

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                      |    |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 博士（農学）                               | 氏名 | 西村 宏 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 海洋性超好熱菌由来の耐熱・耐酸素性ヒドロゲナーゼの生化学的研究と水素生産 |    |      |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                      |    |      |
| <p>温室効果ガスの蓄積による地球温暖化や化石燃料の枯渇によるエネルギー危機により、水素が石油代替エネルギー媒体として期待されている。しかしながら、水素を社会全体のエネルギー系として用いるに当たり、1)水素酸化―生産触媒金属が有限であること、2)水素の高効率な生産系が確立されていないこと、の2点が主な問題点としてあげられる。そこでヒドロゲナーゼが再生産可能な触媒として注目されているが、タンパク質であるために耐久性が乏しく、さらに酸素に対して高い感受性を示すことから応用が困難である。そこで本論文では、耐久性と耐酸素性を示すヒドロゲナーゼ資源として好気性の超好熱菌から耐熱・耐酸素性ヒドロゲナーゼを獲得し、本酵素を用いて光電気化学的水素生産系を構築し、その性能を評価した。本論文の内容は以下のように要約される。</p> |                                      |    |      |
| <p>1. 好気性の超好熱古細菌<i>Aeropyrum</i>属および好気性の多様な好熱性真正細菌より、耐熱・耐酸素性に優れたヒドロゲナーゼを有する株を活性染色法により選抜した。その結果、<i>A. camini</i>、<i>A. pernix</i> TB5株そして<i>Hydrogenimonas thermophila</i>が優れたヒドロゲナーゼを有する可能性を示した。</p>                                                                                                                                                                     |                                      |    |      |
| <p>精製した<i>A. camini</i>ヒドロゲナーゼの水素生産比活性は7.3 μmol H<sub>2</sub>/min/mg (85℃、pH 6.0) であった。4℃で大気暴露による酸素耐性を調べた結果、336時間後も50%の活性を維持した。フーリエ変換赤外分光(FTIR)法によって活性中心微細構造解析を行った結果、3個のシアニド基に対応するピークが検出され本酵素の高い酸素耐性の一因が明らかになった。</p>                                                                                                                                                     |                                      |    |      |
| <p><i>A. pernix</i> TB5株から精製したヒドロゲナーゼの水素生産比活性は0.97 μmol H<sub>2</sub>/min/mg (85℃、pH 6.0) で、同条件下で酸素耐性を調べたところ708時間後も50%の活性を維持した。本酵素はL, M, Sの3種類のサブユニットから構成され、各々のサブユニットをN末端アミノ酸配列解析並びにペプチドマスフィンガープリント解析に供したところ、本酵素は<i>A. pernix</i> K1株の[Mo]-carbon monoxide dehydrogenaseと高い相同性を示した。</p>                                                                                  |                                      |    |      |
| <p><i>H. thermophila</i>の精製したヒドロゲナーゼの水素生産比活性は900 μmol H<sub>2</sub>/min/mg (80℃、pH 6.0) であり、酸素暴露57時間後も50%の活性を残存した。FTIRによって活性中心微細構造解析を行ったところ3個のシアニド基に対応するピークを検出した。</p>                                                                                                                                                                                                    |                                      |    |      |
| <p>2. <i>A. camini</i>、<i>A. pernix</i> TB5および<i>H. thermophila</i>ヒドロゲナーゼを精製し、Glassy Carbon電極に水素電解の理論値である-430 mV (vs Ag/AgCl)を印加し、非</p>                                                                                                                                                                                                                                 |                                      |    |      |

固定化ヒドロゲナーゼによる水の電気分解を試みた。その結果、*A. camini*ヒドロゲナーゼは24時間後に水素生産速度は検出限界以下となり、最大活性は0.292  $\mu\text{mol H}_2/\text{min}/\text{mg}$ と生化学的に求めた値の2%程度にとどまった。一方*H. thermophila*ヒドロゲナーゼも同様に12時間後に水素生産速度が検出限界以下となったが、最大活性は201  $\mu\text{mol H}_2/\text{min}/\text{mg}$ と生化学的に求めた値の22%程度であった。いずれのヒドロゲナーゼにおいても反応開始直後に最大活性を示し、10時間以内に水素生産速度は急激に低下した。また、*A. pernix* TB5ヒドロゲナーゼの試験区では水素生産が観察されなかった。

次に酵素固定化による耐久性を検討した。上記の精製ヒドロゲナーゼを、交互積層法（LBL法）並びにシリカゾルゲルマトリクス法（SG法）にてGlassy Carbon上に固定化した。LBL法にはpoly diallyl dimethyl ammoniumをポリマーとして用いた。またSG法にはtetra ethoxysilaneを用いた。結果、*A. camini*ヒドロゲナーゼおよびLBL法を組み合わせた電解試験において196時間にわたって水素生産が観察され、その活性は1.42  $\mu\text{mol H}_2/\text{min}/\text{mg}$ と生化学法による最大活性の19%に達した。一方*A. camini*ヒドロゲナーゼとSG法の組み合わせでは酵素固定化を行わない結果とほぼ同様であった。*H. thermophila*ヒドロゲナーゼは両試験区で水素生産が見られなかった。

3. 光触媒は光照射によって励起し、酸化還元反応を行う物質であるが、有機物の分解を行う欠点も有する。既報の光触媒とヒドロゲナーゼを組み合わせた水素生産系は水素の生産は行われるが速やかに失活し耐久性を欠いていた。そこで、光触媒P-25と*A. camini*ヒドロゲナーゼを上述の酵素固定法と組み合わせて、ヒドロゲナーゼ光水素生産系を構築した。反応容器は石英ガラスを用い、反応はUVチャンバーにて $\lambda = 254 \text{ nm}$ の光を照射しておこなった。その結果、SG法においては42  $\text{nmol H}_2/\text{min}/\text{mg}$ 、LBL法においては29  $\text{nmol H}_2/\text{min}/\text{mg}$ の水素生産を示し、いずれも6時間にわたって水素生産を持続した。上記固定化ポリマーはいずれも光触媒P-25による光酸化をうけず、耐久性を有するヒドロゲナーゼ光水素生産系を構築できた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

人類は温室効果ガスの蓄積による地球温暖化や化石燃料の枯渇によるエネルギー危機といった問題に直面している。その中で、水素が次世代型エネルギーとして注目されているが、触媒金属の有限性や高効率水素生産系が確立されていないことなど、課題は多い。本論文では、水素エネルギー応用の問題について生物学的側面から取り組み、優れた特性を示す耐熱・耐酸素性ヒドロゲナーゼを獲得し、固定化による水素生産系の構築を行った。評価すべき主な点は以下のように要約される。

1. 既報のヒドロゲナーゼは嫌気性微生物由来のものが多く、そのすべてが高い酸素感受性を示している。また、好気性真正細菌 *Ralstonia eutropha* の本酵素は酸素耐性を示すが、耐熱性に乏しい。本研究では、これまで未報告の好気性の超好熱菌あるいは好熱菌よりヒドロゲナーゼを検索し、耐熱・耐酸素性を示す本酵素を精製した。好気性超好熱古細菌 *Aeropyrum camini* および *A. pernix* TB5 ヒドロゲナーゼにおいては、比活性は低いものの高い耐熱性と酸素耐性を同時に示した。一方、好熱性真正細菌の *Hydrogenimonas thermophila* ヒドロゲナーゼは極めて高い水素生産速度と同時に酸素耐性も示した。さらに、それぞれの酵素の分子生物学的および分光学的解析を行い、その酸素耐性機構について考察した。

2. 上記3種の耐熱・耐酸素性ヒドロゲナーゼについて電気化学的解析に供した。サイクリックボルタンメトリーの結果、*A. camini* および *H. thermophila* ヒドロゲナーゼについて電子の授受が確認され、本酵素を用いて炭素電極を用いた水素生産系を構築した。酵素を遊離させた水素生産系では10時間程度で活性を失ったが、*A. camini* ヒドロゲナーゼにおいて交互積層法で炭素電極に固定化を行った水素生産系はおよそ200時間にわたって水素生産を持続し、その比活性も顕著に向上した。

3. 酵素固定化に耐えうる耐久性を示した *A. camini* ヒドロゲナーゼにて光触媒  $\text{TiO}_2$  を用いた光水素生産系を構築した。光励起された  $\text{TiO}_2$  による酵素失活を防ぐため、石英基盤上に交互積層法およびシリカゾルゲルマトリクス法を用いて、ヒドロゲナーゼと光触媒を接触させずに固定化し、光照射にて水素生産を行ったところ、いずれの固定化法においても水素生産は6時間にわたって持続した。

以上のように、本論文はこれまで未開拓であった好気性超好熱菌から耐熱・耐酸素性を有するヒドロゲナーゼを見出してその特性を詳細に調査し、固定化して耐久性を示す水素生産システムの構築を行ったものであり海洋微生物学、生化学、生物工学に寄与するところが多い。

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22年 2月18日、論文並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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降