

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06296

研究課題名(和文) 極端な窒素飢餓状態に置かれたヘテロシスト形成型シアノバクテリアによる水素生産

研究課題名(英文) Hydrogen production by heterocyst-forming cyanobacteria placed in extreme nitrogen-starved state

研究代表者

井上 和仁 (INOUE, Kazuhito)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：20221088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糸状性シアノバクテリアであるNostocは、窒素飢餓条件下でヘテロシストを分化させ、その内部でニトロゲナーゼを発現して窒素固定を行う。この際、ニトロゲナーゼの基質となる分子状窒素(N<sub>2</sub>)を欠く人工気相下にNostocを置くと、アンモニアの代わりに、多量の水素(H<sub>2</sub>)が生成する。本研究は、窒素栄養とN<sub>2</sub>の制限下に置かれたNostocの代謝生理を明らかにし、長期にわたり水素生産を可能にするメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化石燃料に代わるエネルギー資源として水素エネルギーが注目されているが、将来的に期待される水素製造法の一つに光合成微生物を利用した光生物学的水素生産がある。太陽から供給される光エネルギーによって光合成を駆動し、光合成産物から水素を生産する一連の流れは、低環境負荷・低炭素社会の実現に大きく貢献すると期待される。光合成微生物による光生物学的水素生産法は、既存の化石燃料を利用した水素生産法とは異なり、水素の生産時に二酸化炭素を放出しないカーボンニュートラルな生産法である。本研究は光合成微生物であるシアノバクテリアを利用した光生物学的水素生産法の実現のための基礎研究である。

研究成果の概要(英文)：Nostoc, a filamentous cyanobacteria, differentiates heterocysts under nitrogen starvation conditions and expresses nitrogenase within them to fix nitrogen. At this time, if Nostoc is placed under an artificial gas phase lacking molecular nitrogen (N<sub>2</sub>), which is a substrate for nitrogenase, a large amount of hydrogen (H<sub>2</sub>) is generated instead of ammonia. The purpose of this study was to clarify the metabolic physiology of Nostoc strains under the restriction of nitrogen nutrition and N<sub>2</sub>, and to clarify the mechanism that enables long-term hydrogen production.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 水素 シアノバクテリア ニトロゲナーゼ 光生物学的水素生産

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地表に到達する太陽光エネルギーは、人類が消費する化石燃料エネルギーの 6,000 倍以上と膨大であり、量的に再生可能エネルギー源として有望であるが、その平均エネルギー密度は約  $1,500 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{yr}^{-1}$  と低く、いかにして経済性を確保しつつこれを利用するかが課題となる。植物や藻類などの光合成生物を利用したバイオ燃料の研究は様々に行われているが、エネルギー変換効率、経済性、大規模化、食料生産との競合など克服すべき課題は多い。

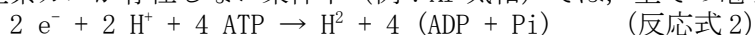
シアノバクテリアは植物や藻類と同様に水を光合成の電子供与体として用いる酸素発生型の光合成を行う原核生物(細菌)である。紅色光合成細菌や緑色細菌等のいわゆる光合成細菌は水を光合成の電子供与体に用いることができず、硫化水素や有機酸などを用いて光合成を行う。資源量を考えると、水を使って光合成を行うシアノバクテリアを利用したバイオ燃料の生産は非常に有利であると考えられる。シアノバクテリアは形態学的にも、生態学的にも非常に大きな多様性を持つ細菌群である。この中で一部の糸状性シアノバクテリア (*Anabaena* や *Nostoc* 属等) は、硝酸塩類などの窒素栄養源が欠乏した条件下では、通常の酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部が、約 10 - 20 細胞の間隔で異型細胞 (ヘテロシスト) へと分化し、窒素固定酵素ニトロゲナーゼの反応により大気中の  $\text{N}_2$  を還元しアンモニアを生産する。

ヘテロシスト内部は、酸素発生源となる光化学系 II が不活性化され、加えて細胞壁を肥厚させて外部から細胞内への酸素透過を防ぎ、呼吸活性を増加させて酸素を除去しており、細胞内部の酸素濃度は低い状態に保たれている。ニトロゲナーゼは酸素により失活しやすいが、上述のように、ヘテロシスト内部は酸素濃度が低いため活性を維持することができる。糸状体全体としては通常的光合成を行う栄養細胞と窒素固定を行うヘテロシストで役割を分業させており、糸状体はあたかも多細胞生物のような細胞共同体として存在している。糸状体の細胞間には細胞間連絡が存在し、栄養細胞で酸素発生型光合成による糖質合成が行われ、その糖質がヘテロシストへ運ばれ、ニトロゲナーゼ反応を駆動する還元力の源となる。ヘテロシストには光化学系 I が存在するので、光化学系 I の循環的な電子伝達系によって光エネルギーを利用してニトロゲナーゼ反応に必要な ATP を生産でき、合成されたアンモニアはグルタミンに変換されて栄養細胞へと輸送される。このように光合成と窒素固定が空間的に分離されることにより、糸状体全体として酸素発生型光合成とニトロゲナーゼ反応の両立が可能となる。

ニトロゲナーゼは、空気中の窒素ガス  $\text{N}_2$  を固定する酵素として知られているが、必然的な副産物として  $\text{H}_2$  も生産される (反応式 1)。シアノバクテリアの他、マメ科植物の根に共生する根粒菌など一部の原核生物がその活性を持つ。酸素発生型光合成生物のうちニトロゲナーゼを持つのは、一部のシアノバクテリアに限られ、クロレラなどの真核光合成生物は持たない。酵素は、多くの場合モリブデン (Mo)、鉄 (Fe)、硫黄 (S) からなる金属クラスターを結合している (Mo 型ニトロゲナーゼ) が、Mo の代わりにバナジウム (V) (V 型ニトロゲナーゼ) や Fe のみ (Fe-only 型ニトロゲナーゼ) を持つものもある。窒素固定の効率が最も高いとき ( $\text{N}_2$  濃度が十分高いとき)、Mo 型酵素の反応は、次式のように表され、電子の 1/4 が水素生産に向けられる。



窒素ガスが存在しない条件下 (例: Ar 気相) では、全ての電子が水素生産に向かう。



ニトロゲナーゼは、上記反応式に示されるように大量の ATP (生体の高エネルギー物質) を消費するので理論的最高エネルギー変換効率は低いが、水素生産が不可逆的に起こることが、その利点である。

水素生産に利用できる酵素として、シアノバクテリアは、ヒドロゲナーゼも持つ。ヒドロゲナーゼは水素生産の理論的最高エネルギー変換効率が非常に高いが、反応は可逆的なため、光合成により生成する酸素の存在下では生産された水素の再吸収が起こりやすい。また、ほとんどの窒素固定生物は、ニトロゲナーゼによって発生した  $\text{H}_2$  を再吸収する取り込み型ヒドロゲナーゼ (Hup) を持ち、Hup 活性の存在は、水素生産を妨げる。

報告者は、このような総合的判断から、ニトロゲナーゼを基礎とする水素生産方式を採用し、その研究開発に取り組んできた<sup>1), 2), 3), 4), 5)</sup>。

### 2. 研究の目的

糸状性シアノバクテリアである *Nostoc* は、窒素飢餓条件下でヘテロシストを分化させ、その内部でニトロゲナーゼを発現して窒素固定を行う。この際、ニトロゲナーゼの基質となる  $\text{N}_2$  を欠く人工気相下に *Nostoc* を置くと、アンモニアの代わりに、多量の  $\text{H}_2$  が生成する。 $\text{N}_2$  制限下では、本来、 $\text{N}_2$  の還元 (窒素固定) に利用される還元力が  $\text{H}^+$  の還元に向けられるためである。さらに、ヘテロシストで発現している取り込み型ヒドロゲナーゼ Hup を不活化すると細胞外に排出される  $\text{H}_2$  量は大幅に増加する。Hup を不活化した *Nostoc* をガラスバイアルに入れて窒素栄養と  $\text{N}_2$  を制限すると、内部には  $\text{H}_2$  と  $\text{O}_2$  がほぼ 2:1 の比で蓄積する。そのままの状態では数日で  $\text{H}_2$  の発生は停止するが、内部の気相を随時更新することで、 $\text{H}_2$  の生産を数ヶ月に渡って持続させることができる。この間、細胞増殖は抑制されている。本研究は、窒素栄養と  $\text{N}_2$  の制限下に置かれた *Nostoc* の Hup 不活化株が長期に渡る持続的な水素生産を可能にする細胞の代謝生理適応を解き明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

長期に渡る持続的な水素生産を可能にする細胞の代謝生理適応を解き明らかにして、培養条件を確立する。これまでの研究で、この条件におくと *Nostoc* ΔHup 株は水素を過剰生産することが判っている。培養開始後、適当な時期に細胞をサンプリングし、水素生産活性、細胞の増殖速度、ヘテロシスト分化率、細胞形態、ニトロゲナーゼ活性、光合成活性など基本的なデータを作成する。長期に栄養制限下に置かれた細胞のプロテオーム解析やゲノム解析を行う。窒素栄養制限とニトロゲナーゼ活性及び水素生産性の関係を理解するために、緑色硫黄細菌や紅色細菌などの光合成細菌におけるニトロゲナーゼ活性と水素生産活性などについても比較研究を行う。

### 4. 研究成果

シアノバクテリアが連なった糸状体の栄養細胞の方では、通常の光合成反応が起こっているため、ガラス容器内部には  $O_2$  も溜まってくる。そうすると  $O_2$  がヘテロシスト内部に浸透し、ニトロゲナーゼの活性が落ちて  $H_2$  も低下する。実験では容量 25 mL のガラス容器に半分程度のシアノバクテリア培養液を入れて蛍光灯の照射下に置くと、一週間ほどで、気体の約 30% 程度の  $H_2$  が蓄積する。そのままでは  $H_2$  は増加しないが、ガラス容器内部の気体を Ar をベースにして 0.5% (v/v)  $N_2$  を含む初期気相に入れ替えると、再び、ニトロゲナーゼの活性が回復し  $H_2$  生産が再開される。この実験では気体の交換はガラス容器の栓に注射針を二本突き刺し、一方の針を  $H_2$  を含まない人工空気を溜めたガスバッグ、もう一方を注射筒にチューブで接続し、注射筒のピストンを引けば  $H_2$  と  $O_2$  を含む混合ガスが回収され、ガラス容器内部は最初の人工空気に置換される。これを繰り返せば、 $H_2$  と  $O_2$  を含む混合ガスを長期にわたって生産し回収し続けることが可能で、実際、本実験系では数カ月にもわたって、ガラス容器内部の培地を交換することなく、 $H_2$  生産を繰り返すことが確認できた (図 1)。

次に将来の大規模な水素生産を志向するために水素低透過性プラスチック素材<sup>6)</sup>を材料にバッグを作成し、シアノバクテリアの培養液を 1 L 袋内に入れて、バッグ内部の気相中に含まれる気体組成と培養液中のクロロフィル *a* 濃度を測定した。実際にプラスチックバッグ内で水素が蓄積し、一方、シアノバクテリアの成長は抑制されていることを確認した (図 2)。このシステムを利用した長期水素生産が可能かどうかは、現在も継続測定を行っている。

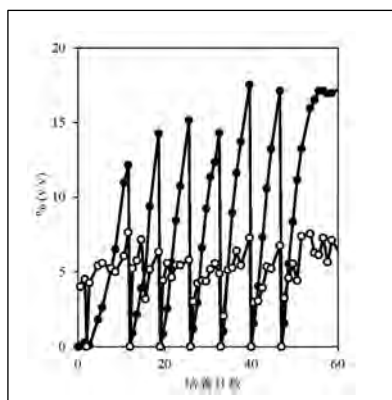


図 1 スモールスケールでの連続した水素生産

窒素栄養欠乏状態に移した *Nostoc* sp. PCC 7422 ΔHupL 株を、密閉ガラス容器に分注し、 $26^{\circ}C$ 、 $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の 12 時間明暗周期光下で培養した。2 日目までの、培養気相中の窒素ガス濃度は 0.5%、二酸化炭素ガス濃度は 5% とした。それ以降の培養気相の組成はヘテロシスト誘導期と同様にし、およそ 1 週間毎に気相の更新を行った。○は酸素、●は水素の濃度

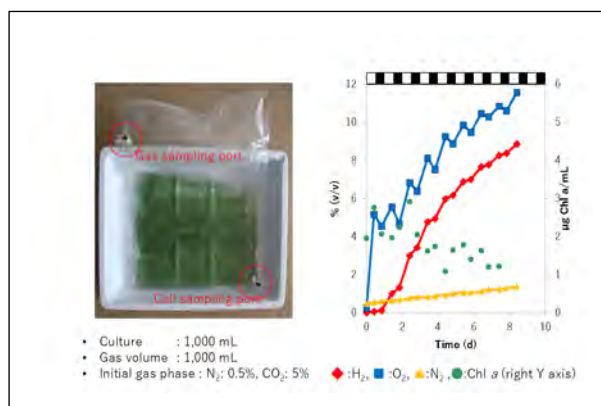


図 2 水素低透過性プラスチック素材を用いたミドルスケールでの水素生産

市販のアクリル酸樹脂系高分子をコートした PET 樹脂フィルムをベースにナイロン層がラミネートされた膜 (GLE, 凸版印刷) をオートクレーブ滅菌処理 ( $120^{\circ}C$ 、20 min) 後、熱融着によって密閉バッグを作り、内部に *Nostoc* sp. PCC 7422 ΔHupL 株の培養液を 1 L 入れた。Ar ベースに 0.5%  $N_2$  と 5%  $CO_2$  を含む気体を初期気相として、バッグを密着後、培養を開始した。

1ヶ月ほどの窒素栄養制限下で、水素生産を行った細胞についてプロテオーム解析及びゲノム解析を行なった。現在、分析結果を解析中である。今後は、さらに数ヶ月間の長期にわたって水素生産を行なった株についての解析が必要である。

シアノバクテリアを利用した水素生産の実用化のためには、経済的に大規模に行うための様々な課題を克服する必要がある。水素生産の低コスト化につながる改変として、今後、エネルギー変換効率や長期の生産安定性をさらに向上させる必要がある。本研究で得られたデータをさらに詳細に解析することで、遺伝子工学的な改良のターゲットを絞ることが可能であると考えている。また、水素生産の大規模化のために、プラスチックバッグの大型化、多層化も今後必要である。これらの改良を積み重ねることで、水素生産が強光下で数週間持続するようにし、光から水素へのエネルギー変換効率を1%以上に高めることが今後の目標である。

#### 参考文献

- 1) H. Masukawa *et al.*, *Ambio*, 41, 169-173 (2012).
- 2) H. Sakurai *et al.*, *J. Photochem. Photobiol., C. Photochem. Rev.*, 17, 1-25 (2013).
- 3) H. Sakurai *et al.*, *Mar. Biotechnol.*, 9, 128-145 (2007).
- 4) 増川一ほか, 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望, シーエムシー出版, p. 80-87 (2012).
- 5) H. Sakurai *et al.*, *Life*, 5, 997-1018 (2015)
- 6) M. Kitashima *et al.*, *Biosci. Biotech. Bioch.*, 76, 831-833 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

|                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Daisuke Seo, Masaharu Kitashima, Kazuhito Inoue                                                                                             |
| 2. 発表標題<br>Kinetic analysis of the reaction between NADP+/H and ferredoxin-NAD(P)+ reductase from green sulfur bacterium in the presence of ferredoxin |
| 3. 学会等名<br>10th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (国際学会)                                      |
| 4. 発表年<br>2019年                                                                                                                                        |

|                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>佐藤 剛, 水谷 穂波, 箭内 里帆, チャン ミイン チャウ, 柴田 智華, 櫻井 英博, 井上 和仁      |
| 2. 発表標題<br>シアノバクテリアAnabaena sp. PCC 7120における代替ニトロゲナーゼ発現株の作製と水素生産性の評価 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本植物生理学会年会                                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                                      |

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>大友 翼, 佐藤 剛, 櫻井 英博, 井上 和仁                            |
| 2. 発表標題<br>Anabaena sp. PCC 7120におけるフィコビリソームロッドコアリンカー遺伝子変異株の作製 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本植物生理学会年会                                      |
| 4. 発表年<br>2020年                                                |

|                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Takeshi Sato, Kenji Nagashima, Hidehiro Sakurai, Kazuhito Inoue                                                                                                |
| 2. 発表標題<br>Effects of stacked bioreactors using heterocystous cyanobacteria and purple bacteria for light energy utilization in photobiological H <sub>2</sub> production |
| 3. 学会等名<br>16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)                                                                                                |
| 4. 発表年<br>2018年                                                                                                                                                           |

|                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Kenji V. P. Nagashima, Sakiko Nagashima, Andre Vermeglio, Kazuhito Inoue                                                                           |
| 2. 発表標題<br>CYTOCHROMES C WORKING IN THE ALTERNATIVE CYCLIC ELECTRON TRANSFER PATHWAY OF PHOTOSYNTHESIS IN THE BETA- PURPLE BACTERIUM, RUBRIVIVAX GELATINOSUS. |
| 3. 学会等名<br>16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)                                                                                    |
| 4. 発表年<br>2018年                                                                                                                                               |

|                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Takeshi Sato, Hidehiro Sakurai, Kazuhito Inoue                                                                                                        |
| 2. 発表標題<br>Creations of mutants expressing alternative nitrogenase from heterocystous cyanobacteria and the availability for photobiological hydrogen production |
| 3. 学会等名<br>International Conference on Microbial Photosynthesis (国際学会)                                                                                           |
| 4. 発表年<br>2018年                                                                                                                                                  |

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>佐藤 剛, 永島 賢治, 櫻井 英博, 井上 和仁                               |
| 2. 発表標題<br>ヘテロシスト形成型シアノバクテリアと紅色光合成細菌を 組み合わせた積層バイオリアクターによる光生物学的水素生産 |
| 3. 学会等名<br>日本植物学会第 82 回大会                                          |
| 4. 発表年<br>2018年                                                    |

〔図書〕 計2件

|                                                                                                 |                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>分担執筆分 佐藤剛、井上和仁 執筆者総数 80名                                                              | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>技術情報協会                                                                                | 5. 総ページ数<br>515 |
| 3. 書名<br>バイオリアクターのスケールアップと物質生産事例集 第8章 バイオリアクターを利用した物質生産の事例：素材・エネルギー編 第3節 積層バイオリアクターによる光生物学的水素生産 |                 |

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>嶋田 敬三、高市 真一 編 執筆者総数 9名 | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>裳華房                    | 5. 総ページ数<br>320 |
| 3. 書名<br>光合成細菌                   |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|