

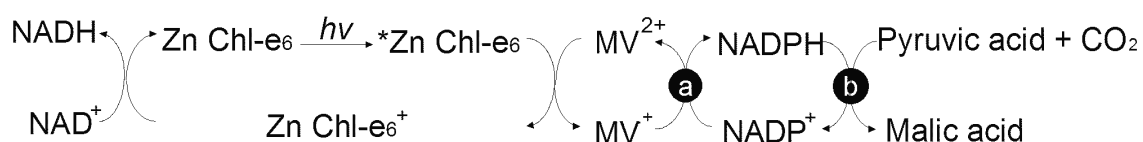
発表番号 15

海水中に含まれる炭酸塩を原料とした光化学的有機合成プロセスに関する研究

天尾 豊 (大分大学工学部)

地球温暖化防止京都会議において二酸化炭素削減に関する議定書が締結されており、二酸化炭素による地球温暖化現象は国際社会においても早急に解決すべき問題である。日本の二酸化炭素の総排出量は世界でも第4位であり、二酸化炭素の排出を抑制するだけでなく、大気中の二酸化炭素を大幅に削減あるいは利用する技術開発が必要である。二酸化炭素を海洋中に固定し、空気中の二酸化炭素量を削減する技術は有用な手法の一つとされている。海洋に固定化された二酸化炭素はプランクトンや藻類によって固定化され、長い年月の末最終的には石油として再利用される。また、短期間で海洋中に固定化された二酸化炭素を利用する技術開発も望まれている。二酸化炭素や炭酸水素イオンは各種脱水素酵素を利用することで水中において有機化合物に変換できる。

本研究では、Scheme 1 に示すようなクロロフィル誘導体である亜鉛クロリン Zn Chl- e_6 の光捕集機能とリンゴ酸酵素 (ME) の二酸化炭素固定可能を利用して、二酸化炭素が海水に溶解したのものと炭酸水素ナトリウムとピルビン酸とからリンゴ酸を水中で光化学的に合成可能な反応系を構築した。



Scheme 1 Photochemical malic acid synthesis from CO_2 and pyruvic acid with malic enzyme (b) via the photoreduction of NADP^+ with ferredoxine-NADP-reductase (FNR) (a) using light-harvesting function of Zn Chl- e_6 .

NADH (3.0 mM), Zn Chl- e_6 (50 μM), MV^{2+} (1.0 mM), NaHCO_3 (10 mM), NADP^+ (10 mM) およびピルビン酸 (10 mM), ME (4.5 units) および FNR (4.0 units) を含む pH8.0 の Bis-Tris 溶液に光照射すると、光照射時間とともにリンゴ酸が生成した。光照射 3 時間後のリンゴ酸生成量は 0.65 mM であり、 NaHCO_3 とピルビン酸からリンゴ酸への変換率は 6.5%であった。一方反応系内に FNR を添加しなかった場合は、 NADPH 生成と同様にリンゴ酸生成が見られなかった。さらに、反応系から MV^{2+} あるいは NADP^+ を除いてもリンゴ酸生成が見られなかった。このことから Scheme 1 に示すリンゴ酸生成反応が進行していることが示唆された。以上のことから、クロロフィル誘導体 Zn Chl- e_6 の光捕集機能と ME の機能によって、二酸化炭素とピルビン酸からリンゴ酸を水中で合成することができた。

1

助成番号 0401

海水中に含まれる炭酸塩を原料とした光化学的有機合成プロセスに関する研究

天尾 豊 (大分大学工学部)

1. 研究目的

地球温暖化防止京都会議において二酸化炭素削減に関する議定書が締結されており、二酸化炭素による地球温暖化現象は国際社会においても早急に解決すべき問題である。日本の二酸化炭素の総排出量は世界でも第4位であり、二酸化炭素の排出を抑制するだけでなく、大気中の二酸化炭素を大幅に削減あるいは利用する技術開発が必要である。これまでに無機半導体を利用して光触媒的に気相の二酸化炭素を還元し削減する研究がなされている^[1,2]。無機半導体を利用する場合には、利用できる光源の波長が紫外線に限られる。つまり無機半導体を利用する場合、太陽光の強度分布の広い可視から赤外領域の光を利用することができず、太陽光エネルギーを十分に有効利用できないという欠点がある。

一方、二酸化炭素を海洋中に固定し、空気中の二酸化炭素量を削減する技術は有用な手法の一つとされている。海洋に固定化された二酸化炭素はプランクトンや藻類によって固定化され、長い年月の末最終的には石油として再利用される。また、短期間で海洋中に固定化された二酸化炭素を利用する技術開発も望まれている。二酸化炭素や炭酸水素イオンは各種脱水素酵素を利用することで水中において有機化合物に変換できる。特に光増感反応

と二酸化炭素固定可能を有する各種脱水素酵素とを組み合わせることで、Fig. 1 に示すように光エネルギーを駆動力として水中で二酸化炭素からメタノールなどの有機化合物を合成することができることになる。

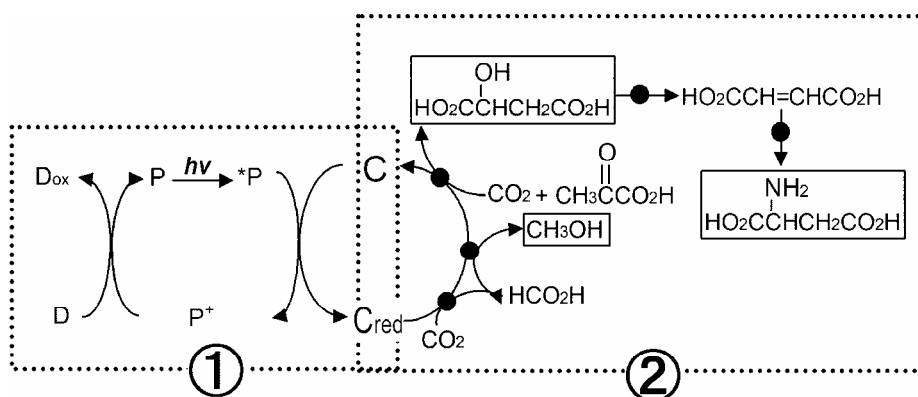


Fig. 1. Photochemical and enzymatic synthesis of organic compounds from carbon dioxide. 1:Photoredox reaction, 2: Carbon dioxide fixation with enzymes.

ルテニウム(II)ポリピリジル錯体の光増感作用とギ酸脱水素酵素とを組み合わせ、光化学的に二酸化炭素からギ酸を合成した反応系が提案されて以来さまざまな光化学的二酸化炭素固定化反応系が構築されている^[3]。われわれはルテニウム(II)ポリピリジル錯体よりも光増感活性が高いとされている水溶性亜鉛ポルフィリンとギ酸脱水素酵素とを組み合わせ、光化学的に二酸化炭素からのギ酸合成に成功している^[4-6]。さらに、二酸化炭素を固定化する酵素として、ピルビン酸と二酸化炭素からリンゴ酸を生成するリンゴ酸酵素 (ME)がある。リンゴ酸は、生体内ではクレブス回路として知られている炭水化物代謝作用において重要な役割を担っているばかりでなく、人体に無害であることから、医薬品や食品分野での需要が望まれている有用な物質である。つまり、水溶性亜鉛ポルフィリンのような光増感剤と ME とを組み合わせることによって二酸化炭素を固定化して有用物質であるリンゴ酸を合成できることになる。

しかしながらルテニウム(II)ポリピリジル錯体や亜鉛ポルフィリンは 600 nm 以降の比較的太陽光の分布強度の強い可視光領域に強い吸収帯を有していないため十分な可視光増感が得られない。一方緑色植物や光合成細菌に含まれるクロロフィルやバクテリオクロロフィルは吸収極大が 650 から 800 nm であるので、ルテニウム(II)ポリピリジル錯体や亜鉛ポルフィリンの欠点を補うことができる有用な光増感剤になると期待できる。クロロフィルやバクテリオクロロフィルは脂溶性であるが、分子中に存在するエステルを加水分解することによって水溶性のクロロフィル誘導体クロリン (Chl-e₆) を導出することができる。また Chl-e₆ の亜鉛錯体 (Zn Chl-e₆ 構造を Fig. 2 に示す) はクロロフィルとほぼ同様の位置に吸収帯を有しているので可視光増感活性が高いと期待される。

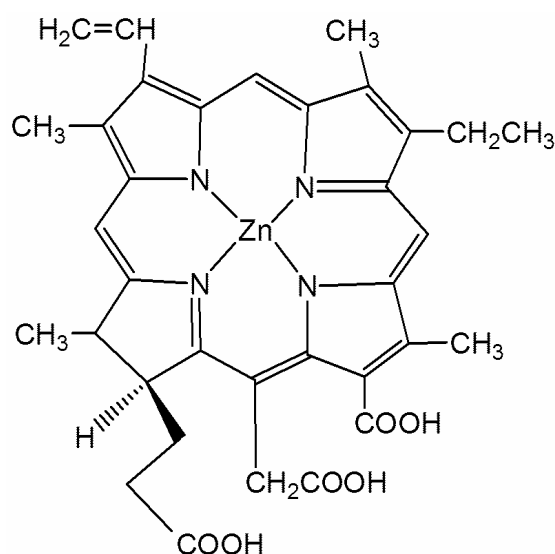
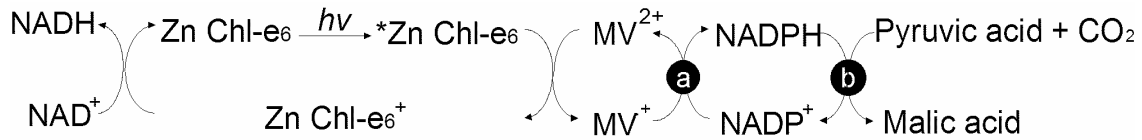


Fig. 2. Chemical structure of zinc chlorin-e₆ (ZnChl-e₆)

本研究では, Scheme 1 に示すような Zn Chl- e_6 の光捕集機能とリンゴ酸酵素 (ME) の二酸化炭素固定可能を利用して, 二酸化炭素が海水に溶解したものと炭酸水素ナトリウムとピルビン酸とからリンゴ酸を水中で光化学的に合成可能な反応系を構築した.



Scheme 1 Photochemical malic acid synthesis from CO_2 and pyruvic acid with malic enzyme (b) via the photoreduction of $NADP^+$ with ferredoxine-NADP-reductase (FNR) (a) using light-harvesting function of Zn Chl- e_6 .

2. 研究方法

2.1 試薬

リンゴ酸酵素 (ME) およびフェレドキシン - NADP レダクターゼ (FNR) はシグマから購入したものをそのまま用いた. メチルビオローゲン二塩化物 (MV^{2+}) は東京化成から購入した. Chl- e_6 は和光純薬から購入した. $NADP^+$ および NADH はオリエンタル酵母から購入した. その他の試薬は特級あるいは一級品を用いた. ME の酵素活性量 1.0 unit は $NADP^+$ 存在下において反応時間 1 分間でリンゴ酸から 1.0 μmol の二酸化炭素とピルビン酸を生成する量と定義した.

2.2 Zn Chl- e_6 の合成

Zn Chl- e_6 はメタノール溶液中でメタルフリーの Chl- e_6 と 10 倍当量の酢酸亜鉛を加熱かくはんすることによって合成した. Zn Chl- e_6 の合成は Shimadzu Multispec 1500 spectrophotometer を用い, 紫外・可視吸収スペクトルにより確認した (Fig. 3). Zn Chl- e_6 が合成されるにつれ 418 および 638 nm の吸収帯が増加し, メタルフリーの Chl- e_6 に基づく 400, 514 および 660 nm の吸収帯が減少した. 反応終了後室温まで冷却した後, メタノールを減圧留去した. その後, 水を加えることによって過剰の酢酸亜鉛を除去し, 沈殿物として Zn Chl- e_6 を得た. 最後に水 - メタノール (5:1) の混合溶媒から再結晶し, Zn Chl- e_6 を精製した.

2.3 $NADP^+$ の光還元反応

リンゴ酸合成反応の重要なステップである $NADP^+$ の光還元反応は以下のようにして行なった. $NADH$ (3.0 mM), Zn Chl- e_6 (50 μM), MV^{2+} (1.0 mM), および FNR (4.0 units) を含む pH 8.0 の Bis-Tris 溶液 (10 mM) を調製し, 溶存酸素を除去するため凍結脱気した後, 5 分間気相をアルゴン置換した. $NADP^+$ (10 mM) 10 μl を反応溶液に添加し, 30°C 恒温水槽内で

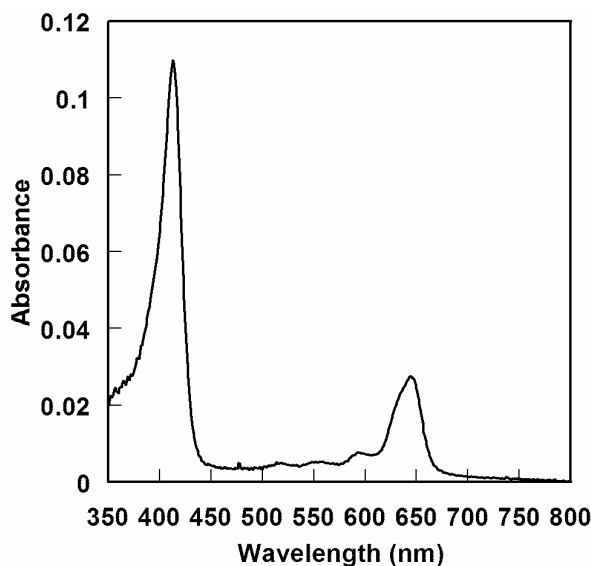


Fig. 3. UV-vis absorption spectrum of ZnChl-e₆ in methanol solution.

200 W タングステンランプを用いて光照射することによって反応開始した。また光源に含まれる 390 nm 以下の光はカットフィルターによって除去した。1 時間ごとに反応溶液を 10 μ l 採取し、高速液体クロマトグラフィー(Shimadzu CDD-10A_{VP})により生成した NADPH を定量した。液体クロマトグラフィーの測定条件は以下の通りである(カラム: Shim-pack SDR-H (スルホン化ポリスチレンゲル; 粒径 8 μ m), 検出器: 電気伝導度検出器, 移動相溶液: *p*-トルエンスルホン酸 (12 mM) および EDTA (78 μ M) を含む 48 mM Bis-Tris 溶液, カラム温度: 40°C)

2.4 可視光を利用したリンゴ酸合成反応

可視光を利用したリンゴ酸合成反応は以下のようにして行なった。NADH (3.0 mM), Zn Chl-e₆ (50 μ M), MV^{2+} (1.0 mM), $NaHCO_3$ (10 mM), $NADP^+$ (10 mM) およびピルビン酸 (10 mM) を含む pH 8.0 の Bis-Tris 溶液 (10 mM) を調製し、溶存酸素を除去するため凍結脱気した後、5 分間気相をアルゴン置換した。FNR (4.0 units) および ME (4.5 units) を含む溶液 10 μ l を反応溶液に添加し、30°C 恒温水槽内で 200 W タングステンランプを用いて光照射することによって反応開始した。1 時間ごとに反応溶液を 10 μ l 採取し、高速液体クロマトグラフィーにより生成したリンゴ酸を定量した。高速液体クロマトグラフィーの測定条件は以下の通りである(カラム: Shim-pack SDR-H (スルホン化ポリスチレンゲル; 粒径 8 μ m), 検出器: 電気伝導度検出器, 移動相溶液: *p*-トルエンスルホン酸 (12 mM) および EDTA (78 μ M) を含む 48 mM Bis-Tris 溶液, カラム温度: 40°C)

3. 研究結果と考察

3.1 NADPH 生成反応

NADPH 生成過程は, Scheme 1 に示すリンゴ酸合成反応において重要な過程である. Fig. 4 に NADH (3.0 mM), Zn Chl- e_6 (50 μ M), MV^{2+} (1.0 mM), $NADP^+$ (10 mM) および FNR (4.0 units) を含む pH 8.0 の Bis-Tris 溶液に光照射したときの NADPH 生成の経時変化を示す. 光照射時間とともに NADPH が生成した. 光照射 3 時間後の NADPH 生成量は 0.83 mM であり, $NADP^+$ から NADPH への還元率は 83.0% であった. また反応系内に FNR を添加しなかった場合は, NADPH 生成が見られなかった (Fig. 4). さらに MV^{2+} を除いた場合にも, NADPH 生成は見られなかった. 以上のことから Scheme 1 に示す MV^{2+} の光還元反応と $NADP^+$ の還元反応が FNR を介して進行していることが示唆された.

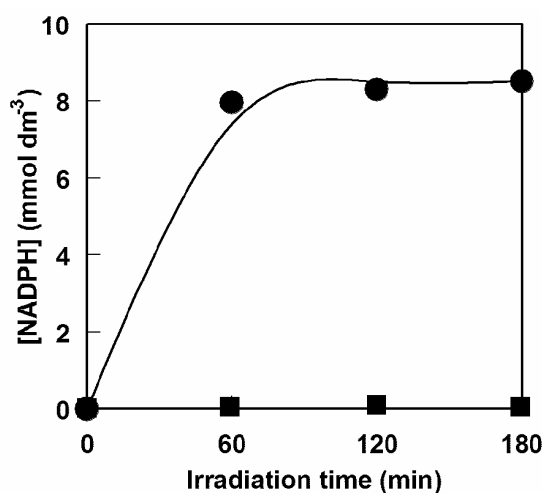


Fig. 4. Time dependence of NADPH production with the system consisting of NADH, Zn Chl- e_6 , MV^{2+} , FNR and $NADP^+$ under steady state irradiation. □: without FNR.

3.2 光化学的リンゴ酸合成反応

NADPH の光還元反応系が構築できたので, この系にピルビン酸, $NaHCO_3$ および ME を添加して, 光化学的リンゴ酸合成反応を試みた. Fig. 5 に NADH (3.0 mM), Zn Chl- e_6 (50 μ M), MV^{2+} (1.0 mM), $NaHCO_3$ (10 mM), $NADP^+$ (10 mM) およびピルビン酸 (10 mM), ME (4.5 units) および FNR (4.0 units) を含む pH 8.0 の Bis-Tris 溶液に光照射したときのリンゴ酸生成の経時変化を示す. 光照射時間とともにリンゴ酸が生成した. 光照射 3 時間後のリンゴ酸生成量は 0.65 mM であり, $NaHCO_3$ とピルビン酸からリンゴ酸への変換率は 6.5% であった. 一方反応系内に FNR を添加しなかった場合は, NADPH 生成と同様にリンゴ酸生成が見られなかった (Fig. 5). さらに, 反応系から MV^{2+} あるいは $NADP^+$ を除いてもリンゴ酸生成が見られなかった. このことから Scheme 1 に示すリンゴ酸生成反応が進行していることが示唆された.

以上のことから, クロロフィル誘導体 Zn Chl- e_6 の光捕集機能と ME の機能によって, 二酸化炭素とピルビン酸からリンゴ酸を水中で合成することができた.

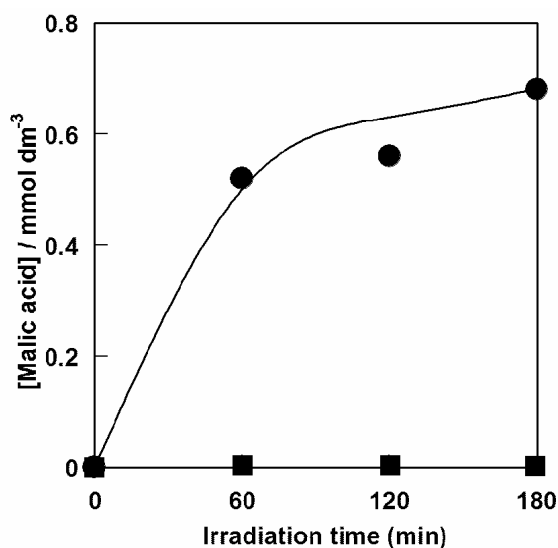


Fig. 5. Time dependence of malic acid production with the system consisting of NADH, Zn Chl-e₆, MV²⁺, FNR, NADP⁺, ME, pyruvic acid and NaHCO₃ under steady state irradiation. \blacksquare : without FNR.

3.3 光化学的リンゴ酸合成の収率向上

次にリンゴ酸合成の収率向上を目指し, 反応要素を検討した. 具体的には系内の NADP⁺ の濃度を変化させた. 最初に系内の NADP⁺ 濃度を 0.01 ~ 10 mM まで変化させたときのリンゴ酸生成反応について述べる. 実験方法は前節 3.2 と同様である. Fig. 6 に NADH(3.0 mM), Zn Chl-e₆ (50 μM), MV²⁺ (1.0 mM), NaHCO₃ (10 mM), NADP⁺ およびピルビン酸 (10 mM), ME (4.5 units) および FNR (4.0 units) を含む pH8.0 の Bis-Tris 溶液に光照射したときのリンゴ酸生成の経時変化を示す.

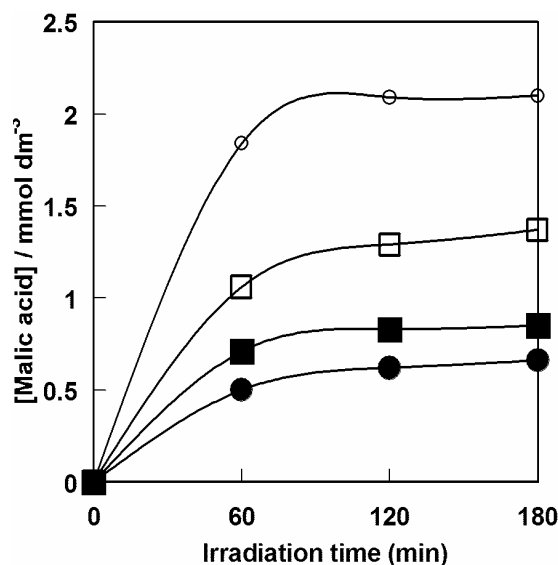


Fig. 6. Time dependence of malic acid production with the system consisting of NADH, Zn Chl-e₆, MV²⁺, FNR, NADP⁺, ME, pyruvic acid and NaHCO₃ under steady state irradiation. [NADP⁺]: 0.01, 0.1, 1.0 and 10 mM.

いずれの場合も光照射時間とともにリンゴ酸が生成した。Fig. 6 に示すとおり， NADP^+ 濃度を少なくするほどリンゴ酸が多く合成できることが分かった。 NADP^+ 濃度が 0.01 mM のときには光照射 3 時間後に約 2.0 mM のリンゴ酸が合成でき，ピルビン酸からリンゴ酸への変換率は 20 % を超えるものであった。これは，Scheme 1 に示した反応系において， NADP^+ 濃度を少なくすることによって $\text{NADPH} - \text{NADP}^+$ 間のターンオーバーが効率よく進行し，結果としてリンゴ酸が効率よく合成できたものと考えられる。逆に NADP^+ が過剰に含まれていると，生成したリンゴ酸が ME と未反応の NADP^+ と反応し，二酸化炭素とピルビン酸へ戻るいわゆる逆反応が進行してしまうためと考えられる。以上の結果をまとめると Table 1 のようになる。

Table 1. The amount of malic acid production and the ratio of [Malic acid] / [Pyruvic acid] under various NADP^+ concentrations after 3 h irradiation.

[NADP^+] (mM)	[Malic acid] (mM)	[Malic acid] / [Pyruvic acid] (%)
0.01	2.10	21.0
0.1	1.37	13.7
1.0	0.85	8.50
10	0.65	6.50

以上のように本研究では，Scheme 1 に示すような Zn Chl- e_6 の光捕集機能と ME の二酸化炭素固定可能を利用して，二酸化炭素が海水に溶解したのものとして用いた炭酸水素ナトリウムとピルビン酸とからリンゴ酸を水中で光化学的に合成可能な反応系の構築に成功した。さらに，反応条件の最適化を行なった結果，光照射 3 時間後に約 2.0 mM のリンゴ酸が合成でき，ピルビン酸からリンゴ酸への変換率は 20% まで向上させることができた。

4. 今後の課題

本研究では，光エネルギーと酵素を利用し，海水中に固定化される二酸化炭素を原料とした有用物質生成反応系の構築を目的として，クロロフィル誘導体 Zn Chl- e_6 の光捕集機能と ME の二酸化炭素固定可能を用いた光化学的リンゴ酸合成反応について研究を行なった。

この系をさらに発展させるために，リンゴ酸生成の原料となるピルビン酸を乳酸脱水素酵素 (LDH) と，乳酸を用いて生成させる反応系を構築し，この系をリンゴ酸生成反応に組み込むことで，定常的に二酸化炭素を原料としたリンゴ酸合成が進むようなシステムの開発につなげたいと考えている。さらに Fig. 1 に示すように生成したリンゴ酸をさらにアミノ酸へ変換していくことで，海水中に固定化される二酸化炭素を原料とした有用物質生成反応ネットワークが構築できるものと確信している。さらに今回は二酸化炭素が溶液に溶けているものと仮定し， NaHCO_3 を用いたが，今後は海水と同様の成分を持つ溶液を用い，

この溶液に気相の炭酸ガスを吸収させ、リンゴ酸生成反応や有用物質生成反応ネットワークに利用していきたいと考えている。

文献等

参考文献

1. T. Inoue, A. Fujishima, S. Konishi, and K. Honda, *Nature*, **277**, 637(1979).
2. B. Aurian-Blajeni, M. Halmann, and J. Manassen, *Solar Energy*, **25**, 165(1980).
3. D. Mandler and I. Witlner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1988, 997.
4. R. Miyatani and Y. Amao, *Biotechnol. Lett.* **24**, 1931(2002).
5. R. Miyatani and Y. Amao, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **27**, 121(2004).
6. R. Miyatani and Y. Amao, *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **47**, 27(2004).
7. H. Scheer, "Chlorophylls", CRC Press, London (1991).

当該研究成果の発表論文

1. Mitsue Ishikawa, Yumi Takeuchi and Yutaka Amao "Photochemical Synthesis of Malic Acid from Pyruvic acid and CO₂ with the Combination System of Chlorophyll Derivative and Malic Enzyme" *Porphyrins*, 13(1), 2004, 19-23.
2. Yutaka Amao and Tomoe Watanabe "Photochemical and Enzymatic Synthesis of Methanol from HCO₃⁻ with Dehydrogenases and Zinc Porphyrin" *Chemistry Letters*, 33(12), 2004, 1544-1545
3. 石川満枝, 天尾 豊 "クロロフィル誘導体と二酸化炭素固定化能を有する酵素を利用した光化学的リンゴ酸合成" 高分子論文集 62(4), 2005, 190-192.

Development of Photochemical Organic Synthesis Using Carbonate in Sea Water

Yutaka Amao

Department of Applied Chemistry, Oita University

Summary

Carbon dioxide fixation is a potential technology for the realization of photocatalytic CO₂ reduction. Many studies on CO₂ fixation have investigated photocatalysis on semiconductors such as titanium dioxide, silicone carbide and strontium titanate. However, these systems used ultraviolet irradiation, whereas a CO₂ fixation system using visible light is more desirable. In contrast, biological CO₂ fixation systems have also received much attention. For example, CO₂ or HCO₃⁻ can be reduced to formic acid with formate dehydrogenase (FDH) and NADH. Therefore, a CO₂ fixation system that combines the photoreduction of NAD⁺ with photosensitizer and ferredoxin-NADP⁺ reductase, and HCO₃⁻ reduction with FDH can be established.

In this work, photochemical synthesis of malic acid was investigated from pyruvic acid and HCO₃⁻ (in sea water) with malic enzyme (ME) and NADP⁺ photoreduction by the visible light photosensitization of zinc chlorin-e₆ (Zn Chl-e₆) in the presence of NADH as an electron-donating reagent. Irradiation of a solution containing NADH, Zn Chl-e₆, methylviologen (MV²⁺), pyruvic acid, NaHCO₃, NADP⁺, ferredoxine-NADP-reductase (FNR) and ME with visible light resulted in malic acid synthesis. The produced malic acid was 0.65 mmol dm⁻³ after 3 h irradiation. Moreover, produced the malic acid was up to 2.10 mmol dm⁻³ after 3 h irradiation under 0.01 m mmol dm⁻³ NADP⁺ condition, and the conversion ratio of pyruvic acid to malic acid was about 20.0 %.