



Title	光合成細菌のニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムに関する研究
Author(s)	前田, 勇
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155624">https://doi.org/10.11501/3155624</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

27692

光合成細菌のニトロゲナーゼ反応を基盤  
とした水素生産システムに関する研究

1999年

前田 勇

光合成細菌のニトロゲナーゼ反応を基盤  
とした水素生産システムに関する研究

1999年

前田 勇

# 目次

緒論	1
本論	
第一章 緑藻における水素生成の抑制と澱粉分解の促進	4
—緑藻のヒドロゲナーゼの関与—	
第一節 水素生成の抑制条件の検討	
(1) 実験目的	5
(2) 実験材料および方法	5
(3) ヒドロゲナーゼ活性の阻害が澱粉分解に及ぼす影響	7
(4) 水素の取込みが澱粉分解に及ぼす影響	8
(5) 炭酸ガス気相下における発酵の検討	9
第二節 小括	
(1) 水素生成の抑制が澱粉分解反応に及ぼす影響	11
(2) 水素生産システムにおける炭酸ガス気相下の発酵法の評価	11
第二章 光合成細菌の水素生成制御メカニズムの解析	14
第一節 ニトロゲナーゼ未発現の光合成細菌に対するエタノールの影響	
(1) 実験目的	15
(2) 実験材料および方法	16
(3) エタノールによる水素生成の完全抑制	20
(4) 内在性 PHB の蓄積と水素生成	21
(5) エタノールが <i>nifHD</i> 遺伝子の発現に及ぼす影響	23

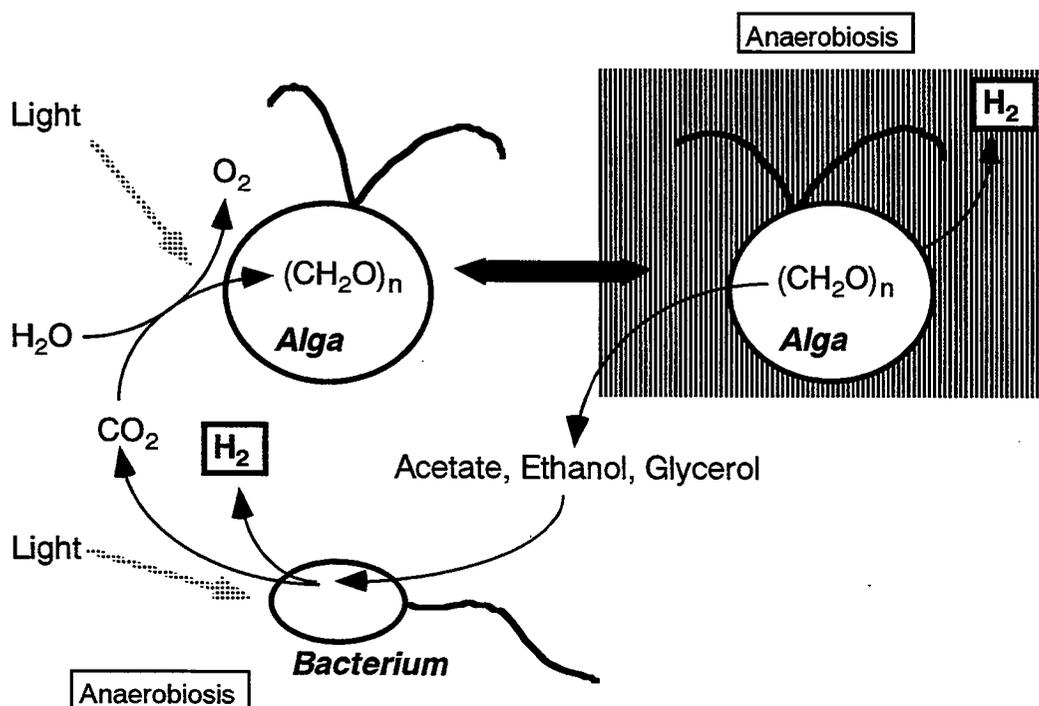
(6) エタノールが ATP 含量に及ぼす影響	25
(7) 最終電子受容体によるニトロゲナーゼ活性抑制の解除	25
第二節 ニトロゲナーゼ活性発現後の光合成細菌に対するエタノールの影響	
(1) 実験目的	27
(2) 実験材料および方法	27
(3) ニトロゲナーゼ活性発現後の菌体調製	27
(4) ニトロゲナーゼ活性発現後の <i>nifHD</i> に対するエタノールの作用	28
第三節 小括	
(1) エタノールによる <i>nif</i> 遺伝子の抑制	30
(2) 最終電子受容体による <i>nif</i> 遺伝子の脱抑制	30
第三章 ニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムの評価	33
第一節 水素生産への菌体供給法	
(1) 実験目的	33
(2) 実験材料および方法	34
(3) ニトロゲナーゼ活性発現後の菌体における基質取込みの特性	35
(4) 菌体供給法の改変による水素生産性の向上	37
第二節 小括	
(1) 水素生産へ供給する光合成細菌の評価	40
(2) ニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムの生産性評価	41
総括	43
結論	46
謝辞	47
参考文献	48

## Abbreviations

C	carbon
CoA	coenzyme A
CTP	cytidine 5'-triphosphate
DMS	dimethylsulfide
DMSO	dimethylsulfoxide
FID	flame ionization detector
HPM	hydrogen producing medium
MGA161	<i>Chlamydomonas</i> sp. MGA161
MOM	modified Okamoto medium
N	nitrogen
nif	nitrogen fixation
PHB	poly(3-hydroxybutyrate)
rRNA	ribosomal RNA
TCD	thermal conductivity detector
W-1S	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> strain W-1S
wt	weight

## 緒論

化石資源の燃焼は人の営みと深く関わっており、そのため様々な弊害が生じことに環境における深刻さの度合いを増している。二酸化炭素は代表的な温室効果ガスであり、その排出削減について早急に対策が講じられねばならず、ここに至ってようやく国際的な排出削減の枠組みが取り決められるようになった。しかしながら、二酸化炭素の排出は産業活動と直結しており、化石資源のエネルギー効率の改善、太陽光、地熱、風波等の自然の力を導入するエネルギー生産の技術開発がない限り産業活動レベルの低下を招きかねない。その中で最も技術革新が期待されるのは太陽光のエネルギー変換であり、環境低負荷型のエネルギー生産技術として将来的に極めて有望なものの一つである。光合成微生物は太陽光のもと二酸化炭素を固定し生物有機資源へと変換する機能を有し、単位体積当りの光合成能は高等植物より優れていることから様々な研究が行われている<sup>1,2)</sup>。本研究に先立つ研究として、光合



**Fig. 1.** Combination of alga and photosynthetic bacterium for  $\text{H}_2$  production system.

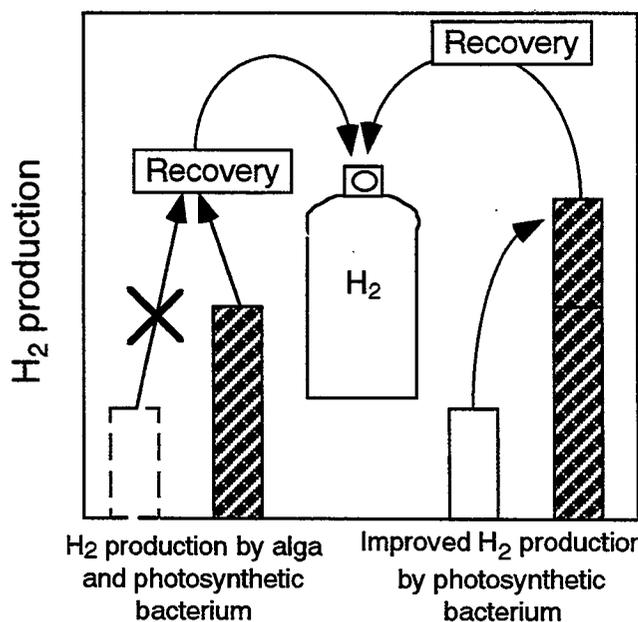
成細菌並びに緑藻の特性を生かし両者を組み合わせた水素生産システムが考案され、その実用化に向けた研究が続けられてきた<sup>3)</sup>。水素は燃焼において全く二酸化炭素の生成を伴わないので環境低負荷型の代表的なクリーンエネルギーである。緑藻は二酸化炭素の供給により太陽光のもと光合成を行い澱粉を藻体内に蓄積し、暗嫌気条件下に移行すると澱粉を分解し種々の代謝産物を生成すると共に水素を生成する。一方、光合成細菌は明嫌気条件下、緑藻の代謝産物を光依存的に分解して水素を生成する (Fig. 1)。

このシステムにおいて水素の生成は、緑藻による澱粉分解と光合成細菌による有機物分解の双方において起きる。緑藻においてはヒドロゲナーゼが (Eq. 1)<sup>4)</sup>、光合成細菌においてはニトロゲナーゼが (Eq. 2)<sup>5)</sup> それぞれ水素の生成を触媒する。



それぞれの特徴としてヒドロゲナーゼが水素の生成・酸化の可逆的反応を触媒するのに対し、ニトロゲナーゼは水素生成の一方向のみの反応を触媒するという点が挙げられる。水素の生成を経時的に測定すると緑藻では暗嫌気条件下、水素濃度が数パーセント以上に増大しないのに対し、光合成細菌では明嫌気条件下、60%を超えてなお、持続的に水素を生成した。緑藻における水素の生成が数パーセント以上に増大しない理由として気相中の水素濃度が一定濃度に達すると Eq. 1 に示すヒドロゲナーゼ反応の平衡が水素の酸化方向へと移行するためと考えられた。実用化を想定した場合、数パーセントの水素濃度では水素の分離・集収の効率が低く緑藻による水素生産は成り立たない。これを改善する方策として、緑藻では効率の低い水素の生成を抑制し、その分を続いて共役させる光合成細菌による水素の生成に上乘せする。終局的に水素生産の効率化・集約化はこのようなシステムにおいて可能になる (Fig. 2)。そこで本研究では、まず緑藻の澱粉分解反応速度を低下させることな

く、如何にしてこの回収効率の低い水素の生成を抑制するかを検討しそれにより生じる代謝の変化を追跡した。また、水素の生成を抑制することで生じた緑藻の代謝産物を効率的に水素へと変換するため、新規な光合成細菌の培養法を検討した。



**Fig. 2.** Improvement in H<sub>2</sub> production process including cultivation of alga and photosynthetic bacterium. In improved process, a loss of H<sub>2</sub> evolution by alga must be complemented by an increase of H<sub>2</sub> evolution by photosynthetic bacterium. Unrecovered H<sub>2</sub> evolved by alga; , theoretical H<sub>2</sub> evolution by alga; , and H<sub>2</sub> evolution by photosynthetic bacterium; .

# 本論

## 第1章 緑藻における水素生成の抑制と澱粉分解の促進

### —緑藻のヒドロゲナーゼの関与—

緑藻は光合成により水を分解し得られた還元力により二酸化炭素を固定し澱粉を藻体内に蓄積する。この澱粉は暗条件下で呼吸に、あるいは嫌氣的代謝に供され、藻体のエネルギー需要を充す。緑藻では暗嫌気の発酵条件において蓄積した澱粉はアミラーゼ、フォスフォリラーゼにより分解を受けグルコース単位に分解された後<sup>6)</sup>、解糖系諸反応によりピルビン酸を経て種々の最終産物へと代謝される<sup>7,8)</sup>。本システムは緑藻の蓄積した澱粉が完全分解される過程に共役して水素を生産するシステムであり [Eq. 3]、その初発過程である澱粉分解の反応効率によってシステム全体の水素生産効率は大きく変動する。



緒論に述べたように本システムにおいては、緑藻の暗嫌気発酵における水素生成を極力抑えることにより澱粉から回収不可能な水素へと流れる還元当量の損失を防ぐ必要がある。ところが、水素は発酵過程において生成する主な分解産物の一つであり水素生成を抑えることで澱粉分解反応、発酵産物生成において種々の変化が生じることが予測された<sup>8-10)</sup>。そこで、種々の発酵条件について澱粉分解および発酵産物生成を低下させずに水素生成を効果的に抑制する方法について検討した。

## 第1節 水素生成の抑制条件の検討

### (1) 実験目的

緑藻において水素生成を触媒するヒドロゲナーゼは酸素感受性が非常に高く、不可逆的な阻害を受けることが知られている<sup>11)</sup>。*Chlamydomonas reinhardtii* のヒドロゲナーゼはクラスター金属として鉄のみを含むタイプであり<sup>12)</sup>、その特徴として一酸化炭素により阻害を受けることが知られている<sup>13,14)</sup>。そこで、酸素並びに一酸化炭素を用いてヒドロゲナーゼを阻害した場合、如何なる影響が生ずるかを澱粉分解および発酵産物生成について調べた。さらに、緑藻の暗発酵において水素生成を抑えるための諸条件を検討した。

### (2) 実験材料および方法

#### 藻株

緑藻は当研究室にて単離された海産性株 *Chlamydomonas* sp. MGA161 (以下、MGA161 株) を用いた<sup>15)</sup>。

#### 培養条件

MGA161 株は、modified Okamoto medium (MOM) にて、ミリポアフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) により除菌した 5% 炭酸ガスを含む空気を通気し、30°C、41 W/m<sup>2</sup> の光照射下で培養した。MOM は NaCl (30 g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.25 g/L)、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.2 g/L)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.02 g/L)、H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (2.86 mg/L)、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (1.81 mg/L)、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.22 mg/L)、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.08 mg/L)、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0.021 mg/L)、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.01 mg/L)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (50 mg/L) を含む無機塩溶液をオートクレーブ滅菌し、これにチアミン塩酸塩 (20 mg/L)、シアノコバラミン (0.2 mg/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8.16 g/L)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99 g/L) を含むリン酸緩衝液 (pH=8.0) をろ過滅菌後に 5 ml/L の割合で混合して調整した。培

養容器はルーボトル (1.6 L) を用いた。

### 暗発酵条件

対数増殖中期の藻体 ( $OD_{680} = 1.0 \sim 1.5$ ) を集め本実験に用いた。遠心分離した藻体は N 源を含まない MOM にて再懸濁を行い遮光した反応容器に分注した。反応容器はシリコン栓をするか、あるいは嫌気条件を保つ場合はダブルキャップで密栓した後に 30 分間、注射針を通じて窒素ガスを通気し置換した後、密封し  $30^{\circ}\text{C}$  で振とうを行った。なお、発酵前に必要に応じて水素ガス、一酸化炭素等を一定量、嫌氣的に注入した。

### 定量

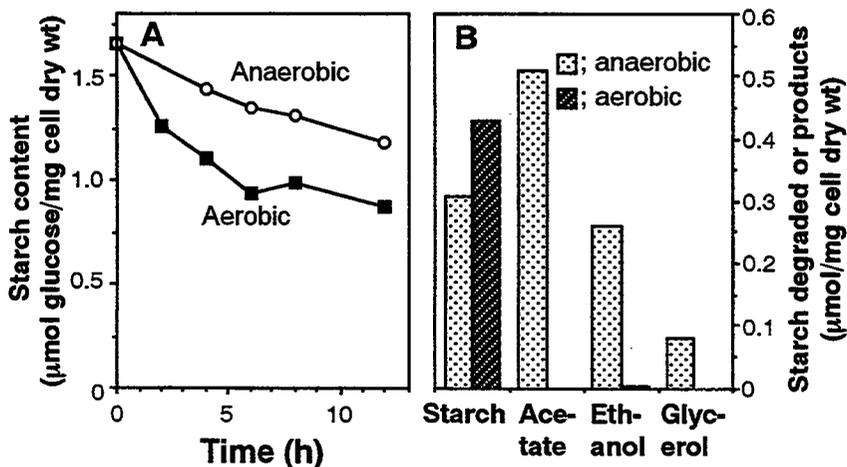
発酵により生成した水素は、TCD-ガスクロマトグラフ法 (カラム; モレキュラシーブ 13X、ガスクロ工業) にて定量した。エタノールはアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼを用いた酵素法により生成する NADH の  $340\text{ nm}$  の吸光度の増加から定量した。グリセロールは F-キット (ベーリンガー・マンハイム) を用いた酵素法、また酢酸は高速液体クロマトグラフ法 (カラム; TSKゲル、東ソー) にてそれぞれ定量した。澱粉は  $10\text{ ml}$  培養液中の藻体を遠心分離にて集めた後、 $40\%$  過塩素酸にて 2 時間の抽出を行い沸騰水浴中で 20 分間処理して加水分解したものを試料とした。澱粉から生成したグルコースを酵素法 (F-キット、ベーリンガー・マンハイム) により定量した。

### ヒドロゲナーゼ活性の測定

発酵中に発現したヒドロゲナーゼ活性は、ヒドロサルファイトナトリウム ( $10\text{ mM}$ )、トリトン X100 ( $0.1\%$ )、メチルピオローゲン ( $2.5\text{ mM}$ ) を嫌氣的に藻体懸濁液に添加し、水素の生成速度より算出した。

### (3) ヒドロゲナーゼ活性の阻害が澱粉分解に及ぼす影響

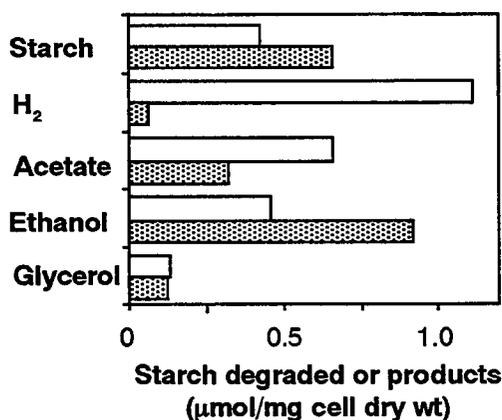
暗条件、空気気相下にて緑藻の発酵を行ったところ窒素ガス気相下の嫌気条件と比較し澱粉分解の向上が認められた (Fig. 3A)。空気中の酸素濃度はヒドロゲナーゼ活性を阻害するに十分高濃度であるため水素の生成は直接は測定しなかったが試験条件下で起きていないと考えられる。また、その際に低分子有機物の生成も認められなかった (Fig. 3B)。これは酸素の存在により呼吸活性が活性化したため有機物は完全に燃焼し二酸化炭素にまで酸化されたためと考えられる。したがって、酸素の共存は水素生成の抑制と澱粉分解の促進を同時に可能にしたものの、目的の発酵産物の生成が伴わないため、この場合、空気気相の発酵は適当でないと考えられる。



**Fig. 3.** Effect of O<sub>2</sub> on starch degradation and end-products formation in *Chlamydomonas* sp. MGA161. A; time courses of starch degradation, B; contents of fermentative products.

酸素はヒドロゲナーゼ活性を阻害するものの、上述のように他の代謝系に及ぼす影響が大きいため次に、より選択的なヒドロゲナーゼの阻害剤である一酸化炭素を用いて検討した。すなわち、窒素気相下において一酸化炭素を混合し緑藻の発酵を試みた (Fig. 4)。

一酸化炭素を添加した場合、暗条件下の水素生成は大幅に低下し逆に澱粉分解量



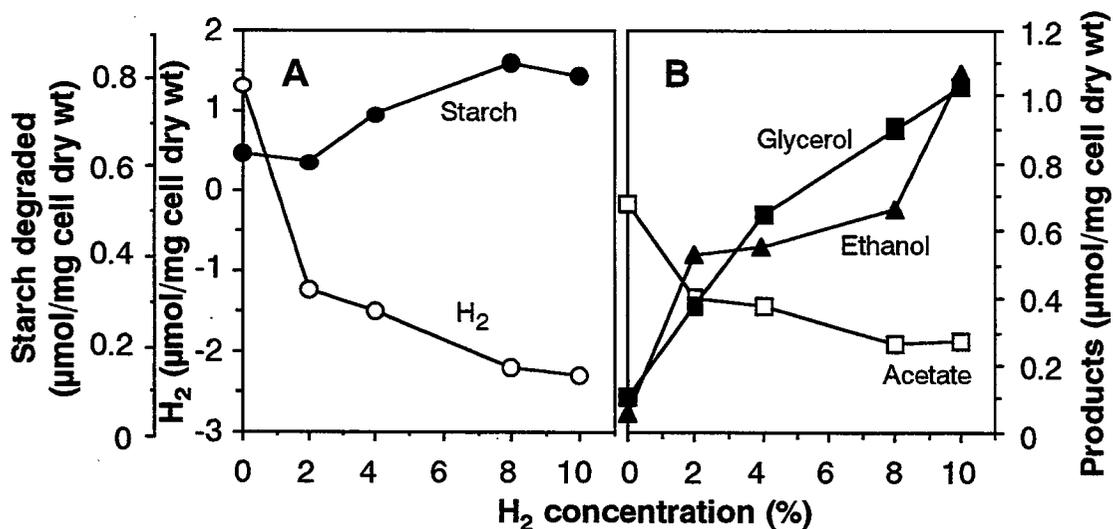
**Fig. 4.** Effect of carbon monoxide on starch degradation and end-products formation. Incubation was carried out for 12 h. The initial starch content was  $1.09 \mu\text{mol}/\text{mg}$  cell dry wt.  $\text{N}_2$  atmosphere ( $\square$ ), 10%  $\text{CO}$  in  $\text{N}_2$  ( $\blacksquare$ ).

は増加した。その際、澱粉の分解産物である有機物の生成にも変化が生じ、酢酸は減少、エタノールは増加傾向を示した。理論的に、酢酸は1モル当り4モル、エタノールは1モル当り6モルの水素へと変換されるため、発酵産物においてエタノールの量比の増大は、生成した有機物の水素当量の増大を意味する。したがって、嫌気条件下においてヒドロゲナーゼ活性を阻害することにより、水素生成の抑制、澱粉分解の促進、および生成した有機物の水素当量の増大が可能になると考えられる。

#### (4) 水素の取込みが澱粉分解に及ぼす影響

一酸化炭素による水素生成の抑制がヒドロゲナーゼ活性の阻害を介しているか否かを確認するため、予め窒素気相中に水素を添加しその影響を調べた。その理由はヒドロゲナーゼ反応はプロトンの還元と水素の酸化の双方を可逆的に触媒することから、気相部への水素の添加は反応平衡を水素酸化（水素の取込み）方向に傾けると推定されたからである (Fig. 5)。

Fig. 5A では水素の終濃度から添加初期の濃度を差し引いて表示しているため、その値は水素の生成に応じて増加、水素の酸化に応じて減少することになる。図から明らかのように添加した水素は2%の濃度においても減少することが示された。しかも、その減少は初期濃度を高く設定するに従い増加した。澱粉の分解率は初期の水素濃度依存的に上昇し8%水素添加において最高となった (Fig. 5A)。発酵産物の生成は水素濃度の増加に伴い酢酸では減少、エタノールおよびグリセロールでは増



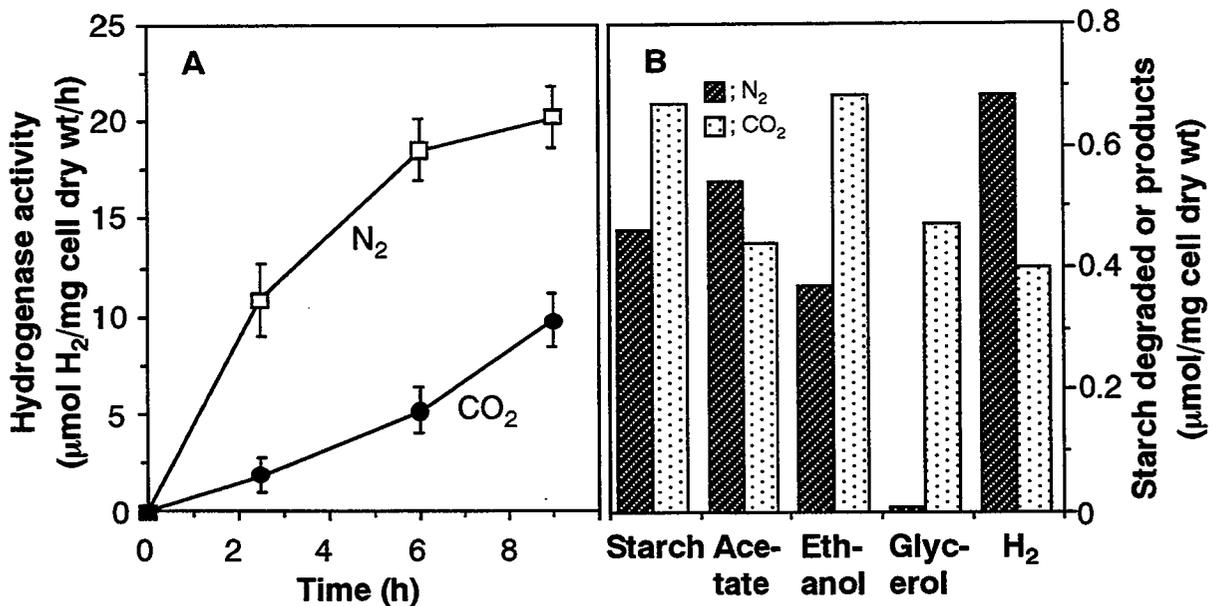
**Fig. 5.** Effect of H<sub>2</sub> injection to gas phase on starch degradation and end-products formation. H<sub>2</sub> at final concentrations of 0, 2, 4, 8, 10% were injected, and after 12-h incubation H<sub>2</sub> evolution was calculated by subtraction of the initial from the final concentration.

加傾向となり一酸化炭素添加時に類似した変化を示した (Fig. 5B)。これらの結果より、水素の取込みを促すと澱粉分解が向上しエタノールとグリセロールの生成が増加することが明かとなった。

#### (5) 炭酸ガス気相下における発酵の検討

炭酸ガスは火力発電所の排ガスから回収することのできる余剰ガスであり<sup>16)</sup>、酸性ガスとしての性質を考慮するとヒドロゲナーゼ活性を低下させる可能性が考えられる。そこで、炭酸ガス、窒素ガスの各嫌気下において緑藻を発酵させ、ヒドロゲナーゼ活性の経時的変化、ならびに澱粉分解量および各発酵産物の生成量を調べた (Fig. 6)。

炭酸ガス気相下で発酵させた緑藻においてはヒドロゲナーゼ活性は発現したものの窒素ガス気相下における 1/2 以下の活性であった (Fig. 6A)。したがって、ヒドロゲナーゼ活性は炭酸ガス気相下では低いレベルに抑えられることが明かとなった。また、炭酸ガス気相下においては水素添加時と同様の効果が認められ、窒素ガス気



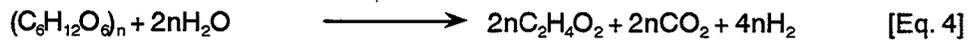
**Fig. 6.** Effect of CO<sub>2</sub> on hydrogenase activity (A), starch degradation (B), and end-products formation (B). Hydrogenase activity was measured under an N<sub>2</sub> atmosphere after N<sub>2</sub>- or CO<sub>2</sub>-anaerobiosis. Bars indicate standard deviations.

相下の発酵と比較し水素、酢酸生成量の減少ならびに澱粉分解量、エタノール、およびグリセロール生成量の増加が認められた (Fig. 6B)。 *Chlamydomonas reinhardtii* の精製されたヒドロゲナーゼにおいて活性の至適 pH は 7 付近であることが報告されており<sup>11)</sup>、また、MGA161 株の可溶化細胞においてヒドロゲナーゼ活性は酸性 pH で顕著な低下が認められた (Data not shown)。これらの結果より、炭酸ガス気相下でのヒドロゲナーゼ活性の低下は発酵時の pH が至適から外れていたためと考えられる。事実、炭酸ガスにより嫌気状態を保った場合には pH は 6 以下になることから、培地の緩衝能を低くすることによってより強い水素生成の抑制効果が期待できる。また、より実用化に近い培養スケールにおいても澱粉分解の向上と発酵産物であるエタノールおよびグリセロールの増加が可能になると考えられる。

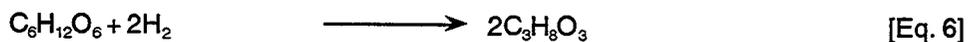
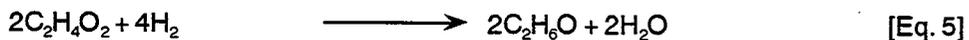
## 第2節 小括

### (1) 水素生成の抑制が澱粉分解反応に及ぼす影響

通常の窒素ガス嫌気における暗発酵においては発酵産物として酢酸生成が主体となっていることから、Eq. 4 に示されるように澱粉分解反応の際に生成した還元当量は水素生成により消費されていると考えられる。



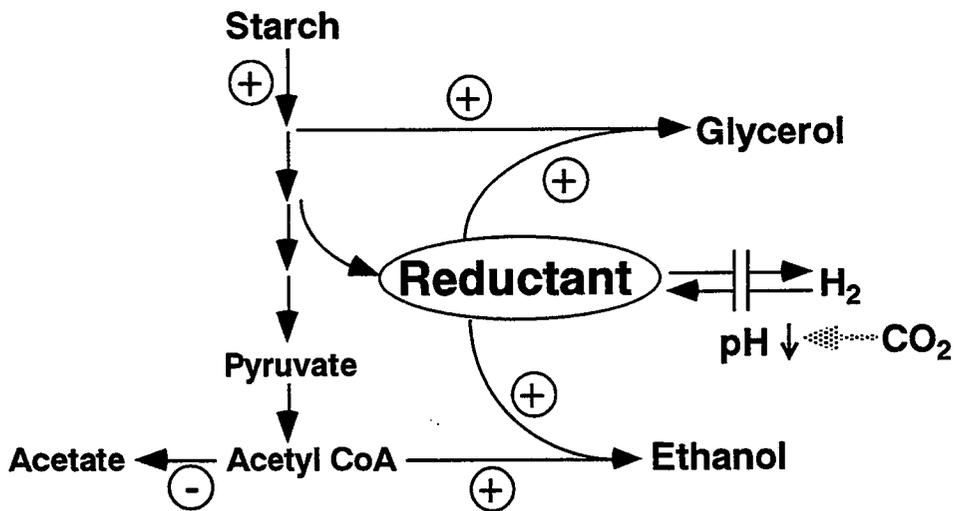
ところが、ヒドロゲナーゼ活性を低下させる、あるいは水素添加により水素取込みを促進させた場合、生成した細胞内の余剰還元力により Eq. 5 で示す酢酸の還元反応が活性化し、結果的に酢酸生成の減少とエタノール生成の増加をひき起こしたと推察される。一方、グリセロールの増加は Eq. 6 に示すように余剰還元力がグルコースを還元する形で、つまりグルコースに水素が付加しグリセロールを生成することに基づくと推察される。しかしながら、一酸化炭素の添加によってはグリセロール生成量の増加は認められず、グリセロール生成酵素への直接的な阻害の可能性が考えられる。この原因については今後の研究を待たねばならない。



また、水素生成を抑制すると澱粉分解量が向上することを今回、初めて明らかにしたが、そのメカニズムとして藻体内の酸化還元バランスと深く関わっている可能性が示唆され極めて興味深い。

### (2) 水素生産システムにおける炭酸ガス気相下の発酵法の評価

窒素ガス気相の発酵を基準として、炭酸ガス気相の発酵において得られた成績を要約すると Fig. 7 のようになる。図中の増加は+で、減少は-で表示した。炭酸ガ



**Fig. 7** Enhancement of starch degradation and formation of ethanol and glycerol under CO<sub>2</sub> atmosphere.  
 +; increase, -; decrease.

ス気相下において澱粉分解および有機物の発酵生成にこのような変化が生じた原因は、ヒドロゲナーゼ活性の部分的な低下が一酸化炭素添加で認められたように嫌気代謝に影響を及ぼしたためと考えられる。また、ヒドロゲナーゼ活性の低下は気相成分を炭酸ガスに保つことにより培地 pH が常に、ヒドロゲナーゼ活性の至適 pH から外れた酸性域に維持されたためと推察された。

水素の生成は緑藻ならびに光合成細菌によるもの全てを含めて、澱粉の分解に起因する。Fig. 6B の結果を例にとると窒素ガス、炭酸ガスそれぞれの気相下において 0.46, 0.67  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  cell dry wt の澱粉が分解しており Eq. 3 より 5.52, 8.04  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  cell dry wt の水素が量論的に生成し得る。この内、緑藻の発酵により生成



した水素はそれぞれ 0.68, 0.40  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  cell dry wt であり、理論的な全生成量のそれぞれ 12.3, 5.0% に相当する。一方、炭酸ガス気相においてはエタノールおよびグリセロールが増加しており各々が 100% の効率で水素へと変換されたと仮定する

と、窒素ガス気相、炭酸ガス気相それぞれで生成した有機物から 4.45, 9.13  $\mu\text{mol/mg cell dry wt}$  の水素の生成が可能である。これは全生成量のそれぞれ 80.6, 113.6% に相当する。これら水素生成の割合を比較すると、炭酸ガス気相下の緑藻の発酵は還元当量が水素生成へと流れる割合が低くその分が有機物に集約しているため、光合成細菌により水素を一括生産するという当初の目的に合致する。また、炭酸ガス気相下で生成した有機物から変換され得る水素の量が分解した澱粉から変換され得る水素の量を上回る計算になるが、これは澱粉以外の藻体成分に起因して低分子有機物の生成が増加したためと推察される。

窒素嫌気下の発酵で藻体が生成する水素はヒドロゲナーゼ阻害剤の添加、あるいは炭酸ガス気相下の発酵によりエタノールやグリセロールへ変換、集約することが可能になった。中でも炭酸ガス気相下における緑藻の発酵は、生成する低分子有機物の水素当量の増大という点から光合成細菌による水素の一括生産、量的増大に寄与するもので極めて意義深い。したがって、次に光合成細菌がこれらの有機物を効率的に水素へと変換するか否かを検討する必要がある。

## 第2章 光合成細菌の水素生成制御メカニズムの解析

光合成細菌における水素生成はニトロゲナーゼにより触媒され、Eq. 2 の反応式で示される<sup>5)</sup>。この反応における ATP は明嫌気条件では光合成によって供給されるため光合成活性はニトロゲナーゼ反応を高レベルで維持するのに重要な意味を持つ。



さらに、光合成が抑えられる暗所あるいは好気条件ではニトロゲナーゼ活性のみならずニトロゲナーゼ蛋白の生合成も抑制されることから、光合成活性とニトロゲナーゼ活性との間には相関があることが予測される<sup>17,18)</sup>。光合成細菌は水の分解を伴わない酸素非生成型の光合成を行うため、水から還元当量を獲得することができず低分子有機物や硫化物を必要とする<sup>5)</sup>。したがって、低分子有機物は電子供与体として光合成の持続に不可欠であり、光合成活性を左右するのみならずニトロゲナーゼ活性に何らかの影響を及ぼす可能性がある。

第1章において、炭酸ガス気相下、緑藻の発酵ではエタノール、グリセロールの生成が促進されることを明らかにした。光合成細菌がこれらの有機物を効率的に水素へと変換することにより、水素生産を一層有利に進めることができる。光合成細菌の水素生成の基質についてリンゴ酸<sup>19-24)</sup>そして乳酸<sup>21,22,25-29)</sup>を用いた研究は多数、報告されているが、エタノールやグリセロールを用いた研究例は限られている<sup>30,31)</sup>。

そこで本章では、エタノールおよびグリセロールについて水素生成の基質としての適性を検討し効率的な水素への変換を試みた。そしてその過程で、光合成の電子供与体となり得る低分子有機物が転写レベルでニトロゲナーゼ蛋白の合成を抑制するという従来に報告のない現象を見出し、この現象を詳細に解析した。

第1節 ニトロゲナーゼ未発現の光合成細菌に対するエタノールの影響

(1) 実験目的

水素生成を触媒するニトロゲナーゼは本来、生理的には窒素ガスを還元し細菌の窒素源として利用可能なアンモニアを生成する酵素であるため、アンモニアが存在するとニトロゲナーゼ遺伝子は抑制され発現しない。一方、アンモニアが欠乏すると明嫌気条件下、遺伝子は脱抑制されニトロゲナーゼ活性が発現する。そして、活性発現後に窒素ガスが存在しない場合、Eq. 2に従いプロトンの還元により水素を生成する。

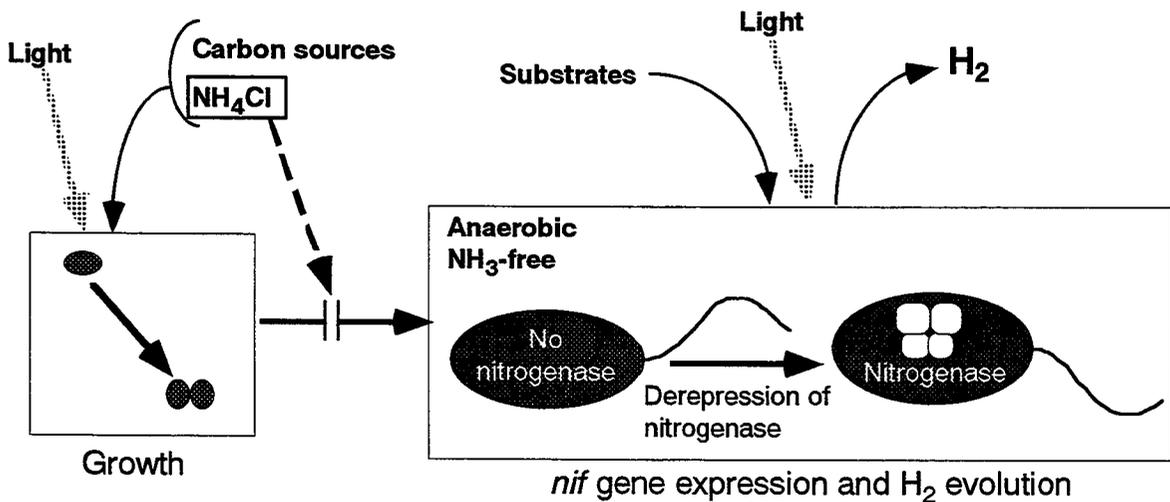


Fig. 8. Process of H<sub>2</sub> production in photosynthetic bacteria.

Arrows:  $\cdots$ , light illumination;  $\dashrightarrow$ , action of a reagent;  $\longrightarrow$ , change of situation;  $\rightarrow$ , flow of substance(s).

Fig. 8 は光合成細菌の培養および水素生産の各過程を示している。菌体増殖を行う培養過程においては窒素源として NH<sub>4</sub>Cl を加えるため、ニトロゲナーゼがコードされる nitrogen fixation (*nif*) 遺伝子は抑制されている。増殖後に菌体がアンモニア欠乏下において明嫌気条件に移されると、ニトロゲナーゼ活性は初めて発現し水素生成が開始する。したがって、増殖後の菌体に供給された有機物が水素へと変換さ

れるためにはニトロゲナーゼ活性の発現が必須である。第1章で緑藻発酵産物が主としてエタノールおよびグリセロールであることを明らかにしたが、後に述べるようにエタノールを光合成細菌の基質に用いた場合、水素生成が認められなかった。そこで、エタノールのニトロゲナーゼ活性発現に対する影響について検討した。

## (2) 実験材料および方法

### 菌株

使用した菌株は当研究室にて単離・同定された紅色非硫黄性細菌 *Rhodovulum sulfidophilum*<sup>32)</sup> strain W-1S (以下、W-1S 株) である。本株は和歌山県の沿岸域の海水試料中より単離された海産性株 (通性嫌気性) であり、16S rRNA の DNA 塩基配列を決定し (GenBank accession no: strain U55277)、その相同性より *R. sulfidophilum* と同種であると結論づけた (Table 1)。

**Table 1.** Identification of species of strain W-1S by 16S rRNA sequences homology of photosynthetic bacteria.

Species	Homology (%)	GenBank accession no.
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	99.3	D16423
<i>Rv. strictum</i>	95.4	D32246
<i>Rv. adriaticum</i>	91.4	D16418
<i>Rv. euryhalinum</i>	90.2	D16426
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	88.9	D16425
<i>Rb. capsulatus</i>	84.5	M34129
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	81.9	L11664
<i>Rp. globiformis</i>	78.6	M59066

### 培地

W-1S 株の増殖、水素生成、ニトロゲナーゼ活性測定等の検討には、MOM を改変した hydrogen producing medium (HPM) を用いた。具体的には光合成細菌のビタミン要求性を考慮しチアミン塩酸塩 (100 mg/L)、ニコチン酸 (100 mg/L)、*p*-

アミノ安息香酸 (60 mg/L)、ビオチン (10 mg/L)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (8.16 g/L)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (99 g/L) を含むリン酸緩衝液 (pH=8.0) を調製し、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を削除した MOM の無機塩溶液 (第1章第1節(2)) に 5 ml/L の割合で添加した。HPM は C 源、N 源を含んでおらず、それぞれの試験、あるいは過程に応じて種々の C 源・N 源あるいはその他の試薬を添加することとした。

菌体の増殖には C 源としてピルビン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、DL-リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウムを各 1 g/L、N 源として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を 5 mM 添加した HPM 培地を用いた。無機塩溶液にピルビン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、DL-リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を加えオートクレーブ滅菌した後、植菌の直前にろ過滅菌したビタミン入りリン酸緩衝液 (pH=8.0) を 5 ml/L の割合で混合した。

### 培養条件

菌体増殖を目的とした培養は、1 L ルービン (容積約 1.6 L) を使い、1 L の HPM 培地 (4 種 C 源、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) に W-1S 株の種菌液 10 ml を植菌し、微好気、光照射条件下、30°C にて、マグネチックスターラーで攪拌しながら行った。

### 水素生成条件

対数増殖中期の菌体 ( $\text{OD}_{660} = 0.4 \sim 0.6$ ) を集菌し本実験に用いた。遠心分離した菌体は HPM にて 2 度洗菌し  $\text{OD}_{660} = 1.2 \sim 1.4$  の濃度になるように HPM に再懸濁し、反応容器である  $\phi 18$  mm の試験管あるいは 100 ml マイヤーに分注した。その後、必要に応じて基質となる有機物を添加した。反応容器はダブルキャップで密栓した後に 30 分間、注射針を通じてアルゴンを通気し置換した後、密封し嫌気条件を保った。水素生成のインキュベートは  $55 \text{ W/m}^2$  のタングステンランプ光を菌懸濁液に照射しつつ 30°C で振とうして行った。

## 定量

水素の定量は第1章第1節(2)の方法に準じて行った。ATPの定量はルシフェラーゼの発光を利用した酵素法(ATPモニタリングリエージェント、バイオオービット)により定量した。poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)の定量は以下の手順で行った。約20~100 mgの乾燥菌体に対し30~60 mlのクロロホルムを加え、60°C、6時間の抽出を行った。ろ過により細胞残渣を除き得られたろ液を蒸発乾固後、残留物にアセトンを加え色素を溶解して除き、再度、蒸発乾固した残渣の重量をPHB量とした。

## ニトロゲナーゼ活性測定

ニトロゲナーゼ活性は細胞懸濁液を用いてアセチレン還元法により以下のように測定した。L字型試験管に3 mlの菌体を嫌氣的に封入しコハク酸ナトリウム(50 mM)およびクロラムフェニコール(50 µg/L)を嫌氣的に添加した。その後、気相部に10%になるようにアセチレンガスを加え350 W/m<sup>2</sup>のタングステンランプ光を照射し30°Cで反応を開始した。反応開始5、20分後に生成したエチレンの量を測定し、その差から活性を算出した。エチレンとアセチレンの分離、検出はFID-ガスクロマトグラフにポラパック R (ウォーターズアソシエーツ)を充填したカラムを装着し窒素ガスをキャリアーガスに用いて行った。

## PCR およびシーケンス

*nif* 遺伝子あるいは16S rRNA 遺伝子をクローニングするためにW-1S株のトータルDNAを鋳型としてPCRを行った。トータルDNAは培養後の菌体をプロテイナーゼKで37°C、7時間処理した後フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1)で除蛋白を行ったものを用いた。プライマーの作成はGenBank DNAデータベースの配列を参考にし*Rhodobacter capsulatus*の*nifH*の5'側配列から5'-TCAGATCGCCTTCTACGGCA-3'を、*nifD*の3'側配列から5'-GGATCTT-

CTCGATGAACTTC-3' を選択し *nifHD* プライマーとし、また、真性細菌の 16S rRNA 遺伝子の 5' および 3' 末端の高度に保存された領域から 5'-TGAGAGTTTGA-TCCTGGCTCAG-3' および 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTTC-3' の配列を選択し rRNA プライマーとした。*nifHD* プライマーおよび rRNA プライマーを用いた PCR により増幅された 2.1 kb および 1.5 kb の DNA 断片を TA-クローニングによりベクターに組み込み塩基配列の決定に用いた。なお、*nifHD* プライマーで増幅した 2.1 kb の断片を組み込んだプラスミドを以降、pNM5 とする。pNM5 に組み込まれた断片について両 PCR プライマーの下流 500 bp 塩基配列を蛍光プライマーを用いたダイデオキシ法（サーモシークエナーゼ サイクルシークエンシングキット、島津）と DNA シークエンサー（DSQ-1000、島津）により決定した。クローニングされた 2.1 kb の PCR 産物は *R. capsulatus* および *R. sphaeroides* の *nifH* 遺伝子と 89.5% および 91.7%、*R. capsulatus* の *nifD* 遺伝子と 83.9% の相同性を示したことから *nifHD* 遺伝子内の領域からなる断片であると結論づけた。

### ノーザンブロット解析

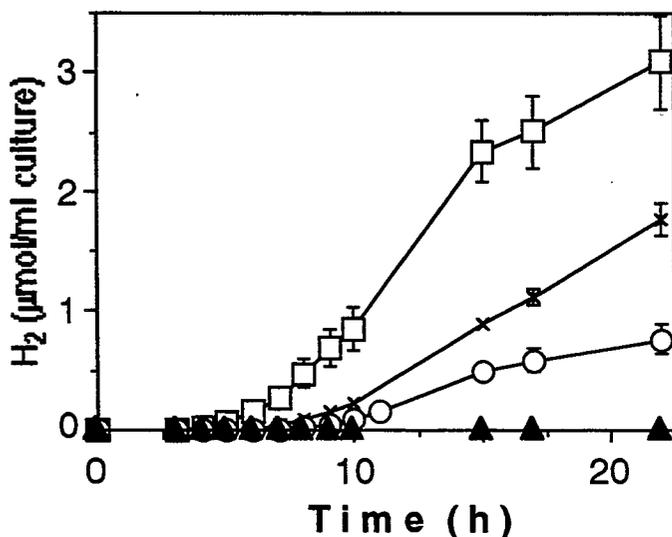
W-1S 株の RNA の抽出は  $OD_{660}=1.25$  の菌懸濁液 40 ml 中の菌体を集菌しアイソジェン（ニッポンジーン） 3 ml で溶解することで行った。各条件下で培養した菌体から抽出した RNA 15  $\mu$ g をホルムアルデヒド (2.2 M)、ホルムアミド (50% v/v) 中にて 65°C、15 分間、変性処理した後、ホルムアルデヒド (2.2 M) を含むアガロースゲル (1.2%) にて電気泳動した。これと同一のゲルにて、RNA マーカー (0.2-10 kb、Novagen 社) を電気泳動しエチジウムブロマイドにより染色することによりハイブリダイゼーション断片のサイズを推定した。その後、Hybond-N (アマシャム) メンブランに RNA をトランスファーし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$  標識されたプローブと 55°C、一晩ハイブリダイゼーションを行った。プローブは pNM5 より *EcoRI* 消化により切り出し回収した 2.0 kb の *nifHD*-PCR 断片を鋳型としランダムプライマー DNA ラベリングキット（宝酒造）にてラジオアイソトープ標識を行っ

た。また、サンプルローディングのコントロールとして各 RNA 4  $\mu\text{g}$  をホルムアミド (50% v/v) 中にて 65°C、5 分間、変性処理した後、ネーティブアガロースゲル (1.2%) にて電気泳動し rRNA をエチジウムブロマイドにより染色した。

### (3) エタノールによる水素生成の完全抑制

Fig. 9 は光合成細菌 W-1S 株を用い、緑藻発酵の主要な有機物であるエタノール、グリセロール、および酢酸からの水素の生成を調べた結果である。ポジティブコントロールとして加えたコハク酸と比較し、グリセロールおよび酢酸では水素の生成量が低くラグタイムも長くなっていた。とくにエタノールを添加した場合は 22 時間経過後も水素生成は全く認められないという予期しない結果が得られた。

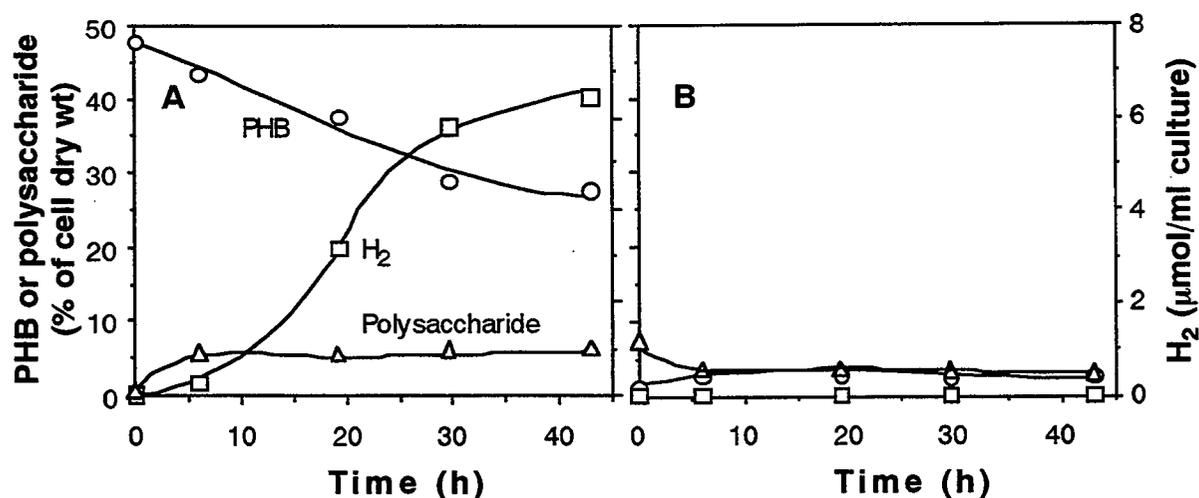
第 1 章で明らかにしたように、炭酸ガス条件下、緑藻の発酵で生成する不必要な水素をエタノールやグリセロールに変換できたにもかかわらず、その内のエタノールが光合成細菌の水素生産に結びつかないとなると重大な問題である。つまり、光合成細菌 W-1S 株がエタノールを基質にしないならば水素の収率は極端に低下し水素生産システム自体が成り立たなくなる。エタノールは酢酸よりも還元的であり電子供与体として優れた性質を持っているにも拘わらず、何故、水素生成に利用されないのか非常に興味ある問題であり、その解決に向けて以下、詳細に検討した。



**Fig. 9.** H<sub>2</sub> evolution from the main organic compounds excreted during the algal fermentation. Succinate was used as a control. Each substrate was added at a concentration of 1 mM to carbon- and nitrogen-free minimal medium. Symbols: ▲, ethanol; ○, acetate; ×, glycerol; □, succinate.

#### (4) 内在性 PHB の蓄積と水素生成

増殖後の菌体を HPM に再懸濁し電子供与体として何も添加せずにインキュベートした結果、水素の生成が認められた (Fig. 10A)。これは水素生成の基質となる内在性物質の存在を示している。光合成細菌において菌体内に蓄積されることが知られている poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)<sup>33-36)</sup> の含量を調べたところ、W-1S 株菌体にもその存在が確認され<sup>37)</sup>、しかも水素の生成に伴い PHB 含量が減少した。また、グルコースを含むポリサッカライドはインキュベート開始数時間後には若干、蓄積するものの、その後に顕著な変化は認められなかった。Fig. 10A の条件ではインキュベートする前の菌体は酢酸、コハク酸、リンゴ酸、およびピルビン酸からなる炭素源で増殖させており、菌体乾燥重量当りかなりの PHB を蓄積していた (Table 2)。これに対し炭素源をコハク酸のみで培養した場合、増殖に伴う PHB 蓄積はほとんど認められなくなった (Table 2)。PHB は分子中に N 原子を含んでおらず、したがって PHB を蓄積した菌体は元素構成の C/N 比が増加するが、コハク酸のみで培養した菌体では 4 種の炭素源で培養した菌体と比較し C/N 比が減少していた。この PHB 含量が低下した菌体をあらかじめ調製し Fig. 10A と同条件でインキュベートした場合、水素の生成は全く認められなかった (Fig. 10B)。これらの結果より、外部から基質となる物質を添加せずにインキュベートした場合に、菌体増殖時にあらかじめ蓄積した PHB があればそれを利用して水素が生成することが明かとなった。したがって、エタノールを添加した場合に水素生成が全く認められないのは、エタノールの添加により内在基質である PHB に由来する水素生成が抑制されているためと推察された。



**Fig. 10** Correlation between H<sub>2</sub> evolution and PHB degradation during light-anaerobic incubation of photosynthetic bacterium in the absence of an external substrate.

A, cells grown with 1 g/L each of pyruvate, succinate, DL-malate, and acetate.

B, cells grown with 3 g succinate/L.

Symbols: ○; PHB, □; H<sub>2</sub>, △; polysaccharide.

**Table 2** Decrease of PHB content, C/N ratio, and growth rate in succinate-grown culture.

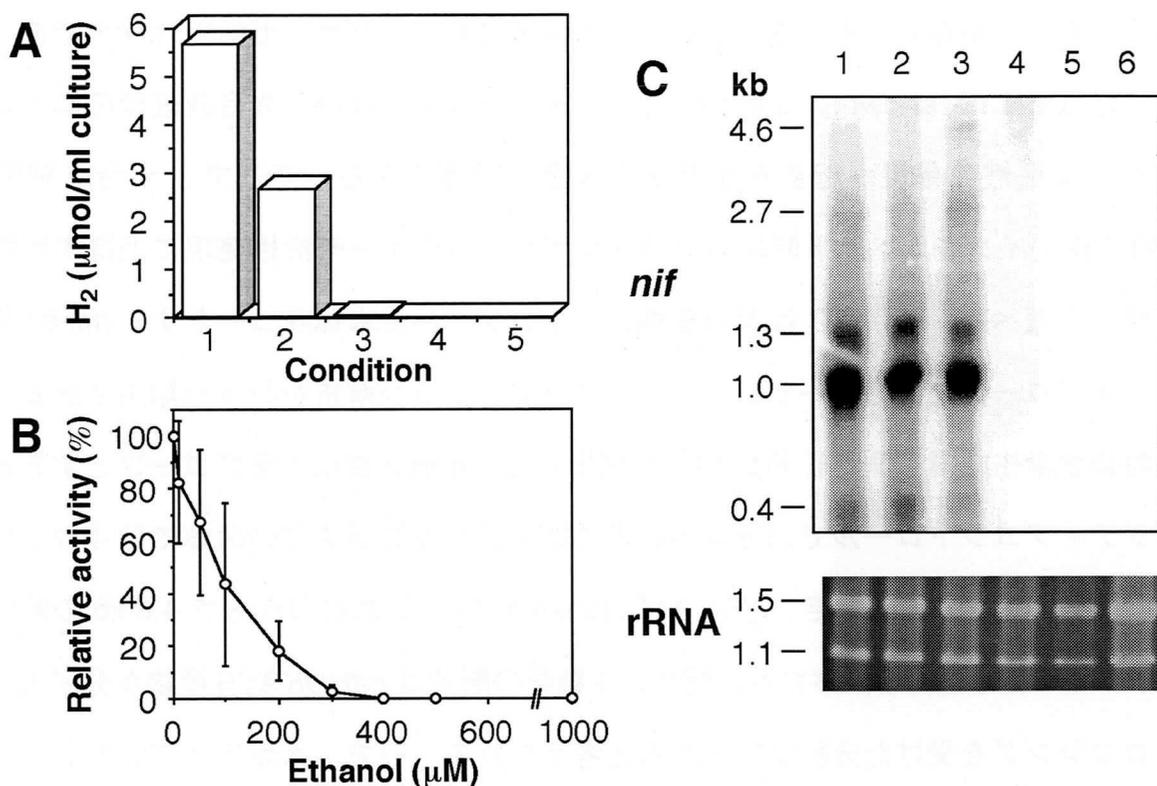
	Carbon source	
	Mixture <sup>a</sup>	Succinate <sup>b</sup> alone
Doubling time in terms of OD <sub>660</sub> (h)	4.6	9.0
Dried cells		
Concentration (g/L culture)	0.207	0.244
Carbon content (% of cell dry wt)	45.7	38.9
Nitrogen content (% of cell dry wt)	6.1	9.7
C/N ratio	7.5	4.0
PHB		
Concentration (mg/L culture)	5.0	0.2
Content (% of cell dry wt)	24.1	0.9

<sup>a</sup>The mixture comprised 1 g/L each of succinate, malate, pyruvate, and acetate.

<sup>b</sup>Succinate was added at 3 g/L as a sole carbon source.

#### (5) エタノールが *nifHD* 遺伝子の発現に及ぼす影響

W-1S 株の水素生成はインキュベートの時間経過と共に発現するニトロゲナーゼ活性に完全に依存し、水素を生成している菌体にヒドロゲナーゼ活性は検出できなかった (Data not shown)。したがって、エタノールの共存時、光合成細菌のニトロゲナーゼ活性の発現が起きるか否か興味深い問題である。そこで、光合成細菌 W-1S 株のインキュベート時にエタノールがニトロゲナーゼ活性発現に及ぼす影響について調べた。Fig. 11C は W-1S 株のニトロゲナーゼ本体をコードする *nifHD* 遺伝子をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーション解析を行った結果である。同時に水素生成量も測定し Fig. 11A に図示した。*nifHD* 遺伝子をプローブとするとポジティブコントロールであるコハク酸添加および基質無添加の菌体では4つないし5つのバンドが確認できた (Fig. 11C, lanes 1, 2)。これらのうちで 4.6 kb の断片は *nifHDK* 転写産物と推察され、残りの4種類の断片は *nifHDK* 転写産物が分子内でプロセッシングを受けた分解産物であると考えられる。一方、ネガティブコントロールの  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加では転写産物は完全に消失した (Fig. 11C, lane 5)。転写産物のハイブリダイゼーションの強弱を遺伝子の発現量の指標とした場合、100  $\mu\text{M}$  のエタノールを加えた菌体では *nifHD* 遺伝子は発現したが 1 mM 添加の菌体では完全に抑制された (Fig. 11C, lanes 3, 4)。つまり、*nifHD* 遺伝子の発現が一定濃度以上のエタノールで完全に抑制されることを反映している。エタノールによる *nifHD* 遺伝子の抑制はニトロゲナーゼ活性を調べることによっても裏付けられた。外部からの基質を添加せずにインキュベートするとニトロゲナーゼ活性が発現するが、エタノールを添加しインキュベートすると活性発現は濃度依存的に低下し 400  $\mu\text{M}$  で完全に抑制された (Fig. 11B)。なお、水素生成は 100  $\mu\text{M}$  のエタノール添加で大幅に減少したものの *nifHD* 転写産物の消失に対応して 1 mM 添加では全く認められなかった (Fig. 11A)。以上の結果から基質としてエタノールをインキュベート時に添加すると、光合成細菌 W-1S 株の *nif* 遺伝子が抑制されニトロゲナーゼが生合成されないため、水素生成が認められないことが明かとなった。

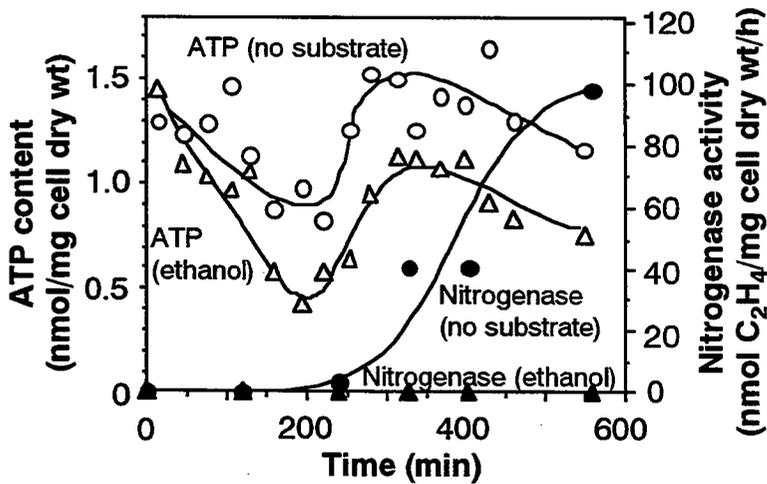


**Fig. 11.** Repression of *nifHD* genes and nitrogenase activity by ethanol. Strain W-1S was precultured in MOM with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a N source and a mixture of C sources. Incubation for nitrogenase derepression was carried out in HPM under an Ar atmosphere with illumination.

(A)  $\text{H}_2$  evolved over a period of 1 d. Conditions: 1, 1 mM succinate; 2, no external substrate; 3, 100  $\mu\text{M}$  ethanol; 4, 1 mM ethanol; 5, 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  with no external substrate. (B) Derepression of nitrogenase activity at each concentration of ethanol over a period of 6 h. The activity was measured by the acetylene reduction method. Values are expressed as percentages of the level of the activity derepressed in the absence of ethanol ( $105 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1} \text{ cell dry wt h}^{-1}$ ). Data are means of three independent experiments; bars indicate standard deviations. (C) Northern blot analysis of total RNA from the cultures corresponding to those used for the  $\text{H}_2$ -evolution measurement. After 8-h incubation, total RNA was extracted for hybridization with a *nifHD*-specific probe. The lane numbering of 1 to 5 corresponds to that of the incubation conditions; lane 6, after cell growth prior to incubation. For a loading control, rRNA bands were visualized by staining with ethidium bromide. The estimated sizes of the hybridizing mRNA species and the 16S and 14S rRNA bands are shown in kb. The 23S rRNA was cleaved *in situ*, giving rise to 1.5-kb and 1.1-kb fragments upon denaturation as in *Rhodobacter capsulatus* and *R. sphaeroides*<sup>54</sup>).

## (6) エタノールが ATP 含量に及ぼす影響

窒素固定細菌において *nif* 遺伝子の発現は菌体内の ATP 含量の量的変化により調節されていることが明らかにされている<sup>38,39</sup>。光合成細菌では ATP は明嫌気条件下、光合成によって供給される。*nif* 遺伝子の発現に及ぼすエタノールの抑制効果を知る目的で細胞内 ATP 含量を経時的に測定した (Fig. 12)。外部からの基質を添加せずにインキュベートするとニトロゲナーゼ活性が発現する直前まで ATP 含量は減少傾向にある。エタノールを添加した場合にはさらに顕著な ATP 含量の減少が認められた。



**Fig. 12.** Decrease in ATP level in cells incubated in the presence of ethanol (triangle), compared to cells incubated in the absence of an external substrate (circle). Open and closed symbols indicate ATP level and nitrogenase activity, respectively.

菌体に電子供与体であるエタノールが供給されているにもかかわらず、ATP 含量はむしろ低下した。このことから、エタノールの添加により光合成の電子伝達系における光リン酸化反応が何らかの形で低下する可能性が示唆された。

## (7) 最終電子受容体によるニトロゲナーゼ活性抑制の解除

光リン酸化反応がスムーズに進行し効率良く ATP が生成するためには、電子伝達系に対して電子の供給源となる電子供与体と、電子伝達系を流れた電子を最終的に持続して受取り続ける最終電子受容体が必要である。先の結果よりニトロゲナーゼ活性発現の抑制は ATP 含量の低下に起因すると考えられるため、電子供与体のエタノールと共に最終電子受容体を添加した場合にエタノールによる抑制効果が起きる

か否かは興味深い。そこで最終電子受容体の  $\text{NaHCO}_3$  や dimethylsulfoxide (DMSO) を同時添加してニトロゲナーゼ活性の発現の有無を調べた (Table 3)。ニトロゲナーゼ活性発現はエタノールの単独添加で抑制されたが、 $\text{NaHCO}_3$  との同時添加で抑制が解除された。しかも、その時の活性は基質無添加で発現した活性を上回り、 $\text{NaHCO}_3$  濃度の増加はさらに促進的であった。DMSO の同時添加もエタノール単独添加で起きる抑制を解除し、DMSO 濃度の増加は促進的に働いた。また、 $\text{NaHCO}_3$  と DMSO の添加でニトロゲナーゼ活性の脱抑制効果の度合いは大きく異なった。この効果の違いが何に起因するかは明らかではないが、一つの可能性としてこれらの最終電子受容体に電子を受け渡す酵素系が菌体内に構成的に存在するか誘導を受けて機能するかの違いに起因することが考えられる。これらの結果より最終電子受容体が共存するとエタノールのニトロゲナーゼ活性に対する抑制効果は解除することが明かとなった。

**Table 3** Derepression of nitrogenase activity in the presence of ethanol combined with dimethylsulphoxide or sodium bicarbonate.

Concentrations <sup>a</sup> (mM)		Nitrogenase activity <sup>b</sup> (nmol/mg cell dry wt/h)	
DMSO/ $\text{NaHCO}_3$	Ethanol	DMSO	$\text{NaHCO}_3$
0	0	170±47	315±110
0	1	0.22±0.09	4±5
1	1	2.3±1.4	472±5
3	1	40±26	691±88

<sup>a</sup>Cells which had been grown with ammonia were resuspended into HPM. Ethanol, DMSO, and sodium bicarbonate were added before 6-h incubation, respectively.

<sup>b</sup>Acetylene reduction activity was measured. Data are mean values for three individual cultures together with standard deviations.

## 第2節 ニトロゲナーゼ活性発現後の光合成細菌に対するエタノールの影響

### (1) 実験目的

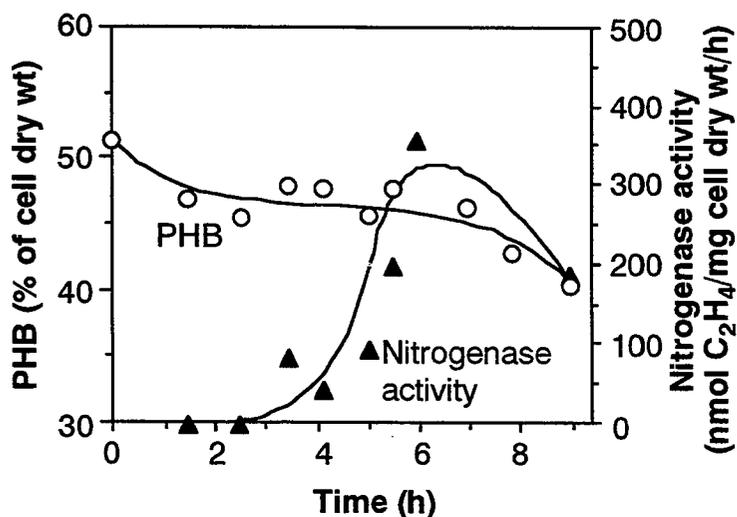
第1節の結果から、W-1S株における水素生成に際しエタノールの抑制的作用を回避するためには最終的に電子を受取る電子受容体が必要であることが明かとなった。ニトロゲナーゼ反応系は還元力の消費経路でありプロトン等を還元することで光合成細菌の酸化・還元バランスを調節するということが示唆されており<sup>40,41)</sup>、この場合にはプロトンが最終電子受容体になる。これが事実ならば、ニトロゲナーゼ活性が既に発現している菌体においてはエタノールによる抑制的效果が回避される可能性が推察される。そこで、この点を明らかにするため以下の実験を試みた。

### (2) 実験材料および方法

第1節の方法に準じて行った。

### (3) ニトロゲナーゼ活性発現後の菌体調製

ニトロゲナーゼ活性が発現した菌体を調製するため、まずニトロゲナーゼ活性の経時的变化を基質無添加の培地でインキュベートした菌体について調べた (Fig. 13)。



**Fig. 13.** Expression of nitrogenase activity associated with PHB degradation in the absence of an external substrate. Cells grown with 1 g/L each of pyruvate, succinate, DL-malate, and acetate were incubated under light-anaerobic conditions.

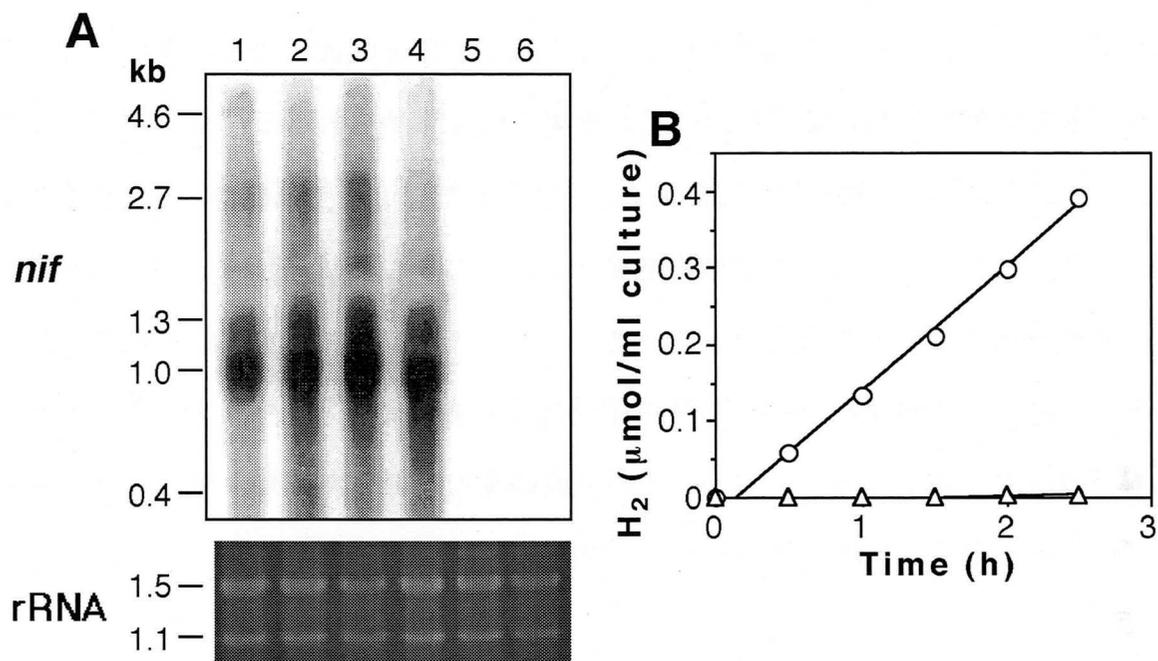
前節において述べたように外部から基質を添加しない場合、細胞内に蓄積した PHB を分解することによりニトロゲナーゼ活性の発現に必要なエネルギーが獲得される。この条件はインキュベートの途中で基質となるエタノールを添加しその影響を調べるにあたり、他の基質の影響がないため最適であると考えられる。このインキュベートにおいてニトロゲナーゼ活性は6時間前後で最大となった (Fig. 13)。

#### (4) ニトロゲナーゼ活性発現後の *nifHD* に対するエタノールの作用

あらかじめ、基質無添加にて菌体をインキュベートし6.5時間経過後にエタノールあるいは  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を嫌氣的に添加した。そして、各々添加後の *nifHD* 転写産物をノーザンハイブリダイゼーションにより解析し (Fig. 14A)、同時にエタノール添加後の水素生成量も経時的に測定した (Fig. 14B)。6.5時間のプレインキュベートにより *nifHD* 転写産物が確認されており (Fig. 14A, lane 1)、また、前述の結果からも菌体はニトロゲナーゼ活性を保持していると考えられる。この菌体に *nifHD* を抑制することが知られている  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加して0.5、2時間後の *nifHD* 転写量を調べた結果、いずれの時間においても転写産物は消失していた (Fig. 14A, lanes 5, 6)。一方、エタノールの添加後には0.5および2時間後の双方において添加前と同様に転写産物が認められ (Fig. 14A, lanes 3, 4)、*nifHD* の発現に顕著な変動がないことが示された。したがって、エタノールはニトロゲナーゼ活性未発現の菌体においては  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と同様に *nifHD* を抑制したが (Fig. 11C)、ニトロゲナーゼ活性発現後の菌体においては *nifHD* の抑制に関し  $\text{NH}_4\text{Cl}$  とは異なる効果を示したことになる。

同様に6.5時間のプレインキュベート後にエタノールを添加したところ、添加後、エタノールは速やかに且つ持続的に水素へと変換された。無添加では水素生成はほとんど認められなかった (Fig. 14B)。つまり、エタノールが電子供与体として代謝されており、さらにニトロゲナーゼ活性が発現した菌体ではエタノールの代謝により生成した還元力が最終電子受容体のプロトンに流れ、水素を生成したと推察される。この場合、ニトロゲナーゼ活性が存在することで、 $\text{NaHCO}_3$  や DMSO の添加

と同様に最終電子受容体の共存効果が現れ *nifHD* はエタノール存在下においても持続的に発現したと推察される。すなわち、ニトロゲナーゼ反応系が活性である限りエタノールによる *nif* 遺伝子の抑制効果は回避されることを示している。そして、エタノールを基質として持続的に水素生成が可能になる。



**Fig. 14.** Derepression of *nifHD* genes in H<sub>2</sub>-evolving cells in the presence of ethanol. Incubation was started in the absence of an external substrate to derepress *nif* genes and nitrogenase activity and after 6.5 h ethanol or NH<sub>4</sub>Cl each at a concentration of 1 mM was added anaerobically to the culture. (A) Northern blot analysis of total RNA extracted from nitrogenase-derepressed cells with a *nifHD*-specific probe. Lane 1: after 6.5-h incubation prior to the additions; lane 2: after 8.5-h incubation without the additions of ethanol and ammonium chloride; lanes 3 and 4: 0.5 and 2 h after the addition of ethanol; lanes 5 and 6: 0.5 and 2 h after the addition of NH<sub>4</sub>Cl. The estimated sizes of the hybridizing mRNA species and the 16S and 14S rRNA bands<sup>54</sup>) are shown in kb. rRNA bands were visualized by staining with ethidium bromide. (B) H<sub>2</sub> evolved after the anaerobic addition of ethanol (○) or without the additions of ethanol and NH<sub>4</sub>Cl (△).

### 第3節 小括

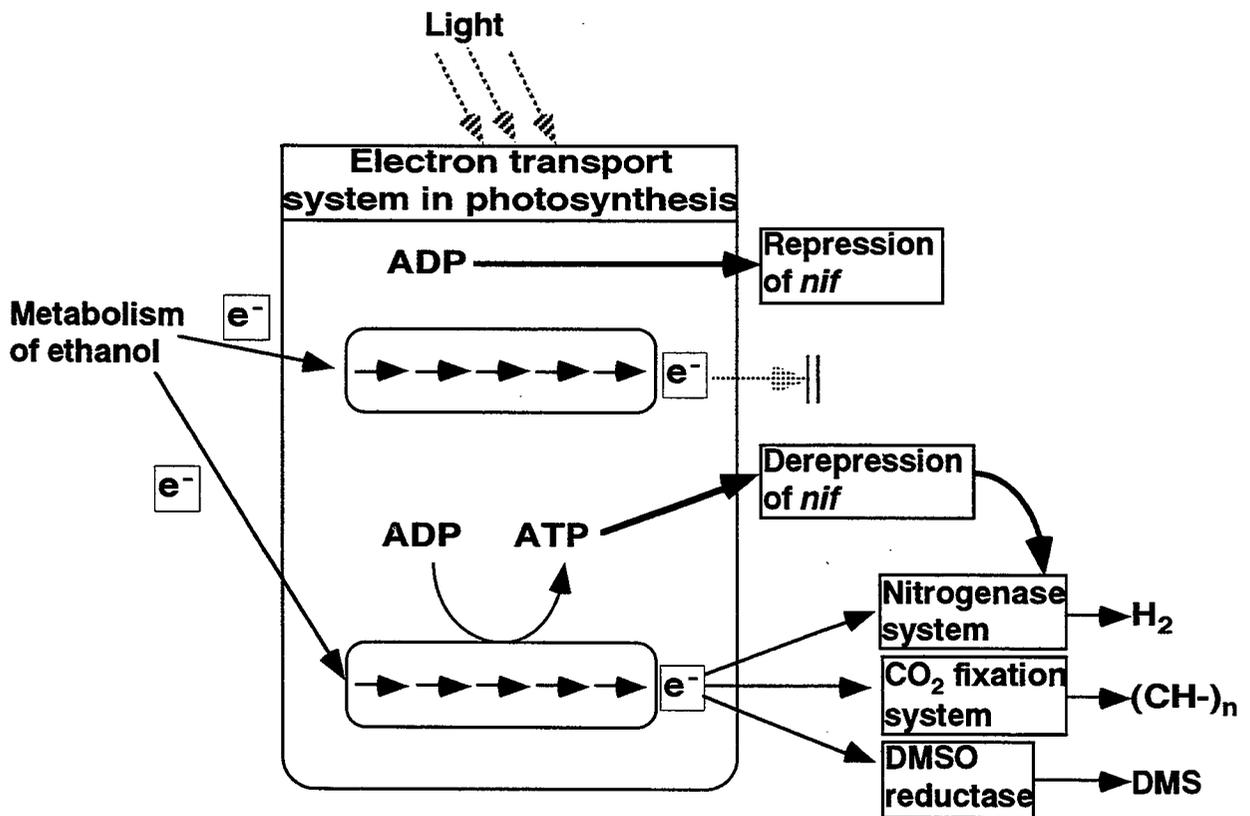
#### (1) エタノールによる *nif* 遺伝子の抑制

緑藻 MGA161 株の主たる発酵産物であるエタノール、グリセロール、および酢酸の内、光合成細菌 W-1S 株による水素生成に利用されるのはグリセロールおよび酢酸であった。エタノールを基質として添加すると水素生成は認められなかった。外部から基質を添加しない条件においても水素生成は認められることから添加したエタノールがこの反応に対し抑制的に働くと推察された。この現象について解析を行ったところ、エタノールは水素生成を触媒するニトロゲナーゼをコードする *nif* 遺伝子の発現を抑えることが明らかとなった。これまで *nif* を抑制する化合物はアンモニア、各種アミノ酸など分子内に N 原子を有するものに限られてきたが<sup>19)</sup>、分子内に N を含んでいないエタノールが *nif* の発現に重大な影響を与え、また一方では光合成における電子供与体であるという二面性を有することは興味深い。

#### (2) 最終電子受容体による *nif* 遺伝子の脱抑制

$\text{NaHCO}_3$  や DMSO は最終電子受容体として作用する化合物であり、これら両化合物を添加すると抑制が解除されニトロゲナーゼ活性が発現した。添加した  $\text{NaHCO}_3$  は二酸化炭素として細胞内に取り込まれ炭酸固定系により還元される際に細胞内の過剰の還元力を消費する<sup>42)</sup>。DMSO は DMSO リダクターゼによって dimethylsulfide (DMS) に還元される際に最終電子受容体として機能する (Fig. 15) ことが *Rhodovulum* 属の光合成細菌で報告されている<sup>43,44)</sup>。最終電子受容体の非存在下でエタノールを添加した細胞においては ATP 含量が低下したことから、エタノールによる *nif* の抑制は ATP 含量の低下に起因する可能性が考えられる。一方、最終電子受容体の混合により、電子供与体から受容体へと光合成の電子伝達系における電子の授受が促され光合成が正常化する結果、ATP 合成が復元し *nif* の抑制が解除したと考えられる (Fig. 15)。

二酸化炭素および DMSO の促進的効果は光合成による菌体の増殖においても報告されている。*Rhodobacter capsulatus* では、酪酸あるいはプロピオン酸といった還元性の高い基質を用いた際に、これらの最終電子受容体の非存在下で菌体は増殖しなかったのに対し、最終電子受容体の同時添加により増殖が認められている<sup>19,45)</sup>。これらの結果からも還元性の高い基質による光合成系への阻害的な作用が示唆されており、エタノールを添加した場合にも同様の作用メカニズムが推察される。



**Fig. 15.** Derepression of *nif* genes in the presence of ethanol coexistent with the terminal electron-acceptors. DMSO; dimethyl sulfoxide, DMS; dimethyl sulfide.

エタノール存在下の *nif* 遺伝子の発現はニトロゲナーゼ活性が発現した菌体においても確認された。これは、ニトロゲナーゼを介して最終電子受容体のプロトンへと電子が流れ、エタノールによる *nif* の抑制が解除されたためと考えられる (Fig. 15)。ちょうど、NaHCO<sub>3</sub> や DMSO を添加してエタノールによる抑制が解除したのと同

様のメカニズムである。つまり、エタノールを電子供与体として添加した場合、ニトロゲナーゼ活性が安定に発現するためには最終的な electron sink となる電子受容体が必要である。

このためエタノールを基質として供給する場合には、とくにあらかじめニトロゲナーゼ活性を十分に発現させた菌体を用意することが、高い水素生成効率を達成するために重要である。水素生産へ供給する光合成細菌のニトロゲナーゼ活性を高く発現することが当面の課題であり、次章ではこの効率の良い活性発現を目的に培養過程の検討を行った。

### 第3章 ニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムの評価

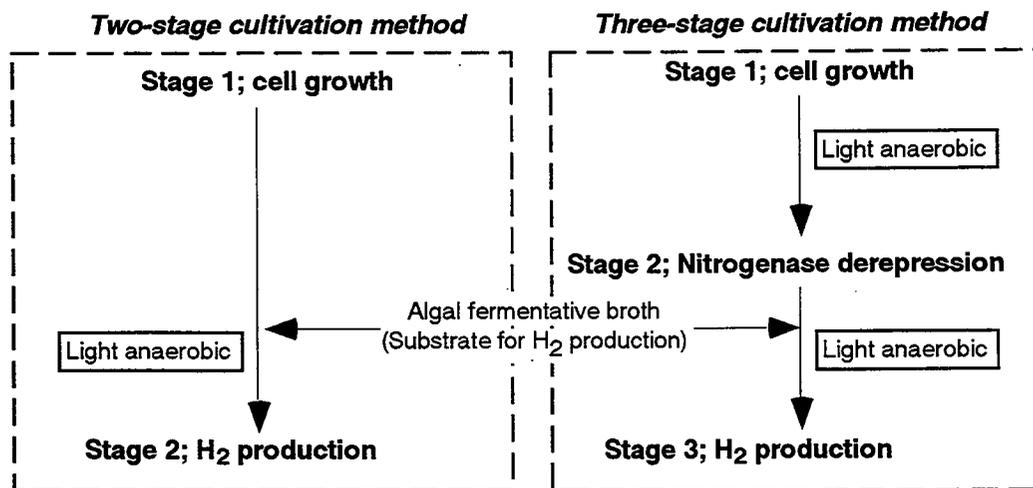
光合成細菌を用いて水素を生産する場合、培養過程は大きく二つに分類することができる。一方は水素生産の反応槽に菌体を仕込んだ後、菌体増殖と水素生産を同時に行わせる方法であり<sup>19)</sup>、他方は水素生産の過程とは別に菌体増殖のための培養過程を設ける方法である<sup>20)</sup>。前者の方法は1段階のみの過程であるため簡便さという点で優れているが、N源に原料として高価なグルタミン酸等のアミノ酸を用いなければならず、また、菌体増殖へと流れる基質の割合を量的に制御し難いという問題点を抱えている<sup>22,26,46)</sup>。一方、後者の方法は静止期にある菌体を用いて水素生産を行うため基質が菌体構成成分に流用される割合が低く、基質の大部分が水素へ変換されるため効率が良いという特徴を有している<sup>47)</sup>。したがって、水素生産における培養過程としては後者の方法がより多く提唱されており、この場合には必要な菌体量が確保されているため水素生産は基本的にN源無添加で行われる<sup>25,29,48)</sup>。包括的固定化法による水素生産も後者に分類される<sup>24,27,49)</sup>。本研究においては、後者の水素生産過程における菌体供給方法を改変した新規な培養過程を提案し緑藻発酵液を基質とした水素生産効率の改善を試みた。

#### 第1節 水素生産への菌体供給法

##### (1) 実験目的

本システムは主要な基質としてエタノール、グリセロールを含む緑藻発酵液からの水素生産を前提としており、基質である発酵液の供給段階で既にニトロゲナーゼ活性を有する光合成細菌を用いる方法がエタノールからの水素生産に有利である。というのは、発酵産物に含まれるエタノールがニトロゲナーゼをコードする *nif* 遺伝子を抑制するからである (第2章)。しかし、従来の菌体増殖と水素生産の2過

程からなるシステムでは水素生産の過程でニトロゲナーゼの活性発現、基質の水素への変換を同時に行うことになるため、ニトロゲナーゼ活性を効率良く発現する過程の導入が重要な課題となる。そこで、これら2過程にニトロゲナーゼの活性発現を目的とした過程を加え、Fig. 16に示す3過程からなる培養法により発酵液からの安定な水素生産を試みた。



**Fig. 16.** Schematic diagram of the cultivation method in H<sub>2</sub> production by cells of photosynthetic bacterium from algal fermentative broth.

## (2) 実験材料および方法

### 藻および菌株

緑藻 MGA161 株および光合成細菌 W-1S 株を用いた。

### 培地、培養条件、暗発酵条件、および水素生成条件

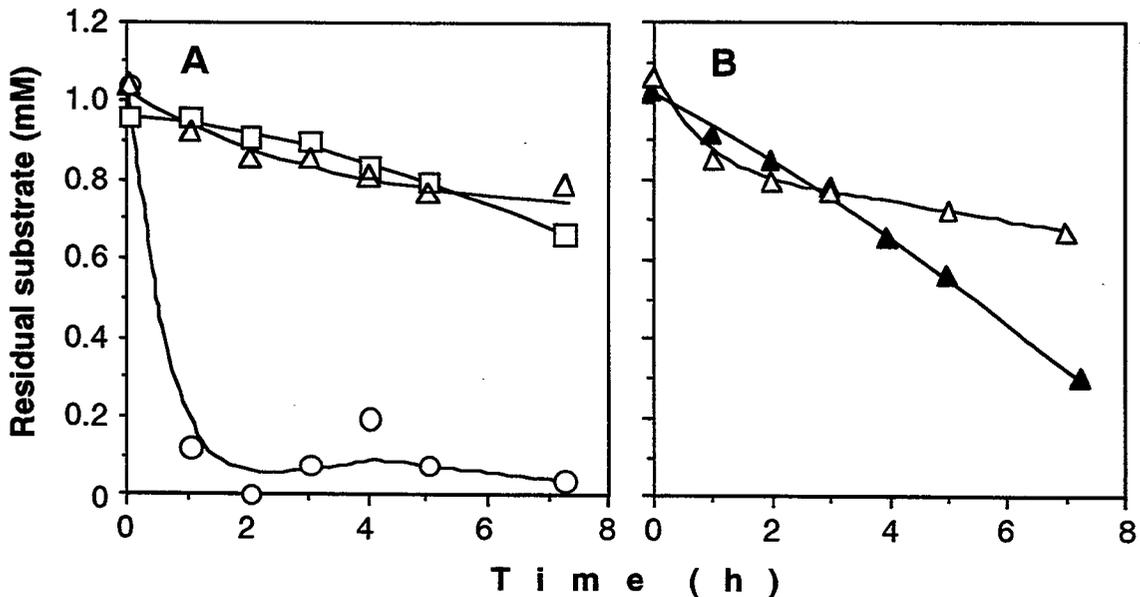
第1章および第2章に準じて行った。

### 定量

第1章に準じて行った。

### (3) ニトロゲナーゼ活性発現後の菌体における基質取込みの特性

外部からの基質を添加せずにインキュベートを行い、光合成細菌の菌体内にニトロゲナーゼ活性を発現させた場合、エタノールを添加後もニトロゲナーゼ遺伝子が持続的に発現し水素生成が継続することを見出した(前章、Fig. 14)。この水素生成が基質として添加したエタノールに由来するものか否かを確認するため、エタノールの細胞内への取込みをニトロゲナーゼ活性を発現した菌体において調べた。まず、ニトロゲナーゼ活性が発現していない菌体にエタノール、グリセロール、あるいは酢酸を単独で添加しインキュベート中の取込みを調べたところ、エタノール、グリセロールでは酢酸と比較し取込みが非常に遅く、特にエタノールでは4時間前後から停止しているのが判る (Fig. 17A)。そして、エタノールの取込みは菌体のニトロゲナーゼ活性発現の有無により変化が認められた (Fig. 17B)。ニトロゲナーゼ活性を発現していない細胞ではエタノールの取込みは添加2時間前後から非常に遅い速



**Fig. 17.** Uptake of substrates during H<sub>2</sub>-producing incubation. (A) Cells in which no nitrogenase had been derepressed were suspended in the medium containing acetate (○), ethanol (△), or glycerol (□). (B) Acceleration of ethanol uptake in cells in which nitrogenase had been derepressed by preincubation in the absence of ethanol (▲), compared to that in cells in which no nitrogenase had been derepressed (△).

度で推移したが、ニトロゲナーゼ活性発現後にエタノールを添加した場合は、取込み速度の低下が起きなかったため結果的に取込み量は大幅に増加した。ニトロゲナーゼ活性を発現した菌体では水素生成量の増加に伴ってエタノールの取込みも増加することが明かとなり、このことから添加したエタノールを基質として水素への変換が行われていることが推察される。

W-1S 株においては、外部から基質を添加しないインキュベートと比較し 1 mM のコハク酸を添加したインキュベートにおいては安定に且つ高いレベルのニトロゲナーゼ活性が発現することから、以下の試験ではコハク酸添加のインキュベートによりニトロゲナーゼ活性を発現させた菌体を用いることとした。

緑藻発酵液成分を想定し酢酸、エタノール、グリセロールを混合した培地に Fig. 16 に示す別々の培養過程により得られた菌体を懸濁し、水素生成のインキュベート中の各基質の取込みを調べた (Table 4)。ニトロゲナーゼ活性の発現した細胞を得る

**Table 4.** Effect of nitrogenase derepression on uptake of substrates.

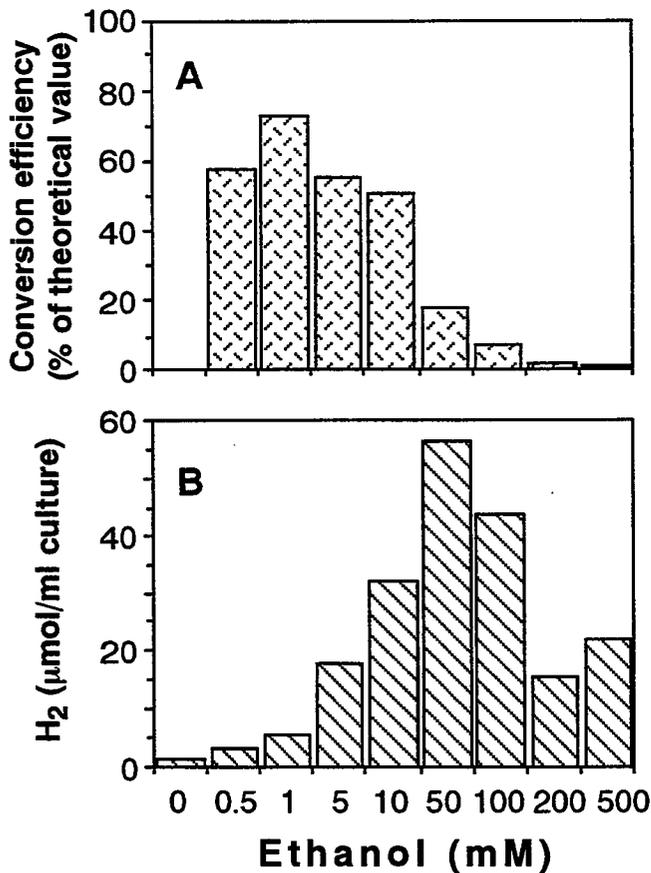
Substrate		Substrate concentration (mM)	
		Before derepression of nitrogenase <sup>a</sup>	After derepression of nitrogenase <sup>a</sup>
Acetate	0 h	5.64	5.64
	21 h	1.85±0.03	0.45±0.18
	Consumption	3.79	5.19
Ethanol	0 h	4.58	4.58
	21 h	4.23±0.18	3.86±0.17
	Consumption	0.35	0.72
Glycerol	0 h	5.05	5.05
	21 h	4.63±0.11	3.87±0.09
	Consumption	0.42	1.18

<sup>a</sup> Cells were suspended in the medium containing acetate, ethanol, and glycerol after growth or after the derepression of nitrogenase by preincubation with 1 mM succinate.

ために終濃度 1 mM コハク酸を添加してプレインキュベーションを行った。その結果、活性発現させた後の菌体においては、酢酸、エタノール、グリセロールのいずれの基質においても活性を発現していない菌体と比較し取込み量が増加していた。これらの基質取込み速度の変化から、緑藻発酵液を基質とした水素生産においてもニトロゲナーゼの活性発現の段階を改善することで、基質の取込み・分解・水素生成に至る一連の代謝の流れが促進されることが示唆された。ニトロゲナーゼ活性が発現した細胞においては、エタノールで約 2 倍、グリセロールで約 3 倍の顕著な取込み促進が起きていることから、特に炭酸ガス気相下の発酵により増加したエタノール、グリセロールを効率的に水素へと変換可能と考えられる。

#### (4) 菌体供給法の改変による水素生産性の向上

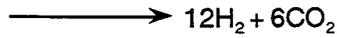
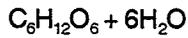
水素生産の基質の取込みにおいても菌体増殖、ニトロゲナーゼ活性発現、緑藻発酵産物の水素への変換の 3 過程からなる培養法の有効性が示唆された。本培養法を水素生産に応用するにあたり、本培養法で水素生産に供される菌体はどの程度の濃度までエタノールによる抑制的効果を受けずに継続的に水素生産を行うことができるのかを明らかにする必要がある。そこで、コハク酸添加によるプレインキュベーションを行いニトロゲナーゼ活性を発現させた菌体を用いて種々の濃度のエタノールの存在下において水素生成量を調べ (Fig. 18B)、エタノール添加量に対する水素変換効率を算出した (Fig. 18A)。水素生成量は 50 mM までは基質供給量に伴い増加傾向となったが、それ以上の供給は生成量を減少させる結果となった。しかしながら、50 mM 以上の濃度はエタノールに限らず他の有機物においても基質阻害が認められ得る濃度であり、また、ニトロゲナーゼ活性を発現していない菌体では 0.1 mM という比較的低濃度で水素生成は認められなくなることを考慮すると、本培養法で供給される菌体は明らかにエタノールによる抑制に対し耐性を付与されていることが判る。一方、変換効率は 1 mM で最高の約 70% という値が得られたがエタノール濃度の増加に従い減少傾向となった。緑藻の発酵液中に存在するエタノール濃度は



**Fig. 18.** Conversion efficiency (A) and production (B) of H<sub>2</sub> from ethanol at various concentrations during the three-stage cultivation of photosynthetic bacterium. Cells were suspended in the medium containing each concentration of ethanol after the derepression of nitrogenase by preincubation with 1 mM succinate. Incubation of each culture was continued until H<sub>2</sub> evolution ceased.

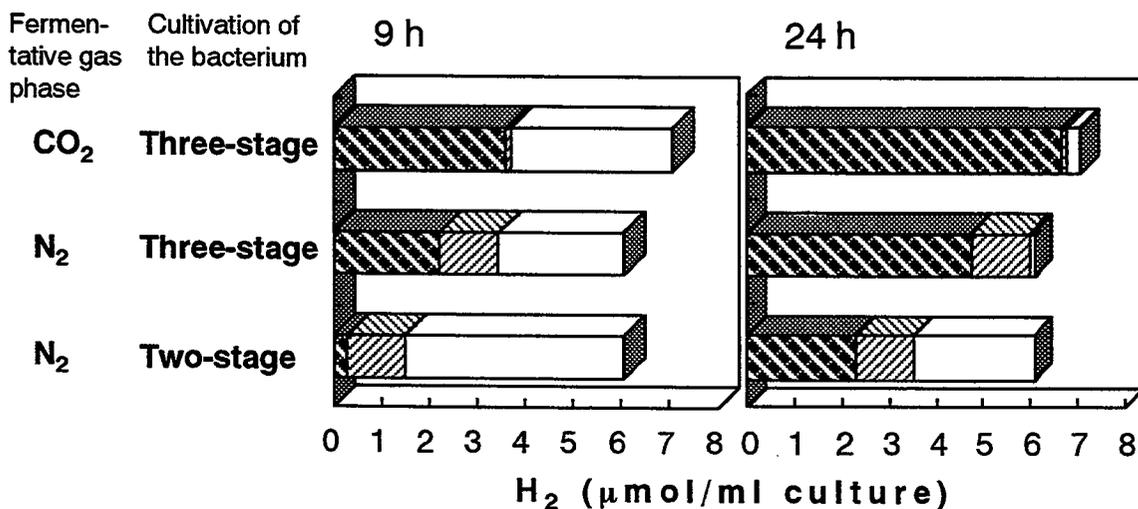
0.5~5 mM 範囲内に収まりこの濃度範囲では比較的高い変換効率が得られていることから、発酵液中のエタノールは水素への変換において適当な濃度範囲にあると言える。

これまでの光合成細菌の水素生成に関する試験は全て HPM に緑藻発酵液で想定される有機物を添加して行ってきたが、実際の発酵液を基質として用いた場合に本培養法が光合成細菌の水素生産性をどの程度改善するのかを検討した。第 1 章で検討した緑藻における炭酸ガス気相下での発酵法と、第 2 章および本章で検討した光合成細菌における菌体供給法を組み合わせた新システムについて、従来のシステムと比較しつつ水素生産量、および水素生産効率を評価した (Fig. 19)。いずれのシステムにおいても水素へと変換される還元当量の源は緑藻の発酵過程において分解した澱粉であり、それはグルコース単位で算出した。Eq. 3 に従って、グルコースが完全分解を受けた時の理論的な全水素生成量が算出されるので、実験から得られた光合成細菌による水素生成量、ならびに緑藻による水素生成量が全水素生成量に占める割合を求めた。



[Eq. 3]

光合成細菌により窒素ガス気相の発酵産物から生成した水素の量は、光合成細菌の3過程ならびに2過程培養法の違いが認められた。3過程の培養では9時間後には光合成細菌からかなりの量の水素が生成しており一方、2過程の培養では水素生成まで約9時間弱のラグタイムが認められた。緑藻と光合成細菌のそれぞれから生成した水素の総量においても、3過程の培養では24時間後にほぼ理論値に近い水素生成量を得ることができたのに対し、2過程の培養では24時間後においても約60%の水素の生成に留まった。また、発酵条件の気相ガスを窒素ガスから炭酸ガスに変更した場合、緑藻からの水素生成量は顕著に減少し、この減少部分は光合成細菌からの水素生成量の増加という形で上乗せされていることが明らかになった。また、緑藻の発酵過程において水素を得るにしても、その濃度は希薄であり精製困難である。したがって、炭酸ガス気相下の発酵は光合成細菌に水素生成が集約され、水素回収効率の改善を見込むことができる。これらの結果から、緑藻におけ



**Fig. 19.** Improvement of conversion efficiency in the three-stage cultivation of photosynthetic bacterium based on stoichiometric H<sub>2</sub> production from glucose degraded during algal fermentation. H<sub>2</sub> production from photosynthetic bacterium was measured at 9 h and 24 h, respectively. H<sub>2</sub> production by the photosynthetic bacterium, ; H<sub>2</sub> production by the alga, ; H<sub>2</sub> remaining to be produced, .

る炭酸ガス気相下の発酵と光合成細菌における3過程から成る培養法を組み合わせることにより、システム全体における水素生産性の向上と回収の効率化が可能になると考えられる。

## 第2節 小括

### (1) 水素生産へ供給する光合成細菌の評価

水素生産に用いる光合成細菌の菌体供給法において、ニトロゲナーゼ活性をあらかじめ発現させた菌体を供給する方法の有効性を明らかにした。基質の取込み速度は基質から水素への変換過程における初発過程であることから、水素生産性における重要な指標となる。ニトロゲナーゼ活性が発現した菌体においてはエタノールやグリセロールなど、緑藻の炭酸ガス気相下の主要な発酵産物をより速やかに取込むことができた。*R. sulfidophilum* 株において、基質の取込みの向上と共に水素生成効率の増大が認められているので<sup>22)</sup>、それと同種の W-1S 株においてもエタノール、グリセロールからの水素生成効率の増大が期待される。ニトロゲナーゼ活性をあらかじめ発現させた菌体においてこれら基質の取込みが促進した原因を明らかにするためにはさらなる検討が必要であるが、この原因として2つの可能性が考えられる。一つ目の可能性はニトロゲナーゼ活性が存在することにより、これら有機物の代謝により生成する還元力を細胞外に排出しやすくなるため代謝が全体的にスムーズに流れやすくなった結果取込み速度が向上したというものである。そして、もう一つの可能性は仮にこれらの有機物の取込みがエネルギー依存的な能動輸送により行われているならば、第2章で議論されているようにニトロゲナーゼ活性が存在することにより光合成を介した ATP 生合成が正常化される結果、有機物取込みも回復するという説である。実際、W-1S 株において種々の有機物の取込みを検討したところ、光合成や呼吸によるエネルギー獲得手段を適用できない暗嫌気条件では極端に取込

み速度が低下することが確認されており (Data not shown)、これら低分子有機物がエネルギー依存的な能動輸送により行われている可能性が示唆されている。

一方、酢酸はニトロゲナーゼ活性の未発現菌体においても速やかに取込まれており、過去に *R. sulfidophilum* 株で得られた結果と一致する<sup>22)</sup>。酢酸はアシル CoA シンセターゼによりアセチル CoA に変換され、アセチル CoA は PHB 生合成経路の初発基質であるため、容易に PHB に変換される<sup>50)</sup>。*Rhodopseudomonas palustris*<sup>51)</sup>、*Rhodobacter sphaeroides*<sup>52)</sup>、そして *Rhodospirillum rubrum*<sup>52)</sup> といった光合成細菌において酢酸を基質とした場合に優先的に PHB が蓄積されることが示されており、また本株においても [<sup>14</sup>C]酢酸を用いた実験から同様の成果を得た<sup>53)</sup>。ニトロゲナーゼ活性が発現した細胞では、酢酸から PHB への変換が抑えられ、水素への変換が有利になる。したがって、緑藻の発酵産物を基質として供給した場合、ニトロゲナーゼ活性の発現を主眼とした 3 過程からなる培養法が優れていると言える。

## (2) ニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムの生産性評価

緑藻の発酵を炭酸ガス気相下で行うことが光合成細菌のニトロゲナーゼ反応を基盤とした水素生産システムを構築する上で必要不可欠である。すなわち、窒素ガス気相下と比較し、緑藻による水素生成は抑えられ、その部分を光合成細菌により変換され得る発酵産物へと誘導できたからである。また、光合成細菌を 3 過程からなる培養法により供給すると、菌体のニトロゲナーゼ活性は高レベルで発現し、水素生成のラグタイムの短縮および生成速度の向上が認められた。

しかしながら、光合成細菌の培養過程を 3 過程に区切ることで自体は水素生産のような大規模培養を前提とした過程の場合にスケールアップの障害となり得るであろう。したがって、プラントスケールの培養では培地交換等の煩雑な操作を行わずに各過程に移行できる培養方法を取らなくてはならないであろう。このために菌体増殖のためのリアクターを設けず、培養開始時の N 源投入量を厳密に決定し菌体の増

殖と共に自然に N 源枯渇・ニトロゲナーゼ生合成へと移行させる必要がある。さらに、ニトロゲナーゼ活性が高発現した後の菌体に発酵液を供給する際にも培地交換は行わず連続培養的に発酵液を供給する等、今後の改善が望まれる。

新規に考案した、緑藻の発酵法および光合成細菌の培養法を組み合わせる本システムの特徴は、水素生産を光合成細菌に集約するものであり、さらに、その水素生産性は従来法の約 3 倍にまでに向上した。

## 総括

本研究では光合成微生物の光エネルギー変換能を利用し、環境に低負荷の代替燃料としての利用が期待されている水素ガスを化石資源に依存せずに生産するシステムの一つのモデルを提案することができた。多くの微生物が水素生成・取込みを触媒する酵素として保持しているニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼに着目し、これらの酵素が水素生成反応のみならず、水素生成・取込みを介して様々な嫌気代謝に影響を与え得ることを示した。

緑藻の水素生成はヒドロゲナーゼ活性により触媒されるがこの水素生成を抑えることで澱粉分解反応が促進することを見出した。そして、従来より嫌気条件に用いられてきた窒素ガス気相から炭酸ガス気相へと条件変更を行うことで、この水素生成の抑制を容易に達成した。水素生成を抑えることは、水素生産を目的とした場合には一見不都合なように思われるが、澱粉分解により生成する還元当量は水素生成から低分子有機物の発酵生成へと転換されたため、還元当量の損失には結び付かなかった。緑藻の水素生成を抑制することで量的に増加したエタノールやグリセロールといった低分子有機物は、光合成細菌に資化させることによりニトロゲナーゼ活性の触媒下、水素へと変換することができたからである。光合成細菌が低分子有機物から変換する水素も緑藻が光合成により蓄積した澱粉に由来するため、緑藻の水素生成の抑制による澱粉分解反応の促進は結果的に光合成細菌の水素生成量、さらにはシステム全体の生産量の向上に結びつくことになった。

緑藻の澱粉分解反応はこれまで細胞内の ATP/ADP 比といったエネルギー充足率により制御される機構が報告されている。一方、本研究で検討された水素生成の抑制は細胞内の酸化還元バランスに変化を及ぼすと考えられ、それに伴い澱粉分解反応が促進したという結果から、澱粉分解反応が酸化還元バランスを媒介することにより制御されるという新規な可能性が示唆された。

一方、緑藻の発酵産物であるエタノールやグリセロールを水素へと変換するために光合成細菌によるこれら有機物からの水素生成を検討した。その研究過程で、水素生成を触媒するニトロゲナーゼ活性の発現する段階がこれら有機物から水素への変換過程における律速段階であることを見出した。このことから、菌体に水素生産の基質である緑藻発酵液を供給する前に、あらかじめ最適条件でニトロゲナーゼ活性を発現させておく培養法が非常に有効であることを示した。このようにニトロゲナーゼ活性の発現の段階が律速となるのは、エタノールがニトロゲナーゼ活性を発現していない菌体において、ニトロゲナーゼ蛋白をコードする *nif* 遺伝子を抑制することに起因していた。細菌にとってのニトロゲナーゼの生理的役割は、窒素化合物の欠乏した環境に置かれた場合に大気中の窒素ガスをアンモニアに還元することにある。このため、アンモニアやアミノ酸など分子中に N 原子を有する化合物により *nif* 遺伝子は抑制されることが知られている。しかしながら、エタノールのような分子内に N 原子を含まず、しかも細菌に資化され得る化合物が *nif* 遺伝子を抑制するという報告は為されていない。このエタノールによる *nif* の抑制は  $\text{NaHCO}_3$  や dimethylsulfoxide (DMSO) といった最終電子受容体の共存下やニトロゲナーゼ活性が発現した菌体においては全く認められなかった。光合成細菌が水素生成を行う嫌気条件では、二酸化炭素などの最終電子受容体は光合成の維持に不可欠であり、還元当量が最終的に二酸化炭素の固定などに用いられることにより光合成の電子伝達系におけるスムーズな電子の授受が促されると考えられている。 $\text{NaHCO}_3$  は二酸化炭素として取込まれその固定系により、DMSO は DMSO リダクターゼにより、またニトロゲナーゼ活性はプロトン還元することによりそれぞれ菌体にとっての還元当量のはけ口として作用した結果、エタノール存在下において光合成機能の正常化に寄与したと考えられる。したがって、エタノールによる *nif* 遺伝子の抑制はエタノールが代謝されることによって生じた何らかの変化により光合成系の維持が困難な状態に細胞が陥ることに起因するというメカニズムが示唆された。

本研究による、水素生産システムの各過程の改善により最終的に水素生産性は従

来の構成による水素生産システムの約3倍にまで向上した。しかしながら、コスト面で化石資源由来の水素ガスとはまだまだ比較にならないため、本システムを含め太陽エネルギーを駆動力として生産された水素ガスが実用的に用いられるためには更なる研究と技術革新が必要である。したがって、今後も、光合成微生物の有する光エネルギー変換能という素晴らしい機能を最大限に引き出し利用するための研究が継続して行われる必要がある。その上で本研究が明らかにしたニトロゲナーゼならびにヒドロゲナーゼ活性が光合成微生物の嫌気代謝に及ぼす影響は新たな知見として光合成微生物ならびに水素生産の研究の発展に寄与するであろう。

## 結論

緑藻および光合成細菌の特性を生かした新規な水素生産システムの構築を目指し以下の結論を得た。

(1) 緑藻の発酵で生成する水素は可逆的なヒドロゲナーゼ反応に依存するため水素濃度の上昇は望めない。

(2) 従来の窒素ガス気相を炭酸ガス気相下に移行すると、緑藻の発酵における水素生成を還元性の高い有機物の発酵生成へと転換できる。

(3) 本研究に用いた緑藻 *Chlamydomonas* sp. MGA161 の澱粉分解は細胞内の酸化還元バランスに依存して調節されていることが示された。

(4) 緑藻の発酵における主要産物であるエタノールは濃度依存的に光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* strain W-1S の *nif* 遺伝子を抑制する。

(5) 最終電子受容体を共存することでエタノールの *nif* 遺伝子に対する抑制は回避され、エタノールを水素へと変換できる。

(6) 一旦、ニトロゲナーゼ活性が発現すれば、プロトンが最終電子受容体として作用するため、エタノールの *nif* 遺伝子に対する抑制は回避される。

(7) ニトロゲナーゼ活性の発現を主眼とした新規な 3 過程培養法により、水素生産の効率化・集約化を可能にした。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始温かい御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学教授、溝口正先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究にあたり種々の御指導と御助言を頂きました大阪大学名誉教授、三浦喜温先生に深く感謝の意を表します。

さらに、種々の貴重な御助言を賜りました大阪大学助教授、八木清仁先生、並びに技官、梅田房子先生に心より感謝いたします。

最後に、本研究に御協力戴きました宮代昌彦、出原賢治、樋川英宏、駄場正樹、Wasimul Q. Chowdhury、陳ユウ宏、岡山信行、永尾秀人、広瀬希、佐藤順子をはじめとする大阪大学薬学部薬品製造工学講座（生体機能分子化学分野）の諸氏に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Benemann, J. (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 1101-1103
- 2) Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S. and Yokota, A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 568-571
- 3) Miura, Y., Saitoh, C., Matsuoka, S. and Miyamoto, K. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 751-754
- 4) Vignais, P. M., Colbeau, A., Willison, J. C. and Jouanneau, Y. (1985) *Adv. Microb. Physiol.* **26**, 155-234
- 5) Sasikala, K., Ramana, C. V., Raghuvver Rao, P. and Kovacs, K. L. (1993) *Adv. Appl. Microbiol.* **38**, 267-268
- 6) Levi, C. and Gibbs, M. (1984) *Plant Physiol.* **74**, 459-463
- 7) Peavey, D. G., Gfeller, R. P. and Gibbs, M. (1983) *Physiol. Vég.* **21**, 337-342
- 8) Gfeller, R. P. and Gibbs, M. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 212-218
- 9) Klein, U. and Betz, A. (1978) *Plant Physiol.* **61**, 953-956
- 10) Ohta, S., Miyamoto, K. and Miura, Y. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 1022-1026
- 11) Happe, T. and Naber, J. D. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**, 475-481
- 12) Happe, T., Mosler, B. and Naber, J. D. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 769-774
- 13) Adams, M. W. W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 115-145
- 14) Payne, M. J., Chapman, A. and Cammack, R. (1993) *FEBS Lett.* **317**, 101-104
- 15) Miura, Y., Ohta, S., Mano, M. and Miyamoto, K. (1986) *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2837-2844
- 16) Kiyohara, M. (1993) *Energy and Resources* **14**, 91-97
- 17) Hallenbeck, P. C., Meyer, C. M. and Vignais, P. M. (1982) *J. Bacteriol.* **151**,

1612-1616

- 18) Jouanneau, Y., Wong, B. and Vignais, P. M. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 149-155
- 19) Hillmer, P. and Gest, H. (1977) *J. Bacteriol.* **129**, 724-731
- 20) Hillmer, P. and Gest, H. (1977) *J. Bacteriol.* **129**, 732-739
- 21) Willison, J. C., Madern, D. and Vignais, P. M. (1984) *Biochem. J.* **219**, 593-600
- 22) Stevens, P., Plovie, N., De Vos, P. and De Ley, J. (1986) *System. Appl. Microbiol.* **8**, 19-23
- 23) Macler, B. A. and Bassham, J. A. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2737-2741
- 24) Planchard, A., Mignot, L., Jouenne, T. and Junter, G. A. (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 49-54
- 25) Zürrer, H. and Bachofen, R. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 789-793
- 26) Kim, J. S., Ito, K. and Takahashi, H. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 937-941
- 27) Francou, N. and Vignais, P. M. (1984) *Biotechnol. Lett.* **6**, 639-644
- 28) Kim, J. S., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. (1987) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1173-1174
- 29) Nakada, E., Asada, Y., Arai, T. and Miyake, J. (1995) *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 53-57
- 30) Fujii, T., Nakazawa, A., Sumi, N., Tani, H., Ando, A. and Yabuki, M. (1983) *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2747-2753
- 31) Fujii, T., Tarusawa, M., Miyanaga, M., Kiyota, S., Watanabe, T. and Yabuki, M. (1987) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1-7
- 32) Hiraishi, A. and Ueda, Y. (1994) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 15-23
- 33) Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. and Clinton Fuller, R. (1991)

*Arch. Microbiol.* **155**, 337-340

- 34) Liebergesell, M., Hustede, E., Timm, A., Steinbüchel, A., Clinton Fuller, R., Lenz, R. W. and Schlegel, H. G. (1991) *Arch. Microbiol.* **155**, 415-421
- 35) Hustede, E., Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, 285-290
- 36) Kranz, R. G., Gabbert, K. K., Locke, T. A. and Madigan, M. T. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3003-3009
- 37) Miura, Y., Akano, T., Fukatsu, K., Miyasaka, H., Mizoguchi, T., Yagi, K., Maeda, I., Ikuta, Y. and Matsumoto, H. (1997) *Energy Convers. Mgmt.* **38**, S533-S537
- 38) Eydmann, T., Soderback, E., Jones, T., Hill, S., Austin, S. and Dixon, R. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 1186-1195
- 39) Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. and Dixon, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2143-2148
- 40) Ormerod, J. G. and Gest, H. (1962) *Bacteriol. Rev.* **26**, 51-66
- 41) Joshi, H. M. and Tabita, F. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14515-14520
- 42) Wang, X., Falcone, D. L. and Tabita, F. R. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 3372-3379
- 43) Hanlon, S. P., Holt, R. A., Moore, G. R. and McEwan, A. G. (1994) *Microbiology* **140**, 1953-1958
- 44) Vogt, C., Rabenstein, A., Rethmeier, J. and Fischer, U. (1997) *Microbiology* **143**, 767-773
- 45) Richardson, D. J., King, G. F., Kelly, D. J., McEwan, A. G., Ferguson, S. J. and Jackson, J. B. (1988) *Arch. Microbiol.* **150**, 131-137
- 46) Peng, Y., Stevens, P., De Vos, P. and De Ley, J. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1243-1247
- 47) Segers, L. and Verstraete, W. (1983) *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 2843-2853

- 48) Ike, A., Toda, N., Tsuji, N., Hirata, K. and Miyamoto, K. (1997) *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 606-609
- 49) Fißler, J., Kohring, G. W. and Giffhorn, F. (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 43-46
- 50) Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 450-472
- 51) De Philippis, R., Ena, A., Guastini, M., Sili, C. and Vincenzini, M. (1992) *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 187-194
- 52) Hustede, E., Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 87-93
- 53) Chowdhury, W. Q. (1996) *Ph. D. thesis* 43-53
- 54) Willison, J. C., Pierrard, J. and Hübner, P. (1993) *Gene* **133**, 39-46



