

第7章 発酵水素発生とメカニズム

7.1 水素発生の化学熱力学と問題点

バクテリアが発酵で水素を発生する反応経路は、図 7.1-1 に示したように、おもに三つの経路が考えられている¹⁾。これらの経路のうち、NADH経路は第3章3.4節で述べたグルコースの嫌気代謝の一部に位置づけられるものである。EM (Embden-Meyerhof)経路、ED (Entner-Doudoroff)経路、PP (Pentose Phosphate)経路のどの経路を通してグルコースを分解するかは、表 7.1-1 に示すように、それぞれの微生物に固有で、エンテロバクター科の微生物は、おもに、EM経路でグルコースを分解している²⁾。クロストリディウム属についても同様である。

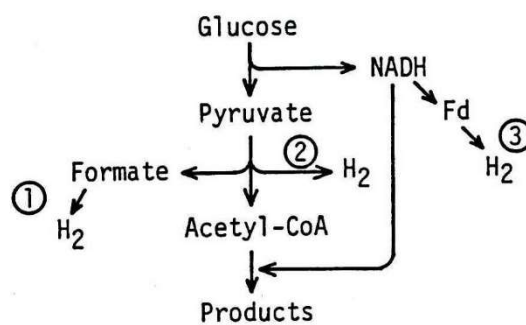


図 7.1-1 発酵水素発生の経路

表 7.1-1 微生物のグルコース初発代謝経路²⁾

微 生 物		EM	PP	ED
細 菌	<i>Pseudomonas reptilivora</i>	0	28	72
	<i>saccharophila</i>	0	0	100
	<i>fluorescens</i> グルコース充分量, 30℃	0	9	91
	" " 8℃	0	15	85
	" グルコース不充分量, 8℃	0	57	43
	<i>Rhizobium japonicum</i>	0	0	100
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0	44	55
	<i>Leucotrix mucor</i> , 肉汁培地生育菌体	0	20~25	80~75
	<i>Gluconobacter</i>	0	100	0
	<i>Acetobacter aceti</i>	0	100	0
	<i>Escherichia coli</i>	72	28	0
	"	85~75	15~25	0
	<i>Salmonella typhimurium</i>	80	20	0
	<i>Zymomonas mobilis</i>	0	0	100
	<i>anaerobica</i>	0	0	100
	<i>Spirochetes</i>	100	0	0
	<i>Micrococcus sodonensis</i> , 有機酸塩培地生育菌体	80	20	0
	<i>Lactobacillus casei</i>	100	0	0
	<i>plantarum</i>	100	0	0
	<i>Streptococcus faecalis</i>	100	0	0
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(PK: 100)		
	<i>brevis</i>	(PK: 100)		
	<i>Bacillus subtilis</i>	65	36	0
	<i>cereus</i> , 肉汁培地, 栄養細胞一胞子形成前期	98~99	2~1	0
	" 肉汁培地, 発芽中の胞子	80	20	0
	<i>Clostridium perfringens</i> , リボース適応菌体	100	0	0
	<i>Arthro bacter globiformis</i>	68	32	0
	<i>ureafaciens</i> , グルコン酸生育培地	93	7	0
	<i>simplex</i>	0	35	65
	<i>pascens</i>	0	6	94
	<i>Brevibacterium flavum</i> , ビオチン充分量	62	38	0
	" ビオチン制限量	74	26	0
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	74~97		
	<i>Streptomyces griseus</i>	97	3	0
	酵 母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	12
"		83~100	27~0	0
<i>Candida utilis</i>		50~96	50~4	0
カ ビ	(鞭毛菌類)			
	<i>Phymatotrichum omnivorum</i>	+	+	-
	(接合菌類)			
<i>Rhizopus oryzae</i>	100	0	0	
MX	100	0	0	

EM 経路における NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) の総収支は、



となり、ピルビン酸生成の過程で2モル生成される。*Clostridium butyricum*、*C. pasteurianum*、*C. kluyveri* など酪酸発酵をするバクテリアは、この2モルの NADH を NAD^+ に再酸化するために、NADHデヒドロゲナーゼ (NADH dehydrogenase)、フェレドキシン (ferredoxin)、ヒドロゲナーゼ (hydrogenase) で構成される酵素系によって、2モルの水素を発生する(図 7.1-2)³⁻¹⁷。

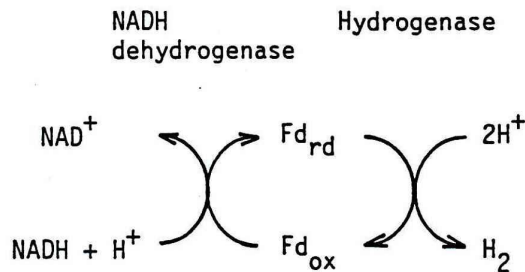
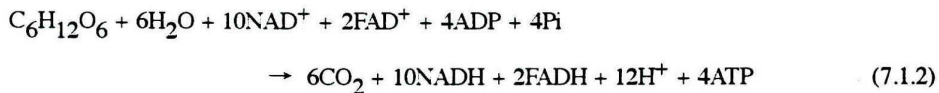


図 7.1-2 NADH-水素発生の電子伝達経路

NADH は好気状態でも生成される。たとえば、EM 経路、TCA 回路(Tricarboxylic Acid Cycle)を
通ってグルコースが好氣的に分解される過程で生成される総 NAD 量は次のようになる。



しかし、このように好氣的分解で生成された多量の NADH は、酸素を電子受容体とする反応で酸化され、ATP 生産のために使用される。したがって、水素発生には関与しない。



ピルビン酸は好気状態では H_2O と CO_2 にまで分解されるが、嫌気状態でもさらに代謝されて、
図 3.4-2 と 3.4-3 の枠囲いで区別した最終産物に到達する。一般的に、混合酸発酵をするバクテリアや乳酸発酵、アルコール発酵をするバクテリアでは、この最終産物生成過程で NADH を NAD^+ に再酸化するので、水素発生に NADH は利用されない。大腸菌 (*Escherichia coli*) などギ酸を産生するバクテリアで、ギ酸デヒドロゲナーゼ (formate dehydrogenase) とヒドロゲナーゼの二種類の酵素をもっているバクテリアだけが¹⁸⁻²³、図 7.1-3 の酵素系でギ酸を分解して H_2 と CO_2 を 1:1 の割合で発生する。

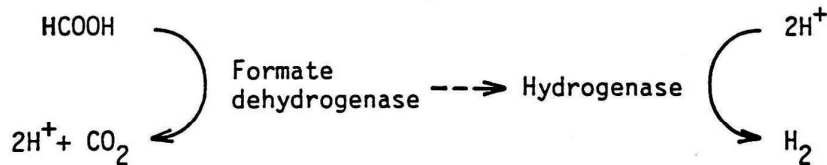
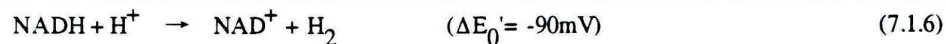
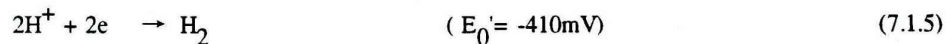
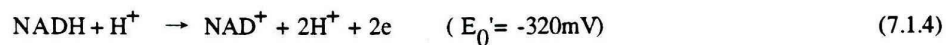


図 7.1-3 ギ酸 - 水素発生の電子伝達経路

C. butylicum は同じ様な経路を通してブタノール (butyl alcohol) を産生するが、ギ酸を産生しないので、ピルビン酸からギ酸を経ないで直接水素と二酸化炭素を発生する^{24,25)}。

以上が、これまで広く受け入れられているグルコース代謝と水素発生の関係である。しかし、これらの水素発生経路は、実験事実ではあるが、化学熱力学的には説明のつかない部分を含んでいる。例えば、 NAD^+/NADH の pH 7.0 における標準酸化還元電位(E_0') は -320 mV であり、 H^+/H_2 の E_0' は -410 mV である。したがって、

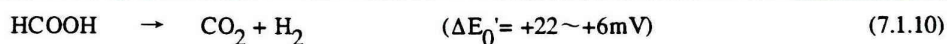
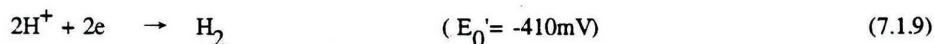
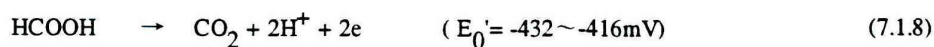


の反応は、非常に負の電位差 (-90 mV) の酸化還元反応であることになる。これを標準自由エネルギー変化 ($\Delta G_0'$) で表すと、

$$\Delta G_0' = -nF(E_{0'rd} - E_{0'ox}) \quad (7.1.7)$$

+4.15 kcal/mol の自由エネルギー変化になり、反応が自然に右に進むとは考えられないくらい大きい値である。Jungermann らも指摘したように、水素の分圧が 0.001 atm 以下でなければこの反応は右に進まないであろう^{11,26-28)}。

ギ酸の標準酸化還元電位に関しても、表 7.1-2 に示すように、-432 mV から -416 mV まで諸説あって定まっていない。表 3.4-1 (a) は Blackwood らが測定した *E. coli* の pH による発酵産物の変化を示したものである²⁹⁾。pH 7.8 ではギ酸が蓄積して水素と二酸化炭素の発生が少ないが、6.2 では逆にギ酸の生成が少なく水素と二酸化炭素の生成が増えている。しかし、ギ酸の標準酸化還元電位の諸説では、いずれの電位をとっても水素より低いので、pH 7.0 においてもギ酸の分解反応は進むことになり、この電位のみでギ酸-水素発生を論ずるのは困難である。



このように、化学熱力学で説明できないまま、水素発生の代謝経路とされているのが現状である。

筆者は、「微生物はなぜ水素を発生するのか」という疑問と、「水素発生のメカニズムはどの様になっているのだろうか」という関心とから、筆者らの実験事実、それと、1970年以後に明らかになったいくつかの事例を組み入れて、次節以降に、NAD 経路の水素発生の化学熱力学的説明とそのメカニズムの構築を試みた。

表 7.1-2 ギ酸の標準酸化還元電位

Author	System	E_0'
Brill <i>et al.</i> ¹⁾	CO ₂ /HCOOH	- 425 mV
Thauer <i>et al.</i> ²⁾	CO ₂ /formate	- 432 mV
Kroeger ³⁾	HCO ₃ ⁻ /formate	- 416 mV
八木 ⁴⁾	CO ₃ /ギ酸	- 0.43 V

1) Brill, Wolin and Walf, Science 144, 297-298 (1964).

2) Thauer, Jungermann and Decker, Bacteriol. Rev. 41, 100-180 (1977).

3) Kroeger, "Diversity of Bacterial Respiratory Systems", C.J. Kowels ed. vol.2, CRC Press(1980)

4) 八木達彦, "エネルギー資源と微生物", 鈴木周一編, 共立出版 (1979)

7.2 *Enterobacter aerogenes* の水素発生経路

Escherichia coli の水素発生がギ酸分解であるとされる歴史的経緯は7.5節で詳しく述べる予定であるが、*E. coli* がギ酸を分解するからということだけではなく、ギ酸生成反応の収支計算も根拠とされている²⁹⁻³¹⁾。つまり、ギ酸はピルビン酸のアセチルCoA化反応において副次生成されると考えられるので、



H₂がギ酸分解によって生成されるならば、アセチルCoA化反応を経て生成されるエタノールと酢酸の生成モル数について、次の関係が成り立つはずである。

$$\text{Moles(ethanol + acetate)} = \text{moles(H}_2\text{ + formate)} \quad (7.2.2)$$

図 7.2-1 に示すように、○印で分類したいくつかの混合酸発酵バクテリアでは、この関係式はよく満たされる。ゆえに、ギ酸から水素が発生した [文献 31, p.593-595]、と。また、*E. coli* に関しては、表 3.4-1 (a) から計算される次の収支バランスもその理由とされている。

$$\frac{(\text{Formic acid} + \text{CO}_2)_{\text{pH}=7.8}}{(\text{Formic acid} + \text{CO}_2)_{\text{pH}=6.2}} = 0.97 \quad (7.2.3)$$

$$\frac{(\text{Formic acid} + \text{H}_2)_{\text{pH}=7.8}}{(\text{Formic acid} + \text{H}_2)_{\text{pH}=6.2}} = 1.11 \quad (7.2.4)$$

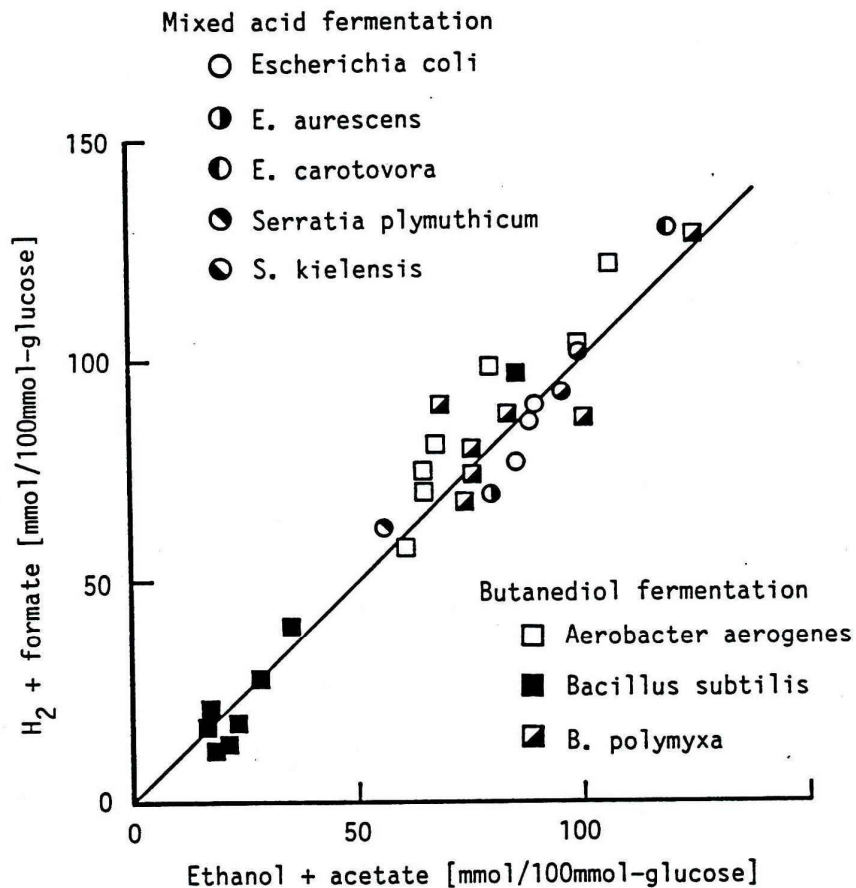
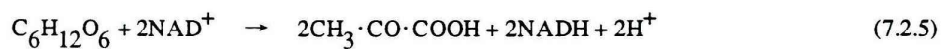


図 7.2-1 水素、ギ酸の生成とエタノール、酢酸生成との相関関係

すなわち、pH 7.8 におけるギ酸と二酸化炭素あるいはギ酸と水素の生成量の和は、pH 6.2 におけるそれらの和とほぼ等しいので、pH 6.2 における水素と二酸化炭素は、本来ギ酸として生成されたものが、何等かの理由で分解されたために発生したとされるわけである。

E. aerogenes の水素発生経路を論じた研究は見あたらなかったが、Neishと Ledingham がブタンジオール発酵の pH による代謝産物の変化を調べた実験データ³⁰⁾、表 3.4-1 (b)、を参考にすると、図 7.2-1 に□印で分類したように、式 (7.2.2) を満足しているようである。しかし、ギ酸と水素、ギ酸と二酸化炭素の生成量の和に関しては、pH が変化すると不規則に変化しており、*E. coli* に見られるような明瞭な関係はあらわれていない。これは、代謝経路が培地 pH によって変化するために、ギ酸生成に関与していた反応も変化するからである。したがって、*E. aerogenes* の水素発生経路をギ酸分解経路と結論することはできない。そこで、最終産物の生成反応から NADH 経路のブタンジオール発酵、ピルビン酸分解による直接水素発生の酪酸発酵、それにギ酸経路の混合酸発酵について、それぞれの NADH 収支を計算し、ブタンジオール発酵にもギ酸経路の特徴が現れるか調べた。

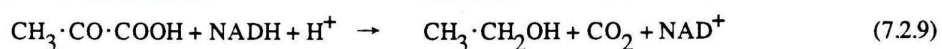
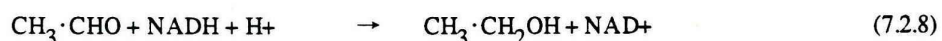
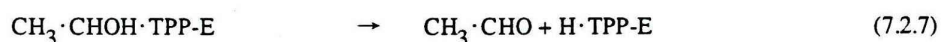
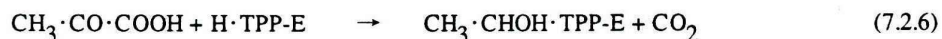
解糖系(Glycolysis)： グルコースは2モルのピルビン酸と2モルの NADH に分解される。



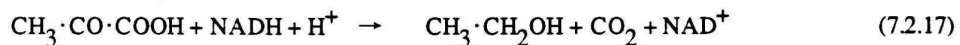
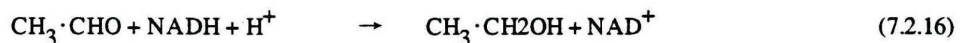
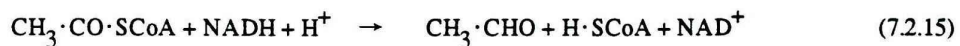
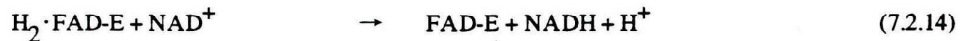
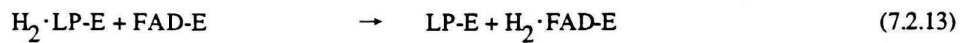
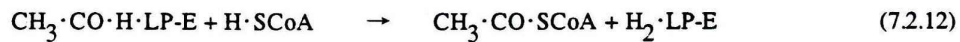
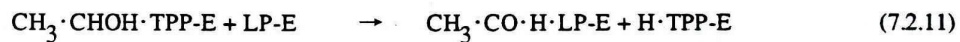
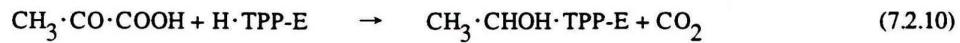
このピルビン酸を初発物質とした代謝産物の生成反応は、アセチルCoAを経るエタノールおよび酢酸と、その他のものに分けられる。

エタノール生成反応： エタノール生成反応には、(1)酵母などによるチアミン（ビタミンB1）のリン酸化合物チアミンピロリン酸（Thiamine pyrophosphate、TPP）を補酵素とした反応 [文献 32, p.253, p.439、文献 33, p.346-8, p.430]、(2)ミトコンドリアや好気状態における *E. coli* などの TPP とリポイック酸（Lipo-ate、LP）の複合酵素系からなるアセチルCoA化反応、(3)嫌気状態の *E. coli* などによるピルビン酸-ギ酸リアーゼ（Pyruvate-formate lyase、PFL）によるアセチルCoA化反応などがある。

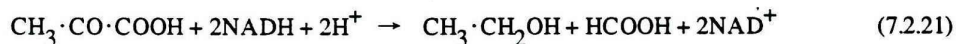
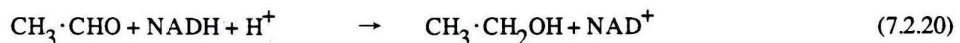
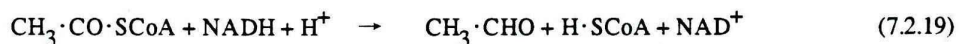
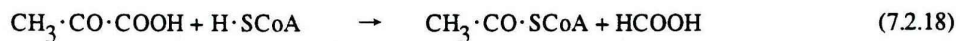
(1)TPP 経路



(2)TPP-LP 複合酵素経路



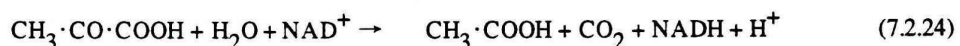
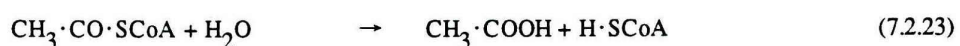
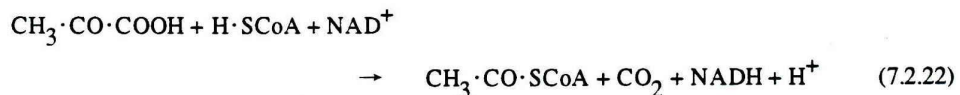
(3)PFL 経路



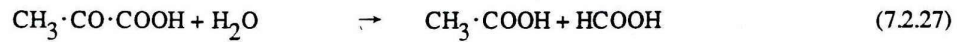
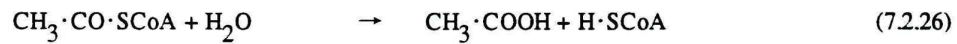
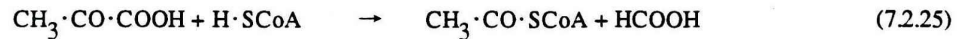
TPP 経路とTPP-LP 複合酵素経路では1モルの NADHが消費され、1モルのCO₂が生成される。これに対して、PFL 経路では2モルの NADH が消費され、1モルのギ酸が生成される。したがって、エタノール生成に関しては NADH 収支とギ酸収支の2つの収支が考えられる。

酢酸生成反応： 酢酸生成に関しても、TPP-LP 複合酵素系によるアセチルCoA生成と、PFL 経路によるアセチルCoA生成反応がある。

(1)TPP-LP 複合酵素経路



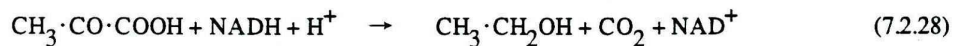
(2)PFL 経路



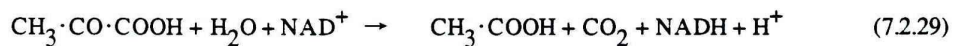
酢酸の PFL 経路もエタノールの PFL 経路も同じ経路であるから、結局、ギ酸を生成しない経路における NADH 収支とギ酸生成に関与する代謝産物の収支を計算すれば、ブタンジオール発酵と混合酸発酵、酪酸発酵、ブタノール発酵の水素発生経路を比較できる。

(a)NADH 生成経路でエタノール、酢酸、ギ酸が生成したと考える場合の反応式

エタノール



酢酸



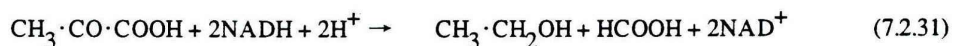
ただし、この経路ではギ酸は生成されないので、余剰の NADH と CO₂ からギ酸が生成されると考える^{34,35}。

ギ酸



(b)ギ酸生成経路でエタノール、酢酸が生成したと考える場合の反応式

エタノール

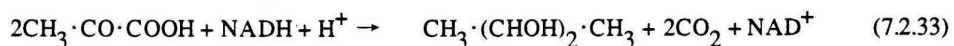


酢酸

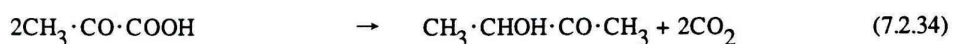


(c)その他の代謝産物の生成反応式

2,3-ブタンジオール

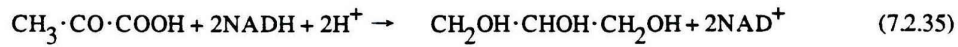


アセトイン

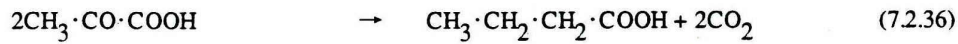


第7章 水素発生とメカニズム

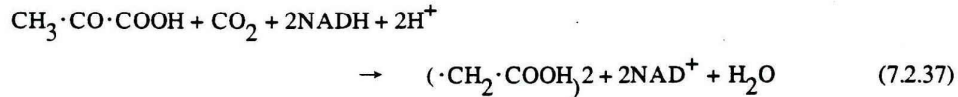
グリセロール



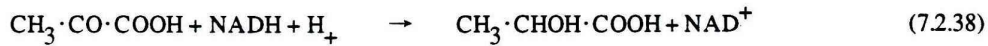
酪酸



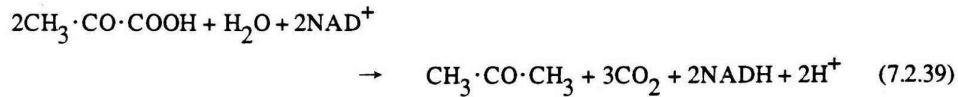
コハク酸



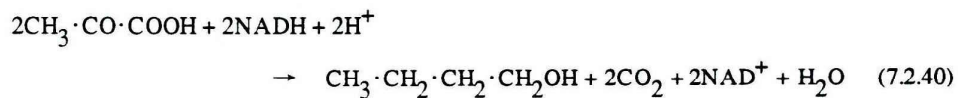
乳酸



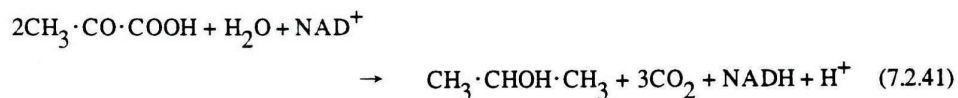
アセトン



ブタノール



イソプロパノール



以上の反応式を使用して、ピルビン酸の生成量、NADHの生成量と水素発生に利用可能な余剰のNADH量を計算した。

表 7.2-1 は、表 3.4-1 (a), (b), (c), (d), (e) に現れた代謝産物を利用して計算した結果である。酪酸発酵は、Jungermann らによって NADH 経路の実験検証に使われたバクテリアの発酵様式である。水素発生に利用可能な NADH 量がギ酸生成にかかわるエタノールと酢酸の生成量に比べて非常に多く、*C. butyricum* では余剰 NADH 量と水素発生量が等しいことがわかる。ブタノール発酵は、ギ酸を経ないピルビン酸-水素発生説の基になった *C. butylicum* の発酵様式である。ブタノール発酵の余剰 NADH 量も水素発生量とほぼ等しく、エタノールと酢酸の生成量よりかなり多い。このように、酪酸発酵のNADH-水素、ブタノール発酵のピルビン酸-水素のいずれの水素発生経路も、余剰 NADH 量と水素発生量とがほぼ等しいという相関関係を示した。それに比べると、混合酸発酵では、余剰 NADH 量と水素発生量の間そのような強い相関関係はあられず、むしろギ酸生

成と連動して生成されるエタノールと酢酸の和が、ギ酸と水素の和に対して相関関係を示した。

以上の特徴を基に、ブタンジオール発酵の余剰 NADH と水素発生量の関係を検討すると、ギ酸-水素発生と NADH-水素発生のどちらに対しても図 7.2-2 に示すようにほぼ同じ相関が見られ、どちらの発生経路であるか決め難いが、ギ酸は NADH とCO₂から生成されると考えるなら、ブタノール発酵や酪酸発酵により近い水素発生経路を経ているということができるとはなからうか。よって、「*E. aerogenes* の水素発生は NADH 経路である」と仮定して、次節では水素発生反応を化学熱力学の観点から検討する。

表 7.2-1 代謝産物から計算したNADH収支

Bacteria	pH of culture	Pyruvate produced	NADH residual	H ₂ evolved	Ethanol + acetate	H ₂ + HCOOH
<u>Butyrate fermentation</u>						
Clostridium	-	203	48	21	25	21
perfringens	-	187	188	214	86	214
C. butyricum	-	194	236	235	42	235
<u>Butanol fermentation</u>						
Clostridium	-	200	139	135	21(122)	135
acetobutylicum	-	193	81	78	17(76)	78
C. butylicum	-	193	81	78	17(76)	78
<u>Mixed acid fermentation</u>						
Escherichia	6.20	179	59	75	86	77
coli	7.80	175	-23	0	89	86
E. aureescens	6.20	152	39	71	77	78
No.219	7.80	177	-15	0	75	79
E. aureescens	6.20	160	60	91	94	96
No.220	7.80	166	-6	0	78	75
<u>Butanediol fermentation</u>						
Aerobacter	5.00	176	89	99	80	99
aerogenes	5.20	172	58	70	65	70
	5.60	170	55	58	61	58
	6.00	172	61	74	65	75
	6.60	166	62	81	68	81
	7.00	166	68	81	100	104
	7.60	167	52	70	107	122
	8.00	159	-11	10	114	130
Bacillus	5.40	166	56	89	69	90
polymyxa	5.80	186	56	68	74	68
	6.20	188	57	70	76	73
	6.47	183	63	78	76	80
	6.80	186	76	84	84	88
	7.17	185	80	82	101	87
	7.60	171	25	46	126	129
Bacillus	6.00	170	-2	0	21	13
subtilis	6.20	198	0	0	16	17
	6.40	190	-9	0	18	12
	6.60	198	0	2	17	21
	6.80	186	-6	0	23	18
	7.20	188	-4	0	28	28
	7.60	201	-4	0	35	40
	8.00	169	-12	1	86	97

7.3 酸化還元電位とpHの関係

微生物の水素発生を研究した論文は非常にたくさんあるが、そのほとんどは pH 6.5~7.0 付近での研究で、それも緩衝液を使用して pH 設定を行っている。酵素活性が pH に影響されることはよく知られているにもかかわらず、生きた微生物の水素発生について pH の影響をあまり深く考えていない理由の一つには、pHを調節しながら培養することの困難さもさることながら、微生物の増殖にとって pH 7.0 辺りが最も適しているので、水素発生にも適しているだろうという先入観があったためと思われる。そのため、化学熱力学的検討も pH 7.0 でおこなうことが多い^{1,32)}。そこで、pHの影響を考慮した酸化還元電位を計算し、酵素活性との関係から水素発生反応の熱力学的な可能性を考えてみた。

7.3.1 水素の酸化還元電位

前章で示したように、*E. aerogenes* st. E.82005 の増殖に適した pH は確かに 7.0 前後である (図 3.2-3)。しかし、水素発生の至適 pH はそれとは異なって 5.5~6.0 にあり (図 3.2-6)、pH 7.0 における水素発生速度は最大発生速度のわずか 35 % しかない。したがって、増殖と水素発生が直接対応する関係にないことは明らかである。同時に、水素発生が培地 pH の影響を受けるということは、



の反応が、培地 pH で規定される酸化還元電位によって進行しているためと考えられる。それでは水素の酸化還元電位は pH とどのような関係にあるだろうか。それは次式のようになる。

$$E = E_0 + \{RT/2F\} \ln\{[\text{H}^+]^2/p_{\text{H}_2}\} \quad (7.3.1)$$

$$\begin{aligned} &= -\{2.303RT/F\} \text{pH} - \{2.303RT/2F\} \log(p_{\text{H}_2}) \\ &= -0.0592 \text{pH} - 0.0296 \log(p_{\text{H}_2}) \end{aligned} \quad (7.3.2)$$

ただし、[]は活動度を表し、()は分圧を表している。

水素の標準酸化還元電位 E_0 は 0 V であり、R は 1.987 cal/(mol·K)、F は 23,063 cal/(mol·V) であるから、 $2.303RT/F$ は 25 °C において約 0.0592 V になる。水素発生の至適 pH 付近にあたる pH 6.0 における酸化還元電位を計算すると、水素分圧 1 atm では、-0.355 V になる。*E. aerogenes* は水素と二酸化炭素とを約 1:2 の割合で発生し、その発生量は発酵槽の気相部分を完全に置換することができるから、水素分圧は 0.3 atm 程度になるであろう。したがって、実際の水素の酸化還元電位は -0.340 V (pH 6.0, 0.3atm で) と計算される。この電位は NAD^+/NADH の pH 7.0 における標準酸化還元電位 (-0.320 V) に非常に近く、注意を引く数値である。

7.3.2 細胞内 pH と培地 pH の関係

1976年に、Padan ら³⁶⁾と Ramos ら³⁷⁾は、それぞれ独立に、*E. coli* の細胞内 pH に関する興味ある研究を報告した。図 7.3-1 に Padan らのデータを引用して示している。この図および Ramos らによると、*E. coli* の細胞内 pH は、従来考えられていた 7.0 ではなくおよそ 8.0 であった。また、細胞内 pH は、培地 pH が 5.5 から 9.0 の広い範囲にわたって変化しても、ほぼ一定に保たれていた。したがって、「細胞内 pH と培地 pH はおなじになっているであろう」と考えられていたそれまでの通念が、まったく覆ってしまった。

pH 7.0 付近が生化学反応にとって好ましいと考えられていたにもかかわらず、ある種のバクテリアでは、細胞内の反応は弱塩基性下で進行しているというこの新しい事実、それと、細胞内 pH は培地 pH によらず一定であるという事実とから、NAD の酸化還元電位に関しても、pH 8.0 で計算すべきであることは、明かである。それでは NAD の酸化還元電位は pH に対してどの様に変化するであろうか。

7.3.3 NAD の酸化還元電位

NAD の電極反応式は



で表される 1 プロトン - 2 電子の反応であるから、酸化還元電位は次式で表される。

$$E = E_0 + \{RT/2F\} \ln\{[\text{NAD}^+][\text{H}^+]/[\text{NADH}]\} \quad (7.3.3)$$

$$= E_0 - \{2.303RT/2F\} \text{pH} + \{2.303RT/2F\} \log\{[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]\} \quad (7.3.4)$$

$$= -0.113 - 0.0296 \text{pH} + 0.0296 \log\{[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]\} \quad (7.3.5)$$

ただし、 E_0 は pH 0、25 °C における中点電位 ($[\text{NADH}] = [\text{NAD}^+]$) である。pH 7.0 における中点電位は -0.320 V であるから³⁸⁾、 E_0 は式 (7.3.4) から -0.113 V と計算された。図 7.3-2 に、水素の酸化還元電位式 (7.3.2) と NADH の酸化還元電位式 (7.3.5) を図示した。図中、pH 6.0 と 8.0 を通る太い垂直の鎖線は、細胞膜の外側と内側の仮定 pH を表している。

さて、細胞内 pH が 8.0 であるとする、式 (7.3.5) から NAD の標準酸化還元電位は -0.349 V になる。この電位は、水素の pH 8.0 における標準酸化還元電位 -0.474 V と比べて、あまりにも高いと言わざるを得ない。つまり、もし、図 7.1-2 で示した水素発生反応が細胞内で起こっているとすると、pH 7.0 における電位差 -90 mV よりさらに負の方に電位差が開き、活発な水素発生はまったく期待できなくなる。他方、培地 pH と水素分圧に準拠してさきに計算した pH 6.0、0.3 atm における酸化還元電位 -0.340 V と比べるならば、NAD のこの電位は、わずかではあるが水素の電位

より低くなる。つまり、水素分圧が 0.3atm でも水素発生が期待できる電位になる。

7.3.4 膜結合ヒドロゲナーゼの活性の至適 pH

以上、酸化還元電位の観点からは、ヒドロゲナーゼなどの酵素に触媒された水素発生が、*E. aerogenes* の細胞の内と外で別々に起きていると考えるならば、化学熱力学的にも説明がしやすいことがわかった。それでは、ヒドロゲナーゼに関する研究はどの様に進展しているであろうか。

種々の微生物のヒドロゲナーゼについては、総説に詳しく述べられている³⁹⁻⁴³⁾。これらの研究の中に *E. aerogenes* のヒドロゲナーゼに関するものを見つけることはできなかったが、*E. coli* に関して非常に興味ある研究があった。それは、Adams と Hall が1979年に発表したもので、細胞膜に結合したヒドロゲナーゼの酵素活性が、水素の発生と取り込みでそれぞれ異なった至適 pH を示すというものである⁴⁴⁾。図 7.3-3 に彼らのデータを引用して示した。この図によると、水素取り込みの酵素活性は pH 8.5 に至適 pH をもち、水素発生の酵素活性は pH 6.5 に至適 pH をもっている。これらの至適 pH は、細胞内 pH と *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生の至適 pH とに、それぞれ、あまりによく一致しているといえる。

7.3.5 膜結合ヒドロゲナーゼの構造

Adams と Hall が *E. coli* から取り出したヒドロゲナーゼは、同じ分子量の2つのサブユニットで構成されており、総分子量 113,000 の細胞膜に結合した酵素であった。この事実は、水素発生と水素取り込みの活性部位が、2つのサブユニットに別々に開いており、細胞膜の外側に向けて開いた活性部位では水素発生が、内側に向いた活性部位では水素の取り込みが行われていることを想像させる。

ヒドロゲナーゼの研究はその後にも精力的に進められており^{7,45-68)}、Boxer らは *E. coli* の膜結合ヒドロゲナーゼを3種類分離している⁶⁹⁻⁷²⁾。そのうちのイソエンザイム-1は、分子量 64,000、31,000、29,000 のポリペプチドから成り、64,000 のポリペプチドだけが H₂ : benzyl viologen oxidoreductase 活性を示した⁶⁹⁾。また、イソエンザイム-2は分子量 61,000 と 35,000 から成っていた⁷⁰⁾。ただし、彼らの所見では、水素取り込み速度に比べて水素発生速度がかなり小さいので、これらのヒドロゲナーゼは水素発生には関係していないだろうと考えている。

Schlegel のグループもヒドロゲナーゼの研究を早くから行っている^{43,73-79)}。彼らは、*E. coli* ではなく *Alcaligenes eutrophus* H16 というバクテリアのヒドロゲナーゼを分離し、このヒドロゲナーゼが 63,000、56,000、30,000、26,000 4つのそれぞれ異なった分子量から成る4量体であること

を報告している⁷⁹⁾。また、*Nocardia opaca* 1b というバクテリアのヒドロゲナーゼも分離し、やはり 64,000、56,000、31,000、27,000 の 4 量体から成り、これらは図 7.3-4 に引用したように、大きい 2 量体と小さい 2 量体に分かれることを示した。

以上のヒドロゲナーゼに関する研究を総合するならば、Adams と Hall が分離したヒドロゲナーゼは、4 量体のうちの大きい 2 つのサブユニットだけを取り出していたように思われる。

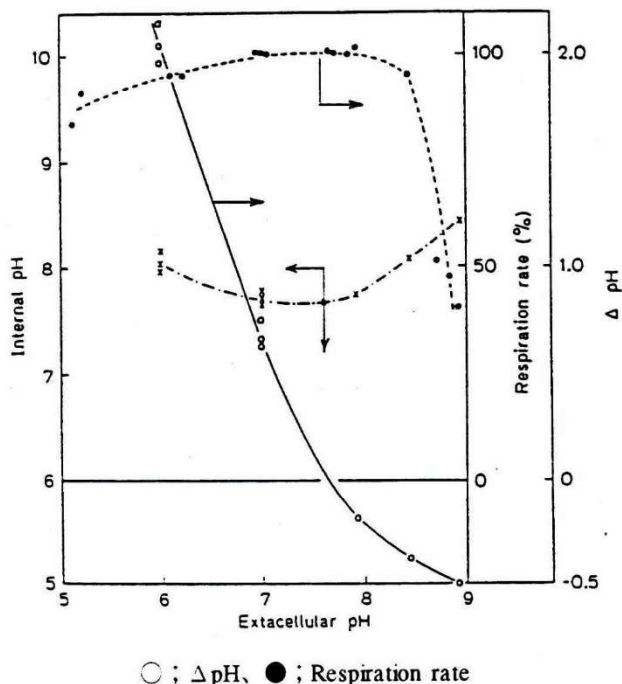


図 7.3-1 *E. coli* 細胞内 pH と外部 pH との関係³⁶⁾

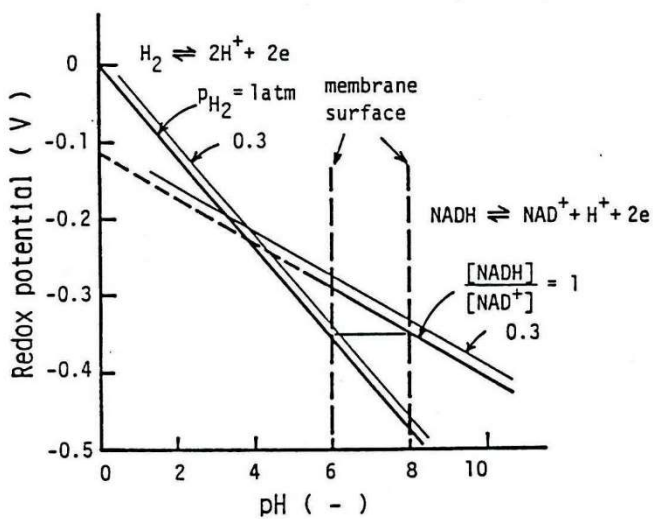


図 7.3-2 酸化還元電位と pH の関係

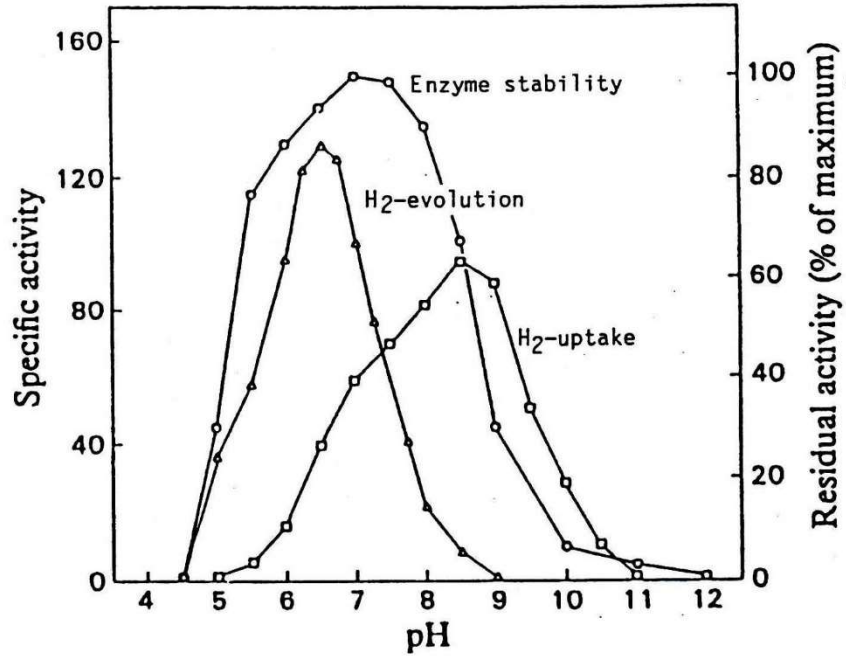


図 7.3-3 *E. coli* のヒドロゲナーゼ活性と pH の影響⁴⁴⁾

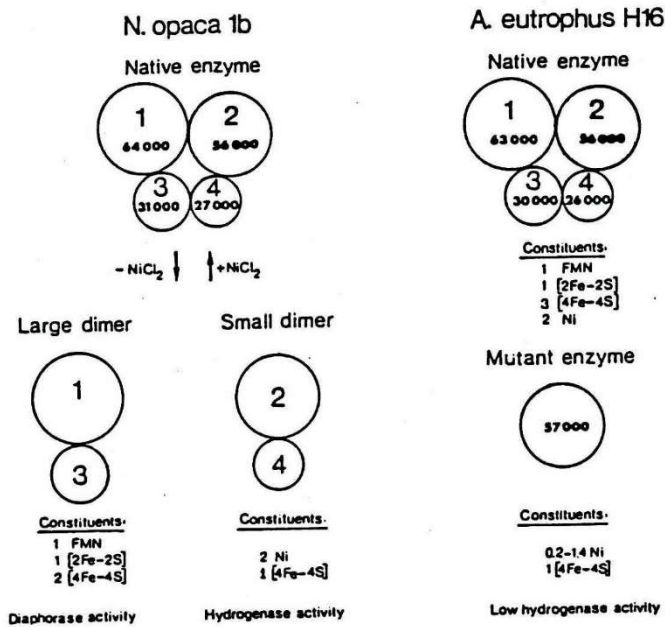
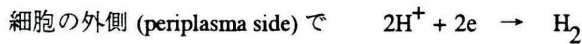


図 7.3-4 ヒドロゲナーゼの構成ユニットと分子量⁷⁹⁾

7.4 NAD経路の水素発生メカニズムの提案

7.4.1 細胞膜の両側で反応する水素発生メカニズムの仮説

E. aerogenes の水素発生経路、水素の酸化還元電位、細胞内 pH と培地 pH の関係、NAD の酸化還元電位、膜結合ヒドロゲナーゼの活性の至適 pH、膜結合ヒドロゲナーゼの構造、と考察を重ねてきたことにより、NAD 経路の水素発生メカニズムがかなりはっきりと浮かび上がってきた。これらの考察をまとめると、図 7.4-1 に図示したように、水素発生反応は原形質膜 (plasma membrane) をはさんで、



の反応が起こっていると考えれば、熱力学的にも無理のない説明ができそうである。そこで、これから、細胞の外側で水素が発生するこのメカニズム仮説に基づいて、実験で得られた水素発生の活性を化学熱力学的に説明することを試みる。

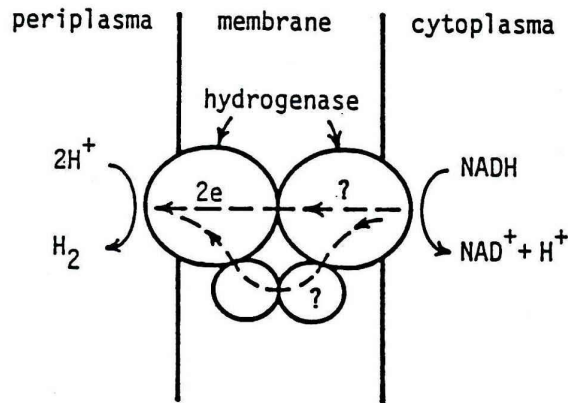


図 7.4-1 NADH-水素発生の電子伝達機構

細胞の内側の pH が 8.0 に保たれているとすると、NAD の酸化還元電位は式 (7.3.5) から次式のように表される。

$$E_{\text{NAD}} = -0.350 + 0.0296 \log\{[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]\} \quad (7.4.1)$$

水素の酸化還元電位は

$$E_{\text{H}_2} = -0.0592 \text{ pH} - 0.0296 \log(p_{\text{H}_2}) \quad (7.4.2)$$

で表されるから、式 (7.4.2) から式 (7.4.1) を引くと、

$$\Delta E = 0.350 - 0.0592 \text{ pH} - 0.0296 \log\{(p_{\text{H}_2})[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]\} \quad (7.4.3)$$

これが細胞の外と内の pH に基づく電位差である。(したがって、バクテリアが自分でエネルギー

第7章 水素発生とメカニズム

生成のために創り出す膜電位差は含んでいない。)

いま、水素分圧 1 atm、 $[NAD^+]/[NADH]=1$ であるとする、細胞の外と内の電位差は培地 pH の関数として、

$$\Delta E = -59.2(\text{pH} - 5.9) \quad \text{for } p_{H_2} = 1 \text{ atm}, [NAD^+]/[NADH] = 1 \quad (7.4.4)$$

で表される。ただし、電位は mV で表している。

もし、水素分圧 0.1 atm、 $[NAD^+]/[NADH]=1/20$ であるとする、電位差は、

$$\Delta E = -59.2(\text{pH} - 7.1) \quad \text{for } p_{H_2} = 0.1 \text{ atm}, [NAD^+]/[NADH] = 1/20 \quad (7.4.5)$$

で表される。図 7.4-2 に式 (7.4.4) と (7.4.5) を図示した。

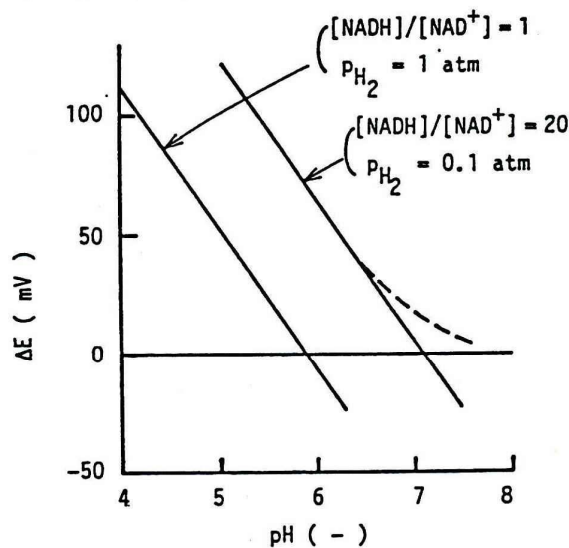


図 7.4-2 NADH-水素系の電位差と培地 pH の関係

ところで、微生物は Mitchell のプロトンポンプ説で説明される方法でエネルギーを生成していると考えられている⁸⁰⁻⁸⁷。この説によれば、バクテリアは、自ら細胞の外側のプロトン濃度を内側より高くし、プロトンが細胞の内側に流入するとき、そのエネルギーを利用して ATP を生成する(図 7.4-3 参照⁸⁸⁻⁹¹)。このプロトン濃度差は pH 差で 2 程度になる。このように、細胞の外側の pH がバクテリア自身によって小さくされるのであれば、培地の pH が 6.5~8.0 においては、細胞膜の近辺では、培地 pH より小さい pH になっていると考えられる。図 7.4-2 の点線は、このことを想定して引いた仮定電位差である。

図 7.4-2 からわかるように、電位差は培地 pH が小さくなればなるほど大きくなる。したがって、電位差のみで反応が進むのであれば、水素も pH が小さくなるに連れて発生しやすくなるはずである。しかるに、第 3 章の実験結果によれば(図 3.2-6 参照)、pH が 5.5 より小さいところでは水素発生速度は遅くなった。したがって、電位差だけで水素発生の活性を説明することはできない

ことがわかる。

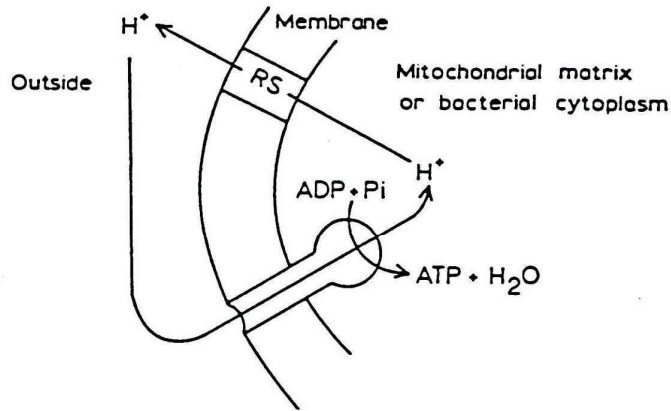


図 7.4-3 プロトンサイクルによるエネルギー生産

第3章第2節では、菌の増殖も pH の影響を受けることが示され、菌体生産量は、pH 7.0 までほぼ直線的に増加していた (図 3.2-3)。Hadjipetrou ら^{92,93)}は *E. aerogenes* の嫌気培養における菌体増殖と ATP 生成量の関係を調べ、1 mol ATP あたり 10.0 g-dry cell の菌体収率 (Y_{ATP} [g-dry cell/mol-ATP]) であることを報告している。この収率を使用すると、表 3.2-1 の菌体生産性 (P_{cell} [g-dry cell/h]) に基づく菌の ATP 生産性 (P_{ATP} [g-dry cell/h]) は、培地 pH の関数として次のように表される。

$$\begin{aligned}
 P_{ATP} &= P_{cell}/Y_{ATP} \\
 &= 3.8(\text{pH} - 4.4) \quad \text{for pH} < 7.0
 \end{aligned}
 \tag{7.4.6}$$

この ATP 生産性と pH の関係を、図 7.4-4 に図示した。

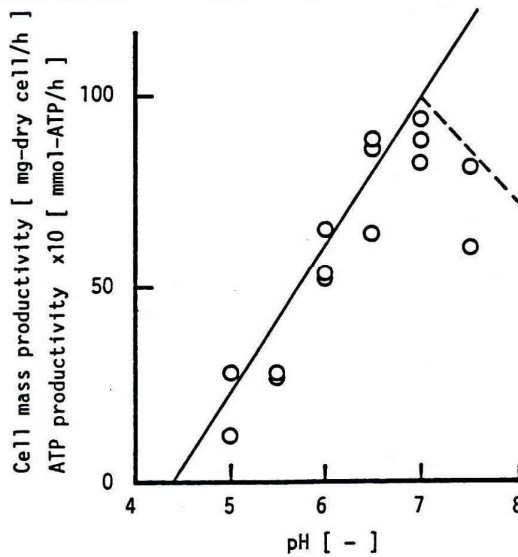


図 7.4-4 菌体生産性および ATP 生産性と pH との関係

さて、大腸菌類は、嫌気条件下では、Embden-Meyerhof 経路を通してグルコースから ATP を生成する。この経路では NADH の生成量は ATP の生成量に比例するので、ATP の生産性はすなわち NADH の生産性に等しい。水素発生速度は、電位差を維持するための NADH の供給速度にも制約されるから、水素発生反応の活性 (f_a) は、電位差と NADH の生成速度との積に比例すると考えられる。つまり、

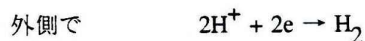
$$f_a \propto (\Delta E)(P_{ATP}) \quad (7.4.7)$$

で表されるであろう。式 (7.4.5) と (7.4.6) を式 (7.4.7) 代入し最大活性を 100 とすると、上式は

$$f_a = -56(\text{pH} - 5.75)^2 + 100 \quad \text{for } 4.4 < \text{pH} < 7.0 \quad (7.4.8)$$

となる。この式を図 7.4-5 に実線で図示した。pH>6.5 では ΔE は図 7.4-2 の点線で表された値になる可能性があるので、この値を用いて計算した活性を図 7.4-5 においても点線で示した。図中、○印は図 3.2-6 の実測値を最大水素発生速度に対する比発生速度で計算したものである。ただし、最大水素発生速度は 11.3 mmol/(g-dry cell h) であるとした。式 (7.4.8) で計算した曲線は、pH<6.5 の範囲で非常によく実測値と合っている。pH>6.5 においても、Mitchell のプロトンポンプ説で生体エネルギーが作られているならば、計算値は非常によく実測値と合うことがわかる。

このように、NAD 経路の水素発生は、原形質膜を挟んで



の反応が起こると考えるならば、化学熱力学的にも反応活性を無理なく説明できることが示された。

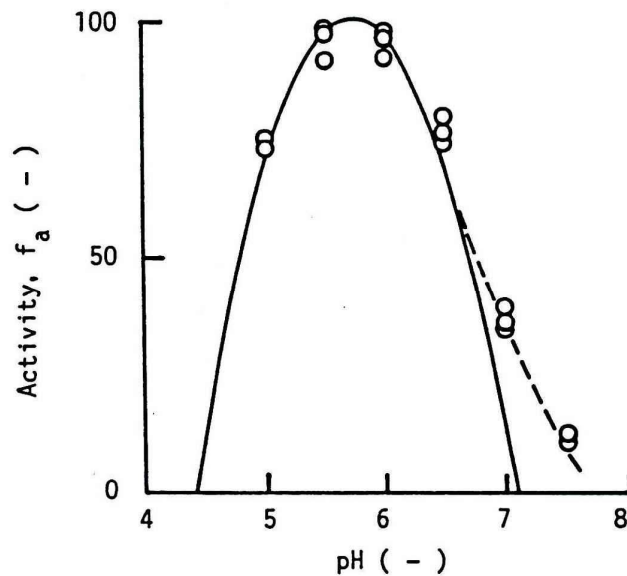


図 7.4-5 NADH-水素発生の電位差と菌体生産性に基づく理論活性曲線

7.4.2 考察

(1) 「細胞膜の両側で反応する」という水素発生メカニズムの仮説が非常に良く水素発生の活性を説明できることがわかった。しかし、まだ幾つも解決されなければならない問題が残されている。その1つとして、この仮説の証明に使用した式 (7.4.5) の条件がある。この条件は必ずしも適切であったとは言い難い。なぜなら、細胞内の $[NADH]$ と $[NAD^+]$ の濃度比について、Decker と Pfitzer は *Clostridium kluyveri* の増殖中の値として約 0.3 を報告しているからである⁹⁴⁾。*Enterobacter aerogenes* と *C. kluyveri* とでは単純に比べられないし、測定時の pH が重要な鍵をにぎっていると思われるが、 $[NADH]/[NAD^+]=20$ という設定値は大きすぎるかも知れない。したがって、*E. aerogenes* のみならず、多くの微生物の細胞内の $[NADH]$ と $[NAD^+]$ の濃度比に関するデータを手に入れる必要がある。

次に、水素分圧を 0.1 atm としたけれども、*E. aerogenes* の気相の分圧は約 0.3 atm であり、連続培養の時には約 0.5 atm にもなる。したがって、細胞壁と原形質膜の間の periplasma 空間において、実際にどのような水素圧になっているのか知る必要があるであろう。

さらに解明の必要な問題に電子伝達系の問題がある。Adams や Schlegel および多くの研究者が分離したヒドロゲナーゼは、BV (benzyl viologen)、MV (methyl viologen)、MB (methylene blue) など人工染料との間では電子の授受を行って水素の取り込み、発生を行うが、NAD、NADP、FMN、FAD などの生体物質とは試験管の中 (*in vitro*) ではほとんど電子の授受を行わないという問題がある。NAD が電子供与体あるいは電子受容体になったという報告は、Schneider らが *Alcaligenes eutrophs* H16 から分離した可溶性ヒドロゲナーゼだけのようである^{41,74,75)}。したがって、膜結合ヒドロゲナーゼでは特殊な電子伝達系が必要なかもしれない。あるいは、可溶性ヒドロゲナーゼは均一な pH 液の中で反応する酵素であるから NAD と *in vitro* でも反応するのであって、膜結合ヒドロゲナーゼの場合は、前節で提案したように、膜で隔てられた pH 勾配のようなものが必要なかも知れない。これらの問題は、膜結合ヒドロゲナーゼと NADH を実際に反応させて、水素発生を実証することで解決される問題であるが、今後の課題としたい。

(2) *E. aerogenes* は細胞膜の外側で水素生成反応をすることがわかったが、それでは、何故、水素を生成するのであろうか。とりわけ大きな疑問は、せっかく汲み出したプロトンを、何故、エネルギー生産に使わず無駄と思われる水素にして捨てるのであろうか。総じて生体反応に無駄な反応はないから、水素生成にも意味があるはずである。そこで注意を引くのは、水素発生は培地が増殖に不適當な小さい pH に移行すると活発になることである。これは、増殖条件と密接な関係があることを意味しているに違い。そうすれば、次のように微生物の水素発生の意味が考えられる。

「図 7.4.4 に見られるように、*E. aerogenes* は培地 pH が 7.0 付近に保たれていることを棲息条件として最も良しとする。然るに、自ら酸を代謝生成するために、培地 pH が小さくなり増殖に不適当な pH 環境に変化する。pH が 4.4 より小さくなると生存さえ危険になる。そこで、代謝経路を変えたりプロトンを気体水素に変えて自分の回りのプロトン濃度を調節する」と。

このように考えると、水素発生が増殖に不適当な小さい pH に移行すると活発になることも理解できるであろう。また、光合成微生物などの水素発生にも適用できるのではなかろうか。今後の検討課題としたい。

ところで、もし、水素発生が上述のようにプロトン濃度調節を目的としているなら、pH 5.0 における水素収率は 1 mol-H₂/mol-glucose であるべきではなかろうか。Neish と Ledingham の分析データ³⁰⁾ではそのようになっている。しかし、これも今後の検討課題としたい。

表 7.4-1 電子供与体、電子受容体の標準酸化還元電位¹⁾

Redox compound	E_0' (mV)
SO ₄ ²⁻ /HSO ₃ ⁻	-516
CO ₂ /formate ^a	-432
H ⁺ /H ₂	-414
S ₂ O ₃ ²⁻ /HS ⁻ + HSO ₃ ⁻	-402
Flavodoxin ox/red (E'_{01})	-371 ^d
Ferredoxin ox/red (E'_{01})	-398 ^e
NAD/NADH	-320
Cytochrome c ₃ ox/red	-290
CO ₂ /acetate ⁻	-290
S ⁰ /HS ⁻	-270
CO ₂ /CH ₄	-244
FAD/FADH ₂	-220
Acetaldehyde/ethanol	-197
Pyruvate ⁻ /lactate ⁻	-190
FMN/FMNH ₂	-190
Dihydroxyacetone phosphate/glycerol-phosphate	-190
HSO ₃ ⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻	-173
Oxaloacetate ²⁻ /malate ²⁻	-172
Flavodoxin ox/red (E'_{02})	-115 ^d
HSO ₃ ⁻ /HS ⁻	-116
Menaquinone ox/red (MK)	-74
APS/AMP + HSO ₃ ⁻	-60
Rubredoxin ox/red	-57
Acrylyl CoA/propionyl CoA	-15
Glycine/acetate ⁻ + NH ₄ ⁺	-10
2-Demethylvitamin K ₂ ox/red	+25
S ₄ O ₆ ²⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻	+24
Fumarate/succinate	+33
Ubiquinone ox/red	+113
S ₃ O ₆ ²⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻ + HSO ₃ ⁻	+225
NO ₂ ⁻ /NO	+350
NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	+433
Fe ³⁺ /Fe ²⁺	+772
O ₂ /H ₂ O	+818
NO/N ₂ O	+1175
N ₂ O/N ₂	+1355

7.5 ギ酸経路の水素発生メカニズムの提案

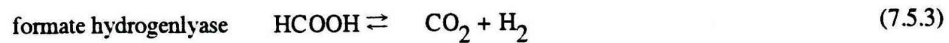
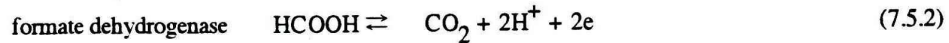
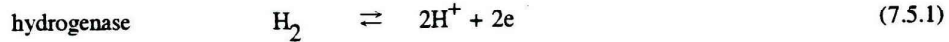
水素発生のもう一つの経路であるギ酸経路について考えてみよう。第1章でも述べたように、微生物の水素発生研究は、ギ酸塩を分解することを観察したのが始まりであった。したがって、表 7.5-1 に示すように、非常に古くから研究が行われている。中でも、Gest は10年ほどをかけてギ酸発生のメカニズムを研究している^{19-22,95,96}。にもかかわらず、表 7.1-2 に見られるように、いまだにギ酸の酸化還元電位さえ定まっていない。では何故定まらないのだろうか。まず、*E. coli* のギ酸-水素発生の研究の発展を検討し、次いで、ギ酸の標準酸化還元電位を求めてギ酸-水素発生のメカニズムを考えてみた。

表 7.5-1 ギ酸 - 水素発生に関する研究の歴史

1887	Hoppe-Seyler	Calcium formate, river mud
1892	Frankland	Mannitol
1901	Pakes & Jollyman	Formate
1932	Stephenson & Stickland	Formic hydrogenlyase
1934	Farkas, Farkas & Yudkin	Formate, D ₂ O
1937	Krebs	$\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$
1939	Ordal & Halvorson	$\text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}$ $2\text{H}^+ + 2\text{e} \rightleftharpoons \text{H}_2$
1955 1965	Gest et al.	MV, BV, MB → activity, mechanism
1962	Mortenson et al.	"ferredoxin"
1968 1972	Decker, Jungermann, Thauer	$\text{NADH} \rightarrow \text{Fd} \rightarrow \text{H}_2$
1970 1974	Jungermann, Thauer	$\text{Fd} \rightarrow \text{NADH} \xrightarrow{\text{CO}_2} \text{HCOOH}$
1972	Reddy, Bryant, Wolin	$\text{HCOOH} \rightarrow \text{NADH} \rightarrow \text{Fd} \rightarrow \text{H}_2$

7.5.1 ギ酸-水素発生の研究の歴史

1932年、Stephenson と Stickland は *Bacterium coli* (後に *Escherichia coli* と呼ばれるようになった) などのギ酸-水素発生酵素に、ヒドロゲナーゼ (hydrogenase)、ギ酸デヒドロゲナーゼ (formate dehydrogenase)、それにギ酸ヒドロゲンリアーゼ (formate hydrogenlyase) という3種の酵素があることを提唱した^{97,98)}。これらの酵素は、それぞれ次の反応を触媒する酵素である。



1934年には、Farkas らが重水とギ酸塩を使用してギ酸-水素発生を調べ、気相と液相の D/H の割合から、次の反応と考えるのが妥当であるとした⁹⁹⁾。



なぜなら、式 (7.5.4) と (7.5.5) の反応ならば、 $\text{D}\cdot + \text{D}\cdot$ の反応によって D_2 の発生も可能であるが、式 (7.5.3) の反応では HD しか発生しないからである。

1936年、Woods はギ酸生成を研究し、水素と重碳酸イオンが1:1の割合で取り込まれ、ギ酸が1の割合で生成することを示した¹⁰⁰⁾。



彼は、また、重碳酸イオンの取り込みには二酸化炭素が存在していなければならず、重碳酸イオン、または、二酸化炭素のみでは取り込まれないことを示した。

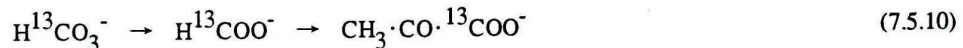
1937年には、Krebs がフマル酸の好気分解の研究から、ギ酸分解の水素はすべて水分子の $\ast\text{H}$ によるとして次式の反応を提案した¹⁰¹⁾。



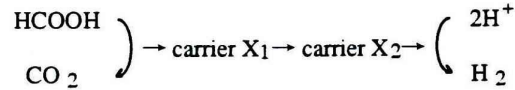
1939年に、Ordal と Halvorson はギ酸ヒドロゲンリアーゼの存在を否定し、Farkasの実験結果と Ordal と Halvorson の提案を取り入れた次のような反応系が、最もよくギ酸-水素発生を説明できるとした¹⁰²⁾。



1945年には、Utter らがピルビン酸のホスホクロラスティック反応の研究過程で、逆反応として重炭酸はまずギ酸に変換され、それからピルビン酸に変換されうること示した¹⁰³⁾。

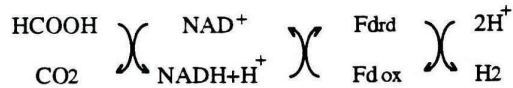


1955年から1965年にかけて、Gest らは BV、MV、MBなど人工色素を使用して、ギ酸ヒドロゲンリアーゼ酵素複合体 (formate hydrogenlyase enzyme complex) という電子伝達系を考えた^{95,96}。



1962年には、Mortensonらが電子伝達で重要な働きをする Fe-S タンパク質 “フェレドキシン (ferredoxin, Fd)” を発見し¹²)、以後、このタンパク質を組み込んだ電子伝達系が考えられるようになった^{7,13,14,17,41,104-106}。

1972年には、Reddy らが、*Methanobacillus omelianskii* から単離した S organism と呼ぶ菌の Fd と、ギ酸、NAD、細胞抽出物からなる *in vitro* システムで、水素と二酸化炭素が発生することを示し、



という反応系を提案した¹⁰⁷。

以上が、*E. coli* あるいは S organism を使用したギ酸-水素発生の主な研究の歴史である。

表 7.5-2 化学熱力学データ

物質	ΔG_f° [kcal/mol]
HCOOH	-89.0
HCOO ⁻ (m=1)	-83.9
CO ₂ (g)	-94.254
(l)undissoc.	-92.26
CO ₃ ²⁻ (m=1)(aq)	-126.17
HCO ₃ ⁻ (m=1)(aq)	-140.26
H ₂ CO ₃ (m=1)(aq)	-148.94
H ₂ O (l)	-56.687
(g)	-54.634

7.5.2 ギ酸の標準酸化還元電位

ギ酸は水溶液では次のように解離して平衡状態をつくる。



ギ酸、ギ酸イオンの標準生成自由エネルギーは、表 8.5-2 に示すように、-89.0 と -83.9 kcal/mol で

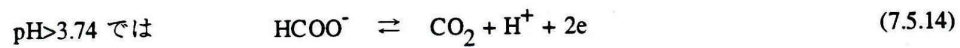
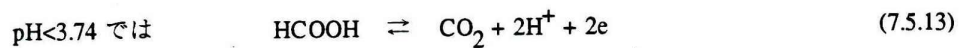
第7章 水素発生とメカニズム

ある。よって、その pK 値は

$$\begin{aligned} \text{pK} &= -\log K = \Delta G / (2.303)RT & (7.5.12) \\ &= (-83.9+89.0)(1000)/(2.303)/(1.987)/(298.15) \\ &= 3.74 \end{aligned}$$

になる。つまり、 $\text{pH} > 3.74$ では式 (7.5.11) の平衡は右に移り、ギ酸はギ酸イオンとして存在する割合が多くなる。

したがって、ギ酸の分解反応は



で表される。

次に、分解で発生した二酸化炭素について考えてみると、



または、



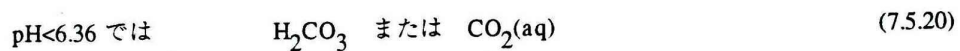
の2つの解離が考えられる。

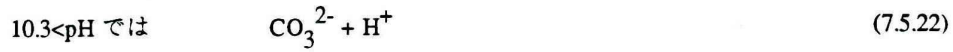
(A)は、二酸化炭素は水に非常に溶け易いので、微生物が発生した二酸化炭素はただちに水と水和すると考えた場合で、発生した二酸化炭素は式 (7.5.15) と (7.5.16) の平衡状態にあると考える。したがって、生じた炭酸は水の中で式 (7.5.17) と (7.5.18) の2段階に解離し、そのpK値は式 (7.5.12) より次の様に求まる。

$$\begin{aligned} \text{pK}_1 &= (-140.26+148.94)(1000)/(2.303)/(1.987)/(298.15) \\ &= 6.36 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{pK}_2 &= (-126.17+140.26)(1000)/(2.303)/(1.987)/(298.15) \\ &= 10.3 \end{aligned}$$

つまり、発生した二酸化炭素は





の状態が存在していると考えられる。したがって、ギ酸の分解反応式と酸化還元電位は

pH < 3.75 では

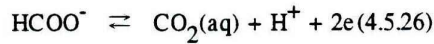


$$\Delta G_0(\text{pH } 0) = (-92.26 + 89.0) = -3.26 \quad (7.5.24)$$

$$\begin{aligned} E_0 &= -\Delta G_0(\text{pH } 0)/(nF) \\ &= -(-3.26)/(2 \times 23.063) = 0.0706 \end{aligned}$$

$$E = -0.071 - 0.0592\text{pH} + 0.0296 \log\{[\text{CO}_2]/[\text{HCOOH}]\} \quad (7.5.25)$$

3.75 < pH < 6.36 では



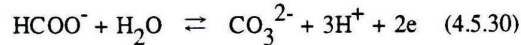
$$E = -0.293 - 0.0296(\text{pH} - 3.75) + 0.0296 \log\{[\text{CO}_2]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.27)$$

6.36 < pH < 10.3 では



$$E = -0.370 - 0.0592(\text{pH} - 6.37) + 0.0296 \log\{[\text{HCO}_3^-]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.29)$$

10.3 < pH では



$$E = -0.602 - 0.0887(\text{pH} - 10.3) + 0.0296 \log\{[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.31)$$

で表されるであろう。

一方、(B)は、ギ酸分解で発生した二酸化炭素が気体であると考えた場合で、その時には解離状態は式(7.5.19)と(7.5.18)で考えなければならない。この場合には、pK値は次のように求まる。

$$\begin{aligned} \text{pK}_1' &= (-140.26 + 94.254 + 56.687)/(2.303)/(1.987)/(298.15) \\ &= 7.83 \end{aligned}$$

$$\text{pK}_2 = 10.3$$

つまり、発生した二酸化炭素は



の状態が存在していると考えられる。したがって、ギ酸の分解反応式と酸化還元電位は

pH<3.75 では



$$\Delta G_0(\text{pH } 0) = (-94.254 + 89.0) = -5.254 \quad (7.5.36)$$

$$E_0 = -(-5.254)/(2 \times 23.063) = 0.1139$$

$$E = -0.114 - 0.0592\text{pH} + 0.0296 \log\{(\text{pCO}_2)/[\text{HCOOH}]\} \quad (7.5.37)$$

3.75<pH<7.83 では



$$E = -0.336 - 0.0296(\text{pH}-3.75) + 0.0296 \log\{(\text{pCO}_2)/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.39)$$

7.83<pH<10.3 では



$$E = -0.457 - 0.0592(\text{pH}-7.83) + 0.0296 \log\{[\text{HCO}_3^-]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.41)$$

10.3<pH では



$$E = -0.602 - 0.0887(\text{pH}-10.3) + 0.0296 \log\{[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.43)$$

で表されるであろう。これらpHと標準酸化還元電位との関係をまとめると、図 7.5-1 のようになる。

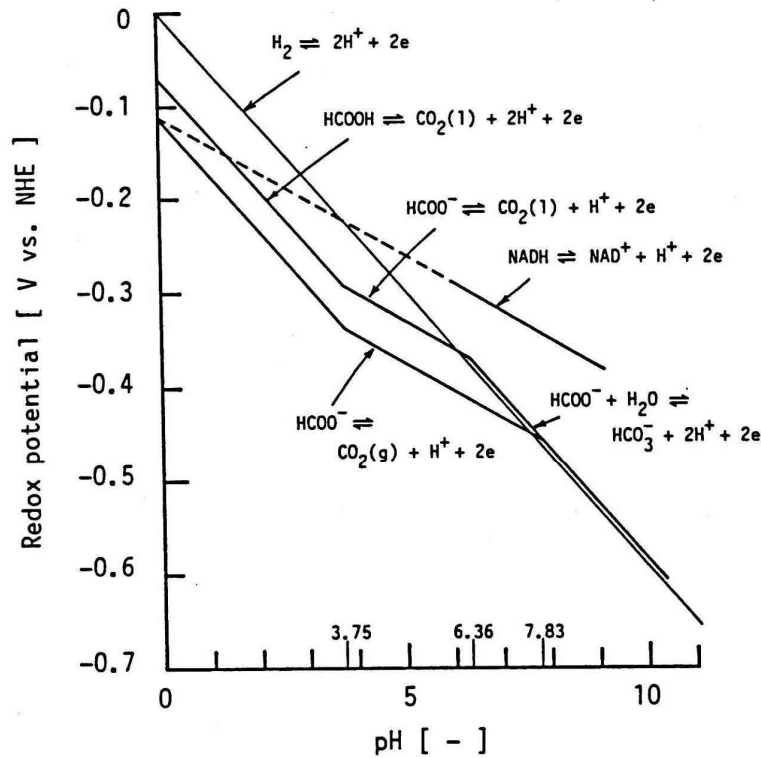


図 7.5-1 ギ酸の酸化還元電位と pH の関係

このように、ギ酸の分解による酸化還元電位は、分解によって生じる二酸化炭素が、水に溶けた状態なのか気体の状態なのか、あるいは、ギ酸がギ酸のまま反応するのかギ酸イオンで反応するのかによって、それぞれ異なるのである。pH 7.0 における標準酸化還元電位を計算すると、

$$\text{CO}_2(\text{aq}) \text{ のとき、式 (4.5.29) より } E_0'(\text{pH } 7) = -0.407 \text{ V} \quad (7.5.44)$$

$$\text{CO}_2(\text{g}) \text{ のとき、式 (4.5.39) より } E_0'(\text{pH } 7) = -0.432 \text{ V} \quad (7.5.45)$$

したがって、Thauerらは二酸化炭素が気体状態で発生するとして標準酸化還元電位を計算していたことがわかる。

7.5.3 ギ酸-水素発生のメカニズム

Brousseau らは下水の沈澱物から単離した *Citrobacter intermedius* の水素発生能を、pHコントロールをしながら測定した¹⁰⁸⁾。この菌は、はじめは *Escherichia coli* と考えられていたほど *E. coli* に代謝性質が似ている菌である^{109,110)}。したがって、グルコースから水素を発生する経路は、ギ酸経路であると考えられる。そこで、彼らの実験データを利用して、ギ酸-水素発生の化学熱力学的説明を試みてみよう。

図 7.5-2 は彼らの測定データである。このデータから菌体生産性と水素発生速度を計算すると、図 7.5-3 と 7.5-4 のようになった。

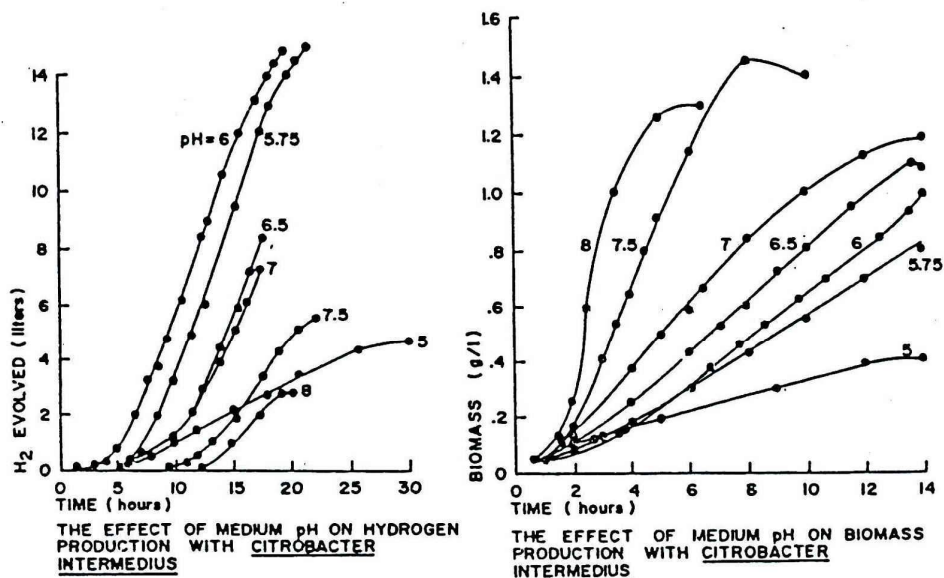


図 7.5-2 *C. intermedius* の水素発生と培地 pH の影響¹⁰⁸⁾

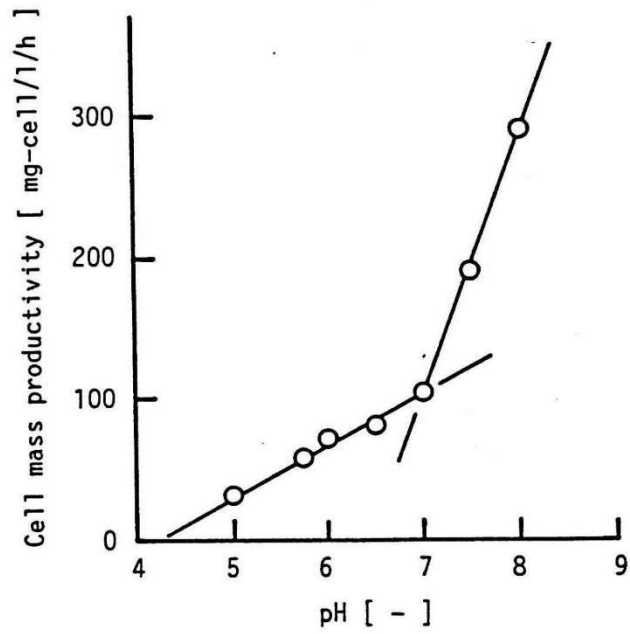


図 7.5-3 *C. intermedius* の菌体生産性と培地 pH の関係 [文献108から作成]

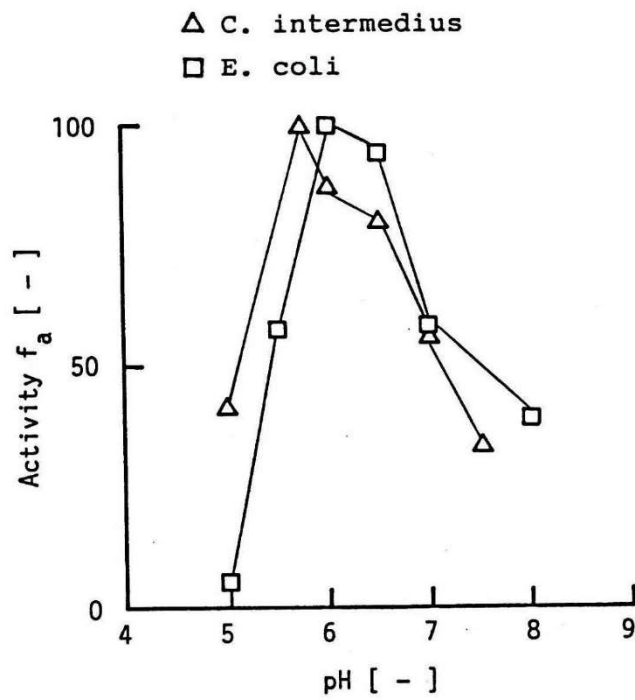


図 7.5-4 *C. intermedius* と *E. coli* の水素発生活性 [文献108,97から作成]

C. intermedius の菌体生産性 (図 7.5-3) は、筆者の実験結果と同じように、pH 5 から 7 まで直線的に増加している。しかし、pH 7 から 8 までは、*E. aerogenes* とは異なって、菌体生産性が爆発的に増加しており、*C. intermedius* の増殖にはアルカリ側が適しているようである。データ個数が少ないので水素発生速度 (図 7.5-4) のバラツキが大きい、pH 6 辺りが水素発生の至適 pH のようである。菌の増殖に適した pH 7.5~8.0 では、水素発生速度は非常に遅くなり、培地 pH の影響を強く受けている。

ところで、7.3 節でも述べたように、バクテリアの細胞内 pH は培地 pH が変化してもほぼ一定に保たれている。したがって、細胞内でギ酸イオンの分解が起こり水素を発生するのであれば、水素とギ酸イオンとの酸化還元電位差に変化は生じないから、培地の pH 変化はなんら関与しないはずである。それにもかかわらず、水素発生が培地 pH の影響を受けているということは、ギ酸分解経路の水素生成反応も、細胞の外側で起きているということである。また、ギ酸イオンはグルコース分解の最終産物の一つとして容易に細胞の外に送り出されているから、細胞内で水素発生が起きているなら、ギ酸イオンの分解自身も細胞の外で起きていると考えるのが自然であろう。したがって、ギ酸分解の水素発生は、ギ酸分解も水素生成も、いずれも細胞の外側で起きていると考えられる。そこで、ギ酸イオンと水素の酸化還元電位差を培地 pH の関数として表すと、

(i) $\text{CO}_2(\text{aq})$ のとき、式 (7.4.12)、(7.5.27)、(7.5.28) から

3.75 < pH < 6.36 では

$$\Delta E = 0.182 - 0.0296\text{pH} - 0.0296 \log\{[\text{CO}_2]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.46)$$

$$[\text{CO}_2]/[\text{HCOO}^-] = 1 \text{ のとき} \quad \Delta E = -0.0296(\text{pH} - 6.15) \quad (7.5.47)$$

6.36 < pH < 10.3 では

$$\Delta E = -0.007 - 0.0296 \log\{[\text{HCO}_3^-]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.48)$$

$$[\text{CO}_2]/[\text{HCOO}^-] = 1 \text{ のとき} \quad \Delta E = -0.007 \quad (7.5.49)$$

となる。一方、

(ii) $\text{CO}_2(\text{g})$ のとき、式 (7.4.12)、(7.5.39)、(7.5.41) から

3.75 < pH < 7.83 では

$$\Delta E = 0.225 - 0.0296\text{pH} - 0.0296 \log\{(\text{p}_{\text{CO}_2})/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.50)$$

$$(\text{p}_{\text{CO}_2})/[\text{HCOO}^-] = 1 \text{ のとき} \quad \Delta E = -0.0296(\text{pH} - 7.60) \quad (7.5.51)$$

7.83 < pH < 10.3 では

$$\Delta E = -0.007 - 0.0296 \log\{[\text{HCO}_3^-]/[\text{HCOO}^-]\} \quad (7.5.52)$$

となる。これらの関係をまとめると図 7.5-5 のようになる。

第7章 水素発生とメカニズム

次に、*C. intermedius* の菌体収率が *E. aerogenes* と同じ 10.0 g-dry cell/mol-ATP であるとする、ATP 生産性 (P_{ATP}) は

4.20 < pH < 7.0 では

$$P_{ATP} = 3.71(\text{pH} - 4.20) \quad (7.5.53)$$

7.0 < pH < 8.0 では

$$P_{ATP} = 18.6(\text{pH} - 6.44) \quad (7.5.54)$$

となる。

ここでも、水素発生速度が電位差と ATP 生産性との積に比例すると考えられるから、水素発生反応の標準状態における活性 (f_a) は、式 (7.4.7) から

(i) $\text{CO}_2(\text{aq})$ のとき

4.20 < pH < 6.36 で

$$f_a(\text{aq}) = -106(\text{pH} - 5.17)^2 + 100 \quad \text{for } P_{\text{H}_2} = 1 \text{ atm, } [\text{HCOO}^-]/[\text{CO}_2] = 1 \quad (7.5.55)$$

(ii) $\text{CO}_2(\text{g})$ のとき

4.20 < pH < 7.0 で

$$f_a(\text{g}) = -34.6(\text{pH} - 5.90)^2 + 100 \quad \text{for } P_{\text{H}_2} = 1 \text{ atm, } [\text{HCOO}^-]/(P_{\text{CO}_2}) = 1 \quad (7.5.56)$$

にそれぞれなる。

これらの関係を図 7.5-6 に示した。図中、△印は Brosseau ら¹⁰⁸⁾のデータを、□印は Stephenson と Stickland⁹⁷⁾のデータを活性で表したものである。ギ酸分解で発生した二酸化炭素が気体であるとしたときの活性曲線は、実測値とかなり良くあっている。したがって、ギ酸イオンの分解と水素発生が細胞の外側で起きているとする仮定は妥当であるといえる。

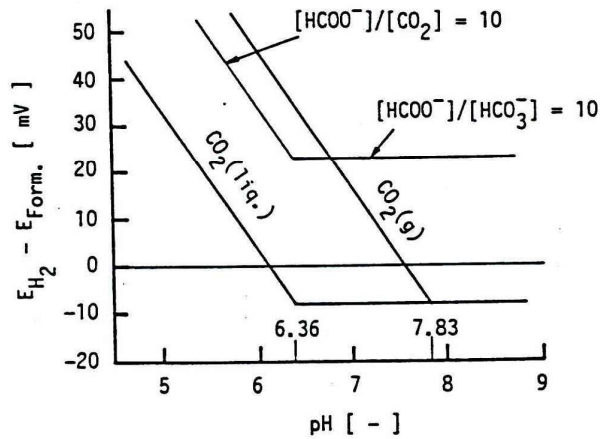


図 7.5-5 水素 - ギ酸の電位差と pH の関係

それでは細胞の外側にどのように酵素が配置しているであろうか。Farkas の重水素発生、Woods の重炭酸イオンの取り込み、Ordal と Halvorson のプロトン-重炭酸イオン分解、Gest らの電子伝達系、などを考慮すると、図 7.5-7 に示す酵素-電子伝達系であると考えられる。

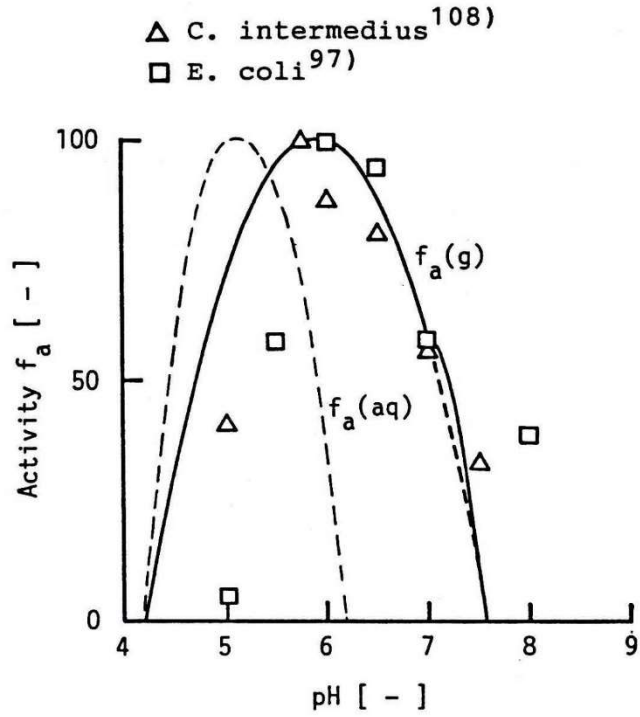


図 7.5-6 ギ酸 - 水素発生の電位差と菌体生産性に基づく理論活性曲線

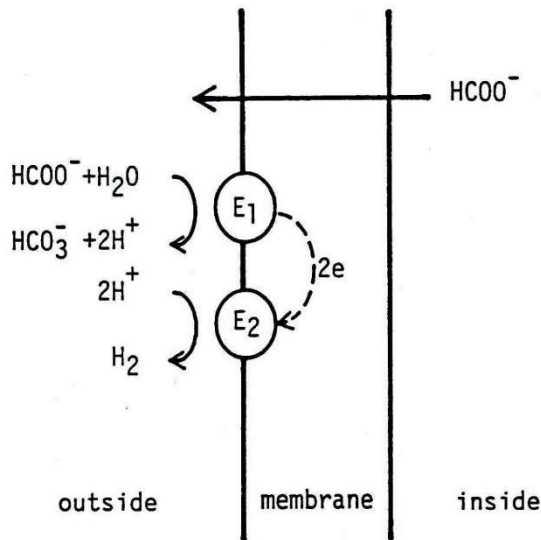


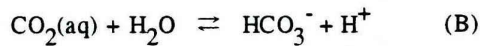
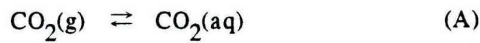
図 7.5-7 ギ酸 - 水素発生の電子伝達機構

7.5.4 考察

水素発生の活性に対する熱力学的考察では、生成する二酸化炭素は気体であると考えた方が、よく活性を説明できた。しかし、従来からの研究に依れば、重碳酸イオンの状態として考えることをよしとする。Woods は *Bact. coli* によるギ酸生成反応において、次式の反応は



$\text{CO}_2(\text{g})$ が存在していなければ進まないし、 $\text{CO}_2(\text{g})$ のみで HCO_3^- が存在しないときも、反応は進まないと言っている¹⁰⁰⁾。これは、ギ酸生成、あるいはギ酸分解反応にかかわっているのは HCO_3^- であるが、 HCO_3^- の濃度変化に対して反応は非常に敏感で、式 (A)、(B) で表される二段階の反応のうち、式 (A) の反応が律速であることを意味していると思われる。



熱力学的には気相の二酸化炭素で考えなければならない理由は、このようなところにあるのではなかろうか。

図 7.5-8 はギ酸デヒドロゲナーゼの反応機構を考えたものである。前述の諸種の検討を考慮すると、図の反応機構は最も良く現象を説明できると思われるが、これは今後の課題としたい。

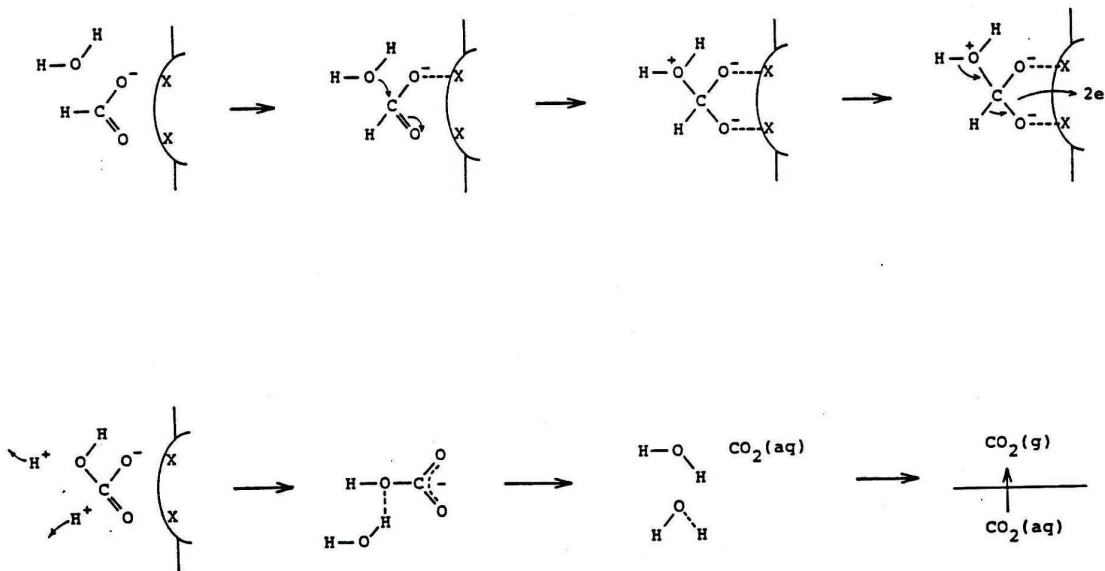


図 7.5-8 ギ酸 - 水素発生の酵素反応メカニズム

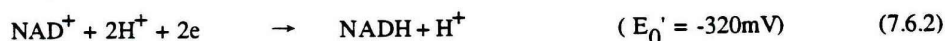
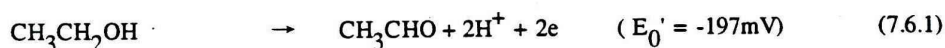
7.6 結論

生物の反応機構は、多くの酵素が関与しているために、非常に複雑な経路が考えられている。そして、異なった微生物なら、同じ反応でも異なった反応経路、異なった酵素系が存在しうるので、例としてピルビン酸の分解反応経路を取り上げて見ると、図 7.6-1 に示すように、わずかつつ違った3つの説が提案され、これらは関与する微生物が異なっていたり条件が異なっているから、いずれも受け入れられている。しかし、詳細に検討すると、どの反応経路も熱力学的あるいは機構的に無理な部分を残している。

水素発生に関与する Fd の還元について検討してみれば、*Clostridium* のシステムでは TPP (thiamine pyrophosphate) によってなされ、*Escherichia coli* のシステムではギ酸によってなされるとしている。ところが、ギ酸は細胞の内外を移動できるので、ギ酸の反応では細胞膜に結合した Fd が単独で酸化還元反応を起こすと考えるのに対して、TPP はピルビン酸デヒドロゲナーゼと結合して複合酵素系を構成していると考えられているから、TPP が Fd を還元するために TPP と Fd の間に電子伝達鎖が存在すると考える。このように、同じ Fd の還元でも全く異なった機構が提唱されている。しかし、ギ酸を代謝生成しないとする *Clostridium* を用いた実験を検討すると、代謝産物を分析した時の培地の pH は 6.0 より低く、そのような pH では仮にギ酸を生成していても、直ちに分解しているだろうから検出されるはずがないのである。また、Fd の標準酸化還元電位は、表 8.4-1 に示したように、-398 mV であるとされており、水素やギ酸の標準酸化還元電位より高い。したがって、ギ酸または TPP で Fd が還元されるとしても、プロトンを還元するには電位が高いから、水素分圧が低いときにのみ反応が進むと考えざるを得なくなる。ただし、この場合には、図 7.5-7 の機構でギ酸が分解されるとすれば、培地の pH 次第で Fd の電位より水素の電位の方が高くなるので、水素分圧の問題も解消される。

一方、ミトコンドリアシステムとして示した *E. coli* の好氣的ピルビン酸分解では、ギ酸は生成されずに重炭酸イオンと NADH になるとされている。しかし、反応の収支をよくみると、*E. coli* システムとミトコンドリアシステムの違いは、 H_2 まで還元されるか NADH に留まっているかだけである。さらに反応を細かく見比べてみると、いずれも、ピルビン酸はアセチルCoAとその残余になっており、好気分解は NAD の還元のための酵素系を提唱しているだけになる。ところが、FAD の酸化還元電位 (-220 mV) は NAD (-320 mV) より高いから、FAD が酸化されるために、NADH は酸素で直ちに酸化され、NADH 濃度は常に低くなっていると云う条件を付けて反応を説明しているのである。

別の例として、正の次の反応式で表わされる血液中のアルコールが肝臓でアルデヒドに分解される反応について検討して見よう。



アルコール分解反応は肝細胞の中で進行すると一般的に考えられており¹¹¹⁻¹¹⁷⁾、ラットやうさぎの肝臓内 NAD 濃度比 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ は 4~7 であることが報告されている^{118,119)}。この反応は、 $\Delta G_0' = +5.67 \text{ kcal/mol}$ にもなる極めて正の反応で、平衡定数 k_{eq} は 6.99×10^{-5} と非常に小さい。したがって、もし肝細胞内でアルコール分解反応が起こるとすれば、 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 10$ であると仮定しても、

$$[\text{CH}_3\text{CHO}]/[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}] < 6.99 \times 10^{-4} \approx 1/1430 \quad (7.6.4)$$

という濃度条件を満たすところまでしか反応は進まない。つまり、 CH_3CHO がほんのわずか生成するだけでも反応は止まることになる。しかし、赤羽らによれば^{120,121)}、血液中のアルデヒドとアルコールの濃度比は最高で $[\text{CH}_3\text{CHO}]/[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}] \approx 1/141$ にもなっており、はるかに反応が進んでいる。この濃度比を達成するには NAD の濃度比 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ は 100 以上にもならなければならない。そのため、肝細胞内では酵素に結合した状態で多数の NAD^+ が存在すると考えている^{122,123)}。

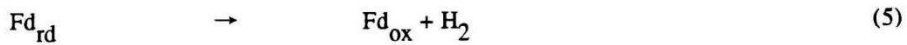
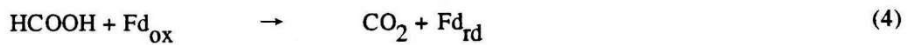
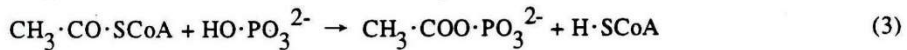
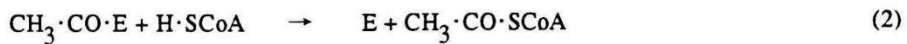
このような反応も、肝細胞の外で、つまり血液側 (pH=7.4) で式 (7.6.1) の反応が進み、細胞内 (pH=6.9)¹²⁴⁾ で式 (7.6.2) の反応が進むと考えれば、実測のアルデヒド/アルコール濃度比を使用しても NAD 濃度比は、

$$[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] \approx 13 \quad (7.6.5)$$

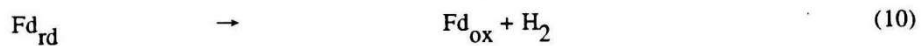
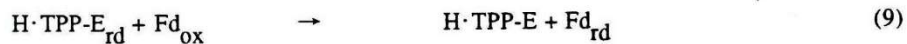
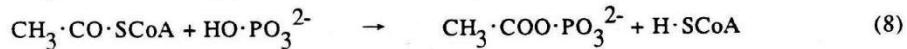
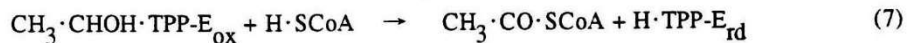
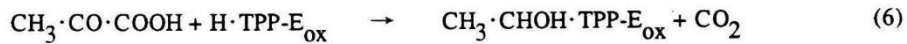
と非常に小さくなり、4~7 と報告されている実験事実に近づくのである。

以上のように、生体反応は複合反応であることから、単独反応では熱力学的に説明が付きにくいことでも、反応が進行するとされてきた。しかも、これらの反応は、常に、同一の pH 条件下で進むと考えられてきた。NAD - 水素発生、ギ酸 - 水素発生の機構が永い間ジレンマに陥っていたのは、こういった固定観念の下でしか反応を取り上げなかったことにある。しかし、本章で示したように、反応活性が pH によって影響される酸化還元反応の中には、「膜結合酵素が細胞膜の両側で反応する」と考えることで、熱力学的に説明が付きにくかった反応でも、容易に説明の付くことが明らかになり、今後の研究に与える影響はかなり大きいものとする。

(1) *E. coli* system [文献28, pp.239-241]



(2) Clostridial system [文献28, p.226]



(3) Mitochondrial system [文献32, p.439]

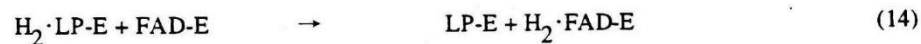
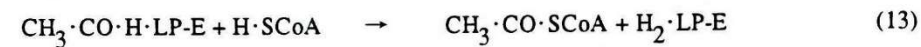
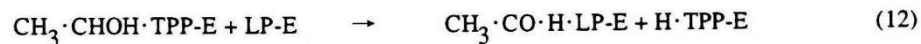
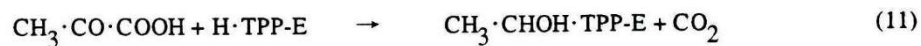


図 7.6-1 水素発生反応とNADH生成反応

参考文献

- 1 Thauer, R.K., K. Jungermann and K. Decker; *Bacteriol. Rev.*, 41, 100-180(1977)
"Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria"
- 2 東京化学同人; 生化学データブック, (1980)
"生化学データブック"
- 3 Suzuki, S. and I. Karube; 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版, 119-171(1979)
"微生物電池"
- 4 Wood, W.A.; in *The Bacteria*, vol.2, (Gunsalus, I.C. and R.Y. Stanier eds), Academic Press, New York, 59-150(1961)
"Fermentation of carbohydrates and related compounds."
- 5 Thauer, R.K., K. Jungermann, H. Henninger, J. Wenning and K. et al. ; *Eur. J. Biochem.*, 4, 173-180(1968)
"The energy metabolism of *Clostridium kluveri*."
- 6 Karube, I., T. Matsunaga, T. Otsuka, H. Kayano and S. Suzuki; *Biochim. Biophys. Acta*, 637, 490-495(1981)
"Hydrogen evolution by co-immobilized chloroplasts and *Clostridium butyricum*"
- 7 Chen, J. S. and L. E. Mortenson; *Biochim. Biophys. Acta*, 371, 283-298(1974)
"Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5."
- 8 Fredricks, W.W. and E.R. Stadtman; *J. Biol. Chem.*, 240, 4065-4071(1965)
"The role of ferredoxin in the hydrogenase system from *Clostridium kluveri*."
- 9 Jungermann, K., E. Rupprecht, C. Ohrloff, R. Thauer and K. D et al. ; *J. Biol. Chem.*, 246, 960-963(1971)
"Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluveri*."
- 10 Jungermann, K., R. K. Thauer, G. Leimenstoll and K. Decker; *Biochim. Biophys. Acta*, 305, 268-280(1973)
"Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*."
- 11 Jungermann, K. R. K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff and K. et al. ; *FEBS Lett.*, 3, 144-146(1969)
"Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluveri*."
- 12 Mortenson, L. E., R. C. Valentine and J. E. Carnahan; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 7, 448-452(1962)
"An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*."
- 13 Mortenson, L. E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 18-25(1966)
"Components of cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum* required for ATP-dependent H₂ evolution from dithionite and for N₂ fixation."
- 14 Mortenson, L. E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 81, 71-77(1964)
"Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*."
- 15 Jungermann, K. and G. Schon; *Arch. Microbiol.*, 99, 109-116(1974)
"Pyruvate formate lyase in *Rhodospirillum rubrum* Ha adapted to anaerobic dark conditions."
- 16 Thauer, R.K., E. Rupprecht, C. Ohrloff, K. Jungermann and K. et al. ;

- J. Biol. Chem., 246, 954-959(1971)
"Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluveri*."
- 17 Valentine, R.C., L.E. Mortenson and J.E. Carnahan; J. Biol. Chem., 238, 1141-1144(1963)
"The hydrogenase system of *Clostridium pasteurianum*."
- 18 Yagi, T.; 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版, 75-118(1979)
"水素の発生"
- 19 Gest, H. and H. D. Peck, Jr.; J. Bacteriol., 70, 326-334(1955)
"A study of the hydrogenlyase reaction with systems derived from normal and anaerogenic coli-aerogenes bacteria."
- 20 Gest, H.; J. Bacteriol., 63, 111-121(1952)
"Properties of cell-free hydrogenases of *Escherichia coli* and *Phodospirillum rubrum*."
- 21 Peck, H. D. Jr. and H. Gest; J. Bacteriol., 71, 70-80(1956)
"A new procedure for assay of bacterial hydrogenases."
- 22 Peck, H. D. Jr. and H. Gest; J. Bacteriol., 73, 706-721(1957)
"Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria."
- 23 Lichstein, H. C. and R. B. Boyd; J. Bacteriol., 65, 617-618(1953)
"The formic hydrogenlyase system of *Aerobacter aerogenes*."
- 24 Wilson, J., L.O. Krampitz and C.H. Werkman; Biochem. J., 42, 598-600(1948)
"Reversibility of a phosphoroclastic reaction."
- 25 Yagi, T., and H. Ochiai; Hydrogen energy system, Proceedings of the 2nd world hydrogen energy conference, Zurich, 1293-1307(1978)
"Attempts to produce hydrogen by coupling hydrogenase and chloroplast photosystems."
- 26 Jungermann, K., G. Leimenstoll, E. Rupprecht and R. K. Thau et al.; Arch. Mikrobiol., 80, 370-372(1971)
"Demonstration of NADH-ferredoxin reductase in two saccharolytic clostridia."
- 27 Thauer, R. K., K. Jungermann, E. Rupprecht and K. Decker; FEBS Lett., 4, 108-112(1969)
"Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluveri*."
- 28 Gottschalk, G.; Bacterial Metabolism, Springer-Verlag, New York, (1979)
""
- 29 Blackwood, A. C., A. C. Neish and G. A. Ledingham; J. Bacteriol., 72, 497-499(1956)
"Dissimilation of glucose at controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of *Escherichia coli*."
- 30 Neish, A. C. and G. A. Ledingham; Can. J. Research, Sec. B, 27, 694-704(1949)
"Production and properties of 2,3-butanediol"
- 31 Doelle, H.W.; Bacterial Metabolism, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York, (1975)
""
- 32 Lehninger, A.L.; Principles of biochemistry, Worth Publishers, Inc., (1982)
"Principles of biochemistry."
- 33 White, A., P. Handler, and E.L. Smith; ホワイト 生化学 [1], 第4版, 廣川書店, (1968)
"Principles of Biochemistry"
- 34 Thauer, R.K.; J. Bacteriol., 114, 443-444(1973)

- "CO₂ reduction to formate in *Clostridium acidurici*."
- 35 Thauer, R.K.; FEBS Letters, 27, 111-115(1972)
"CO₂-reduction to formate by NADPH. The initial step in the total synthesis of acetate from CO₂ in *Clostridium thermoacetium*."
- 36 Padan, E., D. Zilberstein and H. Rottenberg; Eur. J. Biochem., 63, 533-541(1976)
"The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells."
- 37 Ramos, S., S. Schuldiner and H. R. Kaback; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1892-1896(1976)
"The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles."
- 38 Clark, W.M.; Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, The Williams & Wilkins Com., 139-191(1960)
"Oxidation-reduction potentials of organic systems."
- 39 Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov; Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 28, 139-191(1985)
"Production of Molecular Hydrogen in Microorganisms"
- 40 Zajic, J. E., N. Kosaric and J. D. Brosseau; Adv. Biochem. Eng., 9, 57-109(1978)
"Microbial production of hydrogen"
- 41 Adams, M. W. W., L. E. Mortenson and J. S. Chen; Biochim. Biophys. Acta, 594, 105-176(1981)
"Hydrogenase"
- 42 Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Willison and Y. Jouanneau; Adv. Microb. Physiol., 26, 155-234(1985)
"Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria."
- 43 Schlegel, H.G. and K. Schneider; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 15-44(1978)
"Introductory report: distribution and physiological role of hydrogenase in microorganisms."
- 44 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; Biochem. J., 183, 11-22(1979)
"Purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*."
- 45 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; Arch. Biochem. Biophys., 195, 288-299(1979)
"Properties of the solubilized membrane-bound hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*."
- 46 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; Biochem. Biophys. Res. Comm., 77, 730-737(1977)
"Isolation of the membrane-bound hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*."
- 47 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; Biochem. Soc. Trans., 6, 1339-41(1978)
"Solubilization and partial purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*."
- 48 Adams, M.W. and D.O. Hall; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 159-169(1978)
"Physical and catalytic properties of the hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*."
- 49 Bell, G.G., J. Legall and H.D. Peck, Jr.; J. Bacteriol., 120, 994-997(1974)
"Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in *Desulfovibrio gigas*."
- 50 Benemann, J.R. and P.S. Hallenbeck; in Hydrogenase; Their Catalytic

- Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 395-413(1978)
"Basic and applied studies of hydrogenase in cyanobacteria."
- 51 Bernhard, T. and G. Gottschalk; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 199-208(1978)
"The hydrogenase of *Escherichia coli*, purification, some properties and the function of the enzyme."
- 52 Cammack, R., V. M. Fernandez and K. Schneider; *Biochimie*, 68, 85-91(1986)
"Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases."
- 53 Chen, J.S.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 57-81(1978)
"Structure and function of two hydrogenases from the dinitrogen-fixing bacterium *Clostridium pasteurianum*."
- 54 Fromherz, P and E.-M. Ruhr; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 263-268(1978)
"Incorporation of the membrane-bound hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* into lipid vesicles."
- 55 Gogotov, I.N., N.A. Zorin and T.V. Laurinavichene; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 171-182(1978)
"Comparison of properties and function of hydrogenase and NADP-reductase isolated from *Thiocapsa roseopersicina*."
- 56 Hatchikian, E.C., M. Bruschi and J. Legall; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 93-106(1978)
"Characterization of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*."
- 57 Lee, C.-M.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 281-286(1978)
"Solubilization of the membrane-bound hydrogenase of *Pseudomonas pseudoflava*."
- 58 Mayhew, S.G., C. Vandijk and H.M. Vander Westen; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 125-140(1978)
"Properties of hydrogenases from the anaerobic bacteria *Megasphaera elsdenii* and *Desulfovibrio vulgaris*."
- 59 Packer, L. and W. Vishniac; *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 153-154(1955)
"The specificity of a diphosphopyridine nucleotide-linked hydrogenase."
- 60 Schink, B.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 253-261(1978)
"Membrane-bound hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*: Biochemical and immunological characterization of the solubilized and purified enzyme."
- 61 Sim, E., A. Colbeau and P.M. Vignais; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 269-279(1978)
"Characteristics of the membrane-bound and detergent-solubilized hydrogenase from *Paracoccus denitrificans*."
- 62 Simon, H., P. Egerer and H. Gunther; in Hydrogenase; Their Catalytic

- Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 235-251(1978)
"Some mechanistic aspects and immobilization of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*."
- 63 Streckas, T. and A.I. Krasna; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 141-150(1978)
"Nature of the iron sulfur core and stability of Chromatium hydrogenase."
- 64 Tel-Or, E. and L. Packer; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 371-380(1978)
"The hydrogenase of *Anabaena cylindrica* and *Nostoc muscorum* in heterocysts and vegetative cells."
- 65 Tsuji, K. and T. Yagi; Arch. Microbiol., 125, 35-42(1980)
"Significance of hydrogen burst from growing cultures of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki, and the role of hydrogenase and cytochrome c3 in energy production system."
- 66 Vanheerikhuizen, H., S.P.J. Albracht, B. Ten Brink, L. Evers et al. ; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 151-158(1978)
"Purification and some properties of the soluble part of hydrogenase from *Chromatium vinosum*."
- 67 Yagi, T.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2947-2949(1976)
"Separation of hydrogenase-catalyzed hydrogen-evolution system from electron-donating system by means of enzymic electric cell technique"
- 68 Yagi, T., A. Endo and K. Tsuji; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 107-124(1978)
"Properties of hydrogenase from particulate of *Desulfovibrio vulgaris*."
- 69 Sawers, R. G. and D. H. Boxer; Eur. J. Biochem., 156, 265-275(1986)
"Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K12."
- 70 Ballantine, S. P. and D. H. Boxer; Eur. J. Biochem., 156, 277-284(1986)
"Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*."
- 71 Ballantine, S. and D.H. Boxer; J. Bacteriol., 163, 454-459(1985)
"Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12."
- 72 Sawers, R.G., S.P. Ballantine and D.H. Boxer; J. Bacteriol., 164, 1324-1331(1985)
"Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme."
- 73 Andreesen, J.R., G. Gottschalk and H.G. Schlegel; Arch. Mikrobiol., 72, 154-174(1970)
"*Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*."
- 74 Schneider, K. and H. G. Schlegel; Biochim. Biophys. Acta, 452, 66-80(1976)
"Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16."
- 75 Schneider, K., R. Cammack, H. G. Schlegel and D. O. Hall; Biochim. Biophys. Acta, 578, 445-461(1979)

- "The iron-sulphur centers of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*."
- 76 Schneider, K., D. S. Patil and R. Cammack; *Biochim. Biophys. Acta*, 748, 353-361(1983)
"ESR properties of membrane-bound hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria."
- 77 Schneider, K., H. G. Schlegel and K. Jochim; *Eur. J. Biochem.*, 138, 533-541(1984)
"Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1b."
- 78 Schneider, K., R. Cammack and H. G. Schlegel; *Eur. J. Biochem.*, 142, 75-84(1984)
"Content and localization of FMN, Fe-S clusters and nickel in the NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b."
- 79 Hornhardt, S., K. Schneider and H. G. Schlegel; *Biochimie*, 68, 15-24(1986)
"Characterization of a native subunit of the NAD-liked hydrogenase isolated from a mutant of *Alcaligenes eutrophus* H16."
- 80 Mitchell, P.; *Biol. Rev.*, 41, 445-502(1966)
"Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation."
- 81 Mitchell, P.; *Bioenerg.*, 3, 5-24(1972)
"Chemiosmotic coupling in energy transduction: A logical development of biochemical knowledge."
- 82 Mitchell, P.; *Bioenergetics*, 4, 63-91(1973)
"Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems."
- 83 Mitchell, P.; *FEBS Lett.*, 56, 1-6(1975)
"Protonemotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle."
- 84 Mitchell, P.; *J. Biochem.*, 97, 1-18(1985)
"The correlation of chemical and osmotic forces in biochemistry."
- 85 Hirata, H., K. Ohno, N. Sone, Y. Kagawa and T. Hamamoto; *J. Biol. Chem.*, 261, 9839-9843(1986)
"Direct measurement of the electrogenicity of the H⁺-ATPase from thermophilic bacterium PS3 reconstituted in planar phospholipid bilayers."
- 86 Ito, M., M. Nakamura, H. Nagamune, N. Morikawa and H. Terada; *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 138, 72-77(1986)
"An *Escherichia coli* mutant exhibiting temperature-sensitive atp synthesis."
- 87 Velours, J. and B. Guerin; *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 138, 78-86(1986)
"Localisation of the hydrophilic c terminal part of the atp synthase subunit 8 of *Saccharomyces cerevisiae*."
- 88 Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore; *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., (1986)
""
- 89 Haddock, B. A. and C. W. Jones; *Bacteriol. Rev.*, 41, 47-99(1977)
"Bacterial respiration."
- 90 Kagawa, Y.; 生体膜, 岩波書店, (1978)
"生体膜"
- 91 Kagawa, Y.; 生体膜と生体エネルギー, 東京大学出版会, (1975)
"生体膜と生体エネルギー"
- 92 Hadjipetrou, L. P., J. P. Gerrits, F. A. G. Teulings and A. et al. ;

- J. gen. Microbiol., 36, 139-150(1964)
"Relation between energy production and growth of *Aerobacter aerogenes*"
- 93 Hadjipetrou, L. P. and A. H. Stouthamer; J. gen. Microbiol., 38,
29-34(1965)
"Energy production during nitrogen respiration by *Aerobacter aerogenes*"
- 94 Decker, K. and S. Pfitzer; Anal. Biochem., 50, 529-539(1972)
"Determination of steady-state concentrations of adenine nucleotides
in growing *C. Kluyveri* cells by biosynthetic labeling."
- 95 Gest, H.; Bacteriol. revs., 18, 43-73(1954)
"Oxidation and evolution of molecular hydrogen by microorganisms"
- 96 Gray, C. T. and H. Gest; Science, 148, 186-192(1965)
"Biological formation of molecular hydrogen"
- 97 Stephenson, M. and L. H. Stickland; Biochem. J., 26, 712-724(1932)
"Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen."
- 98 Stephenson, M. and L.H. Stickland; Biochem. J., 27, 1528-1532(1933)
"Further experiments on the formation of formic hydrogenlyase by
Bact. Coli."
- 99 Farkas, A., L. Farkas and J. Yudkin; Proc. Roy. Soc. (London)., B115,
373-379(1934)
"The decomposition of sodium formate by *Bacterium coli* in the presence
of heavy water."
- 100 Woods, D. D.; Biochem. J., 30, 515-527(1936)
"Hydrogenlyases. IV. The synthesis of formic acid by bacteria."
- 101 Krebs, H.A.; Biochem. J., 31, 2095-2124(1937)
"The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli commune.*"
- 102 Ordal, E. J. and H. O. Halvorson; J. Bacteriol., 38, 199-220(1939)
"A comparison of hydrogen production from sugars and formic acid by
normal and variant strains of *Escherichia coli.*"
- 103 Utter, M.F., F. Lipmann and C.H. Werkman; J. Biol. Chem., 158,
521-531(1945)
"Reversibility of the phosphoroclastic split of pyruvate."
- 104 Brill, W. J., E. A. Wolin and R. S. Wolfe; Science, 144, 297-298(1964)
"Anaerobic formate oxidation: A ferredoxin-dependent reaction."
- 105 Knoell, H. E. and J. Knappe; Eur. J. Biochem., 50, 245-252(1974)
"*Escherichia coli* ferredoxin, an iron-sulfur protein of the adrenodxin
type."
- 106 Vetter, H. Jr. and J. Knappe; Z. Physiol. Chem., 352, 433-446(1971)
"Flavodoxin and ferredoxin of *Escherichia coli.*"
- 107 Reddy, C.A., M.P. Bryant and M.J. Wolin; J. Bacteriol., 110,
133-138(1972)
"Ferredoxin-dependent conversion of acetaldehyde to acetate and H₂ in
extracts of *S* organism."
- 108 Brosseau, J. D., N. Kosaric and J. E. Zajic; Biotechnol. Letters, 2,
93-98(1980)
"The effect of pH on hydrogen production with *Citrobacter intermedius*"
- 109 Zajic, J. E. and J. D. Brosseau; Dev. Ind. Microbiol., 18, 637-647(1977)
"Hydrogen gas production by *Escherichia coli* isolated from sewage
sludge on acetate"
- 110 Brosseau, J. D. and J. E. Zajic; Dev. Ind. Microbiol., 19, 553-567(1978)
"Hydrogen gas production and growth of *Citrobacter intermedius* on
glucose"
- 111 Bowen, W.R., S.Y.R. Pugh and N.J.D. Schomburgk; J. Chem. Tech.
Biotechnol., 36, 191-196(1986)

- "Inhibition of horse liver and yeast alcohol dehydrogenase by aromatic and aliphatic aldehydes."
- 112 Consalvi, V., G. Mardh and B.L. Vallee; Biotech. Biophys. Research Comm., 139, 1009-1016(1986)
"Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism."
- 113 Eftink, M.R. and K. Bystrom; Biochem., 25, 6624-6630(1986)
"Studies of the pH dependence of the formation of binary and ternary complexes with liver alcohol dehydrogenase."
- 114 Haseda, T.; Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence, 20, 333-349(1985)
"Acidic pi-alcohol dehydrogenase of mouse liver: purification and characterization."
- 115 Mardh, G. and B.L. Vallee; Biochem., 25, 7279-7282(1986)
"Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the interconversion of alcohols and aldehydes in the metabolism of dopamine."
- 116 Pavlov, M.Y., M.A. Sinev, A.A. Timchenko and O.B. Ptitsyn; Biopolymers, 25, 1385-1397(1986)
"A study of apo- and holo-forms of horse liver alcohol dehydrogenase in solution by diffuse x-ray scattering."
- 117 Plapp, B.V., D.C. Sogin, R.T. Dworschack, D.P. Bohlken and C et al. ; Biochem., 25, 5396-5402(1986)
"Kinetics of native and modified liver alcohol dehydrogenase with coenzyme analogues: isomerization of enzyme-nicotinamide adenine dinucleotide complex."
- 118 Jedeikin, L.A. and S. Weinhouse; J. Biol. Chem., , 271-280(1954)
"Assay of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide in normal and neoplastic tissues"
- 119 Glock, G.E. and P. Mclean; Exp. Cell Res., 11, 234(1956)
" "
- 120 Akabane, J., F. Ikomi, E. Nakanishi and K. Yokokawa; Nippon Iji Shinpoh, 1852, 22-26(1959)
" "
- 121 Akabane, J.; Taisha, 7, 878-883(1970)
" "
- 122 Williamson, D.H., P. Lund and H.A. Krebs; Biochem. J., 103, 514-527(1967)
"The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver"
- 123 Krebs, H.A.; Adv. Enzyme Reg., 5, 409-432(1967)
"The redox state of nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver"
- 124 Kousaka, S., H. Abe and H. Tanikawa; 第9回九州肝臓研究会講演要旨, 9, 5-5(1989)
"肝細胞膜 Na^+/H^+ 交換系の証明と細胞内 pH 測定について"