

酸素耐性水素酸化酵素の精製および燃料電池用酵素電極の開発

江口, 滋信

<https://doi.org/10.15017/1500677>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

九州大学大学院工学府

物質創造工学専攻

博士論文

酸素耐性水素酸化酵素の精製および
燃料電池用酵素電極の開発

江口 滋信

目次

第 1 章 緒言	1
1-1. 序	1
1-2. [NiFe]ヒドロゲナーゼ	4
1-3. [NiFe]ヒドロゲナーゼの水素利用技術への応用	7
1-4. 本論文の構成	8
1-5. 参考文献	10
第 2 章 <i>Citrobacter</i> sp. S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの精製と特性評価	12
2-1. 序	13
2-2. 実験	14
2-2-1. 試薬および測定機器	14
2-2-2. 細菌の単離および培養条件	14
2-2-3. 16S rRNA 系統解析	15
2-2-4. ゲノム解析	16
2-2-5. 膜画分の調製およびヒドロゲナーゼの可溶化	16
2-2-6. 水素による細胞膜中シトクロムの還元	16
2-2-7. [NiFe] _{S77} の精製	17
2-2-8. 酵素活性測定	18
2-2-9. [NiFe] _{S77} の酸素耐性	18
2-2-10. [NiFe] _{S77} の特性評価	19
2-3. 結果と考察	20
2-3-1. S-77 株の単離および系統樹解析	20
2-3-2. <i>Citrobacter</i> sp. S-77 のゲノム解析とヒドロゲナーゼ遺伝子群の同定	21

2-3-3. <i>Citrobacter</i> sp. S-77 由来由来 MBH のレドックスパートナー	22
2-3-4. [NiFe] _{S77} の精製	24
2-3-5. [NiFe] _{S77} の熱力学的パラメータ	28
2-3-6. [NiFe] _{S77} の酸素耐性	30
2-4. 結論	34
2-5. 参考文献	34
第3章 <i>Citrobacter</i> sp. S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼ電極の開発	36
3-1. 序	37
3-2. 実験	38
3-2-1. 試薬および測定機器	38
3-2-2. [NiFe] _{S77} の可溶化および精製	39
3-2-3. [NiFe] _{DVMF} の可溶化および精製	40
3-2-4. 酵素活性測定	41
3-2-5. [NiFe] _{S77} および[NiFe] _{DVMF} の熱安定性	42
3-2-6. [NiFe] _{S77} 酵素溶液のタンパク定量	43
3-2-7. [NiFe] _{DVMF} 酵素溶液のタンパク定量	44
3-2-8. [NiFe] _{S77} の分子量測定	45
3-2-9. [NiFe] _{S77} アノードの作成	45
3-2-10. [NiFe] _{DVMF} アノードの作成	46
3-2-11. Pt/C アノードの作成	46
3-2-12. Pt/C カソードの作成	46
3-2-13. 対照実験用アノードおよびカソードの作成	47
3-2-14. 対照実験用酵素フリーアノードの作成	48
3-2-15. 対照実験用 Pt フリーNafion/C カソードの作成	48
3-2-16. MEA および燃料電池アセンブリ	48

3-2-17. 分極曲線測定	49
3-2-18. [NiFe] _{S77} による HOR におけるプラトー電流密度からの TOF の算出	50
3-2-19. [NiFe] _{DVMF} による HOR におけるプラトー電流密度からの TOF の算出	50
3-2-20. Pt/C による HOR におけるプラトー電流密度からの TOF の算出	51
3-3. 結果と考察	53
3-3-1. [NiFe] _{S77} アノード及び膜電極接合体 (MEA)	53
3-3-2. 分極曲線測定	53
3-3-3. インピーダンス測定	59
3-3-4. 交換電流密度と活性化エネルギー	61
3-3-5. [NiFe] _{S77} 水素燃料電池	65
3-3-6. [NiFe] _{S77} の一酸化炭素被毒	66
3-4. 結論	69
3-5. 参考文献	70
第 4 章 結言	72
発表論文目録	76
謝辞	77

第 1 章 緒言

1-1. 序

産業革命以来、世界のエネルギー消費量は年々増加の一途をたどっている。国際エネルギー機関 (IEA) によれば、2040 年の世界のエネルギー消費量は、新興国のエネルギー需要拡大を受けて、2012 年に比べ約 1.5 倍へ増加すると予測している¹⁾。これら新興国は、近年大きな経済成長を遂げており、今後はますますその成長が加速するとともに、石油や石炭、天然ガスなどの化石燃料の消費量の増加が予測され、エネルギーコストや地球温暖化問題等への大きな影響が懸念される。したがって、化石燃料に変わる代替エネルギー技術の開発は、経済性および環境への適合の観点から、急務であるといえる。

水素は、化石燃料に代わるエネルギー源としてその利用技術開発が精力的に勧められている。中でも、燃料電池技術は、省エネルギー、環境負荷低減の両面で特に注目を集めている。燃料電池は、燃料である水素と空気中の酸素の電気化学反応から電気エネルギーを直接取り出すため発電効率が低い。また、利用段階では二酸化炭素を排出しないことから、水素の製造時に二酸化炭素回収、貯留技術 (Carbon dioxide capture and storage, CCS) を組み合わせる、もしくは再生可能エネルギーから水素を製造するといった水素の製造方法次第では、大気中への二酸化炭素排出量を大幅に削減することが可能である。種々ある燃料電池の内、固体高分子形燃料電池は、作動温度が低く、小型化が容易であることから、民生用および携帯用の発電装置としての開発が進められている。

しかし、現在の固体高分子形の水素-酸素燃料電池において、電極触媒には高価かつ枯渇性の白金が用いられており、本技術の一般化には代替触媒の開発が必要不可欠である。自然界では、水素酸化酵素 (ヒドロゲナーゼ) が常温常圧の温和な条件で水素から電子を取り出しており、触媒としての性能は白金を上回ると考えられている (図 1-1)。

ヒドロゲナーゼは、電子伝達物質の存在下で水素の酸化および生成反応を触媒する酵素である (式 1-1)²⁾。



ここで E は特異的な外部電子伝達物質である。

ヒドロゲナーゼは、数多くの微生物においてタンパク質および遺伝子の研究が進められており、活性中心部位の金属原子によって (1) [NiFe]ヒドロゲナーゼ、(2) [FeFe]ヒドロゲナーゼ、(3) [Fe]ヒドロゲナーゼの3つに分類されている³⁾。このうち、[Fe]ヒドロゲナーゼは、メタン古細菌にのみ存在が確認されており⁴⁾、既報の多くは[NiFe]ヒドロゲナーゼおよび[FeFe]ヒドロゲナーゼに集中している。なかでも、[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水素生成反応に比べて水素酸化反応を効率よく触媒する傾向にあり、水素利用技術への応用が特に期待されている⁵⁾。実際、[NiFe]ヒドロゲナーゼの燃料電池用のアノード極への応用を目的とした研究がいくつか報告されており、ヒドロゲナーゼの触媒性能の高さを実証している。一方で、今日までに報告されてきたヒドロゲナーゼ燃料電池では、セルの構築に電解質溶液を必要としており、白金触媒を搭載した燃料電池に比べて出力密度が著しく低いため、出力の向上が課題となっている (図 1-1)。

本論文における研究対象である *Citrobacter* sp. strain S-77 由来の新規膜結合型ヒドロゲナーゼも[NiFe]ヒドロゲナーゼであるので、以降では[NiFe]ヒドロゲナーゼに関する知見と、その実用触媒としての応用へ向けた研究の現状について概要を述べる。

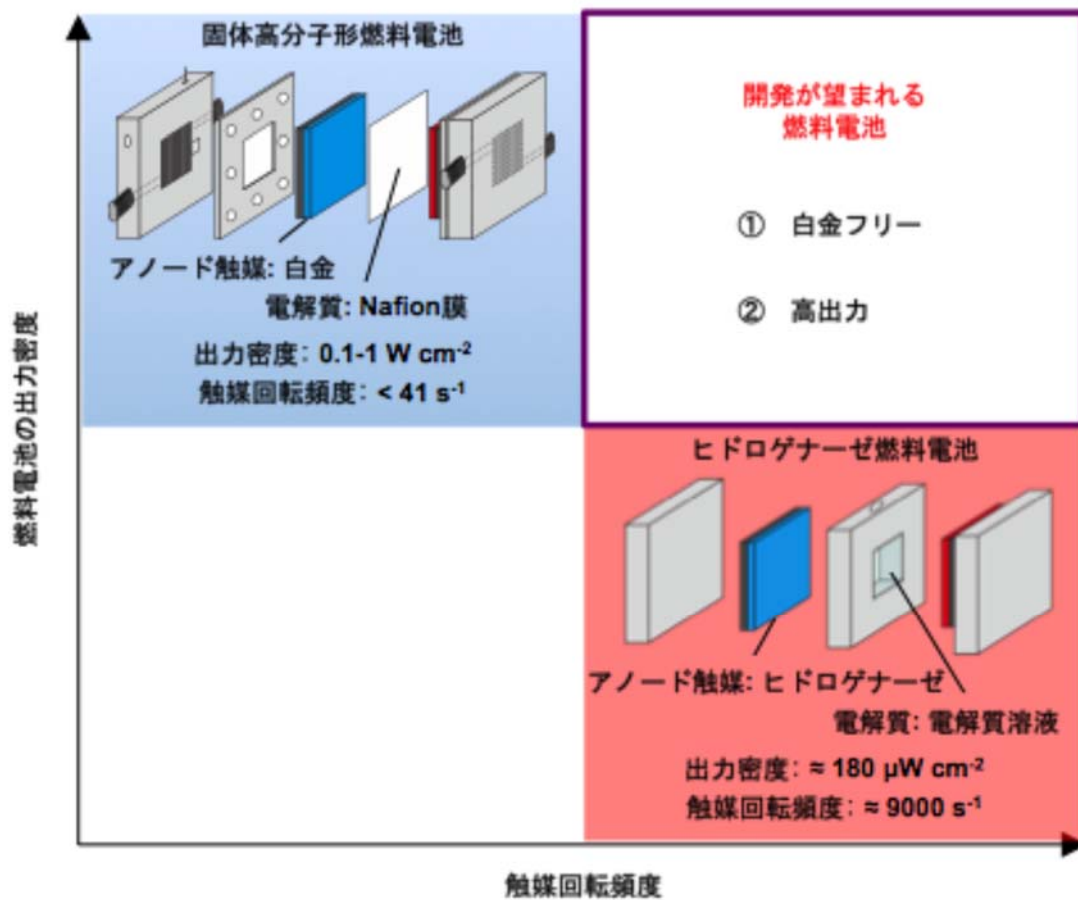


図 1-1. 燃料電池の現状と開発要求.

1-2. [NiFe]ヒドロゲナーゼ

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、活性中心にNiとFeの二核構造を有しており(図1-2a)、(式1-1)の順方向、つまり水素の酸化反応への触媒能に優れる酵素である。立体構造に関しては、Fontecilla-Campsらによって1995年に*Desulfovibrio gigas*由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造(図1-2b)が報告されて以来⁶⁾、同じ硫酸還元菌の*D. vulgaris*や*D. fructosivorans*の他⁷⁾、超高温始原菌*Thermococcus kodakaraensis*から結晶化がなされ⁸⁾、立体構造が推定されている。これらは、全体的な構造にほとんど差がなく、いずれも大、小2つのサブユニットから構成されるheterodimer構造をとっている。2つのサブユニットは、サブユニット界面のアミノ酸残基による疎水性相互作用で安定化されている。大サブユニットには、NiとFeが配位した活性中心があり、小サブユニットには電子伝達を担うFe-Sクラスターが存在している。小サブユニットにはFe-Sクラスターが合計3個、直線上に配置されており、Ni-Fe活性中心側から、[4Fe-4S]クラスター(proximal)、[3Fe-4S]クラスター(medial)、[4Fe-4S]クラスター(distal)の順で約10-12 Åの間隔で並んでいる。これらのヒドロゲナーゼは、結晶学的な解析の他、分光学的、生化学的および電気化学的に最もよく研究されてきており、微量の酸素によって失活し不活性化されてしまうという欠点を有していた⁹⁾。これは、今日までヒドロゲナーゼの実用触媒としての応用を妨げる最大の障壁となってきた。

しかし、近年、好気性水素酸化細菌から大気中程度の酸素濃度でも失活しない酸素耐性を持つヒドロゲナーゼが見出されるようになった¹⁰⁾。さらに最近では、*Hydrogenovibrio marinus*や*Ralstonia eutropha*由来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造解析が成され、proximalのFe-Sクラスターが酸素感受性のヒドロゲナーゼとは異なる特徴的な構造を有していることなどが明らかにされた(図1-2c)¹¹⁾。これら好気性水素酸化細菌由来のヒドロゲナーゼに関する研究に続き、*Escherichia coli*や*salmonella enterica*のような通性嫌気性の腸内細菌にも同様の酸素耐性ヒドロゲナーゼの存在が確認されるなど、生物学的、工業的な分野を始めとする数多くの分野で注目を集めている¹²⁾。

一方で、ヒドロゲナーゼの水素酸化触媒能に着目すると、酸素感受性の[NiFe]ヒドロ

ゲナーゼが 30°C において 2240 s⁻¹ の触媒回転頻度を誇るのに対して¹³⁾、酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼは 8-340 s⁻¹ 程度と大きく劣っている^{10c, 14)}。実用触媒としての応用を考える上では、酸素への耐性と水素酸化触媒能を両立するハイブリッド型酵素の探索が必要不可欠である (表 1-1)。

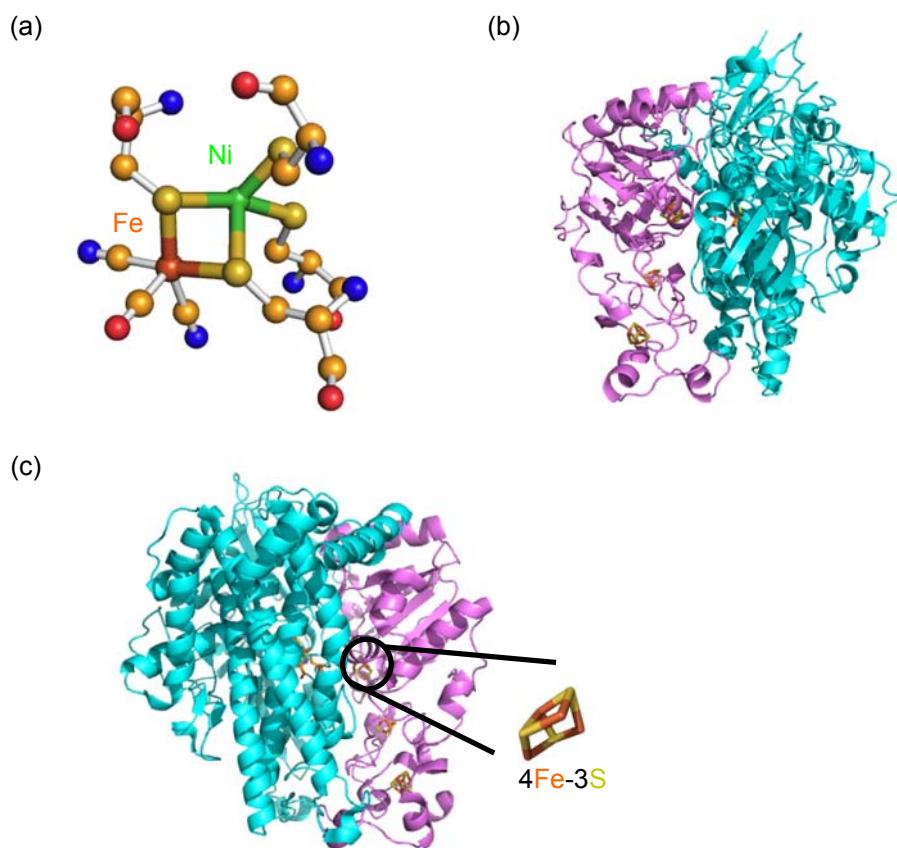


図 1-2. [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造 (a) 活性中心の構造. (b) *D. gigas* 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造 (PDB entry: 2FRV). (c) *H. marinus* 由来酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造 (PDB entry: 3AYZ).

表 1-1 酸素感受性、酸素耐性およびハイブリッド型[NiFe]ヒドロゲナーゼの特徴

	酸素感受性ヒドロゲナーゼ	ハイブリッド型	酸素耐性ヒドロゲナーゼ
長所	高活性	高酸素耐性 高活性	高酸素耐性
短所	酸素存在下で不活性化		低活性

1-3. [NiFe]ヒドロゲナーゼの水素利用技術への応用

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、その水素酸化触媒効率の高さから、水素利用技術への応用が期待されている。代表的な水素利用技術の一つが水素-酸素燃料電池である。燃料電池は、電力を得るための酸化剤および還元剤が電池内に存在する一次電池や二次電池とは異なり、電池外部から反応物を供給し、生成物を外部に排出する。反応物を供給し続ける限り、原理的には永久に発電を続けることが可能で、発電容量や容積発電効率の大きさなどが他の電池に比べて優れている。1839年に Grove 卿により燃料電池の発電実験が公開されて以来、燃料極および対極触媒や電解質の研究開発が続けられてきた。今日では、使われる電解質の種類により、固体高分子形燃料電池(Polymer Electrolyte Fuel Cell, PEFC)、アルカリ型燃料電池(Alkaline Fuel Cell, AFC)、リン酸形燃料電池(Phosphoric Acid Fuel Cell, PAFC)、熔融炭酸塩形燃料電池(Molten Carbonate Fuel Cell, MCFC)、固体酸化物形燃料電池(Solid Oxide Fuel Cell, SOFC)に分類される (表 1-2)¹⁵⁾。

このうち、PEFC や AFC は作動温度が低く、そのシステムが酵素や機能性タンパク質を電極触媒として利用するバイオ燃料電池への応用に適していると考えられる。実際、今日までにグルコースやフラクトースを燃料とし、それらの酸化触媒能を有する酵素を電極触媒に利用した燃料電池が、PEFC と同様にプロトン交換膜をアノード-カソード間のセパレータに用いるシステムで構築が試みられてきた¹⁶⁾。

一方で、水素を燃料とする燃料電池においては、Armstrong らが[NiFe]ヒドロゲナーゼを電極触媒に用いて水素酸化電流の観測に成功している¹⁷⁾。近年では、前述の水素酸化細菌や腸内細菌由来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼを用いて、セパレータのないオープン燃料電池を構築し、3%の水素を含む空気中で起電力を得ることに成功している¹⁸⁾。

しかし、これらの[NiFe]ヒドロゲナーゼを利用した燃料電池用アノード極において観測される触媒電流密度は数 $\mu\text{A cm}^{-2}$ と極めて低く、電池に応用した際にも、従来の白金を電極触媒とする PEFC に比べ大きく劣る性能にとどまっていた。つまり、生物化学的に観測される酵素の触媒効率と、電気化学反応において得られる触媒電流密度との間に大きな隔たりが生じてしまっているのが、酵素燃料電池の現状である。実用を見据えた酵素燃料電池の実現には、酵素を電極触媒に用いて白金と同等以上の触媒電流密度を実証することが重要な課題といえる。

表 1-2 燃料電池の分類と特徴

	PEFC	AFC	PAFC	MCFC	SOFC
作動温度	室温～100°C	室温～230°C	180～200°C	630～670°C	～1000°C
電解質	陽イオン 交換膜	KOH 水溶液	濃 H ₃ PO ₄	Li ₂ CO ₃ -K ₂ CO ₃ 熔融塩	ZrO ₂ -Y ₂ O ₃ (YSZ)
導電イオン	H ⁺	OH ⁻	H ⁺	CO ₃ ²⁻	O ²⁻
触媒	貴金属 (Pt)	Pt (黒 or 担持)	貴金属 (Pt)	-	-
燃料	純水素	純水素	改質水素	改質水素	改質水素
酸化剤	O ₂ , 空気	O ₂ , 空気	空気	空気+CO ₂	空気
用途	小型、携帯用	宇宙、軍用	自家用発電	大規模発電	大規模発電

1-4. 本論文の構成

これまで述べてきたように、[NiFe]ヒドロゲナーゼの実用触媒への応用を考える上で、酸素に安定で、かつ優秀な水素酸化触媒能を有する酵素が求められる。また、そのような酵素を用いて、[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒能を実証することは、水素利用技術の発展に大きな貢献を果たすと考えられる。本論文では、上述の要求を達成するため、自然界より新規の[NiFe]ヒドロゲナーゼを探索と、燃料電池用電極触媒としての性能の実証を目的とする (図 1-3)。

第 2 章では、新規細菌 *Citrobacter* sp. S-77 を単離し、本菌由来のヒドロゲナーゼを精製し、その酸素耐性と水素酸化触媒能を評価した。

第 3 章では、*Citrobacter* sp. S-77 由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼをアノード極触媒に用いて固体高分子形燃料電池を構築し、電極特性の解析と電池としての性能を実証した。

第 4 章では、本論文で得られた知見を総括し、その意義を述べるとともに今後の展望について考察した。

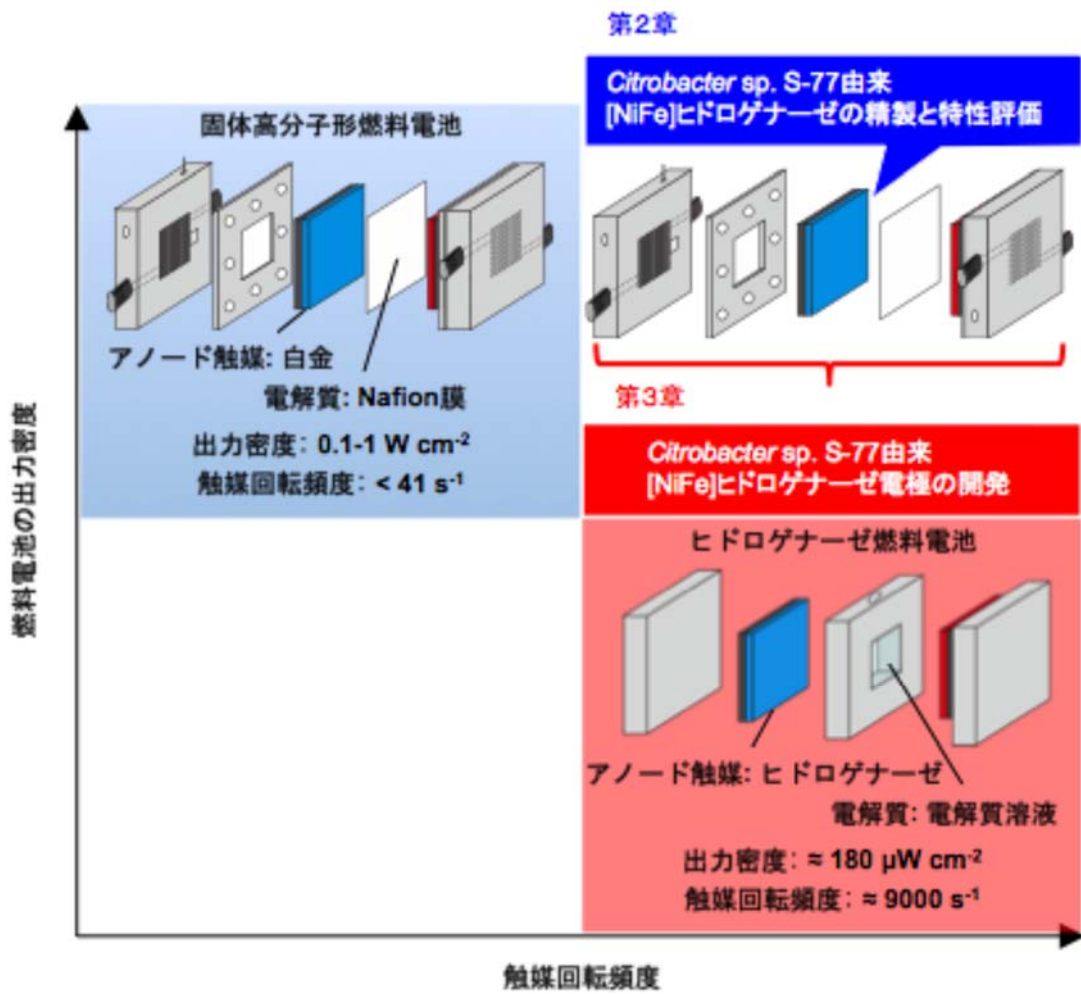


図 1-3. 本論文の構成.

1-5. 参考文献

- 1 World Energy Outlook 2014, *Part A Global Energy Trends*, International Energy Agency, **2014**.
- 2 Vignais, P. M.; Billoud, B. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4206-4072.
- 3 Yagi, T.; Higuchi, Y. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, **2013**, *89*, 16-33.
- 4 (a) Zirngibl, C.; Van Dongen, W.; Schwörer, B.; Von Büнау, R.; Richter, M.; Klein, A.; Thauer, R. K., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *208*, 511–520. (b) Buurman, G.; Shima, S; Thauer, R. K., *FEBS Lett.*, **2000**, *485*, 200-204.
- 5 (a) Mertens, R; Liese, A. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *15*, 343-348. (b) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2439-2461. (c) Ogo, S.; Kabe, R.; Uehara, K.; Kure, B.; Nishimura, T.; Menon, S. C.; Harada, R.; Fukuzumi, S.; Higuchi, Y.; Ohhara, T.; Tamada, T.; Kuroki, R. *Science*, **2007**, *316*, 585-587. (d) Matsumoto, T.; Kim, K.; Ogo, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 11202-11205. (e) Qian, D. J.; Nakamura, C.; Noda, K.; Zorin, N. A.; Miyake, J. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2000**, *84-86*, 409-418.
- 6 Volbeda, A.; Charon, M.-H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. *Nature*, **1995**, *373*, 580-587.
- 7 (a) Higuchi, Y.; Yagi, T.; Yasuoka, N. *Structure*, **1997**, *5*, 1671-1680. (b) Rousset, M.; Montet, Y.; Guigliarelli, B.; Forget, N.; Asso, M.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Hatchikian, E. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 11625–11630.
- 8 Watanabe, S.; Matsumi, R.; Arai, T.; Atomi, H. Imanaka, T. Miki, K. *Mol. Cell*, **2007**, *27*, 29-40.
- 9 Ogata, H.; Lubitz, W.; Higuchi, Y. *Dalton Trans.*, **2009**, 7577-7578.
- 10 (a) Brugna-Guiral, M.; Tron, P.; Nitscheke, W.; Stetter, K.-O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, Giudici-Orticoni, M. T. *Extremophiles*, **2003**, *7*, 145-157. (b) Van der Linden, E.; Burgdorf, T.; Bernhard, M.; Bleijlevens, B.; Friedrich, B.; Albracht S. P. J. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, *9* 616-626. (c) Yoon, K.-S.; Fukuda, K.; Fujisawa, K. *Int. J. Hydrogen Energy*, **2011**, *36*, 7081-7088.

- 11 (a) Shomura, Y.; Yoon, K. S.; Nishihara, H.; Higuchi, Y. *Nature*, **2011**, *479*, 253-256. (b) Fritsch, J.; Scheerer, P.; Frielingsdorf, S.; Kroschinsky, S.; Friedrich, B.; Lenz, O. *Nature*, **2011** *479*, 249-252.
- 12 (a) Volbeda, A.; Amara, P.; Darnault, C.; Mouesca, J. M.; Parkin, A.; Roessler, M. M.; Armstrong, F. A.; Fontecilla-Camps, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 5305-5310. (b) Parkin, A.; Bowman, L.; Roessler, M. M.; Davies, R. A.; Palmer, T., Armstrong, F. A.; Sargent, F. *FEBS Lett.*, **2012**, *586*, 536-544.
- 13 Fauque, G.; Peck Jr., H. D.; Moura, J. J. G.; Huynh, B. H.; Berlier, y.; DerVartanian, D. V.; Teixeira, M.; Przybyla, A. E.; Lespinat, P. A.; Moura, I.; LeGall, J. *FEMS Microbiol. Rev.*, **1988**, *54*, 299-344.
- 14 Sawers, R. G.; Boxer, D. H. *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *156*, 265–275.
- 15 Blomen, L. J. M. H.; Mugerwa, M.N. *Fuel cell Systems*, Springer Publishing, **1994**
- 16 Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kajino, T.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, *9*, 1793-1801.
- 17 Pershad, H. R.; Duff, J. L. C.; Heering, H. A.; Duin, E. C.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 8992–8999.
- 18 (a) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2439–2461. (b) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4366–4413.

第 2 章 *Citrobacter* sp. strain S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの精製と特性評価

概要

ヒドロゲナーゼは、高い触媒能から水素利用技術への応用が期待されている。しかし、多くのヒドロゲナーゼにおいて、酸素に対する不安定さが研究展開の障害となってきた。本研究では、新規に単離した細菌 S-77 株より、酸素に安定な膜結合型ヒドロゲナーゼ (membrane-bound hydrogenase、MBH) を精製した。16S rRNA 系統解析の結果 S-77 株は *Citrobacter* に属するものであった。S-77 株の細胞膜を用いた *in vitro* 実験では、ヒドロゲナーゼの生体内電子受容体としてシトクロム *b* が機能していることが示唆された。精製された MBH ([NiFe]_{S77}) は大小 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体を形成しており、両サブユニットの分子量はそれぞれ 58.5 および 38.5 kDa であった。本酵素の、水素酸化比活性は 661 U mg⁻¹ で、水素発生比活性 18.7 U mg⁻¹ の 35 倍の値を示した。とりわけ、[NiFe]_{S77} は酸素に対して特筆すべき安定性を示し、4°C、空気下において 30 時間経過後も、初期活性の 95% を維持した。以上の結果は、好気雰囲気下での *Citrobacter* sp. S-77 の水素代謝経路において、酸素に安定な [NiFe]_{S77} が重要な役割を担っていることを示唆するものである。本研究の成果は、*Citrobacter* 属の細菌より酸素に安定な MBH の精製および生化学的な特性評価を行った初の例である。

Eguchi, S.; Yoon, K. -S.; Ogo, S.
J. Biosci. Bioeng. **2012**, *114*, 479–484.

2-1. 序

ヒドロゲナーゼは、水素の分解と生成を触媒する酵素であり、数多くの微生物から精製および特性評価がなされてきた¹⁾。Fontecilla-Camps らが初めて[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造を報告して以来²⁾、ヒドロゲナーゼとそれを模倣した合成触媒は生物学および科学技術的な応用の各分野で注目されてきた。事実、ヒドロゲナーゼとそのモデル化合物の広大な研究努力は、これらの水素利用技術への応用の可能性を実証している³⁾。上述の高い期待にも関わらず、実用的な観点からは、酸素による酵素の不活化が最大の問題とされている。ほとんどの[NiFe]ヒドロゲナーゼは、酸素に極めて鋭敏で、空気によって酸化されることで触媒活性を失ってしまう^{1a,4)}。しかし、水素酸化細菌より精製された、いくつかの[NiFe]ヒドロゲナーゼは、並外れた高い酸素耐性を有しており、酸素が高濃度で存在する環境においても触媒活性を示す⁵⁾。一方で近年、*Escherichia coli* 由来の Hydrogenase 1 (Hyd-1) および *Salmonella enterica* 由来の Hyd-5 もまた酸素耐性ヒドロゲナーゼの一群に属することが報告された⁶⁾。

本研究では、自然環境より優れたヒドロゲナーゼを探索するため、酸素への安定性と高触媒活性を両立する強固なヒドロゲナーゼを有する新規細菌を単離した。本論文では、新規細菌 *Citrobacter* sp. S-77 の単離および、*Citrobacter* 属由来としては初となる酸素に安定な MBH の精製と特性評価について報告する。精製した MBH ([NiFe]_{S77}) は著しい水素酸化活性と対酸素安定性を示し、水素生成よりも水素酸化に適していた。*Citrobacter* 属細菌は生物学的な有機化合物の発酵による水素生成が特に注目されている⁷⁾。しかし、ヒドロゲナーゼの生成と特性評価の成功例は未だ報告されていない。本研究において生物化学的な特性評価を通じて得た成果は、酸素に安定な[NiFe]_{S77}が、将来的な水素利用技術における効率的な水素活性化触媒として数多くの利点を有していることを示唆するものである。

2-2. 実験

2-2-1. 試薬および測定機器

水素 (99.9999%) は、岩谷産業株式会社より購入した。Hydroxyapatite は、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社より購入した。HiTrap Q HP、Superdex 200 および DEAE Sepharose FF は、GE ヘルスケア株式会社より購入した。Amicon Ultra-15 (30 000 NMWL) は、メルクミリポアより購入した。3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) は、株式会社同仁化学研究所より購入した。polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (Triton X-100) および dithiothreitol は、和光純薬工業株式会社より購入した。LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis は、GE ヘルスケア株式会社より購入し、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のマーカートンパックとして用いた。紫外可視 (UV-vis) 吸収スペクトルは、日本分光株式会社製 紫外可視近赤外分光光度計 V-670 (光路長 1.0 cm) を用いて記録した。細胞破碎には、株式会社トミー精工製超音波破碎機 UD-200 を用いた。遠心分離は、ベックマン・コールター社製 Optima L-90K 超遠心分離装置を用いて行った。カラムクロマトグラフィーには、GE ヘルスケア株式会社製 AKTA-FPLC システムを用いた。酵素の可溶化および精製において、嫌気雰囲気下での作業は、Coy 社製ビニル嫌気チャンバーを用いて行った。

2-2-2. 細菌の単離および培養条件

S-77 株は、熊本県阿蘇くじゅう国立公園内の中温泉 (21°C) から単離し、30°C で好気培養した。増菌および単離は、改良 Bacto marine broth 培地: 1L あたり yeast extract (3.0 g)、NaCl (30.0 g)、MgSO₄·7H₂O (0.5 g)、(NH₄)₂SO₄ (3.0 g)、K₂HPO₄ (2.0 g)、KH₂PO₄ (1.0 g)、Na₂S₂O₃·5H₂O (2.0 g)、NiCl₂·7H₂O (48 μg)、FeSO₄·7H₂O (3.0 mg)、CaCl₂ (1.2 mg)を用いて行った。pH は、1.0 M NaOH 水溶液を用いて 7.0 に調整した。液体培養は、200 mL フラスコへ培地を 30 mL 分注し、往復式しんとう培養機にて 30°C で行った。複数回の増菌培養の後、培養液を希釈し寒天プレート上に塗布した。コロニーの形成を確認した後、滅菌済みの triphenyltetrazolium chloride 溶液を噴霧し、プレートをデシケータへ移動した。デシケータを水素置換し、30°C で静置した。赤色に染まったコロニーのみを選別

し、液体培地へ植菌した。菌株の純度を確保するため、水素酸化活性を有するコロニーに対してプレート培養と液体培養を3回繰り返した。最も高い水素酸化活性を有するコロニーを選別し、S-77株と命名した。最適な培養条件検討のため、NaCl耐性、至適生育温度、至適生育pHを決定した。生育速度の測定は、2時間毎にサンプルを採取し、540 nmの吸光度測定により行った。大量培養は、10 L ジャーファーマンター model MBF-1000ME (東京理科器械株式会社)を用いて、培地 7 L: 1 L あたり yeast extract (3.0 g)、peptone (3.0 g)、MgSO₄·7H₂O (0.5 g)、(NH₄)₂SO₄ (3.0 g)、KH₂PO₄ (1.0 g)、Na₂S₂O₃·5H₂O (2.0 g)、Ammonium Fe(III) citrate (0.2 g)、CaCl₂ (0.1 g)、NiCl₂·7H₂O (48 μg)、FeSO₄·7H₂O (3.0 mg) を 350 rpm で攪拌し、毎分 1.0 L で窒素を供給しながら 30°C で行った。定常期細胞は、4°C、10,000 × g で 20 分間遠心分離することで収集した。なお、本菌は偏性嫌気条件でなくとも生育可能で、特に本論文で扱うヒドロゲナーゼの精製に関しては、窒素を供給せずに、密閉容器中で行う微好気条件での培養により得られた菌体を用いても同様の結果が得られる。

2-2-3. 16S rRNA 系統解析

ゲノム DNA は、定常期細胞より InstaGene kit (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を用いて抽出した。PCR では、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて、96°C で 10 秒間変性の後、50°C で 5 秒間のアニーリングによりプライマーを結合、60°C で 4 分間プライマーの伸長を 1 サイクルとし、25 サイクル繰り返した。16S rRNA 遺伝子は、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) により配列決定した。実験行程は、メーカーの説明に従い行った。S-77 株の 16S rRNA 遺伝子の完全配列 (1467 bp) は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースにアクセッション番号 AB668058 で登録した。CLUSTAL_X プログラム⁸⁾ は、16S rRNA 遺伝子配列のアラインメントに用いた。系統樹は、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5.2⁹⁾を用いて、neighbor-joining 法¹⁰⁾および maximum-likelihood 法¹¹⁾によって作成した。分岐順は、bootstrap 分析の 1000 回試行結果を元に判断した。

2-2-4. ゲノム解析

Citrobacter sp. S-77 のゲノム解析はインフォバイオ株式会社への委託分析で行った。菌体からゲノム DNA を抽出・断片化し、Roche 社 Genome Sequencer FLX を用いて配列の読み込みを行った。さらに得られた配列を用いて *de novo* アセンブルを行い、scaffold 配列を作成した。

2-2-5. 膜画分の調製およびヒドロゲナーゼの可溶化

採取湿細胞 (25.0 g) を、20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、超音波破碎機 UD-200 を用いて、60 W、5 分間、4 サイクル超音波処理することで破碎した。得られた抽出液を 3000 ×g で 20 分間遠心分離し、細胞残屑を除いた後、Optima L-90 を用いて、150 000 ×g で 1 時間超遠心分離した。沈殿したペレットを 1 M NaCl を含む緩衝液で一度洗浄し、細胞膜に付着した細胞質由来の混入物を排除した。洗浄後の膜画分を 0.2 M NaCl、1 mM dithiothreitol (DTT)、20 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) にタンパク濃度が 4.0 mg mL⁻¹ になるように懸濁し、非イオン性界面活性剤の 1.0% Triton X-100 を用いて可溶化した。界面活性剤を加えた直後に、膜画分懸濁液を 100% Ar 雰囲気下にて 4°C で 3 時間ゆっくりと攪拌した。抽出液を 150 000 ×g で 1 時間超遠心分離した。上澄をヒドロゲナーゼの精製に用いた。

2-2-6. 水素による細胞膜中シトクロムの還元

[NiFe]_{S77} のレドックスパートナーを明らかにするため、単離細胞膜画分を用いて、水素により還元された状態と空気酸化された状態の差スペクトルを測定した。好氣的に調製した膜画分 (1.5 mg mL⁻¹) を、0.1% Triton X-100 を含む 20 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、350 nm から 600 nm 間の吸収スペクトルを測定した。試料の入ったキュベットを厳密封し、水素で 5 分間置換して溶存酸素を取り除いた。嫌気状態の水素飽和試料溶液を 25°C で 30 分間静置し、吸光度の変化を測定した。

2-2-7. [NiFe]_{S77} の精製

全ての精製工程は Coy anaerobic chamber を用いて、室温、嫌気雰囲気 (98% 窒素、2% 水素) で行った。全ての緩衝液は、繰り返し脱気とアルゴン置換を行い、嫌気チャンバー内に保管した。タンパク精製は、AKTA-FPLC system を用いて行った。可溶化膜タンパク溶液は、予め 0.5 mM DTT および 0.03% Triton X-100 を含む 1 mM potassium phosphate (KP) 緩衝液 (pH 7.0) により流速 8.0 mL min⁻¹ で平衡化した hydroxyapatite (2.5 × 15 cm) カラムに直接添加した。ヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションは、流速 7.0 mL min⁻¹ でのグラジエント溶出において約 50 mM KP で溶出した。ヒドロゲナーゼ活性を有するフラクションを集め、最終濃度が 0.5 M になるよう ammonium sulfate を加えた。酵素溶液を、予め 1 mM DTT および 0.5 M ammonium sulfate を含む 20 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により平衡化した Phenyl Sepharose HP (1.6 × 12 cm) カラムに添加した。ヒドロゲナーゼは、1 mM DTT および 0.4% triton X-100 を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いた、流速 5.0 mL/min でのグラジエント溶出において、ammonium sulfate 濃度の低下および、triton X-100 濃度の上昇に伴って溶出した。0.01 M ammonium sulfate、0.3% triton X-100 付近で溶出したヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションを、予め 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により平衡化した Hitrap Q HP (0.7 × 2.5 cm) カラムへ直接添加した。カラムを緩衝液で洗浄後、0.1-0.25 M NaCl を含む MOPS 緩衝液を用いた、流速 1.5 mL min⁻¹ でのグラジエント溶出によって、タンパク質を溶出させた。ヒドロゲナーゼは、約 0.2 M NaCl で溶出し、Amicon ultra-15 を用いて濃縮の後、0.3 M NaCl、0.05% triton X-100 を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により、予め平衡化した Superdex 200 (1.6 × 50 cm) カラムへ添加した。ヒドロゲナーゼは、分子量約 100 kDa の単一ピークとして溶出した。タンパク質の純度は、10 %アクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、Coomassie Brilliant Blue R-250 による染色後に確認した。N 末端アミノ酸配列解析は株式会社アプロサイエンスおよび株式会社ニッピへの委託分析により行った。

2-2-8. 酵素活性測定

水素酸化活性は、吸光度計を用いて、水素依存的な benzyl viologen (BV) の還元に伴う吸光度の変化を測定することで求めた。測定は、ブチルゴムキャップ、アルミシール、およびガラスキューベットを用いて 30°C で行った。標準の測定試料には、20 mM BV を含む 20 mM KP 緩衝液 (pH 7.0) を用いた。活性は、BV ($\epsilon_{600\text{nm}} = 8.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の 600 nm における吸光度の増加速度から計算した。最大反応速度 (V_{max}) およびミカエリスメンテン定数 (K_m) は、測定値のミカエリスメンテン式への非線形回帰的な曲線フィッティングにより算出した。データ処理には、SigmaPlot 8.0 software (Jandel Scientific, CA, USA) の Enzyme Kinetics Module1.1 を用いた。水素発生活性は、 MnCl_2 -alumina カラム搭載の GC-8A gas chromatography (He carrier) (model: Shinwa OGO-SP) を用いて、-196°C (液体窒素) で測定した。ヒドロゲナーゼ活性は、1 分間で 1 μmol の H_2 を酸化もしくは生成する活性を 1 unit と定義し、unit/mg of protein で表した。

2-2-9. $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ の酸素耐性

精製した $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ の酸素耐性を確認するため、酸素雰囲気暴露し酸化された酵素の水素酸化活性を測定した。反応は、ブチルゴムキャップ、アルミシール、2 mL ガラスバイアルを用いて行った。バイアルに精製酵素溶液を入れ、水素、酸素、及び空気で 5 分間置換した。それぞれの試料を 30°C で 60 分間静置した。酸化された試料の残存活性を以下の 2 通りの条件のもと測定した。第一の条件では、水素、酸素、及び空気で飽和したそれぞれの精製 $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ 酵素溶液を、直接酵素活性測定に用いた。第二の条件では、測定前に溶存気体を取り除いた。酵素溶液中の溶存酸素を除去するため、試料を窒素で 3 分間置換した。全ての酵素活性測定は、反応溶液に精製酵素溶液をシリンジで添加して反応を開始した。

2-2-10. [NiFe]_{S77} の特性評価

[NiFe]_{S77} の反応至適 pH は、100 mM Britton and Robinson (BR) 緩衝液を用いて、pH 4.0-10.0 の範囲で水素酸化活性を測定することで求めた。反応至適温度は、20-80°C の範囲で水素酸化活性を測定することで求めた。精製[NiFe]_{S77} の分子量は、Superdex 200 カラムを用いたゲルろ過によって求めた。精製[NiFe]_{S77} の金属含有率は、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) (Exova, Santa Fe Springs, CA, USA) を用いて求めた。検量線は、外標準法によって求めた。タンパク濃度は、既報に従い Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc) を用いて求めた。

2-3. 結果と考察

2-3-1. S-77 株の単離および系統樹解析

高い水素酸化触媒能と酸素安定性を両立するヒドロゲナーゼを有する新規細菌を単離するため、九州地区内の様々な温泉から水性サンプルを採取した。採取したサンプルの内、熊本県阿蘇くじゅう国立公園内の中温泉より採取したサンプルより S-77 株を単離した。単離した S-77 株は 20-40°C の中温域で良く生育した。本菌の至適生育温度は 32°C であった。45°C 以上では生育が見られなかった。生育 pH 範囲は pH 5.0-8.0 で、至適生育 pH は 7.0 であった。S-77 株は 1-7% NaCl 濃度 (w/v) 中で生育可能な高い塩耐性を示し、至適 NaCl 濃度は 3% であった。S-77 株は好気 (空気) および嫌気 (窒素) 雰囲気下のいずれにおいても良く生育した。至適生育条件 (pH 7.0、32°C) において、好気および嫌気雰囲気下での S-77 株の倍加時間は、それぞれ約 1.7 および 1.6 h⁻¹ であった。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹における S-77 株の位置を図 2-1 に示す。S-77 株の 16S rRNA 遺伝子配列は 1437 bp (GenBank accession no. AB668058) で構成されている。S-77 株に完全一致する菌株は NCBI nucleotide database に見つからなかった。16S rRNA 遺伝子配列の比較から、S-77 株は Enterobacteriaceae の一群に属し、最近縁の *Citrobacter murlinae* (NR_028668) と 99% の同一性を示した。

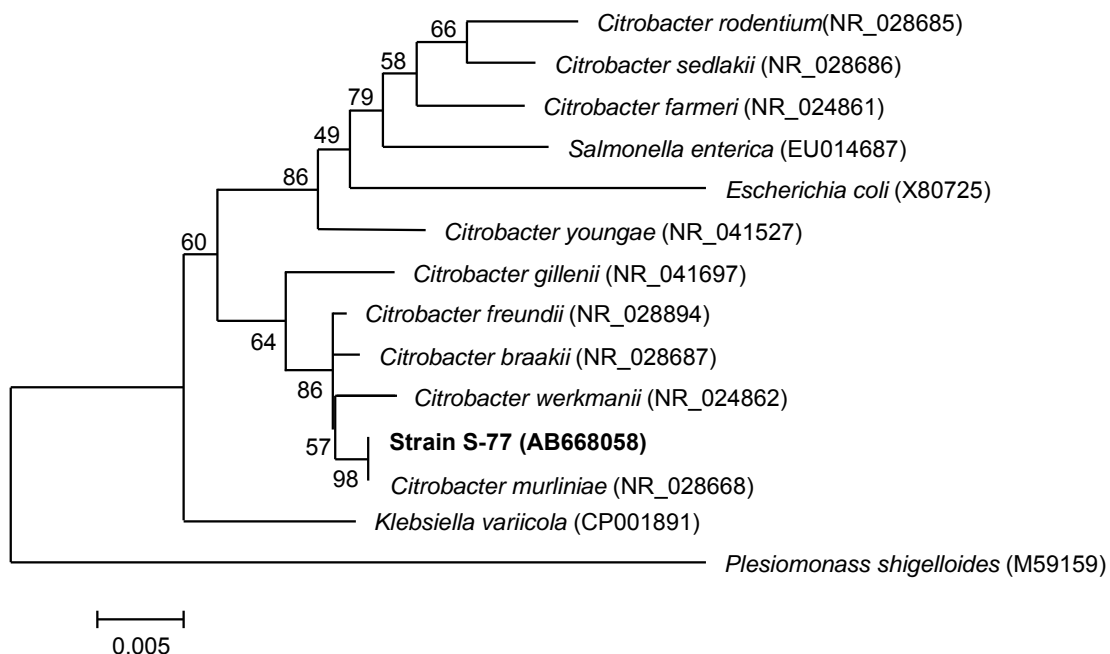


図 2-1 16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹. S-77 株と *Citrobacter* およびその他の近縁種との関係を示す. *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029 (M59159) を外群として選択した. 系統樹作成に用いた配列の Accession number は括弧内に示した. 樹形の高からしきはブートストラップ解析 (1000 回繰り返す) により評価し、分岐箇所にて百分率で表記した. 進化距離は複合最尤法を用いて算出した. 系統解析は MEGA version 5 を用いて行った. スケールバーはサイトあたりの塩基置換数を示す。

2-3-2. *Citrobacter* sp. S-77 のゲノム解析とヒドロゲナーゼ遺伝子群の同定

Citrobacter sp. S-77 の菌体から DNA を抽出・断片化し、シーケンス後に得られた配列を用いて *de novo* アセンブルを行い、scaffold 配列を作成した。得られた scaffold の数は 2 つであり、その総塩基数は約 5.22 Mbp であった (GenBank ID: DF830265, 830266)。既報の 3 例の *Citrobacter* 属細菌ゲノム (GenBank ID: CP007557, NC_013716, NC_009792) では、いずれも総塩基数が 5 Mbp 前後であることから、S-77 のゲノム配列を十分な長さで得ることができたと考えられる。Blastx プログラムを用いて、得られたゲノム配列をアミノ酸配列に翻訳し既知のヒドロゲナーゼ遺伝子群との相同性を評価した。相同性検索の結果、S-77 株が *Citrobacter freundii* 由来の hydrogenase-1 (GenBank ID:

EKS56702-56707)、hydrogenase-2 (GenBank ID: EKS57105-57112)、hydrogenase-3 (GenBank ID: EKS55625-55637)に相当する遺伝子を、いずれも高い相同性で有している事が確認出来た。

2-3-3. *Citrobacter* sp. S-77 由来 MBH のレドックスパートナー

水素分子をヘテロリティックに開裂する際、ヒドロゲナーゼはレドックスパートナーを必要とする。 $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ の生体内レドックスパートナーを明らかにするため、可溶化膜タンパク溶液の吸光スペクトル変化を測定した。水素により還元された試料では、ソーレ帯の 411 nm から 429 nm へのシフトに加え、531 nm および 560 nm に新たな吸収帯が観測された (図 2-2a)。特に、水素還元状態と空気酸化状態の差スペクトルでは、560、531、429 nm にそれぞれ α -、 β -、 γ -吸収帯のピークが観測された (図 2-2b)。この吸収スペクトルはシトクロム *b* に特有のもので、いくつかの好気性水素酸化細菌由来の酸素耐性ヒドロゲナーゼと共通する特徴である^{1a, 12)}。以上の実験結果は、膜内在性のシトクロム b_{560} が $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ の生体内レドックスパートナーとして機能していることを間接的に示唆するものである。報告例の多い硫酸還元菌由来の酸素に鋭敏な $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼでは、低電位のヘム 4 量体シトクロム c_3 が、水素酸化における直接的なレドックスパートナーとして機能すると考えられている¹³⁾。対照的に、好気性水素酸化細菌の酸素耐性ヒドロゲナーゼは、膜内在性のヘム 2 量体シトクロム *b* を MBH の重要な生体内電子伝達体として有している^{1a, 14)}。MBH とシトクロム *b* は、細胞膜を通して互いに MBH のスモールサブユニットの C 末端部位とシトクロム *b* の N 末端部位とで結合している^{1a, 5b-g)}。通常、精製の過程において、シトクロム *b* は MBH 複合体から脱離してしまう^{5a, 14)}。

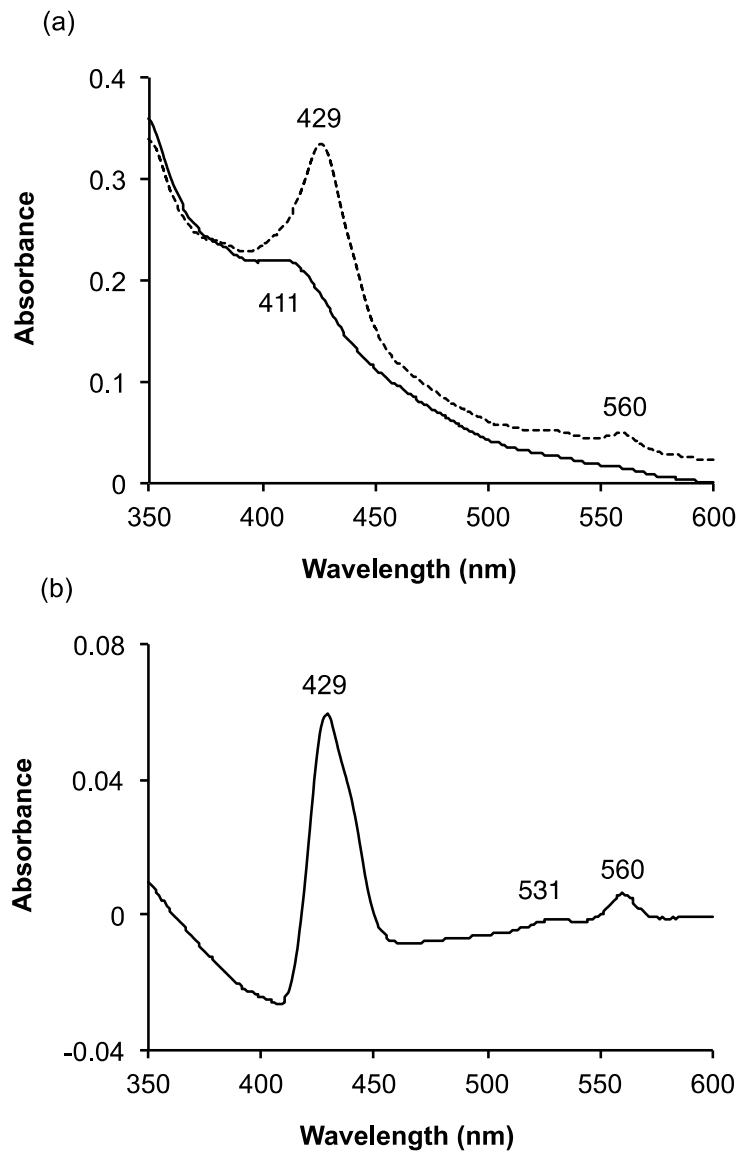


図 2-2 *Citrobacter* sp. S-77 の可溶化膜タンパク溶液 (20 mM MOPS, 0.1% Triton X-100, PH 7.0) の吸収スペクトル. (a) 空気下で酸化した試料 (実線) および 水素下で還元した試料の吸収スペクトル (破線). (b) 差スペクトル (水素還元状態の吸収 - 空気酸化状態の吸収).

2-3-4. [NiFe]_{S77} の精製

可溶化は 1.0% Triton X-100 行い、S-77 株由来単離細胞膜の全ヒドロゲナーゼ活性の内、約 85%の収率で回収した。[NiFe]_{S77}は、hydroxyapatite、Phenyl Sepharose HP、Hitrap Q HP、Superdex 200 の 4 種類のカラムを用いて、精製倍率 67.6 倍および収率 16.3%で精製した (表 2-1)。精製[NiFe]_{S77}は、661 U mg⁻¹の比活性を示した。精製酵素の分子量は、Superdex 200 ゲルろ過クロマトグラフィーにより、約 100 ± 10 kDa と算出された。上述の結果より、[NiFe]_{S77}が SDS-PAGE によって求められた 58.5 および 38.5 kDa の分子量よりなるヘテロ 2 量体を構成していることを示唆するものである (図 2-3)。[NiFe]_{S77} の大小 2 つのサブユニットは、N 末端アミノ酸配列解析の結果、いずれの配列も前述のゲノム解析により明らかにした、hydrogenase-2 に類似の遺伝子より予測されるタンパク質のアミノ酸配列の一部と完全に一致した(図 2-4)。なお、小サブユニットではタンパク質の輸送に関わる Twin-arginine シグナルペプチドを含む 39 残基が切断されていた。NCBI-Blast による相同性検索の結果、[NiFe]_{S77}は、大サブユニットおよび小サブユニットのアミノ酸配列がともに、従来の酸素感受性ヒドロゲナーゼもしくは酸素耐性ヒドロゲナーゼのいずれとも相同性を持たず、大きく異なる配列を持つことが確認された (表 2-2, 2-3)。[NiFe]_{S77}は約 1.8 mol のニッケルと 25.0 mol の鉄を含有しており、*Citrobacter* sp. S-77 由来の精製ヒドロゲナーゼが[NiFe]ヒドロゲナーゼに属することが示唆された。

表 2-1 *Citrobacter* sp. S-77 由来の膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの精製.

Purification step	Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity [†] (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Membrane	2392	245	9.78	100	1
Solubilization	2024	110	18.4	84.5	1.88
Hydroxyapatite	1501	27.6	54.4	62.6	5.56
Phenyl Sepharose HP	1257	8.98	140	52.5	14.3
Hitrap Q HP	728	1.78	409	30.4	41.8
Superdex 200	390	0.59	661	16.3	67.6

[†]水素酸化活性は 20 mM KP 緩衝液 (pH 7.0)を用いて、30°C で測定した。1 分間でタンパク質 1 mg が 2 μmol の BV を還元する活性を 1 ユニット (U) と定義し U/mg で記述した。

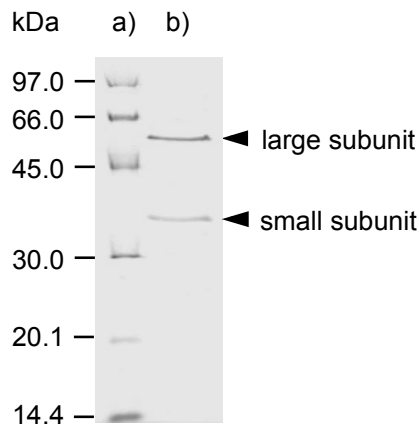


図 2-3 精製[NiFe]_{S77}の SDS-PAGE (12.5%) ゲル。レーン(a) standard marker protein. レーン(b) 精製[NiFe]_{S77}.

(a)

```

M SQRI LDPV R EG HRID QENM QVK MS TNRG MEEV KNRP I
5 W I V A G V T TTHA SSVRA ESAL QNDVP QVGY QNI QNH
101 DI QRY S SD WVDI SALIA DPAKA AMLN GSTW HISA EFK
151 NI QLV S QG IFAG CWGHP AMQLP EVNL IVAH YAL QGD
201 RV QLG KPI QNIA GGVAV PINLD LGVL NERL QKS FDL
251 FE QK DAI AAPP EWLER GQGAV YLSA PFPT QNG QEP
301 YT QD TYRI TSHD EYLK GIQES KHAW YDEA QPW QTV
351 YG QD KQV KAFP YGKTQ EVGPL NMLC KAAK QETH QLE
401 AY QT KTEV AQLS TLGR IGRTV CCEL QVLQ QNA LVI
451 GH TV PDA TGRK GVGEL EAPRG LSHW MIKD QSN QAV
501 TNT QR FNV GPER SLVQ PINDP KPILE VRTE QDPF QSA E

```

(b)

```

G
D D
MNK SLIS NGI NR QFMK L AAL AMG QSA QM A EVSR PQRPP1
5 I AQT GCT LLRA HPTVEN LVLE QTSLE QHVL QAG QHE
101 HA QR GCL VVDS IPLQD NGIYC VAGE PVDH IRRAA EGAAA
151 IIAIG SCAAW GGVAAGVNB TAVG QVQ QKIM NP QMP HNEA
201 AI QG QHD AKNR QFAYG RLIHE CERR PFDA QAK QGE
251 RG QY QGG PETG NCSTL QFCDV GVWP VIGH QGC QEI
301 HG QD QVQ TPRE KPDW IKEGG NISAG AVGLL GGTVG LVAGV
351 SVMAE RLGR QKD QDR Q

```

図 2-4 ゲノム解析結果より予測される[NiFe]_{S77}の (a) 大サブユニット および (b) 小サブユニットのアミノ酸配列。赤字: は N 末端アミノ酸配列解析により確認された配列, 青字: Twin-arginine シグナルペプチドの特徴的な配列。

表 2-2 [NiFe]_{S77} と酸素感受性および酸素耐性ヒドロゲナーゼの大サブユニットのアミノ酸配列
 相同性.

ヒドロゲナーゼの種類		Score (bits)	Expect (E-value)	Identities (%)	Positives (%)
	<i>Citrobacter freundii</i> hydrogenase-2	1145	0.0	99	100
酸素感受性	<i>Hydrogenovibrio marinus</i> hydrogenase	447	4e-154	43	58
ヒドロゲナーゼ	<i>Ralstonia eutropha</i> hydrogenase	444	9e-153	43	58
酸素耐性	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> hydrogenase	447	1e-154	44	59
ヒドロゲナーゼ	<i>Desulfovibrio gigas</i> hydrogenase	449	1e-155	43	59

表 2-3 [NiFe]_{S77} と酸素感受性および酸素耐性ヒドロゲナーゼの小サブユニットのアミノ酸配列
 相同性.

ヒドロゲナーゼの種類		Score (bits)	Expect (E-value)	Identities (%)	Positives (%)
	<i>Citrobacter freundii</i> hydrogenase-2	761	0.0	99	99
酸素感受性	<i>Hydrogenovibrio marinus</i> hydrogenase	279	1e-94	44	63
ヒドロゲナーゼ	<i>Ralstonia eutropha</i> hydrogenase	309	3e-94	42	63
酸素耐性	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> hydrogenase	270	7e-92	47	63
ヒドロゲナーゼ	<i>Desulfovibrio gigas</i> hydrogenase	265	3e-90	47	62

2-3-5. [NiFe]_{S77} の熱力学的パラメータ

本酵素の水素酸化反応における至適反応温度は 65°C であった (図 2-5a)。65°C における水素酸化活性は約 1890 $\mu\text{mol H}_2\text{-oxidation min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ で、30°C における活性の約 2.7 倍となった。[NiFe]_{S77} は、水素雰囲気下、70°C における酵素活性の半減期は 30 分で、S-77 株の至適生育温度が 32°C であることを考慮すると、本酵素が高い熱安定性を有しているといえる。[NiFe]_{S77} の水素酸化反応における至適反応 pH は、pH 7.5 であった。また、pH 7.0、30°C における水素発生活性は 18.7 U mg^{-1} と算出され、水素酸化活性の 1/35 の比活性となった。以上の結果より、[NiFe]_{S77} は、水素発生に比べて水素酸化に特化した特性を持つと推察される。[NiFe]_{S77} の水素酸化反応における比活性 (661 U mg^{-1}) は、他の酸素耐性ヒドロゲナーゼの活性 (4.0-185 U mg^{-1} 、30°C) と比べて著しく高い値である^{12, 17, 33, 34})。水素酸化反応における定常状態の熱力学的パラメータはミカエリスメンテン式を用いて導出され、BV に対するミカエリスメンテン定数 K_m 値は 0.91 mM、最大反応速度 V_{max} は 679 U mg^{-1} となった (図 2-5b)。触媒回転頻度 (k_{cat}) は、[NiFe]_{S77} の計算分子量 100 kDa を用いて計算し、1132 s^{-1} となった。

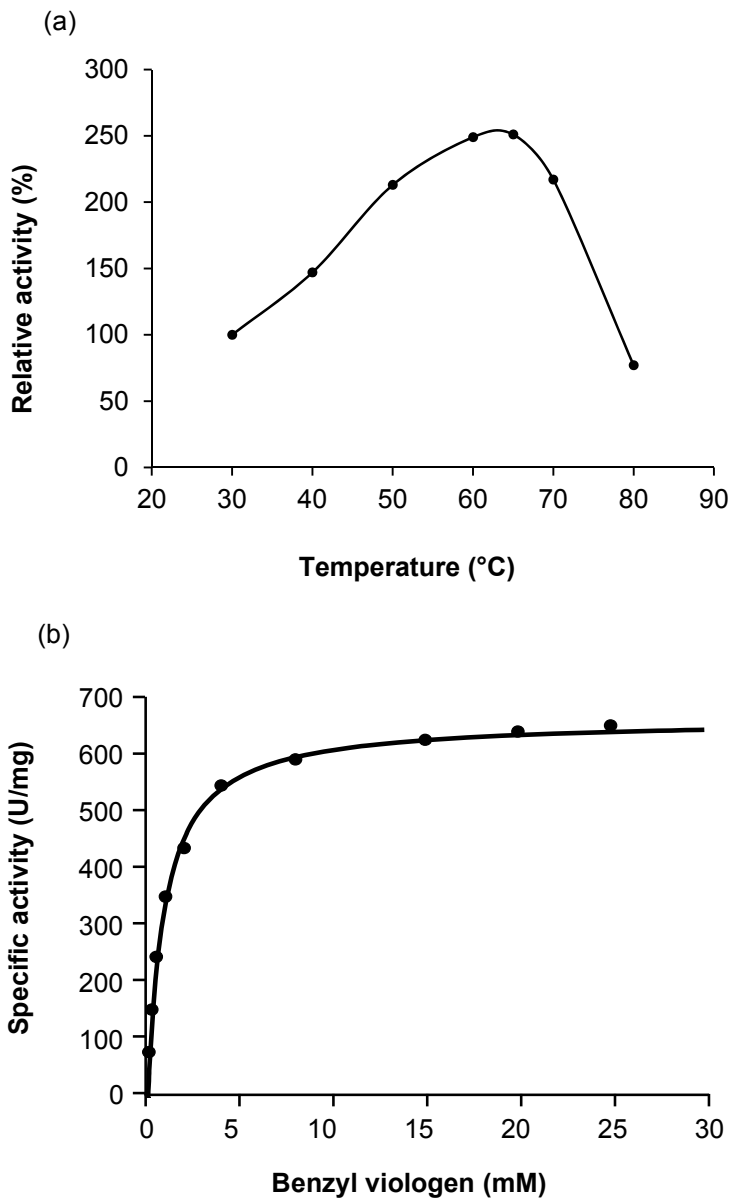


図 2-5 [NiFe]_{S77} の生化学的特性. (a) [NiFe]_{S77} の水素酸化反応における至適反応温度. 測定は pH 7.0 で行った. (b) 定常状態における熱力学的パラメータ. パラメータはベンジルビオロゲン (BV) を電子受容体とした水素酸化活性で決定した. 測定は、予め準備した試料溶液に 30°C で BV を添加することで反応を開始して行った. 得られた結果はミカエリス-メンテン式を用いて非線形回帰直線に帰属した.

2-3-6. [NiFe]_{S77} の酸素耐性

嫌氣的に精製した[NiFe]_{S77}は、水素雰囲気下で反応液に直接添加することで、即座にBVを還元した。空気および100%純酸素によって、30°Cで1時間酸化した試料では、最大活性に到達するまでそれぞれ5分および14分の誘導期が生じた(図2-6)。この誘導期は、反応溶液中の溶存酸素(a-2およびa-3ではそれぞれ、約1.6 μMおよび7.5 μMの溶存酸素濃度)を消費して水を生成するのにかかる時間であると考えられる。酸素耐性ヒドロゲナーゼは大気中と同程度の酸素存在下においても、水素酸化反応を触媒可能で、酸素は4電子、4プロトンの供給を受けて水を生成するために消費される^{14,17)}。図2-5のa-2およびa-3において誘導期を終えた後の比活性は、予め水素雰囲気下で静置した精製直後の[NiFe]_{S77}(a-1)の比活性とほぼ等しかった。図2-6のa-2およびa-3における誘導期は、3分間の窒素置換によって劇的に減少した(図2-6b-2、b-3)。この場合にも、精製直後の[NiFe]_{S77}の比活性とほぼ等しい活性を維持していた。酸素感受性のヒドロゲナーゼでは、酸化状態(Ni-AもしくはNi-B)において、著しく比活性が低下し、微量の酸素が反応溶液中に含まれる場合には水素酸化反応を触媒することが出来ない^{4a)}。例として、代表的な酸素感受性の[NiFe]ヒドロゲナーゼである*Desulfovibrio gigas*由来のヒドロゲナーゼでは、短時間空気に暴露するだけで比活性が80%以上減少することが報告されている。この酸素感受性の[NiFe]ヒドロゲナーゼは、10分間の水素による再活性化後にも元の活性には戻らず、2時間半かけてようやく元の比活性へと回復する^{4a)}。驚くべきことに、酸化された[NiFe]_{S77}は、100%の純酸素に1時間暴露した後でも、90秒以内ですぐに元の比活性へと回復した(図2-6b)。[NiFe]_{S77}は再活性化の手順を必要とせず、これは酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼに特有の性質である^{5a, g)}。また、空気への長期間暴露実験において、[NiFe]_{S77}は、暴露開始から30時間経過後においても初期活性の95%以上を維持していた(図2-7)。より長時間の96時間経過後においても、初期活性の約77%を維持していた。好気性超好熱古細菌*Aeropyrum camini*由来のHydrogenase IIも同様の高い酸素への安定性を示し、48時間の空気暴露後においてもほぼ100%の活性を維持する¹⁵⁾。しかし、このヒドロゲナーゼの水素酸化比活性は14.8 U mg⁻¹で、[NiFe]_{S77}の比活性(661 U mg⁻¹)と比べて著しく劣っている。*Hydrogenovibrio marinus* 由

来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼは、4°C、空気下で72時間経過後に初期活性の19.8%まで活性が低下した。30°C、水素雰囲気下で7時間の再活性化の手順を経ることで、初期活性の51.3%まで活性が回復した^{5a)}。その他、シトクロム *b* の欠損した超好熱水素酸化細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼ I では、20% 酸素雰囲気下で24時間経過後に初期活性の50%まで活性が低下した¹⁶⁾。これらの水素酸化細菌由来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼと比較しても、[NiFe]_{S77} は特筆すべき高い酸素への安定性を有しているといえる。近年、*E. coli* や *S. enterica* 由来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼが確認されている⁶⁾。*Citrobacter* sp. S-77 は Enterobacteriaceae に属しているため、[NiFe]_{S77} は *E. coli* や *S. enterica* 由来の酸素耐性ヒドロゲナーゼと似た特性を示す可能性が考えられる。

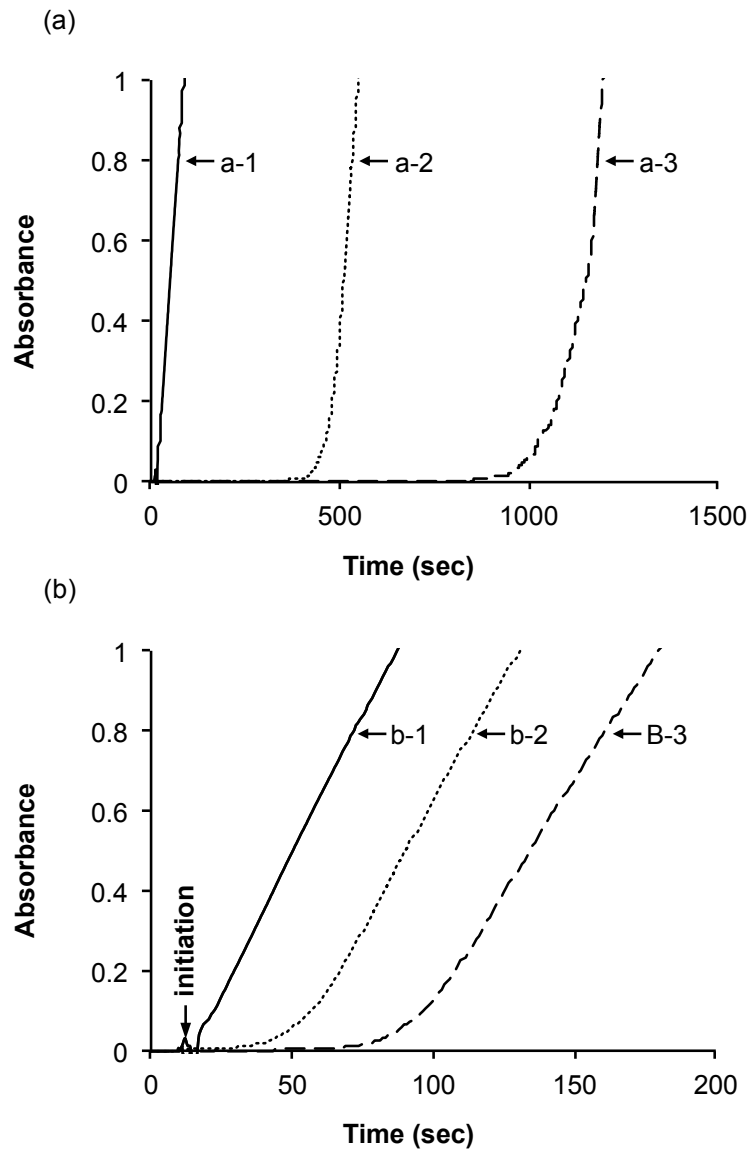


図 2-6 [NiFe]_{S77} の水素酸化活性へ酸素が与える影響. 酸素安定性は、酸素への暴露後の残存活性で評価した. (a) 酵素試料溶液の BV 還元に伴う吸光度の変化. 水素雰囲気下 30°C で 1 時間静置した[NiFe]_{S77} (a-1); 空気雰囲気下 30°C で 1 時間酸化した[NiFe]_{S77} (a-2); 100%酸素雰囲気下 30°C で 1 時間参加した[NiFe]_{S77} (a-3). (b) 窒素で 3 分間置換し溶存酸素を取り除いた酵素試料溶液の BV 還元に伴う吸光度の変化. b-1, 2, 3 はそれぞれ、a-1, 2, 3 で用いた試料を窒素置換したものに对应する. 試料の添加時期は図中に示す.

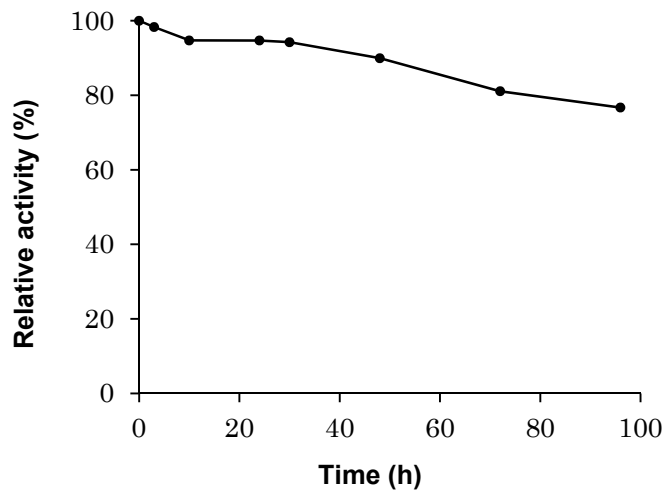


図 2-7 [NiFe]_{S77} の酸素への長期安定性. 精製[NiFe]_{S77} をガラスバイアルに入れ、ゴムキャップとアルミシールで封入し、メンブレンフィルター (0.22 μm) を通した空気です 5 分間置換した. 酵素試料溶液は 4°C で静置し、任意の時間経過ごとに活性測定を行った. 活性測定の前に、酵素試料溶液を窒素で 3 分間置換し、溶存酸素を取り除いた. 反応は、酵素試料溶液を反応溶液に添加することで開始した. すべての測定は 50 mM KP 緩衝溶液 (pH 7.0) を用いて 30°C で行った.

2-4. 結論

第2章では、新規に単離した細菌 *Citrobacter* sp. S-77 由来の膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼを精製しその特性を評価した。精製酵素は、優秀な水素酸化活性と酸素への安定性を両立し、水素利用技術への応用が期待される性質を示した。本研究の成果は、[NiFe]ヒドロゲナーゼの実用触媒への応用の可能性を広げるものであり、今後の本酵素に対する更なる生物化学および構造機能学的な研究によって、酵素触媒および酵素を模倣したモデル化合物の飛躍的な発展へと繋がることを期待する。

2-5. 参考文献

- 1 (a) Vignais, P. M.; Billoud, B. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4206-4272. (b) Ishii, M.; Takishita, S.; Iwasaki, T.; Peerapornpisal, Y.; Yoshino, J.; Kodama, T.; Igarashi, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 492-502. (c) Kanai, T.; Ito, S.; Imanaka, T. *J. Bacteriol.*, **2003**, *185*, 1705-1711.
- 2 Volbeda, A.; Charon, M. H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. *Nature*, **1995**, *373*, 580-587.
- 3 (a) Mertens, R.; Liese, A. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *15*, 343-348. (b) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2439-2461. (c) Ogo, S.; Kabe, R.; Uehara, K.; Kure, B.; Nishimura, T.; Menon, S. C.; Harada, R.; Fukuzumi, S.; Higuchi, Y.; Ohhara, T.; Tamada, T.; Kuroki, R. *Science*, **2007**, *316*, 585-587. (d) Matsumoto, T.; Kim, K.; Ogo, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 11202-11205. (e) Qian, D. J.; Nakamura, C.; Noda, K.; Zorin, N. A.; Miyake, J. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2000**, *84-86*, 409-418.
- 4 (a) Lissolo, T.; Pulvin, S.; Thomas, D. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 11725-11729. (b) Van der Westen, H. M.; Mayhew, S. G.; Veeger, C. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1980**, *7*, 35-39.
- 5 (a) Yoon, K. S.; Fukuda, K.; Fujisawa, K.; Nishihara, H. *Int. J. Hydrogen Energy*, **2011**, *36*, 7081-7088. (b) Shomura, Y.; Yoon, K. S.; Nishihara, H.; Higuchi, Y. *Nature*, **2011**, *479*, 253-256. (c) Fritsch, J.; Scheerer, P.; Frielingsdorf, S.; Kroschinsky, S.; Friedrich, B.; Lenz, O. *Nature*, **2011**, *479*, 249-252. (e) Pandelia, M. E.; Infossi, P.; Giudici-Orticoni, M. T.;

- Lubitz, W. *Biochemistry*, **2010**, *49*, 8873-8881. (f) Schink, B.; Probst, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, *95*, 1563-1569. (g) Cracknell, J. A.; Wait, A. F.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 20681-20686.
- 6 (a) Volbeda, A.; Amara, P.; Darnault, C.; Mouesca, J. M.; Parkin, A.; Roessler, M. M.; Armstrong, F. A.; Fontecilla-Camps, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 5305-5310. (b) Parkin, A.; Bowman, L.; Roessler, M. M.; Davies, R. A.; Palmer, T., Armstrong, F. A.; Sargent, F. *FEBS Lett.*, **2012**, *586*, 536-544.
- 7 (a) Kanayama, H.; Sode, K.; Karube, I. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1987**, *15*, 97-106. (b) Oh, Y. K.; Seol, E. H.; Kim, J. R.; Park, S. *Int. J. Hydrogen Energy*, **2003**, *28*, 1353-1359.
- 8 Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4876-4882.
- 9 Saitou, N.; Nei, M. *Mol. Biol. Evol.*, **1987**, *4*, 406-425.
- 10 Felsenstein, J. *J. Mol. Evol.*, **1981**, *17*, 368-376.
- 11 Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. *Brief. Bioinform.*, **2004**, *5*, 150-163 (2004).
- 12 (a) Yoon, K. S.; Sakai, Y.; Tsukada, N.; Fujisawa, K.; Nishihara, H. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2009**, *290*, 114-120. (b) Yoon, K. S.; Tsukada, N.; Sakai, Y.; Ishii, M.; Igarashi, Y.; Nishihara, Y. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2008**, *278*, 94-100. (c) Bernhard, M.; Benelli, B.; Hochkoeppler, A.; Zannoni, D.; Friedrich, B. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *248*, 179-186.
- 13 (a) Yahata, N.; Saitoh, T.; Takayama, Y.; Ozawa, K.; Ogata, H.; Higuchi, Y.; Akutsu, H. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 1653-1662. (b) Matias, P. M.; Soares, C. M.; Saraiva, L. M.; Coelho, R.; Morais, J.; Gall, J. L.; Carrondo, M. A. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, *6*, 63-81.
- 14 Schink, B.; Schlegel, H. G. *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, *567*, 315-324.
- 15 Nishimura, H.; Sako, Y. *J. Biosci. Bioeng.*, **2009**, *108*, 299-303.
- 16 Brugna-Guiral, M.; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K. O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M.; Giudici-Orticoni, M. T. *Extremophiles*, **2003**, *7*, 145-157.

第3章 *Citrobacter* sp. S-77 由来 [NiFe]ヒドロゲナーゼ電極の開発

概要

水素と酸素から電気エネルギーを取り出す水素-酸素燃料電池は、排出される廃棄物が水のみな為、環境調和型の次世代発電デバイスとして、数ある水素利用技術の中でも特に期待されている。しかし、電極触媒には枯渇性の高価な白金が用いられており、これに代わる触媒の開発が望まれている。本研究では、*Citrobacter* sp. S-77 由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼ ([NiFe]_{S77}) を触媒として用いた燃料電池の水素極を開発した。[NiFe]_{S77} 電極は、水素半電池において 50 mV における単位質量あたりの活性 (1 mg の[NiFe]_{S77} および白金を基準にして算出) が白金の 637 倍である。[NiFe]_{S77} 電極は、空气中で安定な上、白金とは異なり一酸化炭素被毒後に 100%の活性回復も可能である。[NiFe]_{S77} 電極の特性評価に加え、[NiFe]_{S77} アノードと白金カソードを用いた燃料電池を構築し、白金により達成されるよりも高い出力密度を実証した。

Matsumoto, T.; Eguchi, S.; Nakai, H.; Hibino, T.; Yoon, K. -S.; Ogo, S.
Angew. Chem. Int. Ed, **2014**, 53(34), 8895–8898.

3-1. 序

白金は、周知の通り希少かつ高価であるにも関わらず、化学的に安定で、優秀な電気化学性質を有している為に、数多くの電気化学的応用において電極として利用されている。白金は、非常に低いオーバーポテンシャルで水素分子 (H_2) を水素ラジカル (H^\bullet) へホモリティックに開裂させる触媒としても機能する為、特に水素燃料電池のアノードとして有益である¹⁾。故に、白金は標準水素電極 (standard hydrogen electrode, SHE) として、全ての電気化学的な電位を定義する電極としての重要な役割を担っている²⁾。実際、白金は水素極において非常に優秀な触媒であり、費用と供給量の問題のみが化学者が代替物質を模索する要因となっている³⁾。

代替電極として期待されるものの1つに酵素電極があり、ここで酵素は溶液中や固体物質の一部として用いられ、興味深い電気化学反応を触媒する。しかし、酵素電極は多くの場合効率的には働かず、主にその基質特異性に注目が集まっている。水素電極の場合、[NiFe]ヒドロゲナーゼが、水素酸化の優秀な触媒として検討されてきた⁴⁾。しかし、既報の[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水素燃料電池において満足な性能を発揮する為には、酸素に対して鋭敏すぎるか、もしくは活性が低すぎるかのどちらかの問題を抱えていた。

Armstrongらは、*Allochromatium vinosum* 由来の精製した膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼを、溶液系の水素-酸素燃料電池のアノード触媒として使用した^{4c)}。この[NiFe]ヒドロゲナーゼアノードは白金アノードと同等以上の水素酸化能を有している。しかし、ヒドロゲナーゼは未だ固体高分子形燃料電池 (PEFC) の電極には用いられていない^{4c, d, 5)}。

本研究に先立ち、筆者らは特徴的な[NiFe]ヒドロゲナーゼを *Citrobacter sp. S-77* から発見したことを報告した⁶⁾。この膜結合型の[NiFe]ヒドロゲナーゼ ([NiFe]_{S77}) は、酸素に安定なだけでなく、高活性である。本研究では、[NiFe]_{S77}の水素燃料電池用電極としての応用について検討し、質量活性および反応/拡散抵抗のいずれにおいても、一般的な Pt/C に勝ることを実証する。さらに、標準の白金水素燃料電池に勝る性能の固体高分子形酵素燃料電池の構築についても実証する。

3-2. 実験

3-2-1. 試薬および測定機器

H₂ (99.9999%) は、岩谷産業株式会社より購入した。H₂/CO (103.2 ppm CO) 混合ガス及び H₂/N₂ (50%/50%、30%/70%および 4%/96%) 混合ガスは、住友精化株式会社より購入した。O₂ (99.9999%) は、ジャパン・エア・ガシズ株式会社より購入した。Vulcan XC-72 炭素粉末は、キャボットより購入した。カーボン粉末担持白金触媒 (Pt/C, Pt 46.1%) は、田中貴金属工業株式会社より購入した。耐水カーボンクロス (EC-CC1-060T) は、株式会社東陽テクニカより購入した。プロトン伝導性高分子電解質 Nafion NRE212 および Nafion 5wt%分散溶液は、シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社より購入した。Hydroxyapatite は、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社より購入した。HiTrap Q HP、Superdex 200 および DEAE Sepharose FF は、GE ヘルスケア株式会社より購入した。Amicon Ultra-15 (30 000 NMWL) は、メルクミリポアより購入した。3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS) は、株式会社同仁化学研究所より購入した。polyoxyethylene(10) octylphenyl ether (Triton X-100) および dithiothreitol は、和光純薬工業株式会社より購入した。Sinapinic acid は、フルカより購入した。Precision plus protein unstained standards は、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社より購入し、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のマーカートンパクとして用いた。分極曲線、出力密度曲線およびインピーダンス曲線は、株式会社東陽テクニカ製燃料電池評価システム 890CL およびソーラートロン社製ポテンショ／ガルバノスタット 1287A、周波数応答アナライザ 1255B を用いて記録した。紫外可視 (UV-vis) 吸収スペクトルは、日本分光株式会社製 紫外可視近赤外分光光度計 V-670 (光路長 1.0 cm) を用いて記録した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) は、ブルカー社製 Autoflex III を用いて測定した。細胞破碎には、株式会社トミー精工製超音波破碎機 UD-200 を用いた。遠心分離は、ベックマン・コールター社製 Optima L-90K 超遠心分離装置を用いて行った。カラムクロマトグラフィーには、GE ヘルスケア株式会社製 AKTA-FPLC システムを用いた。酵素の可溶化および精製において、嫌気雰囲気下での作業は、Coy 社製ビニル嫌気チャンバーを用いて行った。

燃料電池セル作成において、嫌気雰囲気下での作業は、グローブバック (AS One、2200ANM/XL、size: 860 × 560 × 725 mm) を用いて行った。

3-2-2. [NiFe]_{S77} の可溶化および精製

[NiFe]_{DvMF} の可溶化および精製は、既報の一部に改良を加えた以下の手順により行った⁶⁾。採取湿菌体 (50 g) を MOPS/KOH 緩衝溶液 (20 mM、pH 7.0) 200 mL に懸濁した。細胞懸濁液を氷浴しながら 60 W、5 分間を 3 サイクル超音波処理することで細胞を破碎した。細胞膜は、4°C、150 000 ×g で 1 時間超遠心分離することで集めた。膜ペレットを、dithiothreitol (0.5 mM) および Triton X-100 (1%) を含む MOPS/KOH 緩衝溶液 (20 mM、pH 7.0) でタンパク濃度が約 4 mg mL⁻¹になるように懸濁した。懸濁液を 4°C、N₂ 雰囲気下で 3 時間ゆっくりと攪拌した後、150 000 ×g で 1 時間超遠心分離した。上澄を [NiFe]_{S77} の精製に用いた。可溶化膜タンパクは、予め 0.5 mM DTT および 0.03% Triton X-100 を含む MOPS/KOH 緩衝溶液 (10 mM、pH 7.0) により平衡化した DEAE Sepharose FF カラム (5.0 × 15 cm) へ直接添加した。カラムを同一の緩衝溶液で洗浄した後、流速 20 mL min⁻¹ で 0-500 mM NaCl のグラジエント溶出を行った。約 200 mM NaCl で溶出したヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションを、予め 0.5 mM DTT および 0.03% Triton X-100 を含む 1 mM potassium phosphate (KP) 緩衝液 (pH 7.0) により流速 8.0 mL min⁻¹ で平衡化した hydroxyapatite カラムへと添加した。ヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションは、流速 7.0 mL min⁻¹ でのグラジエント溶出において約 50 mM KP で溶出した。ヒドロゲナーゼ活性を有するフラクションを集め、予め 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により平衡化した Hitrap Q HP (0.7 × 2.5 cm; GE healthcare) カラムへ直接添加した。カラムを緩衝液で洗浄後、0.1-0.25 M NaCl を含む MOPS 緩衝液を用いた、流速 1.5 mL min⁻¹ でのグラジエント溶出によって、タンパク質を溶出させた。ヒドロゲナーゼは、約 0.15 M NaCl で溶出し、Amicon ultra-15 (30 000 NMWL) を用いて濃縮の後、0.15 M NaCl を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により、流速 0.5 mL min⁻¹ で予め平衡化した Superdex 200 (1.6 × 50 cm) カラムへ添加した。タンパク質の純度は、12.5%アクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。後述のタンパク定

量の結果、[NiFe]_{S77} 酵素溶液 (10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) のタンパク濃度は、47.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ となった。

3-2-3. [NiFe]_{DvMF} の可溶化および精製

[NiFe]_{DvMF} の可溶化および精製は、既報の一部に改良を加えた以下の手順により行った⁷⁾。採取湿菌体 (30 g) を 400 mM の硫酸アンモニウムを含むリン酸カリウム緩衝溶液 (600 mM、pH 7.0) 150 mL で洗浄した。洗浄菌体を同一の緩衝液 150 mL で懸濁し、氷浴しながら 60 W、3 分間を 4 サイクル超音波処理することで細胞を破碎した。得られた抽出液を 4°C、3000 $\times g$ で 20 分間遠心分離し細胞残屑を除いた後、4°C、150 000 $\times g$ で 1 時間超遠心分離した。膜ペレットを、400 mM 硫酸アンモニウムを含むリン酸カリウム緩衝溶液 (600 mM、pH 7.0) で懸濁し、Triton X-100 (0.5%) およびコール酸ナトリウム (2%) を界面活性剤として加えて可溶化した。懸濁液を 4°C、N₂ 雰囲気下で 1 時間ゆっくりと攪拌した後、150 000 $\times g$ で 1 時間超遠心分離した。上澄を [NiFe]_{DvMF} の精製に用いた。タンパク溶液の緩衝溶液交換および脱塩は、Sephadex G-25 (300 mL) カラムを用いて Tris-HCl 緩衝溶液 (10 mM、pH 8.0) で行った。脱塩後のタンパク溶液は、予め Tris-HCl 緩衝溶液 (10 mM、pH 8.0) により平衡化した Q Sepharose high performance カラム (2.6 \times 15 cm) へ直接添加した。カラムを 100 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝溶液 (10 mM、pH 8.0) で洗浄した後、流速 8.0 mL min⁻¹ で 100-400 mM NaCl のグラジエント溶出を行った。約 300 mM NaCl で溶出したヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションを、予めリン酸カリウム緩衝溶液 (1 mM、pH 7.0) により流速 4.0 mL min⁻¹ で平衡化した hydroxyapatite カラム (1.6 \times 15 cm) へと添加した。ヒドロゲナーゼ活性を示すフラクションは、流速 4.0 mL min⁻¹ での 1-400 mM KP のグラジエント溶出によって、約 200 mM KP で溶出した。ヒドロゲナーゼ活性を有するフラクションを集め、Amicon ultra-15 (30,000 NMWL) を用いて濃縮の後、0.15 M NaCl を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) により、流速 0.5 mL min⁻¹ で予め平衡化した Superdex 200 (1.6 \times 50 cm) カラムへ添加した。タンパク質の純度は、12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気

泳動によって確認した (図 3-1)。後述のタンパク定量の結果、[NiFe]_{DvMF} 酵素溶液 (10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) のタンパク濃度は、49.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ となった。

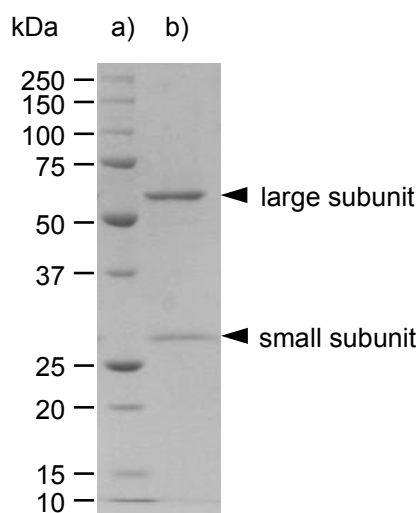


図 3-1 *D. vulgaris* Miyazaki F 由来の精製[NiFe]ヒドロゲナーゼの SDS-PAGE (12.5%) ゲル。レーン(a) standard marker protein. レーン(b) 精製[NiFe]ヒドロゲナーゼ。

3-2-4. 酵素活性測定

水素酸化活性は、吸光光度計を用いて、水素依存的な benzyl viologen (BV)の還元に伴う吸光度の変化を測定することで求めた。測定は、ブチルゴムキャップ、アルミシール、およびガラスキューベットを用いて 60°C で行った。標準の測定試料には、20 mM BV を含む KP 緩衝液 (20 mM、pH 7.0)を用いた。活性は、BV ($\epsilon_{600\text{nm}} = 8.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の 600 nm における吸光度上昇から計算した。[NiFe]_{DvMF} の比活性は、553 $\mu\text{mol H}_2\text{-oxidized min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ となった。[NiFe]_{DvMF} の比活性と分子量 (89 kDa) より、TOF ((mol of H₂/mol of [NiFe]_{DvMF}) per second)は、820 s⁻¹となった。

3-2-5. [NiFe]_{S77} および [NiFe]_{DvMF} の熱安定性

精製した[NiFe]_{S77}および[NiFe]_{DvMF}の熱安定性は、水素雰囲気下、60°Cで加熱処理した後の活性残存率で評価した(図3-2)。試料は、任意の時間ごとに収集し、活性測定に用いた。

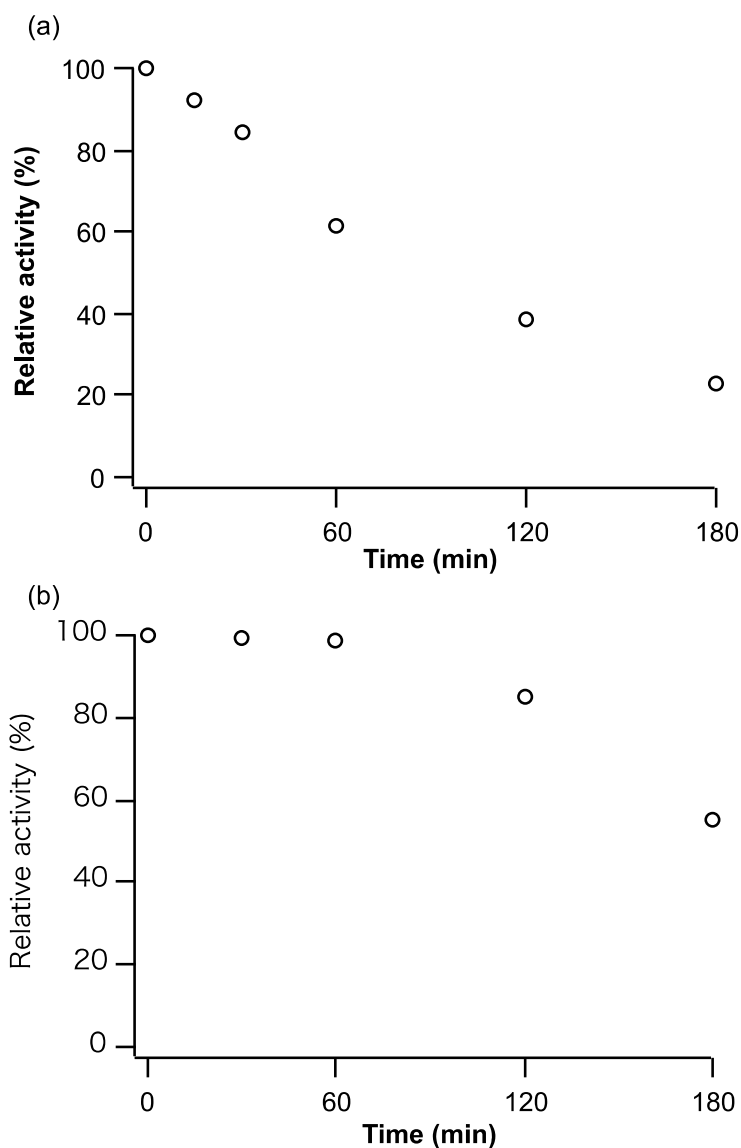


図 3-2 (a) [NiFe]_{S77} および (b) [NiFe]_{DvMF} の熱安定性. 水素雰囲気下、60°Cでの加熱時間ごとの残存活性で評価. 詳細は実験項に記述.

3-2-6. [NiFe]_{S77} 酵素溶液のタンパク定量

精製後の[NiFe]_{S77} 酵素溶液 (10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) のタンパク濃度は、DC (Detergent compatible) protein assay (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) により $47.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (3 回平均) となった⁸⁾。ウシ血清アルブミン (BSA) は、検量線作成の際に標準タンパクとして用いた (図 3-3)。

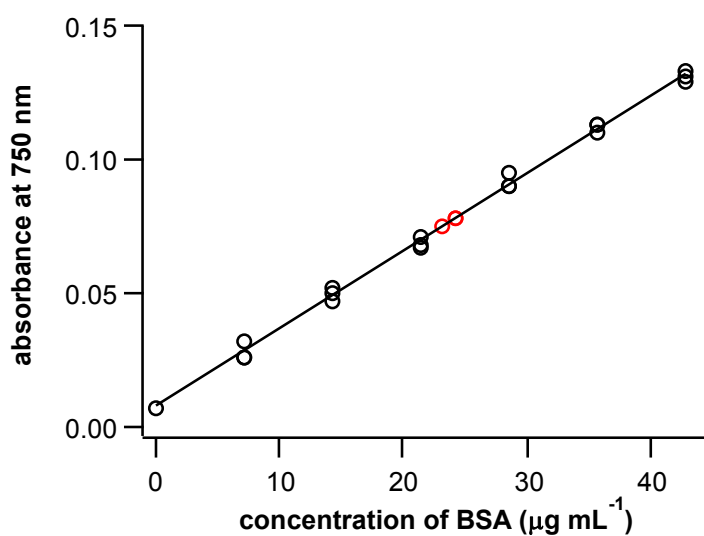


図 3-3 BSA を標準タンパクに用いて作成した検量線 (○) と 2 倍希釈した[NiFe]_{S77} のタンパク濃度 (○).

3-2-7. [NiFe]_{DvMF} 酵素溶液のタンパク定量

精製後の[NiFe]_{DvMF} 酵素溶液 (10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) のタンパク濃度は、DC (Detergent compatible) protein assay (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) により $49.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (3 回平均) となった⁸⁾。ウシ血清アルブミン (BSA) は、検量線作成の際に標準タンパクとして用いた (図 3-4)。

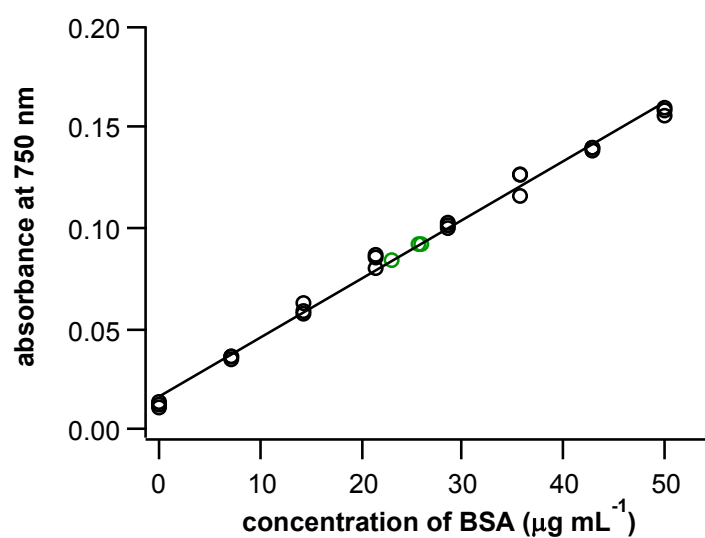


図 3-4 BSA を標準タンパクに用いて作成した検量線 (○) と 2 倍希釈した[NiFe]_{DvMF} のタンパク濃度 (○).

3-2-8. [NiFe]_{S77} の分子量測定

[NiFe]_{S77} の分子量は、sinapinic acid をマトリクスに用いた MALDI-TOF-MS によって決定した (図 3-5)。60 542 (大サブユニット) および 30 219 (小サブユニット) を合計した 90 761 を [NiFe]_{S77} の分子量と定めた。

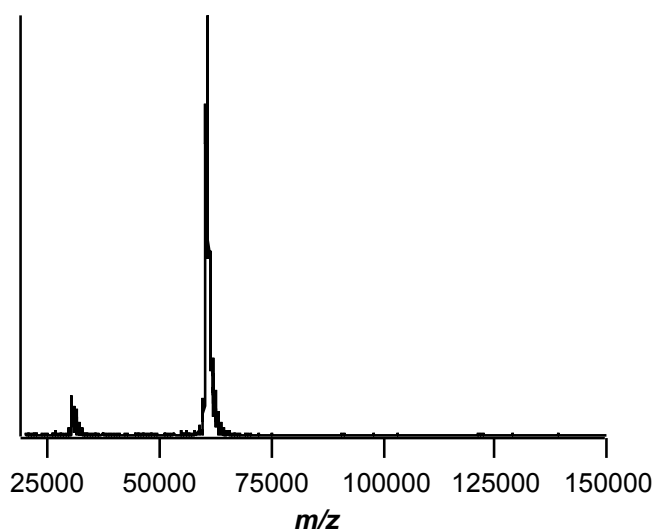


図 3-5 Sinapinic acid をマトリクスに用いた [NiFe]_{S77} の MALDI-TOF mass スペクトル. m/z 60 542 および 30 219 のシグナルはそれぞれ大サブユニットおよび小サブユニットに相当する. MALDI-TOF-MS 分析の試料は以下の手順で調製した. [NiFe]_{S77} 酵素溶液 ($47.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 mM MOPS/KOH 緩衝液, 150 mM NaCl, pH 7.0) $1 \mu\text{L}$ を試料台に滴下し、マトリクス水溶液 (sinapinic acid 10 mg mL^{-1} , trifluoroacetic acid 0.05%, acetonitrile 50%) $1 \mu\text{L}$ と混合した. 試料台上の混合溶液を減圧乾燥した.

3-2-9. [NiFe]_{S77} アノードの作成

[NiFe]_{S77} 希釈溶液 ($9.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液, 150 mM NaCl, pH 7.0) は、精製 [NiFe]_{S77} 酵素溶液 ($47.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) を 5 倍希釈して調製した。カーボンブラック (5 mg) を [NiFe]_{S77} 希釈溶液 (100 μL) に加えた懸濁液を、耐水カーボクロス (5 cm^2) に塗布した後、室温、空気下で乾燥させてガス拡散電極を作成した。

3-2-10. [NiFe]_{DvMF} アノードの作成

[NiFe]_{DvMF} 希釈溶液 (9.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) は、精製[NiFe]_{DvMF} 酵素溶液 (49.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) を 5 倍希釈して調製した。カーボンブラック (5 mg) を[NiFe]_{DvMF} 希釈溶液 (100 μL) に加えた懸濁液を、耐水カーボクロス (5 cm^2) に塗布した後、室温、空気下で乾燥させてガス拡散電極を作成した。

3-2-11. Pt/C アノードの作成

カーボンブラック (4.4 mg) と Pt/C (1.1 mg) を混合し、耐水カーボクロス (5 cm^2) へ塗布してガス拡散電極を作成した。Nafion 溶液を使わずに作成した[NiFe]_{S77} アノード都の比較のため、Pt/C アノードの作成には Nafion 溶液を使用しなかった。

3-2-12. Pt/C カソードの作成

Nafion 溶液 (59 mg) に Pt/C (11 mg) を Nafion とカーボンの比が 1:2 になるように加え、1 時間超音波処理した。懸濁液を耐水カーボクロス (5 cm^2) へ塗布してガス拡散電極を作成した。

3-2-13. 対照実験用アノードおよびカソードの作成

対照実験のため、上述の手法に従い、いくつかの異なる量の[NiFe]_{S77}、[NiFe]_{DvMF}、Pt およびカーボンブラックを用いて、アノードおよびカソードを作成した (表 3-1)。

表 3-1 対照実験. [NiFe]_{S77}, [NiFe]_{DvMF}, Pt およびカーボンブラックは 5 cm² カーボンクロス上に塗布した.

エントリー	アノード					カソード		iR フリー過電圧 50 mV における 電流密度 / mA cm ⁻²	最大電力密度 / mW cm ⁻²
	Air or N2	[NiFe] _{S77} , [NiFe] _{DvMF} or Pt	触媒量 / μg	H2/N2	カーボン ブラック / mg	Pt / mg	カーボン ブラック / mg		
1	Air	[NiFe] _{S77}	1.9	100%/0%	5.0	5.0	5.0	103	177
2	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	5.0	5.0	104	180
3	N2	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	5.0	5.0	102	179
4	Air	[NiFe] _{S77}	0.48	100%/0%	5.0	5.0	5.0	51	97
5	-	-	0	100%/0%	5.0	5.0	5.0	1.3	2
6	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	50%/50%	5.0	5.0	5.0	51	130
7	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	30%/70%	5.0	5.0	5.0	31	93
8	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	4%/96%	5.0	5.0	5.0	1.3	24
9	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	0%/100%	5.0	5.0	5.0	~0	~0
10	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	2.5	5.0	5.0	40	61
11	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	1.5	5.0	5.0	22	31
12	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	2.5	5.0	104	124
13	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	0.0	5.0	104	1.2
14	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	5.0	2.5	104	83
15	Air	[NiFe] _{S77}	0.95	100%/0%	5.0	5.0	0.0	104	44
16	-	-	0	100%/0%	5.0	0.0	5.0	1.3	0.1
17	N2	[NiFe] _{DvMF}	2	100%/0%	5.0	5.0	5.0	3.1	4.0
18	N2	[NiFe] _{DvMF}	0.98	100%/0%	5.0	5.0	5.0	3.2	4.1
19	Air	[NiFe] _{DvMF}	0.98	100%/0%	5.0	5.0	5.0	2.5	3.5
20	N2	[NiFe] _{DvMF}	0.49	100%/0%	5.0	5.0	5.0	1.9	2.5
21	Air	Pt	1000	100%/0%	5.0	5.0	5.0	101	163
22	Air	Pt	500	100%/0%	5.0	5.0	5.0	86	100
23	Air	Pt	250	100%/0%	5.0	5.0	5.0	44	65

3-2-14. 対照実験用酵素フリーアノードの作成

カーボンブラック (5 mg) を 100 μL の緩衝溶液 (10 mM MOPS/KOH 緩衝溶液、150 mM NaCl、pH 7.0) に加えた懸濁液を、耐水カーボクロス (5 cm^2) に塗布した後、室温、空気下で乾燥させてガス拡散電極を作成した。

3-2-15. 対照実験用 Pt フリーNafion/C カソードの作成

Nafion 溶液 (59 mg) にカーボンブラック (5.0 mg) を Nafion とカーボンの比が 1:2 になるように加え、1 時間超音波処理した。懸濁液を耐水カーボクロス (5 cm^2) へ塗布してガス拡散電極を作成した。

3-2-16. MEA および燃料電池アセンブリ

Nafion NRE212 は、3%過酸化水素水溶液中で 1 時間、脱イオン水中で 1 時間、硫酸中で 1 時間、脱イオン水中で 1 時間煮沸した後。前処理した Nafion 212 の一片を 2 つのガス拡散電極で挟み MEA を作成し、MEA を 5 cm^2 燃料電池装置に組み込んだ。白金参照電極付き 5 cm^2 シングルセル (東陽テクニカ株式会社製、EFC-05-02-REF) はアノードの分極曲線およびインピーダンススペクトル測定に用いた。白金参照電極は、可逆水素電極 (RHE) として機能し、シングルセルのアノード側内部に位置している (図 3-6)。

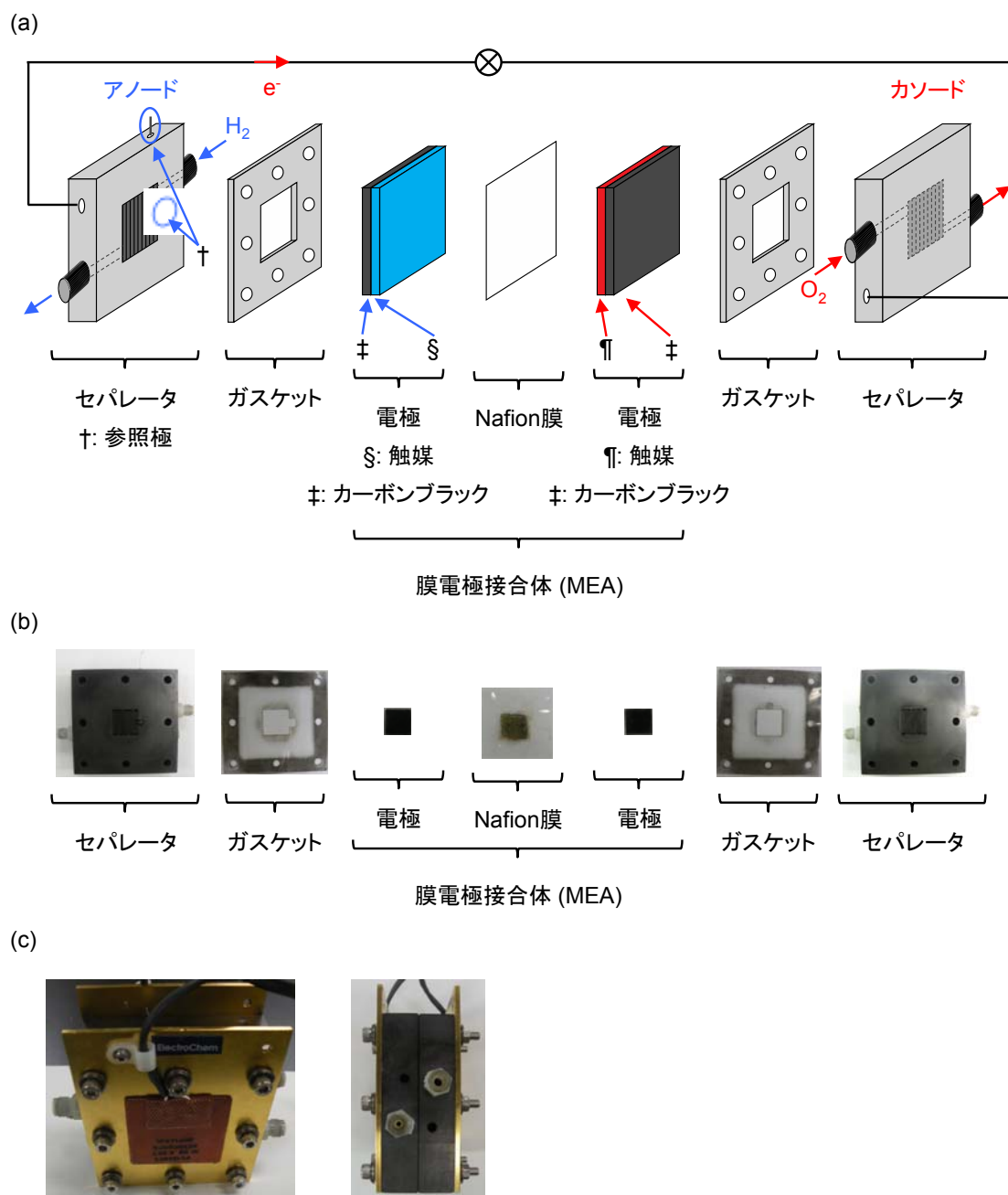


図 3-6 燃料電池セルの内部構造. (a) 模式図. (b) 部品写真. (c) セル写真.

3-2-17. 分極曲線測定

分極曲線は、2 電極式ないし 3 電極式測定法にて測定した。アノード分極曲線は、RE、WE、および CE にそれぞれ参照極、アノードおよびカソードを接続した 3 電極式測定法にて測定した。燃料電池分極曲線は、RE1 および CE にアノードを、RE2 および WE

にカソードを接続した 2 電極式で測定し、電圧値は掃引速度 $1\text{-}50\text{ mV s}^{-1}$ のリニアスイープボルタンメトリーにより記録した。 iR -フリー過電圧は以下の式に従い算出した:

$\eta(\text{anode}) = V(\text{anode}) - iR$ 、ここで、 η は過電圧、 V は電圧、 i は電流密度、はインピーダンス測定から求まるオーミック抵抗である。

3-2-18. [NiFe]_{S77} による水素酸化反応 (HOR) におけるプラトー電流密度からの TOF の算出

水素半電池のアノード上の[NiFe]_{S77}による、60°CでのHORにおけるプラトー電流密度から、TOF ((mol of H₂/mol of [NiFe]_{S77}) per second)は、触媒の利用率を 100%、本反応を水素の 2e⁻酸化反応と仮定して、以下の式で求めた。

図 3-7a におけるプラトー電流密度:

$$0.361\text{ A cm}^{-2}$$

プラトー電流密度において電極 1 cm²あたり 1 秒間に酸化される H₂ の mol 数:

$$0.361\text{ A cm}^{-2} / (9.65 \times 10^4 \times 2\text{ A s}) = 1.87 \times 10^{-6}\text{ mol cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$$

電極 1 cm²あたりの[NiFe]_{S77}の mol 数:

$$0.95 \times 10^{-6}\text{ g} / 90761\text{ (molecular weight of [NiFe]_{S77})} / 5\text{ cm}^{-2} \\ = 2.09 \times 10^{-12}\text{ mol cm}^{-2}$$

TOF ((mol of the oxidized H₂ / mol of [NiFe]_{S77}) per second)

$$1.87 \times 10^{-6}\text{ mol cm}^{-2}\text{ s}^{-1} / 2.09 \times 10^{-12}\text{ mol cm}^{-2} = 8.95 \times 10^5\text{ s}^{-1}$$

3-2-19. [NiFe]_{DvMF} による HOR におけるプラトー電流密度からの TOF の算出

水素半電池のアノード上の[NiFe]_{DvMF}による、60°CでのHORにおけるプラトー電流密度から、TOF ((mol of H₂/mol of [NiFe]_{DvMF}) per second)は、触媒の利用率を 100%、本反応を水素の 2e⁻酸化反応と仮定して、以下の式で求めた。

図 3-7b におけるプラトー電流密度:

$$0.00600\text{ A cm}^{-2}$$

プラトー電流密度において電極 1 cm²あたり 1 秒間に酸化される H₂ の mol 数:

$$0.00600 \text{ A cm}^{-2} / (9.65 \times 10^4 \times 2 \text{ A s}) = 3.11 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

電極 1 cm²あたりの[NiFe]_{DV_{MF}}の mol 数:

$$0.98 \times 10^{-6} \text{ g} / 89000 \text{ (molecular weight of [NiFe]_{DV_{MF}})} / 5 \text{ cm}^{-2} \\ = 2.20 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$$

TOF ((mol of the oxidized H₂ / mol of [NiFe]_{DV_{MF}}) per second)

$$3.11 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1} / 2.20 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2} = 1.41 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$$

3-2-20. Pt/C による HOR におけるプラトー電流密度からの TOF の算出

水素半電池アノード上の Pt/C による、60°C での HOR におけるプラトー電流密度から、TOF ((mol of H₂/mol of Pt) per second)は、触媒の利用率を 100%、本反応を水素の 2e⁻酸化反応と仮定して、以下の式で求めた。

図 3-7c におけるプラトー電流密度:

$$0.120 \text{ A cm}^{-2}$$

プラトー電流密度において電極 1 cm²あたり 1 秒間に酸化される H₂ の mol 数:

$$0.120 \text{ A cm}^{-2} / (9.65 \times 10^4 \times 2 \text{ A s}) = 6.22 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

電極 1 cm²あたりの Pt の mol 数:

$$0.00050 \text{ g} / 195.08 \text{ (atomic weight of Pt)} / 5 \text{ cm}^{-2} \\ = 5.13 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2}$$

TOF ((mol of the oxidized H₂ / mol of Pt) per second)

$$6.22 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1} / 5.13 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2} = 1.21 \text{ s}^{-1}$$

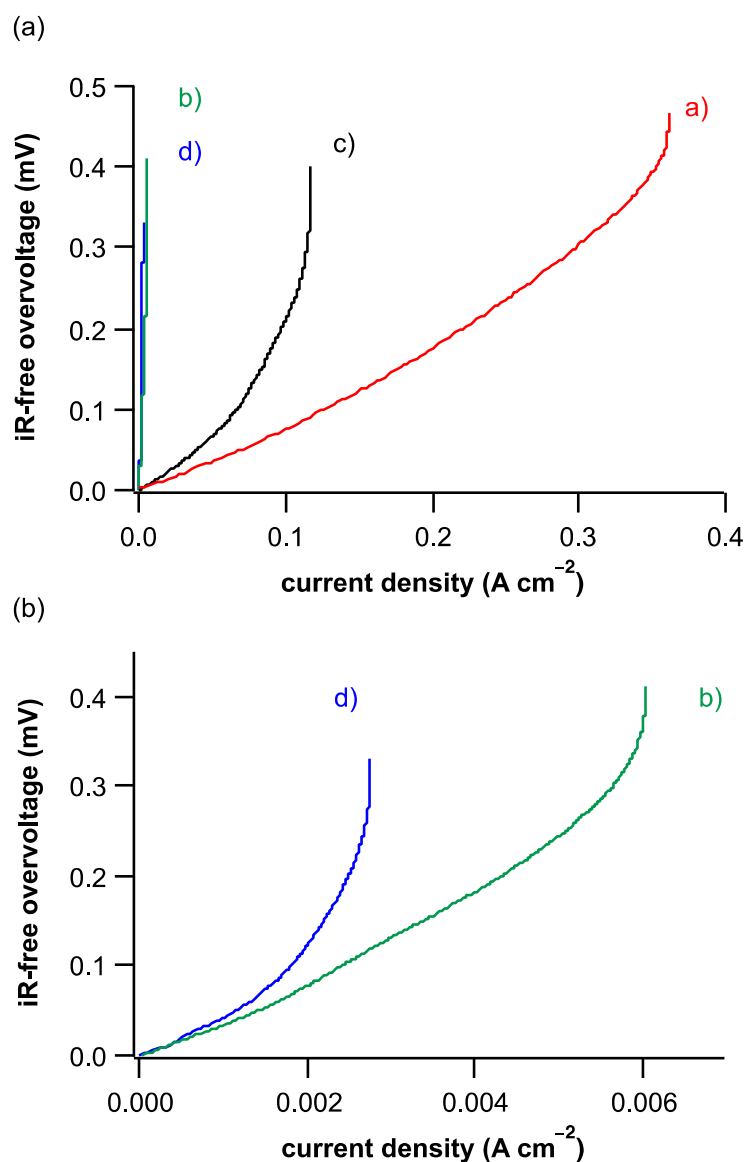


図 3-7 a) [NiFe]_{S77}, b) [NiFe]_{DvMF}, c) Pt/C および d) 緩衝液/Cアノードの水素—酸素燃料電池中での HOR における電流密度と iR-フリー過電圧. Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. MEA 表面積: 5 cm². アノード: [NiFe]_{S77} (0.19 μg_{[NiFe]_{S77}} cm⁻²), [NiFe]_{DvMF} (0.20 μg_{[NiFe]_{DvMF}} cm⁻²), および Pt/C (0.10 mg_{Pt} cm⁻²)は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C (1.0 mg_{Pt} cm⁻²)は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤 H₂/N₂ (50%/50%) 混合ガスの流速: 200 mL min⁻¹. 湿潤酸素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿度: 100%. カーボンブラック: キヤボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T. 上段および下段の図はそれぞれ 0-0.4 および 0-0.007 A cm⁻² の範囲での電流密度と iR-フリー過電圧を表す.

3-3. 結果と考察

3-3-1. [NiFe]_{S77} アノード及び膜電極接合体 (MEA)

[NiFe]_{S77} を用いた水素アノードは、以下の手順で作成した。カーボンブラックを [NiFe]_{S77} 水溶液に加え、懸濁物をカーボンクロスに塗布した。 ([NiFe]_{S77}: 0.19 $\mu\text{g cm}^{-2}$, 2.1 pmol cm^{-2})。MEA は、ナフィオン膜を用いて、ヒドロゲナーゼアノードと Pt/C カソードにより構成した。[NiFe]_{S77} は空気下での取り扱いにおいて十分に安定で、ナフィオン溶液を必要としなかった。[NiFe]_{S77} のアミノ酸配列は *Escherichia coli* 由来の Hyd-2 とほぼ同一の配列であった。大サブユニットおよび小サブユニットのペアワイズアライメントスコアは、それぞれ 93 および 95 であった。Hyd-2 は酸素感受性のヒドロゲナーゼに分類され、O₂ による不活性化の後でも再活性化が可能である。[NiFe]_{DvMF} アノードは、[NiFe]_{S77} と同様の手法で、嫌気雰囲気下で作成した。

3-3-2. 分極曲線測定

[NiFe]_{S77} のアノードとしての水素酸化反応における特性を評価し、並外れた高い質量活性を明らかにした (図 3-8)。[NiFe]_{DvMF} も、アノードとして機能したが、質量活性は [NiFe]_{S77} と比べて極めて低かった。開放状態での [NiFe]_{S77} および [NiFe]_{DvMF} のアノード電位は、白金アノード同様、可逆水素電極 (RHE) に対してほぼ 0 V であった iR-フリー電圧が 50 mV における [NiFe]_{S77} アノードの質量活性は、それぞれ 1 mg の [NiFe]_{S77}、[NiFe]_{DvMF} および Pt を基準に算出すると、[NiFe]_{DvMF} の 33 倍、Pt の 637 倍 (活性中心の Ni および Fe を基準にすると 506 000 倍、(図 3-9)も上回る数値となった。従来最高記録である Pt/コバルト/マンガン (PtCoMn) 合金は、1 mV の過電圧での値を報告しており、我々の活性中心の Ni および Fe を基準にした質量活性は、合金の 200 倍、Pt/C の 1000 倍に上がることがわかった ([NiFe]_{S77}: 7830 A mg_{NiFe}⁻¹、PtCoMn: 約 40 A mg_{Pt}⁻¹、Pt/C: 7.5 A mg_{Pt}⁻¹)⁹⁾。酵素の特性もまた、他の既知のヒドロゲナーゼに比べて優秀である。[NiFe]_{S77} は、H₂/N₂ (50%/50%) 混合ガスを用いたプラトー電流密度において、893 000 s⁻¹ の TOF を達成している (図 3-7a)。これは、[NiFe]_{DvMF} アノードの TOF (14 100 s⁻¹、図 3-7b) の 63 倍にあたり、既報の *Allochromatium vinosum* 由来 [NiFe] ヒドロゲナーゼの TOF

(1500-9000 s⁻¹) の 99 から 595 倍に上り¹⁰⁾、白金の TOF (1.2 s⁻¹、図 3-7c) よりもはるかに高い値である^{4d)}。BV を電子受容体に用いた分光学的測定において、3 時間経過後に 77%の活性が失われた一方で (図 3-2a)、PEFC において、3 時間、0 V から 200 V の間での電位走査 120 サイクルの後でも、アノードの性能は 9%しか低下しなかった (図 3-10)。このことは、[NiFe]_{S77} が PEFC において安定であることを示唆している。

既報の電気化学的分析により求められた[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素酸化反応における TOF は、いずれも BV を電子受容体に用いた分光学的測定により求められた TOF に比べ高い値を示している (表 3-2、エントリー 1-3)^{5a, c)}。同様の傾向が[NiFe]_{S77} および [NiFe]_{DvMF} についても見られる (表 3-2、エントリー 4、5)。PEFC で得られた TOF (表 3-2、エントリー 4、5) と、溶液系の燃料電池で得られた TOF (表 3-2、エントリー 1-3) を比較すると、PEFC は、[NiFe]ヒドロゲナーゼがより高活性な触媒として機能するのに適していると考えられる。この理由として、溶液系と PEFC との間でアノードへの水素の供給速度に大きな差が生じていることが考えられる。実際、溶液系においては酵素固定電極を用いた回転電極法による電流密度の計測において、水素酸化に伴う発生電流が、電極の回転速度に依存するとの報告が成されている¹⁰⁾。溶液系では、溶存した水素のみがアノードへ供給されるのに対して、PEFC では湿潤水素が直接供給される。PEFC においては、十分な水素の供給速度が得られることで、[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒性能が向上しているものと予想できる。

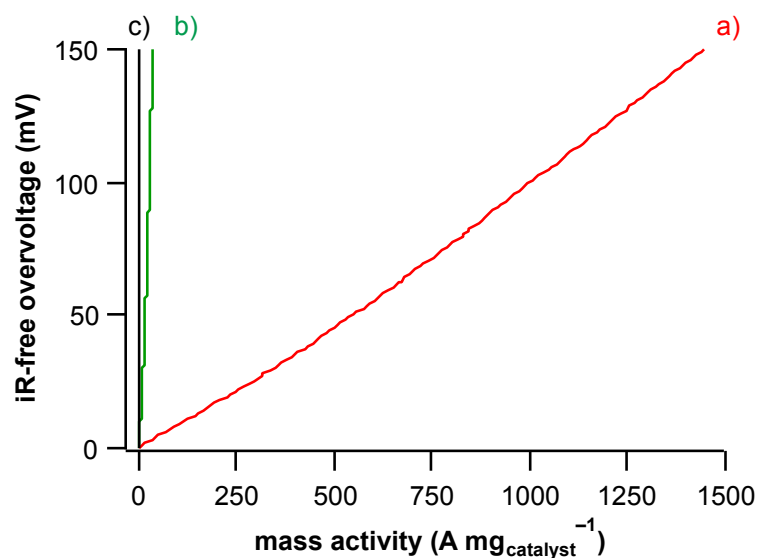


図 3-8 a) $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$, b) $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ および c) Pt/C アノードの水素-酸素燃料電池中での HOR における質量活性と iR-フリー過電圧. Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. MEA 表面積: 5 cm^2 . アノード: $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ ($0.19 \mu\text{g}_{[\text{NiFe}]_{\text{S77}}} \text{ cm}^{-2}$), $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ ($0.20 \mu\text{g}_{[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}} \text{ cm}^{-2}$), および Pt/C ($0.10 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C ($1.0 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿潤酸素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.

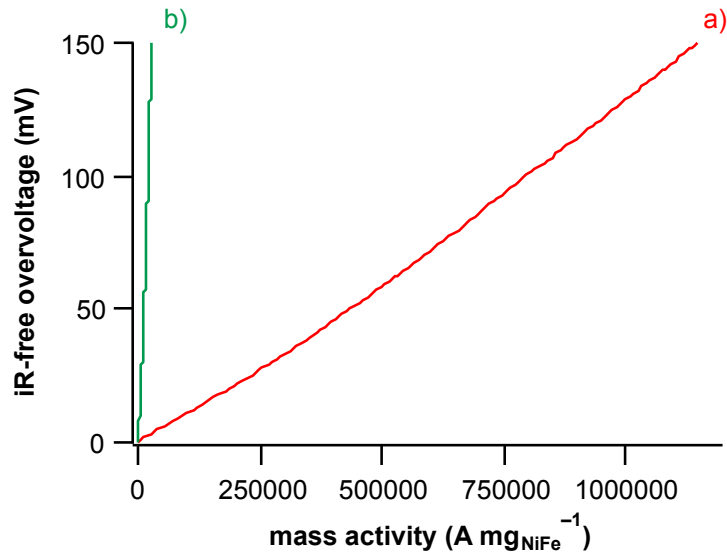


図 3-9 a) [NiFe]_{S77} および b) [NiFe]_{DvMF} アノードの水素-酸素燃料電池中での HOR における質量活性と iR-フリー過電圧. 質量活性は 1 mg の Ni および Fe (酵素活性中心の構成金属) を基準に算出した. Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. MEA 表面積: 5 cm². アノード: [NiFe]_{S77} (0.19 μg_{[NiFe]_{S77} cm⁻²) および [NiFe]_{DvMF} (0.20 μg_{[NiFe]_{DvMF} cm⁻²) は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C (1.0 mg_{Pt} cm⁻²) は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤 H₂/N₂ (50%/50%) 混合ガスの流速: 200 mL min⁻¹. 湿潤酸素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.}}

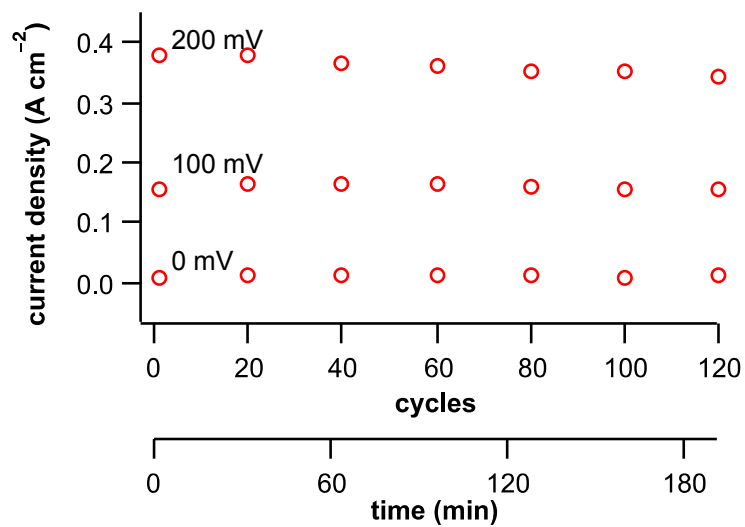


図 3-10 [NiFe]_{S77} アノードの水素-酸素燃料電池中での HOR における 0-200 mV の電位掃引を繰り返した後の電流密度. Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. MEA 表面積: 5 cm². アノード: [NiFe]_{S77} (0.19 μg_{[NiFe]_{S77} cm⁻²) は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C (1.0 mg_{Pt} cm⁻²) は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿潤酸素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72.}

表 3-2 [NiFe]ヒドロゲナーゼの HOR における TOF.

エントリー	ヒドロゲナーゼの種類	TOF (s ⁻¹): (mol of H ₂)/(mol of [NiFe]H ₂ ase) per second		
		分光学的測定	電気化学的測定	
		溶液系	PEFC 系	溶液系
1	<i>Allochro-matium vinosum</i> 由来 [NiFe]ヒドロゲナーゼ	300 ¹⁰⁾	-	1500-9000 ¹⁰⁾
2	<i>Escherichia coli</i> 由来 Hyd-1	8.35 ^{5b)†}	-	1700 ¹¹⁾
3	<i>Aquifex aeolicus</i> 由来 MbH1	7 ^{5e)‡}	-	48 ^{5d)}
4	[NiFe] _{S77}	2496 ^{6)§}	893 000 [¶]	-
5	[NiFe] _{DVMF}	820 [¶]	14 100 [¶]	-

† *Escherichia coli* 由来の Hyd-1 の比活性は既報より 5.53 U mg⁻¹ (1 μmol の水素を 1 分間で酸化する活性を 1 U と定義する) である. Hyd-1 の比活性と分子量 (94 kDa) より、TOF は 8.35 s⁻¹ と算出した.

‡ *Aquifex aeolicus* 由来の MbH1 の比活性は既報より 4 U mg⁻¹ である. MbH1 の比活性と分子量 (110 kDa) より、TOF は 7 s⁻¹ と算出した.

§ [NiFe]_{S77} の 60°C における比活性は既報より 1645.9 U mg⁻¹ である. [NiFe]_{S77} の比活性と分子量 (90.761 kDa) より、TOF は 2496 s⁻¹ と算出した.

¶ 本研究の実測データ.

3-3-3. インピーダンス測定

PEFCにおけるアノード側半電池の等価回路を図 3-11 に示す。基本構成はアノードの化学反応に伴うインピーダンス、ワールブルグインピーダンス、電荷移動に際して生じるオーミック抵抗、計測系インダクタンスの4要素である。各要素はPEFCの電気化学反応課程において、互いに独立なため、等価回路においてはそれらを直列接続して表現している。また、電極/電解質界面には電解質側に電気二重層が形成されるため容量性挙動を示し、界面特性は電気二重層容量と電解銅抵抗の並列回路に対応する。図 3-11 の等価回路により導出されるトータルインピーダンス Z は 式 3-1 で算出される。

$$Z = \frac{R_a}{1+j\omega R_a C_a} + Z_w + R_{ohm} + L$$

ただし、 $Z_w = \frac{R_w \tanh(j\omega T)^P}{(j\omega T)^P}$

(式 3-1)

ここで、 ω は角周波数、 j は虚数単位、 T は拡散時定数、 P は拡散条件に関する定数、 L は計測系インダクタンスである。

式 3-1 により描かれるナイキスト線図は、高周波数側にアノード反応抵抗及び電気二重層容量に起因する容量性インピーダンスの半円、低周波数側にワールブルグインピーダンスの半円が観測される。本論文において、作成した3種類のアノードを用いたインピーダンス特性の評価においては、電荷移動速度に比べて十分に早い水素の拡散速度が得られたため、ワールブルグインピーダンスは観測されていない(図 3-12)。容量性インピーダンスの半円の径はアノードの反応抵抗 R_a 、高周波数側の実数軸との交点はオーミック抵抗 R_{ohm} となる。図 3-12 によると、[NiFe]_{S77} のトータルインピーダンスが極めて小さく (0.13 Ω)、[NiFe]_{DVMF} (2.6 Ω) および Pt (0.34 Ω) よりも小さかった。また、[NiFe]_{S77} のオーミック抵抗 (0.019 Ω) は、アノードにおける反応抵抗よりも十分に小さい。これは、反応速度が Nafion 膜内でのプロトン移動よりも、アノードの水素酸化触媒能によって支配される事を示唆している。

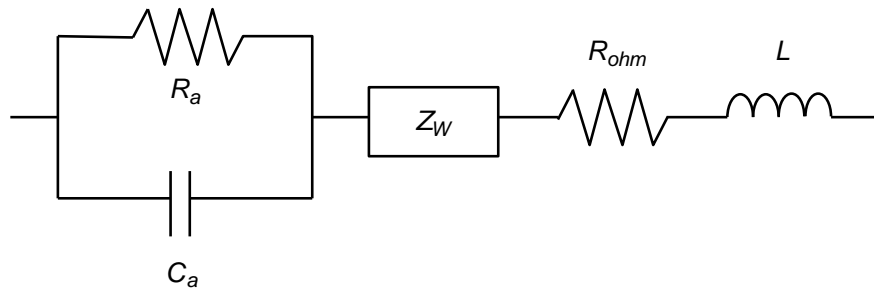


図 3-11 PEMFC の等価回路. R_a アノードの反応抵抗, C_a アノードの電気二重層容量, Z_w ワールブルグインピーダンス, R_{ohm} オーミック抵抗, L インダクタンス.

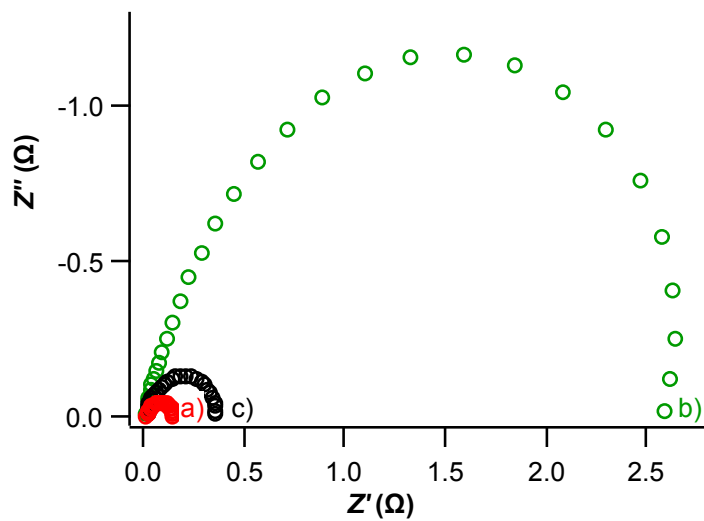


図 3-12 a) $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$, b) $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ および c) Pt/C アノードの水素-酸素燃料電池中での HOR におけるインピーダンススペクトル. Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. スペクトルは開路条件で周波数を $0.1\text{-}10^5$ Hz で変化させて測定した. MEA 表面積およびその他条件は図 3-8 に同じ.

3-3-4. 交換電流密度と活性化エネルギー

[NiFe]_{DVMF} および Pt と比べて、[NiFe]_{S77} の交換電流密度はより高く、活性化エネルギーはより低くなった。 [NiFe]_{S77}、[NiFe]_{DVMF} および Pt のターフェルプロットから、60°C における交換電流密度は、それぞれ 0.211、0.0466 および 0.120 A cm⁻² と分かった (図 3-13, 14, 15)。活性化エネルギー ([NiFe]_{S77}: 10.1 kJ mol⁻¹、[NiFe]_{DVMF}: 14.5 kJ mol⁻¹、Pt/C: 13.5 kJ mol⁻¹) は交換電流密度を用いたアレニウスプロットより算出した (図 3-16)。

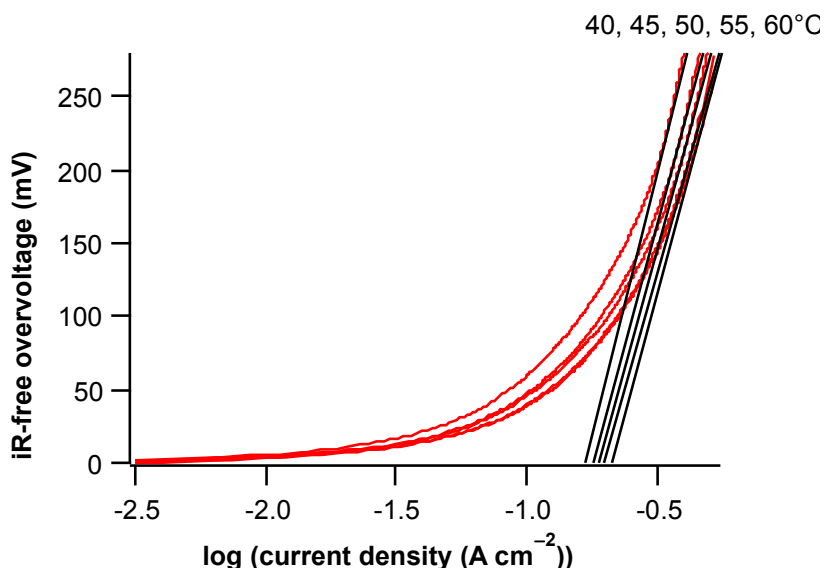


図 3-13 アノード上の[NiFe]_{S77}による HOR における 40-60°C でのターフェルプロット. 各プロットは[NiFe]_{S77} アノードと Pt/C カソードで構成された燃料電池のアノード側の電流密度の対数に対する、iR-フリー過電圧を表す。 Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた。 MEA 表面積: 5 cm². アノード: [NiFe]_{S77} (0.19 μg_{[NiFe]_{S77} cm⁻²)は Nafion 溶液を用いずに調製した。 カソード: Pt/C (1.0 mg_{Pt} cm⁻²)は Nafion 溶液を用いて調製した。 プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿潤酸素の流速: 200 mL min⁻¹. 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.}

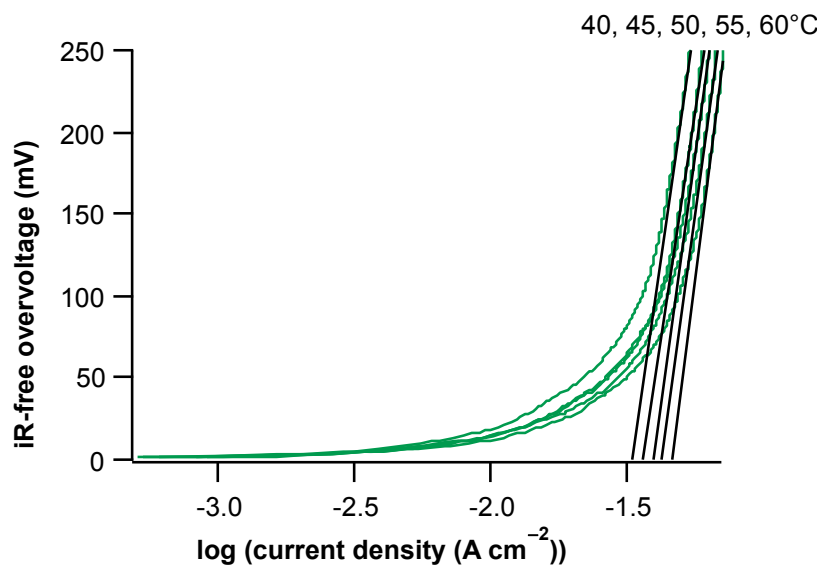


図 3-14 アノード上の $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ による HOR における 40-60°C でのターフェルプロット. 各プロットは $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ アノードと Pt/C カソードで構成された燃料電池のアノード側の電流密度の対数に対する、iR-フリー過電圧を表す。Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた。MEA 表面積: 5 cm^2 . アノード: $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ ($0.20 \mu\text{g}_{[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}} \text{ cm}^{-2}$)は Nafion 溶液を用いずに調製した。カソード: Pt/C ($1.0 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$)は Nafion 溶液を用いて調製した。プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿潤酸素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.

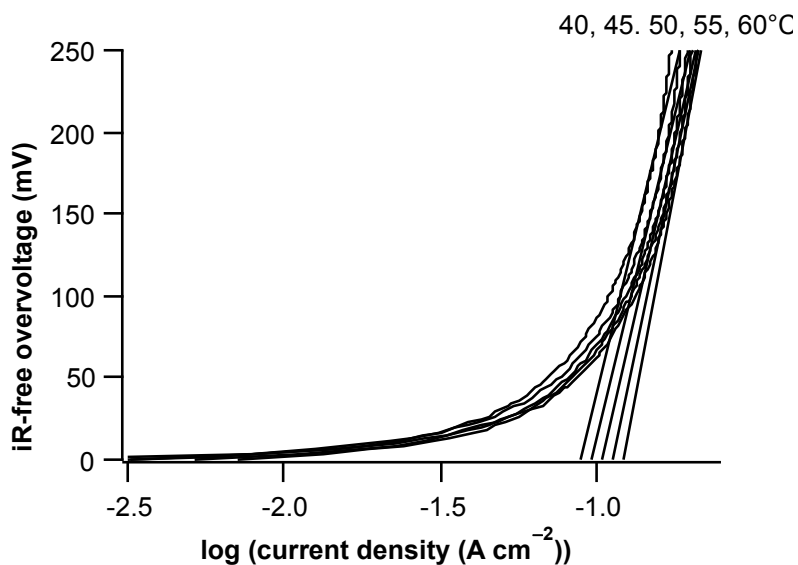


図 3-15 アノード上の Pt/C による HOR における 40-60°C でのターフェルプロット. 各プロットは Pt/C アノードおよびカソードで構成された燃料電池のアノード側の電流密度の対数に対する、iR-フリー過電圧を表す。Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた. MEA 表面積: 5 cm^2 . アノード: Pt/C ($0.10 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$)は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C ($1.0 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$)は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿潤酸素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.

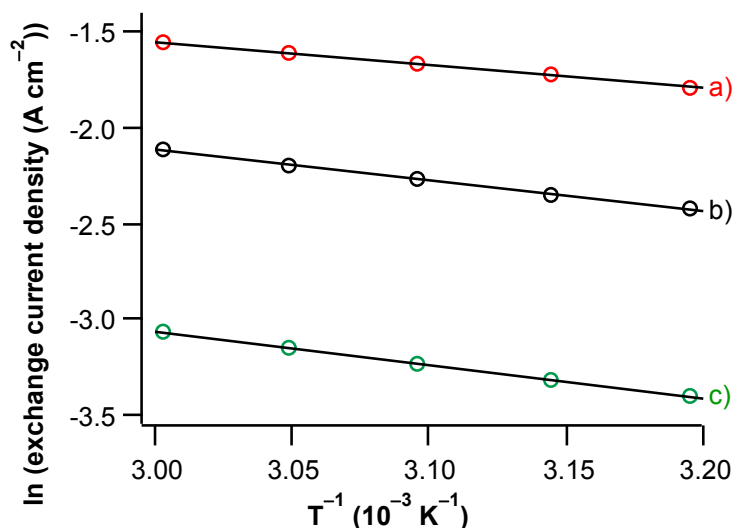


図 3-16 アノード上の a) $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$, b) $[\text{NiFe}]_{\text{DvMF}}$ および c) Pt/C による HOR におけるアレニウスプロット. 40-60°C での交換電流密度の値は図 3-12, 13, 14 に示したターフェルプロットより求めた.

3-3-5. [NiFe]_{S77} 水素燃料電池

上述のとおり、[NiFe]_{S77} アノードは類稀な電極であり、当然ながら水素燃料電池のアノード極としての応用が可能である (図 3-17)。[NiFe]_{S77} 燃料電池は 0.95 V の開放電圧と 180 mW cm⁻² の最大電力密度を示した。この値は、[NiFe]_{DvMF} 燃料電池で得られた 4.1 mW cm⁻² の 44 倍に上る。これは、[NiFe]ヒドロゲナーゼベースの PEFC を構築した初の例である^{4c, d, 5)}。[NiFe]_{S77} および [NiFe]_{DvMF} 燃料電池の性能は、いくつかの対照実験を通じて最適化している (表 3-1)。最大電力密度について、PEFC で得られた値 (180 mW cm⁻², 表 3-3 エントリー 1) と溶液系の燃料電池で得られた値 (1.67 および 0.3 mW cm⁻², 表 3-3 エントリー 2 および 3)^{5a, c)} の大きな違いは、燃料電池のシステムの違いと、用いているカソード触媒の違い (PEFC では Pt/C を、溶液系の燃料電池では bilirubin oxidase) に起因するものであると考えられる。

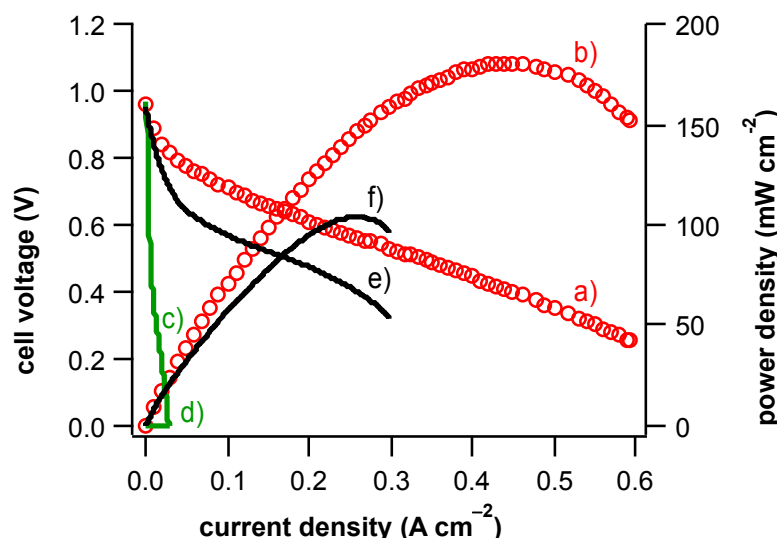


図 3-17 a) [NiFe]_{S77} (掃引速度: 50 mV s⁻¹), c) [NiFe]_{DvMF} (掃引速度: 1 mV s⁻¹) および e) Pt/C (掃引速度: 10 mV s⁻¹) アノードの水素-酸素燃料電池の分極曲線。b) [NiFe]_{S77} (掃引速度: 50 mV s⁻¹), d) [NiFe]_{DvMF} (掃引速度: 1 mV s⁻¹) および f) Pt/C (掃引速度: 10 mV s⁻¹) アノードの水素-酸素燃料電池の電力密度曲線。Pt および Pt/C は参照極および対極として用いた。MEA 表面積およびその他条件は図 3-8 に同じ。その他の対照実験については表 3-1 に明記。

表 3-3 [NiFe]ヒドロゲナーゼを用いた燃料電池の最大電力密度.

エントリー	電極		最大電力密度 (mW cm ⁻²)	
	アノード	カソード	PEFC	溶液系燃料電池
1	[NiFe] _{S77}	Pt/C	180 [†]	
2	<i>Escherichia coli</i> 由来 Hyd-1	ビリルビンオキシダーゼ		1.67 ^{5-a)}
3	<i>Aquifex aeolicus</i> 由来 MbH1	ビリルビンオキシダーゼ		0.3 ^{5-c)}

†本研究の実測データ.

3-3-6. [NiFe]_{S77} の一酸化炭素被毒

[NiFe]_{S77}は、CO 被毒された後、そのほとんどの活性を回復可能なことがわかった (図 3-18, 19)。燃料電池への水素の供給が、H₂/CO (CO 103.2 ppm) 混合ガスに切り替えられると、元の電力密度の 12%程度に性能が低下した (図)。水素の供給を復活させると、元の電力密度のほぼ 100%まで性能が回復した。CO 阻害/回復の挙動は、*Allochromatium vinosum* 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼとよく似ているが⁴⁰⁾、活性サイトの極一部が回復を示す Pt/C とは異なっている¹²⁾。前述のとおり、[NiFe]_{S77}は、*Escherichia coli* 由来 Hyd-2 とアミノ酸配列の高い相同性を持っている。Hyd-2 は CO 阻害された後、水素によって再活性化が可能なヒドロゲナーゼとして知られており、PEFC で[NiFe]_{S77}によって観測された現象と似た特徴を示す。

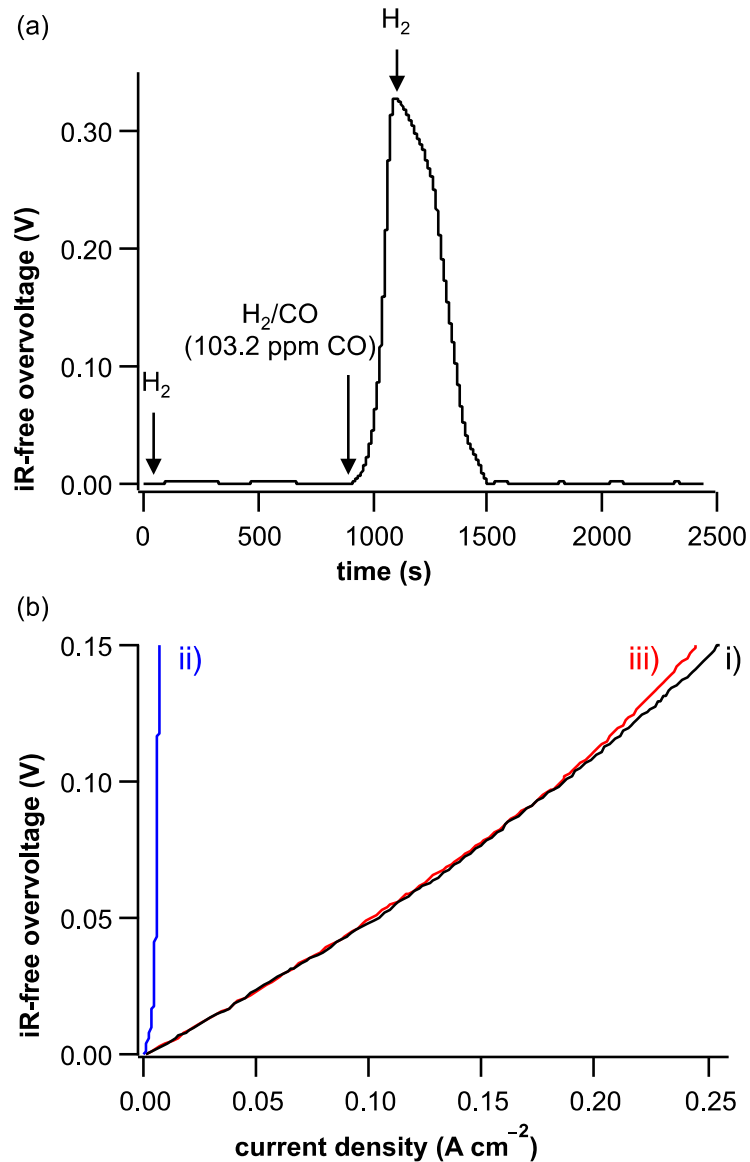


図 3-18 (a) 供給燃料を変化させた際の 1 mA cm^{-2} における iR-フリー過電圧の時間変化および (b) $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ アノードと Pt/C カソードで構成された燃料電池のアノード側の 60°C における分極曲線. i) 水素, ii) H_2/CO (103.2 ppm CO) 混合ガス および iii) H_2/CO 混合ガスの供給後に再び水素をアノードに供給して測定. MEA 表面積: 5 cm^2 . アノード: $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ ($0.19 \mu\text{g}_{[\text{NiFe}]_{\text{S77}}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C ($1.0 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素および H_2/CO 混合ガスの流速: 200 mL min^{-1} . 湿潤酸素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.

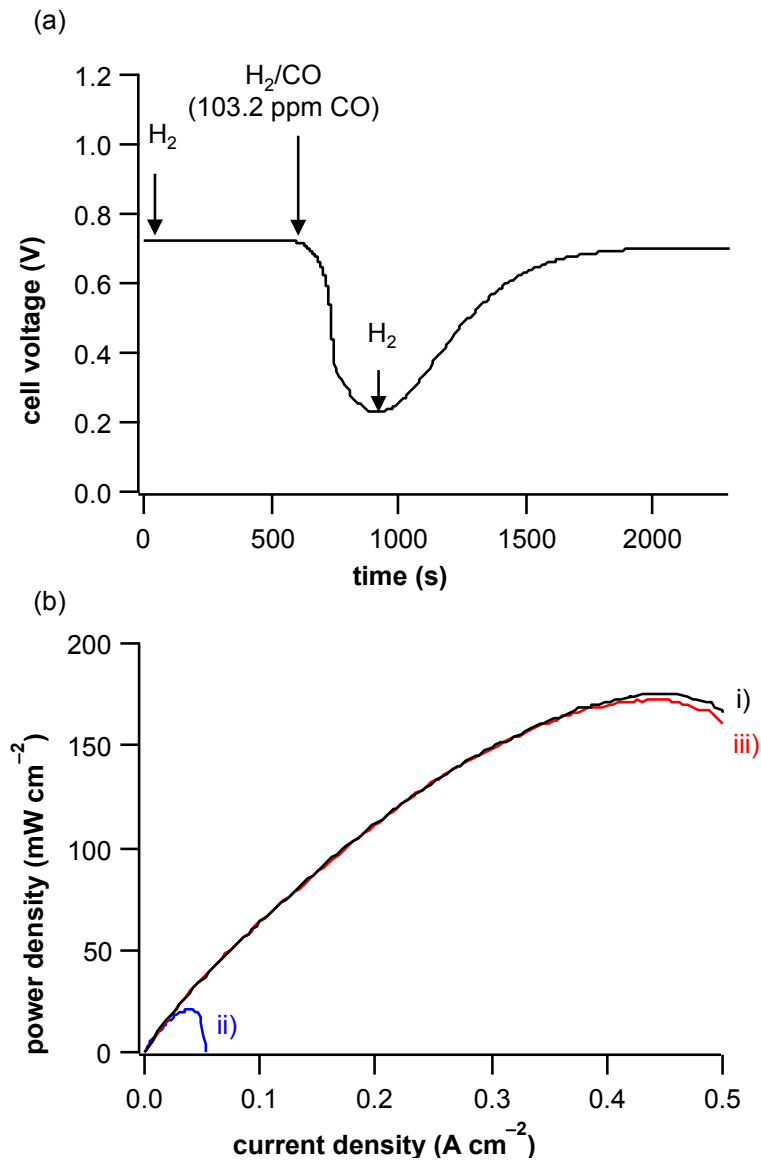


図 3-19 (a) 供給燃料を変化させた際の 50 mA cm^{-2} におけるセル電圧の時間変化および (b) $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ アノードと Pt/C カソードで構成された燃料電池の 60°C における出力密度曲線. i) 水素, ii) H_2/CO (103.2 ppm CO) 混合ガス および iii) H_2/CO 混合ガスの供給後に再び水素をアノードに供給して測定. MEA 表面積: 5 cm^2 . アノード: $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ ($0.19 \mu\text{g}_{[\text{NiFe}]_{\text{S77}}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いずに調製した. カソード: Pt/C ($1.0 \text{ mg}_{\text{Pt}} \text{ cm}^{-2}$) は Nafion 溶液を用いて調製した. プロトン伝導高分子電解質: Nafion 212. 湿潤水素および H_2/CO 混合ガスの流速: 200 mL min^{-1} . 湿潤酸素の流速: 200 mL min^{-1} . 湿度: 100%. カーボンブラック: キャボットコーポレーション Vulcan XC-72. カーボンクロス: 東陽テクニカ株式会社 EC-CC1-060T.

3-3-7. ヒドロゲナーゼによる効率的な水素分解に関する考察

水素の分解において、ヒドロゲナーゼが白金よりも効率的である理由として、両者が水素を分解するために用いるメカニズムの違いに注目した。ヒドロゲナーゼは、ヘテロリティックに水素を開裂させるが (式 3-2)^{4a, b, c, 13, 14}、白金はホモリティックに水素を開裂させる (式 3-3)¹。ホモリティックな開裂は気相中で有利に進行するが ($\Delta G^0_{\text{hetero}} = 1642 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G^0_{\text{homo}} = 407 \text{ kJ mol}^{-1}$)^{15, 16}、水中では、ヘテロリティックな開裂が有利となる ($\Delta G^0_{\text{hetero}} = 176 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G^0_{\text{homo}} = 442 \text{ kJ mol}^{-1}$)^{16, 17}。固体高分子形燃料電池においても、水の薄いフィルムが固体で担持された電極を覆うために、水中でのエンタルピーが最も重要になると考えられる。



3-4. 結論

第 3 章では、酸素に安定で、優秀な水素酸化触媒能を有する [NiFe]_{S77} を用いて、活性、反応および拡散抵抗、そして活性化エネルギーのいずれの点においても白金に勝る水素酸化のための新しい電極を作成した。また、作成した電極を PEFC のアノード極に応用し、180 mW cm⁻² もの高出力を実証した。本研究の成果は、[NiFe]_{S77} が水素電極としての新しい標準の指標となりうることを確信させるものである。

3-5. 参考文献

- 1 Abe K.; Ida, M.; Izumi, A.; Terashima, S.; Sudo, T.; Watanabe, Y.; Fukuda, Y. *Thin Solid Films*, **2009**, *517*, 3449–3451.
- 2 IUPAC Physical and Biophysical Chemistry Division, *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (The IUPAC “Green Book”), 3rd ed. Prepared for publication by E. R. Cohen et al. RSC Publishing, Cambridge, **2007**.
- 3 Perry, M. L.; Fuller, T. F. *J. Electrochem. Soc.*, **2002**, *149*, S59–S67.
- 4 (a) Yagi, T.; Higuchi, Y. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **2013**, *89*, 16–33. (b) Tard, C.; Pickett, C. *J. Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 2245–2274. (c) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2439–2461. (d) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4366–4413.
- 5 (a) Xu, L.; Armstrong, F. A.; *Energy Environ. Sci.*, **2013**, *6*, 2166–2171. (b) Sawers, R. G.; Boxer, D. H. *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *156*, 265–275. (c) Ciaccafava, A.; de Poulpiquet, A.; Techer, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Tingry, S.; Innocent, C.; Lojou, E. *Electrochem. Commun.*, **2012**, *23*, 25–28. (d) de Poulpiquet, A.; Marques-Knopf, H.; Wernert, V.; Giudici-Ortoni, M. T.; Gadioub, R.; Lojou, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 1366–1378. (e) Brugna-Guiral, M.; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K.-O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M.; Giudici-Ortoni, M. T. *Extremophiles*, **2003**, *7*, 145–157. (f) Tsujimura, S.; Fujita, M.; Tatsumi, H.; Kano, K.; Ikeda, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, *3*, 1331–1335.
- 6 Eguchi, S.; Yoon, K.-S.; Ogo, S. *J. Biosci. Bioeng.*, **2012**, *114*, 479–484.
- 7 (a) Nonaka, K.; Nguyen, N. T.; Yoon, K.-S.; Ogo, S. *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, *115*, 366–371. (b) Yagi, T.; Kimura, K.; Daidoji, H.; Sakai, F.; Tamura, S.; Inokuchi, H. *J. Biochem.*, **1976**, *79*, 661–671.
- 8 Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*, 265–275.

- 9 (a) Wang, X.; Ahluwalia, R. K.; Steinbach, A. J. *J. Electrochem. Soc.*, **2013**, *160*, F251–F261. (b) Neyerlin, K. C.; Gu, W.; Jorne, J.; Gasteiger, H. A. *J. Electrochem. Soc.*, **2007**, *154*, B631–B635.
- 10 Pershad, H. R.; Duff, J. L. C.; Heering, H. A.; Duin, E. C.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 8992–8999.
- 11 Evans, R. M.; Armstrong, F. A. in *Metalloproteins: Methods and Protocols* (Eds.: Fontecilla-Camps, J. C.; Nicolet, Y.), Springer Science+Business Media New York, 2014, ch. 6, pp. 73-94.
- 12 Zhang, J. Z.; Liu, Z.; Goodwin, Jr. J. G. *J. Power Sources*, **2010**, *195*, 3060–3068.
- 13 Barton, B. E.; Whaley, C. M.; Rauchfuss, T. B.; Gray, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6942–6943.
- 14 Ogo, S.; Ichikawa, K.; Kishima, T.; Matsumoto, T.; Nakai, H.; Kusaka, K.; Ohhara, T. *Science*, **2013**, *339*, 682–684.
- 15 Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 6109–6114.
- 16 Wayner, D. D. M.; Parker, V. D. *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 287–294.
- 17 Creutz, C.; Chou, M. H.; Hou, H.; Muckerman, J. T. *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 9809–9822.

第 4 章 結言

本論文では、新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素酸化触媒能と酸素への安定性に着目し、電極触媒としての性能を検討した。新規の[NiFe]ヒドロゲナーゼを精製し、固体高分子形燃料電池のアノード極触媒として応用することで、新規ヒドロゲナーゼの酸素への安定性と燃料電池用電極触媒としての性能を実証した。

第 2 章

第 2 章では、酸素への安定性と高い水素酸化触媒能を両立する新規[NiFe]ヒドロゲナーゼに着目した。自然界より新たに単離した *Citrobacter* sp. S-77 より、膜結合型の[NiFe]ヒドロゲナーゼ ([NiFe]_{S77}) を精製し、その水素酸化活性と酸素への安定性を評価した。*Citrobacter* sp. S-77 のゲノム解析、および精製タンパク質の N 末端アミノ酸解析により、[NiFe]_{S77} が *Citrobacter freundii* 由来の hydrogenase-2 (GenBank ID: EKS57105-57112) と高い相同性を持つタンパク質であり、今日までに研究されてきた酸素感受性ヒドロゲナーゼおよび酸素耐性ヒドロゲナーゼのいずれとも大きく異なるアミノ酸配列を有していることを明らかにした。*Citrobacter* sp. S-77 の膜画分を用いた紫外可視吸収スペクトル測定では、膜内在性のシトクロム *b*₅₆₀ が [NiFe]_{S77} の生体内レドックスパートナーとして機能していることを示唆する結果を得た。精製した [NiFe]_{S77} の水素酸化活性は、水素依存的な benzyl viologen (BV) の還元に伴う吸光度の変化を測定することで評価した。[NiFe]_{S77} は、従来の酸素耐性ヒドロゲナーゼと比べて 3.6-170 倍程度の高い水素酸化活性 (触媒回転頻度にして 1132 s⁻¹) を示した。[NiFe]_{S77} は、酸素により酸化された後でも、再活性化の必要なく水素酸化を触媒可能で、30 時間の空気暴露後においても 95%以上の活性を維持することを確認した。本研究で精製に成功した [NiFe]_{S77} は、実用触媒に求められる酸素耐性と高い触媒能を両立するハイブリッド型ヒドロゲナーゼである (表 4-1)。本研究は、ヒドロゲナーゼの水素利用技術への応用を促進するだけでなく、ヒドロゲナーゼの酸素に対する安定性および酵素の活性を決定づける構造的要因の解明に繋がる研究材料を発掘した点で意義がある。

表 4-1 [NiFe]_{S77} と酸素感受性および酸素耐性ヒドロゲナーゼの比較.

	酸素感受性 ヒドロゲナーゼ	[NiFe] _{S77}	酸素耐性 ヒドロゲナーゼ
酸素耐性 [†]		95%	30-50%
触媒回転頻度 (s ⁻¹) [‡]	2240	1132	8-340

[†] 空気へ 24 時間暴露後の水素酸化比活性の残存率

[‡] (mol of H₂/mol of [NiFe]hydrogenase) per second

第 3 章

第 3 章では、[NiFe]_{S77} を触媒に用いて、燃料電池の水素極を開発した。[NiFe]_{S77} 電極の性能は、水素半電池の分極曲線測定およびインピーダンス測定によって評価した。[NiFe]_{S77} 電極は水素半電池において 50 mV における単位質量あたりの活性 (1 mg の [NiFe]_{S77} および白金を基準にして算出) が Pt/C 電極の 637 倍となった。また、1 mV における [NiFe]_{S77} の触媒回転頻度は、893 000 s⁻¹ となった。[NiFe]_{S77} 電極は、トータルインピーダンスが 0.13 Ω と極めて小さく、オーミック抵抗がアノードにおける反応抵抗に比べて十分に小さかった。このことより、アノードにおける水素酸化の反応速度が、Nafion 膜内のプロトン移動ではなく、水素酸化触媒能によって支配されていることが確認できた。[NiFe]_{S77} 燃料電池は 0.95 V の開放電圧と 180 mW cm⁻² の最大電力密度を示した (図 4-2)。これは、[NiFe]ヒドロゲナーゼベースの PEFC を構築した初の例であり、ヒドロゲナーゼの白金を上回る電極触媒としての性能を実証したという点で有意義である。

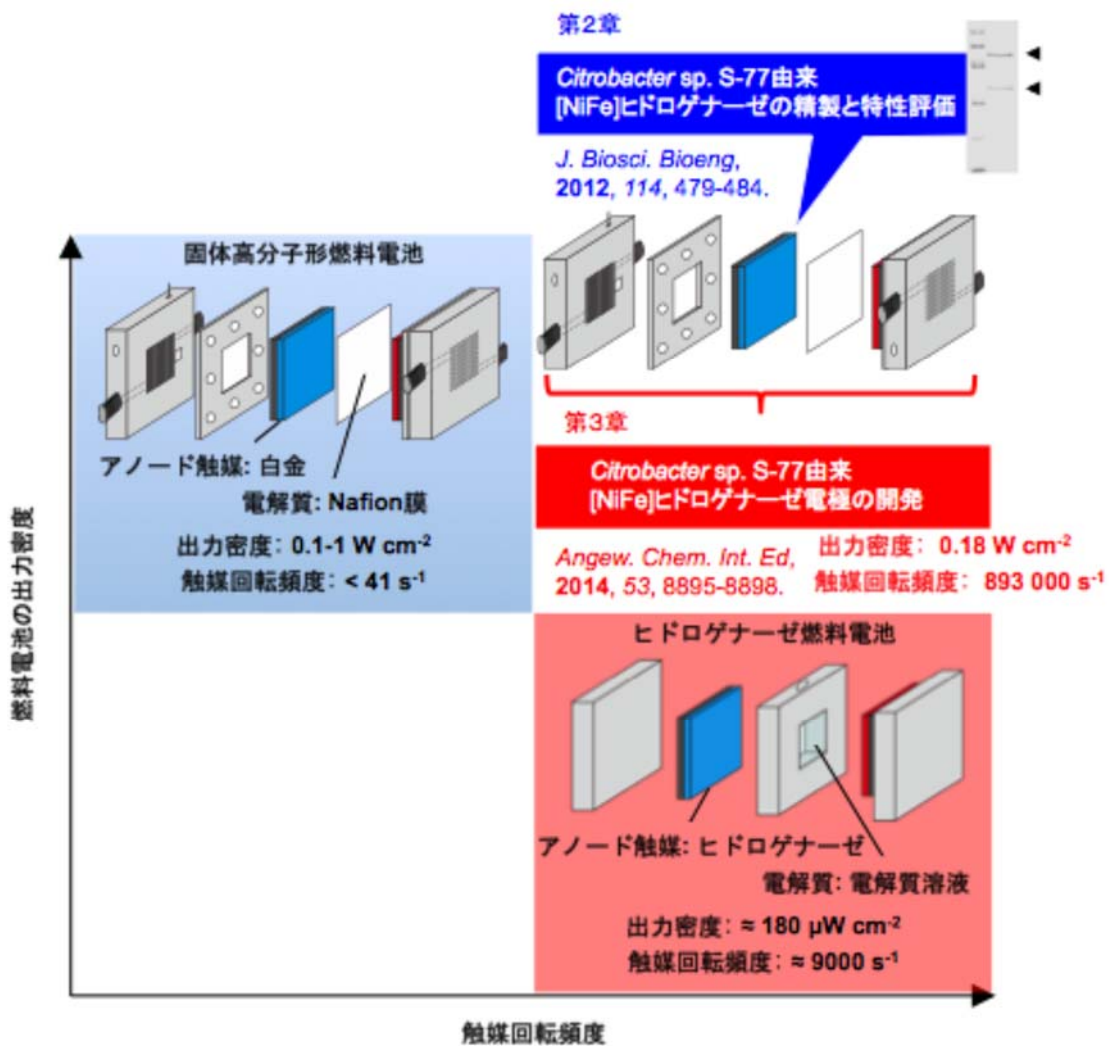


図 4-2. 本研究で開発した[NiFe]_{S77}燃料電池.

本論文では、酸素への安定性と高い水素酸化触媒能を両立する $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ を精製し、PEFC のアノード極として応用可能な $[\text{NiFe}]_{\text{S77}}$ 電極の開発と電気化学特性の分析に成功した。本研究で得られた結果は、従来議論されることの少なかった、酵素の酸素による酸化ストレスに対する安定性と比活性の二つの指標を、実用触媒としての性能に直結させた成果と捉えることが可能で、ヒドロゲナーゼの水素利用技術への応用に重要な貢献を果たすと考えられる。本論文に関する今後の展望としては、ヒドロゲナーゼを始めとする種々の機能性タンパク質の酸化ストレスへの防御機構および酵素活性を決定づける構造的要因に関する研究の発展が期待される。ひいては、本論文の成果が、酵素の実用触媒への応用と、酵素を模倣した人工触媒の開発に貢献していくことを期待している。

発表論文目録

第2章 Citrobacter sp. strain S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの精製と特性評価

“O₂-stable membrane-bound [NiFe]hydrogenase from a newly isolated *Citrobacter* sp. S-77”

Eguchi, S.; Yoon, K. -S.; Ogo, S.

J. Biosci. Bioeng. **2012**, *114*, 479–484.

第3章 Citrobacter sp. strain S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼ電極の開発

“[NiFe]hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 surpasses platinum as an electrode for H₂ oxidation reaction”

Matsumoto, T.; Eguchi, S.; Nakai, H.; Hibino, T.; Yoon, K. -S.; Ogo, S.

Angew. Chem. Int. Ed. **2014**, *53*, 8895–8898.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました、九州大学大学院工学研究院の小江誠司教授に心より感謝の意を表します。また、本研究を行う上でご指導および有益なご助言を頂きました、中井英隆准教授、尹基石准教授、松本崇弘准教授に深く感謝致します。日頃よりの的確なご助言をして頂き、研究をご指導くださいました、谷田部剛史助教に深く感謝致します。研究を行う上で有益なご助言を頂きました、磯邊清先生、鈴木正樹先生に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、有益なご教示、ご助言を頂きました、九州大学大学院工学研究院の木戸秋悟教授、神谷典穂教授に深く感謝致します。

本研究を進める上で有益なご助言を頂きました、日比野高士教授 (名古屋大学)、金光洋修博士、猪木大輔博士、市川幸治博士、キムギョンモク博士に心より感謝致します。事務手続き等でお世話になりました、小江研究室の重松由美子秘書に深くお礼申し上げます。

研究生生活を送る上で、切磋琢磨し、苦楽を共にしてきた研究室の学生諸君に心より感謝致します。

最後に、5年にわたり研究生生活を支えてくれた家族に心より感謝致します。

2015年3月

江口 滋信