

光合成微生物による光水素生産の改良 — 遺伝育種技術の戦略 —

Improvement of Photosynthetic Bacterial Hydrogen Production
- Strategies for Genetic Engineerings -

三宅 淳、浅田泰男

Jun Miyake, Yasuo Asada

工業技術院・生命研/融合研 つくば市東1-1

1. はじめに

温室効果、酸性雨に象徴されるように、化石燃料を利用していることによる環境への悪影響が懸念されている。生活の向上を目指せば今後益々エネルギーが必要であり、太陽光の様な再生可能でクリーンなエネルギーの開発が必要となっている。

太陽エネルギーの総量は膨大であるが密度が薄い。地球全体では 1.8×10^{14} kWもあり、人類が利用しているエネルギーの数万倍もある。ところが、真昼でも日射エネルギーは高々 1 kW/m^2 程度にすぎない。集積、輸送に要するコストがかかることが太陽エネルギーの利用が進まない原因となっている。

太陽光を利用するには、希薄なエネルギーに対応した技術が必要である。光合成微生物を利用するとシステムが簡単になり、資源とエネルギーの投資が少なくてすむ。近年のバイオテクノロジーの急速な発展を背景として、すでにこの種の生物の機能を応用するための基礎研究が始まっている。地球環境産業技術研究機構(RITE)と通商産業省によって、太陽光と再生可能な資源を利用した水素生産の研究プロジェクトが進められている。光合成微生物などを用いて、光エネルギーを変換し、水素を生産することを目指している(1)。本論では我々の研究における水素生産を改良する戦略と、遺伝育種技術の現状について解説する。

2. 光合成細菌の水素発生能力の改良

光合成細菌は植物の光合成に比べると簡単な光合成系を有する。水分解ができないが、代わりに有機物を電子供与体として利用し、水素を発生する。光合成系で作られた高エネルギー化合物(ATP)と高い還元力(フェレドキシン)が水素発生酵素であるニトロゲナーゼに供給されて水素イオンを還元して水素分子(ガス)が生成される(図1)。有機物を完全に分解して水素を発生することが実用上は有用な機能であり、有機性廃液の処理と水素発生を組み合わせる利用できる(2-5)。

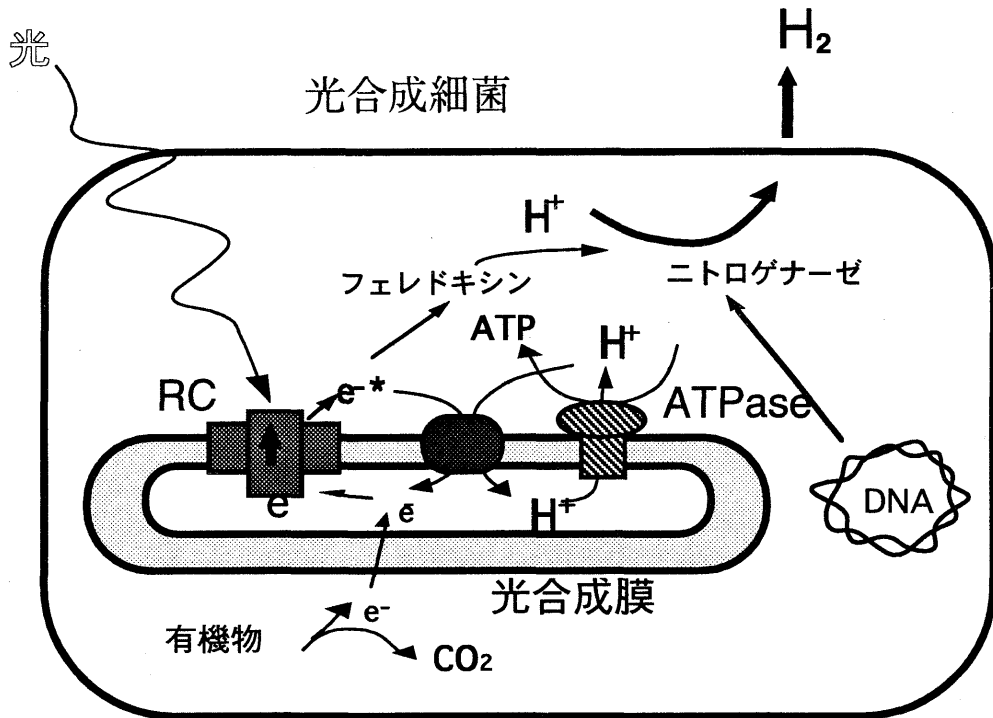


図1 光合成細菌の水素発生メカニズム

この種の技術の最も重要な要素は、水素発生速度である。ただし、嫌気性菌などで良く用いられる菌体当たりの水素発生速度は実用上殆ど意味がない。菌体1個1個の能力が問題なのでは無く、光エネルギーが律速要因だからである。我々が探索分離した光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の光エネルギーの変換効率は、ソーラーシミュレーターを用いた実験で7%（発生した水素の燃焼エネルギー/照射光エネルギー）に達している(6,7)。しかし、太陽光の下では2-3%程度にしかならない。より高い変換効率が求められる。

光合成細菌の水素発生メカニズムは複雑で、水素発生には多くの反応が関与している。これらのうち、1つだけを改良することで、水素発生能力を向上させることは難しい。むしろ全体のバランスを保ちつつ、無駄なエネルギーの流れを制御することが、水素発生能の向上につながる。

1-1. リアクター内部への光の浸透と水素発生能力の関係の解明

微生物の能力を生かすにはリアクターの改良が必要である。光はリアクター内部に均一に行き渡るわけではなく、光合成細菌によって吸収されるために、エネルギーとしては減衰し、しかもスペクトルも変化する。そこで、アクリルでできた光路

長1cm厚の透明容器を4個重ねて、各深における光強度と水素発生との関係を調べた。

光合成細菌の吸収ピークである800nm付近の光は急速に減衰し、リアクターの深部まで届かない。吸収の少ない700nm付近の光が深部まで届いて水素発生に寄与していることが分かった。また、入射光に近い(浅い)部分においては光エネルギーの多くを吸収するにも関わらず効率は低く、深いところでは効率が高くなった(8,9)。リアクター全体として効率を高めるには、深さ方向に光の強弱を作らず、均一な光エネルギーを分配することが必要である。また、菌体の固定化による水素発生の増強も検討している。

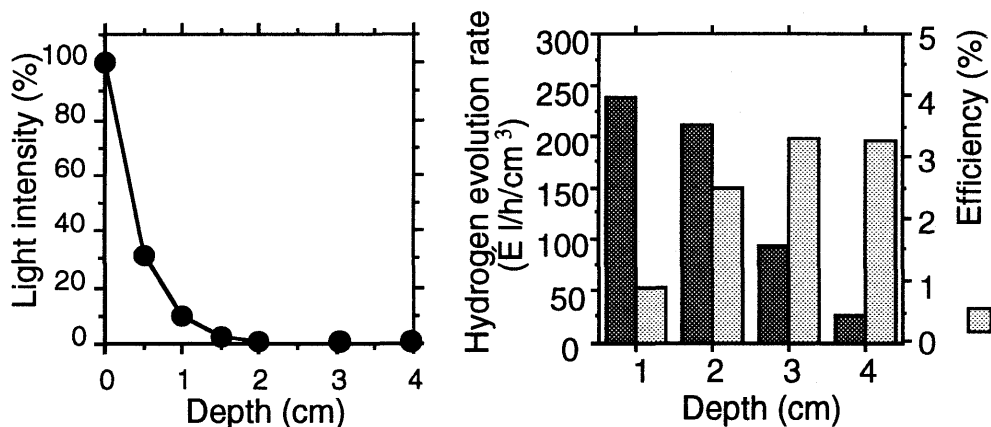


図2. リアクター内部への光の浸透と水素発生速度・効率(8)

1-2. 遺伝育種技術

図1に示すように、水素発生の反応の主たる要素は光合成系、電子伝達系、水素発生酵素系(ニトロゲナーゼ)である。これら要素のバランスを保つことが重要である。我々は遺伝子操作技術を用いて、目的に適した光合成細菌の遺伝育種を行うことを試みている(10, 11)。光合成色素の光吸収波長スペクトル、量、ニトロゲナーゼの制御が期待される。

現在、広域宿主ベクターであるpKT230に光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV株の *puf* プロモーター領域を組み込み、大腸菌との接合を利用して同株に導入することを試みている(10, 11)(図3)。広域宿主ベクターであるpKT230を光合成細菌 *R. sphaeroides* RV株に大腸菌との接合を利用して導入し、カナマイシンおよびストレプトマイシン耐性株を得ることに成功した。これまでの研究では、光集光色素(LHII)などの遺伝子を操作した株では光照射下において生育が困難になり、水素発生も見られないことが報告されているが、今回我々の研究室で得られた遺伝子操作株は、抗生物質存在下でも良く生育し、水素発生が可能であることが示された。

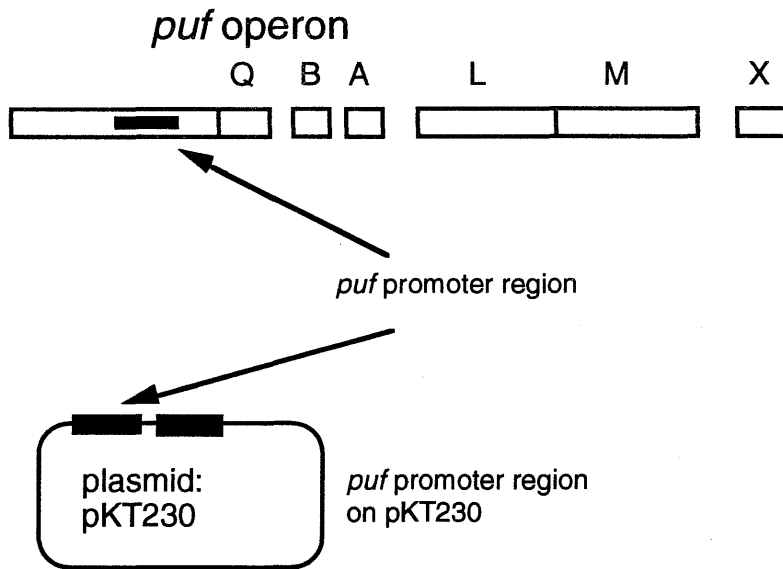


図3. *puf*遺伝子のプロモーター部位の発現(10)

3. ラン藻による水素生産の高効率化

ラン藻類は高等植物と同様な光合成を行うので、水を分解して水素に変換できるという利点を有しているが、水素生産速度は実用化のためには十分とは言えない。そこで高水素生産藻株の検索や遺伝子操作等による育種が必要となる。

ラン藻では光合成細菌に比べてさらに光合成系が複雑であり、光合成によって生産された還元力も直接水素発生に結びつくものが少なく、効率の低下を招いていると考えられる。水素生産にふさわしい生物とするためには水素のとりだしを広げてやる必要がある。そこで我々は水素生産能力の高い*Clostridium* 属の持つヒドロゲナーゼ遺伝子を抽出し、ラン藻に導入することを検討している(図4)。

Clostridium のヒドロゲナーゼがラン藻において機能を発現できるかを確かめた。ラン藻の内部へ*Clostridium* のヒドロゲナーゼ蛋白質を直接導入する方法を開発した(疑似形質転換法)。 *Clostridium* のヒドロゲナーゼとラン藻*Synechococcus elongatus* を混合し、電気パルスをかけることにより、菌体内に導入した。その結果、*Clostridium* のヒドロゲナーゼがラン藻の菌体内で電子伝達系とカップリングし、水素発生を行うことが確かめられた(12)。従って、ヒドロゲナーゼの遺伝子をラン藻内で発現させれば、水素発生の向上が期待できる。

現在までのところラン藻については多種に渡って幅広く利用できる遺伝子操作系が確立されてはいない。そこで、現在は*Synechococcus* PCC7942を用い、遺伝子の発現系を構築している。発現ベクターpKE4-9を用いて、*Clostridium* 由来ヒドロゲナー

ゼ遺伝子をレポーター遺伝子 (cat) と共に導入し、得られた形質転換ラン藻(13)について、各遺伝子の発現を調べている。その結果、レポーター遺伝子が発現してcat活性 (クロラムフェニコール耐性の付与) が得られた。また、クロラムフェニコール分解酵素蛋白質も生産されていることが確かめられた(13)。遺伝子操作系が得られたので、ヒドロゲナーゼあるいは電子伝達蛋白質等の遺伝子をプラスミドに組み込んで、ラン藻細胞内部で発現させることを試みている。

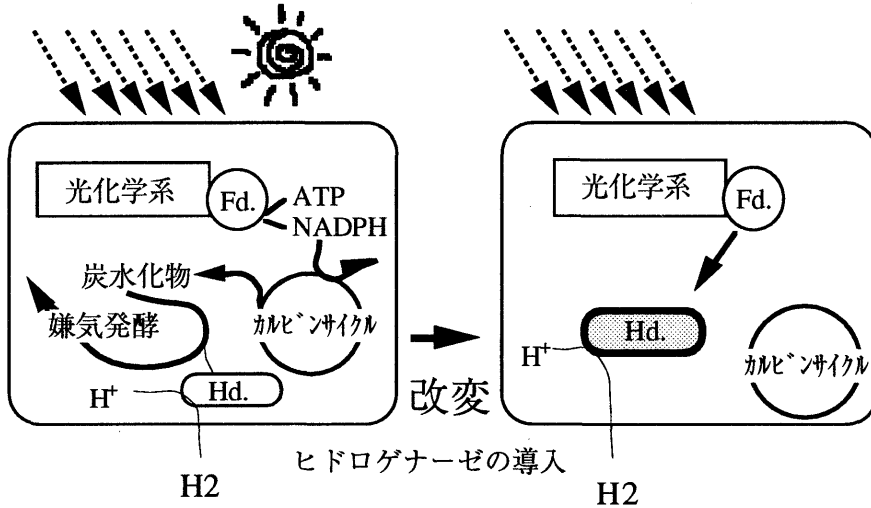


図4. ラン藻へのClostridiumヒドロゲナーゼの導入による水素発生の改良(12)

謝辞

本研究はRITE環境調和型水素製造プロジェクトとの共同によって行われている。永峰恭子、青山勝博、中田栄寿、庄林学、L. Vasilyeva, A. Tsygankov、三宅正人らの共同研究の成果をまとめたものである。

参考文献

1. M. Morimoto, J. Miyake; Development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen, Hydrogen Energy Prog. X, vol.2, 951-957 (1994).
2. 三宅 淳: 化学と生物、30、597 (1992).
3. 三宅 淳: 生物工学会誌、71、431 (1993).
4. J. Miyake, Y. Asada; Biological production of hydrogen by environmentally acceptable technologies, Front. Sci. Ser. 7, pp.219-23 (1993).
5. J. Miyake; Photosynthetic bacteria for solar energy conversion, Prog. Biotechnol., pp.1019-1025 (1994).
6. J. Miyake, Y. Asada, S. Kawamura: "Biomass Handbook (eds. C. W. Hall and O. Kirani)", Gordon and Breach Science Publishers, 1989, p.363.
7. J. Miyake, S. Kawamura: Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacteria Rhodospirillum rubrum, Int. J. Hydrogen Energy, 12, 147-149 (1987).
8. E. Nakada, Y. Asada, T. Arai, J. Miyake; Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production, J. Ferment. Bioeng. 80:

53-57 (1995).

9. E. Nakada, S. Nishikata, Y. Asada,, J. Miyake; Hydrogen production by gel-immobilized cells of *Rhodobacter sphaeroides*, J. Marine Biotechnol., in press (1995).
10. Y. Nagamine, T. Kawasugi, M. Miyake, Y Asada,, J. Miyake; Characterization of a photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV for hydrogen production, J. Marine Biotechnol., in press (1995).
11. L. Vasilyeva 他、日本生物工学会大会平成6年度大会
12. 三宅正人他、日本生物工学会大会平成6年度大会
13. K. Aoyama, M. Miyake, J. Yamada, J. Miyake, I. Uemura, T. Hoshino, Y. Asada
Application of the vector, pKE4-9 carrying strong promoter to the expression of foreign proteins in *Synechococcus* PCC7942, J. Marine Biotechnol., in press (1995).