

小江 誠司

九州大学大学院 応用化学部門・教授

水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧エネルギー変換

§ 1. 研究実施の概要

21世紀の最重要課題の一つであるエネルギー問題を解決するためには、「生命の機能原理を解明」、「生命機能を抽出・応用」、「生命機能を凌駕するエネルギー変換技術を開発」することが必要不可欠である。本研究は、「水素活性化アクア触媒の界面を利用したナノレベルでの水素駆動型常温・常圧エネルギー変換の創成」を目標とする。本研究の鍵となる「水素活性化アクア触媒」は、膜界面で水素をプロトンと電子に変換する酵素である「ヒドロゲナーゼ」を範として設計・合成する。具体的には、ヒドロゲナーゼの界面を利用した水素活性化機構および活性化状態構造を解明し、その結果を基に、水素活性化アクア触媒の界面で、水素から抽出した電子を利用する燃料電池および触媒的酸化還元反応の開発を行う。

2年次である平成21年度は、以下の3つの研究テーマを中心に行った。

1. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池の開発
2. ヒドロゲナーゼの研究
3. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応の研究

§ 2. 研究実施体制

(1) 小江グループ

- ① 研究分担グループ長：小江 誠司（九州大学、教授）
- ② 研究項目：水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池の開発

(2) 樋口グループ

- ① 研究分担グループ長：樋口 芳樹（兵庫県立大学、教授）

②研究項目：ヒドロゲナーゼの研究

(3)大場グループ

①研究分担グループ長：大場 智之（チッソ株式会社水俣研究所、グループリーダー）

②研究項目：水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応の研究

§ 3. 研究実施内容（文中、1)などの引用番号は(4-1)に対応する）

平成21年度(2年次)は、以下の研究テーマについて、以下の研究項目を実施した。

テーマ 1. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池の開発(小江グループ)

実施項目 1. 水素活性化触媒の設計と合成

実施項目 2. 水素活性化触媒の界面を利用した燃料電池の開発

テーマ 2. ヒドロゲナーゼの研究(樋口グループ)

実施項目 3. NAD 還元型ヒドロゲナーゼの精製法の確立

実施項目 4. 新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶化

テーマ 3. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応の研究(大場グループ)

実施項目 5. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応の研究

実施項目 6. 水中窒素センサーの開発

以下に、実施した研究項目を具体的に記す。

1. 水素活性化触媒の設計と合成（小江グループ）

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水中・常温・常圧で水素分子をプロトンとヒドリドイオンにし、さらにヒドリドイオンから電子を抽出することが知られている。本研究グループは、[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性中心構造を範としたニッケル・ルテニウム錯体を昨年度より設計・合成し、水素活性化触媒として検討し、今年度論文化した。¹⁾また、アクア配位子の水素活性化におけるルイス塩基の役割を解明するために、ピリジン部位を有する新規支持配位子(Bz[^]py)を昨年度設計・合成した。そして、Bz[^]py配位子を有する新規ニッケル・ルテニウム錯体1を合成し、その水素活性化能力を検討した(図 1)。得られた成果を今年度論文化した。²⁾次年度は、さらに高活性な水素活性化触媒の設計・合成に取り組む。

2. 水素活性化触媒の界面を利用した燃料電池の開発(小江グループ)

平成21年度は、燃料極の触媒として水中で水素活性化能を有する錯体と、空気極の触媒として水中で酸素活性化能を有する錯体の分子設計および合成を行った。そして、市販の燃料電池評価システムを改良した装置を用いて、合成した錯体の界面と水素分子、酸素分子との反応メカニズムを検討した。次年度は、それら電極触媒のインク化に取り組む。

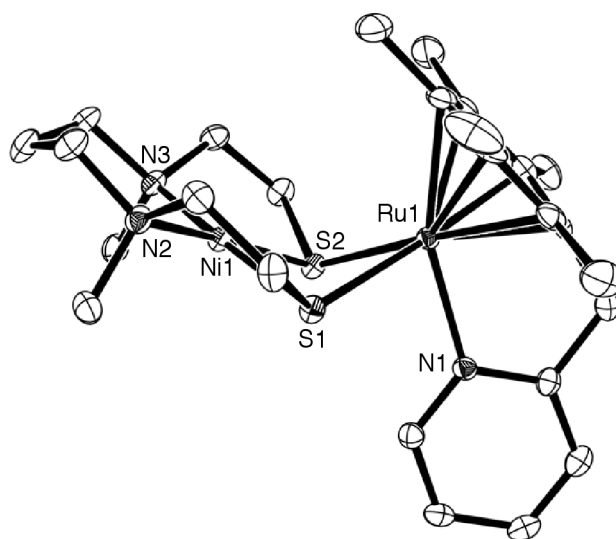


図1 錯体1の結晶構造²⁾

3. NAD還元型ヒドロゲナーゼの精製法の確立（菌体の純化・培養、タンパク質の活性測定法の検討）（樋口グループ）

昨年度、パイロット研究を実施した*Ralstonia eutropha* H16株の菌体の有するNAD還元型ヒドロゲナーゼについては、菌体の収量およびそれから抽出・精製した酵素の収量、活性の全てについてX線結晶解析に適すると思われる結果を得ることはできなかった。平成21年度は、NAD還元型ヒドロゲナーゼを有する他の菌株のスクリーニングを行い、水素酸化細菌・*Hydrogenophilus thermoluteolus*のTH-1株を見出した。この菌体は無機培地に酸素、水素、二酸化炭素の混合気体を導入することでのみ生育する菌体と考えられていたが、培養培地のスクリーニングを行った結果、大腸菌などに利用される一般的な栄養培地である、Luria-Bertani (LB) 培地、2X-Yeast-Trypton (2X-YT) 培地に空気を導入するのみで効率的に生育させることが判明した。また、得られた菌体について、そのNAD還元型ヒドロゲナーゼ活性を調べたところ、無機培地で得られるヒドロゲナーゼとほぼ同程度の活性を検出した。現在、各種クロマトグラフィー法（イオン交換およびゲルろ過法の組み合わせ）による精製条件の確立を目指している。次年度は、酵素活性のアッセイ方法についてもネイティブ酵素について、電気泳動ゲル上で、より迅速にしかも簡便に行う方法を開発する。

4. 新規[NiFe]ヒドロゲナーゼ（チトクロム*b*含有3量体膜結合型）の結晶化（樋口グループ）

平成21年度は、*Hydrogenobacter marinus*由来のチトクロム*b*成分を含まない2量体酵素（[NiFe]2量体部分）の精製タンパク質試料について、結晶化条件のスクリーニングを行い、X線回折実験に適する単結晶を得ることに成功した。現在、SPring-8にてX線結晶解析を行い、分子置

換法にて結晶構造解析を進めている。次年度は、本酵素の活性部位金属原子に由来するEPRスペクトルを測定し、その解析を行う。さらに、チトクロム*b*成分を含んだホロ酵素については、引き続き精製と結晶化条件のスクリーニングを行う。

5. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応の研究 (大場グループ)

本研究グループは、「水素活性化アクア触媒の界面」を利用し、水素から抽出された電子を利用するクリーンな還元触媒反応の開発を行っている。平成21年度は、水素分子を活性化して電子を抽出し、かつこれら電子を酸素あるいは二酸化炭素の還元的活性化に利用できるアクア触媒の設計・合成を行った。また、これら活性な水素活性化アクア触媒を固体材料に担持し、その界面を利用して産業価値の高い低環境負荷型の高機能固体触媒の開発にも取り組んでいる。次年度は、これら触媒を利用した芳香族化合物の水酸化やオレフィン類のカルボキシル化等の反応を検討する。

6. 水中窒素センサーの開発 (大場グループ)

水中の溶存窒素濃度を感知できるセンサーは、環境化学や食品化学の分野における必要性が高い。しかしながら、大部分の既存センサーは、溶存窒素を気相に抽出し、ガスクロマトグラフィー

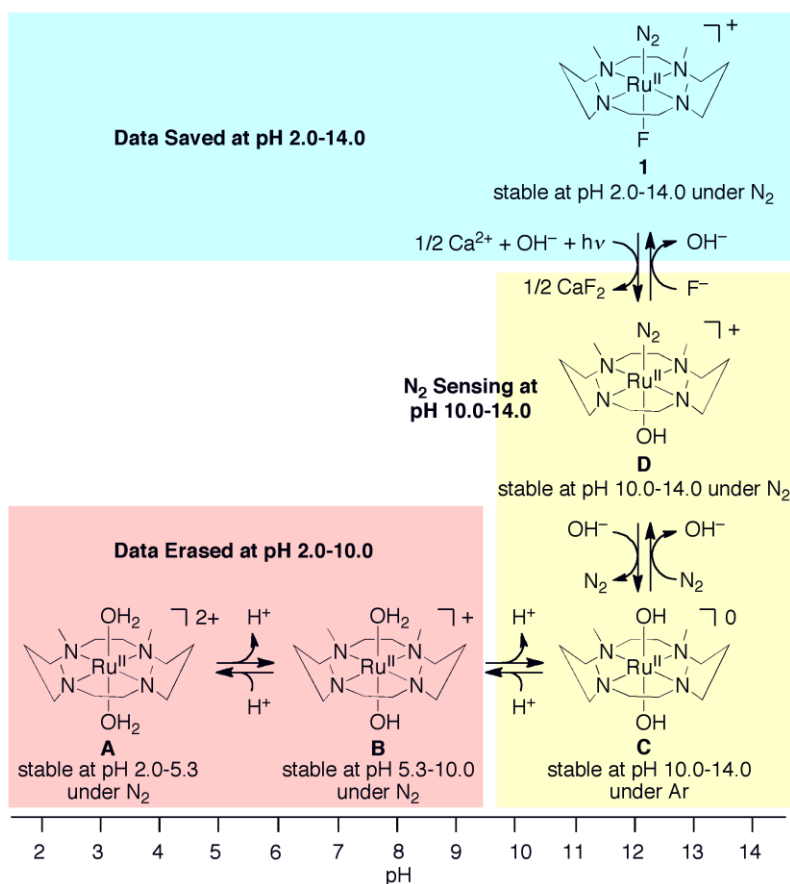


図2 水中窒素センサー^{7),8)}

等によって溶存窒素濃度を推定している。昨年度より、窒素と金属の結合をpHスイッチで切り替えることのできる「水溶性アクア触媒界面」を用い、UV変化で溶存窒素濃度をリアルタイム直接モニタリングできる「水中窒素センサーの開発」を行った(図2)。今年度得られた成果を論文化した。

7),8)

§ 4 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- (1) Electrons from Hydrogen, Ogo, S. *Chem. Commun.* 3297-3476 (2009). DOI: 10.1039/b900297a.
- (2) Critical aspects of [NiFe]hydrogenase ligand composition, Ichikawa, K.; Matsumoto, T.; Ogo, S. *Dalton Trans.* 4304-4309 (2009). DOI: 10.1039/b819395a.
- (3) [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism, Ogata, H.; Lubitz, W.; Higuchi, Y. *Dalton Trans.* 7577-7587 (2009). DOI: 10.1039/b903840j.
- (4) Molecular design of nylon-6 byproduct degrading enzyme from carboxylesterase with b-lactamase fold, Kawashima, Y.; Ohki, T.; Shibata, N.; Higuchi, Y.; Wakitani, Y.; Matsuura, Y.; Nakata, Y.; Takeo, M.; Kato, D.; Negoro, S. *FEBS J.* 276, 2547-2556 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06978.x.
- (5) Two alternative modes for optimizing nylon-6 byproduct hydrolytic activity from a carboxylesterase with a b-lactamase fold: X-ray crystallographic analysis of directly evolved 6-aminohexanoate-dimer hydrolase, Ohki, T.; Shibata, N.; Higuchi, Y.; Kawashima, Y.; Takeo, M.; Kato, D.; Negoro, S. *Protein Science* 18, 1662-1673 (2009). DOI: 10.1002/pro.185.
- (6) Structure analysis of the flavoredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F reveals key residues that discriminate the functions and properties of the flavin reductase family, Shibata, N.; Ueda, Y.; Takeuchi, D.; Haruyama, Y.; Kojima, S.; Sato, J.; Niimura, Y.; Kitamura, M.; Higuchi, Y. *FEBS J.* 276, 4840-4853 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07184.x.

- (7) A pH-Stable Ruthenium(II)-based Sensing System for Dissolved Dinitrogen, Kizaki, T.; Abe, T.; Matsumoto, T.; Ogo S. *Chem. Lett.* 39, 128-129 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.128.
- (8) An Acid-Stable Organoruthenium Complex Suitable as a Bidentate Building Block, Zheng, C.; Inoki, D.; Matsumoto, T.; Ogo, S. *Chem. Lett.* 39, 130-131 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.128.
- (9) Dissolved N₂ sensing by pH-dependent Ru complexes, Kizaki, T.; Matsumoto, T.; Ogo, S. *Dalton Trans.* 39, 1339-1344 (2010). DOI: 10.1039/b918940h.
- (10) Crystal structure of NADH:rubredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*: A key component of the dioxygen scavenging system in obligatory anaerobes, Nishikawa, K.; Shomura, Y.; Kawasaki, S.; Niimura, Y.; Higuchi, Y. *Proteins* 78, 1066-1070 (2010). DOI: 10.1002/prot.22650.
- (11) X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation, Yasuhira, K.; Shibata, N.; Mongami, G.; Uedo, Y.; Atsumi, Y.; Kawashima, Y.; Hibino, A.; Tanaka, Y.; Lee, Y.-H.; Kato, D.; Takeo, M.; Higuchi, Y.; Negoro, S. *J. Biol. Chem.* 285, 1239-1248 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M109.041285.
- (12) The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module, Terawaki, S.; Kitano, K.; Mori, T.; Zhai, Y.; Higuchi, Y.; Itoh, N.; Watanabe, T.; Kaibuchi, K.; Hakoshima, T. *EMBO J.* 29, 236-250 (2010). DOI: 10.1038/emboj.2009.323.
- (13) Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADH:rubredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*, Nishikawa, K.; Shomura, Y.; Kawasaki, S.; Niimura, Y.; Higuchi, Y. *Acta Crystallogr. F* 66, 23-25 (2010). DOI: 10.1107/S1744309109047162.
- (14) The useful properties of H₂O as a ligand of a hydrogenases mimic, Zheng, C.; Kim, K.; Matsumoto, T.; Ogo, S. *Dalton Trans.* 39, 2218-2225 (2010). DOI: 10.1039/b921273f.
- (15) *Concerto catalysis* — harmonising [NiFe]hydrogenase and NiRu model catalysts, Ichikawa, K.; Nonaka, K.; Matsumoto T.; Kure, B.; Yoon, K.-S.; Higuchi, Y.; Yagi, T.; Ogo, S. *Dalton Trans.* 39, 2993-2994 (2010). DOI: 10.1039/b926061g.

- (16) Crystallization and preliminary X-ray studies of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase encoded by *Bacillus subtilis* yumC, Komori, H.; Seo, D.; Sakurai, T.; Higuchi, Y. *Acta Crystallogr. F66*, 301-303 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110000151.
- (17) Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins, Komori, H.; Higuchi, Y. *BIOMOLECULAR CONCEPTS*, in press. DOI: 10.1515/BMC.2010.004.

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)