

論文の内容の要旨

論文題目 Study on Multi-Electron Transfer Reactions Based on Spectroelectrochemistry and Enzyme Genetics

(分光電気化学及び酵素遺伝学に基づく多電子移動反応に関する研究)

氏名 大岡 英史

1. 緒言

多電子移動反応とは複数の電子が移動する化学反応であり、効率的なエネルギー・物質変換を担う重要な反応群である^[1]。例えば生体二大エネルギー生産系として知られる光合成と好気呼吸、そして近年注目を集めている水素社会は、いずれも多電子移動反応による水と酸素の可逆的な変換に立脚している。また、多電子移動反応によるエネルギー獲得は、がんや加齢などの生命現象とも深く関わっている。^[2]このため、多電子移動反応を深く理解することは、持続可能な社会の構築のみならず、生命そのものを理解する新たな切り口を提供しうるものと考えられる。

そこで本研究では、多電子移動反応を制御する因子を明らかにすることを目的とし、人工触媒の高効率化、そして生体酵素における多電子移動制御機構について検討を行ってきた。これまでも多電子移動反応の理解に向けて、結合の生成と切断の活性化障壁に着目したd-band理論による理論構築が精力的に行われており、実際に同理論を用いることで高活性触媒の開発が促進されている。一方、多電子移動反応を制御する上で、結合の生成と切断だけでなく、金属イオンの価数変化による電荷の貯蔵や物質拡散による反応場制御も重要であると考えられる。また、生体内では、遺伝子発現によって多電子移動酵素の機能や発現量の調節が行われていると考えられる。そこで本研究では、既存理論の枠組みを超えた多電子移動制御の可能性を分光化学的及び酵素遺伝学的に示すことによって、より包括的な多電子移動反応論の構築を目指した。具体的には、高活性酸素発生触媒であるIr酸化物の電荷貯蔵能に焦点を当て、3d金属と4d/5d貴金属触媒の活性相違について知見を獲得することを試みた。また、多電子移動制御に対する反応場の効果を評価するため、二酸化炭素還元と水素発生反応の競合について検討を行った。そして細胞や遺伝子のスケールにおける多電子移動制御について知見を得るため、生体酵素を遺伝学的に解析した。

2. Ir酸化物電極による酸素発生反応：3d金属触媒と5d貴金属触媒の相違【2, 4, 5】

酸素発生反応を駆動するには、4つの電子と4つのプロトンの輸送の制御が必要である。現在触媒活性を議論する上で主流のd-band理論は、基質と触媒の吸着エネルギーの最適化により高活性触媒の開発が可能になると予測している。一方で、酸素発生を駆動するには、複数の電荷を触媒活性サイトに貯蔵する必要があるが、このような「電荷貯蔵過程」の重要性は従来の多電子

移動反応論では見落とされてきた。そこで本研究では、触媒予測理論において度々見られる実験と理論の乖離が、電荷貯蔵過程に起因する、という新たな仮説を立て、その検証を目的として人工材料の中で最高活性を示すIrO_xについて検討を行った。そして、電荷貯蔵効率と触媒活性の相関という観点から5d貴金属触媒であるIrO_xの酸素発生機構をpH横断的に評価し、MnO₂やFe₂O₃などの3d金属触媒と比較することを通して、多電子移動反応全般において4d/5d貴金属触媒が高い活性を示す起源に迫った。

【実験】 既報^[4]に倣い酸化インジウムスズ (ITO) 付き光導波路基板表面にIrO_xを電析した。電解液はBritton-Robinson 緩衝溶液に0.5 MのNa₂SO₄を添加し、pH調整を行うことで作製した。以下、電位は全て可逆水素電極 (RHE) に対しての値とする。

【結果と考察】 IrO_xの酸素発生能と電荷貯蔵能の相関を評価するため、pH 2-12においてIrの価数変化 (図1▼: Ir³⁺ → Ir⁴⁺、▲: Ir⁴⁺ → Ir⁵⁺) の電位と、酸素発生開始電位 (図1■) を電気化学測定より求めた。興味深いことに、酸素発生の開始電位はpHに依存せず1.5 Vで一定であるのに対し、電荷貯蔵過程に対応するIr

の価数変化は強いpH依存性を示した。この結果は、酸素発生反応を駆動するために必要な電荷貯蔵過程が、酸素発生の活性を支配する因子でないことを示している。この結論は、電気化学的に算出した価数変化の速度定数が酸素発生のものよりも8桁以上大きいことから支持された。

引き続き、触媒反応の律速段階について知見を得るため、光導波路分光法により反応中間体の追跡を試みた。すると、酸素発生の開始電位と強い相関を示す、Ir⁵⁺に帰属可能^[5]な中間体A₄₅₀ (吸収極大: 450 nm、図1○) が検出された。この中間体はIr⁴⁺の酸化で生じるIr⁵⁺ (吸収極大: 410 nm) とは異なる電子状態にあり、計算化学よりこの吸収極大の相違はIr⁵⁺核に配位した酸素配位子のスピンの反転に帰属された。スピン反転後は二つの酸素原子間の距離が自発的に収縮すること (活性化障壁: 16 kcal/mol) より、IrO_xの律速段階は中間体A₄₅₀によるO-O結合生成であることが分かった。

このような金属の価数変化が律速とならない酸素発生触媒は、MnO₂やFe₂O₃などの3d金属触媒と対照的であり^[6]、この差異は金属イオンの電子配置によるものと考えられる (図2)。MnO₂やFe₂O₃などの場合、電荷不均化傾向を有する高スピンd⁴電子配置 (Mn³⁺、Fe⁴⁺) を経由するため、価数変化が困難となった。一方、IrO_xは低スピン電子配置を取るため、有利に電荷貯蔵を行うことが可能となる。この電荷貯蔵能の差により、反応開始電位、そして反応速度の電位依存性の両側面において、IrO_xはMnO₂よりも優れた酸素発生能を有していると考えられる。^[7]これらの効果は多電子移動反応全般に成立するものであることを踏まえると、低スピン電子配置により有利な電荷貯蔵過程を有する4d/5d貴金属元素は、反応開始電位と反応速度の電位依存性の両方の観点において潜在的に多電子移動触媒能が高いと考えられる。これらの知見は結合の生成と切断だけに着目した従来の触媒予測理論から得ることができなかったものであり、人工系の触媒開発を大きく発展させるものと考えられる。

3. 二酸化炭素還元における電極近傍pHの効果【3】

水溶液中で二酸化炭素還元 (CO₂ + 8H⁺ + 8e⁻ → CH₄、など) を行うと、水素発生反応 (プロトン還元: 2H⁺ + 2e⁻ → H₂、あるいは水分子の還元2H₂O + 2e⁻ → H₂ + 2OH⁻) が競合するため、

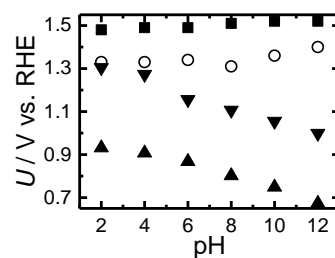


図1 酸素発生開始電位 (■)、価数変化 (▲、▼)、そして中間体 A₄₅₀ の生成電位 (○) の pH 依存性。

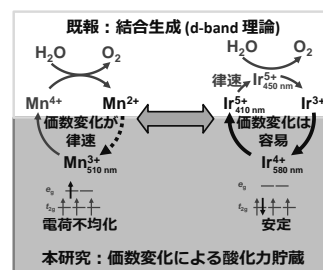


図2 IrO_x と MnO₂ の相違。

目的生成物の選択性が低下する。この競合を説明するため、吸着水素の安定性などを考慮したd-band理論による説明が試みられてきた⁸⁾。しかし、同理論は、反応選択性を左右することが実験的に提唱されている拡散輸送や電極近傍のpHの効果を考慮することができず、競合反応の本質を理解する上で大きな弊害となっていると考えられる。そこで本研究では、二酸化炭素還元と水素発生反応の競合における電極近傍のpHの効果を明らかにするため、水分子の還元とプロトン還元を区別できる回転電極系を用いて二酸化炭素還元機構について電気化学的検討を行った。

【実験】 機械研磨した銅回転電極を作用極とし、0.1 M NaClO₄電解液 (pH 2.5) 中で電気化学測定を行った。

【結果と考察】 図3に銅回転電極のサイクリック・ボルタモグラムを示す。アルゴン雰囲気下 (図3灰色) において-0.4 V vs. RHEから立ち上がる電流は、プロトン拡散速度に比例する飽和電流を示すため、プロトン還元による水素発生に帰属された。一方、-1.1 Vから立ち上がる電流は電極近傍のプロトン濃度の影響を受けないことから、水分子の還元による水素発生に帰属された。引き続き水素発生の両経路と二酸化炭素還元とどのように競合するかを検討するため、系中に二酸化炭素を導入した (図3黒)。すると、プロトン還元は二酸化炭素の有無に関わらず同程度の電流電位応答性を示すのに対し、水分子の還元は二酸化炭素共存下では大きく抑制されることが分かった。

これらの結果は、2つの水素発生経路の内、プロトン還元はより小さな活性化障壁を有するだけでなく、二酸化炭素共存下でも阻害されないことを示している。従って、プロトン還元を抑制するには電極近傍のpH制御が必要であり、この知見は、今後さらに二酸化炭素還元の選択性を向上する上で重要となると期待される。

4. 遺伝子構造による多電子移動制御：酸素発生酵素と酸素還元酵素の相違【1, 6】

古来より多電子移動反応を活用してきた自然界は、活性サイトの構造のみならず、遺伝子や細胞単位での反応制御も行っていることが。そこで本研究では、光合成酵素 (光化学系II、PS II) 及び好気呼吸の酵素 (シトクロムCオキシダーゼ、COX) の生物種横断的な遺伝子構造解析を通して、自然界が持続的にエネルギー獲得を行うために採った戦略について検討を行った。これは、これまで盛んに行われてきたタンパク結晶構造の階層とは対照的に、遺伝子の階層における多電子移動反応制御に初めて着目したものである。

【手法】 シアノバクテリア38種類に対して、PS II及びCOXの修復費用を遺伝子発現コストから算出し (図4)、正味のエネルギー獲得を行うために必要な触媒回転数を求めた。

【結果と考察】 遺伝子データベースProOpDBより、PS IIの活性中心 (*psbA*遺伝子) は単独で発現制御されるのに対し、COXは酵素全体が同時に発現されることが分かった (図4B)。ここで、酵素修復は遺伝子発現で行われることに着目すると、遺伝子発現機構の違いのため、COXの修復コストはPS IIの3倍ほど大きくなる。

一方、エネルギー獲得酵素であるPS II及びCOXは、それぞれの分解経路に依らず、修復コストを上回るエネルギーを触媒反応により獲得しなければならない。酵素が失活するまでに獲得できるエネルギーは、触媒反応1回転当たりのエネルギー獲得量 (PS II: 4.8、^[11] COX: 6.3^[12] [ATP/O₂]) と生涯中の触媒回転数の積から算出することが可能である。以上を踏まえると、PS IIは約500回転で正味のエネルギー獲得量が正に転じるのに対し、COXは約1500回転行うまで修

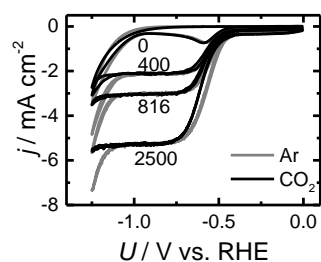


図3 Ar及びCO₂雰囲気下における銅回転電極のサイクリック・ボルタモグラム。図中の数値は rpm 単位の回転数を表す。

復コストが獲得エネルギー量を上回ることが分かった (図5)。この結果は、ここで、原核生物は複数の遺伝子をまとめて発現制御することが一般的であることを踏まえると、単独発現される *psbA* 遺伝子が特殊な遺伝子構造を有しており、このことにより PS II 修復コストの抑制が可能となったと言える。これは、酸化分解に安定な酸素発生酵素を開発する代わりに、最小限のエネルギー消費で頻繁に修復することを前提とした酵素設計が行われたことを示唆するものである。

また、上記遺伝子解析で明らかとなった遺伝子構造による多電子移動制御に加え、申請者は緑色藻類ミドリムシが細胞運動性による多電子移動制御を行っていることも明らかにした。すなわち、ミドリムシは光合成で活用できない緑色光を外部刺激として運動制御を行う【1】ことで、光合成効率を制御している。これらの知見は、タンパク結晶構造を基にしたこれまでの理解に対し、遺伝子や細胞運動性の階層でも多電子移動反応制御が行われていることを初めて明らかにしたものであり、生体多電子移動の多面性を示すものである。

5. 総括

本研究では、分光電気化学及び酵素遺伝学による検討を行い、多電子移動反応を行う上で結合の生成と切断以外にも重要な要素があることを示すことにより、d-band理論による多電子移動論を拡張することを目指した。その結果、従来理論では説明できなかった3d金属触媒と4d/5d貴金属触媒の相違を明らかにし、二酸化炭素還元を選択性に対する電極近傍pHの重要性を提唱した。また、生体は遺伝子や細胞運動性の階層でも多電子移動反応制御を行っていることを明らかにした。これらは人工触媒開発、そしてエネルギーの効率的な利活用に向けて足掛かりとなると期待される。

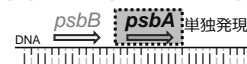
6. 発表状況

【1】 [H. Ooka](#), T. Ishii, K. Hashimoto, R. Nakamura, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 20693 – 20698. 【2】 [H. Ooka](#), Y. Wang, A. Yamaguchi, M. Hatakeyama, S. Nakamura, K. Hashimoto, R. Nakamura, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, *18*, 15199 – 15204. 【3】 [H. Ooka](#), M. C. Figueiredo, M. T. M. Koper, *Langmuir*, **2017**, *33*, 9307 – 9313. 【4】 [H. Ooka](#), T. Takashima, A. Yamaguchi, T. Hayashi, R. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 7149 – 7161. 【5】 [H. Ooka](#), A. Yamaguchi, T. Takashima, K. Hashimoto, R. Nakamura, *J Phys. Chem. C*, **2017**, *121*, 17873 – 17881. 【6】 [H. Ooka](#), K. Hashimoto, R. Nakamura, *submitted*.

7. 引用文献

[1] H. Tributsch, *Carbon-Neutral Fuels and Energy Carriers*, CRC Press, Florida, **2012**, p. 415. [2] M. G. V. Heiden *et al.*, *Science*, **2009**, *324*, 1029. [3] I. C. Man *et al.*, *ChemCatChem*, **2011**, *3*, 1159. [4] Y. Zhao *et al.*, *Small*, **2011**, *7*, 2087. [5] S. E. Castillo-Blum *et al.*, *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 954. [6] T. Takashima *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 1519. [7] A. R. Kucernak *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, *120*, 10721. [8] Y. Hori, *Modern Aspects of Electrochemistry*, Springer, New York, **2008**, p89. [9] M. Ma *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 6680. [10] A. Wuttig *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **2016**, *2*, 522. [11] K. Miyata *et al.*, *Photosynth. Res.*, **2012**, *113*, 165. [12] M. Asashima *et al.*, *Life Science 3rd Edition*, Yodosha, Tokyo, **2009**, p102.

(A) PS II (修復費用：小)



(B) COX (修復費用：大)

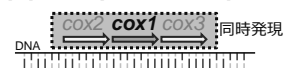


図4 PS II(A)及びCOX (B)の遺伝子構造。

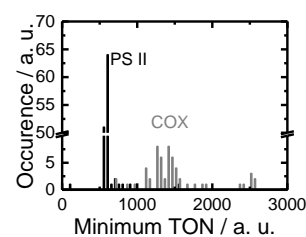


図5 PS II及びCOXの最小触媒回転数 (TON)。