

化学修飾ヘムを用いた蛋白質を基盤とする  
光駆動型二酸化炭素変換システムの開発  
**Light-driven CO<sub>2</sub> Fixation by Artificial Protein Having Chemically  
Modified Prosthetic Group**

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻・講師  
松尾貴史

1. 研究の概要

光合成は、太陽エネルギーにより、二酸化炭素を有機化合物と酸素に変換するプロセスである。人工的に光合成類似の反応を行わせるためには、いかにシンプルな系で効率よく光エネルギーを化学反応エネルギーに変換するかが鍵となる。本研究では、酸素貯蔵蛋白質であるミオグロビンのポルフィリン補因子を、アニオン性ドメインを有する亜鉛ポルフィリンと置換し、酵素系と組み合わせることによって、水中での光駆動型の二酸化炭素固定化システムの構築を目指す。蛋白質空間は、ポルフィリンの可溶化と光誘起電子移動を有利にするための環境を提供し、アニオン性のドメインは、光励起された亜鉛ポルフィリンからの電子アクセプターであるカチオン性のビオロゲンを結合させ、電子移動をスムーズにする機能を持つ。還元されたビオロゲンラジカルは、電子キャリアとして、共存するギ酸脱水素酵素に作用し、溶存二酸化炭素をギ酸に変換するプロセスに関与する。

2. Abstract

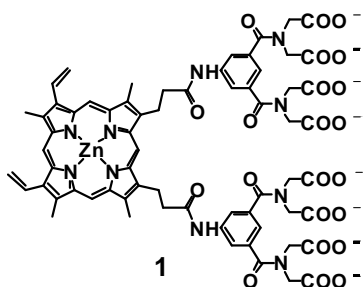
Photosynthesis is the well-constructed system to produce organic materials and oxygen from CO<sub>2</sub>. This mechanism works under special environments provided by biomolecules i.e. proteins, membranes and so on. One of the important keys to attain “Artificial Photosynthesis” would be to utilize and/or apply the unique environment.

We have paid attention to functions, structures and modifications of hemoproteins, proteins containing (an) iron porphyrin dye complex(es) as a prosthetic group. Porphyrin is a light-responding chemical material and its derivatives are components in natural photosynthesis. In this research, we artificially introduce zinc porphyrin complex, an especially effective light absorber, and a binding site for an electron acceptor into a protein matrix to lead an effective photo-induced electron transfer. The activated electron acceptor is supposed to trigger various chemical reactions. We will make a combination of the artificial photo-induced system with the production of formate catalyzed by formate dehydrogenase. The structures and reactivities of porphyrin complexes, binding domains and electron acceptors will be precisely fine-tuned.

In this research, an artificial prosthetic group and an artificial interface are constructed in a protein matrix. The environment provided by the protein structure is regarded as “protein flask”. The idea of this research will give us insights and hints to develop artificial photosynthesis.

### 3. 研究目的

ポルフィリンは、ヘム蛋白質の補因子の構成分子であり、その亜鉛錯体の光応答性は古くから知られている、本研究においては、このことを利用して、シンプルな系での水中での光駆動型二酸化炭素の固定化システムの確立を目指し、二酸化炭素固定化に必須のプロセスである炭酸イオンへの電子付与を効果的に行うために、有用な還元剤であるピペリジンラジカル( $P^{\bullet}$ )を光照射により効果的に発生させることを第一目標とした。具体的には、補因子の置換が容易なミオグロビン(酸素貯蔵蛋白質)に対して、アニオン性のドメインを有する亜鉛ポルフィリン **1** を導入し、再構成ミオグロビンを調製し、モノカチオン性のピペリジニウムを電子メディエーターとするシステムを構築した。本システムにより、カチオン性の酸化型ピペリジン( $P^+$ )がアニオン性のドメインに静電相互作用により結合している状態で、光誘起電子移動により  $P^+$  が発生し、電荷が減少した  $P^{\bullet}$  は、溶媒中に素早く拡散し、FDH 酵素系により、二酸化炭素はギ酸とし



#### 本研究での反応系

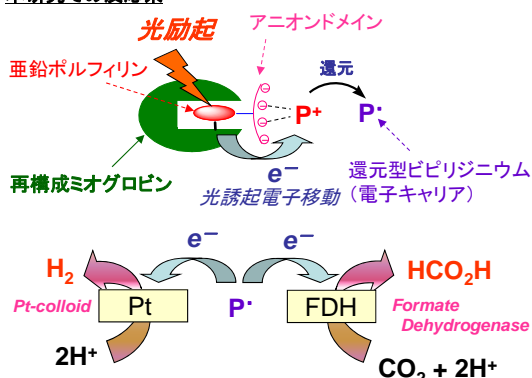


図1 本研究での反応系模式図

て固定化されると期待される。本反応システムは、FDH 酵素系を白金触媒に置き換えることにより、二酸化炭素を排出しないエネルギー生産として期待される水素発生システムにも応用できる汎用性の広いものである。

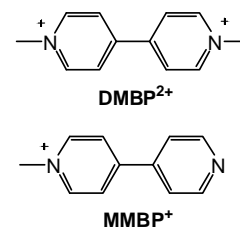
### 4. 研究経過

まず、アニオンドメインを有する亜鉛ポルフィリンを有機合成によって構築し、ミオグロビンの天然補因子であるヘム(鉄ポルフィリン)と置換することにより、再構成ミオグロビンを得た。次に、光駆動型電子移動反応を物理化学的に評価するために、レーザーフラッシュフォトリシス実験を行い、その後、二酸化炭素還元および水素発生実験を実施した。

### 5. 研究成果

#### ①電子移動反応の観測

2種類のピペリジニウム(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium,  $DMBP^{2+}$  および 1-methyl-4,4'-bipyridinium,  $MMBP^+$ ) 存在下、再構成ミオグロビンの緩衝液溶液(10 mM KPi, pH = 7.0) を 500 W のキセノンランプ照射を行ったところ、両場合とも、溶液の色が紫色



に変化し、600 nm にピペリジニウムラジカル特有の吸収バンドが出現した(図2)。このことは、光照射により亜鉛ポルフィリンが励起され、期待通り、アニオンドメインにおいてピペリジニウム分子への三重項光駆動型電子移動反応が起こったことを示している。Nd-YAG レーザーを用いたフラッシュフォトリシス実験により、電子移動反応の速度論的検討を行った。アニオンドメインを有する再構成ミオグロビンでは、Michaelis-Menten 型に依存したが、アニオンドメインを持たない亜鉛ポルフィリンを有するミオグロビンでは、反応速度は、直線

的な依存を示した。このことは、前者ではアニオンドメイン内での電子移動反応が起こっていることを示唆している。速度解析の結果、DMBP<sup>2+</sup>存在下では、 $K_a = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $k_{et} = 2.0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ であり、MMBP<sup>2+</sup>存在下では  $K_a = 5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $k_{et} = 1.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ であったことから、電荷が+2であり還元電位の高い DMBP<sup>2+</sup>において電子移動効率が良いことが示された。ここで問題となるのは、電子移動後の電荷分離状態が逆電子移動により解消されてしまうことである。そこで、電子移動後に生成する亜鉛ポルフィリンカチオンラジカルの寿命を 680 nm の吸収変化より評価したところ、MMBP<sup>+</sup>存在下の方が2倍長い、すなわち、逆電子移動が抑制されていることが判明した。MMBP<sup>+</sup>が一電子還元された MMBP<sup>•</sup>も、対応する DMBP<sup>•+</sup>よりも還元電位は低いことから逆電子移動は有利なはずである。それにもかかわらず逆電子移動が抑制されたのは、電氣的に中性な MMBP<sup>•</sup>がアニオン性のドメインから容易に拡散できるのに対し、DMBP<sup>•+</sup>では+1の電荷のために、電子移動後もアニオンドメイン内に留まったため、逆電子移動が進行したものと考えられる。以上の知見を基に、二酸化炭素固定、水素発生システムの電子キャリアとして MMBP<sup>+</sup>の方が優れていることが示唆された。

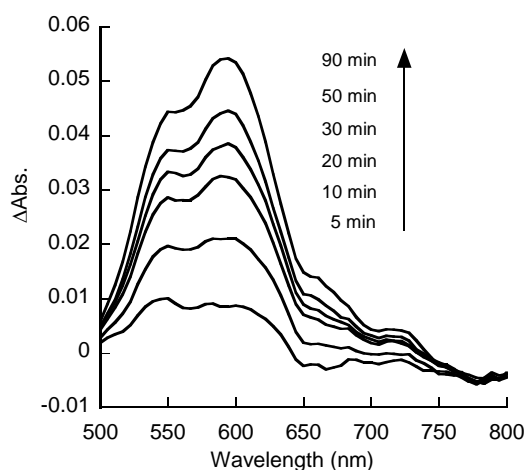


図2 MMBP<sup>+</sup>存在下での照射後の可視吸収差スペクトル(10 mM KPi, pH = 7.0, 25 °C, [myoglobin] = 10 mM, [MMBP<sup>+</sup>] = 1 mM)

## ②二酸化炭素還元反応

上記の結果より、MMBP<sup>+</sup>の電子キャリアとしての有用性を検証するために、Formate dehydrogenase (FDH)の逆反応を利用した二酸化炭素のギ酸への還元反応を検討した。

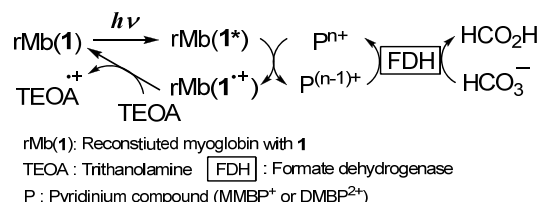


図3 本研究における二酸化炭素還元システム

アニオンドメイン亜鉛ポルフィリン含有再構成ミオグロビン(10 μM)の緩衝溶液(10 mM KPi, pH = 7)に、FDH 3 units および犠牲試薬としてトリエタノールアミン(20 mM)を加え、炭酸源として二酸化炭素の代わりに炭酸水素ナトリウム(1.0 mM)と MMBP<sup>+</sup> (1 mM)を共存させて、500 W のキセノンランプ照射を行い、イオンクロマトグラフィー法(Dionex AS-17)により、生成するギ酸をモニターした。光照射開始直後から、ギ酸の生成を示す保持時間 4.4 min のピークが増大し、光駆動型反応により、90分で約5回転の効率で水中の炭酸イオンが還元されていることが明らかとなった。

MMBP<sup>+</sup>の代わりに DMBP<sup>2+</sup>を共存させた場合、炭酸イオンの還元効率は、MMBP<sup>+</sup>共存下の約 40%であった。このことは、上述の電子移動反応の速度解析の結果と一致し、MMBP<sup>+</sup>が本反応系において、ミオグロビンと FDH の間の効率よい電子キャリアとして機能していることを示唆している。

## ③水素発生反応

次に、水素発生反応について検討した。アニオンドメイン亜鉛ポルフィリン含有再構成ミオグロビン(10 μM)の緩衝溶液(10 mM KPi, pH = 5~8)に、ポリビニルピロリドンでコーティングした白金コロイド(20 μM)とトリエタノールアミン(20mM)を共存させて、キセノンランプ照射下での水素発

生を TCD 検出器のガスクロマトグラフィーによって観測した。

MMBP<sup>+</sup> (1 mM)を共存させたときに、照射開始直後から 150 分後までほぼ直線的に水素発生が認められた。水素発生量は、緩衝溶液の pH に依存し、pH = 6.0 のときに最大となった。これは、酸性になると、アニオンドメインを構成するカルボキシレートがプロトン化され、電荷が中和されるために、カチオン性の MMBP<sup>+</sup>の結合が抑制されるためと考えられる。通常、水中での水素発生はプロトン濃度に依存するため、酸性になるほど有利であるが、本反応系の特徴が現れている。

一方、電荷キャリアとして DMBP<sup>2+</sup>を用いた場合、水素発生量は TCD 検出以下であった。このことは、上述の電子移動反応の速度解析の結果と一致する結果である。

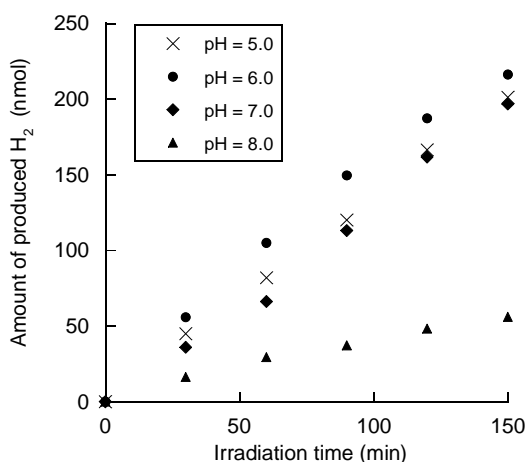


図4 MMBP<sup>+</sup>存在下での光照射後の水素発生 ((10 mM KPi, pH = 7.0, 25°C, [myoglobin] = 10 mM, [MMBP<sup>+</sup>] = 1 mM, TEOA = 20 mM)

## 6. 今後の課題と発展

本研究において、光応答する構成要素の構造と、電子キャリア分子の構造をうまく組み合わせることにより、ユニークな光駆動型二酸化炭素還元システムおよび水素発生システムが構築できた。本反応系は、この二酸化炭素削減に関わる2つの反応を、

亜鉛ポルフィリン含有ミオグロビンという共通の構成要素を用いて実現でき、逆電子移動を極力抑えた光駆動電子移動反応が可能である。一方、電子キャリアによって還元される実際の二酸化炭素還元および水素発生の反応点の構造については、なお一層の改善が望まれる。まず、二酸化炭素還元については、FDHが高価なため、これに代わるルテニウムピリジル錯体などの分子デザイン可能な金属触媒との組み合わせが有効であろう。また、水素発生については、ヒドロゲナーゼなどの比較的安価な酵素系との組み合わせにより、中性付近で活性な水素発生システムへと発展すると考えられる。

## 6. 研究成果

T. Matsuo, A. Asano, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Hayashi, "Photocatalytic Hydrogen Generation Using a Protein-Coated Photosensitizer with Anionic Patches and a Monocationic Electron Mediator", *Chem. Commun.* in press.

(謝辞)

本研究遂行にあたり、(財)日産科学振興財団の援助に厚く御礼申し上げます。