論文特集「エネルギー変換の化学と技術」

(日本化学会誌, 1988, (8), p. 1163~1168)

© 1988 The Chemical Society of Japan

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の
クロマトホアによる光アノード反応

(1988年2月29日受理)

撰 遠夫*・加藤康明・山下芳温・松本清治
西村(平田)久美子・和田正徳

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* から調製したクロマトホアを用いて、酸化スズ電極上での光電気化学的挙動を調べた。その結果、クロマトホア懸濁液に 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (m-PMS) と レアスコルビン酸を添加したとき、この系は光アノードとして機能することがわかった。このときに流れる光アノード電流の発生機構について、光電流作用スペクトルの測定、光電流の電極電位依存性、固定化クロマトホアを使用する光電流測定などの諸実験に基づき考察を加え、光アノード電流はクロマトホア中で光励起したバクテリオクロロフィルからの電子が酸化スズ電極に移行することにより生じると予想した。

1 緒 言

化石燃料に代わる新しいエネルギー源を開発する試みの一つとして、葉緑体¹⁾や紫膜²⁾、光合成反応中心³⁾、クロロフィル⁴⁾などの生物成分を用いる光生物学的水素生産システムに関する電気化学的研究が広く行なわれるようになってきている。このような研究は太陽エネルギーの有効利用を図ることを可能とするばかりでなく、光合成の初期過程の研究に新しい手段を提供するものとして注目をあびるようになった。しかしながら、これらの生体成分は単離されると非常に不安定であり、極端な場合、単離の過程と電子伝達活性の低下とは競争的で、光エネルギーの変換能力が数時間と保持できないものも多い。一方、光合成細菌の光合成器官であるクロマトホアは葉緑体と比較して、その構造も簡単であり、電子移動機構の解析も比較的容易であると判断される。また、電子伝達活性も長期間保持されることが知られている。そこで、著者らは、光合成細菌のクロマトホアを使用して、光エネルギーを電気エネルギーへ変換することを目指して、クロマトホアの光電気化学的挙動を定電位分極下の白金電極で検討し⁵⁾⁶⁾、クロマトホア-白金系の光カソードとしての機能を解析したけれども、光水

素生産の基礎となる光アノードとしての能力は見いだされなかった。

そこで、本研究では、葉緑体を光電変換素子したとき⁷⁾に使用された酸化スズ透明電極を使用して、クロマトホアが光アノード素子として機能するかどうかについて検討を加えた。

2 実 験

光照射下に3日間 30°C で培養した光合成細菌 *Rs. rubrum* のカロチノイド欠損株 G-9 から常法⁷⁾により、超音波処理、遠心分離を行なってクロマトホアを調製した。調製したクロマトホアは、通常は 0.1 M (M=mol/dm³) Tris 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁して暗所、4°C で保存した。光アノード特性の pH による影響を調べるときは、Tris 緩衝液のかわりに任意の pH の 0.12 M GTA 緩衝液⁸⁾を使用した。このようにして調製されたクロマトホア懸濁液の濃度はクロマトホアに結合しているバクテリオクロロフィルの最大吸収波長 873 nm での吸光度 (A_{873})⁹⁾ によって表わし、特記しないかぎり、測定には $A_{873}=75$ とした懸濁液を使用した。

鳥取大学工学部工業化学科, 680 鳥取市湖山町南

- 1) 生物のもつ光合成能力を利用する研究は多数報告されている。たとえば、H. Ochiai, H. Shibata, Y. Sawa, T. Katoh, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 149(1982)。
- 2) たとえば、L. A. Drachev, V. N. Frolov, A. D. Kaulen, E. A. Liberman, S. A. Ostroumov, V. G. Plakunova, A. Yu. Semenov, V. P. Skulachev, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059(1976)。
- 3) たとえば、M. Seibert, A. F. Janzen, M. Kendall-Tobias, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 193(1982)。
- 4) たとえば、T. Miyasaka, T. Watanabe, A. Fujishima, K. Honda, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6657(1978)。

- 5) T. Erabi, H. Hiura, M. Hayashi, M. Yamada, T. Endo, J. Yamashita, M. Tanaka, T. Horio, *Chem. Lett.*, **1978**, 341。
- 6) T. Erabi, K. Matsumoto, H. Itoh, N. Takahashi, K. Nishimura, M. Wada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3805(1987)。
- 7) N. Nishi, M. Kataoka, G. Soe, T. Kakuno, T. Ueki, J. Yamashita, T. Horio, *J. Biochem.*, **86**, 1211(1979)。
- 8) 3,3-Dimethylglutaric acid, tris(hydroxymethyl)amino-methane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol の等モル混合緩衝液。
- 9) $A_{873}=1$ はクロマトホアに結合しているバクテリオクロロフィルの 7.1 $\mu\text{mol/dm}^3$ に相当する¹⁰⁾。
- 10) T. Kakuno, R. G. Bartsch, K. Nishikawa, T. Horio, *J. Biochem.*, **70**, 79(1971)。

懸濁液には溶存酸素除去のため glucose oxidase (Sigma, 10 units/ml), glucose (2 mM), catalase (Sigma, 13 units/ml) を添加した。

クロマトホア懸濁液を酸化スズ電極 (松崎真空製, 表面積 $2 \times 3 \text{ cm}^2$) を動作極とする電解槽に入れ, 対極に白金線, 参照極に飽和カロメル電極を使用して, 30 分間ゆっくりと窒素通気を行なったのち, 北斗電工製ポテンシオスタット HA-104 により, 暗所で任意の電位に 10~30 分間分極した。系がほぼ平衡に達した後, 300 W タングステンランプからの光を酸化スズ自身の光応答と熱の影響を避けるために, 色ガラスフィルター (東芝 R-60) と厚さ 12 cm の水フィルターを通して, 酸化スズ電極背面から照射し, 光電流を測定した。また, 光電流作用スペクトルを測定するときには, 光源として 500 W キセノンランプを使用し, 日本分光製 CT-25 N 型回折格子分光器を通して得られる単色光を酸化スズ電極面に照射した。なお, 測定はすべて 25°C で行なった。また, 以下にしめす電位は標準水素電極を基準とする電位に換算した。

3 結果と考察

3.1 酸化スズ電極上でのクロマトホアの光応答

クロマトホア懸濁液をアノード分極して光照射したとき, 観測された光電流はすべて光カソード電流であり, その値も大変に小さく, 分極電位にもほとんど影響されなかった (図 1)。クロマトホア中に存在する光合成電子伝達系は, その成分が酸化還元電位の序列にしたがって環状に配列されていて, ATP や NADH の光生産を有効に行なっている。もしそうであるなら, アノード分極下においても電極へ電子を移行する余裕はないことになり, この実験結果は妥当なものと考えられる。したがって, クロマトホアを利用して光アノードを構成しようとするならば, この電子伝達系に電子を供与することのできる物質を測定系に添加してやるが必要になる。このような性質をもつ物質として, コハク酸や L-アスコルビン酸のような還元性有機物が知られている。そ

Fig. 1 Dependence of photocurrent on applied potential
The experimental conditions were as follows: $A_{873}=75$ in Tris buffer (pH 8.0) in absence ● or presence ■ of 5 mM ascorbate; 6000 lx of illuminance

こで, 今回の測定には, 電極反応がかなり遅いことを考え併せて, L-アスコルビン酸を電子供与体として使用することとした。

クロマトホア懸濁液に L-アスコルビン酸を共存させて光電流の測定を行なうと, 予期したように約 $+0.55 \text{ V}$ 以上の分極電位で光アノード電流が観測されるようになったが, その値は小さいものだった (図 1)。そこで, 白金電極上での光電流測定⁶⁾において, 30~50 倍という大きな光電流増加効果を示した 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (以下 m-PMS と略記する) をさらにクロマトホア懸濁液に加え光電流測定を行なった。m-PMS を添加すると光アノード電流は増大し, 光アノード電流の出現する分極電位も低下したけれども, 任意の分極電位での光電流-時間曲線は複雑な変化を示した (図 2)。この複雑な光応答は図 2 にあわせて示すように, 速い光カソード電流と遅い光アノード電流との合成波と考えれば現象をうまく説明できるように思われる。この速い光カソード電流の大きさを正確に予想することは困難であるので, 今回は L-アスコルビン酸が存在しないときに観測される光カソード電流がこれに相当すると考えて, L-アスコルビン酸共存下で観測される光アノード電流とアスコルビン酸非共存下での光カソード電流値の差の最大値を光アノード電流値とした。光アノード電流のこのような遅い光応答については, 後で述べるように, 光励起したバクテリオクロフィルよりの電子がクロマトホア内の電子伝達系を経て電子プールとしてのユビキノンに一旦蓄えられ, それから徐々に酸化スズ電極に移動するものと考えれば現象をうまく説明できるように思われる。このような考え方は光照射を停止した後の光アノード電流の遅い減少にも適用され, プールとしてのユビキノンに蓄積した電子が光照射停止後も徐々に電極へ移動していると解釈できるが, これを裏付け

Fig. 2 Typical current vs. time curves and resolution of the current into fast cathodic and slow anodic currents

The experimental conditions were as follows: $A_{873}=75$ in 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) containing 100 μM m-PMS; $E=+0.65 \text{ V}$; 6000 lx of illuminance (measured 1) and (measured 2) show the curve obtained in the presence of 5 mM ascorbate and that in the absence of ascorbate, respectively

る具体的な実験データは現時点では得られていない。

3.2 光電流値におよぼすクロマトホアおよび添加試薬濃度の影響

このように定義された光アノード電流、光カソード電流とクロマトホア濃度との関係を図3に示す。光アノード電流はクロマトホア濃度の増加とともに増加し、 A_{878} の 50 あたりではほぼ一定となったのに対して、光カソード電流はクロマトホア濃度にはほとんど影響されなかった。

両光電流と m-PMS 濃度との関係を図4に示す。光アノード、光カソード電流とも m-PMS 濃度の増加とともに増加し、光アノード電流は $80 \mu\text{M}$ 、光カソード電流は $30 \mu\text{M}$ 付近で一定となった。m-PMS 添加による光電流の増大は両光電流共約 10 倍

Fig. 3 Dependence of photocurrent on concentration of chromatophores

The experimental conditions were the same as those for Fig. 2, except for chromatophore concentration. □ and ○ represent the values obtained in the presence and absence of 5 mM ascorbate, respectively

Fig. 4 Dependence of photocurrent on concentration of m-PMS

The experimental conditions and symbols in the figure were the same as those for Figs. 2 and 3, respectively, except for concentration of m-PMS

Fig. 5 Dependence of photocurrent on concentration of ascorbate

The experimental conditions and symbols were the same as those for Figs. 2 and 3, except for concentration of ascorbate

と、白金電極での光カソード電流測定時の増加度⁶⁾にはおよばなかった。

光アノード電流はまた、L-アスコルビン酸濃度の増加とともに増加し、5~10 mM で一定値に達した(図5)。これらの実験結果を概括すると、光アノード電流はクロマトホア濃度やL-アスコルビン酸濃度に大きく依存することから、光照射によってクロマトホアに存在する光合成電子伝達系が駆動され、L-アスコルビン酸よりの電子が電子伝達系を經由して、酸化スズ電極に移動することによって発生するものと予想される。一方、光カソード電流はその大きさがクロマトホアや m-PMS の濃度にあまり影響されないことから、Pettinger ら¹¹⁾や Watanabe ら¹²⁾によって色素増感光電流の発生機構で議論されたような、吸着クロマトホアと酸化スズ電極間に生じる電子のトンネル移動によるものと考えるのが妥当と思われる。

3.3 光電流におよぼす照射光強度、照射光波長の影響

クロマトホア懸濁液に m-PMS、L-アスコルビン酸を添加し光照射を行なうとき、照射光の照度を変えるとそれに応じて光電流は変化した。光アノード電流は照度の増加とともに大きくなり、6000 lx ではほぼ一定値を示したのに対して、光カソード電流は約 1000 lx という弱光下で飽和した。この結果も、クロマトホア中で光酸化され、電極からの電子を受容できる成分が少ないことを示していて、光カソード電流が主として電極上に吸着したクロマトホアに起因するものではないかという予想を裏付けている(図6)。

クロマトホアによって発生するこれらの光電流が、光合成電子伝達系とどのような関わりをもっているのかを調べるために、照射光の波長を変えて光電流作用スペクトルを測定した。その結果を図7に、クロマトホアの吸収スペクトルと併せて示す。光電流作用スペクトルの極大波長(600, 800, 875 nm)は光アノードお

11) von B. Pettinger, H.-R. Schöppel, H. Gerischer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **77**, 960(1973).

12) T. Watanabe, A. Fujishima, K. Honda, *ibid.*, **83**, 476 (1979).

Fig. 6 Dependence of photocurrent on illuminance

The experimental conditions and symbols were the same as those for Figs. 2 and 3, except for the irradiation of light

Fig. 7 Photocurrent action spectra by chromatophores

The experimental conditions and symbols were the same as those for Figs. 2 and 3, except for the wavelength of incident light

The dotted line shows the absorption spectrum of chromatophore suspension

よび光カソード電流ともに変わらず、吸収スペクトルの極大値 (588, 804, 873 nm) とよく一致しており、またその形状も非常に似ている。吸収スペクトルに見られる三つの極大はクロマトホアに結合しているバクテリオクロフィルの光吸収に起因するもの¹³⁾とされているから、光アノードおよび光カソード電流はバクテリオクロフィルの光励起を初発過程とする、クロマトホア電子伝達系のいずれかの成分と電極間での電子移動により生じて

13) 細井和雄, 徐 吉夫, 堀尾武一, “生体膜実験法”, 共立出版 (1974) p. 321.

Fig. 8 Dependence of potential onset for anodic photocurrent on solution pH

A typical photocurrent-potential curve is shown in the insert

The experimental conditions and symbols were the same as those for Figs. 2 and 3, except for the applied potential or solution pH

いると考えられる。

3.4 光電流の電位依存性

光励起したバクテリオクロフィルからの電子がクロマトホア電子伝達系を経由して、酸化スズ電極に移動することにより、光電流を発生することが光電流作用スペクトルを始めとする種々の測定を通して推定されたけれども、電極上で直接反応する化学種は未だ明らかでない。この点を検討するために、光アノード電流と電極電位との関係を調べた。得られた関係の典型的な例を図8の挿入図に示す。図中、約0 Vより卑な電位で光アノード電流が逆に増加する傾向を示しているが、この現象は、この電位領域ではL-アスコルビン酸共存下でも光カソード電流しか観察されず、その光カソード電流値がL-アスコルビン酸非共存下で測定される光カソード電流値よりも小さかったために生じたもので真の傾向とは考えられない。したがって、光アノード電流は約0 Vより貴の電位領域で観測できるようになり、電極電位の上昇とともに増加し、約+0.4 Vで最大に達し、以後一定の値をとった。光アノード電流の電位比例領域に図8挿入図中の点線で示すように、光電流の測定値に基づく一次回帰分析により直線を求め、この直線と電位軸との交点を光アノード電流の出現電位と定義すると、光アノード電流出現電位はクロマトホア懸濁液のpHと図8に示すような関係にあった。このプロットに基づく一次回帰分析の結果を図中の点線で示すが、pH 7.0で+0.02 Vを通る傾き-0.03 V/pHの直線となった。この挙動は酸化スズ電極のフラットバンド電位のpH変化¹⁴⁾やクロマトホア電子伝達系の多くの成分の酸化還元電位のpH依存性¹⁵⁾¹⁶⁾とも異なっていて、pH 7.0

14) F. Möllers, R. Memming, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **76**, 469(1975).

15) T. Kakuno, K. Hosoi, T. Higuti, T. Horio, *J. Biochem.*, **74**, 1193(1973).

における電位や pH 依存の傾向はクロマトホア中の電子プールとしてのユビキノ-10 の酸化還元電位のそれ¹⁶⁾と非常によく似通っている。また、このユビキノ-10 がクロマトホア表層に存在していることも考えあわせると、電子プールとしてのユビキノ-10 が電極反応に関与している可能性が大きい。この予想を裏付けるために次のような実験を行なった。クロマトホアに結合しているユビキノ-10 のうち電子プールとしての役割を果たすものは、凍結乾燥したクロマトホアから 2,2,4-トリメチルペンタンによりほとんど完全に抽出することができる¹⁷⁾。こうして得られたユビキノ抽出クロマトホアを用いて光電流の測定を行なうと、光アノード電流は無処理の場合の約 1/4 に減少し、光アノード電流の出現電位も各 pH で 0.02~0.1 V アノード側にシフトした。また、出現電位の pH 依存性を示す直線の傾きも約 -0.02 V/pH へと変化した。このように、酸化光電流の最大値や出現電位およびその pH 依存性にユビキノ抽出の影響が現われたことから、ユビキノ-10 が電極反応に関与しているという予想は妥当なものと考えられる。

3.5 光電流発生への m-PMS の関与の仕方

クロマトホア懸濁液に m-PMS を添加して光アノード電流を測定すると、無添加のときに比べて約 10 倍に増加したけれども、白金電極上での添加の効果ほどではなかった。m-PMS は白金電極上ではクロマトホアと電極間で電子運搬体として機能していると考えられた⁶⁾が、酸化スズ電極上でのこの結果は m-PMS の別の関与の仕方を示唆しているものと考えられる。m-PMS の関与の仕方を検討する一つの方法として、つぎのような実験を行なった。クロマトホアは Ochiai らがラン藻で試みた方法¹⁸⁾にしたがってアルギン酸膜中に固定化することができる。A₈₇₃=150 に調整したクロマトホア懸濁液を 10% アルギン酸ナトリウムを含む同量の GTA 緩衝液に練り込み、0.3 mm の膜厚になるように酸化スズ電極に塗布した後、0.3% 塩化カルシウム溶液中に 9 分間浸漬して固定化した。こうして作成した固定化クロマトホア-酸化スズ電極を用いて光電流の測定を行なうさい、固定化膜中あるいは電解液中に m-PMS や L-アスコルビン酸を共存させて光電流値への影響を調べた結果が表 1 である。この結果から、L-アスコルビン酸が存在するとき、m-PMS を固定化膜中に添加しても光アノード電流はそれほど増加せず、むしろ電解液中に添加した方が光電流の増加効果が大きい傾向が認められる。すなわち、電極と接触可能である膜中に m-PMS が存在しているときより、電極から遠い電解液中に存在しているときの方が光アノード電流がより増加している。このことは、m-PMS が白金電極の場合と異なり、酸化スズ電極とクロマトホア間の電子運搬体として働いているのではなく、アスコルビン酸からの電子をクロマトホアに橋渡しする機能をもっていることを示している。

以上の実験結果に基づいて、酸化スズ電極上での光電流の発生機構を推察したのが図 9 である。主として 870 nm 付近の光を吸収して励起したクロマトホア中のバクテリオクロロフィル (図中

Table 1 Effect of addition of m-PMS or ascorbate into immobilized film or solution on photocurrent by chromatophores

Film	Solution	Cathodic photocurrent ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Anodic photocurrent ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
none	none	~0	~0
none	asc	~0	~0
none	m-PMS	~0	~0
m-PMS	none	~0	~0
m-PMS	m-PMS	~0	~0
asc	none	~0	~0
asc	asc	~0	~0
m-PMS, asc	none	-0.01	~0
asc	m-PMS	-0.02	~0
m-PMS, asc	m-PMS	-0.09	~0
m-PMS, asc	asc	-0.19	+0.20
m-PMS	asc	-0.12	+0.22
none	m-PMS, asc	-0.19	+0.40
asc	m-PMS, asc	-0.15	+0.39
m-PMS	m-PMS, asc	-0.22	+0.41
m-PMS, asc	m-PMS, asc	-0.28	+0.49

The experimental conditions were as follows: A₈₇₃=75 in 0.12 M GTA buffer (pH 8.0); +0.65 V of applied potential; 6000 lx of illuminance; concentrations of m-PMS and ascorbate being 100 μM and 5 mM, respectively.

Fig. 9 A possible mechanism for induction of photocurrent by chromatophores at an SnO₂ in the presence of m-PMS and ascorbate

では BChl と略記する) から放出された電子はバクテリオフェオフィチン (BPh)、第一キノ-ン、第二キノ-ン (Q₁, Q₂) を経て、クロマトホア表層に存在する電子プールとしてのユビキノ-ン (Q_P) に到達し¹⁹⁾、ついで酸化スズ電極の伝導帯に移行することにより光アノード電流を生じる。一方、クロマトホア中に残されたバクテリオクロロフィルカチオンラジカルには L-アスコルビン酸からの電子が m-PMS を経て移動し、元の分子に戻り反応は終了

- 16) T. Erabi, T. Higuti, T. Kakuno, J. Yamashita, M. Tanaka, T. Horio, *J. Biochem.*, **78**, 759(1975).
- 17) T. Higuti, T. Erabi, T. Kakuno, T. Horio, *ibid.*, **78**, 51(1975).
- 18) H. Ochiai, H. Shibata, Y. Sawa, T. Katoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 2442(1980).

- 19) R. K. Clayton, W. R. Sistrom, ed., "The Photosynthetic Bacteria", Plenum Press, New York (1978) Chap. 20~25.

する、と考えられる。このように、クロマトホア懸濁液にL-アスコルビン酸を加えた系で光アノード電流が観測されるようにはなかったけれども、L-アスコルビン酸の酸化還元電位が電子プールとしてのユビキノンのそれとほぼ同程度であり、また酸化スズ電極のフラットバンド電位よりは卑であることから、この系はエネルギー変換系とは言い難く、今後、電子供与体、クロマトホアより電極への電子移動部位について改善が望まれる。一方、光カソード電流はアスコルビン酸非共存下で観測されるから、酸化スズ電極よりの電子が Seibert ら⁹⁾も考えたように、吸着クロマトホア中のバクテリオクロロフィルカチオンラジカルにトンネル移動することにより生じるものと予想されるが、詳細は明らかでない。これらの機構は基本的にはクロロフィルによる光電流発生⁹⁾のそれ⁹⁾と変わりはない様に思われるけれども、バクテリオクロロフィル分子がクロマトホア膜中で安定に存在できるようになって、光電流発生の持続性はいちじるしく向上している。

4 結 論

光生物学的水素生産システムに関する電気化学的研究が、太陽

エネルギーの有効利用を図るという観点からばかりでなく、光合成の初期過程の研究に新しい手段を提供するものとして広く行なわれるようになってきた。著者らも光合成細菌のクロマトホアを使用して、光水素生産の基礎となる光アノードを製作すること、光合成電子伝達機構に対して新しい知見を得ることを目的として、前に述べたような諸実験を行なった。その結果、クロマトホア懸濁液に m-PMS と L-アスコルビン酸を添加したとき、光照射下の酸化スズ電極が光アノードとして機能することを見いだした。光アノードとしての作用機構は概ね図9に示すようなものと予想され、さらにクロマトホア中での電子移動に関する諸データも図8にその典型を示すように、得られつつある。これらのデータの生理学的意味については、現時点ではその解釈に困難な点も多いが、今後、このようなデータが蓄積され、光合成器官の解体、再構成法による個々の成分の電気化学的測定とあわせて解析されれば、その意味も明らかになるものと思われる。

Special Articles on Chemistry and Technology of Energy Conversion

A Photoanodic Reaction with *Rs. rubrum* Chromatophores at an SnO₂ Electrode

Tatsuo ERABI*, Yasuaki KATO, Yoshiharu YAMASHITA, Kiyoharu MATSUMOTO,
Kumiko NISHIMURA-HIRATA and Masanori WADA

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tottori University;
Koyama-cho, Tottori-shi 680 Japan

An anodic photocurrent was observed when an SnO₂ electrode, immersed in chromatophore suspension containing L-ascorbate and 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (m-PMS), was irradiated under potentiostatic conditions. The magnitude of photocurrent induced depended on chromatophore concentration, m-PMS concentration, ascorbate concentration, intensity of light, wavelength of the incident light and electric potential applied. A possible mechanism for induction of the anodic photocurrent was discussed.

~~~~~