

氏名	たつみ 巽	ひろ 広	すけ 輔
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	農博第1175号		
学位授与の日付	平成13年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻		
学位論文題目	Kinetic Analysis of Hydrogenase Reaction of <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Cells by the Electrochemical Methods (電気化学法による硫酸還元菌ヒドロゲナーゼ反応の速度論解析)		
論文調査委員	(主査) 教授 池田篤治 教授 松野隆一 教授 井上國世		

### 論文内容の要旨

近年、水素がいわゆるクリーンエネルギーとして注目される中で、水素発生・消費反応を触媒するヒドロゲナーゼは、そのエネルギー変換系への応用が期待されている。しかし精製したヒドロゲナーゼは一般に不安定であるので、細胞をそのまま高活性なヒドロゲナーゼ触媒として用いることができれば都合がよい。

硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) は、そのペリプラズム空間に活性の高いヒドロゲナーゼを有している。本研究は、硫酸還元菌細胞のヒドロゲナーゼ触媒反応を、細胞外液に加えた電子供与体もしくは受容体を介して電気化学的に制御しようとしたものである。さらに本研究は、この細胞触媒反応を電気化学法により測定し、解析することにより、細胞触媒機能の定量的評価を行おうとしたものである。

その主な内容は以下に示すとおりである。

1. メチルピオローゲンを含む緩衝液を水素ガスで飽和させ、硫酸還元菌固定化電極を用いてサイクリックボルタンメトリーを行うと、両方向のスキャンで明瞭な触媒定常電流が観測された。この結果から、硫酸還元菌細胞のヒドロゲナーゼ反応がメチルピオローゲンの電極反応と迅速に共役し、ヒドロゲナーゼ反応が電気化学的に制御されていることが示された。pHが異なる溶液に対して硫酸還元菌固定化電極を用いたポテンシオメトリーを行うと、平衡電位はそれぞれのpHにおける水素の標準酸化還元電位に一致し、硫酸還元菌固定層においてヒドロゲナーゼが触媒する反応が平衡に達していることが確認された。測定されたボルタモグラムは、電極反応の可逆性と硫酸還元菌固定層におけるヒドロゲナーゼ反応の平衡を考慮することによって得られる電流-電圧曲線の式によってよく説明できることが示された。

また、水素の発生と消費の両方向に関し、細胞-メチルピオローゲン間の電子移動速度が電気化学法により測定され、解析が行われた。解析により得られた速度パラメータの値を用いてサイクリックボルタモグラムのデジタルシミュレーションを行うと、実測されたボルタモグラムが良く再現され、解析の妥当性が示された。

2. 四種のキノン化合物を電子受容体として、水素-硫酸還元菌細胞間、および硫酸還元菌細胞-キノン化合物間の電子移動速度が電気化学法により測定された。それぞれの場合についてミカエリス-メンテン型の速度式を用いて解析が行われ、細胞一個あたりのターンオーバー数  $k'_{cat}$ 、水素およびキノン化合物に対するミカエリス定数  $K'_{m,H}$  および  $K'_{m,Q}$ 、水素-細胞間および細胞-キノン間の電子移動反応の見かけの二分子反応速度定数  $k'_{cat}/K'_{m,Q}$  および  $k'/K'_{m,Q}$  が求められた。得られたパラメータの値から、これらの電子移動反応がきわめて速いことが示された。

そこで、この全速度過程に及ぼす基質の細胞外膜透過および細胞表面への輸送過程の影響が詳細に検討された。これらの物質移動過程を定量的に評価するため、単純なモデルをもとに考察が行われ、水素が低濃度の条件においては水素の細胞表面への拡散速度が全速度過程に影響することが明らかにされた。また、細胞外膜の物質透過速度は細胞表面への拡散速度に比べて大変大きく、測定結果に影響しないことも明らかにされた。

## 論文審査の結果の要旨

近年、水素がクリーンエネルギーとして注目される中で、温和な条件下で水の発生反応と消費反応を触媒するヒドロゲナーゼの利用が期待されている。本研究は、硫酸還元菌細胞がヒドロゲナーゼ活性を示すことに着目し、硫酸還元菌ヒドロゲナーゼ触媒反応の電気化学的制御、および硫酸還元菌細胞ヒドロゲナーゼ触媒反応の詳細な速度解析を目的として行ったものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 硫酸還元菌ペリプラズム空間内のヒドロゲナーゼ反応を、細胞外液に加えた電子供与体もしくは受容体を介して電極反応と共役させることにより、水素発生・消費反応を電気化学的に制御できることを示した。ヒドロゲナーゼ触媒反応が、電極に加える電圧に依存して、水素発生方向にも水素消費方向にも、常温中性条件下で迅速に進行する。このような電極系の構築は、生物燃料電池への展開に見通しを与えるものとして、また、電解水素生産の可能性を示すものとして意義深い。

生体触媒反応を電極反応と共役させる研究において、正逆両方向の反応を同一溶液で実現した例は少なく、細胞触媒については、本研究が初めての例である。本研究は、この反応の電流-電圧曲線の理論的説明にも成功しており、基礎研究としても高く評価できる。

2. 細胞懸濁液における細胞触媒反応の速度を電気化学法を用いて測定し、硫酸還元菌細胞のヒドロゲナーゼ触媒能を定量的に評価することに成功している。分光法では細胞による光の散乱のため細胞懸濁液での速度測定は容易ではないが、電気化学法では簡便に測定できることを示している。得られたパラメータの値は、この系を電解水素生産や燃料電池などへ応用する場合に有用である。

3. モデル計算によって、硫酸還元菌細胞が触媒する水素消費反応においては、基質の細胞外膜透過の影響が小さいことを明らかにしている。また、基質が低濃度の条件では、基質の細胞表面への拡散速度が全速度過程に影響することを明らかにしている。このモデル計算の結果は、グラム陰性菌細胞外膜の基質透過過程評価に一般的に適用できる有用な知見である。

以上のように本論文は、硫酸還元菌細胞の水素発生・消費反応の触媒としての機能と、その電気化学的解析法に関して重要な知見を加えたものであり、生物電気化学、微生物工学、酵素化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月8日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。