

# 光合成微生物を用いた 水素発生用バイオ分子デバイスの開発

若山 樹\*・中村 史・三宅 淳

21世紀が水素エコノミーとなることは論を待たない。すでに水素を燃料する自動車や水素スタンドが実用レベルに達している。当然、水素を化石燃料で作ったのでは意味がなく、中-長期的には再生可能エネルギーからの水素の製造が不可欠である。

太陽光など拡散したエネルギー資源の集約には、バイオ技術を活用したバイオコンバージョン技術の応用が有効である。我々は、バイオコンバージョン技術を用いた再生可能資源からの水素製造技術を開発してきた。太陽光を7%以上の高効率で水素に変換する光合成細菌を見だし、遺伝子操作技術によって、より高効率のエネルギー変換を可能にする方法の開発を行ってきた。また、水素を発生させる触媒となる酵素の研究、安定で使いやすいデバイス化技術を開発や、有機性廃水などのバイオマスを資源として産業的にエネルギー化する技術を開発してきており、技術的にはすでに産業的に応用可能なものもある。

本特集では、水素の製造が可能なバイオコンバージョン技術として、ナノバイオテクノロジーの活用による光合成微生物由来の光合成器官やヒドロゲナーゼを用いた水素発生用バイオ分子デバイスを紹介する。

ヒドロゲナーゼ ( $H_2ase$ ) を用いた水素発生用バイオ分子デバイスは、究極のエネルギー資源である太陽光と水から直接的に水素を生産することが可能である。太陽光と水からの光水素生産技術には、光電変換とプロトンの還元から成る2段のステップが必要である。藻類などの光合成微生物において、光電変換は光エネルギー変換を司る光合成タンパク質が行い、プロトンの還元は  $H_2ase$  が行っている。 $H_2ase$  は、水素とプロトンと電子の反応を可逆触媒するタンパク質である。 $H_2ase$  は、白金黒などの人工触媒より単位面積あたりの活性点が多いため、<sup>1)</sup> 高感度な水素センサーや高効率な非金属電池などへの応用が期待されている。近年、きわめて耐久性に富む  $H_2ase$ 、ハンドリングが容易で安定した  $H_2ase$ 、低分子量の  $H_2ase$  や、異種  $H_2ase$  遺伝子発現系の成功などが報告され、工業的な利用の可能性が見いだされている。また、耐久性にすぐれた光合成系タンパク質も数多く単離され、遺伝子的な改良も可能な技術が整いつつある。

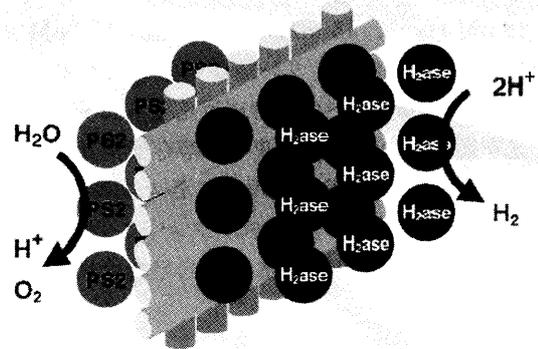


図1. 水素発生用バイオ分子デバイスの研究概念図

そこで、最新の分子ハンドリング技術によって、 $H_2ase$  と光合成器官・電子伝達鎖を電極基盤上に3次元的に組織化した工業用触媒に変換することにより、従来型の金属触媒より安価で高効率の水素エネルギー変換デバイスの開発が可能になると思われる。我々は、太陽エネルギーを集積し水素へ高効率で変換する水素発生用バイオ分子デバイスの開発を試みている (図1).<sup>2,3)</sup>

## 実験操作

光エネルギー駆動型の水素生産を行う当該デバイスは、一般的に光増感材料、水素発生用触媒、電子供与体、メディエーターによって構成される。本研究では、好熱性の藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechocystis* PCC 6803由来の光合成器官 (Photosystem 1; PS1, Photosystem 2; PS2) や、側鎖をさまざまに修飾した亜鉛ポルフィリン化合物を光増感材料として用いた。また紅色硫黄性の光合成細菌 *Thiocapsa roseopersicina* 由来の熱安定性・低酸素感受性の  $H_2ase$  を水素発生用触媒として用いた。 $H_2ase$  は、Ni-Fe (大サブユニット) と Fe-S (小サブユニット) から成り、分子量 90 kDa, 等電点 = 4.2, 直径 = 11 nm, 高さ = 8 nm である。必要に応じて 20 残基のポリ-L-リジン (PLL) を  $H_2ase$  の安定化、ラングミュアー・ブロージェット (LB) 膜作製時の対イオンとして用いた。エチレンジアミントリアセテート (EDTA), ア

\*著者紹介 (独) 産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 (客員研究員) 〒661-0974 尼崎市若王寺3-11-49  
TEL. 06-6494-7803 FAX. 06-6494-7862 E-mail: tatsuki-wakayama@eaist.go.jp

スコルビン酸, メルカプトエタノール, メルカプト酢酸などを電子供与体として, ポリメチルビオロゲン, ポリブチルビオロゲンをメディエーターとして用いた. 光増感材料や $H_2ase$ は, リン脂質などを用いたLB膜法によって, 金, ITO, カーボン, 石英電極などに, 固定化した. LB膜は, 下層水(トリス+PLLなど)にグラスロッド法でバイオ分子などを展開し, Z型(基板引き上げ時にLB膜を積層)の垂直浸漬法にて作製した. 0.2 mM 光増感剤, 38 nM  $H_2ase$ , 15 mM 電子供与体, 0.77  $\mu$ M メディエーターを含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)を受光面積1.9 cm<sup>2</sup>, 容量2 cm<sup>3</sup>の光合成反応セルに充填し, ハロゲン光を照射した. 緩衝溶液中の溶存酸素及び溶存水素濃度は, 酸素, 水素電極を用いて各々同時に測定した. 光増感剤であるPS1, 亜鉛ポルフィリンは, 表面圧20 mN/mにおいて積層したLB膜, 自己集合膜を作製し実験に供した.

### ヒドロゲナーゼのデバイス化

$H_2ase$ とPLLを用いて, 石英基板上にPLL- $H_2ase$ -LB膜を作製し, デバイス化を試みた. LB膜中の $H_2ase$ の活性測定を行い評価した. PLL- $H_2ase$ -LB膜による水素発生反応を測定したところ, 電極上にLB膜を作製することで $H_2ase$ の活性を維持できることが明らかになった(図2). PLLを用いた場合, LB膜の累積数に対し,  $H_2ase$ の活性を示す水素発生速度が直線的に増加した. 一方,  $Ca^{2+}$ を対イオンとして用いた場合, 得られた水素発生速度は低く, 累積数の増加に対して水素生産速度の増加は見られなかった.  $Ca^{2+}$ を用いた場合, 基板上に $H_2ase$ の単分子膜が累積されなかったか, もしくは累積されても $H_2ase$ が失活したと考えられる. PLLを用いることによ

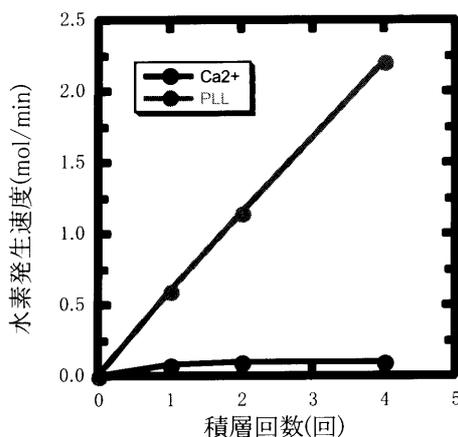


図2.  $H_2ase$ -LB膜の積層回数と水素発生速度の相関

り活性を保持したPLL- $H_2ase$ -LB膜が石英基板上に形成されていることが示された. PLL- $H_2ase$ -LB膜を屋外で用いる場合, 太陽光や太陽熱によって比較的高温環境下におかれることが予想されるため, PLL- $H_2ase$ -LB膜の熱安定性を $H_2ase$ の加熱後の水素発生反応によって評価した. 電熱オープン内で加熱(10 min, 30–100°C)されたPLL- $H_2ase$ -LB膜の水素発生活性は, 30–70°Cにおいて維持されていた.

### ヒドロゲナーゼ+人工光増感剤のデバイス化

$H_2ase$ と人工光増感剤として側鎖を新たに合成・改変したさまざまな亜鉛ポルフィリン化合物(Zn-Por)を用いて, ITOガラス電極上にZn-Por- $H_2ase$ -LB膜を作製し, デバイス化を試みた. これにより, 光エネルギーを水素エネルギーに変換するバイオ分子デバイスの構築が可能となる. Zn-Por- $H_2ase$ -LB膜による水素発生反応を測定したところ, 亜鉛ポルフィリンが有する側鎖中のメチル基数をさまざまに変化させても, ITOガラス電極上にディッピングごとの積層が可能であり, いずれの亜鉛ポルフィリンを用いても光エネルギー駆動型の水素発生が認められた(図3). また, 電子供与体であるEDTA濃度の増加に伴い, 水素発生速度が向上した. ポルフィリン環に中心金属が配位していないフリーベースのポルフィリンと亜鉛が中心金属として配位している亜鉛ポルフィリンの水素発生能を比較したところ, フリーベースのポルフィリンではほとんどその活性が認められなかった.

### ヒドロゲナーゼ+光合成器官のデバイス化

$H_2ase$ と生体由来の光増感剤として好熱性の藍色細菌由来の光合成器官(PS1)を用いて, ITOガラス電極上にPS1- $H_2ase$ -LB膜を作製し, デバイス化を試みた. PS1のみをLB膜法によってガラス電極基盤上に積層したと

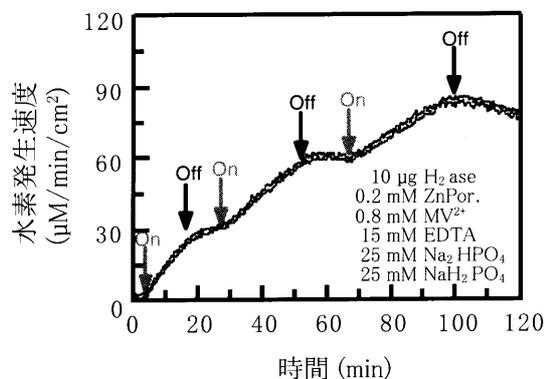


図3.  $H_2ase$ +Zn Por-LB膜による光水素発生

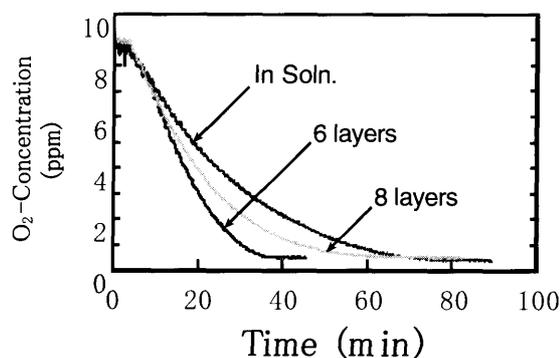
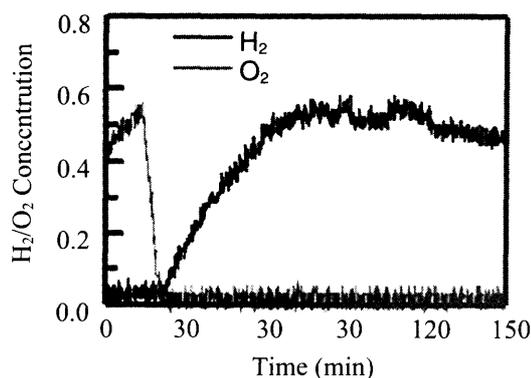


図4. PS1-LB膜の活性測定

図5. 基板上的 H<sub>2</sub>ase と溶液中の PS1 による光エネルギー駆動型水素発生

ころ、活性（溶存酸素の減少速度）の増加が確認された（図4）。基盤上に積層した PS2 についても光に反応する電流の発生が観察された。H<sub>2</sub>ase と PS1 をガラス電極基盤上に積層したところ、両バイオ分子の LB 法による積層は特異吸収波長の増加によって確認されたが、光エネルギー駆動型の水素発生は観察されなかった。PS1, H<sub>2</sub>ase を個々に積層した場合には、活性の維持が確認されていることより、現在、カーボンナノチューブなど新たなメディエーターによる PS1 から H<sub>2</sub>ase への電子伝達効率の向上を試みている。

ガラス電極基盤上に積層した H<sub>2</sub>ase と溶液中に懸濁した PS1 を酸素・水素電極が設置された光合成反応セルに充填し、ハロゲンランプ光を光源とした光水素発生反応を試みた（図5）。電子供与体であるメルカプト酢酸量を

倍加させることにより、光エネルギー→電子供与体と PS-1 による光電変換→メディエーターによる電子伝達→電極上の H<sub>2</sub>ase によるプロトンの還元反応→水素電極による溶存水素の検出から成る光水素発生反応が可能であった。

H<sub>2</sub>ase は、工業的利用の観点からも物理的環境に安定なものが見いだされており、バイオ分子デバイスの素材としてさらなる応用が可能と考えられる。H<sub>2</sub>ase の構造解析が進みつつある状況にあり、H<sub>2</sub>ase の立体構造と作用機構について詳細な解明が進めば、高感度・高効率なバイオ分子デバイスの設計が可能となる。水素分子の酸化、得られた電子の電極への伝達などのプロセスを高効率で進行させるには、H<sub>2</sub>ase の電子授受部位の特定や、H<sub>2</sub>ase を含む電子供与分子、受容分子の電子授受部位を正確に配向し、3 次元的に組織化する分子ハンドリング技術の開発が必須となる。本研究では、熱安定性 H<sub>2</sub>ase と人工材料の光増感剤をガラス電極基盤上に積層・固定化し、水素発生反応を行うことが可能となった。今後、光合成微生物由来の光合成系と H<sub>2</sub>ase のカップリングによる光水素発生反応が観察されれば、水素発生用バイオ分子デバイスの開発が可能となり、生体分子と人工材料を複合化したナノテクノロジーの一分野として新規分野の開拓が可能になると思われる。また、当該デバイス技術は、水素センサーデバイスとして応用可能であり、すでにさまざまな混合ガス中より水素を検出して応答電流を発生させる高選択性のセンサーデバイスの開発に成功している。<sup>4)</sup> バイオ分子デバイスの開発は、低価格、再生可能、省スペース、環境調和などの諸条件を満足させる技術開発となる。また、分子操作技術の向上により、任意の生体触媒を基盤上において 3 次元的なデザインを自由に行うことも可能になると思われる。

## 文 献

- 1) Okura, I. *et al.*: *Coord. Chem. Rev.*, **68**, 53 (1985).
- 2) Miyake, J. (ed.): *BioHydrogen III*, Elsevier, London (2004).
- 3) Wenk, S.-O. *et al.*: *J. Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1489 (2002).
- 4) Qian D.-J. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 789 (2002).