

光合成微生物による光水素生産

工業技術院・生命工学工業技術研究所

(〒305 茨城県つくば市東1-1)

産業技術融合領域研究所

(〒305 茨城県つくば市東1-1-4)

三宅 淳、永峰 恭子、青山 勝博、中田 栄寿、
リトミラハシエハ、吳 其威、三宅 正人、浅田 泰男

Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria

Jun Miyake, Kyoko Naqamine, Katsuhiko Aoyama, Eiju Nakada,
Lyudmila Vasilyeva, Qiwei Wu, Masato Miyake and Yasuo Asada

National Institute for Advanced Interdisciplinary Research

(Hiqashi 1-1-4, tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan 305)

National Institute of Bioscience and Human-Technology

(Hiqashi 1-1, tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan 305)

AIST/MITI

Biological hydrogen production project is being carried out to develop renewable and environmentally acceptable energy sources. Basic research has been done to obtain capable microorganisms for hydrogen production (photosynthetic bacteria and cyanobacteria) by using genetic engineering methods. For photosynthetic bacteria, control of *puf* promoter has been examined to regulate the expression of the photosynthetic proteins to increase the efficiency. In the case of cyanobacteria, replacement of enzyme for hydrogen production has been examined to introduce hydrogenase gene into cyanobacteria. Adding to the improvements, experiments were done to measure the light penetration precisely and its effect to hydrogen production.

1. 緒言

化石燃料の代替として水素は極めて有望なものであり、その製造方法の確立が望まれる。再生可能な資源から作るのが望ましく、太陽エネルギーの利用が期待される。

光合成細菌、ラン藻などの光合成微生物は光エネルギーの照射によってエネルギーを獲得し、水素を発生する。極めて簡易なシステムによって水素生産が可能であり、上記目的に適している。現在、地球環境産業技術研究機構（RITE）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¹⁾。本論文では光合成細菌とラン藻の水素生産の問題点と改良への試みを示す。

(1) 光合成細菌： 光合成微生物の中で、光合成細菌は高い水素発生能力を有しており、実用化に近い微生物と考えられる。光合成細菌は有機物を分解して電子を

取り出し、この電子を利用して水素を発生する。この際、有機物を完全に分解できることから、食品工場廃液などの有機性廃液を用いての水素発生が研究されている²⁵⁾。また、有機物の分解能力を高めるために光合成細菌と嫌気性細菌を併せて用いることも研究されている。

実用に供するために最も重要な要素は水素発生速度である。各地で探索育種が行われているが、最も高い水素発生速度の一つは*Rhodobacter sphaeroides* の260 $\mu\text{l/h/mg}$ である。この株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。

技術として実用に供するには、さらに水素発生速度を向上させることが必要である。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と考えられる。

(2) ラン藻： 光による水素生産システムとして藍藻類は、細胞の中に水分分解の能力を備えている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⁶⁾。

2. 方法

光合成細菌として*Rhodobacter sphaeroides* RV株を用いた。前培養は乳酸を炭素源として照射下で行なった。菌体を水素発生用培地(乳酸+グルタミン酸+無機塩)に移し、24-48時間培養して水素発生速度が安定下条件で実験に供した。この菌体懸濁液(1.5mg/ml)をリアクターに移して深さと水素発生の関係を調べた。リアクターは受光面積37.5 cm²、深さ4cm(深さ1cmのリアクターを4個重ねたもの)を用い、タングステンランプを用いて照射した。光エネルギーの強度は光エネルギー計(YSI-Kettering, model 65A)を用いて測定した。菌体けん濁液は積分球を付けた分光光度計(Hitachi, model 330)を用いて各波長の光の透過性を測定した。光強度と光路との関係については、上記光の透過性を基に、350-980nmの範囲の光エネルギーの変化を計算によって求めた。

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC7942形質転換株⁷⁾に導入されたクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(cat)及び*Clostridium*由来ヒドロゲナーゼ遺伝子の発現の検討は、ホットフェノール法⁸⁾により抽出したRNAをノーザンハイブリダイゼーション⁸⁾によって検出することによって行った。プローブにはcat遺伝子及び*Clostridium*ヒドロゲナーゼ遺伝子のPCR (polymerase chain reaction) 産物を用いた。

3. 結果・考察

(1) 光合成細菌の水素発生と光エネルギーの関係

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。1 cm厚の透明容器を重ねて、深さと水素発生との関係を調べた。結果を図1に示す。

*R.shpaeroides*はバクテリアオクロロフィルによる 850nm および 400nm の吸収極大を有する。500-800nm の間は光吸収ピークがなく、吸光度は低い。白色光を用いて照射した場合、光波長によって透過性が異なり、850nm 付近の光は菌体懸濁液の浅い部分で吸収されてしまい、吸収の少ない 700nm の光が深部まで届いていることがわかった。700nm 付近の光を除くとリアクターの水素発生量は大きく低下した。光合成細菌はクロロフィルの吸収極大の波長だけでなく、吸収の少ない波長領域でも水素発生を行うことが分かった。

また、入射光に近い（浅い）部分で光が強く、効率が低いことが、リアクター全体の効率を下げていることが示された⁹⁻¹⁰。即ち、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。

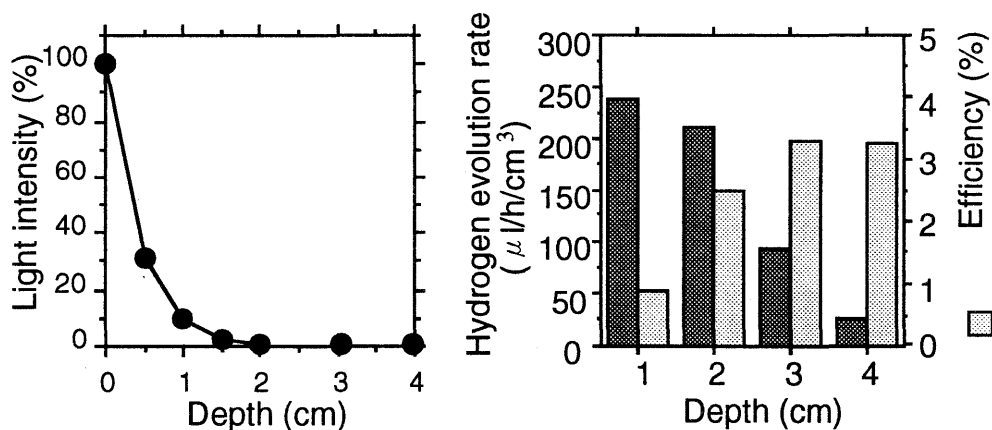


図1. リアクター内部への光の浸透と水素発生速度・効率¹⁰⁾

水素発生の反応の主たる要素は光合成系、電子伝達系、水素発生酵素系である。強光を受けて光合成系で過剰のエネルギーが生産されると、後続の過程でオーバーフローを引き起こす。光合成系、電子伝達系、水素発生酵素のバランスを保ち、オーバーフローを避ければ、水素発生効率の向上が可能となる。即ち、状況に応じて光合成系の機能（発現量）を他の要素とバランスさせることが有効と考えられる。

光合成系を制御し、目的に応じてその量を増減することが必要である。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^{11, 1}

2)。広域宿主ベクターであるpKT230を光合成細菌 *Rhodobacter 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。遺伝子操作菌株からも水素発生が可能であることが示された。

(2) ラン藻による水素生産の高効率化

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。疑似形質転換系によって *Clostridium* のヒドロゲナーゼ蛋白質が直接導入されたPCC 7942株において、*Clostridium* のヒドロゲナーゼがラン藻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⁶⁾ことから、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に寄与できると考えられた。

そこで、PCC7942を宿主とする発現ベクター-pKE4-9¹³⁾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⁽⁷⁾について、各遺伝子の発現を調べた (図2)。その結果、*cat* 及びヒドロゲナーゼ遺伝子保有株で、*cat*、ヒドロゲナーゼがともに転写されていることがわかった。それらのサイズは2.2kbと等しく *cat* 転写産物(0.7kb)、*Clostridium* のヒドロゲナーゼ転写産物(1.7kb) よりも大きかった。これは、*cat* とヒドロゲナーゼの融合 mRNA として得られているためと考えられた。

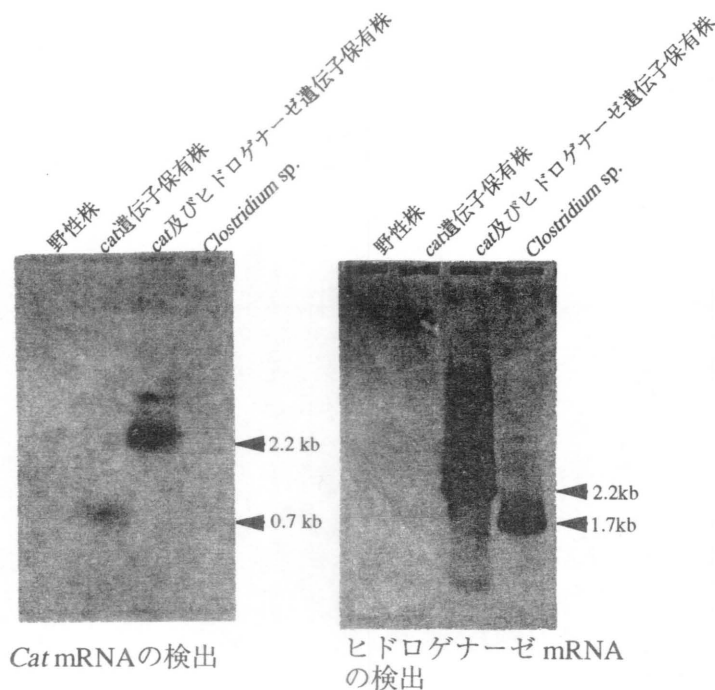


図2. PCC 7942 形質転換株のNorthern解析

謝辞

本研究は地球環境産業技術研究機構 (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。

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. 三宅正人他、日本生物工学会大会平成6年度大会
7. 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 (1996).
8. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis; *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).
9. 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).
10. E. Nakada, S. Nishikata, Y. Asada, J. Miyake; Hydrogen production by gel-immobilized cells of *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Marine Biotechnol.*, in press (1996).
11. 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 (1996).
12. L. Vasilyeva 他、日本生物工学会大会平成6年度大会
13. M. Miyake, J. Yamada, K. Aoyama, I. Uemura, T. Hoshino, J. Miyake, Y. Asada; Strong expression of foreign protein in *Synechococcus* PCC7942. *J. Marine Biotech*, in press (1996).