

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14239

研究課題名(和文)多電子・水素イオン協奏型二酸化炭素-メタノール変換を触媒する革新的人工酵素の創製

研究課題名(英文)Development of novel artificial biocatalyst for carbon dioxide to methanol conversion due to multi-electrons-protons coupling reduction

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本提案では、ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素一元複合体を設計・創製することを目的とした。ホルムアルデヒド-メタノール変換反応を触媒するアルコール脱水素酵素との相互作用について酵素反応速度論的解析を用いて検討し、メチルビオローゲンとアルコール脱水素酵素との相互作用とギ酸脱水素酵素との相互作用はほぼ等しい親和性で機能している事を見出し、さらに、ホルムアルデヒド脱水素酵素との相互作用についても検討し結果、ホルムアルデヒド脱水素酵素との相互作用は他の脱水素酵素より強い親和性を示すことがわかった。これらの結果を基にギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素系による二酸化炭素-メタノール変換を達成した。

研究成果の概要(英文)：In this proposal, to develop the novel catalyst for carbon dioxide conversion to methanol, formate, aldehyde and alcohol dehydrogenase hybrid biocatalysts system is designed. The interaction with alcohol dehydrogenase catalyzing the formaldehyde-methanol conversion and single-electron reduced methylviologen was investigated using enzymatic kinetic analysis. The interaction with aldehyde dehydrogenase catalyzing the formic acid-formaldehyde conversion and single-electron reduced methylviologen also was investigated using enzymatic kinetic analysis. As a result of enzymatic kinetic analysis, the interaction with aldehyde dehydrogenase shows stronger affinity for single-electron reduced methylviologen than other dehydrogenases. Based on these results, carbon dioxide-methanol conversion by formate, aldehyde, alcohol dehydrogenases system with single-electron reduced methylviologen was achieved.

研究分野：生体触媒化学

キーワード：二酸化炭素還元 生体触媒 ビオローゲン 人工補酵素 人工光合成 メタノール

1. 研究開始当初の背景

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日本は「2020年までに1990年比で25%の温室効果ガスを削減する」と明言したことから、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。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達成は、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。高等植物やある種の藍藻類の光合成は、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グルコースを生成する反応であり、これは本研究で最終目標とする二酸化炭素を光エネルギーで活性化、還元し次世代型低炭素燃料メタノールを生成する人工光合成技術の確立への重要な手がかりとなる。しかしながら二酸化炭素をメタノールに変換するための触媒開発は多電子-水素イオン協奏型還元過程を要するため分子触媒・無機触媒では未だ達成されていない。

そこで本研究では、人工補酵素-ギ酸・アルデヒド及びアルコール脱水素酵素を一元複合化することによる二酸化炭素-メタノール変換反応触媒創製を目指した。

本研究目標を達成するため、研究期間内に以下の点を重点的に明らかにすることとした。

ギ酸・アルデヒド及びアルコール脱水素酵素それぞれに末端にイミダゾール基及びアミノ基を有するピオローゲンを基盤とした人工補酵素分子とを複合化する。人工補酵素-脱水素酵素複合体のそれぞれの酵素反応の加速要因を明らかにする。3種類の人工補酵素-脱水素酵素複合体のイミダゾール部位とニッケルイオン等とを配位結合により複合・一元化する。上記複合体の二酸化炭素-メタノール変換反応の触媒機能を評価する。

2. 研究の目的

これまでに図1に示すような電子供与体-光増感剤-電子伝達体-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素による光エネルギーで駆動する二酸化炭素-メタノール変換系の構築に世界で初めて成功している。具体的には、電子供与体(D)にトリエタノールアミン、光増感剤(S)に水溶性亜鉛ポルフィリン、電子伝達体(C)には3つの脱水素酵素の基質となるメチルピオローゲンを利用した。しかしながら、この系では二酸化炭素からメタノールが生成することは達成できたが、メタノール生成効率が低い。これは3つの脱水素酵素機能によって生成した中間分子であるギ酸やホルムアルデヒドの溶液中での拡散が律速となってしまいうためである。

そこで本研究のアイデアとして3つの脱水素酵素を一元化し、生成した中間分子をそれぞれの酵素の近傍に存在させることによって最終生成物であるメタノール生成効率を飛躍的に向上させることを考えた。

電子供与体-光増感剤-電子伝達体-ギ酸・アルデヒド-アルコール脱水素酵素系による光エネルギーで駆動する二酸化炭素-メタノール変換

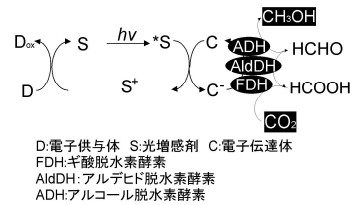


図1. 電子供与体(D)・光増感剤(S)・電子伝達体(C)・ギ酸(FDH)・アルデヒド(AldDH)・アルコール脱水素酵素(ADH)からなる可視光駆動型二酸化炭素メタノール変換系

これに加えてこれまでに明らかにしているこれらの脱水素酵素の人工補酵素として有効であるピオローゲンを基盤とした人工補酵素を直接結合することにより人工補酵素から脱水素酵素への電子移動効率を向上させることを考えた。

従来多種の酵素を複合化するためにはグルタルアルデヒド等の縮合剤を用いることが多いが同種の酵素が縮合する等の問題がある。この点を斬新的に解決するために金属イオンの錯形成能を用いて3つの人工補酵素-脱水素酵素を精密に一元化するチャレンジングな手法を考案することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、水中で二酸化炭素をメタノールに分子変換機能を有する「人工補酵素-脱水素酵素一元複合体」の設計と創製を目的とする。以下の研究項目を重点的に進める。

ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素に有効なピオローゲン誘導体を基盤とした人工補酵素分子の設計と合成する。人工補酵素と脱水素酵素とを縮合反応によって複合化する。

人工補酵素-脱水素酵素複合体を用い、それぞれの脱水素酵素が触媒する分子変換反応の機構を調べる。

金属イオンによる錯形成を基盤とした人工補酵素-脱水素酵素複合体の一元化及び酵素活性機能を評価する。

4. 研究成果

酵素反応速度論的解析によるアルコール脱水素酵素と人工補酵素との相互作用の解明

これまでにギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素に人工補酵素であるメチルピオローゲンの一電子還元体が有効であることを見出している。しかしながら、メチルピオローゲンの一電子還元体と3つの脱水素酵素

との間の直接的な相互作用については解明されていない。二酸化炭素をメタノールに変換する際の最初の過程である、二酸化炭素をギ酸に還元する反応を触媒する FDH とメチルピオローゲンの一電子還元体との相互作用は酵素反応速度論的に解析されている。

そこで、ホルムアルデヒドからメタノールに変換する反応を触媒する ADH とメチルピオローゲンの一電子還元体との相互作用を酵素反応速度論的に解析した。具体的な実験条件は以下の通りである。10 mM ホルムアルデヒド、4.0 mM ジチオン酸ナトリウムで化学的に還元したメチルピオローゲンの一電子還元体と 2.0 μM ADH とを窒素ガスで飽和した緩衝液中で反応させた。生成したメタノールはガスクロマトグラフにより定量した。

図 2 にメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度とメタノール生成反応初速度との関係を示している。

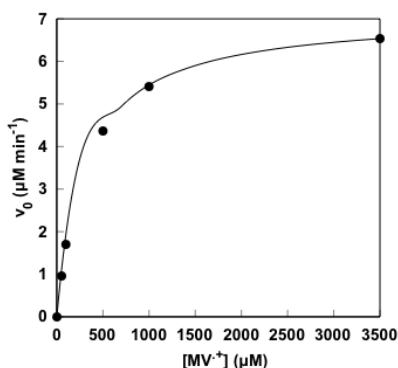


図 2. メチルピオローゲンの一電子還元体 ($\text{MV}^{\cdot+}$) の濃度とメタノール生成反応初速度 (V_0) との関係

メチルピオローゲンの一電子還元体が低濃度の時、メタノール生成濃度はメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度に対して一次関数的に増加し、メチルピオローゲンの一電子還元体が高濃度になるにつれて、生成速度は一定値に近づいたことからこの反応がミカエリス-メンテン型の酵素反応に従うことがわかった。得られたメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度とメタノール生成初速度の値から Lineweaver-Burk(図 3)式を用いることで、速度パラメータを求めた。

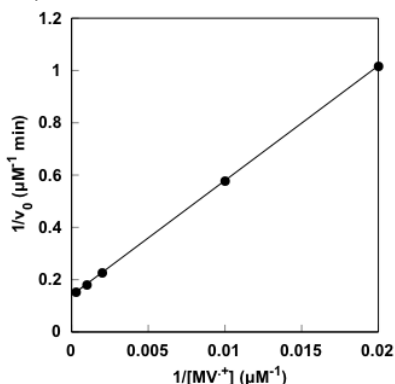


図 3. Lineweaver-Burk プロット

Lineweaver-Burk プロットにおいて近似直線をひくと切片から最大速度 (V_{max})、傾きからミカエリス定数 (K_m) の値が得られる。これらの値から K_m と V_{max} を求めることができる。 k_{cat} は V_{max} を ADH 濃度 $[\text{ADH}]$ で割ることで求められる。最大速度 (V_{max}) は、ADH の活性部位に対してメチルピオローゲンの一電子還元体が飽和した時の最大反応速度を表し、ミカエリス定数 (K_m) は ADH のメチルピオローゲンの一電子還元体に対する親和性を示す。ターンオーバー数 (k_{cat}) は最大速度で反応するときに 1 分子の ADH あたり単位時間に何分子の基質を生成物に変換する数である。メチルピオローゲンの一電子還元体濃度がミカエリス定数より著しく低い場合での二次反応速度定数は k_{cat} / K_m であらわされる。Lineweaver-Burk プロットから各速度パラメータを求めた結果は以下の通りである ($V_{\text{max}}=7.13 \mu\text{M min}^{-1}$, $K_m=312 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}=3.57 \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} / K_m = 11400 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)。

酵素反応速度論的解析によるアルデヒド脱水素酵素と人工補酵素との相互作用の解明

次に、ギ酸からホルムアルデヒドへの変換反応の進行によりを触媒する AldDH とメチルピオローゲンの一電子還元体との相互作用を酵素反応速度論的に解析した。ここで直接ホルムアルデヒドを定量することが困難であったため、ギ酸減少量がホルムアルデヒド生成量と等値であるとし、ギ酸減少量からホルムアルデヒドの生成量を見積もることとした。具体的な実験方法を以下に示す。2 mM ギ酸、4.0 mM ジチオン酸ナトリウムで化学的に還元したメチルピオローゲンの一電子還元体と 20 μM AldDH とを窒素ガスで飽和した緩衝液中で反応させた。イオンクロマトグラフにより反応系のギ酸濃度を測定し、ギ酸減少量からホルムアルデヒド生成量を見積もった。

図 4 にメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度とホルムアルデヒド生成反応初速度との関係を示している。

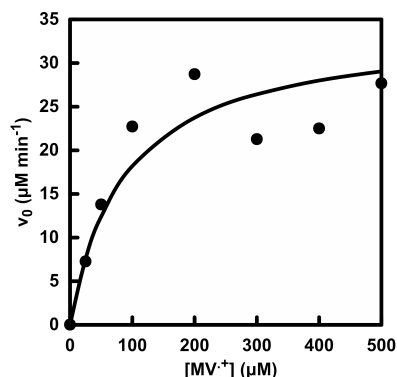


図 4. メチルピオローゲンの一電子還元体 ($\text{MV}^{\cdot+}$) の濃度とホルムアルデヒド生成反応初速度 (V_0) との関係

メチルピオローゲンの一電子還元体が低

濃度の時、ホルムアルデヒド生成濃度はメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度に対して一次関数的に増加し、メチルピオローゲンの一電子還元体が高濃度になるにつれて、生成速度は一定値に近づいたことからこの反応もミカエリス-メンテン型の酵素反応に従うことがわかった。

得られたメチルピオローゲンの一電子還元体の濃度とホルムアルデヒド生成初速度の値から Lineweaver-Burk(図 5)式を用いることで、速度パラメータを求めた。

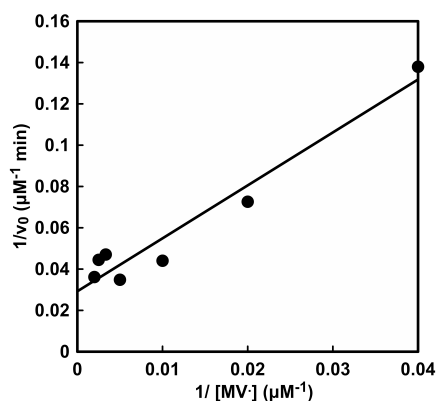


図 5 . Lineweaver-Burk プロット

Lineweaver-Burk プロットから各速度パラメータを求めた結果は以下の通りである ($V_{max}=34.1 \mu\text{M min}^{-1}$, $K_m=87.5 \mu\text{M}$, $k_{cat}=25.7 \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}/K_m=293000 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).^[1]

以上述べたように、メチルピオローゲンの一電子還元体と二酸化炭素-メタノール変換の最終段階であるホルムアルデヒド-メタノール変換反応を触媒するADHとの相互作用について酵素反応速度論的解析を用いて検討し、メチルピオローゲンの一電子還元体とADHとの相互作用とFDHとの相互作用はほぼ等しい親和性で機能している事を見出した。さらに、二酸化炭素-メタノール変換反応を効率的に進めるためには第2段階のギ酸-ホルムアルデヒド変換反応を触媒するAldDHを活性化する人工補酵素が必要であることを明らかにした。これらの成果を基に、メチルピオローゲンの一電子還元体とAldDHとの相互作用について酵素反応速度論的解析を用いて検討した。その結果、メチルピオローゲンの一電子還元体とAldDHとの相互作用は他の脱水素酵素より強い親和性を示すことがわかった。これらの結果を基にメチルピオローゲンの一電子還元体を用い、FDH・AldDH・ADH系による二酸化炭素-メタノール変換系を達成した。

参考文献

[1] Tomoya Ishibashi, Shusaku Ikeyama, Yutaka Amao “Activation of catalytic function of formaldehyde dehydrogenase for formate reduction by single-electron reduced methylviologen”, *New J. Chem.* 投稿中。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

Yutaka Amao, Ryota Kataoka “Methanol production from CO₂ with the hybrid system of biocatalyst and organo-photocatalyst” *Catal. Today*, 2018, 307, 243-247. DOI: 10.1016/j.cattod.2017.12.029. 査読有

Shusaku Ikeyama, Ryutaro Abe, Sachina Shiotani, Yutaka Amao “Effective Artificial Co-enzyme Based on Single-Electron Reduced Form of 2,2'-Bipyridinium Salt Derivatives for Formate Dehydrogenase in the Catalytic Conversion of CO₂ to Formic Acid” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2018.掲載決定 DOI: 10.1246/bcsj.20180013. 査読有

Shusaku Ikeyama, Yutaka Amao “The effect of the functional ionic group of the viologen derivative on visible-light driven CO₂ reduction to formic acid with the system consisting of water-soluble zinc porphyrin and formate dehydrogenase” *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018, 17, 60-68. DOI: 10.1039/C7PP00277G. 査読有

Shusaku Ikeyama, Yutaka Amao “A novel electron carrier molecule based on a viologen derivative for visible light-driven CO₂ reduction to formic acid with the system of zinc porphyrin and formate dehydrogenase” *Sustainable Energy Fuels* 2017, 1, 1730-1733. DOI: 10.1039/C7SE00255F. 査読有

Yutaka Amao “Viologens for Co-enzyme of Biocatalysts with the Function of CO₂ Reduction and Utilization” *Chem. Lett.* 2017, 46, 780-788. DOI: 10.1246/cl.161189. 査読有

(学会発表)(計 51 件)

Yutaka Amao “Visible-light Driven Carbon Dioxide Utilization with Biocatalyst and Dye Molecule Hybrid System” 2017 Global Research Efforts on Energy and Nanomaterials (GREEN 2017)(招待講演), 2017 年

Yutaka Amao “Biocatalyst and Dye Hybrid System with for Visible-light Driven Carbon Dioxide Reduction and Fixation” 2nd International Symposium on Hydrogen Energy-based Society (招待講演) 2017 年

Yutaka Amao “Visible-Light Induced Carbon Dioxide Reduction and Fixation with Photoredox System” EMN Meeting on Energy Storage 2017 (招待講演) 2017 年

Yutaka Amao “Visible light induced CO₂ reduction with the system of biocatalyst and photosensitizer” 15th International

Conference on Carbon Dioxide Utilization
(ICCDU XV) (招待講演) 2017 年

Yutaka Amao “Photoreduction properties of
diphenyl-viologen derivative with
water-soluble porphyrin and its application
for C-C bond formation from carbon
dioxide” 2017 International Conference on
Artificial Photosynthesis (ICARP 2017) (招
待講演) 2017 年

〔その他〕

ホームページ: 大阪市立大学複合先端研究機
構天尾研究室

<http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/site/amao>

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