

ラン藻の光生物的水素生産性向上に向けたヘテロシスト形成頻度の増大

増川 一^{1, 2}・井上 和仁^{2, 3}・櫻井 英博²

¹JST さきがけ、²神奈川大学光合成水素生産研究所、³神奈川大学理学部

〒259-1293 神奈川県平塚市土屋 2946

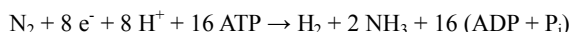
E-mail: jimimasu@gmail.com, wtk-0488gg@kanagawa-u.ac.jp

Home Page: <http://bio-hydrogen.kanagawa-u.ac.jp/index.html>

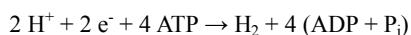
一部のラン藻は窒素固定酵素ニトロゲナーゼを持ち、その窒素固定反応の必然的副産物として水素を発生する。ニトロゲナーゼは酸素感受性だが、糸状性ラン藻の一部は、窒素固定に特化した異型細胞ヘテロシストを形成し、ニトロゲナーゼを酸素による失活から保護している。さらに、水素を再吸収する取込み型ヒドロゲナーゼの不活性化により、水素を酸素の共存下でも長期にわたり生産蓄積できる。ヘテロシストは、窒素栄養欠乏条件下で、栄養細胞の一部が通常約 10-20 細胞間隔で分化し形成されるが、栄養細胞（光合成による糖質供給）に対するヘテロシスト（ニトロゲナーゼによる水素生産）の割合を増加させれば、水素生産性が向上する可能性が考えられる。そこで本研究では、窒素固定ラン藻 *Anabaena* PCC 7120 を用いて、*patN* 遺伝子破壊を行い、ヘテロシスト形成頻度が親株と比べて約 2 倍増大し、2 個以上連続したヘテロシストはほとんど見られず、一定の間隔において規則的に形成される変異株を作成した。この変異株におけるヘテロシスト形成頻度の増加が水素生産性に及ぼす影響を調べた。

1. はじめに

水素は、将来のクリーンな再生可能エネルギーとして燃料電池などでの利用が期待される。藻類による光生物的水素生産には、酵素ヒドロゲナーゼまたはニトロゲナーゼを利用できる[1]。ニトロゲナーゼは、空気中の窒素ガスをアンモニアへと固定する酵素であるが、この反応（窒素固定反応）の必然的な副産物として水素が発生する。



上式では、電子の約 3/4 が窒素固定（ N_2 還元）に、残りの約 1/4 が水素発生（ H^+ 還元）に使われる。窒素ガスが存在しないアルゴン（Ar）気相下などでは、投入された全ての電子が水素生産に向かう。



ニトロゲナーゼ利用系の理論的な最大エネルギー変換効率は低い（通常の C3 型光合成の約 60%）、ヒドロゲナーゼと異なり酸素存在下でも不可逆的に水素を生産できる利点がある。ラン藻は一般にヒドロゲナーゼを持つので生産された水素を再吸収するが、ヒドロゲナーゼを遺伝子工学的に不活性化することにより、水素を酸素の共存下でも長期にわたり生産蓄積できる[2,3]。これらの長所から、遺伝子工学的手法による改

良を積み重ね、エネルギー変換効率を高めていけば、水素生産の省力化、低コスト化、大規模化の可能性が開けると期待される[4-7]。

Anabaena、*Nostoc* 属等のラン藻は、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、そこでニトロゲナーゼ反応を行う[8]（図 1）。その細胞内部の酸素濃度は低く維持され、ニトロゲナーゼ反応に必要な電子は、隣接する栄養細胞が光合成によって合成した糖質から供給される。ヘテロシスト（水素生産）の栄養細胞（光合成による糖質供給）に対する比率は通常 5-10%であるが、この比率を増大させれば、水素生産性が向上する可能性がある。

ヘテロシスト頻度が増加すると報告されている遺伝子変異のほとんどは、ヘテロシストが 2 つ以上連続して形成されるという問題があった。ニトロゲナーゼ反応に必要な還元力は、栄養細胞から供給される糖質に依存しているので、ヘテロシストは一定の間隔において形成されることが望ましい。そのような唯一の変異例として、*patN* 遺伝子破壊が他のラン藻株で報告されている[9]。本研究は、窒素固定ラン藻のモデル生物 *Anabaena* PCC 7120 株の取込み型ヒドロゲナーゼを

不活性化した ΔHup 株[2]を親株として、*patN* 遺伝子破壊株 (ΔpatN 株)を作成し、ヘテロシスト頻度増大が水素生産活性に及ぼす影響を調べた。

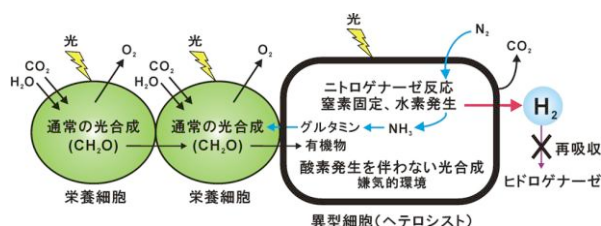


図 1. 窒素固定ラン藻における栄養細胞と異型細胞 (ヘテロシスト)

2. 結果と考察

ΔpatN 株のヘテロシスト頻度は、空気通気培養条件では 12-16%で、対照株 (親株 ΔHup) と比べて約 2 倍増加した。また、対照株では 2 つ以上連続したヘテロシストが一定割合形成されたが、 ΔpatN 株ではほとんど見られず、一定の間隔において規則的に形成された。同条件下で、窒素欠乏培地への移行後に誘導される水素生産活性およびアセチレン還元法によるニトロゲナーゼ活性の 10 日間にわたるタイムコースの結果からは、対照株と比べて ΔpatN 株の活性向上は見られなかった。ヘテロシスト頻度の増加に関わらず、活性向上につながらなかった原因として、ヘテロシスト当たりの栄養細胞数の減少または空気通気培養条件 (低 CO_2 濃度条件) のため、栄養細胞での糖質 (還元力源) 合成またはヘテロシストへの糖質供給が十分でないことが考えられた。

そこで、通気培養時の CO_2 濃度を高めたところ、 ΔpatN 株では水素生産の高活性の持続性が改善された。一方、対照株では、空気通気培養条件と同程度の活性レベルで、同じように高活性は急速に低下していった。活性測定と同時にを行った糖質 (グリコーゲン、スクロース) 測定の結果からも、 CO_2 濃度上昇により、光合成による糖質合成が活性化され、ヘテロシストへの糖質供給が増加した結果、 ΔpatN 株では高活性が持続するようになったということが支持された。対照株で同様な効果が見られなかったのは、ヘテロシスト当たりの栄養細胞数が ΔpatN 株より多いので、低 CO_2 濃度条件でもある程度十分な糖質合成ができており、これ以上に糖質合成が増大しても、ヘテロシストへの糖質供給段階が律速となっている可能性が考えられる。

以上の結果から、ヘテロシスト頻度の増加は高 CO_2 濃度条件では効果が見られ、水素生産の高活性が持続

するようになることがわかった。この効果による水素生産性の向上は、より長期間 (数週間) にわたる生産において、さらに顕著に見られることが期待される。

4. 今後の展望

我々は、これまでにラン藻の水素生産性向上に向けた改良研究で、以下の成果を達成した。(i)ヒドロゲナーゼ不活性化により、酸素存在下で水素を濃度 30%(v/v)に蓄積[3]。(ii)培地を換えることなく 60 日以上に亘り水素を生産。(iii)高い (光→水素) 光エネルギー変換効率 1.7% (実験室条件下)。(iv)ニトロゲナーゼの触媒部位 (金属クラスター) 周辺アミノ酸残基への部位特異的変異導入により、窒素ガス存在下でも窒素固定が起こらず、その分、高い水素生産活性を示す改良株の作成[10]。今後、水素生産の実用化に資するラン藻の開発には、屋外条件下 (強光下) でのエネルギー変換効率 (最高報告値は約 0.12%) の改善が必要である。上記のこれまでの改良成果をもとに、本研究のヘテロシスト頻度増加やニトロゲナーゼ反応に必要な還元力源の合成およびヘテロシストへの供給強化などの改良を組み合わせ、当面の目標として変換効率 0.5%の達成を目指し、さらに将来の実用化のためには、1%以上にまで効率を高めることを目標とする。

参考文献

- [1] Tamagnini P, *et al.*: Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, 1-20 (2002)
- [2] Masukawa H, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 618-624 (2002)
- [3] Yoshino F, *et al.*: Mar. Biotechnol., 9, 101-112 (2007)
- [4] 櫻井英博, 増川一: 燃料電池 Vol.6 No.2, 46-52 (2006)
- [5] Sakurai H and Masukawa H: Mar. Biotechnol., 9, 128-145 (2007)
- [6] Sakurai H, *et al.*: In Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes, Springer, p. 291-303 (2010)
- [7] Masukawa H, *et al.*: Ambio, 41, 169-173 (2012)
- [8] Wolk CP, *et al.*: In The molecular biology of cyanobacteria, Springer, p. 769-823 (1994)
- [9] Meeks JC, *et al.*: Arch. Microbiol., 178, 395-403 (2002)
- [10] Masukawa H, *et al.*: Appl. Environ. Microbiol., 76, 6741-6750 (2010)