

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655053

研究課題名（和文） 光合成モデル電池の創製

研究課題名（英文） Development of a photosynthesis-model cell

研究代表者

小江 誠司 (OGO SEIJI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：60290904

研究成果の概要（和文）：

2つの新規な酵素の単離と2つの新規なモデル触媒の合成に成功した。Citrobacter sp. S-77由来の新規な[NiFe]ヒドロゲナーゼと、トリエチルフォスファイトを配位子にする新規なニッケル・鉄錯体は、カソード触媒として機能することを見いだした。Leptolyngbya sp. strain 0-77由来の新規な光化学系 II と、トリスピリジルメチルアミンを配位子にする新規なマンガン錯体は、アノード触媒として機能することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

New enzymes and their model catalysts have been isolated. [NiFe]hydrogenase from Citrobacter sp. S-77 and [NiFe]P(OEt) complex act as cathode catalysts. Photosystem II from Leptolyngbya sp. strain 0-77 and MnTPA complex act as anode catalysts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：光合成、モデル電池、水素、酸素

1. 研究開始当初の背景

化石燃料と熱エネルギーを主体とする社会活動を続けてきた結果、現代において化石燃料の枯渇や地球温暖化など様々な社会問題が生じている。新たなエネルギー源として水素を用いる燃料電池が注目されている。なぜなら水素は電子源として利用した後も水しか生成せず、環境調型のエネルギー源としての利用が見込まれるからである。しかし、現在世界で利用されている水素の大半は化石燃料（主に天然ガス）から製造されている。それは、他の原料より簡単で、経済的にも低コストでつくることができるからである。化石燃料から水素をつくらなければならない限りは、化石燃料の削減にはつながらない。さらに、燃料

電池用電極触媒としては、一般的に白金触媒が用いられているが、白金触媒も高価な枯渇性資源である。そのため、白金触媒に代わる安価な燃料電池用電極触媒の開発が盛んに行われ、種々の電極触媒が報告されている。そのような電極触媒としては、金属錯体の熱処理物、層状金属錯体、高分子金属錯体等が報告されているが、触媒の合成段階で金属錯体を高温で燃焼するため、金属錯体が熱分解し、錯体構造を保持していない。そのため、上記金属錯体の熱処理物は錯体ではなく、金属触媒である。そのため、従来の燃料電池用電極触媒では、触媒能力の制御を容易に行うことができない。すなわち、錯体の配位子を自由に設計して触媒能力の制御を容易に行

うことができない。本研究は、上記の問題点に鑑み、「水素発生ヒドロゲナーゼおよびそのモデル錯体」をカソード、「新規高温性光合成細菌及びそのモデル錯体」をアノードとする「光合成モデル電池」の創製を目指した。

2. 研究の目的

次期エネルギー源として期待されている水素の大半は、天然ガスから製造されており、化石燃料の削減にはつながらない。さらに、燃料電池用電極触媒として白金触媒が用いられているが、白金も高価な枯渇性資源である。本研究は、上記の問題点に鑑みて着想したものである。その目的は、「水素発生ヒドロゲナーゼおよびそのモデル錯体」をカソード、「新規高温性光合成細菌及びそのモデル錯体」をアノードとする「光合成モデル電池」を創製することである。本研究で開発する基本概念は様々な分野の技術に応用可能であり、新技術の創成という意味でもその価値は非常に大きい。

3. 研究の方法

(1) カソード触媒

カソードとして「水素発生ヒドロゲナーゼ電極及びそのモデル錯体電極」の作成を行った。本研究で用いる電極触媒は、錯体であっても酵素であってもかまわない。また、固体であっても溶液であっても構わない。錯体の場合は、配位子を自由に設計して触媒能力の制御を行うことが可能である。例えば、配位子の置換基を変えることにより電子的効果の制御ができる。さらに、配位子を自由に設計して電極反応のメカニズムを明らかにすることができる。これらの手法は、触媒開発研究の新しい技術となりうる。

(i) 新規ヒドロゲナーゼ

カソードとしてヒドロゲナーゼ電極を作成した。水素酸化菌は 80 °C 以上の超高温から低温まで幅広い温度範囲で生育する様々な種がある。その中には、80 °C 以上の超好熱性菌由来のヒドロゲナーゼ遺伝子が低温性菌に水平伝播されたユニークなものが存在する可能性がある。その低温性菌由来のヒドロゲナーゼは低温から超高温条件 (20–90 °C) まで高活性を示す高安定型酵素である可能性が非常に高い。ヒドロゲナーゼは燃料電池の触媒や水素エネルギーの生産などにその利用性が期待される。しかし、ヒドロゲナーゼの利用面において一番厄介なのはその活性の不安定性である。ヒドロゲナーゼは、酸素や一酸化炭素に暴露すると短時間で酵素は失活してしまう。本研究では低温から超高温条件まで高活性を示し、また、酸素や一酸化炭素に暴露しても酵素活性が阻害されない高安定型ヒドロゲナーゼを保持する新規な生物資源の検索・単離と新規高温性ヒ

ドロゲナーゼの培養・選択を行った (図 1)。

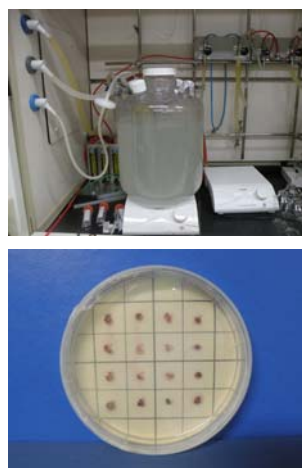


図 1 新規高温性ヒドロゲナーゼの培養・選択

(ii) 新規ヒドロゲナーゼモデル

カソードとして、ヒドロゲナーゼモデル錯体 $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{X}')\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MeCN})\{\text{P}(\text{OEt})_3\}_3](\text{BPh}_4)_2$ $\{[1](\text{BPh}_4)_2, \text{X}' = N, N\text{-diethyl-3, 7-diazanonane-1, 9-dithiolato}\}$ を合成した (図 2)。この非白金触媒には金属としてニッケルと鉄しか含まれておらず、かつ触媒能力の制御をより容易に行うことができる。電極触媒は、このような金属錯体のみを含有していてもよいし、必要に応じて他の成分を含有していてもよい。例えば、バルカン (Cabot 社製)、カーボンブラック、活性炭等の触媒担持体、ポリアセチレン、ポリチオフェン等の導電性高分子の添加も考えた。

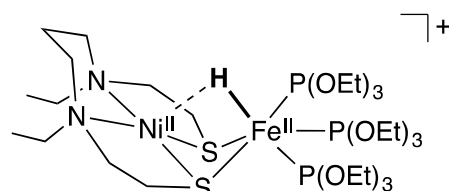


図 2 ヒドロゲナーゼモデル錯体

(2) アノード触媒

アノードとして「新規高温性光合成細菌電極及びそのモデル錯体電極」を作成した。

(i) 新規光合成細菌

酸素発生型光合成には水分子を酸化し酸素分子を発生する光化学系 II 酸素発生複合体 (Photosystem II, PS II) がある。その酵素を基盤上に固定し、循環型光酵素電池を作製するためには高安定性/高活性の PS II を保持する新規な光合成生物の単離が必須となる。至適生育温度 57 °C を示す好熱性シアノバクテリア (藍色細菌) が、現在まで最も安定な PS II として知られている。高安定型酵素電池の特徴は低温から高温まで、また

広い pH 範囲においても高活性を示すものが理想的である。本研究では、様々な特殊環境から高安定な PS II を保持する光合成生物資源の検索・単離と新規高温性光合成細菌の採取・単離・活性測定を行った (図 3)。



図 3 新規高温性光合成細菌の採取・単離・活性測定

(ii) 新規光合成細菌モデル

アノードは、光合成の活性中心である酸素発生タンパク質複合体 (oxygen-evolution complex) の構造を範にしたマンガン錯体を合成した (図 4)。

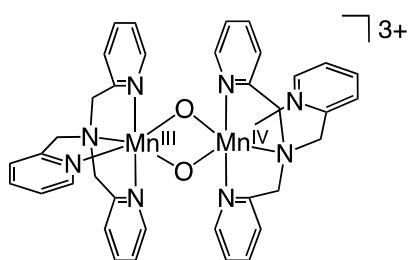


図 4 PS II モデル錯体

水の酸化反応は、地球上に無尽蔵に存在する水から電子を取り出す反応である ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$)。自然界では、光合成を行う生物中に存在する「光化学系 II」が水の酸化反応を触媒する。その活性中心は「酸素発生中心 (Oxygen Evolving Center : OEC)」と呼ばれるマンガンクラスターである。OEC による水の酸化反応の触媒メカニズムの解明は、水の酸化触媒の開発に重要な知見を与えるため注目されている。しかし、そのメカニズムの詳細は明らかとなっていない。OEC による水の酸化反応の触媒メカニズムは、以下の 2 タイプが提案されている。すなわち、(A) ターミナルアクア部位が水の酸化反応の活性部位として機能するメカニズム、(B) bis(μ -oxo) 部位が水の酸化反応の活性種として機能するメカニズム、である。現在、OEC モデル錯体が触媒する水の酸化反応のメカニズムを明らかにすることで、OEC による水の酸化反応の触媒メカニズムについての知

見を得ようとする研究が行われている。

2004 年に Yagi らは、(A) のモデル錯体を粘土鉱物に吸着させた不均一触媒を用いて、犠牲酸化剤である Ce^{IV} 存在下で水の酸化反応を報告した。また 2012 年に Brudvig らは、そのメカニズムについて論じた。しかし、(B) のモデル錯体を用いる触媒的な水の酸化反応及びメカニズム解明を行った例は無い。本研究では、OEC による水の酸化反応のメカニズム (B) についての知見を得ることを目的とした。具体的には、(B) のモデル錯体であるマンガン 2 核錯体 $[\text{Mn}^{\text{III,IV}}_2(\text{TPA})_2(\mu\text{-O})_2](\text{ClO}_4)_3$ (TPA = tris(2-pyridylmethyl)amine) を粘土鉱物 (モンモリロナイト) に吸着させた不均一触媒を用いて水の酸化反応のメカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) カソード触媒

(i) 新規ヒドロゲナーゼ

新規単離細菌 (S-77 株と命名) は 16S rRNA 系統解析の結果、Citrobacter に属するものであった。本菌は対数増殖期における倍增時間が 1 時間以下という生育が早い細菌であり、ジャーフェーマンターを用いての大量培養にも成功した。

細胞膜は、超音波処理および超遠心分離によって単離した。ヒドロゲナーゼは、細胞膜に Triton X-100 を添加し、氷上で 2 時間攪拌することで可溶化を行った。新規ヒドロゲナーゼの精製は、嫌気条件下にて四つのカラムクロマトグラフィー (hydroxyapatite, Phenyl Sepharose HP, Q-Sepharose HP 及び Superdex 200) を用いることで、単一酵素まで精製した。

本精製酵素は、分子量測定の結果、58.5 kDa と 38.5 kDa の 2 つのサブユニットを有することが分かった (図 5 a)。水素酸化活性は、最適条件下で $1,890 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ の高い値を示した。酸素耐性評価においては、24 時間酸素暴露後においても、水素酸化活性を約 95% 維持できる酸素耐性を確認した (図 5 b)。

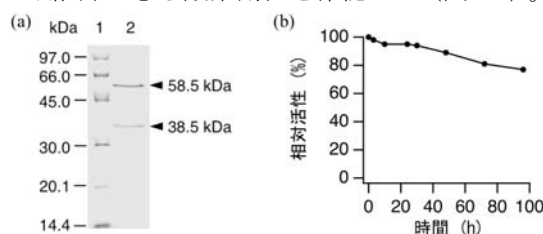


図 5 (a) 精製酵素の SDS-PAGE (12.5%ゲル)。 (b) 酸素存在下での水素酸化活性の時間変化 (酸素暴露前の活性を 100% とする相対活性で表記)

(ii) 新規ヒドロゲナーゼモデル

自然界の水素活性化酵素であるニッケ

ル・鉄ヒドロゲナーゼをモデルとして、新たなニッケル・鉄触媒の開発と、常温常圧で水素からの電子を電子受容体（フェロセニウムイオンやメチルビオロゲン等）に移動させることに成功した。結晶構造の解明により、水素を活性化した後生成するヒドリドイオン（H⁻）がニッケルではなく、鉄に結合していることを示した。これまでニッケルか鉄のどちらにヒドリドイオンが結合しているかは分かっていなかった。

ニッケル・鉄ヒドロゲナーゼは、自然界に存在する、水素を活性化する酵素である。その活性中心は、図6のように、ニッケルと鉄がシステイン残基（Cys）のイオウ原子によって架橋された2核構造です。Xは、休止状態ではH₂O、OH⁻、またはO²⁻、活性化状態ではH⁻と考えられている。

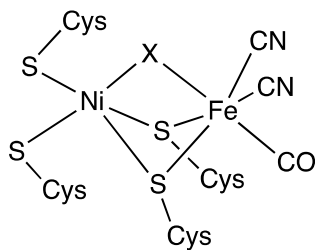


図6 ニッケル・鉄ヒドロゲナーゼの活性中心の構造（Cys = システイン残基）

本研究では、自然界のニッケル・鉄ヒドロゲナーゼと同様に、ニッケルと鉄を使って常温常圧で水素を活性化した。X線及び中性子回折により、その人工モデル触媒の構造を明らかにした（図7）。

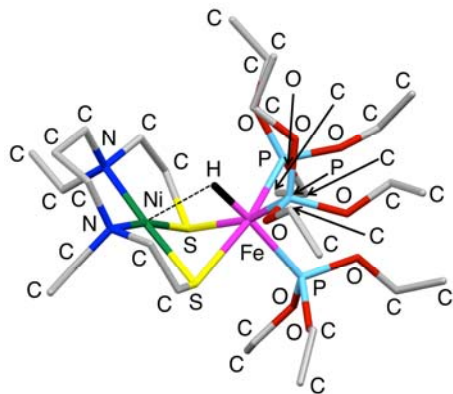


図7 ニッケル・鉄触媒の結晶構造

常温常圧で水素からの電子抽出の触媒サイクルを図8に示す。触媒1が常温常圧で水素を活性化し、鉄にヒドリドイオンが結合した触媒2となる。触媒2は種々の電子受容体に電子を与え、触媒1に戻る。

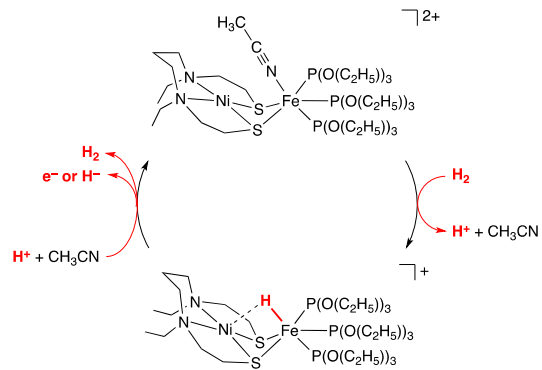


図8 ニッケル・鉄触媒を用いた水素からの電子抽出

(2) アノード触媒

(i) 新規光合成細菌

単離した菌体は、16S rRNA 系統解析の結果、新種のシアノバクテリア *Leptolyngbya* sp. strain 0-77 であるということが明らかになった。0-77 は糸状の形態であり（図9）、他の好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus* と同程度の温度で生育する。したがって、0-77 は、本研究で必要とする新しいサンプルであると言える。

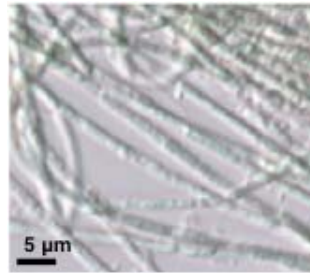


図9 0-77の形態

PS II の精製は、そのタンパク質複合体の不安定さから容易に活性が失活してしまうなど、非常に困難である。安定に PS II 精製を行う条件を検討するため、可溶性 PS II 膜面分を用いてタンパク質の最適活性条件を調べた。その結果、0-77 の PS II 活性は最適活性温度 35 °C、最適活性 pH 7.0 であった。また、熱処理した可溶性 PS II 膜面分は、40 °C まで安定であるということがわかった（図10）。熱処理したそれぞれのサンプルの紫外-可視吸収スペクトルを測定したところ、50 °C を境に大きく吸収強度が減少していった。スペクトル変化より、タンパク質の変性による凝集または解離が PS II 活性失活の原因であることが分かった。

得られた知見をもとに、0-77 から PS II の精製を試みた。その結果、吸収スペクトルが微妙に異なる二つの画分が得られた。この内 680 nm 付近に吸収極大をもつ画分は、Native-PAGE の結果ただひとつのバンドを示し（単一のタンパク質複合体である）、

SDS-PAGEの結果PS IIを構成するサブユニットと類似したバンドを示した。つまり、PS IIが精製されていることを示す結果が得られた。

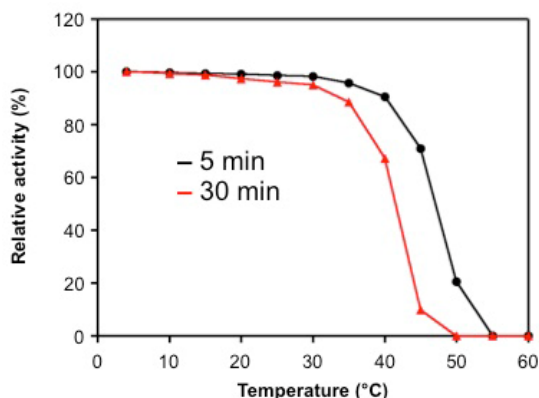


図 1 0 酸素発生の温度依存性

(ii) 新規光合成細菌モデル

作製した complex@clay の UV-vis スペクトルは、440、560、670 nm 付近に特徴的な吸収を示した。これは、 $Mn^{III,IV}_2bis(\mu-oxo)$ 錯体に特有の吸収であることから、モンモリロナイトに吸着後もその酸化数状態や bis($\mu-oxo$) 構造が保持されている。また、complex@clay の X 線回折測定の結果から、錯体はモンモリロナイトの表面に吸着していることを明らかにした。

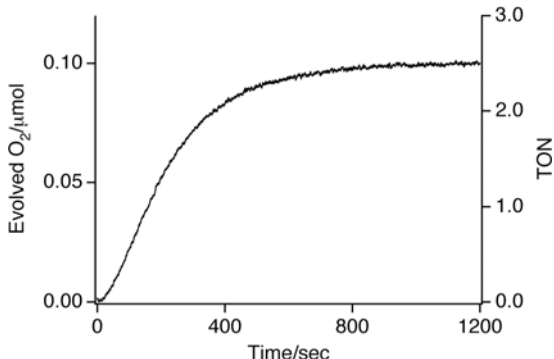


図 1 1 酸素発生の時間経過

Complex@clay と Ce^{IV} との反応により、触媒的な水の酸化反応が進行することを確認し、触媒回転数は 2.5、触媒回転頻度は 1.25/10 分であった (図 1 1)。水の酸化反応のメカニズムを解明するために、水の酸化反応系から complex@clay 及び上澄みの UV-vis スペクトルをそれぞれ測定した。反応系中から取り出した complex@clay の UV-vis スペクトルは、 Ce^{IV} との反応によってモンモリロナイト上で $Mn^{IV,V}_2bis(\mu-oxo)$ が生成することを示した。一方、上澄み液の UV-vis スペクトルを測定した結果、過マンガン酸イオンが生成していることを確認した。過マンガン酸イオンの生成は、高原子価 $Mn^{IV,V}_2bis(\mu-oxo)$ 錯体の不均

化反応によって生成していると考えられる。以上の結果から、図 1 2 に示す水の酸化反応のメカニズムによって水の酸化反応が進行したと考えられる。bis($\mu-oxo$) 部位を活性部位とする触媒的な水の酸化反応及びそのメカニズムを考察した例は無く、本研究は OEC による水の酸化反応のメカニズム解明に新たな知見を与えるものである。

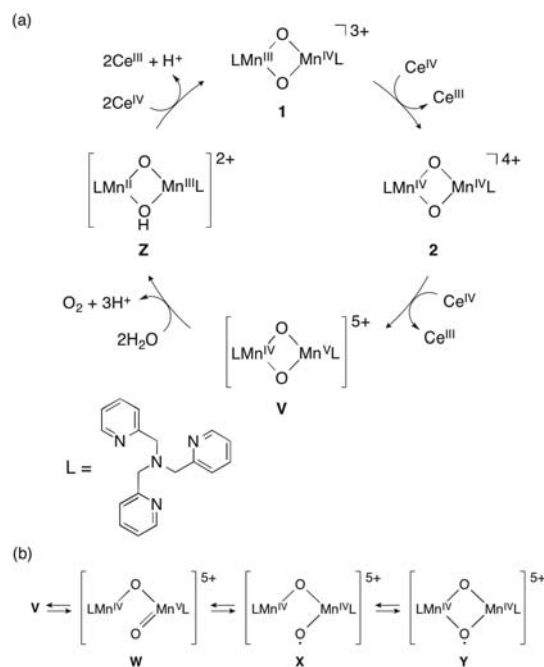


図 1 2 提案される水の酸化メカニズム

以上、本研究では、カソード触媒として新規ヒドロゲナーゼ S-77 (J. Biosci. Bioeng. 2012, 114(5), 479-484) と新規ニッケル・鉄ヒドロゲナーゼモデル錯体 (Science 2013, 339(6120), 682-684) と、アノード触媒として、新規光合成細菌 O-77 (論文投稿中) と新規 PS II モデル錯体 (論文投稿中) の単離・合成に成功した。今後は、作成したカソードとアノードを連結して光合成モデル電池を組み上げていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

(1) Ogo, Seiji; Ichikawa, Koji; Kishima, Takahiro; Matsumoto, Takahiro; Nakai, Hidetaka; Kusaka, Katsuhiko; Ohara, Takashi. A Functional [NiFe]Hydrogenase Mimic That Catalyzes Electron and Hydride Transfer from H_2 . Science 2013, 339(6120), 682-684. 査読有
DOI: 10.1126/science.1231345

(2) Eguchi, Shigenobu; Yoon, Ki-Seok; Ogo, Seiji. O_2 -stable Membrane-bound

[NiFe]hydrogenase from a Newly Isolated
Citrobacter sp. S-77. J. Biosci. Bioeng.
2012, 114(5), 479-484. 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.018

(3) Matsumoto, Takahiro; Kim, Kyoungmok;
Ogo, Seiji. Molecular Catalysis in a Fuel
Cell. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50(47),
11202-11205. 査読有
DOI: 10.1002/anie.201104498

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) 発表者：小江誠司

発表標題：Platinum Catalysts vs. Enzymes
and their Models

学会等名：世界トップレベル研究拠点平成 24
年 度 プ ロ グ ラ ム 委 員 会
(2012 WPI Program Committee Meeting)

発表年月日：平成 24 年 10 月 24 日

発表場所：東京、フォーシーズンズホテル椿
山荘 東京

(2) 発表者：小江誠司

発表標題：水素からのエネルギー：生物に学
ぶエネルギーのつくり方

学会等名：世界トップレベル研究拠点プログ
ラム (WPI) 6 拠点合同シンポジウムー 最先
端の科学と君たちの未来 ー

発表年月日：平成 23 年 11 月 12 日

発表場所：福岡、福岡銀行本店大ホール

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.cstm.kyushu-u.ac.jp/ogo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小江 誠司 (OGO SEIJI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：6 0 2 9 0 9 0 4

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし