

研 究 報 告 書

「ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した水素生産の高効率化・高速化」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研 究 者: 増川 一

1. 研究のねらい

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ます。水素発生する生物の多くは低酸素濃度条件を必要としますが、一部のラン藻の光合成系・窒素固定酵素ニトロゲナーゼ系を利用した水素生産は、酸素存在下でも可能で、水素を高濃度まで蓄積できます。これらの長所は、粗放型で経済的な大規模水素生産を行うのに適していると考えられますが、現状の屋外での(光→水素)エネルギー変換効率は、最高でも0.1%(空気 + 2% CO₂ 気相下)に過ぎません。本研究は、ラン藻がニトロゲナーゼを酸素失活から保護するために異型細胞ヘテロシストを形成することに着目し、ヘテロシストの形成頻度を増やすことにより、酸素存在下の水素生産性向上を目指します。さらに、ニトロゲナーゼのアミノ酸置換変異により、低コストな窒素ガス気相下で高い水素生産活性を長期間持続させる、及び酵素の分子活性を高めることを目指します。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、糸状性窒素固定ラン藻でヘテロシスト形成する *Ababaena* PCC 7120 株を材料として、ヘテロシスト形成頻度を増大させるために、次の 2 通りの方法で変異株作成を行った。(i) 他のラン藻株での研究成果を利用した *patN* 遺伝子破壊株、および(ii) *hetR* 遺伝子のランダム変異株を作成した。それぞれの変異株でヘテロシスト形成頻度は増大し、水素生産性を向上させることに成功した。

ニトロゲナーゼによる水素生産活性は、窒素ガス存在下で急速に低下する。高い活性を維持させるために、しばしば Ar ガスが用いられるが、高コストである。このため本研究では、ニトロゲナーゼの活性中心部位近傍のアミノ酸残基置換変異株から選抜した 2 株を用いて、窒素ガス気相下で比較的高い水素生産性が 3 週間にわたって持続することを示し、培養気相コスト削減につながる成果を得ることができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「ヘテロシスト形成頻度の増大と水素生産性の向上」

ヘテロシストは、ニトロゲナーゼを酸素失活から保護することができ、ニトロゲナーゼ活性が発現する場(細胞)である。その形成頻度がある程度増加すれば、ラン藻の水素生産性が向上することが期待される。また、ニトロゲナーゼ反応(水素生産)に必要な還元力は、栄養細胞が通常の光合成により合成する糖質の供給に依存しているので、ヘテロシストは連続せず、栄養細胞に隣接したパターンで形成されることが重要である。そこで本研究では、ヘテロシストがフィラメントに沿って一定間隔を置いて形成され、かつその頻度が増大するような変異株を作成するため、次の 2 通りの方法で行った。(i) 他のラン藻株での研究成果を利用した *patN* 遺伝子破壊、および(ii) ヘテロシスト形成の活性化因子である *hetR* 遺伝子のランダム変異導入により、上記の表現型を示すヘテロシスト頻度増大株を作成することができた。

(i) *patN* 遺伝子破壊株では、(空気 + 5% CO₂) 通気下で、水素生産の最大活性が親株と比べて同程度であったが、より長く持続する傾向が見られた。さらに、同気相条件下で細胞あたりの色素濃度の低下が見られたので、培養液のクロロフィル濃度が高い条件、または強光条件で、水素生産性の顕著な増大が見られた。この結果から、*patN* 遺伝子破壊株では、濃度の高いカルチャーにおいて光利用効率が向上し、強光阻害が軽減されたと示唆された。



図 1. *patN* 破壊株のヘテロシスト分化。

ヘテロシストは alcian blue で染色されている。ヘテロシストは、通常 10-20 細胞に一つの割合で形成されるが、*patN* 破壊株では、ヘテロシスト間隔が短くなっている。

(ii) *hetR* 遺伝子ヘランダム変異を導入し、変異の選抜を行い、ラン藻のヘテロシスト形成頻度が増加した変異株を多数得ることに成功した。ランダム変異の選抜は、ヘテロシスト形成の抑制因子 PatS による活性化因子 HetR の阻害が軽減される変異選抜を進めた結果、活性化因子 HetR 内に 21 種類、抑制因子 PatS 内に 10 種類のアミノ酸残基置換変異を同定した。同定した *hetR* 変異を *Anabaena* の染色体へ導入後、15 種類の HetR アミノ酸残基置換変異株(一重交差相同組換え株)を作成でき、ヘテロシスト形成頻度が有意に増大した変異株を複数単離した。これらの変異株の中から、ヘテロシストが親株より少し高い頻度で、一定間隔を置いて形成される HetR 変異株を 4 種類選び、より詳細に調べた。その際、変異株のゲノム上の *hetR* 遺伝子周辺構造を親株のゲノム構造と同じにし、遺伝子発現を正常にするため一重交差株から二重交差株を作成し、これらを用いた。変異株のヘテロシスト頻度は、親株と比べて約 1.7 倍まで増大し、水素生産速度及びニトロゲナーゼ活

性(アセチレン還元活性)の最大値は約 2 倍まで増大した。5 日間に亘る水素生産の速度は、約 30%向上することがわかりました。

これらの結果から、ヘテロシスト分化の活性化因子である HetR の活性レベルをランダム変異導入により制御することで、ヘテロシスト形成を一定間隔のパターンで、その頻度を増大させ、さらに様々なヘテロシスト頻度を示す変異株を作成できることに初めて成功しました。藻類を用いたランダム変異による改良の成功例は、非常に少なく、本研究成果は窒素固定ラン藻では世界で初めての成功例である。

研究テーマ B「ニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異株による窒素ガス気相下での持続的水素生産」

窒素ガス気相下では、窒素栄養が充足されるとニトロゲナーゼ活性が急速に低下するため、活性は持続しない。Ar 気相下ではニトロゲナーゼ活性がある程度持続するが、コストがかかる。培養気相コスト削減のため、ニトロゲナーゼの活性中心近傍のアミノ酸残基置換変異株から、窒素ガス気相下で水素生産活性が低下しにくい 2 株を選び、それらの活性持続性について評価した。ニトロゲナーゼ変異株は、窒素ガス気相下で、親株の Ar 気相下の水素生産性と同程度の比較的高い水素生産性が 3 週間にわたって持続した。また、この変異株の窒素ガス気相下の生産性は、Ar 気相下の生産性よりも有意に増大していた。この変異株は、僅かながら窒素固定能を持つことが示唆されたので、変異ニトロゲナーゼにより固定された僅かな窒素栄養が、高活性の持続性向上に寄与したと考えられる。

3. 今後の展開

本研究では、ヘテロシスト形成頻度の増加による水素生産性向上、およびニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異株による窒素ガス気相下での 3 週間にわたる持続的水素生産に成功した。今後、これら 2 つの変異(ヘテロシスト形成頻度増大変異とニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異)を組み合わせることにより、窒素ガス気相下での水素生産性と活性持続性の更なる向上が期待できる。また、本研究で、ヘテロシスト形成の活性化因子 HetR の変異と共に、抑制因子 PatS の変異も複数同定することができたので、今後、抑制因子 PatS 変異によるヘテロシスト形成頻度の増大を試みる。さらに、HetR と PatS を標的とした 2 回目、3 回目のランダム変異をさらに進め、持続的な水素生産に最適なヘテロシスト頻度を見出し、水素生産能力の高いラン藻株の作出を目指す。窒素固定ラン藻 *Anabaena* PCC 7120 株においてランダム変異導入系を確立し、その有効性を初めて示すことができたので、ニトロゲナーゼやその他の水素生産に関わる代謝系に対して、この変異法による改良を展開する。

4. 評価

(1) 自己評価

さがけ研究期間では、*Anabaena* で新たにランダム変異導入系を確立し、HetR への変異導入だけで、これまで難しかったヘテロシスト分化をある程度自由に制御することができるようになった。当初の目的であった、ヘテロシスト形成を一定間隔のパターンを保ちつつ、その頻度を増大させることに成功し、さらに様々なヘテロシスト頻度を持つ株を多数作成することができた。数日間に亘り高い水素生産活性が持続するように、培養気相中の窒素ガス濃度を検討し、持続的な水素生産の評価系を確立した。この評価系により初めて、ヘテロシスト頻度増大

株の水素生産性が優れていることを明らかにすることができた。藻類では数少ないランダム変異による改良成功例であり、その方法の有効性を示すことができたことは重要な成果であると考ええる。

また、ヘテロシスト頻度増大株で、CO₂ 通気により、細胞当たりの色素濃度の低下が見られる変異株では、高濃度の培養液における光利用効率の向上、および強光阻害の軽減が示唆され、これらの培養条件で水素生産性が顕著に増大するという有利な点を明らかにすることができた。今後、この変異株の色素分析と水素生産性増大との関連を明らかにする必要がある。

ニトロゲナーゼの分子活性向上のためのランダム変異による改変は、ニトロゲナーゼ発現系は構築できたが、変異株のスクリーニング系の工夫が必要で、今後の課題である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

ヘテロシスト型ラン藻のニトロゲナーゼによる水素生産において、ヘテロシスト頻度を増やすことと、ニトロゲナーゼを改変し空気下の水素生産の高速化と高効率化を目指した研究を行っている。窒素固定ラン藻のランダム変異では、分化パターン形成の最新の知見を基にスクリーニング系を上手く工夫し、効果的に多数の目的変異株を得た。水素生産活性の評価は、長期間、高活性を持続させた上で比較し、ヘテロシストの増加により水素生産が増加することを示した。ニトロゲナーゼの改変では、窒素ガス下で高活性が長期間持続することを示し、培養の低コスト化につながる成果を得た。ニトロゲナーゼの発現系を構築し、分子活性を高めるための改変にも挑戦したが、目的変異株の取得には至らなかった。光合成生物を使ったバイオ燃料としての水素生産の研究は、古くからの重要なテーマである。その中で、着実に成果を挙げ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、得られた成果を論文として完成させるとともに、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めて行って欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, R. P. Hausinger “Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water” AMBIO 2012, 41:169–173
2. H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue “Photobiological Hydrogen Production: Bioenergetics and Challenges for its Practical Application” Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 2013, 17, 1–25

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際会議 招待講演】

- ・Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and

water. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, and R. P. Hausinger
JSP-RSAS Joint Conference “Capturing the Sun” (2011), Sweden
•Creating Anabaena PCC 7120 mutants with increased heterocyst frequency to increase
photobiological hydrogen production. H. Masukawa
18th International Congress on Nitrogen Fixation (2013), Miyazaki, Japan

【著作物】

- ・増川一、北島正治、櫻井英博、井上和仁、ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した大規模な水素生産構想、「微細藻類によるエネルギー生産と事業展開」、竹山春子 監修、執筆分 第Ⅱ編 第10章、シーエムシー出版 (2012.7)
- ・増川一、井上和仁、櫻井英博、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、第 64 回日本生物工学会大会(創立 90 周年記念大会) トピックス集 (2012.10)
- ・増川一、櫻井英博、シアノバクテリア及び微細藻類による光水素生産、水素エネルギーシステム 2013, 38(1), 27-32