

# 光生物的水素生産研究開発の再評価の提案

—再生可能なエネルギー源の創設を目指して—

桜井 英博\*・持丸 真里\*\*・増川 一\*

\*早稲田大学教育学部生物学教室、早稲田大学理工学研究科

169-8050 東京都新宿区西早稲田 1

\*\*駒澤大学文学部自然科学教室

154-8525 東京都世田谷区駒沢1-23-1

## A Proposal for the Reevaluation of Developmental Research of Photobiological Hydrogen Production - Toward Development of Renewable Energy Source -

Hidehiro SAKURAI\*, Mari MOCHIMARU\*\* and Hajime MASUKAWA\*

\*Department of Biology, School of Education, and Graduate School of Science and Engineering  
Waseda University, Nishiwaseda 1, Shinjuku, Tokyo 169-8050

\*\*Natural Science Faculty, Faculty of Letters, Komazawa University  
1-23-1 Komazawa, Setagaya, Tokyo 154-8525

The amount of solar energy received by the earth's surface exceeds that of the world social energy consumption by 6000 times, and its exploitation as a source of renewable energy source is keenly desired. The process consisting of photobiological production of hydrogen utilizing cyanobacteria has distinct advantages over the most of the conventional energy producing systems in that it consumes less material and less energy, and produces less waste materials than the latter during any stages of production, operation and disposal of the process. This paper describes a proposal for the reevaluation and the promotion of developmental research on hydrogen production utilizing oxygen-evolving photosynthesis.

**Key words:** cyanobacteria, hydrogen production, nitrogenase, photosynthesis, solar energy conversion

### 1. はじめに

地球に降り注ぐ太陽エネルギーは莫大で、人類社会が消費する一次エネルギーの6,000倍を越え、持続的エネルギー源としてその開発が強く望まれている。特に、ラン色細菌を利用した光生物的水素発生系は、システムの建設、運転、廃棄のいずれの段階においても消費する資源とエネルギー、発生する廃棄物が少なく、地球環境への負担が少ないと考えられる。本提案は、ラン色細菌の酸素発生型光合成を利用し

て水素を生産するための開発的研究の再評価とその促進を訴えるものである。

### 2. 提案の背景

#### 1) 気候変動に対する懸念と再生可能なエネルギー源創生の必要性

大気中のCO<sub>2</sub>濃度が年を追って上昇していることが事実として認識され、人類の社会的活動の増大がこうした事態を招いていることが強く示唆されるに至

った[1]。気候変動の悪影響を最小限にとどめるためには温室効果ガスの削減が緊急な課題だと認識されるに至り、気候変動枠組み条約が締約され、1997年に採択された京都議定書においてわが国は温室効果ガスの排出を2008-2012年には1990年度比較で6%削減しなければならないことになった。これ自体も大変厳しい目標であるが、気候変動に関する政府間パネル(IPCC)の長期予測によれば、この削減では全く不十分で、地球平均気温の現在レベルからの上昇を1.5°C、2.5°Cに抑えるには、将来的には約85%、70%の削減が必要だという[1]。人口の増加、経済発展途上国の経済成長を含んでなおこれだけの削減を達成するためには、省エネルギーに向けて社会システムを整えることと並んで、長期的には再生可能なエネルギー源開発を目指さなければならないことは明らかである。

**2) 莫大な太陽光エネルギーとその利用における経済性確保の必要性**

地球に降り注ぐ太陽光エネルギーは莫大で、人類社会が消費するエネルギーの6,000倍を越える(表1)。

しかし、その利用を考えたとき太陽光強度はそれほど高くなく、日本では、約 $5.4 \times 10^9 \text{ J/m}^2/\text{年}$ すなわち1,500 kWh/m<sup>2</sup>/年である。1 kWhの価格を10円ないし40円と仮定したとき、予想される1 m<sup>2</sup>当たりの年間の収入は、効率1%で150円ないし600円、効率10%で1,500円ないし6,000円である(表2)。

このことから、太陽光エネルギー利用系の開発戦略は、生産系の建設、運転、廃棄の経費の総額をこの収入以内に納められるような経済的なものでなければならない。これは、大変厳しい目標であるが、必ずしも実現不可能ではないと考えられる。効率的な農業における太陽エネルギーの変換効率率は、年間を通せば1%程度であるが、ブラジルや米国などでは、砂糖やトウモロコシから燃料用エタノールを年間 $22 \times 10^9$ リットル生産している(1998, 1999年度)[3]。米国は10%エタノールを含むガソリンに対して1ガロン当たり5.4セントの優遇税制をとっており、これはエタノール1リットル当たり約14円の助成金に相当するが、原油価格が1バレル10-20ドル台でも価格競争力を保っていた[3]。ブラジルでは、税制上の優遇措置と補助金によって、アルコール燃料車は最盛時には

表1 エネルギー需要と太陽エネルギー

	(10 <sup>18</sup> J/年)	比率
[世界]		
社会的エネルギー需要 (1997年) *	360	1
太陽エネルギー	2,500,000	6,900
光合成 (純生産、効率0.13%)	3,300	9
[日本]		
社会的エネルギー需要 (1998年) **	22.8	1
太陽エネルギー (陸地)	2,100	92
太陽エネルギー (含経済専管水域)	33,000	1,450

\*1997年度一次エネルギー消費 (非OECD諸国の再生可能エネルギーを含まず) [2]

\*\*1998年度一次エネルギー総供給 [2]

表2 太陽光利用の収益

エネルギー変換効率	収益 (m <sup>2</sup> /年)	
	電力料金 (1kWh当たり) の仮定	
	10 円	40 円
1%	150 円	600 円
5%	750 円	3000 円
10%	1500 円	6000 円

日本の平均太陽光強度 1,500kWh/m<sup>2</sup>/年 (一日平均 4kWh/m<sup>2</sup>)

表3 生物による太陽光利用法の初期の提案

A	水素生産(ヒドロゲナーゼ)
B	バイオマス生産(ジャイアントケルプ)→メタン・水素生産
C	炭化水素(ガソリン代替物)生産(アオサング、ユーカリ)
D	炭水化物生産→エタノール生産
E	高濃度有機廃液からのメタン・水素生産
F	窒素固定(ニトロゲナーゼ)による化学肥料の削減

400万台に達し、現在も300万台を維持している。1999年10月までは、エタノール1リットル当たり3円弱の助成をしていたが、以後はガソリンとの間の自由競争となっている[4]。

経済的な農業生産は、長年にわたるそれぞれの気候風土に合った作物の選抜と品種改良、栽培技術改良、社会基盤の整備によって実現されたものであるが、こうした農業の実績およびエタノールの価格競争力から見て、光生物的水素生産系も、長期戦略に基づいて研究開発を積み重ねれば経済的生産実現の可能性があると考えられる。

### 3) 初期(1978-1980年代初頭)の提案とその反省

太陽エネルギーは上記のように莫大なもので、特に1973年の第一次オイルショックを契機として表3のような生物を利用した太陽エネルギー利用法が考えられた。

しかし、そのほとんどは間もなく実現の見込みが低いものと評価されるに至った。一応の成功を収めているのは、上述のようにDのエタノール生産であるが、これは食糧需要と競合関係にあって飢餓の問題と関わり、また、価格の変動を受けやすいという弱点がある。Eの食品工場廃液や家畜尿のような高濃度有機廃液からのメタン・水素生産は可能であるが、資源量が限られている。現状は、世界的に見ても、光生物学的太陽エネルギー利用の研究にまとまった研究費を支出している国はないといってもよい状態で、散発的に開発に向けた研究が行われているにすぎない。

初期の提案が実を結ばなかった原因の一つは、エネルギー生産の最終段階までの戦略が描かれていなかった点にある。たとえば、提案Bにおいては、ユーカリやジャイアントケルプ(海藻ホンダワラの近縁種)のように光合成能力が高く成長の早いものをまず

育て、その利用(メタン発酵など)については後で考えようという姿勢であった。しかし、これらを利用しようとするときのメタン発酵速度は遅く、実用化が困難であった。こうした結果の反省として、部分的技術開発計画ではなく、最終利用までを見通す首尾一貫した開発戦略を立てることの必要性が痛感される。日本の山には持続的エネルギー生産が可能な木々が繁っているが、経済的理由によって薪や炭としての利用がほとんど行われていないことから考えても、開発戦略における経済性確保の見通しは極めて重要である。

### 3. 光生物的水素生産の利点とその概要

#### 1) 本開発研究戦略が描けるようになった背景

上述のように生物を利用した太陽光エネルギー変換計画は、初期の提案が実を結ばなかったために世間一般は悲観的評価を下しているが、この間、関連分野に以下のような進歩があった。

- A 良好な条件下で数%のエネルギー変換効率で水素発生を行うラン色細菌の存在[5]
- B ニトロゲナーゼの酵素レベルにおける反応機構の解明(1980年代)
- C 窒素固定細菌や光合成細菌における、ニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ活性の発現に関わる40を越える遺伝子群の解明(1990年代)。特に、窒素固定ラン色細菌の全ゲノムDNA塩基配列の解明[6]
- D ニトロゲナーゼ立体構造のX線結晶解析による解明(1990年代)。

(B-D)については、[7][8]参照)

Aについては、特にマイアミ大学の故三井旭教授が実用化を目指して精力的に多数の野生生物株を採取し、水素生産活性の高いラン色細菌を分離しており、その実績はラン色細菌による水素発生研究を勇気づ

けている。しかしながら、水素生産の実用化においてはこれでも不十分で、さらに幾つかの克服すべき課題があることも明らかとなった。特に問題となるのは、水素生産の効率が低いこと、水素発生が長続きしないことであり、これまでその克服のための戦略が描かれていなかった。

しかし、上述のような関連分野の研究の進歩によって、ここに示すような開発戦略を描くことが可能になったと考える。本開発戦略の要点を以下に示す：

- a 発生した水素の再吸収にはたらくヒドロゲナーゼ活性の分子生物学的手法による抑制
- b ニトロゲナーゼの分子生物学的手法による水素生産性増大に向けた改良
- c 水素生産性の高い株の自然界よりの探索
- d 水素生産増大に向けた培養法の改良
- e 水素生産を支える諸技術の開発(海上での培養装置、モニタリング、分離、回収運搬、貯蔵等)

このようにして、再生可能なエネルギー源の創出と新規産業の創生を目指す。

## 2) 水素生産システムの特徴

開発目標である光生物的水素生産システムは、次のような特徴を持っている：

- A エネルギー源は太陽光で、資源量が極めて大きい
- B 原料は水で資源量は無尽蔵といつてよい
- C 持続的エネルギー生産が可能であり、システム製造過程においても資源をほとんど消費しない。必要な資源は、培養に必要な栄養塩類と容器(たとえばプラスチックバッグ)である
- D 産物は水素と酸素で、システム製造、運転、廃棄を通じて環境を汚染しない。不用になったラン色細菌は、動物プランクトンの餌になる
- E 最終利用形態までも視野に入れた計画である。最終産物の水素は無公害な(クリーンな)エネルギーであり、燃料電池の直接の原料となるが、燃料電池(水素)のエネルギー変換効率は現在でも50%以上が可能で、更に効率をあげることが期待できる。

わが国は陸地は狭いが、広い200海里経済専管水域を持つので、これを活用してたとえばプラスチックバッグの中で栽培漁業の感覚で経済的水素生産を目指

すのが適当だと考えられる。

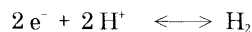
## 3) ラン色細菌の水素代謝

われわれは、上記開発研究戦略(1) - aにしたがい、ヒドロゲナーゼに焦点を当てた研究をおこなっているが、研究の背景について更に詳しく述べる。

ラン色細菌(別名、ラン(藍)藻、シアノバクテリア)は、水を電子供与体として酸素発生型の光合成を行う原核生物である。ラン色細菌の中には酵素ニトロゲナーゼの作用により窒素固定を行うものがある。本提案は、この反応を利用して水素発生を行わせようとするものである[8]。

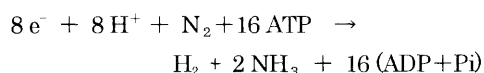
ラン色細菌の水素代謝に関係する酵素は、ヒドロゲナーゼとニトロゲナーゼである。

・ヒドロゲナーゼ反応は、次のように表される



生理機能的に見て、ヒドロゲナーゼは水素の取り込みにはたらく取り込型ヒドロゲナーゼ(Hup)と取り込みと放出の両方にはたらく双方向性ヒドロゲナーゼ(Hox)に分けられる。ヒドロゲナーゼの活性中心クラスターとしては、(Ni, Se, Fe, S), (Ni, Fe, S), (Fe, S)などが知られている。

・ニトロゲナーゼは窒素固定の酵素で、その反応は次のように表される：



水素発生は、ニトロゲナーゼ反応に付随して必然的に起こり、生物にとってはおそらく無駄な反応だと考えられるが、これを水素生産に利用することができる。ニトロゲナーゼは、活性中心クラスターの特徴的金属原子によりMo, V, Fe型に分けられる。

水を電子供与体としたときの可視光(550 nm)のエネルギー変換効率は、最終産物ごとに表4のように試算される。太陽光のうち光合成に利用できるのは、エネルギーにしてその約半分をしめる可視光線なので、全太陽光に対する効率は表に示した値の約半分となる。

表4に示すように、ヒドロゲナーゼを利用した水素発生系は、エネルギー変換効率が高いのでこれを水素生産に利用しようとする考えがある。しかし、ラン色細菌や緑藻の酸素発生型光合成を利用する場合、

表4 光生物的エネルギー変換効率 (理論的最高値) [8]

炭水化物	27%	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2$
$\text{H}_2$ (ヒドロゲナーゼ)	28%	$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}_2 + \text{O}_2$
$\text{H}_2$ (ニトロゲナーゼ)	4%	$4 \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2 \rightarrow \text{H}_2 + 2 \text{NH}_3 + 2 \text{O}_2$
$\text{H}_2$ (改変ニトロゲナーゼ)	16%	$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}_2 + \text{O}_2$

ヒドロゲナーゼは水素発生だけでなく吸収にもはたらくので、水素生産には気相を嫌氣的にして光照射することが必要である。こうした制約があるため、経済的水素生産の実現は困難ではないかと考えられる。

これに対し、酸素発生型ラン色細菌のニトロゲナーゼによる水素生産系では、嫌気操作は不要である。ニトロゲナーゼ反応においては、エネルギーの大部分は窒素固定に使われるので、水素への変換効率が極めて低い。しかし、窒素固定と水素発生の比は固定したのではなく、V型ニトロゲナーゼはMo型にくらべて水素発生の割合が高い(窒素固定の効率が悪い)という。こうした事実を背景に、ニトロゲナーゼの遺伝子工学的改変が考えられ、窒素固定に向いていた電子をすべて水素発生に振り向けることができれば、水素生産のエネルギー変換効率は上昇し、究極的最大変換効率は約16%と試算される。野生のラン色細菌にとっては、副産物として生じる水素はエネルギー源なので、これを無駄に逃がしたりはせず、酵素ヒドロゲナーゼにより再吸収、再利用している。したがって、自然界から水素生産性の高い株を見出そうとするだけでは不十分で、遺伝子工学的改良が必要である。水素生産の観点からすればヒドロゲナーゼは余計な反応なので、活性を抑える必要がある。

#### 4) ヘテロシスト形成窒素固定ラン色細菌

窒素固定を行うラン色細菌には、異形細胞(ヘテロシスト)を形成するものとしめないものがある。ヘテロシストを形成するのは糸状の*Anabaena*属、*Nostoc*属がその代表で、生育速度が高いものが多いのでこれを研究材料とした。ニトロゲナーゼは酸素感受性が極めて高いので、生物は酸素による障害からニトロゲナーゼを守るためにさまざまな工夫をしている。ラン色細

菌が窒素欠乏状態に置かれると栄養細胞の一部が分化して、窒素固定のために特化した細胞ヘテロシストが形成され、ニトロゲナーゼの合成が起こる。ヘテロシストは、光化学系IIを持たないので酸素を発生せず、厚い細胞壁によって囲まれていて、細胞内酸素濃度を低く保っている。また、光化学系Iを持ち、環状電子伝達系により高エネルギー物質ATPを生産し、これをニトロゲナーゼ反応系に供給している。栄養細胞は酸素発生型光合成により $\text{CO}_2$ を同化して有機物をヘテロシストに送り、ヘテロシストはこれを還元力として窒素を固定し、窒素化合物を栄養細胞に送る。糸状ラン色細菌は、このような分業によって、酸素発生型光合成と酸素感受性ニトロゲナーゼの二つの反応を巧みに両立させている。

#### 4. 現在までの研究成果

##### 1) ヒドロゲナーゼ遺伝子の分布

われわれは、ヒドロゲナーゼはニトロゲナーゼ反応により生成する水素の再吸収に働くので水素生産の妨害となっている可能性が高く、その活性抑制が水素生産性向上につながると考えた。

ヒドロゲナーゼには、上述のように取り込型(Hup)と双方向性(Hox)の2種があり、窒素固定ラン色細菌はその両方を持つと考えられていたが、最近*Anabaena* PCC73102株が*hox*遺伝子およびHox活性を持たないことが報告され、ついで*hox*遺伝子を持たない株がほかにも数株あることが報告された[9]、[10]。われわれは、日本および米国の藻類保存センターが所有している窒素固定ラン色細菌12株についてヒドロゲナーゼ遺伝子の有無をサザンブロット法により調べ、*hup*遺伝子はすべての株に存在するが、*hox*遺伝子は*Nostoc*

*punctiforme* IAM-15および*Nostoc commune* IAM-13株には存在しないことを明らかにした。次に、ジチオナイト、メチルピオロゲン存在下で生細胞および細胞抽出液のHox活性を測定し、上記2株はHox活性を持たないことを確認した。[11]

## 2) *Anabaena* PCC7120ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作出とその水素生産活性

糸状窒素固定ラン色細菌*Anabaena* PCC7120は、生物学的基礎研究に多く用いられ、最近わずさDNA研究所によってゲノムDNAの全塩基配列が明らかにされつつある[6]。本ラン色細菌は*hup*および*hox*を持っているが、これをモデル実験生物としてヒドロゲナーゼ構造遺伝子破壊が水素生産向上に寄与するか否かを検討した。

方法としては、この株のHup構造遺伝子*hupLS*の一つである*hupL*の部分配列オリゴヌクレオチドを作製し、Wolkらが開発したtriparental mating法を用いて、遺伝子破壊株の作出を試みた。抗生物質耐性をマーカーとして組換え体を選抜し、組換え体数株を得た。これが目的とする遺伝子破壊株であることは、*hupL*部分配列オリゴヌクレオチドをプローブとするサザンブロット法およびヒドロゲナーゼ活性測定により確認した。

これらの株を窒素を含まない培地に移して培養し、経時的に試料を取り出してニトロゲナーゼおよび水素生産活性を測定した。両活性とも培養約35-45時間後に最大値に達したのち減衰したが、正味の最大水素生産活性は野生株では14  $\mu\text{molH}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ 、*hupL*破壊株では53-77  $\mu\text{molH}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ であった。このように、*hupL*破壊株の水素生産性は野生株の約4-5倍に向上しており、われわれの期待通りにヒドロゲナーゼ構造遺伝子の破壊が水素生産活性向上に役立つことがこの株では実証された。この方法が水素生産性向上において一般的に利用できるか否かを調べるため、他の幾つかの株についても遺伝子破壊株の作出を進めている。また、*hox*遺伝子破壊株の作出を進めている。

最近Happeらは、われわれと別の株*Anabaena variabilis* ATCC29413において、*hupL*遺伝子を破壊すると水素生産が3倍に増大すると報告している[12]。

## 3) 水素生産活性の高い野性株に関する予備的研究

窒素固定型ラン色細菌12株について、窒素固定条件下におけるニトロゲナーゼ、および水素生産の活性を1-6日間にわたって測定した。両活性とも窒素欠乏培地に移してから1-5日で最大値を示したが、中でも*Anabaena variabilis* IAM-58株が水素生産性が最も高く(2.4  $\mu\text{molH}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ )、*Anabaena* PCC 7120の約1.7倍の活性を示した[13]。なお、その後の研究で活性は培養時の振とう条件に大きく左右されることが分かり、上記の実験では振とうが強めで活性が全体として低かったので、さらにさまざまな培養条件下での活性の比較が必要である。

## 5. まとめ：ラン色細菌を利用した光生物的水素生産実用化への道のり

上述のように、ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊により水素生産性は向上したが、この活性は窒素の栄養条件に依存していて持続しないという欠点があり、その克服が次の課題である。洋上での水素生産実用化をにらんだ実験室条件下での中期目標は、野外と似た条件下において変換効率1%で持続的に水素生産ができるようなラン色細菌の遺伝工学的改造と優良株の選抜である。光合成効率約1%のサトウキビをベースにした燃料用エタノールの価格競争力から見て、光生物的水素生産も約1%の効率が達成できれば、周辺技術の進歩と相まって、実用化の可能性が開けてくると考えられる。

ラン色細菌による光生物的水素生産は、再生可能なエネルギー源の創設および新規産業の創出につながり、地球環境への負荷軽減など極めて大きな波及効果が期待される。本計画は広い経済専管水域を有するわが国の国情に合ったものであり、公的資金による継続的研究支援が強く望まれる。

## 謝辞

形質転換のためのプラスミドを恵与されたDr. Wolk, C. P. (Michigan State Univ.)に感謝する。また、中村賢介、岩田俊輔両君の研究協力に感謝する。

本研究は、RITE(平成11-12年度優秀研究企画)による支援を受けた。

## 参考文献

- [1] Houghton, J. T., Meira Filho, L. G., Callander, B. A., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (eds.), "Climate Change 1995", Cambridge University Press (1996)
- [2] 日本エネルギー経済研究所計量分析部編、「エネルギー・経済統計要覧」(2000年版)、(財)省エネルギーセンター(2000)
- [3] Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M. G., Amorim, H. V., Trends. Biotechnol. 17: 482-487 (1999)
- [4] NEDO 海外レポート No. 826 (2000)
- [5] 三井旭先生メモリアルシンポジウム実行委員会編、「三井旭教授論文集」(1995)
- [6] Tabata, S., in Abstract of 10<sup>th</sup> International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, p. 37, (Barcelona, 2000)
- [7] Howard, J. B., Rees, D. C., Ann. Rev. Biochem. 63: 235-264 (1994)
- [8] 桜井英博, 「人工光合成技術の研究開発動向調査」 p. 3-10 (日本エネルギー学会) (1997)
- [9] Tamagnini, P., Troshima, O., Oxelfelt, J., Salema, R., Lindblad, P., Appl. Environ. Microbiol. 63: 1801-1807 (1997)
- [10] Tamagnini, P., Costam H. -L., Almeida, L., Oliveira, M. -J., Salema, R., Lindblad, P., Curr. Microbiol. 40: 356-361 (2000)
- [11] Masukawa et al. (in preparation)
- [12] Happe T., Schuetz, K., Boehme, H., J. Bacteriol. 182: 1624-1631 (2000)
- [13] Masukawa, H., Nakamura, K., Mochimaru, M., Sakurai, H., "Biohydrogen II" (ed. Miyake, J.) Elsevier Publishers (Amsterdam) (in press)

(E-mail 連絡先: sakurai@mn.waseda.ac.jp)