OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	水の生物学的光分解における水素・酸素分離発生に関する研究
Author(s)	八木, 清仁
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33190
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	八木清仁
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第5428号
学位授与の日付	昭和56年9月30日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**水の生物学的光分解における水素・酸素分離発生に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 三浦 喜温 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 鎌田 皎 教授 岩田平太郎

論文内容の要旨

緒　論

近年，太陽光エネルギー利用の一端として生物の持つ光合成能を利用し，石炭・石油等の化石燃料に替わるクリーンエネルギー源として水素を生産しようとする研究が注目されている。原料として地球上に豊富に存在する水を用い，太陽エネルギーを駆動力とすれば，大量安価に水素を製造することが可能となろう。また，化石燃料の燃焼による環境汚染が自然サイクルの乱れを生じさせている現状を考慮すれば，水から出て水に帰る水素エネルギーの特質は，健康な人間生活に対し極めて重要な役割を果たすことは明らかである。

太陽エネルギーを利用する水素製造法としては，水の熱あるいは光分解等の非生物学的方法と，光合成生物を利用する方法が承げられる。後者においては，水分解能を有する高等植物および藻類の代謝を制御することあるいは，水素発生能を持つ微生物と組み合わすことにより，水の生物学的光分解による水素生産を行う系が提唱され，現在その基礎研究が行なわれている。しかし，水の分解の結果生じる酸素は水素発生系に対し阻害的に働き，不安定性の主要因となっている。

本研究は優れた生産性及び持続性を有する水素生産系の開発を目的とし，酸素の発生を水素発生の場から，時間的あるいは空間的に分離するシステムに関する検討を行ったものである。

第1章　水素・酸素分離発生系の可能性

“Biophotolysis”（水の生物学的光分解）とは，緑色植物あるいは藻類の光合成器官を用い水から水素を生産することと定義される。Biophotolysisは，水の分解の結果生ずる酸素と水素を同一系内で発生させるSingle-stage systemと，両ガスの発生を時間的あるいは空間的に分離させたTwo-stage

systemに分類される。前者の代表的な例として，藍藻の窒素制限培養系が挙げられる。*Anabaena*または*Mastigocladus*等の糸状性藍藻は窒素制限下，ニトロゲナーゼを誘導し，水素を発生する性質を有している。この性質を利用し既に屋外における長期の連続水素発生が可能となっている。また，高等植物のクロロプラスト，電子伝達体フェレドキシン，およびフェレドキシンから電子をプロトンに渡して水素を発生させる酵素ヒドロゲナーゼを混合し，光照射下，水素発生を行う系も報告されている。[5] 酸素は水素発生系に対し阻害的に働くこと，また水素の分離・精製の煩雑さもあり，両ガスの発生を分離したTwo-stage systemの開発が重要と考えられる。

現在まで，水から電子を奪う成分と，その電子をプロトンに渡して水素を発生させる成分を電気化学的に分離させる系が報告されている。[3] しかし，各成分はいずれも生体内から抽出したものであり，非常に不安定で，固定化による安定化の努力もなされているが，いまだ充分であるとは言えない。

そこで，安定な水素生産系を組むため，生細胞あるいはそれに近い状態の細胞を用いるTwo-stage systemの検索を行った。Fig. 1に示す。再編成系，緑藻系の2種が，可能と思われる系である。

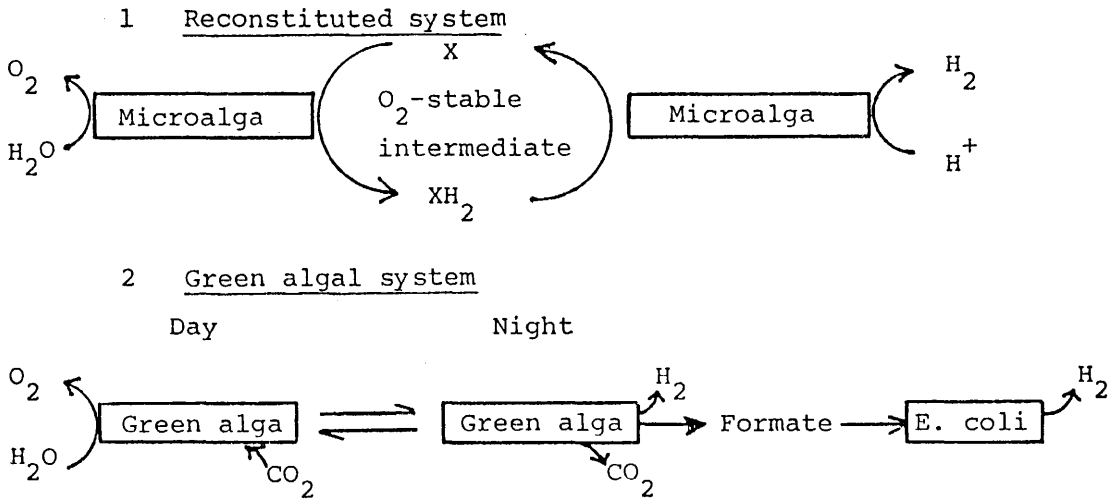

Fig. 1 Possible schemes of two-stage biophotolysis

1に示した再構成系は，酸素に安定で，水素発生あるいはヒドロゲナーゼの基質となりうる中間物質を設定し，光合成系が働く期間，すなわち酸素が生成される期間に安定な中間物質を生産させ，その後に嫌気条件下で中間物質から水素を発生させる系である。2で示した緑藻系は，光照射下で蓄積したデンプン等の有機物質を，暗嫌気条件下で発酵し水素を発生する緑藻の性質を利用したものである。また，水素のみならずギ酸を体外に放出する性質も利用し，ギ酸を基質として水素を発生する酵素系を有する*E. coli*と組み合わすことにより，緑藻単独の場合に比べ，水素の生産性を向上させることも可能である。

以下の章において，本章で概念的に示したシステムに従って，実際に水素生産系を組む際の問題点に関する検討を行った。

第２章　藍藻*Synechococcus*によるNADPH再生

前章Fig. 1-1で示した再構成系に関する検討を行った。緑藻*Chlamydomonas*はNADPHを基質とし光依存で水素を発生することが既に報告されている[4]。$NADP^+$は光合成電子伝達系の最終電子受容体である。したがってNADPHを酸素に安定な中間物質として設定し，外部から添加した$NADP^+$を光照射下連続的にNADPHに変換させることができれば，再構成系を組むことが可能となる。そこで可能な限り生細胞に近い状態で，外部から添加した$NADP^+$を還元する標品の調製を試みた。

別府温泉白池地獄より採取した好熱性藍藻*Synechococcus*の生細胞は細胞外の$NADP^+$を基質として利用し得なかったが，液体窒素による凍結融解処理によってNADPH再生活性を発現させることに成功した。Fig. 2に処理藍藻のNADPH再生に及ぼす，光照射及びDCMU（光化学系Ⅱの特異的な阻害剤）の影響を示した。光照射することにより，連続的にNADPHが再生されており，暗条件下及びDCMU添加時にはNADPH再生は認められなかった。Fig. 2の結果よりNADPHは水からの光電子伝達系が関与した反応によって再生されることが確認された。しかしながら，NADPH再生速度は時間の経過と共に徐々に低下しており，比較的緩和と考えられる凍結融解処理においても，チラコイド膜が損傷を受けていると思われる。本標品は活性の至適温度が50℃付近とかなり高温部に存在すること，NADPH再生のため，外部からフェレドキシン，フェレドキシン・NADPレダクターゼを加える必要がないこと等の長所を持っている。しかし，連続水素産生の観点からすれば，安定性に乏しく，安定

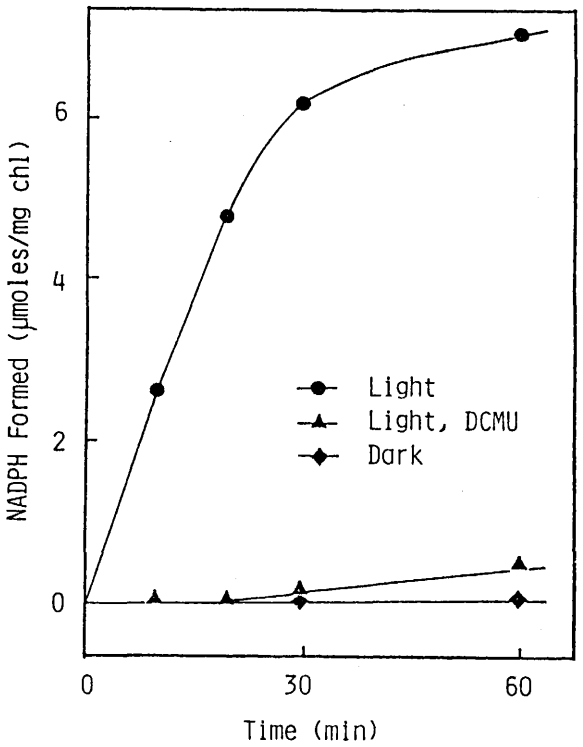

Fig. 2. Effect of light and DCMU on $NADP^+$ reduction by frozen-thawed *Synechococcus*.

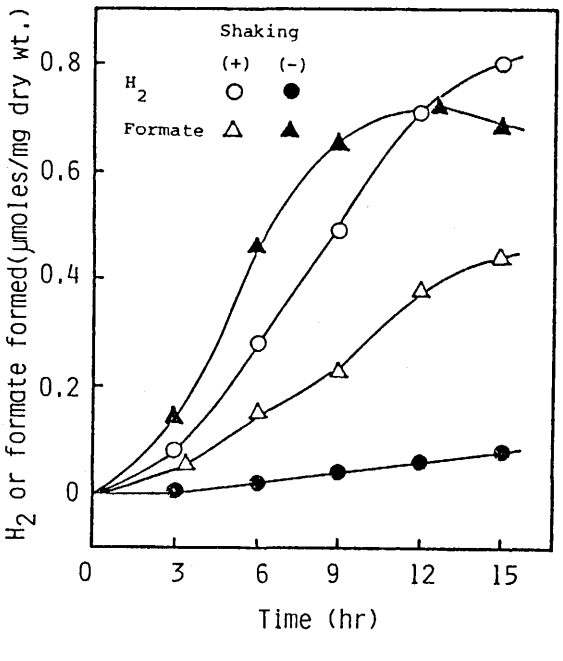

Fig. 3. Effect of shaking on production of H_2 and formate by *Chlamydomonas*.

化剤の使用による改善にも限度があるとすれば，やはり無処理の細胞を用いる緑藻系が有望である。

第三章　緑藻*Chlamydomonas*の暗水素発生における微量酸素要求性

前章で示した再構成系では，細胞処理による系の不安定化を克服するための研究が今後の課題として残されている。本章以下ではFig. 1-2で概念的に示した。生細胞を用いる緑藻系における問題点及び生産性向上の手段に関する検討を行った。

緑藻が水素発生能を獲得する際，暗・嫌気条件下でのadaptation期間が必要とされている[5]。しかしながら，adaptationの内容はいまだ明らかではなく，暗水素発生量は振盪条件等により著しく変動する。そこで，水素発生能を有する緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*を用い，暗水素発生量の変動の要因を検討した。

光を遮断した試験管に藻体を入れ，気相を窒素で置換し，振盪あるいは静置状態にてインキュベートしたところ振盪を加えると，はるかに高い水素発生速度を示すことが観察された。（Fig. 3）。また液相中に放出されるギ酸量を測定したところ逆に静置状態の方が蓄積量は多く，暗条件下で藻の代謝が振盪条件によって変化することが明らかとなった。気相は完全嫌気ではなく，酸素が0.08%程度混在する微好気条件下で，藻をインキュベートしたため，微量の酸素が振盪によって液相に供給された結果，水素発生が観察された可能性が考えられる。液相中の微量酸素を取り除く目的で，ヂチオナイトを添加したところ，水素発生は観察されなかった。また脱共役剤ジニトロフェノールによっても阻害された。したがって，酸素を最終電子受容体とする好気呼吸由来のエネルギーが，水素発生能の獲得あるいは水素発生の活性に寄与していることが明らかとなった。また，暗条件でのインキュベーション開始時に，種々の濃度の酸素を添加し，水素発生獲得に与える影響に関して検討を行った。Fig. 4に示すように0.23%まで酸素濃度の上昇と共に水素発生能も上昇するという

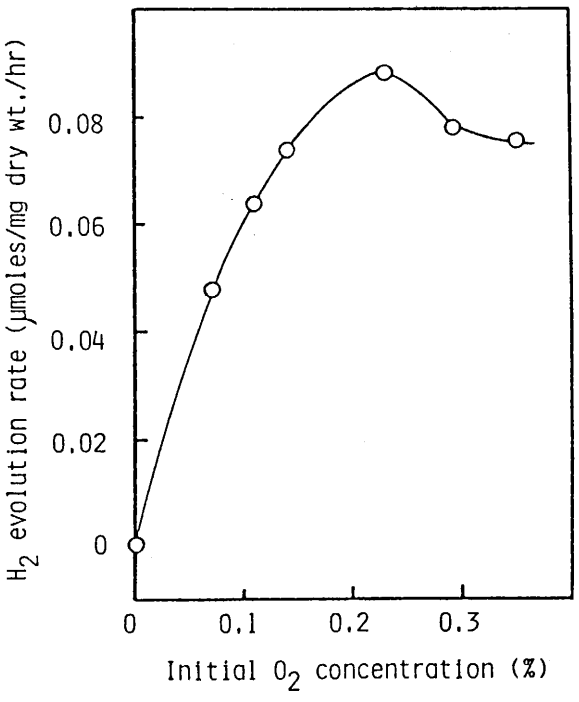

Fig. 4. Effect of initial O_2 concentration on capability to evolve H_2 in *Chlamydomonas*.

現象が観察された。したがって*C. reinhardtii*を用い，緑藻系による水素生産を行う場合，暗条件下において気相を微好気条件とし，攪拌あるいは振盪を加えることにより，高い水素生産性が得られることが見い出された。

第4章　緑藻による昼夜のサイクルを利用した水素発生系

実際に昼夜のサイクルに同調させて酸素と水素の発生を時間的に分離した系を組む場合問題となるのは，暗微好気条件下で水素発生を行なわせた後に，明好気という状態にすみやかに適応し，デンプンの蓄積あるいは増殖が12時間で可能であろうかということである。そこで，*Chlamydomonas reinhardtii*を用い，Fig. 1-2で示したシステムが，12時間の周期に同調しうるか否かを検討した。

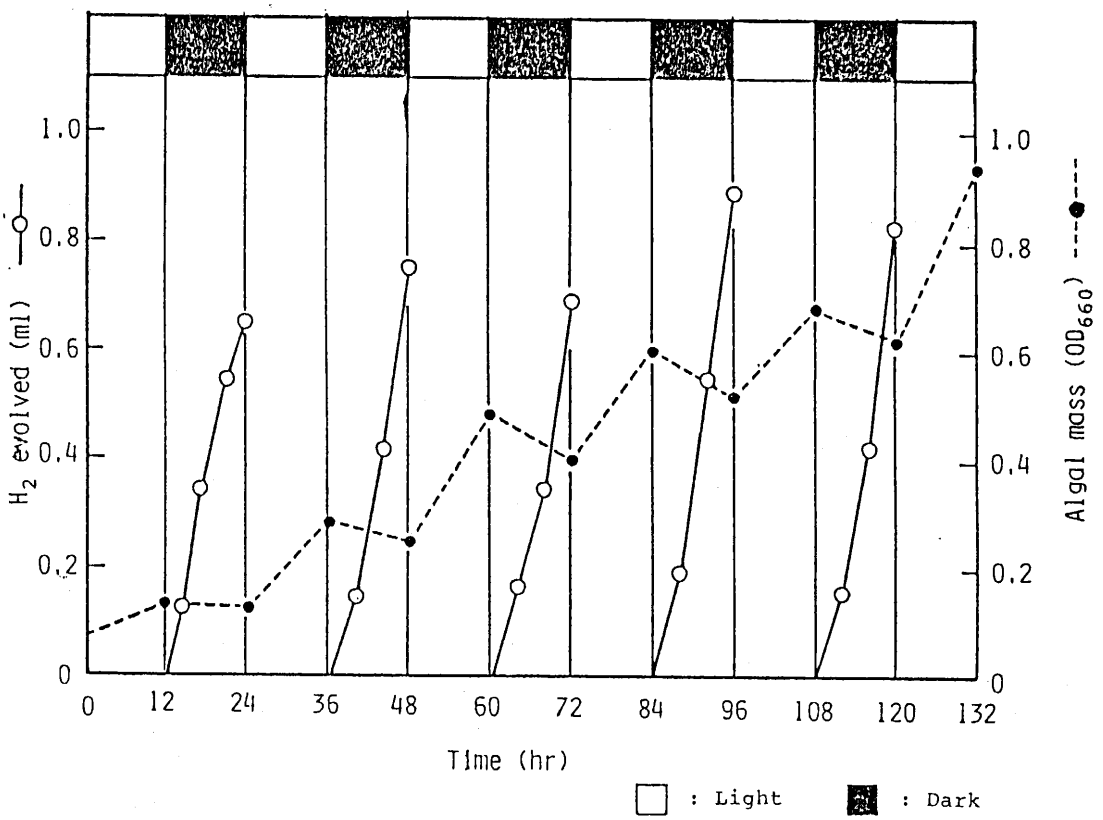

Fig. 5. Hydrogen evolution by *Chlamydomonas reinhardtii* in light/dark cycle.

Fig. 5に示すように，明好気・暗微好気条件で交互に藻をインキュベートしたところ，暗条件の期間に水素発生，及び光照射期間中に増殖が，繰り返し可能であった。したがって12時間の暗微好気条件下での水素発生期間後においても，藻はデンプンの蓄積あるいは増殖が可能であることが示された。この結果より緑藻が太陽エネルギーを利用し，自然の昼夜のサイクル中で水素を生産する系が，将来的に有望であることが明らかとなった。また，光照射期間中に増加する藻体をバイオマスとして回収することも可能と考えられる。

緑藻の暗条件下における代表的な代謝産物の定量を試みたところ，Table 1に示すように，ギ酸・酢酸・エタノールの蓄積が確認された。

Table Ⅰ. Distribution of fermentation products in *Chlamydomonas reinhardtii.*

	μmoles/mg dry wt.		μmoles/mg dry wt.
H_2	1.61	Ethanol	0.60
Formate	0.51	Lactate	0.08
Acetate	o.97	Glycerol	0.00

Amounts of fermentation products were measured after dark microaerobic incubation for 12 hr.

したがって，暗中での緑藻の代謝を制御することにより，水素の生産性を上昇させること，あるいはエタノール等の有用物質生産に用いることが可能と思われる。

第5章　*E. coli*のギ酸分解能による水素生産性の改善

Fig. 3及びTable 1で示したように緑藻*Chlamydomonas*は暗条件下で水素のみならず液相中にギ酸を蓄積することが確認された。したがって，ギ酸分解能を有する*E. coli*に各種発酵産物を含む液相部を与え，何ら阻害されることなく水素を回収することが可能であれば，緑藻系の水素生産性を上昇させることができる。

*E. coli*のギ酸分解に関与する酵素系は，formic hydrogenlyaseと呼ばれ，通常嫌気条件下，グルコース，カザミノ酸存在下で誘導的に合成される[6]。しかし，誘導量は嫌気度によって著しく変化し，好気条件では全く誘導されない。そこで，嫌気度によって誘導量が左右されない。つまり大気下で誘導可能な方法を検索した。グルコースをエネルギー源および，インデューサーであるギ酸の前駆体とした時，好気条件下では全く誘導されない理由として，ギ酸を生成する酵素pyruvate formate-lyaseが，好気条件下で不活性型になる[7]ことが考えられる。そこで，Table Ⅱで示すように，インデューサーとしてギ酸塩，好気呼吸の電子供与体としてコハク酸塩を添加し，好気的にインキュベートすると，高いformic hydrogenlyase活性を有した菌が得られた。この酵素系は嫌気条件においてのみ機能を発揮し，これまで誘導はすべて嫌気条件下で行なわれてきたが，インデューサーであるギ酸を添加することにより，好気呼吸由来のエネルギーを用いての誘導が可能であることが明らかとなった。

実際に，*Chlamydomonas reinhardtii*を暗微好気条件下で12時間インキュベートした後遠心分離して藻体を除き，その上清を上述の方法によりformic hydrogenlyaseを誘導した*E. coli*に与えたところ，特に阻害もなく，上清中のギ酸に依存した水素発生が観察された。したがって，緑藻系の水素生産性を向上させるために，*E. coli*をギ酸から水素を発生させる触媒として用いうることが示された。

総　括

本研究において，2種の水素・酸素分離発生系について検討を行った。再構成系においては，NADPH再生能の安定性に関して改善すべき点が残されているのに反し，緑藻系の場合，無処理の細胞を本来の性質を以ってシステムに生かすことが可能な点で連続水素生産に適していると考えられる。暗条件

Table Ⅱ. Induction of formic hydrogenlyase using energy generated by aerobic respiration.

Addition to basal medium	Formic hydrogenlyase synthesized (μmoles/mg dry wt./hr)	
	Aerobic	Anaerobic
Formate, Succinate	12	0
Formate, Succinate, CCCP	0	0
Formate, Succinate, CAP	0	0
Formate	3.8	0
Succinate	0	0

Basal medium contained 0.2% casamino acids and 20 mM phosphate buffer(pH 7.0).
CCCP(carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) : 30 μM
CAP(chloramphenicol) : 30 ppm

下で蓄積されるギ酸を*E. coli*に与え水素として回収する系も組み込めば，この緑藻系の水素生産性を上昇させることが可能である。

また，光照射下，増加する藻体をバイオマスとして回収，及び暗条件下で蓄積されるエタノール等の有用物質を回収することも可能であり，緑藻を用いる総合的有用物質生産系が近い将来注目されるであろう。

結　論

1．生細胞あるいはそれに近い状態の生物を用いて，水素・酸素分離発生系を組むことを目的とし，システムとして下記の2種を設定した。酸素に安定な中間物質を仲介とし，酸素と水素の発生を別々の生物に分担させる再構成系および，昼夜のサイクルを利用し，両ガスの発生を時間的に分離する緑藻系である。

2．藍藻*Synechococcus*を用いてNADPH再生に関する検討を行ったところ，凍結融解処理によって，外部より与えたNADP$^+$が光依存で還元されることが明らかとなった。安定性に関して改善すべき点が残されているものの，簡便な方法で，フェレドキシン及びフェレドキシン・NADPレダクターゼ無添加でNADPH再生能が得られる点で有利である。

3．緑藻の暗水素発生量に影響を与える因子について検討したところ*Chlamydomonas reinhardtii*は絶対嫌気条件下では水素発生能を獲得することができず，微量の酸素添加が必要であることが明らかとなった。

4．明好気・暗微好気条件で交互に緑藻をインキュベートしたところ，暗条件下で水素発生，及び明条件下で増殖が繰り返し可能であった。Biophotolysisの研究において昼夜のサイクルを有効に利用するシステムは，概念的には存在したものの，実験室レベルでの実証例は本研究が初の試みであ

る。

5．ギ酸分解能を有する*E. coli*に各種発酵産物を含む液相部を与えたところ，何ら阻害されることなく，ギ酸に依存した水素発生が観察されたところから，緑藻系の水素生産性を向上させるために，*E. coli*をギ酸から水素を発生させる触媒として用いうることが示された。またその過程において好気呼吸由来のエネルギーを用いるformic hydrogenlyaseの新誘導法を開発した。

引用文献

1) Miyamoto, K., Hallenbeck, P. and Benemann, J. R. : *J. Ferm. Technol.*, 57, 287 (1979).

2) Benemann, J. R., Berenson, J. A., Kaplan, N. O. and Kamen, M. O. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2317 (1979).

3) Yagi, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2974 (1976).
Ochiai, H., Shibata, H., Fugishima, A. and Honda, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 881 (1979).

4) Abeles, F. B. : *Plant Physiol.*, 39, 169 (1964).

5) Gaffron, H. and Rubin, J. : *J. Gen. Physiol.*, 26, 219 (1942).

6) Fukuyama, T. and Ordal, E. J. : *J. Bacteriol.*, 90, 673 (1965)

7) Knappe, J., Blaschkowski, H. P., Grobner, P. and Schmit, T. : *Eur. J. Biochem.*, 50, 253 (1974).

論文の審査結果の要旨

将来の1つの理想的なクリーンエネルギーとしての水素の生産を藻類の水の光分解能を用いて行う場合，この系に阻害的効果を持つ酸素を水素と分離して発生させ，安定な水素生産系を得ようとして行なわれた研究であるが，先ず凍結融解処理した藍藻*Synechococcus*を用い光エネルギーによる酸素に安定なNADPHを連続的に生産することを実現し，緑藻 *Chlamydomonas* による水素生産の基質NADPHの連続供給を可能にした。また緑藻*Chlamydomonas*による昼夜のサイクルにおいて夜は暗微好気条件による水素発生を，昼は明好気条件によって増殖及びデンプンの蓄積を行なわせることに成功し，長期間安定な水素生産系を開発した。さらにその水素生産性の向上についても種々検討を加えた。よって本論文は充分博士論文に値する。