

バイオ水素の現状と問題点 — 光合成微生物を中心に —

浅田 泰男¹・石見 勝洋¹・神野 英毅²

日本大学理工学部¹、日本大学大学院生産工学研究科²

〒274- 8501千葉県船橋市習志野台7-24-1¹、〒275- 8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1²

The state-of-art and future prospects of BioHydrogen - Photosynthetic Microorganisms as Main Objects -

Yasuo ASADA¹, Katsuhiko ISHIMI¹ and Hideki KOHNO²,

College of Science and Technology Nihon University¹, Graduate School, of Industrial Technology²

7-24-1Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8501¹, 1-2-1 Izumicho, Narashino, Chiba 275-8575²

The state-of-art and future prospects of BioHydrogen are overviewed, targeted on photosynthetic microorganisms (photosynthetic bacteria, cyanobacteria and green algae as main objects). We describe here our recent results, mainly hydrogen production with sugar by co-culture of photosynthetic bacteria and anaerobic bacteria. Recent efforts of genetic alteration to enhance hydrogen production in these microorganisms are briefly introduced.

Keywords: biohydrogen, photosynthetic bacteria, co-culture, cyanobacteria, green algae

1. 緒言

水素の需要については、改めて言うまでも無い。電気自動車を実用化されている現代であるが、発電がまだまだ化石燃料に依存しているかぎり、水素エネルギーの重要性は変わることがない。

再生可能エネルギーとしての「バイオ水素生産」の研究史も、1970年代のオイルショック以来長くなった[1]が、まだ実用化に至っているとは言いがたい。

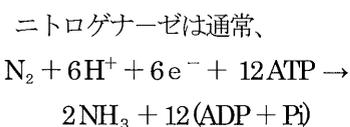
微生物による水素生産は、大きく分けて、i) 有機物を原料とした嫌気的な水素発酵(光合成プロセスを用いない)、ii) 有機物を原料とした光合成細菌による水素生産、iii) シアノバクテリアおよび緑藻による水素生産(原料は水)、に大別できる。二酸化炭素を排出しないという点では、iii) が理想的であるが、水素の生産速度は低い。水素生産速度は、i) が一番高く、ii) はi)とiii)の中間である。i)、ii)は有機物が分解されるため二酸化炭素が排出されるが、もとをたどれば、有機物は、光合成産物に由来するので光合成によって再び有機物となり、新たに化石燃料を掘り出さなくてもよい(カーボンニュートラル)という考えである。もう一つの評価基準は、ii)とiii)では、収率、すなわち、

消費された単位有機物あたりの水素生産量である。これは、i)が最低で、理論的には、グルコース、デンプンの場合、グルコース1モルあたり4モルの水素が最高で、2モルの酢酸と2モルの二酸化炭素が副生する。これは、化学的なエネルギー変化論によるものなので、如何にバイオといえど魔法ではないので、これを超えることはできない。ほぼこれに近い値が超好熱菌によって報告されている[2]が、実際には、4モルを常に保つことは困難であろう。また、副生する2モルの酢酸は、メタン発酵や光合成細菌によるしかエネルギーとして回収できない。

以下、本文では、ii)とiii)を中心に著者らの研究をも含め、概観していきたい。

2. 水素生産に関与する酵素について

まず、バイオ水素の原理について触れておく。水素生産に関与する酵素は、ニトロゲナーゼ[3]とヒドロゲナーゼ[4]の2種類がある。

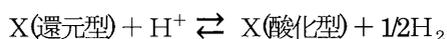


という空中窒素をアンモニアに還元する反応を行うが、基質特異性が広くプロトン還元反応、すなわち、次の水素生産反応をも行う。



窒素ガス還元反応と水素生産反応は互いに競合するが、窒素ガス100%雰囲気下でも水素生産反応は副反応として25～30%の速度でおこる。還元力はフェレドキシン（各種の細菌や藻類、植物に存在する低分子量の電子伝達タンパク質）によって供給されるとされる。ニトロゲナーゼによる水素生産はATPを消費する（酵素の作用時に立体構造の変化のために消費されるとされる）分だけエネルギー的に損であるが、反応は水素の発生側に非常に傾いており事実上の不可逆反応である。

ヒドロゲナーゼは、



(Xは電子伝達体)の可逆反応を触媒する酵素である。ニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼとも純粋な状態では酸素に弱い、後者は酸素に比較的耐性があるものが存在するなど、多様性がある。微生物における役割も異なる。ヒドロゲナーゼについては、Vignaisの総説[4]に詳しい。Xには、フェレドキシン、チトクローム_c₃、NAD⁺などが知られる。緑藻ではXはフェレドキシン、シアノバクテリアでは、遺伝子構造の解析結果によって、ジアフオラーゼ（生体内の電子のキャリアーである NAD⁺やメチレンブルーなど人工的な電子伝達体と電子の受け渡しをする酵素）とヒドロゲナーゼが複合体を形成し、NAD⁺と電子を授受すると考えられている。

上述のようにニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼとも酸素に弱く、阻害、失活を受ける。ニトロゲナーゼを有する光合成微生物のうち、シアノバクテリアは、細胞レベルで対酸素防御機構を有するので、生菌体では好気条件で窒素固定、ひいては水素生産が可能である。光合成細菌では、ニトロゲナーゼは対酸素防御機構を有せず、その酵素活性を示すには嫌気条件が必要である。ヒドロゲナーゼによる水素生産活性は、基本的に酸素の無い条件で発揮される。

3. 光合成細菌および嫌気性細菌との混合培養による水素生産

光合成というと、酸素の生成、二酸化炭素の還元によるデンプンの生成というイメージが強くなるが、これは植物

とシアノバクテリア、藻類（緑藻を含む）による光合成である。もちろん生態学的にも重要で、主な光合成のタイプである。しかし、実は光合成には、もう一つのタイプがある。これは細菌型光合成と呼ばれ、水の代わりにイオウ化合物や有機酸を電子供与体とする光合成を行う。よって、酸素は生成しない。

光合成細菌による水素生産は電子供与体の供給を要することは一面制限条件であるが、有機廃棄物の処理を兼ねることができる、酸素を発生せず生成ガスは炭酸ガスと水素のみでガス分離が容易、水分解に光エネルギーを使わなくて良いため水素発生速度は大きい、など利点でもある。

光合成細菌の水素生産に関与するのは多くの場合ニトロゲナーゼであり、ヒドロゲナーゼは取り込みに関与することが多い。

Miyakeらが分離した強力な水素生産光合成細菌、*Rhodobacter* 8703株は、乳酸を電子供与体とし人工光源を用いた実験では最大約7%の変換効率（発生した水素の燃焼エネルギー/入射光エネルギー）を達成した[5]。光が充分である条件下では、当該分離株は、262 μl/h/mg cell と光合成微生物としての最高値を示した。

光合成細菌による水素生産の研究例は非常に多く、特に各種実廃水を用いた水素生産の研究は、近年、アジア各国を中心にさかんである[6]。

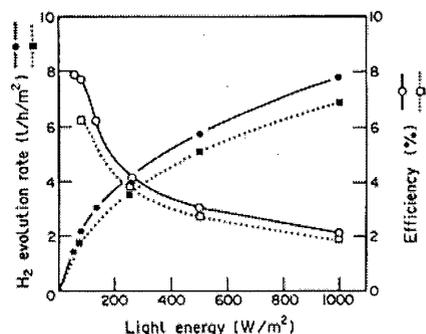
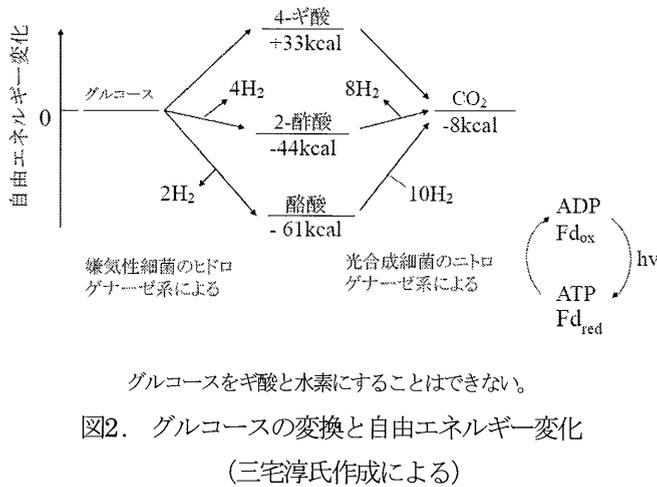


Fig. 1. Hydrogen production rate and efficiency vs light intensity: Light sources were; real line, xenon lamp; dotted line, filtered xenon lamp (solar simulator).

図1. *Rhodobacter*8703株による水素生産とエネルギー変換効率 [5]

水素生産の基質（原料）として廃棄バイオマスの主成分である糖質は当然考慮すべきであるが、光合成細菌は糖よりも主に有機酸を好んで利用するものが多い。この問題点を解決するため、Miyakeら[7]は、嫌気性細菌である *Clostridium* と光合成細菌、*Rhodobacter sphaeroides* RV の



混合培養系（寒天による混合固定化）によって糖の還元力を効率良く水素として取り出すことが出来る系を確立した。すなわち、図2.に示すように、糖 → H₂ + 有機酸、の発エルゴン反応を嫌気性菌が行い、有機酸 → H₂ + CO₂ の吸エルゴン反応を光合成細菌が光エネルギーの投入によって行う。全反応のグルコース1モル当りの理論収率は、水素ガス 12モルであるが、実際にも約7モルと、高かった。

このような混合培養系の研究例は多いが、我々のグループは、*Clostridium*の替わりに培養のより容易な乳酸菌 [8]、大腸菌、エンテロバクター、または*Rhizopus*（クモノスカビ） [9]の4種をそれぞれ*Rb. sphaeroides* RV と混合固定化し、グルコースからの水素生産を試みた。

その結果、乳酸菌とRV株の混合固定化では、7.1モル水素 / 1モルグルコースと、*Clostridium* との混合培養系に匹敵する結果を得た。*Clostridium*とは異なり、乳酸菌はグルコースを分解する過程では水素を生産しないが、生成する乳酸は一般に光合成細菌にとって水素生産に適した基質であることが知られている。

さらに、*Rhizopus* とRV株の組み合わせでは、約8モル水素 / 1モルグルコース の高収率が得られた（図3. ■はグルコース+窒素源として加えたグルタミン酸、◆はグルタミン酸のみでの水素生産量、差が収率に対応）。*Rhizopus*は嫌気性ではなく、好気性のカビなので、好氣的に培養した後、RV株と混合固定化するのである。*Rhizopus*は乳酸菌と同様、主として乳酸を生成し、他の有機酸の副生は少ない。また、嫌气的条件ではほとんど増殖しないと考えられ、一種の固定化酵素の様に使えるのであろう。乳酸菌は嫌气的条件でもよく増殖して乳酸をつくるので、pHが下がりRV株には悪く、その制御が困難である。乳酸菌との

組み合わせよりも*Rhizopus* との組み合わせがより高収率であるのは、このことが原因であろうと考えている。*Rhizopus*は、セルラーゼ活性も有しており、現在、デンプンや実廃水についても検討中である。

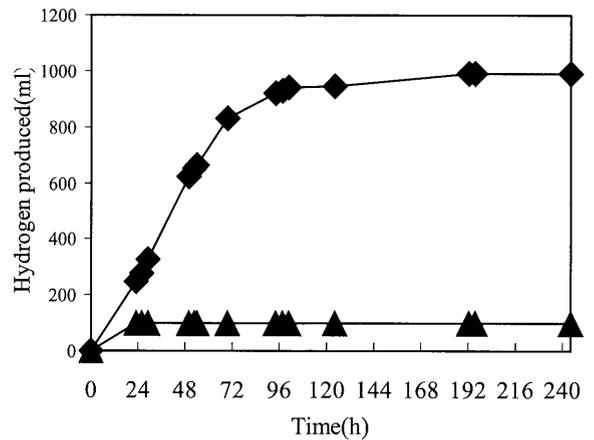


図3. *Rhizopus* とRVの混合固定化による水素生産

大腸菌およびエンテロバクターとRV株との混合固定化の結果は未発表であるが、大腸菌はペプトンや酵母エキスなどのリッチな培地で無いと水素生産が持続せず、これらはRV株のニトロゲナーゼ生成を抑制し、全体として水素生産は困難であった（ニトロゲナーゼは、窒素源欠乏状態でないと合成されない）。エンテロバクターは、窒素源を制限した培地でも高い水素生産速度を保つが、アルコールやブタンジオールなどの副生物が多く、収率は3~4モル水素 / 1モルグルコースに留まった。

4. 緑藻による水素生産

クロレラ、クラミドモナスなど緑藻は、ヒドロゲナーゼによって水素を生産する。水素生産条件は複数あり、①これらの緑藻を嫌気暗条件に保った後、明条件に移すと水素と酸素が同時発生するが、やがて生成する酸素によって水素生産は停止する、②嫌気暗条件に保つだけでもデンプンの蓄積した藻体では、デンプンの嫌気分解により水素を生産する（アルコールや有機酸も副生）、この方法は、昼まず、クラミドモナスをイオウ（硫酸塩）制限培地で光合成的に増殖させると、この緑藻の光合成システムのうち、酸素発生系の活性が低下し、3.で述べたような細菌型光合成を行うようになる、次に嫌気明条件に移すと水素生産が観察される（電子供与体は、藻体内のデンプンなど有機物であると考えられる）。これも水素生産と酸素の生成を時

間的に分けている。

また、緑藻によりデンブンを生産させ、これから水素を生産させる方法もある。Miyamotoらは、緑藻、*Chlamydomonas* (クラミドモナス)、*Dunaliella*などの藻体に含まれる貯蔵デンブンを原料として、乳酸菌による乳酸発酵と乳酸を基質とする光合成細菌による光水素生産というシステムを構築した[12-14]。生成した水素は、耐塩性光合成細菌を用いた系では緑藻デンブンプ中のグルコース1モルあたり6ないし8モルに達した[13]。

5. シアノバクテリアによる水素生産

シアノバクテリアは約半世紀前は blue-green algae と呼ばれていたが、現在では細菌であるという認識は定着した。和名は、藍藻または藍色細菌と呼ばれる。高等植物や緑藻を含む藻類と同様な酸素発生型光合成をする。高等植物と藻類の葉緑体の起源は化石年代に他の細胞に取り込まれたシアノバクテリアであると考えられている (内部共生説)。

シアノバクテリアは細菌であるので、大腸菌を宿主として展開されてきた遺伝子工学技術の適用が緑藻よりも容易である。

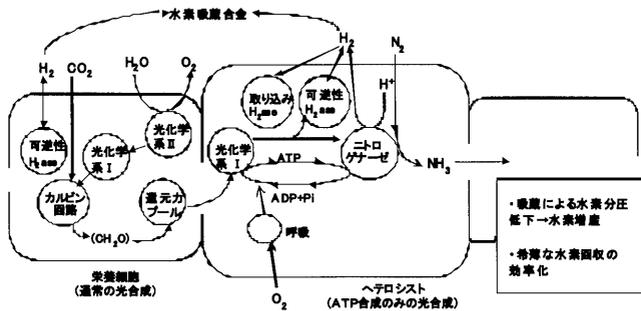


図4. ヘテロシストにおける水素の代謝

シアノバクテリアによる水素生産はニトロゲナーゼによるものとヒドロゲナーゼによるものがある。前者の酵素活性を有するシアノバクテリアは多くの場合後者の酵素活性をも有しており、水素の吸収や生産に関与して、水素の代謝を複雑にしている。

ニトロゲナーゼによる水素生産は、BenemannとWeareにより、糸状性シアノバクテリア、*Anabaena cylindrica*を用いて示された[15]。ニトロゲナーゼは、*Anabaena*などではヘテロシスト[16]に局在する。ヘテロシストは酸素発生

能のない特異な分化細胞でニトロゲナーゼを酸素から守るとともにATP合成活性 (いわば細菌型光合成による) を有し、酵素として機能させる (図4)。ただし、取り込みヒドロゲナーゼ (hup と略される) とともに可逆性ヒドロゲナーゼ (hox) をも有するため、水素の代謝は複雑であり、特にhupは正味の水素生産を減少させる。

Miyamotoら[17]は同株による水素生産 (アルゴンをベースとする混合ガス中に窒素源として窒素ガスを0.2~0.4%添加し、連続通気) を屋外で行い5週間以上の長期にわたり入射太陽光に対する平均変換効率 0.2%を得た。最大生産速度は約 140ml/培養液L/日であった。

Mitsuiら[18]は、海洋性シアノバクテリア、*Synechococcus* BG0043511 株 (単細胞であるが、好氣的に窒素固定をおこなう) を用いたシアノバクテリアとしては高い水素生産速度 (50 μl/h/mg cell) を達成した。

我々は、天然のhupマイナス株と推定される*Anabaena*の一種を用い、二酸化炭素を逐次添加した空気中で水素と酸素を蓄積させた[19]。

櫻井のグループは、遺伝子工学によって*Anabaena*のhupマイナス変異株を創製し[20]、これを用いた大規模な水素生産システムを提案している[21]。

以上はニトロゲナーゼによるものであるが、シアノバクテリアでも、ヒドロゲナーゼによる水素生産が、我々のグループ[22,23]、およびLindbladら[24]によって報告されている。

緑藻と異なり、水素生産条件は、嫌気暗条件のみである。電子供与体は菌体内に蓄積された藍藻デンブンとも呼ばれるグリコーゲンである。やはり、アルコールや有機酸を副生する。Lindbladら[24]は、*Gloeoactis* (*Synechococcus*とも分類される) がほぼ酢酸のみを副生する理想的な発酵タイプにより、26 μl/h/mg cellの水素を生産すると報告している。しかし、菌体懸濁液とアルゴンガスを封入した閉鎖系では水素が0.3%に達すると水素生産と取り込みが平衡になるので、アルゴンの連続通気を行っている。

我々のグループは、明条件での水素生産をめざして、以前に*Clostridium*のヒドロゲナーゼ遺伝子をシアノバクテリアに導入し、活性のあるヒドロゲナーゼの発現に成功した[25]が (無細胞抽出液中に活性および抗体で検出)、生菌体レベルでは水素の生産は認められなかった。おそらく、ヒドロゲナーゼタンパク質の酸素感受性によるものと思われる。

6. まとめと問題点

初めにも述べたが、微生物による水素生産は、速度は非光合成の嫌気性細菌による糖の発酵が最も高いが、対糖収率は低い。酸素発生（水分解）型のシアノバクテリアや緑藻が有機物を必要としない、従って二酸化炭素を排出しない点では理想的であるが、速度は相対的に遅い。光合成細菌はこの両者との中間の速度となる。糖質からの水素生産では、混合培養によって収率が改善できるが、水素生産速度は、もっと上げたいところである。

光合成細菌によるバイオ水素では、色素量の減少した変異株が、親株よりも高い水素生産性を示したのが見られる[26]。また、本稿で概説した緑藻、*Chlamydomonas*を用いた水素生産では、同緑藻を用い極めて多様な遺伝子組み替え研究がなされている[27]。その中で、Melisらのグループは、光合成単位のクロロフィル数を減少させることをめざしている。光合成は量子的な過程で、遺伝子工学的改変は困難であるとされるが、バイオ水素に限らず、近年油脂や炭化水素の生産者として各種の藻類が注目されているが、律速段階はやはり高い速度での大量培養である。今回は触れなかったが、光バイオリクター開発とともに、藻類の改良が今後とも注目されていくであろう。

参考文献

1. Y. Asada and J. Miyake, *J. Biosci. Bioeng.* **83**, 1-6 (1999)
2. S.W.M. Kengen, and A.J.M. Stams, *Arch. Microbiol.* **161**, 168-175 (1994)
3. J. Miyake et al.: O.Kitani and C.W.Hall (ed.): Biomass Handbook, Gordon & Breach Science Publishers, NY, pp.362-370 (1989)
4. P.M. Vignais, B. Billoud, J. Meyerm, *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 455-501 (2001)
5. J. Miyake and S. Kawamura, *Int. J. Hydrogen Energy*, **39**, 147-149 (1987)
6. D. Das and T.N. Veziroglu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**, 6046-6057 (2008)
7. J. Miyake, X.-Y. Mao and S. Kawamura, *J. Ferment. Technol.*, **22**, 531-535 (1984)
8. Y. Asada, M. Tokumoto, Y. Aihara, M. Oku, K. Ishimi, T. Wakayama, J. Miyake, M. Tomiyama and H. Kohno, *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1509-1513 (2006)
9. Y. Asada, K. Ishimi, Y. Nagata, T. Wakayama, J. Miyake and H. Kohno, *J. Res. Inst. Sci. Technol., College of Science and Technology,* Nihon University, Vol. 2010, No. 122, 19-24 (2010)
10. J.R. Benemann, K. Miyamoto and P.C. Hallenbeck, *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 103-111 (1980)
11. M.L. Ghirardi, L. Zhang, J.W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum and A. Melis, *Trends Biotechnol.* **18**, 506-511 (2000)
12. A. Ike, N. Toda, K. Hirata and K. Miyamoto, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 428-433 (1997)
13. A. Ike, N. Toda, N. Tsuji, K. Hirata and K. Miyamoto, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 606-609 (1997)
14. A. Ike, T. Murakawa, H. Kawaguchi, T. Murakawa, K. Hirata and K. Miyamoto, *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 72-77 (1999)
15. J.R. Benemann and N.M. Weare, *Science* **184**, 174-175 (1974)
16. C. van Baalen, P. Fay and C. van Baalen (ed.): The cyanobacteria, Elsevier, Amsterdam, pp.187-198 (1987)
17. K. Miyamoto et al., *J. Ferment. Technol.* **57**, 287-293 (1979)
18. A. Mitsui et al., *Nature* **323**, 720-722 (1986)
19. Y. Asada and S. Kawamura, *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1063-1066 (1986)
20. H. Masukawa, M. Mochimaru and H. Sakurai, *Appl. Microbiol. Biotech.* **58**, 621-624 (2002)
21. H. Sakurai, H. Masukawa and K. Inoue, In P.M. Gault and H.J. Marler (eds.) Handbook in cyanobacteria: the biochemistry, biotechnology and applications. NOVA publishers, COMMACK, N.Y., pp.433-462.
22. Y. Asada and S. Kawamura, *J. Ferment. Technol.* **64**, 553-556 (1986)
23. K. Aoyama, I. Uemura and J. Miyake, *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 17-20 (1997)
24. O. Troshina, L. Serebryakova, M. Sheremetieva and P. Lindblad, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1283-1289 (2002)
25. Y. Asada, Y. Koike, J. Schnackenberg, M. Miyake, I. Uemura, and J. Miyake, *Biochim. Biophys. Acta* **1490**, 269-278 (2000)
26. T. Kondo, M. Arakawa, T. Hirai, T. Wakayama, M. Hara and J. Miyake, *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 145-150 (2002)
27. E. Eroglu and A. Melis, *Bioresour. Technol.* **102**, 8403-8413 (2011)