

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05230

研究課題名(和文) 微生物の金属硫化物半導体形成能を用いる無機-生体ハイブリッド型光触媒反応

研究課題名(英文) Inorganic-bio hybrid photocatalytic hydrogen production using a combination of microbial metal sulfide precipitation and hydrogenase reaction

研究代表者

本田 裕樹 (Honda, Yuki)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：90583849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水素はクリーンなエネルギーキャリアとして注目される。一方、工業的な水素生産は化石燃料の使用に依存しており、自然エネルギー(太陽光)を利用するクリーンな水素生産系への転換に期待が寄せられる。本研究では、光を用いる水素生産の実現に資する新規な反応系の構築を目的として、無機半導体光触媒と生体触媒を組み合わせた無機-生体ハイブリッド型光触媒系による光バイオ水素生産を目指した。高活性な水素生成能を付与した組換え大腸菌を所定の条件下に曝して硫化物半導体を形成させ、その硫化物半導体による光触媒反応と、水素生成酵素の反応とを組み合わせた新たな光水素生産系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、大腸菌で形成された金属硫化物半導体(硫化カドミウム、CdS)による光エネルギー変換と、遺伝子工学的に付与した水素生成能の共役させた無機-生体ハイブリッド系による光駆動型水素生産系の構築を達成した。無機-生体ハイブリッド系は、安価で高安定な無機材料による光化学エネルギー変換と、高選択的かつ高活性な酵素による物質生産の両方の特長を組み合わせた新しいアプローチに属する反応系である。ハイブリッド系の設計指針やその高効率化についての学術的な知見を深めるとともに、持続可能な開発の実現という社会的要請に応える反応システムの構築に向けた成果を得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen is regarded as a clean energy carrier. However, most industrial hydrogen production depends on the fossil fuel consumption. Therefore, an alternative system utilizing renewable solar energy is required for clean hydrogen production. An inorganic-biological hybrid system, which integrates both features of semiconductor photocatalysts and enzymes, is attractive for the conversion of solar energy to hydrogen. In this study, the new inorganic-biological hybrid system was constructed by combining the bacterial self-precipitation of CdS, which is a visible light responsive semiconductor, and the genetic modification for highly active hydrogen production in *Escherichia coli*. The new system achieved photocatalytic hydrogen production, demonstrating the feasibility of the biohybrid approaches and expanding the knowledge of photosensitization using a bacterial whole cell with a self-precipitated semiconductor.

研究分野：応用微生物学

キーワード：水素生産 無機-生体ハイブリッド 光触媒 ヒドロゲナーゼ 硫化カドミウム 人工光合成

### 1. 研究開始当初の背景

水素は次世代のクリーンなエネルギーキャリアとして注目されており、燃料電池自動車の市販等といった利用範囲の拡大に見られるように、水素の需要はますます高まると予想される。一方、現在の工業的な水素生産は天然ガスの水蒸気改質といった化石燃料の使用に依存しており、水素エネルギー社会の実現に向けて、自然エネルギーとくに人類にとっては無尽蔵の太陽光エネルギーを利用したクリーンな水素生産システムの構築に期待が寄せられる。

無機半導体光触媒を用いた水の分解反応は理想的な水素生産法の1つと考えられている。図1に酸化チタンにPtを担持した系を用いた水の分解反応による水素生産の模式図を示した。二酸化炭素を排出しない水素生産が実現できる一方で、実用化に向けて、i. 貴金属を使用せずかつ高活性な助触媒への変更、ii. 太陽光エネルギー変換効率を改善するために可視光応答型材料への転換、iii. 触媒製造時の省エネルギー化、が課題であり、高効率な光水素生産反応の実現に向けた材料探索が続いている。

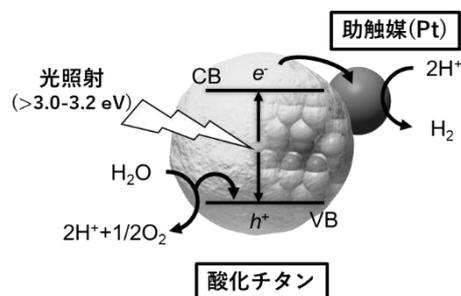


図1 光触媒反応の模式図

### 2. 研究の目的

本研究のゴールは持続可能な開発の実現や資源の枯渇といった地球規模の主要な課題の解決に資する光触媒による水素生産の実現であり、本研究課題では前述の3つの課題を従来とは異なる新たな方法論、すなわち常温常圧下で高効率かつ高選択的な反応を触媒する酵素や微生物の特長を巧みに活用した無機-生体ハイブリッド型反応系を構築することで解決し、効率的な光水素生産系を提案することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では新規な無機-生体ハイブリッド型光触媒系を構築した。具体的には、微生物の有する金属硫化物半導体ナノ粒子の形成能と、極めて高活性な水素生成酵素として知られる[FeFe]-ヒドロゲナーゼを活用した新規な反応系の構築を目指した。図2には本研究で構想する無機-生体ハイブリッド型光触媒の模式図を示した。

無機-生体ハイブリッド型光触媒によって、どのように1. 背景に示す3つの課題が解決されるのかを述べる。まず、i. 貴金属を使用せずかつ高活性な助触媒への変更の解決には、極めて高活性な水素生成生体触媒である[FeFe]-ヒドロゲナーゼを利用する。酸化チタンが担う光触媒反応に対し、水素生成を担う助触媒として[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群を発現する組換え大腸菌細胞を添加した無機-生体ハイブリッド型反応系を構築し、実際に光照射時に効率的に水素が生成することを見出しており<sup>①</sup>、本研究においても当該組換え大腸菌細胞を基盤に研究を展開した。

次に、ii. 太陽光エネルギー変換効率を改善するために可視光応答型材料への転換の解決には、微生物が元々有する金属硫化物半導体ナノ粒子形成能を用いた。Cd<sup>2+</sup>のような重金属イオンは細胞毒性を示すが、微生物にはこの毒性回避のために金属硫化物(CdS)を細胞表面あるいは細胞内に形成する能力がある<sup>②</sup>。一方でCdSは、2.4-2.5 eVのバンドギャップを有し、かつ伝導帯電位が水素生成に十分なことから可視光応答型の水素生成光触媒としての実用化に期待が寄せられる材料である。したがって、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群を発現する組換え大腸菌細胞を所定の条件で培養することでCdSを形成させ、そのCdSによる光触媒反応と水素生成反応を共役させることで新規な無機-生体ハイブリッド型光触媒による水素生産(図2)を実現できると期待できる。

光触媒能と水素生成能を同時に備えた大腸菌が培養操作によって自動的に調製されることになり、これは当然温和な条件で達成されることから、iii. 触媒製造時の省エネルギー化につながる上、さらに菌体を回収しそのまま“生きた”光触媒として水素生産に適用するという新たな無機-生体ハイブリッド系を構築できるものと期待できる。

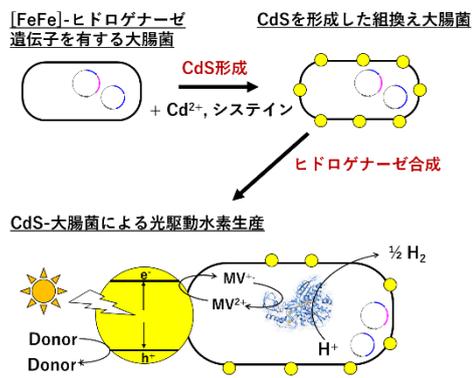


図2 本研究で想定する無機-生体ハイブリッド型光触媒

組換え大腸菌を所定の条件下で培養することで細胞にCdSを形成後、遺伝子を発現する。得られた菌体が可視光応答型の水素生成光触媒となる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸菌を用いた硫化物半導体形成と物性評価

大腸菌による CdS の形成条件を検討し、その CdS 物性を評価した。クロストリジウム属由来 [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌を供試菌とした。当該大腸菌を培養後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し、0.5 mM CdCl<sub>2</sub> と 1 mM システインを添加して CdS 形成を試みた。菌体懸濁液を遠心分離すると、黄色の菌体ペレットとして回収された。回収した菌体を凍結乾燥し、X 線回折 (XRD)、走査型電子顕微鏡観察 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)、および拡散反射スペクトルの解析により、CdS であることを確認した (図 3)。測定結果は、大腸菌において CdS が形成され、そのバンドギャップは 2.5-2.6 eV、ナノオーダーの粒子径であることを示した。以上より、実験に使用する組換え大腸菌での CdS 形成に成功した。

##### (2) CdS 形成後の大腸菌での水素生成活性の評価

CdS を生成した大腸菌 (CdS-大腸菌) を回収後、遺伝子発現を誘導し、[FeFe]-ヒドロゲナーゼを細胞内で合成させ、水素生成活性を評価した。種々の検討の結果、CdS 形成と遺伝子工学的なヒドロゲナーゼ合成が同じ大腸菌のなかで両立できる条件を見出した。ヒドロゲナーゼの合成は SDS-PAGE と、還元型メチルビオローゲン (MV) を用いた水素生成によって検討した (図 4)。CdS 形成後にも問題なく大腸菌へ水素生成能を付与でき [湿菌体重量 (mg) 当たり 0.7 μmol-H<sub>2</sub>/min]、その後の光駆動水素生産へ適用した。

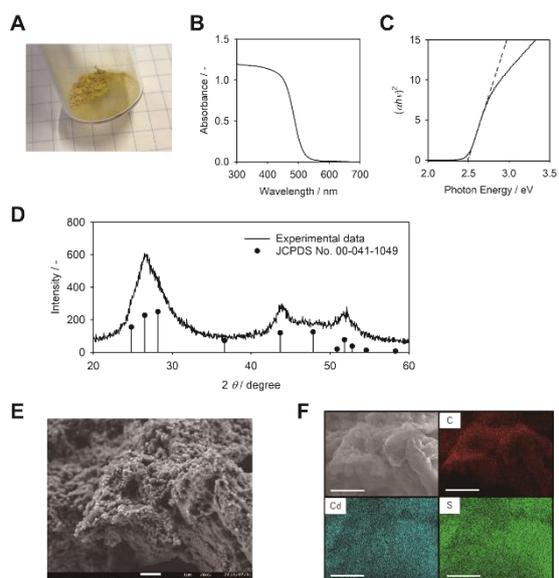


図 3 大腸菌で形成された CdS の物性評価

A, 得られた粉末写真; B, 拡散反射スペクトル; C, Tauc プロット; D, XRD (対照には JCPDS no. 00-041-1049); E, 粉末の SEM 像; F, EDX による元素マッピング

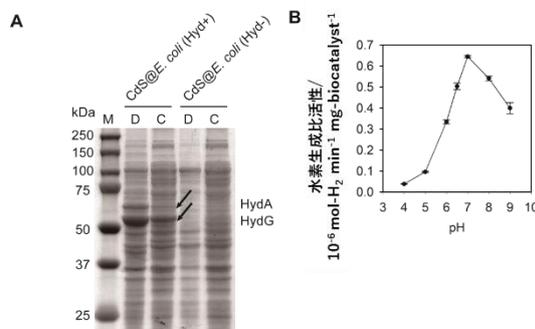


図 4 CdS を形成した大腸菌での [FeFe]-ヒドロゲナーゼの合成

A, SDS-PAGE (*E. coli* (Hyd+), ヒドロゲナーゼ遺伝子導入株; *E. coli* (Hyd-), 遺伝子非導入株)  
B, 各 pH での活性測定の結果 (反応液 2 ml: 100 mM BisTris, 5 mM MV, 25 mM 亜ジチオン酸 Na, 湿菌体 0.01 g, 37°C)

##### (3) CdS 形成し、かつ水素生成能を付与した大腸菌による光駆動水素生産

ここまで水素生成活性を示す CdS-大腸菌を得た。当該 CdS-大腸菌を光触媒とした光水素生産を試みた。電子供与試薬として BisTris、光触媒として CdS-大腸菌、電子メディエーターとしてメチルビオローゲン (MV) を含む反応溶液を調製し、ソーラーシミュレーターを光源として照射依存的水素生産を試みた。ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した CdS-大腸菌 [CdS-*E. coli* (Hyd+)] を用いた場合に照射依存的水素生産が確認された。一方、遺伝子導入をしていない CdS-大腸菌 [CdS-*E. coli* (Hyd-)] や CdS を形成していない大腸菌 [*E. coli* (Hyd+)]、暗条件からは水素生成は確認できなかった (図 5)。また、各波長での水素生産の見かけの量子収率 (AQY) は、AQY<sub>350</sub> = 0.11%、AQY<sub>420</sub> = 0.10%、AQY<sub>470</sub> = 0.04%と算出された。以上より、大腸菌によって形成された CdS への照射で生じる励起電子をヒドロゲナーゼに伝達して水素生産を実現するという、当初の想定通りの反応系を実現することができた。

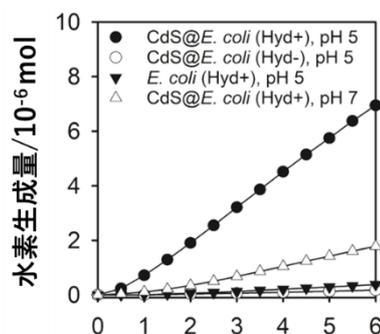


図 5 ハイブリッドの光水素生産  
溶液 (20 ml): CdS 大腸菌 0.5 g, 5 mM MV, 100 mM BisTris·Cl (pH 5 or 7); 光源, AM1.5G solar simulator.

#### (4) 大腸菌での CdS 合成能の強化：システインデスルフィドラーゼの利用

図5の通り、CdS-大腸菌による光照射依存的な水素生産が確認された。一方、その見かけの量子収率(AQY)は低く、高活性化に向けて改善が必要であった。光水素生産速度( $2.1 \times 10^{-6}$  mol/h)は反応系に加えた酵素活性(2.9 mmol/h)から考えると低く、反応効率の改善には、CdSによる光エネルギー変換の改善が必要である。CdSは、大腸菌に備わるシステインデスルフィドラーゼ(DSH, EC 4.4.1.18)活性によってシステインから遊離するスルフィドが、溶液中の  $Cd^{2+}$  と反応することで形成される。(DSHの反応:  $L\text{-Cys} + H_2O \rightarrow H_2S + NH_3 + \text{pyruvate}$ )

ここで大腸菌の CdS 形成を遺伝子工学的に強化して、ハイブリッド系における CdS の質や量を改善できないかと考えた。新たに *Treponema denticola* 由来 DSH 遺伝子を保持するプラスミド pBAD-DSH を作製した。[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子発現用プラスミド pEHyEFG-A と pBAD-DSH を両方保持する大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)/pEHyEFG-A+pBAD-DSH (Hyd+/DSH+) を作製した。DSH 遺伝子の導入で、大腸菌がシステインからスルフィドを生産する効率が向上することを確認した。図6は大腸菌に DSH 遺伝子を追加で導入した菌体と遺伝子導入をしていない菌体の懸濁液に対し、システイン 1 mM を添加し、スルフィド生成量をメチレンブルー法で定量した結果である。この結果、DSH 遺伝子の導入はスルフィド生成を促進することが確認できた。並行して DSH 遺伝子の発現がヒドロゲナーゼの生産や活性に影響しないことも確認した。

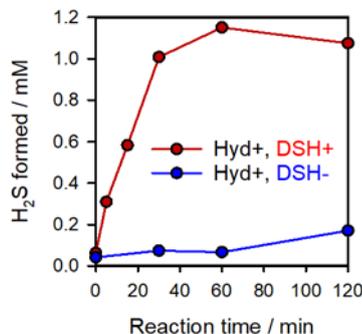


図6 DSH 遺伝子を導入した大腸菌によるスルフィドの生成

#### (5) DSH による CdS 形成量の向上

DSH 遺伝子未導入の大腸菌による CdS 形成は、 $Cd^{2+}$  濃度 0.5 mM、システイン濃度 1.0 mM のときに観察され、より高濃度の  $Cd^{2+}$  存在下では CdS 形成が確認できなかった。DSH 遺伝子を導入した大腸菌 (DSH+) ではスルフィド量の向上によって、より高濃度の Cd 存在下で CdS 形成が可能ではないかと期待した。より高濃度の  $Cd^{2+}$  存在下での CdS 形成は、単位菌体量あたりの CdS 量の増大を見込むことができる。図7は、DSH 遺伝子の有無と Cd 濃度、システイン濃度、その菌体懸濁液で CdS 形成が行われたかを黄色の呈色で確認した結果である。明らかに DSH 遺伝子の導入で、より高濃度の Cd 存在下で CdS 形成が可能になることが示された。

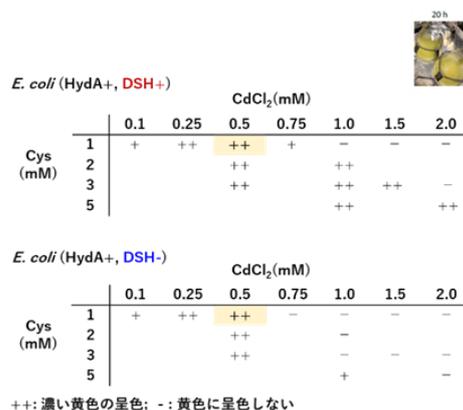


図7 各 Cd 濃度、システイン濃度下での CdS

#### (6) DSH による CdS の質への影響

DSH 遺伝子を導入した場合に形成された CdS の質的な変化を検証した。半導体ナノ粒子は、粒子径や形状によって性質が変化する。CdS 形成条件に曝した菌体を各時間で回収し、その菌体懸濁液の吸光度を追跡して CdS 形成の経時変化を追跡する (図8) と、DSH+では、CdS 形成を開始して1時間で UV 領域に吸収が見られ、その後3時間までに 400 nm から 500 nm に吸収を示した。これは最初の1時間での CdS ナノ粒子形成と、その後の粒子径の成長に対応する変化と考えられる。一方、DSH-では、UV 領域の吸収は見られず、10時間程度たってから 450 nm 程度までの吸収を示した。DSHの有無は、微生物による CdS 形成の速度や、形成された CdS の質の変化を促すと考えられた。

さらなる CdS の質的な評価には、大腸菌で形成した CdS を単離し、精製して導電性膜が塗布

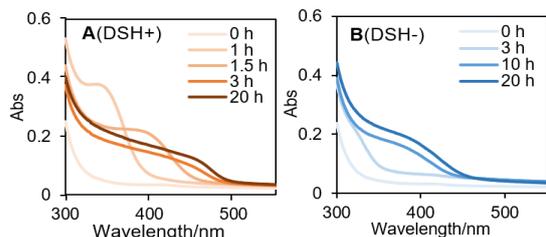


図8 DSH 遺伝子の導入と CdS 形成の経時変化

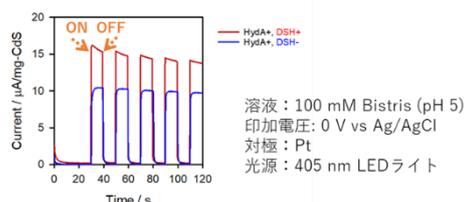


図9 DSH 遺伝子を発現させた大腸菌で形成した CdS の光電流測定

されたガラスの上に CdS 膜を形成し、それを光電極として光電流を測定し、単位 CdS 当たりの光電流の大小で評価した。従来の CdS 形成条件 ( $\text{Cd}^{2+}$  0.5 mM、システイン 1 mM) で、DSH 遺伝子の有無で形成された CdS に質的な変化を検討した。図 9 は、単位 CdS 量当たりの光電流の測定結果である。並行した実験において、電極上に乗せた CdS の量と光電流が一定の範囲では比例関係にあることを確認した上で、この比較を行った。また、この CdS 形成条件では、DSH 遺伝子の有無で菌体当たりの Cd 含量は同じであり、添加した Cd がすべて菌体に移行した。この結果、DSH+ が形成した CdS は、単位重量当たりの光電流が増大することが明らかになった。これは CdS の質的な向上を示している。なぜこのような質的な変化が観察されるのかは現在検討を続けている。

#### (7) DSH 遺伝子の導入による CdS—大腸菌系の光水素生産能の向上

DSH 遺伝子の導入で、これまでと同じ CdS 形成条件でも形成された CdS の単位重量当たりの光電流の増大=質の向上が見出されている。そこで、DSH 遺伝子を導入して CdS 形成後、さらに [FeFe]-ヒドロゲナーゼの生産を行い、CdS-大腸菌ハイブリッドを作製し、その光水素生産能を試験した。図 10 に光水素生産の結果を示す。DSH 遺伝子を発現させた大腸菌を用いて作製した CdS-大腸菌ハイブリッドは、従来と比較して 2 倍の光水素生産を示した。DSH 遺伝子の有無によって、水素生成活性に違いはないことは並行した実験で確認している。したがって、この光水素生産能の向上は、図 8 の可視光領域の吸収の変化や、図 9 で検討した CdS の単位重量当たりの光電流の増大と対応した結果と考えられる。

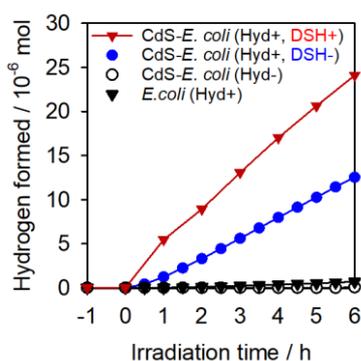


図 10 DSH 遺伝子の導入による光水素生産能の向上

以上、本研究は、光エネルギーを有効に活用する水素生産の達成に向け、無機光触媒の光—化学エネルギー変換と、生体触媒の高選択的かつ高効率な物質変換を組み合わせた無機-生体ハイブリッド触媒系を構築した。具体的には、微生物が有する金属硫化物半導体ナノ粒子の形成能と、高活性な水素生成酵素である [FeFe]-ヒドロゲナーゼを活用し、微生物が形成した硫化物半導体による光エネルギー変換と、そこで得られた還元力を用いる酵素での水素生産によって光駆動型水素生産が達成した。さらに、当初のハイブリッド系の効率化には硫化物半導体の光エネルギー変換の強化が必要なことを明らかにし、硫化物半導体形成能を強化するための遺伝子改変を加えた。これによって微生物が形成する硫化物半導体の質が変化し、ハイブリッド系全体の光水素生産能の向上につながった。

本研究での、非生物的な光—化学エネルギー変換に生体触媒反応を組み合わせるハイブリッド系によって何らかの高エネルギー化合物 (水素など) の生産を目指す反応は、「半人工光合成」といえる新しいアプローチに属し、近年報告例が増えている。半人工光合成は、人工物や天然の光合成の一方に偏った系では達成できない効率や安定性、さらには細胞を用いる利点である触媒の自己修復・自己増殖を組み合わせた従来にはない触媒系の構築が可能になると期待される。本研究では、持続可能な開発の実現や資源の枯渇といった地球規模の主要な課題の解決に資する触媒系の開発指針の 1 つとして提案するとともに、酵素や微生物機能を応用するバイオ技術による物質生産の知見を拡大する成果を得た。

#### <引用文献>

- ① Y. Honda, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8045-8048.
- ② C. Wang, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 425-430.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Yuki, Shinohara Yuka, Watanabe Motonori, Ishihara Tatsumi, Fujii Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Photo biohydrogen Production by Photosensitization with Biologically Precipitated Cadmium Sulfide in Hydrogen Forming Recombinant Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3389 ~ 3397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202000383	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田裕樹; 篠原優佳; 渡邊源規; 石原達己; 藤井浩
2. 発表標題 無機 生体ハイブリッド系による可視光駆動型水素生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 本田裕樹（分担執筆）渡辺一哉監修	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 245
3. 書名 微生物を用いた発電および水素生産 第11編 第8章 光触媒と生体触媒を組み合わせた光駆動型水素生産	

〔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
---------	---------