

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

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。

3年次である平成22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
(九州大学大学院応用化学部門、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
(兵庫県立大学大学院生命理学研究科、教授)
- ② 研究項目: ヒドロゲナーゼの研究

(3)大島グループ

① 研究分担グループ長:大島 俊二

(チツ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

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。本研究の基本的な構想は、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、「水素活性化アクア触媒」を設計・合成する。そして、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技術(界面で水素から抽出した電子を用いる燃料電池および触媒的酸化還元反応)を開発することである。平成22年度(3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. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池の開発

実施項目 2. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池のメカニズム解明

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(菌体の培養, タンパク質の精製)

実施項目 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

実施項目 5. 中性子結晶解析を目指した[NiFe]ヒドロゲナーゼ巨大単結晶の調製

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(大島グループ)

実施項目 6. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応

実施項目 7. Rh、Ir、Ru の単核アクア錯体の担持型触媒

実施項目 8. 新規に合成した水素活性化アクア触媒とその反応活性

以下に、実施した研究項目を具体的に記す。

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(小江誠司グループ)

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

平成22年度は、これまでに燃料電池の電極として「金属錯体」を用いることにより、白金単体や白金合金に代わる安価で触媒能力の制御が容易にできる「水素活性化触媒の界面を利用した分子燃料電池」の開発に成功した(図1)。

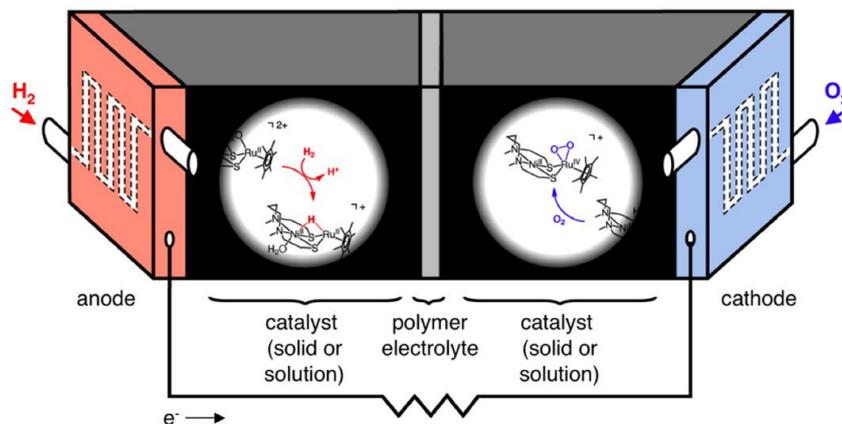


図1 本研究で開発した「分子界面燃料電池」の概念図

2. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧燃料電池のメカニズム解明

(小江誠司グループ)

平成22年度は、水素活性化触媒の界面を利用した分子燃料電池の反応メカニズムの解明を行った。その結果、ヒドリド錯体を経由するアノード・カソードの反応メカニズム(図2)を明らかにした。さらに、図2の、アクア錯体(1a)とヒドリド錯体(1b)の結晶構造をX線構造解析で明らかにした。

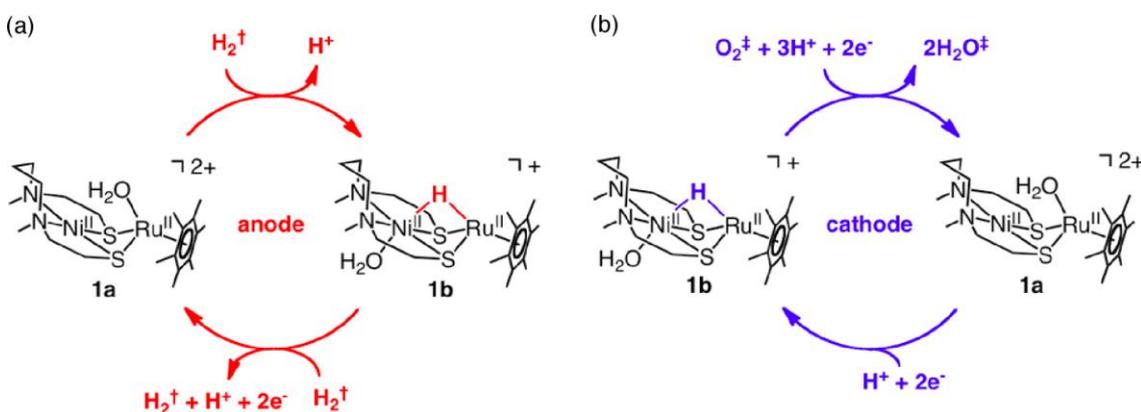


図2 (a)ヒドリド錯体を経由するアノードの反応メカニズム (b)ヒドリド錯体を経由するカソードの反応メカニズム

3. NAD還元型ヒドロゲナーゼの精製法の確立(菌体の培養, タンパク質の精製)

(樋口芳樹グループ)

昨年度より開始した水素酸化細菌・*Hydrogenophilus thermoluteolus*のTH-1株の有するNAD還元型ヒドロゲナーゼの精製法をほぼ確立した。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、20L規模の培養において約500gもの培養菌体を得ること

に成功した。得られた菌体の NAD^+ 還元型ヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、従来の無機培地から得られた菌体中の酵素とほぼ同程度であった。培養菌体破碎上清のpHを変化さないように硫酸分画することで多くの夾雑タンパク質を除去できることを見出した。その後、活性画分をDEAE陰イオン交換クロマトグラフィー(2回)とゲル濾過クロマトグラフィーで精製することで、SDSおよびNative電気泳動で、4本および単一のバンドを示す最終精製ヒドロゲナーゼを得た。SDS電気泳動で得られた4本のバンド試料のN末端部分のアミノ酸配列を分析したところ、それらは文献値と完全に一致した。また、Native酵素の吸収スペクトルパターンから、本試料が*HttTH-1*由来の NAD^+ 還元型 [NiFe] ヒドロゲナーゼであることを確認した。さらに、動的光散乱測定を行ったところ、Native酵素の推定分子量はヘテロ4量体分子の計算値とほぼ一致した。

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(樋口芳樹グループ)

*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X線結晶構造解析に成功した(図3)。結晶は単斜晶系に属し、空間群 $P 2_1$ 、格子定数 $a = 75.8$, $b = 116.3$, $c = 114.2 \text{ \AA}$, $\beta = 91.3^\circ$ であった。分子置換法による位相決定後、 1.25 \AA 分解能の回折データを用いて精密化を行っている。

従来型[NiFe]ヒドロゲナーゼは大・小サブユニットからなるヘテロ2量体を機能単位とするのに対して、本酵素はヘテロ4量体(ヘテロ2量体 $\times 2$)構造をとっていた。従って、生体内では膜内在性のチトクロム*b*₅₆₀ 2量体と結合し、ヘテロ6量体であると考えられる。また、活性部位は従来型酵素のNi-B型と良く似ていた。一方、3個の鉄硫黄クラスターのうちの 하나가標準型のものと大きく異なり、新規のクラスター構造であると思われる。今後、さらに構造精密化を続けるとともに、水素還元型等の構造解析も進め、この新規クラスターと本酵素の耐酸素性や活性との関係を解明する予定である。

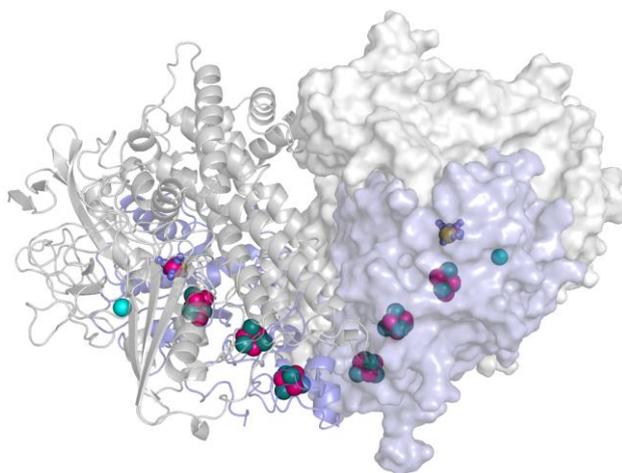


図3 膜結合型ヒドロゲナーゼの [NiFe]サブユニットのみの結晶構造。ヘテロ4量体(ヘテロ2量体が2個)構造をもつ。

5. 中性子結晶解析を目指した[NiFe]ヒドロゲナーゼ巨大単結晶の調製(樋口芳樹グループ)

従来型従来型[NiFe]ヒドロゲナーゼについて、酵素以外の試薬類を全て重水素化した溶液中での結晶化条件を見出し、1mm³以上の大きさの単結晶を得た。本結晶について日本原子力研究開発機構の中性子線源を用いて回折実験をしたところ、7.5 Å 分解能の回折データの取得に成功した。

6. 水素活性化アクア触媒界面による常温・常圧還元反応(大島俊二グループ)

本研究グループは、「水素活性化アクア触媒界面」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、九州大学にて開発された Rh、Ir、Ru の単核アクア錯体の担持を行い、担持型触媒の活性評価を行ったが、水中での安定性に問題があった。そこで平成22年度は、より活性の高い触媒の設計・合成を行った。この新たに合成された触媒は、水素分子を活性化して電子を抽出することが可能で、さらにその電子により二酸化炭素を還元的に活性化することを確認した。次年度は、これら触媒を利用したオレフィン類のカルボキシル化等の有用な反応への応用や、再度担持型触媒への展開を検討する。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kanemitsu, H.; Harada, R.; Ogo, S. A Water-soluble Iridium(III) Porphyrin. *Chem. Commun.* 2010, *46*, 3083-3085 (DOI: 10.1039/c000263a) [Chem. Commun., Hot Article] [Chem. Commun., Top 10 Most-Accessed Articles]
2. Ichikawa, K.; Nonaka, K.; Matsumoto, T.; Kure, B.; Yoon, K.-S.; Higuchi, Y.; Yagi, T.; Ogo, S. *Concerto Catalysis – Harmonising [NiFe]hydrogenase and NiRu Model Catalyst.* *Dalton Trans.* 2010, *39*, 2993-2994 (DOI: 10.1039/b926061g). [Cover Picture]
3. Zheng, C.; Kim, K.; Matsumoto, T.; Ogo, S. The Useful Properties of H₂O as a Ligand of a Hydrogenases Mimic. *Dalton. Trans.* 2010, *39*, 2218-2225 (DOI: 10.1039/b921273f).
4. Kizaki, T.; Matsumoto, T.; Ogo, S. Dissolved N₂ Sensing by pH-Dependent Ru Complexes. *Dalton. Trans.* 2010, *39*, 1339-1344 (DOI: 10.1039/b918940h).
5. Zheng, C.; Inoki, D.; Matsumoto, T.; Ogo, S. An Acid-Stable Organoruthenium Complex Suitable as a Bidentate Building Block. *Chem. Lett.* 2010, *39*, 130-131 (DOI:

10.1246/cl.2010.130).

6. Kizaki, T.; Abe, T.; Matsumoto, T.; Ogo, S. A pH-Stable Ruthenium(II)-based Sensing System for Dissolved Dinitrogen. *Chem. Lett.* 2010, *39*, 128-129 (DOI: 10.1246/cl.2010.128). [Editor's Choice]

7. Kawashima, Y.; Yasuhira, K.; Shibata, N.; Matsuura, Y.; Tanaka, Y.; Taniguchi, M.; Miyoshi, Y.; Takeo, M.; Kato, D.; Higuchi, Y.; Negoro, S. Enzymatic Synthesis of Nylon-6 units in Organic Solvent Contained Low-water: Structural Requirement of 6-aminohexanoate-dimer Hydrolase for Efficient Amide Synthesis. *J. Mol. Cat. B* 2010, *64*, 81-88 (DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.02.006).

8. Komori, H.; Higuchi, Y. Structure and Molecular Evolution of Multicopper Blue Proteins. *BIOMOLECULAR CONCEPTS* 2010, *1*, 31-40 (DOI: 10.1515/BMC.2010.004).

9. Shibata, N.; Tamagaki, H.; Ohtsuki, S.; Hieda, N.; Akita, K.; Komori, H.; Shomura, Y.; Terawaki, S.; Toraya, T.; Yasuoka, N.; Higuchi, Y. Expression, Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Study of Ethanolamine Ammonia-lyase from *Escherichia Coli*. *Acta Crystallogr.* 2010, *F66*, 709-711 (DOI: 10.1107/S1744309110014478).

10. Shibata, N.; Tamagaki, H.; Hieda, N.; Akita, K.; Komori, H.; Shomura, Y.; Terawaki, S.; Mori, K.; Yasuoka, N.; Higuchi, Y. Toraya, T. Crystal Structures of Ethanolamine Ammonia-lyase complexed with Coenzyme B₁₂ Analogs and Substrates. *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 26484-26493 (DOI: 10.1074/jbc.M110.125112).

11. Hirota, S.; Hattori, Y.; Nagao, S.; Taketa, M.; Komori, H.; Kamikubo, H.; Wang, Z.; Takahashi, I.; Negi, S.; Sugiura, Y.; Kataoka, M.; Higuchi, Y. Cytochrome *c* Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-terminal Helix. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 2010, *107*, 12854-12859 (DOI: 10.1073/pnas.1001839107).

12. Ogata, H.; Shomura, Y.; Agrawal, A.G.; Kaur, A.P.; Gärtner, W.; Higuchi, Y.; Lubitz, W. Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Dissimilatory Sulfite Reductase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Acta Crystallogr.* 2010, *F66*, 1470-1472 (DOI: 10.1107/S1744309110033191).

13. Taketa, M.; Komori, H.; Hattori, Y.; Nagao, S.; Hirota, S.; Higuchi, Y. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Dimeric and Trimeric Cytochromes *c* from Horse Heart. *Acta Crystallogr.* 2010, *F66*, 1477-1479 (DOI: 10.1107/S1744309110034913).
14. Komori, H.; Seo, D.; Sakurai, T.; Higuchi, Y. Crystal Structure Analysis of *Bacillus subtilis* Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase and the Structural Basis for Its Substrate Selectivity. *Protein Science* 2010, *19*, 2279-2290 (DOI: 10.1002/pro.508).
15. Kondo, J.; Shibata, H.; Miura, S.; Yamakawa, A.; Sato, K.; Higuchi, Y.; Shukunami, C.; Hiraki, Y. A Functional Role of the Glycosylated N-terminal Domain of Chondromodulin-I. *J. Bone Miner. Metab.* 2011, *1*, 23-30 (DOI: 10.1007/s00774-010-0193-0).
16. Michishita, M.; Morimoto, A.; Ishii, T.; Komori, H.; Shiomi, Y.; Higuchi, Y.; Nishitani, H. Positively Charged Domain Located Downstream of PIP Box, Together with TD Amino Acids within PIP Box, is Important for CRL4Cdt2-mediated Proteolysis. *Genes to Cells* 2011, *16*, 12-22 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01464.x).
17. Shibata, N.; Higuchi, Y.; Toraya, T. How Coenzyme B12-dependent Ethanolamine Ammonialyase Deals with Both Enantiomers of 2-Amino-1-propanol as Substrates: Structure-based Rationalization. *Biochemistry* 2011, *50*, 591-598 (DOI: 10.1021/bi101696h).

(4-2) 知財出願

①平成22年度特許出願件数(国内 0件)

②CREST 研究期間累積件数(国内 1件)