

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380200

研究課題名（和文） タイプの異なるニトロゲナーゼによるシアノバクテリア光合成水素生産の遺伝子工学的改良

英文課題名 Improvement of Photobiological Hydrogen Production of Cyanobacteria by Expressing Different Types of Nitrogenase through Genetic Engineering

研究代表者

桜井 英博（SAKURAI HIDEHIRO）

神奈川大学・光合成水素生産研究所・客員教授

研究者番号 10063645

研究成果の概要（和文）：

シアノバクテリアの光合成系とニトロゲナーゼを利用した水素生産の効率化のために通常の Mo 型ニトロゲナーゼ遺伝子代えて、V（バナジウム）型ニトロゲナーゼ、Fe-only（鉄）型ニトロゲナーゼ活性を発現した改良株を遺伝子工学的に作成することを試みた。Mo 型だけ、及び Mo 型と V 型の両方を持つ株の、Mo 型遺伝子を破壊した株を作成した。他の株または細菌のニトロゲナーゼ遺伝子を導入するためのプラスミドを準備した。Mo 型と V 型の両方を持つ株で、培地中の Mo 濃度低下により、Mo 型の活性を低下させる目的で、ガラス瓶に代えてガスバリアー性プラスチックバッグを利用した培養容器を開発した。

研究成果の概要（英文）：

In order to improve the nitrogenase-based photobiological hydrogen production by cyanobacteria, we aimed at creating cyanobacteria mutants that preferentially express V or Fe-only type nitrogenase in place of Mo type, by genetic engineering. We have knocked out the Mo type nitrogenase gene of the cyanobacteria that have either Mo type and V type, or solely Mo type. We have prepared plasmids that harbor V or Fe-only type genes. In order to decrease the Mo possibly eluted from culture glass bottles into the culture medium, we developed hydrogen- gas-barrier plastic bags.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,200,000 | 1,860,000 | 8,060,000 |
| 2010年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2011年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

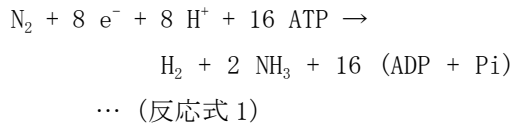
研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

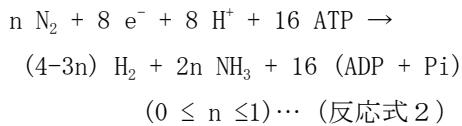
キーワード：シアノバクテリア、水素、光合成、ニトロゲナーゼ、再生可能エネルギー、バナジウム

1. 研究開始当初の背景

光合成微生物シアノバクテリア(別名:ラン色細菌、ラン藻類)の光合成系とニトロゲナーゼ反応を利用して、水素を生産できる。窒素固定効率の高い時の反応は次式で表される:



ニトロゲナーゼは活性中心に Mo を持つもの (Mo 型) が一般的であるが、生物種によっては Mo の代わりに V (バナジウム) を持つもの (V 型)、Fe を持つもの (Fe-only 型) がある。これまでに調べられた窒素固定シアノバクテリアは、全て Mo 型ニトロゲナーゼを持ち、更に V 型を持つものもあるが、Fe-only 型の存在は未だ報告されていない。Mo 型以外のものを含むニトロゲナーゼ反応の一般式は次式で表される:



N_2 が存在し、窒素固定に最適な条件下で、Mo 型では $n = 1$ であるが、他の型では $n < 1$ であり、後者は N_2 存在下でも水素生産に向かう電子の割合が高いと考えられる。

したがって、通常の Mo 型に代わって V 型、さらには Fe-only 型を発現させたシアノバクテリアは、Mo 型と比較して、 N_2 存在下で光合成活性に基づく水素生産性が高いと予想される。さらに、 N_2 非存在でも、酵素の分子活性の差により水素生産を高いという可能性が考えられた。

2. 研究の目的

Mo 型と V 型を持つものについては V 型を優

先的に発現させること、及び Mo 型だけを持つものは Mo 型遺伝子を破壊したのち他の型の遺伝子を導入した変異株を作成し、水素生

産に対する効果を研究することを目的とする。

Mo 型と V 型の両方を持つシアノバクテリアは、Mo をできるだけ除いた培養液ですることにより Mo 型の活性が抑えられ、V 型の活性が高くなる可能性が考えられるので、Mo をできるだけ除いた培養法について検討した。

また、自然界から光合成及びニトロゲナーゼ活性の高い株を選抜すること、さらに選抜した株について、ニトロゲナーゼ関連の遺伝子配列を明らかにして改良を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Nostoc* sp. PCC 7422 株は、世界の学術的株保存センターから入手した 13 株の中で、光合成に依存したニトロゲナーゼ活性が最も高かった株で、Mo 型のほかに V 型ニトロゲナーゼを併せ持つ。その取り込み型ヒドロゲナーゼを分断破壊した株 (Δ Hup) を親株とし、Mo 型および V 型の遺伝子の塩基配列を明らかにし、研究材料とした。V 型を優先的に発現した株を得て、その水素生産活性について比較研究する。方法としては、Mo 型遺伝子を遺伝子工学的に破壊した変異株を作成すること、及び培養液から Mo を除き V 型の活性が優先的に発現する細胞を得るための条件について検討する。

(2) *Nostoc/Anabaena* sp. PCC 7120 株は、窒素固定シアノバクテリアの中で、全ゲノム情報が最初に明らかにされた株で、ニトロゲナーゼは Mo 型のみを持つ。この株の Δ Hup 変異株は既に作成済みであり、これを親株として、Mo 型の遺伝子を破壊し、他の株の V 型あるいは Fe-only 型ニトロゲナーゼ遺伝子を導入するための株を作成する。

(3) 培養にガラス瓶を用いると容器に不純物として含まれる Mo が培養液に溶出する可能性があるため、水素バリアー性の柔軟プラスチック容器の開発を行う。

(4) 淡水域(川、池、田等)から水を採取し、光合成及び窒素固定活性の高い株を選抜する。方法としては、窒素栄養塩類を含まない培地中で、屋外光下での成育速度の高いものを選抜する。

4. 研究成果

(1) Mo 型と V 型の 2 種類のニトロゲナーゼを持つ *Nostoc* sp. PCC 7422 の両方の遺伝子の塩基配列を明らかにした。配列情報に基づき、 Δ Hup 株を親株として、Mo 型ニトロゲナーゼ *nif* 遺伝子を破壊した変異株 (Δ Hup/ Δ Nif 株) を遺伝子工学的に作成した。その水素生産特性について親株との比較研究を行っている。また、V 型ニトロゲナーゼ *vnf* 遺伝子を持つプラスミドを作成した。

(2) *Nostoc/Anabaena* sp. PCC 7120 株の Mo 型ニトロゲナーゼ遺伝子 *nif* を破壊した株を作成した。この株にシアノバクテリア *Anabaena variabilis* の V 型ニトロゲナーゼ遺伝子 (*vnf*) クラスター、または従属栄養窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* の Fe-only 型ニトロゲナーゼ (*anf*) 遺伝子クラスターを導入するためのプラスミドを作成した。遺伝子導入のための準備は完了し、これらの遺伝子を Triparental mating 法によりシアノバクテリアに導入し、変異株の選抜を行っている。

(3) Mo 型と V 型の両方を持つ *Nostoc* sp. PCC 7422 株のヒドロゲナーゼ破壊株 (Δ Hup) について、培地中の Mo 濃度を低下させることにより、V 型ニトロゲナーゼが高い細胞をガラス容器内での培養により得ることを試みたが、高純度の試薬を培養液作成に用いても Mo 型の活性がなかなか低下しなかった。培養に用いるガラス瓶から Mo 等が混入するおそれが考えられたので、ガスバリアー性プラスチックバッグを利用した培養法を開発した。水素バリアー性の柔軟なプラスチックバッグは、将来の屋外での生産実施において、安

価なバイオリアクターの素材とし適していることを示した。

(4) 首都圏周辺から採集した陸水中のシアノバクテリアを屋外で培養し、光合成及び窒素固定活性に依存した成育速度を比較した。50 以上の試水の培養から、候補となる株を複数得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(いずれも査読あり)

① M. Kitashima, H. Masukawa, H. Sakurai, K. Inoue (2012) Flexible plastic bioreactors for photobiological hydrogen production by hydrogenase-deficient cyanobacteria. *Biosci. Biochem. Biotechnol.* 76: 831-833.

② H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, R.P. Hausinger (2012) Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water. *AMBIO* 41, suppl. (2) 169-173.

③ 北島正治、桜井英博、井上和仁 (2011) シアノバクテリアを利用した海面上での水素の大規模生産、*水環境学会誌* 34:108-112.

④ H. Masukawa, K. Inoue, H. Sakurai, C.P. Wolk, R.P. Hausinger (2010) Site-directed mutagenesis of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 nitrogenase active site to increase photobiological hydrogen production. *Appl. Env. Microbiol.* 76: 6741-6750.

⑤ H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue (2010) A feasibility study of large-scale photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 675: 291-303.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 櫻井英博、増川一、北島正治、井上和仁、シアノバクテリアのニトロゲナーゼによる水素生産の持続性の向上とバイオリクター素材の検討. 第14回マリンバイオテクノロジー学会 (2011. 5. 28-29) 静岡(セッション座長)
 - ② H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, Challenges for large-scale photobiological hydrogen production on the ocean surface. Marine-Tech Summit-2010 (2010. 10. 25-28), Dalian (セッション座長)
 - ③ H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, Culture conditions and genetic engineering towards improved photobiological hydrogen production by cyanobacteria. 15th International Congress on Photosynthesis (2010. 8. 22-27) Beijing,
 - ④ H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, A survey of the economical viability of large-scale photobiological hydrogen production utilizing cyanobacteria. 13th International Conference on Phototrophic Prokaryote (2009. 8. 10-15) Motreal
- (他 13 件)

[図書] (計 4 件)

- ① H. Sakurai, M. Kitashima, H. Masukawa, K. Inoue, Improvement of nitrogenase-based photobiological hydrogen production by cyanobacteria by gene engineering In: Proc. 15th International Congress on Photosynthesis, Springer Verlag (in press)
- ② 櫻井英博、光合成による水素生産、「水素の事典」(朝倉書店) (印刷中).
- ③ 櫻井英博、藻類の光合成、「藻類ハンド

ブック」(監修: 渡邊 信) (エヌ・ティー・エス) (印刷中) (査読あり).

- ④ H. Sakurai, H. Masukawa, K. Inoue (2009) A preliminary survey of the economical viability of large-scale photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria. In (Gault, PM, and Mahler, HG eds.) “New Research on Energy Economics” Nova Science Publisher. pp. 443. 462.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

出願人: 早稲田大学、神奈川大学
名称: ガスサンプリングデバイス
発明者: 櫻井英博、増川一、井上和仁、北島正治
権利者: 早稲田大学、櫻井英博 (神奈川大学より譲渡)
種類: 特願
番号: 特願 2009-218160、
出願年月日: 特願 21 年 9 月 18 日、優先権出願 21 年 12 月 18 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
神奈川大学・光合成水素生産研究所
<http://bio-hydrogen.kanagawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 英博 (SAKURAI HIDEHIRO)

神奈川大学・光合成水素生産研究所・客員教授

研究者番号: 10063645

(2) 研究分担者

井上 和仁 (INOUE KAZUHITO)

神奈川大学・理学部・教授
研究者番号：20221088