



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 好熱性ランソウMastigocladus laminosusの水素発生に関する研究   |
| Author(s)    | 横山, 裕彰  |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33186">https://hdl.handle.net/11094/33186</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|             |  |                 |                 |                    |
|-------------|--|-----------------|-----------------|--------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 横 <sup>よこ</sup>  | 山 <sup>やま</sup> | 裕 <sup>ひろ</sup> | 彰 <sup>あき</sup>    |
| 学 位 の 種 類   | 薬  | 学               | 博               | 士                  |
| 学 位 記 番 号   | 第  | 5               | 4               | 9                  |
| 学位授与の日付     | 昭和 56 年 12 月 25 日                                      |                 |                 |                    |
| 学位授与の要件     | 薬学研究科 応用薬学専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                       |                 |                 |                    |
| 学 位 論 文 題 目 | 好熱性ランソウ <i>Mastigocladus laminosus</i> の水素発生に<br>関する研究 |                 |                 |                    |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授  | 三浦              | 喜温              |                    |
|             | (副査)<br>教 授  | 近藤              | 雅臣              | 教 授 岩田平太郎 教 授 青沼 繁 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

太陽エネルギー有効利用の方法の一つとして、光合成生物による水の光分解 (Biophotolysis) を利用する水素生産を挙げることができる。この方法は、豊富に存在する水を原料とし、太陽光エネルギーを駆動力として利用し、かつ、常温・常圧の下で水素および酸素を同時に生成する生物反応を利用していること、さらに生成する水素は無公害なクリーンエネルギーとして注目されている二次エネルギーであることなど、健康な人間生活をおくる上において非常に優れたエネルギー生産方式であると考えられる。

Biophotolysisを利用する水素生産方式として考案されている系は、

1. ヒドロゲナーゼ系 (緑藻を利用する方式、光合成成分と酵素を再構成する方式など)
2. ニトロゲナーゼ系 (ランソウや光合成細菌を利用する方式)

の二つに大別することができる。本研究では、ランソウを利用するニトロゲナーゼ系 Biophotolysis に着目した。

ランソウによる水素放出現象は古くから知られており、またニトロゲナーゼに関しても空中窒素固定を行なう酵素として、窒素固定の分野において非常によく研究が進められている。ランソウを用いた Biophotolysis に関する報告は、1974 年 Benemann と Weare により糸状性ランソウ *Anabaena cylindrica* を用いてなされ、<sup>1)</sup> 水素および酸素の同時発生が観察された。この水素発生はニトロゲナーゼの作用によると考えられた。*A. cylindrica* のような糸状性ランソウでは、ニトロゲナーゼは異質細胞 (ヘテロシスト, Heterocyst) に局在し、<sup>2)</sup> このため外部の酸素から保護されることとなり、酸素

および水素の同時発生が可能となったと考えられた<sup>1)</sup>。これ以後、ランソウを用いた Biophotolysis の研究は主に *A. cylindrica* を用いてよくなされ、以下の事実が認められている。

1. 水素代謝に関連する酵素として、reversible ヒドロゲナーゼ、ニトロゲナーゼそしていわゆる 'uptake' ヒドロゲナーゼの三種が知られているが、*A. cylindrica* の水素発生はニトロゲナーゼの作用である。
2. 水素発生は、窒素欠乏あるいは窒素制限細胞において高活性が認められる。
3. ランソウには水素取り込み活性の高いものが多く、このため水素発生が低下あるいは認められなくなる。
4. アセチレンと一酸化炭素が共存する気相下では水素発生が高くなる。

本研究において、好熱性ランソウを用いる Biophotolysis による水素生産の可能性ならびに窒素欠乏細胞における水素代謝に関し検討を加えた。

## 本 論

### 第1章 好熱性ランソウの分離とその水素発生の特徴

好熱性ランソウを、別府温泉白池地獄付近より採取の藻塊から分離し、希釈・洗浄法により単一な株を得た。このランソウは、イデユアイミドリ *Mastigocladus laminosus* Cohn (*Mastigocladaceae*, *Stigonematales*) と同定された。*M. laminosus* は硝酸塩を窒素源として増殖した細胞 (Nitrate-grown cells) ではヘテロシストの形成も水素発生も認めることはできなかったが、窒素固定により増殖した細胞 (Air-grown cells) ではヘテロシストの形成および水素発生を認めることができた (Fig. 1)。この水素発生は、窒素ガスにより阻害されまた、脱共役剤によっても阻害されたことなど (Table I) よりニトロゲナーゼの作用であると考えられる<sup>3)</sup>。なお、水素発生の最適温度は 44℃ ~ 49℃、最適 pH は、7.0 ~ 7.5 であった。また、暗所では水素発生を認めることはできなかった。

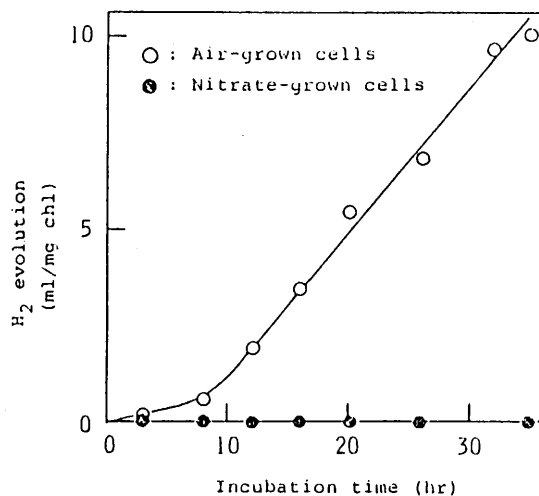


Fig.1. Profiles of  $H_2$  evolution of *M. laminosus* under  $Ar/CO_2$  in light.

Table I. Effect of inhibitors on H<sub>2</sub> evolution.

| Gas atmosphere<br>and inhibitor              | Final conc.<br>(mM) | Inhibition of                   |                                 |
|--|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|  |                     | H <sub>2</sub> evolution<br>(%) | O <sub>2</sub> evolution<br>(%) |
| Argon/3% CO <sub>2</sub> (control)           |                     | 0                               | 0                               |
| DCMU   | 0.001               | <5                              | >95                             |
|  | 0.01                | 10                              | >95                             |
|  | 0.1                 | 60                              | >95                             |
| Salicylaldoxime                              | 0.5                 | 30                              | 30                              |
|  | 5                   | >95                             | >95                             |
| 2,4-Dinitrophenol                            | 0.05                | 65                              | 20                              |
| N <sub>2</sub> (1%) in Argon/CO <sub>2</sub> |                     | 20                              |                                 |
| N <sub>2</sub> (2%) in Argon/CO <sub>2</sub> |                     | 50                              |                                 |
| N <sub>2</sub> (7%) in Argon/CO <sub>2</sub> |                     | 85                              |                                 |
| N <sub>2</sub> /3% CO <sub>2</sub>           |                     | 90                              |                                 |
| Air  |                     | >95                             |                                 |

## 第2章 水素発生を担う酵素ニトロゲナーゼの活性増大

水素発生を増加させるためにはニトロゲナーゼ活性を増大させる必要がある。そこで、*A. cylindrica*を用いた窒素固定の研究より明らかとなっている以下の二つの方法を適用した。

1. ニトロゲナーゼ合成制御に関係しているグルタミン合成酵素の阻害剤を添加する方法<sup>4)</sup>
2. 細胞内C/N比を大きくするために窒素欠乏条件下でインキュベートする方法<sup>5)</sup>

Table IIに示すように、グルタミン合成酵素阻害剤メチオニンスルフォキシミン (MSX) を添加したところ、*A. cylindrica*の水素発生およびヘテロシスト形成は増加したが、*M. laminosus*にはあまり効果はなかった。

Table II. Effects of MSX on H<sub>2</sub> evolution and heterocyst formation.

| Algae                | Concentration<br>of MSX<br>(μg/ml) | H <sub>2</sub> evolution<br>(ml/mg chl/24 hr) | Heterocyst frequency<br>(%) |
|----------------------|------------------------------------|---|-----------------------------|
|                      |                                    |   |                             |
| <u>Anabaena</u>      |                                    |   |                             |
| <u>cylindrica</u>    | 0                                  | 0.19  | 2.2± 0.26                   |
|                      | 0.5                                | 0.91  | 3.3± 0.26                   |
|                      | 1.0                                | 1.22  | 6.3± 0.66                   |
| <u>Mastigocladus</u> |                                    |   |                             |
| <u>laminosus</u>     | 0                                  | 1.56  | 1.7± 0.06                   |
|                      | 1.0                                | 1.73  | 2.4± 0.06                   |

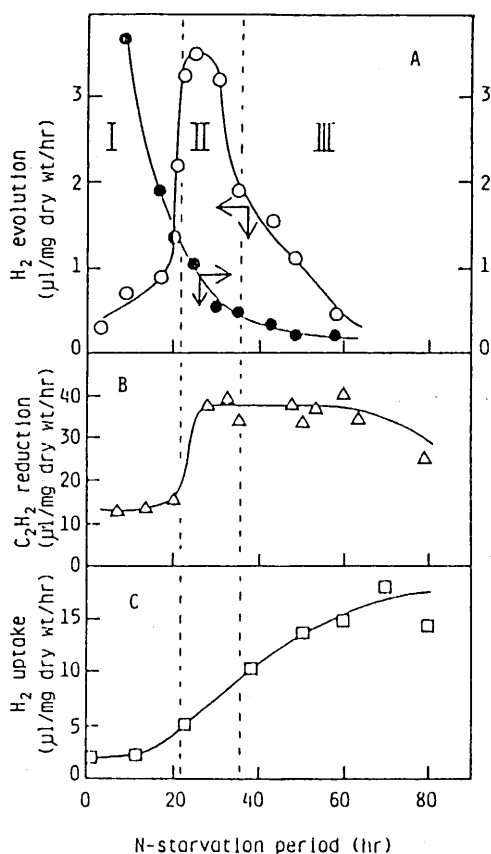


Fig. 2. Typical patterns of  $H_2$  and  $O_2$  evolution (A),  $C_2H_2$  reduction (B), and  $H_2$  uptake activity (C) during nitrogen starvation.

次に窒素欠乏条件下 ( $Ar/2.5\%CO_2$  通気下) でランソウをインキュベートしたところ、Fig. 2 に示すように、約 1 日後には水素発生

およびアセチレン還元 (ニトロゲナーゼ) 活性の著しい増加が認められた。したがって、窒素欠乏条件下でのインキュベーションは、*M. laminosus* のニトロゲナーゼ活性の増大、すなわち水素発生の増加に対し非常に有効であると考えられる。ところが、インキュベーションを続けると、数時間後から急激な水素発生の低下が認められた。この時期の細胞 (phase III 細胞, Fig. 2 参照) では高い水素取り込み活性が認められ、このために水素発生低下が生じたものと考え、次章において水素取り込み活性の制御について検討した。

### 第 3 章 水素発生低下の要因—水素取り込み活性—の制御

まず、温度および pH を制御することにより水素取り込み活性の抑制が可能かどうか検討したが、

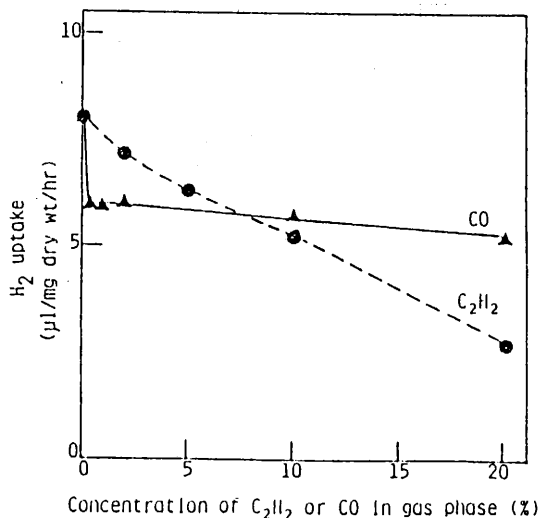


Fig. 3. Effects of  $C_2H_2$  and CO on  $H_2$  uptake.

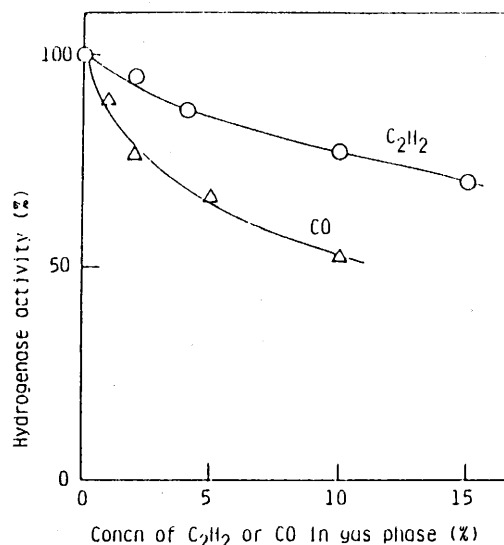


Fig. 4. Effects of  $C_2H_2$  and CO on hydrogenase activity. 100%;  $35.4 \mu l/mg$  dry wt./hr.

これらの因子の制御により水素発生の増加を計ることは困難であろうと思われた。そこで、ヒドロゲナーゼ阻害剤<sup>6,7)</sup>による水素取り込み活性抑制を検討した。Fig. 3に示すように、一酸化炭素では、20%まで濃度を変化させたが、どの濃度においても約25%の抑制しか得られなかった。アセチレンでは、添加濃度を大きくすればそれだけ抑制も大きくなり、10%で約30%の活性の抑制が認められた。一方、両気体のヒドロゲナーゼ活性に対する効果を検討したところ、両気体ともに濃度が大きくなるにつれ、活性阻害も大きくなった (Fig. 4)。

#### 第4章 一酸化炭素・アセチレン存在下 (水素取り込み活性抑制時) の水素発生

前章において、一酸化炭素およびアセチレンにより水素取り込み活性が、部分的にはあるが抑制されることが認められたので、これらの気体の水素発生に対する効果について検討した。一酸化炭素およびアセチレンは、それぞれ単独では水素発生を抑制したが、両者が共存した場合には水素発生の増加が認められた (Table III)。このとき、水素取り込み活性およびヒドロゲナーゼ活性は各単独気体による抑制より著しく大きく抑制されることは認められなかった。このような水素発生の増加は、水素取り込み活性の高い窒素固定微生物で認められている現象であり、<sup>7,8)</sup> この機構は両気体によるヒドロゲナーゼ阻害の他に一酸化炭素がニトロゲナーゼに作用し、その水素生成部位の抑制を解除するからであろうと報告されている。<sup>7,9)</sup> *M. laminosus*の窒素欠乏細胞においても同様の機構で水素発生の増加が認められるようになったと考えられる。

Table III. Effects of  $C_2H_2$ , CO and CO plus  $C_2H_2$  on  $H_2$  evolution of N-starved (phase III) cells.

| Addition of<br>gases        | $H_2$ evolution         |     |
|-----------------------------|-------------------------|-----|
|                             | ( $\mu$ l/mg dry wt/hr) | (%) |
| Ar/ $CO_2$ (control)        | 0.85                    | 100 |
| + 0.1% CO                   | 0.7                     | 82  |
| + 0.5% CO                   | 0.45                    | 53  |
| + 5% $C_2H_2$               | 0.35                    | 41  |
| + 10% $C_2H_2$              | 0.31                    | 36  |
| + 0.5% CO plus 5% $C_2H_2$  | 2.08                    | 245 |
| + 0.5% CO plus 10% $C_2H_2$ | 2.11                    | 248 |
| + 2% CO plus 5% $C_2H_2$    | 1.55                    | 182 |

次に一酸化炭素・アセチレン共存下での長期連続水素発生を試みた。Ar中においても $N_2$ 中においても、5日から10日毎に気相部を新しくすること (Replacement of gas phase) により、20日間の連続水素発生が可能であった。また、空気中 (Air) においても同様の操作で、15日間の水素発生が可能であった (Fig. 5)。このときの操作 (気相部を新しくする) の効果について検討した。両気体共存

下において9日間インキュベートした *M. laminosus* のアセチレン還元活性およびヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、窒素欠乏条件下でインキュベートしたもの (Ar/CO<sub>2</sub>, bubbling) に比べるとアセチレン還元活性は25~40%程度 (インキュベーション前の活性の2~3倍) はあったが、一方、ヒドロゲナーゼ活性は40~50%しか認められなかった (Tabl IV)。次にインキュベーションを行っている容器中より酸素を除去するため sodium dithionite (DT) の添加を行なった。<sup>10)</sup> 3週間両気体共存下でインキュベーション後気相部を新しくし水素発生を行なわせたところ1~2日間水素発生を認め

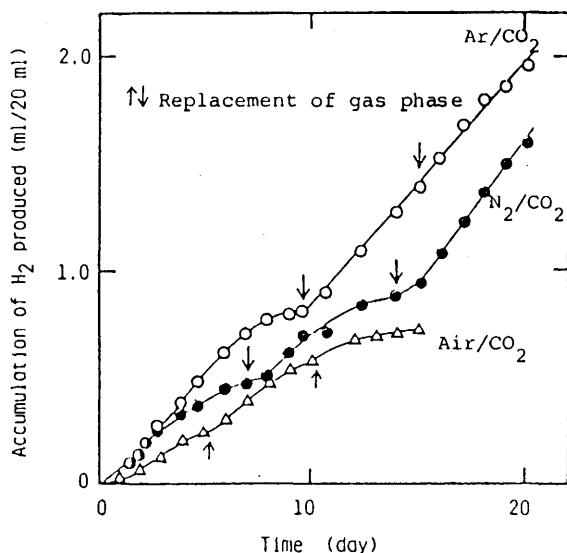


Fig.5. Long-term production of H<sub>2</sub> in the presence of 10% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> plus 1% CO in light.

Table IV. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction and hydrogenase activities after incubation with C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> plus CO for 9 days in light.

| Incubation<br>gas phase  | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> reduction | Hydrogenase              |
|--|---|--------------------------|
|  | ( $\mu$ l/mg dry wt./hr)                | ( $\mu$ l/mg dry wt./hr) |
| Ar/CO <sub>2</sub> (bubbling)                                      | 32.4                                    | 7.7                      |
| Ar/CO <sub>2</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /CO              | 13.9                                    | 3.4                      |
| N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /CO | 8.4                                     | 4.1                      |

だが、その後水素の減少が現われた (Fig. 6)。そこで3日目にDTを添加した (N<sub>2</sub>(+), Ar(+)) とこゝろ急激な水素発生を認めることができた (Fig. 6)。添加したDTはニトロゲナーゼ活性を促進しないことを認めている。このような事実より、長期水素発生を行なわせる場合必要であった気相部を新しくする操作によって、気相部より水素および酸素が除去されるために、一酸化炭素・アセチレン共存下においても残存している水素取り込み活性の発現が抑制され、水素発生が長期にわたり継続したものと考えられる。したがって、一酸化炭素・アセチレンを含む気体を連続通気し、かつ水素および酸素

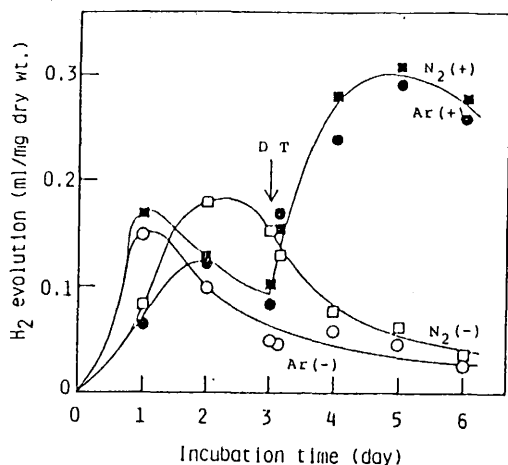


Fig. 6. Effect of sodium dithionite (DT, 8 mM) on  $H_2$  evolution of cells preincubated for 3 weeks under  $Ar/CO_2/C_2H_2/CO$ .

を系外へ取り去る方式を用いれば、水素取り込み活性の高いランソウをも利用し得る水素生産系が構築できると考えられる。

#### 第5章 窒素欠乏細胞の水素代謝におけるアセチレンの効果

前章において、一酸化炭素・アセチレン共存下において窒素欠乏細胞の水素発生の増加が認められ (Table III), また両気体共存下において長期水素発生が可能であった (Fig. 5)。このような両気体共存下の水素発生促進作用について、さらに詳しく検討した。

窒素欠乏細胞はインキュベーション中の活性の変化に基き I, II, III の三つの phase に分けることができる (Fig. 2 参照)。Fig. 7 に示すように 3 種の細胞を用い、3 ~ 6 時間インキュベートしたところ

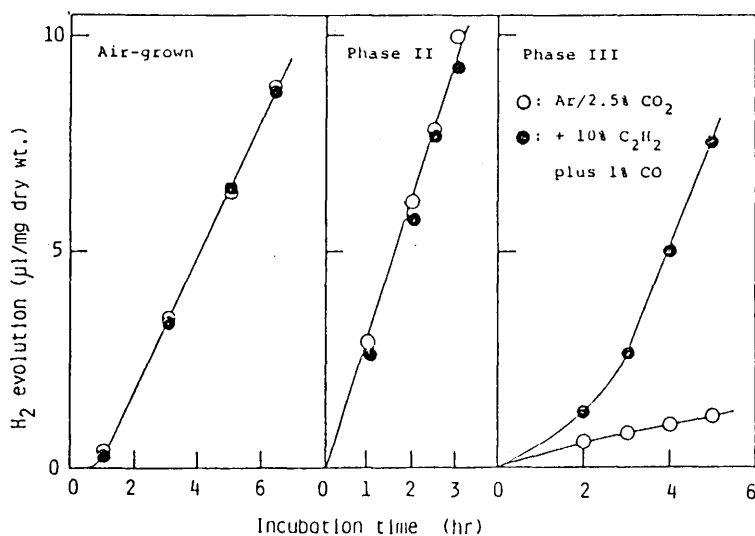


Fig. 7. Effect of  $C_2H_2$  plus  $CO$  on  $H_2$  evolution of air-grown and N-starved (phase II and III) cells.



ろ窒素固定により増殖した (Air-grown) 細胞および phase II の細胞の水素発生は、両気体共存下においても促進されず、phase III の細胞の水素発生は速かに、その後ゆっくりと増加した。速かな増加は、第 4 章 (Table III) で認められた効果と同様であると考えられるので、ゆっくりとした (時間を要する) 水素発生増加について検討した。

時間を要する水素発生促進作用は両気体共存下においてのみ認められる現象ではなく、アセチレン単独存在下においても認められた。そこで、アセチレンの効果をより明確にするため、アセチレン前処理細胞を用いて検討した。前処理した phase III の細胞の水素発生および水素取り込み活性を、一酸化炭素・アセチレン共存下で測定した。Fig. 8 に示すように、前処理細胞の水素発生活性は前処理 3 時間までは処理時間を長くすればそれだけ高くなったが、3 時間より長い時間処理してももはや活性

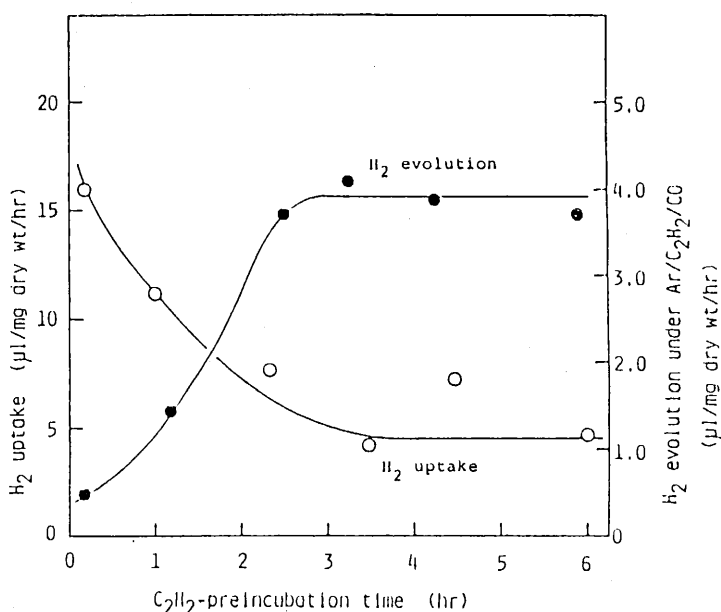


Fig. 8. Changes of H<sub>2</sub> uptake and H<sub>2</sub> evolution activities of phase III cells during incubation with C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> in light.

は増加しなかった。一方、水素取り込み活性は、あたかも水素発生活性の鏡像のような変化を示した。すなわち、3 時間目頃までは水素取り込み活性下し、それ以上の処理では活性低下は認められなかった (Fig. 8)。また、4 ~ 7 時間アセチレンで前処理した細胞ではもはや時間を要する水素発生増加現象は認めることはできなかった。以上の事実より、時間を要する水素発生促進作用は、アセチレンの作用により水素取り込み活性が低下し、この低下作用発現に時間を要するために生じたものであると考えられる。

このアセチレンによる水素取り込み活性低下作用について検討したところ、ヒドロゲナーゼ活性を阻害していなかった (Table V) ことより、水素取り込み反応に関連する他の部位にアセチレンが作用していると考えられる。また、蛋白合成阻害剤で 5.5 時間処理しても水素取り込み活性の低下は認められず、水素取り込み反応に関連する蛋白性成分は処理時間内において安定であると考えられる。

Table V. Effect of preincubation with  $C_2H_2$  for 5.5hr on hydrogenase activity.

| Preincubation<br>conditions <sup>a)</sup> | Hydrogenase activity     |     |
|---|--------------------------|-----|
|   | ( $\mu$ l/mg dry wt./hr) | (%) |
| Ar/5% $CO_2$ (control)                    | 32.7                     | 100 |
| + puromycin (30 $\mu$ g/ml)               | 32.3                     | 98  |
| +10% $C_2H_2$                             | 32.7                     | 100 |

さらに、アセチレンの作用は光エネルギーを必要としなかった。

好熱性ランソウ *Mastigocladus laminosus* は水素発生を行なわせる窒素欠乏条件下において、高い水素取り込み活性が発現するが、一酸化炭素・アセチレン共存下において長期水素発生が可能であった。したがって *M. laminosus* を用いる Biophotolysis を水素生産に適用することは可能であると思われる。また、窒素欠乏細胞に対するアセチレンの興味ある作用は、ランソウの水素代謝研究に一つの新しい手段を与えるものと考えられる。

#### 結 論

1. 別府温泉より分離した水素発生を行う好熱性ランソウはイデユアイミドリ *Mastigocladus laminosus* であった。
2. *M. laminosus* の水素発生はニトロゲナーゼの作用であることを明らかにした。
3. ランソウを窒素欠乏条件下でインキュベートし、細胞内C/N比を大きくすることにより水素発生は著しく増加した。
4. 窒素欠乏条件下において、水素取り込み活性も増加し、このため増加した水素発生は再び低下した。
5. 一酸化炭素・アセチレン共存下において水素取り込み活性は抑制され、また同気相下において長期水素発生が可能となった。
6. アセチレン・一酸化炭素共存下における水素取り込み活性低下現象は二つの機構により認められると考えられる。(1)両気体によるヒドロゲナーゼ阻害(速かな作用)と、(2)アセチレンによる、ヒドロゲナーゼを阻害しない水素取り込み活性低下作用(時間を要する作用)の二つである。

#### 引用文献

1. Benemann, J. R., and N. M. Weare. 1974. *Science*, **184**, 174.
2. Fay, P., W. D. P. Stewart, N. E. Walsby, and G. E. Fogg. 1968. *Nature, London*, **220**, 810.
3. 服部明彦, 大森正之, 1971, 植物生理学講座1 光合成(古谷, 宮地, 玖村編), pp. 201, 朝倉書店.
4. Stewart, W. D. P., and P. Rowell. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 846.
5. Kulasoorya, S. A., N. J. Lang, and P. Fay. 1972. *Proc. Royal Soc.*, **B181**, 199.

6. 八木達彦, 1975, 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 493.
7. Smith, L. A., S. Hill, and M. G. Yates. 1976. *Nature*, **262**, 209.
8. Bothe, H., J. Tennigkeit, and G. Eisebrenner. 1977. *Planta*, **133**, 237.
9. Bothe, H., J. Tennigkeit, and G. Eisebrenner. 1977. *Arch. Microbiol.*, **114**, 43.
10. Pow, T., and A. I. Krasna. 1979. *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 413.

### 論文の審査結果の要旨

水素は将来のクリーンエネルギーとして注目を集めているが、太陽エネルギーを利用し、水を分解して水素を生産する能力を持っている藻類の利用は水素生産には一つの理想的な形態である。本研究では光照射時におこる高温状態で水素生産の可能な好熱性ランソウ *Mastigocladus laminosus* による水素発生に関する基礎的な研究を行ない、特に水素生産能低下の原因をつきとめ、それが水素取込みによることを明確にした。さらにその水素取込みを防ぐ方法について検討を加え、CO, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> による水素取込み抑制によって長期間の水素発生を可能にした。よって本論文は博士論文に充分価する論文と考えられる。