

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	分光電気化学を利用したヒドロゲナーゼの分子内電子移動反応の解析
Title(English)	
著者(和文)	西澤翔
Author(English)	Shaw Nishizawa
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9486号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:朝倉 則行,丹治 保典,三原 久和,蒲池 利章,廣田 順二
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9486号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨
THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生物プロセス	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	西澤 翔		指導教員 (主)： 朝倉 則行 Academic Advisor(main)
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)
Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

現在、酵素を利用した物質生産反応の実用化が期待されている。しかし、酵素の溶液反応では、拡散が反応の律速になり反応速度が低下する。また、拡散によるエネルギー損失が大きいことが問題となり、反応効率は実用レベルにまで達していないことが多い。これらを解決する手法として、固体表面上に分子レベルの反応系を構築することが期待されている。分子を固定化することにより、高密度な反応系を構築できると共に、拡散律速が解消され反応速度を高めることができる。さらに、電子移動の理論に基づいて酵素を並べた反応系を組み上げることで、断熱的な電子移動が進行し、エネルギー損失をなくすることができる。したがって、固体表面上に集積させるには、酵素の電子移動の仕組みを明らかにすることが求められている。

本研究では、光水素発生反応の触媒であるヒドロゲナーゼに注目し、電子移動について調べた。ヒドロゲナーゼの電子移動の速度とメカニズムを明らかにすることにより、固体表面上での高密度反応系の構築が可能となる。しかしながら、現状では分子内電子移動を明らかにするための有効な手法がない。

そこで、ヒドロゲナーゼの分子内電子移動を調べることを目的とし、新規測定法の開発を行なった。開発した測定法は、ヒドロゲナーゼの電子入口と電子出口にセンサーを結合し、電子の入力信号と出力信号を取り出した。センサーには酸化還元によって色が変わる分子を用いることにより、電子の流れを色の変化としてモニターできると考えた。

新しい電子移動測定法には、酸化インジウムスズ透明ガラス電極 (ITO電極) と電気化学測定と吸収スペクトルの同時測定を利用した。測定の検出感度と時間分解能を高めることにより、ITO電極上に単分子層で固定化した分子の電子移動をモニターできる測定システムの開発を行なった。酸化還元によって色が変わる分子には、マンガンポルフィリン (MnP) とコバルトポルフィリン (CoP) を用いた。ITO電極上にMnPとCoPを連結して固定化し、電極電位を変化させると同時に吸収スペクトル変化を測定した。その結果、 $Mn^{II/III}P$ と $Co^{I/II/III}P$ の Soret-band の吸収を利用して、それぞれの酸化還元を別々にモニターできた。これを利用し、単分子層で固定化したMnPとCoPの間の分子間の電子移動速度が測定できた。

新規測定法を用いてヒドロゲナーゼの分子内電子移動を調べるためには、ヒドロゲナーゼの配向を均一にして電極上に固定化することが重要となる。そこで、ヒドロゲナーゼの遠位[4Fe4S]クラスターを電極側、[NiFe]クラスターが溶液側になる配向の電極 (ヒドロゲナーゼ電極) の調製を行なった。これにより、電極から遠位[4Fe4S]クラスターに電子供与し、2 つの [FeS]クラスターを経由して[NiFe]クラスターに電子移動させることができた。さらに、電子移動の検出にはピリジル基を有するマンガンポルフィリン (MnTPyP) を用い、[NiFe]クラスターに結合させた。これにより、[NiFe]クラスターの Ni 原子に MnTPyP が結合し、[NiFe]クラスターから MnTPyP への電子移動を進行させることができた。また、MnTPyP の吸収スペクトル変化を電子の出力信号として観測できた。以上、均一な配向を有するヒドロゲナーゼ固定化電極を調製し、遠位[4Fe4S]クラスターから[NiFe]クラスターへ移動した電子のシグナルを取り出すことができた。

開発した手法を利用してヒドロゲナーゼの分子内電子移動速度の測定を行なった。酸化還元によって色が変わる分子にはビオローゲンとMnTPyPを用い、ITO電極上でヒドロゲナーゼの遠位[4Fe4S]クラスターと[NiFe]クラスターにそれぞれ結合させた。この電極の電位をステップさせ、ビオローゲンとMnPの吸収スペクトル変化を測定した。MnPの吸光度変化を解析した結果、遠位[4Fe4S]クラスターから[NiFe]クラスターへの分子内電子移動速度が 8 s^{-1} であることが明らかとなった。次に、[NiFe]クラスターから遠位[4Fe4S]クラスターへの分子内電子移動速度をとビオローゲンの吸光度変化から解析した。その結果、[NiFe]クラスターから遠位[4Fe4S]クラスターへの分子内電子移動速度は $1.0 \sim 1.5\text{ s}^{-1}$ であることが明らかとなった。以上のことから、本研究で開発した新規測定法により、ヒドロゲナーゼの分子内電子移動速度を明らかにすることができた。

本研究で開発したヒドロゲナーゼ固定化法を応用し、固体表面上に光水素発生反応系を構築した。ITO 電極上にポルフィリン、ビオローゲン、ヒドロゲナーゼを順番に連結して固定化した電極 (Hyase-V-P-ITO 電極) を調製した。Hyase-V-P-ITO 電極に定常光を照射すると、定常的な水素発生反応が進行した。このことから、光水素発生反応系を固体表面上に構築できたことがわかった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 生物プロセス 専攻
Department of
学生氏名： 西澤 翔
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 朝倉 則行
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：
Academic Advisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

A method based on spectroelectrochemistry to monitor intramolecular electron transfer in [NiFe] hydrogenase was developed. In the presence of indicators, electron transfer can generate spectral color changes that may be measured to determine the intramolecular electron transfer rate.

In chapter 2, we describe the electron transfer monitoring system, equipped with a potentiostat and a spectrometer, which was used to follow electron transfer processes by the spectral changes. In a test system, Mn-porphyrin and Co-porphyrin were immobilized on an indium-tin oxide (ITO) electrode, and the intermolecular electron transfer rate between them was measured from their spectral changes using the designed monitoring system. The successful measurement of the intermolecular electron transfer rate confirmed the utility of the experimental design.

In chapter 3, a method to prepare a hydrogenase-immobilized ITO electrode (Hyase-ITO electrode) was developed, which exploited electrostatic interactions between the hydrogenase and NH_3^+ groups that covered the ITO electrode surface. Cyclic voltammograms of the Hyase-ITO electrode displayed typical hydrogenase catalytic current. This indicated that the acidic amino acid carboxyl group near the distal [4Fe4S] cluster was connected to the ITO surface, and confirmed the occurrence of electron transfer between the ITO electrode and the distal [4Fe4S] cluster. Subsequently, Mn-tetrapyrrolylporphyrin (MnTPyP) was bound to the [NiFe] cluster, allowing effective monitoring of electron of [NiFe] cluster via the color change in MnTPyP.

In chapter 4, the intramolecular electron transfer rate of [NiFe] hydrogenase was measured using the developed system. Di-(3-aminopropyl)-4,4'-bipyridine was bound to the distal [4Fe4S] cluster via an amino group, and a pyridyl group of MnTPyP was bound to the [NiFe] cluster on the ITO electrode. When the electrode potential was stepped from 0.1 V to -0.8 V, the electron transfer rate from the distal [4Fe4S] cluster to the [NiFe] cluster via two iron-sulfur clusters was measured, affording a rate constant of 8 s^{-1} . When the electrode potential was stepped from -0.8 V to 0.1 V, the electron transfer rate from the [NiFe] cluster to the distal [4Fe4S] cluster via two iron-sulfur clusters was $1.0\text{--}1.5 \text{ s}^{-1}$. Therefore, the rate for intramolecular electron transfer between the distal [4Fe4S] cluster and [NiFe] cluster of hydrogenase was successfully measured by the developed system.

In chapter 5, a hydrogenase-based photoinduced hydrogen evolution system was constructed on an ITO electrode. Hydrogen was continuously evolved under steady-state visible light irradiation at a rate of $3.4 \times 10^{-13} \text{ mol s}^{-1}$. Thus, a photoinduced hydrogen evolution system was successfully constructed on an ITO electrode.

In conclusion, the intramolecular electron transfer of hydrogenase was successfully monitored using the developed analytical system.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).