

## 研究報告書

### 「藻類由来光合成器官の電極デバイス化とバイオ燃料変換系への展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 天尾 豊

#### 1. 研究のねらい

地球環境保全のためには環境低負荷型エネルギー循環システムの構築や有害物質を有効利用するエネルギー変換システムの開発が必須であり、特に二酸化炭素の削減技術を取り入れた低炭素社会の構築が急務である。低炭素社会を築き上げていくために必要なエネルギー源として、水、木材廃棄物等に含まれるセルロースやデンプンなどの多糖類バイオマス、太陽光エネルギー、メタノールなどの低炭素燃料の利用があげられる。特に様々な機能を付与した太陽光発電システムは今後ますます重要なアイテムになっていく。また、2009年国連地球変動サミットで「日本は2020年までに1990年比で25%の温室効果ガスを削減する」と明言し、二酸化炭素も大幅に削減する技術も同時に必要となっている。本提案では、多機能性バイオ太陽電池の基盤技術確立を目指し、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナの水中での効率的な酸素発生型光合成機能に着目し、スピルリナ由来の光合成膜を固定した電極を用い、水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらメタノールを同時に生産できる光電変換系を構築する。本提案で構築されるシステムは、スピルリナの酸素発生型光合成機能による太陽光エネルギーの利用、水を原料とし、二酸化炭素を削減しながら発電し、さらに同時に低炭素燃料であるメタノールの生産を可能とする、藻類の機能をデバイス化した全く斬新かつ革新的なバイオエネルギー創成多機能型太陽電池の構築を狙ったものである。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では以下の4つの研究項目に分類して最終目標達成のために要素技術を十分に検討した。

- ① 濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と光合成膜の分離精製
- ② 光合成膜固定酸化チタン電極の調製と光電変換能の評価
- ③ 電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価
- ④ 光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価

スピルリナプラテンシスの定常的な培養法を確立し、さらに電極上に固定するために必要な酸素発生能を保持した光合成膜の分離・精製に成功した。スピルリナから分離した光合成膜を酸化チタン薄膜電極上に固定化及び光電変換能、酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能について評価した。酸化電位印加状態において酸化チタン薄膜電極上の光合成膜に光照射するところで酸素が発生し、さらに白金電極とで形成される光電変換系が作動することを明らかにし、電極1cm<sup>2</sup>あたり20μA程度の光電流が得られた。電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に関して、特に重要な二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオ

ローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化を達成した。二酸化炭素飽和下においてビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がギ酸に変換されることを見出した。さらに光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極とを組み合わせた光電変換系を構築したところ、光照射によって光電流(電極 1cm<sup>2</sup>あたり 55 μA 程度)が観測された。さらに光照射による発電と同時に光合成膜固定電極側から酸素が、ギ酸脱水素酵素固定電極側では二酸化炭素が還元されギ酸が化学量論的に生成することを見出した。最後に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製に着手し、ビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がメタノールに変換されることも明らかにした。

## (2) 詳細

4つの研究項目について得られた成果の詳細を以下に示す。

### ① 濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と光合成膜の分離精製

スピルリナプラテンシスの培養は以下の方法を用いた。スピルリナプラテンシス(NIES-39株)は国立環境研究所微生物系統保存施設より購入した。スピルリナプラテンシスはSOT培地を用い、光強度3000ルクスで12時間光照射・未照射繰り返し、振盪培養した。スピルリナプラテンシス由来の光合成膜は以下の方法で分離した(図1)。

スピルリナプラテンシス1gを4°Cで3分間3000gで遠心分離した。続いて0.5mlの新しく調製した培地に懸濁し-20°Cで凍結した後、氷浴上で解凍し、pH6.8に調整した溶液(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2% アスコルビン酸ナトリウム、0.2% PVP、1mM アミノヘキサン酸、1mMアミノベンザミジン)に加えた。5分間28kHzで超音波破碎した後4°Cで3分間3000gで遠心、上澄み液を採取

#### \* 光合成膜の分離・精製

スピルリナ 1g

4°C 3000g  
3分遠心分離

沈殿物

- ① 凍結
- ② 氷浴上で解凍
- ③ 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2%アスコルビン酸ナトリウム, 0.2% PVP, 1mM アミノヘキサン酸, 1mM アミノベンザミジンを含む緩衝溶液pH=6.8に懸濁
- ④ 氷浴中で28kHz 5分間で超音波破碎
- ⑤ 4°C 3000g 3分遠心分離
- ⑥ 上澄み液を4°C 75000g 30分超遠心分離

J.Q. Zhao et. Al., *Photosynthetica* 42 (3) 365-370, 2004を参考

チラコイド膜

した。最後に上澄み液を4°Cで 図 1. スピルリナプラテンシス由来光合成膜の分離法  
30分間75000gで超遠心分離

し、沈殿物として光合成膜(チラコイド膜)を得た。またジクロロインドフェノール(DCPIP)存在下で光合成膜の懸濁液に可視光照射すると酸素が発生することを確認した。

### ② 光合成膜固定酸化チタン電極の調製と光電変換能の評価

酸化チタン粉末(PM2.5)3g に対して硝酸 4ml, メタノール 13ml, 及び少量の水を加え、ホットスターラーを用いて80°Cで8時間加熱した。加熱処理後、乾燥させ粉末状にした。得られた粉末状酸化チタンを水に再分散させ、少量のポリエチレングリコール(分子量約 20,000)を加え、ホットスターラーで30分間攪拌し、次いで超音波洗浄機で30分間分散させ酸化チタンペーストを調製した。導電性ガラス基板の導電面上に調製した酸化チタンペーストを適量滴下し、

ガラス面に薄く押し広げ薄膜を作製した。ホットスターラーで2時間乾燥させた後、電気炉で50°C30分間加熱し、その後500°Cで30分間加熱焼成することによって酸化チタン薄膜電極を調製した。上記①で得られた光合成膜をリン酸塩緩衝液(pH=7.0)に懸濁し、冷蔵庫内(4°C)で酸化チタン薄膜電極を浸漬し、電極表面に光合成膜を固定した。

光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極、リン酸塩緩衝液(pH=7.0)をベースとした電解質溶液を用い、図2に示すような光電変換系を構築した。電極面積は1cm<sup>2</sup>、光源には100mWcm<sup>-2</sup>のソーラーシミュレータを用いた。

最初に酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能について評価した結果、酸化電位印加状態において酸化チタン薄膜電極上の光合成膜に光照射することで酸素が発生することがわかった。

次に光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極として用いた光電変換系について、光照射・未照射を繰り返した光電流応答を調べた結果を図3に示す。光照射・未照射に対応して光電流が応答していることがわかった。光照射時の光電流は電極1cm<sup>2</sup>あたり20μAであった。電解質溶液中には酸化力あるいは還元力を持つ物質を添加していないことから図2に示すような水を電子媒体とした光電変換サイクルが達成できたと考えられる。

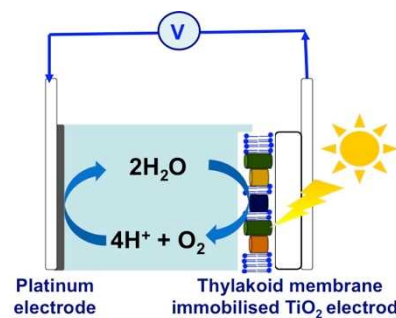


図3 光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極とした光電変換系

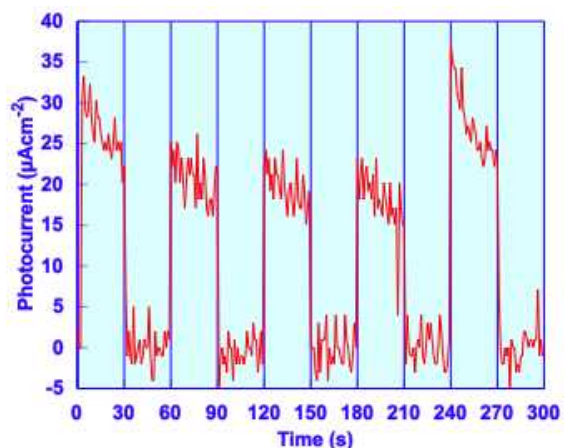
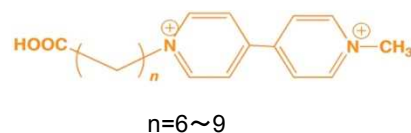


図2 光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極とした光電変換系の光電流応答の経時変化

### ③ 電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価

電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に関して、特に重要な二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化した。具体的には右図に示すような末端にカルボキシル基を有するビオローゲン誘導体を合成し、ギ酸脱水素酵素とともに導電性ガラス電極基板上に固定した。



最初にビオローゲン誘導体のみを固定した電極の電気化学的特性を評価した。作用極にビオローゲン固定電極、対極に白金ワイヤー電極、参照極に銀塩化銀電極を用いた。第一還元電位はビオローゲン部位とメチレン鎖長とに依存せずすべての分子において-550mVであった。

次にギ酸脱水素酵素とピオローゲン誘導体を固定した電極(FDH-ピオローゲン固定電極)の電気化学的特性を評価した。作用極に FDH-ピオローゲン固定電極, 対極に白金ワイヤ電極, 参照極に銀塩化銀電極を用いた。二酸化炭素を飽和したピロリン酸ナトリウム緩衝液中で両極間にピオローゲンの第一還元電位に相当する $-550\text{mV}$  を引加し, 生成したギ酸をイオンクロマトグラフで定量した。いずれのピオローゲン誘導体を用いた場合も電圧印加時間とともにギ酸生成量が増加した。またギ酸生成量はピオローゲン誘導体のピオローゲン部位とカルボキシル基との間のメチレン鎖長に依存しており, 長くなるほどギ酸生成量が増加した。電極表面上に固定されているピオローゲン誘導体及びギ酸脱水素酵素の量を一定にしていることから電極表面とギ酸脱水素酵素との距離がギ酸生成量に影響を与えていると考えられる。

④ 光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価

最後に光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極, ピロリン酸ナトリウム緩衝液をベースとした電解質溶液を用い, 図 4 に示すような光電変換系を構築

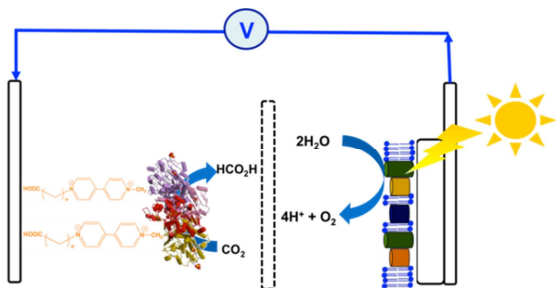


図 4 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系

した。電極面積は $1\text{cm}^2$ , 光源には $100\text{mWcm}^{-2}$ のソーラーシミュレータを用いた。光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極として用いた光電変換系について, 光照射・未照射を繰り返した光電流応答を調べた結果を図 5 に示す。光照射・未照射に対応して光電流が応答していることがわかった。光照射時の光電流は電極 $1\text{cm}^2$ あたり $55\mu\text{A}$ であった。電解質溶液中には酸化力あるいは還元力を持つ物質を添加していないことから図 4 に示すような水を電子媒体とした光電変換サイクルが達成できたと考えられる。

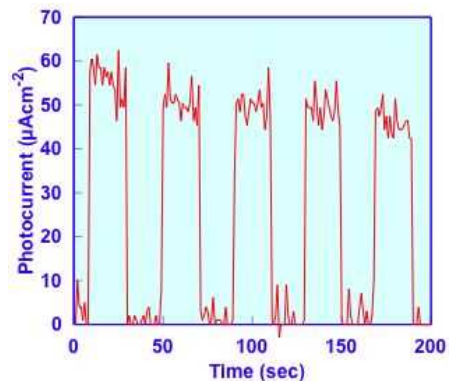
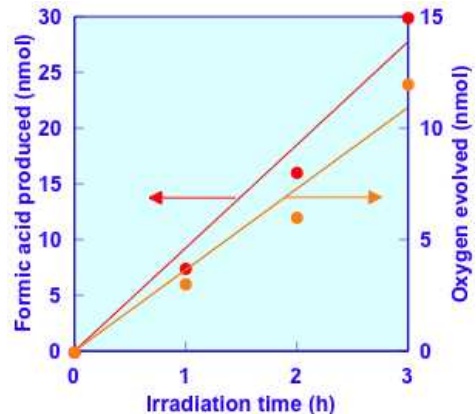


図 5 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系の光電流応答の経時変化

次に光照射による発電中の FDH-ピオローゲン固定電極側の生成物分析について検討した。光照射時間に対するギ酸生成量の経時変化を図 6 に示す。定常的に光照射すると光電流値は $55\mu\text{A}$  で一定であったが, 同時にギ酸脱水素酵素固定電極側では二酸化炭素が還元されギ酸(3時間の発電で $15\text{nmol}$ )が, 光合成膜固定電極側では $12\text{nmol}$ の酸素が発生し, ギ酸と酸素が化学量論比で生成することがわかった。



さらに, メチルピオローゲン-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製に着手

図 6 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系における酸素及びギ酸生成の経時変化

し、カーボンペーストにメチルビオローゲン-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素を混合固定し電極を作製した。この電極についてメチルビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がメタノールに変換されることもわかった。

### 3. 今後の展開

5年計画の研究開始3年度までは、システムの重要要素であるスピルリナの培養の効率化、スピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極の調製と機能評価、光電変換効率向上に関する研究を進めた。同時に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に主眼を置いた研究を進めた。当初計画では要素技術の確立を3年間の目標としていたが、上述の研究成果で述べたように光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価について光照射によって発電しながら二酸化炭素が有機分子に変換可能なシステムのプロトタイプ構築に成功した。また中間評価後2年間でメタノール生成機能を持つ電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極構築を達成できた。加えてスピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極についてもさらなる安定化・効率化を目指し、電極基板上への配向性を持たせた光合成膜固定化方法を検討、さらには可視光照射下における酸素発生活性能向上を達成できた。特に水と二酸化炭素を作動媒体としたギ酸やメタノール生成機能を持つ光電変換系の構築に成功し、ほぼ化学量論的な反応が進行することを明らかにした。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究は、多機能性バイオ太陽電池の基盤技術確立を目指し、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナの水中での効率的な酸素発生型光合成機能に着目し、スピルリナ由来の光合成膜を固定した電極を用い、水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらメタノールを同時に生産できる光電変換系を構築することを狙ったものである。当初の計画では、研究開始3年度までは、システムの重要要素であるスピルリナの培養の効率化、スピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極の調製と機能評価、光電変換効率向上に関する研究を進める。同時に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に主眼を置いた研究を進め、後半2年を目途に水と二酸化炭素を作動媒体としたメタノール生成機能を持つ光電変換系の構築に関する研究に着手し、最終年度には最終型のデバイス構築する予定とした。

上述の研究成果のとおりスピルリナ由来の光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価について光照射によって発電しながら二酸化炭素が有機分子に変換可能なシステムのプロトタイプ構築に成功し、加えて化学量論的に反応が進むことを明らかにしたことは大きな成果と言える。これらの成果は最終目標である水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながら二酸化炭素を還元できる光電変換系ができることを証明できたと評価できる。一方で、当初成果が不十分であった二酸化炭素をメタノールに変換する機能を持つ電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の構築も達成

でき、既に組み上がっているプロトタイプへの適用も達成できた。

## (2) 研究総括評価

### (研究総括)

本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。

提案された研究課題を達成するためには、生物機能材料の均一性、電極材料特性の理解と改良、変換効率測定系の確立及びその複合的連続反応を正確に計測する技術開発など、多岐にわたる分野の専門的知識を吸収し、要素技術を確立することで自己のアイデアを証明することが必要となる。

まず、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と電極上に固定するために必要な酸素発生能を保持した光合成膜の分離・精製を行い、光電変換能、酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能を評価し、白金電極とで組んだ光電変換系の作動と光電流発生を確認した。次いで、二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化し、ビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加し二酸化炭素がギ酸に変換されること確認した。そこで、開発した光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極とを組み合わせた光電変換系を構築し、光照射による光電流の発生と二酸化炭素からのギ酸生成に成功した。以上のように、光合成組織をデバイス化した電極を構築し、太陽光エネルギーによる発電中に二酸化炭素を削減し、ギ酸が同時に生産可能な多機能太陽電池システムのプロトタイプを確立できた。3年間の中間評価後、研究者が独自に開発している二酸化炭素をメタノールに変換する機能を持つ脱水素酵素と電子伝達分子に関する研究を精力的にすすめ、藻類由来光合成膜との融合により世界初の水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらバイオ燃料物質を化学量論的に直接合成できる多機能性バイオ太陽電池システムの構築が達成できた点は評価できる。さらにさきがけ期間中に国際誌への積極的な投稿・掲載、国際会議での数多くの招待講演、受賞なども評価できる。加えて研究者が所属する研究組織内の人工光合成研究センターのセンター所長に抜擢されたことは本さきがけでの大きな成果であると判断し、今後も本分野での飛躍が大きく期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yutaka Amao, Naho Shuto, "Formate dehydrogenase catalyzed CO<sub>2</sub> reduction in a chlorin-e<sub>6</sub> sensitized photochemical biofuel cell", Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2015, 19, 459-464.
2. Shusaku, Ikeyama, Yutaka Amao, "Discovery of Reduced Form of Methylviologen Activating Formate Dehydrogenase in the Catalytic Conversion of Carbon Dioxide to Formic Acid", Chemistry Letters, 2015, 44, 1182-1184
3. Yutaka Amao, Naho Shuto, "Formate dehydrogenase-viologen immobilized electrode for

CO<sub>2</sub> conversion toward the development of artificial photosynthesis system”, Research on Chemical Intermediates, 2014, 40, 3267–3276.

4. Yutaka Amao, Akemi Tadokoro, Naho Shuto, Miki Nakamura, Ayumi Kuroki, “Chloroplast from Spinach adsorbed nanocrystalline TiO<sub>2</sub> electrode for photovoltaic conversion device toward artificial photosynthesis system”, Research on Chemical Intermediates, 2014, 40, 3257–3265.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議での招待講演

1. “Development of Artificial Leaf Device for Solar Fuel Production” アメリカ化学会 243 回 National Meeting アメリカ合衆国サンディエゴ
2. “Solar Fuel Production Based on the Bio-hybrid Artificial Photosynthesis System” 2012 OCARINA Annual International Meeting--- Launch of the Artificial Photosynthesis Research Center ---
3. “Visible-light induced conversion of CO<sub>2</sub> to chemical with sensitizer-enzyme hybrid artificial photosynthesis system” International Conference on Artificial Photosynthesis 2014 Hyogo, Japan
4. “Artificial photosynthesis devices for hydrogen production and CO<sub>2</sub> reduction” Royal Institute of Technology (KTH) Seminar, Stockholm (Sweden)
5. “Artificial Photosynthesis: Photoelectrochemical Biofuel Cell with the Carbon Dioxide Conversion Function -Combination System of Thylakoid Membrane from Microalgae Spirulina Platensis and Biocatalyst Immobilized Electrodes-“2015 INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ADVANCED MATERIALS RESEARCH

受賞

1. Outstanding achievement and contribution to ISAMR2015 Invited Presentation 受賞

著作物

1. 天尾 豊 第 11 章 藻類由来光合成機能を利用したバイオ燃料変換系への展開 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望 p88–93 シーエムシー出版
2. 天尾 豊 光合成器官－触媒複合型人工光合成系を利用した光エネルギー変換技術触媒, 56, 4, 244–249, 2014