaka Amao "Artificial Photosynthesis
System for Solar Fuel and Energy Carrier
Molecule Production (Invited)" 21st
International SPACC Symposium (SPACC)-
Innovative Applications of Coordination
Compounds - October 31 - November 3,
2014, Kogakuin University (Shinjuku-ku,
Tokyo).

Yutaka Amao "Visible-light induced
conversion of CO₂ to chemical with
sensitizer-enzyme hybrid artificial
photosynthesis system (Invited)" 2014
International Conference on Artificial
Photosynthesis (ICARP2014), November
24-28, 2014, Awaji Yumebutai (Awaji-shi,
Hyogo)

〔図書〕(計3件)

天尾 豊 「第2節 光合成器官・触媒
複合型人工光合成システムの開発」光合
成研究と産業応用最前線、299-306 NTS
(2014). ISBN 978-4-86043-412-0

天尾豊 “6.6.6 バイオ触媒”化学便覧 日
本化学会編 『化学便覧 応用化学編 第
7版』(2014) 99-100 ISBN
978-4-621-08759-6

天尾 豊、「第1節 ソーラー燃料・物質
生産のためのハイブリッド型人工光合成
技術」人工光合成 実現に向けた最新技
術、261-269、情報機構(2013). ISBN
978-4-86502-006-9

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:酸化還元酵素反応の制御及びその応用
発明者:天尾豊,池山秀作,中西雄二、高橋
哲也,荻野幹治,小池田聡

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2012-139887

出願年月日:2012年6月21日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

天尾 豊 (AMAO, Yutaka)

大阪市立大学・複合先端研究機構・教授

研究者番号:80300961