

海洋光合成微生物による水素生産

東京農工大工学部
生命工学科教授
松永 是

1. はじめに

バイオテクノロジーを利用した水素生成法は、光合成微生物や嫌気性細菌による方法が挙げられる。微生物を用いた水素生産技術の利点としては、化石燃料に依存しない点や、水素生成反応が常温で進むことからリアクター等の構成に特殊な材料は必要としないといった点が挙げられる。また、水素生産と同時に有用物質生産を行うことも期待できる。特に光合成微生物を利用する方法は、太陽エネルギーの利用が可能であるため、今後重要になっていくと思われる。光合成微生物を利用した水素生産システムを開発する場合、淡水の供給、土地利用、及び光供給の面で、従来の農業との競合を避けたシステムが望ましいと考えられる。海洋は地球の7割を占め、太陽エネルギーを豊富に利用できる。また、海水は生物の生育に必要な無機物を含んでいる。そこで、海洋光合成微生物を利用した水素生産システムの開発が進められている^(1, 2)。ここでは、海洋光合成微生物を利用した水素生成を中心に解説する。

2. 水素生成能を有する光合成微生物の探索

海洋には多様な微生物の存在が知られているが、その中から水素生成能を有する微生物を分離し、高水素生成株を検索することは極めて重要である。しかし、これまでのスクリーニング方法は水素生成菌を含まないサンプルに対しても様々な培養条件を検討せねばならず、また水素生成菌が含まれているにもかかわらず、培養条件の不適合から見落としてしまう場合もある。多様な微生物群に対し、効率の良いスクリーニングを行うためには、海洋から得られたサンプル中の水素生成菌の有無を迅速かつ簡便に判断する必要がある。当研究室では水素生成能を有する光合成微生物の多くがニトロゲナーゼを有することに着目し、ニトロゲナーゼのサブユニットである鉄タンパクをコードする*niH*遺伝子を直接PCR法により増幅し、検出することを試みた。その結果、高感度で水素生成菌のニトロゲナーゼを検出することが可能であった(図1)。以上の方法は、水素生成菌の効率の良いスクリーニング法に適していると考えられる。また検出に用いる機能遺伝子を変えることにより、様々な能力を有する微生物のスクリーニング法にも応用できると考えられる。

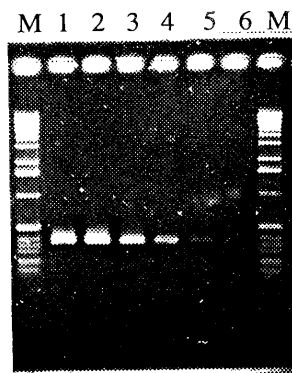


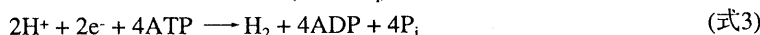
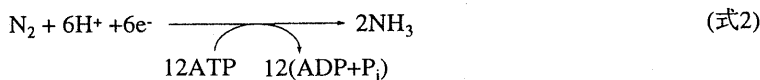
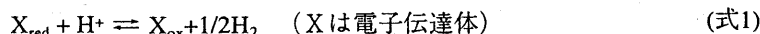
図1 *niH*プライマーを用いた直接PCR法による*niH*遺伝子の検出

水素生成菌(*Rhodobacter*. sp.)の菌体数：
1: 10^5 cells, 2: 10^4 cells, 3: 10^3 cells, 4: 10^2 cells, 5: 10^1 cells, 6: 10^0 cells, M: マーカー

3. 光合成微生物の水素生成機構

微生物による水素生成は、ヒドロゲナーゼ、及びニトロゲナーゼの2つの酵素が関与している。ヒドロゲナーゼは、ATPを必要としない水素生成が可能な酵素である(式1)。反応は可逆的であるが、水素生成に傾いているものと水素吸収に傾いているもの(吸収型ヒドロゲナーゼ)の2種類が知られている。生理的役割とし

ては、微生物体内の余剰還元力の水素ガスとしての排出や還元力を得るための水素ガスの利用に参与している。一方、ニトロゲナーゼは窒素ガス存在下において窒素固定反応を行う酵素である(式2)。ニトロゲナーゼの基質特異性は広く、ATPを利用して窒素やアセチレン等の3重結合を還元するばかりでなく、これらの物質が存在しない場合、水素イオンを還元して水素を生成する(式3)。



水素生成能を有する光合成微生物としては、緑藻、藍藻、及び光合成細菌があるが、以下にそれぞれの光合成微生物の水素生成機構やその特徴について示す。

3.1 緑藻

緑藻は真核生物であり、藍藻や光合成細菌などの原核生物と異なる。一般的に真核生物はニトロゲナーゼを持たないことから、緑藻による水素生成はヒドロゲナーゼによるものと考えられている。水素生成のための電子供与体としては、光化学的に生成したデンプンなどの内部貯蔵物質による系が考えられている。水素生成は暗所嫌気条件下で生じる⁽³⁾が、光合成により生じた貯蔵物質の消費を伴う(図2)。水の光分解による水素生成を主張しているグループもあるが、まだその機構が証明されているわけではない。しかし、水素生成は明所嫌気条件下でも観察⁽⁴⁾される。酸素の発生を伴うことからすぐにヒドロゲナーゼが失活し、水素生成は見られなくなる。どちらの場合も長期間にわたる水素生成は不可能であるが、明暗サイクルにおいて断続的に水素生成を行うことは可能である。前者による水素生成は、アルコールや低分子の有機酸の生成を伴うことから、緑藻と光合成細菌を組み合わせた水素生産システムの開発が検討されている⁽⁵⁾。

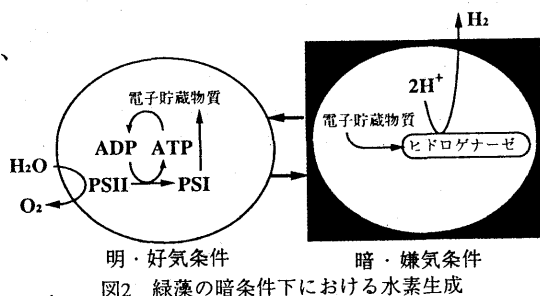


図2 緑藻の暗条件下における水素生成

3.2 藍藻

藍藻はその形態から糸状性藍藻と単細胞藍藻の2つに分類できる。また糸状性藍藻には、異型細胞(heterocyst)を形成するものや異型細胞を形成しないものがあり、それぞれ異なった水素生成機構を有している。

異型細胞を形成する糸状藍藻の水素生成は、ニトロゲナーゼのによるものである。このような株は、好気条件下においても比較的安定な水素生成を行うことが可能である。この原因としては、ニトロゲナーゼがPSIIを持たない異型細胞内で発現するため、酸素による阻害効果を受けにくくなっていることが考えられる(図3)。現在、異型細胞の分化機構の解明が遺伝子レベルで行われている。

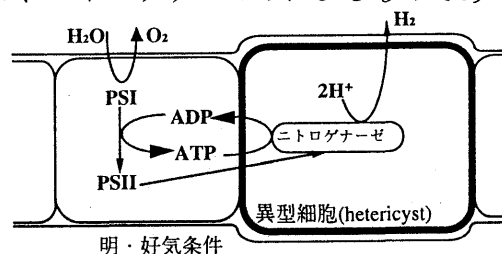


図3 異型細胞を有する糸状性藻類による水素生成

また、異型細胞を持たない場合でも条件により高い水素生成能を有する株があ

る。海洋藍藻 *Oscillatoria* sp. Miami BG7は、窒素栄養制限下で培養した株を明・嫌気条件下に置くと主にニトロゲナーゼに依存した水素生成を行うことが知られている(図4)。なお、この株の最大水素生成速度は、 $0.29(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1})$ に達している⁽⁶⁾。

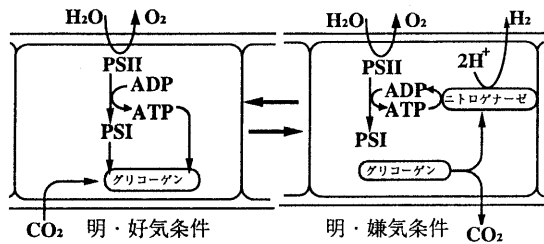


図4 異型細胞を持たない糸状性藻類による水素生成

海洋単細胞藍藻 *Synechococcus* sp. Miami BG 043511は、明・好気条件下で水素生成を行うことが可能である。この株もニトロゲナーゼに依存した水素生成を行うが(図5)これは、この株のニトロゲナーゼに何らかの防御機構が存在するためと考えられている。また、この株の同調培養を行った結果、窒素固定及び、水素生成と光合成が細胞の分裂周期の異なった時期に起こっていることが明らかになった^(7, 8)。バッチ培養や連続光照射下で見られた水素生成は、常に全細胞の何割かが水素生成を行う細胞周期にあったためであると考えられる。また、この株の水素生成速度は、 $2.0(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1})$ に達している。

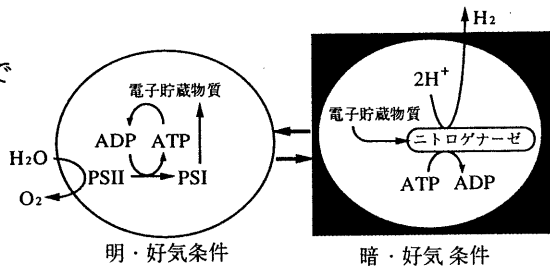


図5 単細胞藻類による水素生成

3.3 光合成細菌

光合成細菌は、PSI, PSIIの2つの光化学系を経て水素を生成する藻類と異なり、PSIIを持たない。このため、水の光分解により電子を得ることができないが、有機酸、糖類、アルコール類、芳香族化合物などの有機物や硫化水素などの無機物を電子供与体として利用した水素生成が可能である。また、この反応はニトロゲナーゼを最終的な触媒としている(図6)。光合成細菌による最大水素生成速度は、淡水産光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* による $262(\mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1})$ といった例⁹⁾があり、この値をモルに換算すると約 $10.4(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1})$ となる。当研究室で分離された海洋光合成細菌 *Rhodobacter* sp. N KPB160471もこれと同レベルの水素生成能を有し、 $10.4(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1})$ に達している。光合成細菌の水素生成速度は、水から水素生成を行う藻類に比べ非常に高く、長時間にわたる水素生成が可能である。水素生成時に有機酸などの分解を伴うことから、水素生産と同時に排水処理を行うシステムへの応用が期待されている。

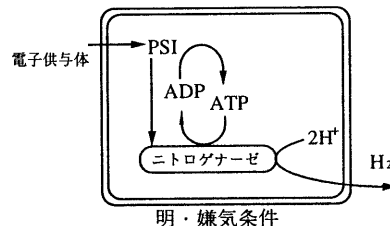


図6 光合成細菌による水素生成

4. 遺伝子組換えによる水素生成能の向上

光合成微生物の水素生成能をさらに向上させるためには、遺伝子の組換えが必要である。当研究室では、海洋藍藻や海洋光合成細菌のベクター系の開発や、パーティクルガン、エレクトロポレーション、接合伝達による遺伝子導入を行ってきた⁽¹⁰⁻¹³⁾。また、これらの技術を利用して水素生成能の向上を試みている。

水素生成能を有する微生物の多くは吸収型ヒドロゲナーゼを有し、水素ガスの

生成と同時に吸収を行っている。光合成微生物を用いた高速水素生成を目的とした場合、吸収型ヒドロゲナーゼ活性の欠損した変異株の作製が必要である。光合成細菌や藍藻において化学変異剤やトランスポゾンを用いた遺伝子組替えによる吸収型ヒドロゲナーゼ欠損株が作製され、水素生成速度の向上が報告されている⁽¹⁴⁾。当研究室で分離された海洋光合成細菌 *Rhodobacter* sp. NKPB160471 においてもトランスポゾン(Tn5) 導入による吸収型ヒドロゲナーゼ欠損株の作製が試みられている。その結果、吸収型ヒドロゲナーゼ活性の全くない変異株が得られ、その株の最大水素生成速度は、13.5 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{dry weight}) \cdot \text{h}^{-1}$) に達した。これは野生株と比べ約30%高い値となった(図7)。なお、この値は光合成細菌による水素生成の最高レベルに達していると思われる。

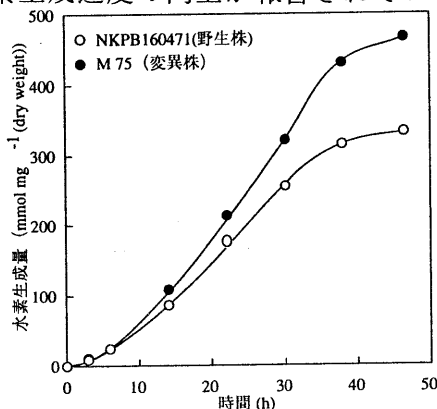


図7 *Rhodobacter* sp. NKPB160471の野生株及び吸収型ヒドロゲナーゼ欠損株(M75)による水素生成の経時変化

5. 水素生産バイオリクターシステムの開発

当研究室で単離された高水素生成株であり、また新種の *Rhodobacter* 属と同定された海洋光合成細菌 *Rhodobacter marinus*⁽¹⁵⁾ は、菌体懸濁液中に海水を添加すると速やかに凝集し、沈澱する性質を有することが明らかになった。なお、この株は、既に遺伝子導入システムが開発され^(12, 13)、

成長ホルモン等の有用物質生産遺伝子⁽¹⁶⁾ を発現させることに成功している。上記の性質を利用した海洋光合成細菌による水素生産システムが考案されている。その概略を図8に示す。これは、太陽光集光装置、バイオソーラーリアクター、及び凝集槽の3つから成り立っている。一般に、光合成微生物を用いて、バイオリアクターにより連続水素生産を行う場合、細胞への光の供給方法が問題になる。特に光合成微生物が高濃度になるにつれ、リアクター全体への光供給は困難になる。ここに示したバイオソーラーリアクターは、光分散

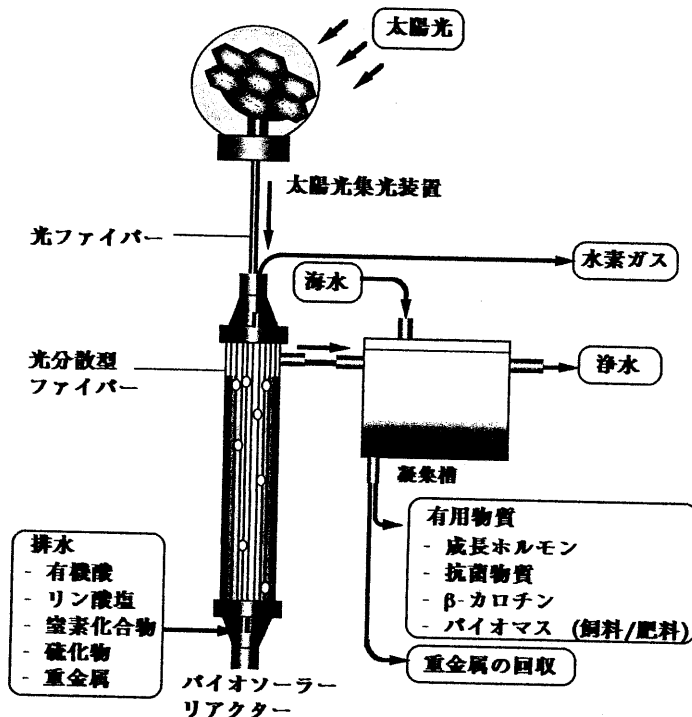


図8 海洋光合成細菌を用いたバイオソーラーリアクターシステム

型ファイバーをリアクター内部に充填したもので、この問題を解決している。光源としては、太陽光集光装置により集光された光の他に、人工光の利用も可能である。また、このリアクターを利用して藻類の高密度培養に成功した例もある^(17, 18)。本システムは、以下に示す3つを同時に行うことが可能である。

1. 排水中に含まれる有機酸、硫化物等を海洋光合成細菌を用いてリアクター内で分解し、高速水素生産を行う。
2. 水素生成を行った菌体懸濁液に海水を添加してフロキュレーション(菌体が凝集し、沈殿する現象)による菌体の除去を行う。(排水処理)
3. 回収した菌体の有効利用を行う。

本システムの利点としては、これまでの固定化菌体を利用した水素生産システムに比べ、固定化担体を使用しない点やシステムの運転に手間がかからないことなどから大量水素生産を行うのに適していると考えられる。また、本システムは、炭酸ガスを含む空気の通気ラインの設置や凝集槽のpHコントロール等を行えば、藻類にも適用できると思われる。

6. おわりに

太陽エネルギーの導入により藻類は水から水素と酸素を生成し、光合成細菌は、排水中に含まれる有機物などを分解して水素生成を行う。光合成微生物を利用した水素生成法は、反応が常温で行われることから、リアクターシステムの構築に特殊な材料を必要としない点で、新しいエネルギー獲得手段として非常に魅力的である。特に海洋光合成微生物を用いれば、太陽光が豊富に降り注ぐ海洋で、海水を利用した水素生産を行うことが可能である。今後、光合成微生物による水素生産システムを実用化させるためには、基礎研究の蓄積と共に屋外での大規模な研究を行うことが必要であると考えられる。

参考文献

1. 松永 是：CO₂・地球温暖化対策技術、シーエムシー、(1990)
2. 松永 是：生物化学工学の応用、化学工業社、(1992)
3. Y. Miura, W. Yamada, K. Hirata, K. Miyamoto, M. Kiyohara:
Stimulation of hydrogen production in algal cells grown under high CO₂ concentration and low temperature: Appl. Biochem. Biotech. , Vol.39/40, p.753-761, (1993)
4. R. M. Cinco, J. M. MacInnis, E. Greenbaum: The role of carbon dioxide in light-activated hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*, Photosynthesis Research, Vol.38, p.27-33, (1993)
5. K. Yagi, I. Maeda, K. Idehara, Y. Ikuta, H. Nakamura: Removal of inhibition by ammonium ion in nitrogenase-dependent hydrogen evolution of a marine photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas* sp. strain W-1S, Appl. Biochem. Biotech. , Vol.39/40, p.753-761, (1993)
6. S. Kumazawa, A. Mitsui: Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by saltwater blue-green algae, *Oscillatoria* sp. Miami BG 7, Int. J. Hydrogen Energy, Vol.6, p.339-348, (1981)
7. A. Mitsui, S. Kumazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, T. Arai: Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically, Nature, Vol.323, p.720-722, (1986)

8. A. Mitsui, S. Suda: Alternative and cyclic appearance of H₂ and O₂ photoproduction activities under non-growing conditions in an aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Curr. Microbiol.* , Vol.30, p.1-6, (1995)
9. J. Miyake, S. Kawamura: Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.12, No.3, p.147-149, (1987)
10. H. Takeyama, J. G. Burgess, H. Sudo, K. Sode, T. Matsunaga: Salinity dependent copy number increase of a marine cyanobacterial endogenous plasmid, *FEMS Microbiol. Lett.* , Vol.90, p.95-98, (1991)
11. K. Sode, M. Tataru, H. Takeyama, J. G. Burgess, T. Matsunaga: Conjugative gene transfer in marine cyanobacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , Vol.37, p.369-373, (1992)
12. T. Matsunaga, N. Matsunaga, N. Tsubaki, T. Tanaka: Development of a gene cloning system of the hydrogen-producing marine photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* sp. , *J. Bacteriol.* , Vol.168, p.460-463, (1986)
13. J. G. Burgess, H. Sudo, H. Sode, T. Matsunaga: Efficient gene transfer of high copy number mobilizable plasmids containing a marine *Rhodobacter* origin of replication, *Curr. Microbiol.* , Vol.26, p.105-108, (1993)
14. M. Kern, W. Klipp, J. H. Klemme: Increased nitrogenase-dependent H₂ photoproduction by hup mutant of *Rhodospirillum rubrum*, *Appl. Environ. Microbiol.* , Vol.60, No.6, p.1768-1774, (1994)
15. J. G. Burgess, R. Kawaguchi, A. Yamada, T. Matsunaga: *Rhodobacter marinus* sp. nov. : a new marine hydrogen producing photosynthetic bacterium which is sensitive to oxygen and sulphide, *Microbiology*, Vol.140, p.965-970, (1994)
16. T. Matsunaga, S. Kuriyama, M. Miyake, I. Kawazoe, A. Akasaka, N. Nakamura, K. Sode: Cloning, Sequencing, and expression of bonito (*Katsuwonus pelamis*) growth hormone cDNA in the marine photosynthetic bacterium, *Rhodobacter* sp. NKPB0021, *J. Mar. Biotechnol.* , Vol.1, p.73-77, (1993)
17. H. Takano, H. Furuue, J. G. Burgess, E. Manabe, M. Hirano, M. Okazaki, T. Matsunaga: Development of a rapid isolation procedure for coccolith ultrafine particles produced by coccolithophorid algae, *Appl. Biochem. Biotechnol.* , Vol.39/40, p159-167, (1993)
18. J. G. Burgess, K. Iwamoto, Y. Miura, H. Takano, T. Matsunaga: An optical fibre photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis* aff. *galbana* T-Iso (UTEX LB 2307) rich in docosahexaenoic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , Vol.39, p.456-459, (1993)