



Title	水素発生
Author(s)	増川, 一
Description	4章 分光測定 6
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 561-565
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39193
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-077.pdf



6. 水素発生

増川 —^{1,2)}

光合成生物による水素発生は、酵素ニトロゲナーゼまたはヒドロゲナーゼにより触媒される。本稿ではガスクロマトグラフィーを使用した水素発生の分析方法について述べる。

Measurement of photobiological hydrogen production

Hajime Masukawa

Many microorganisms, eukaryotic as well as prokaryotic, can evolve H_2 . The enzymes of H_2 production are either hydrogenase or nitrogenase, both of which are generally sensitive to O_2 . Here, method for measurement of H_2 production by photosynthetic microorganisms using gas chromatography has been described.

6.1 水素を発生する生物とその酵素

水素を発生する光合成生物には、水を電子供与体として酸素発生型光合成をするシアノバクテリアや緑藻、硫化水素などの硫黄化合物や有機物を電子供与体とする各種光合成細菌がある¹⁾。光合成生物以外にも、有機物や糖類を電子供与体として暗所嫌気性発酵過程により水素を発生する発酵細菌などがあるが本稿ではふれない。

水素発生を触媒する酵素は、ニトロゲナーゼ (nitrogenase) またはヒドロゲナーゼ (hydrogenase) であり^{1,2)}、どちらも一般的に酸素感受性が高く、酸素共存下では失活しやすい。一般的に、光合成細菌による水素生産は、嫌気的条件を必要とする。酸素発生型光合成生物である緑藻やシアノバクテリアのヒドロゲナーゼを利用した生産系では、水素生産系に嫌气的 (微好气的) 条件を必要とする。シアノバクテリアのニトロゲナーゼを利用した生産系では、好气的条件下でも水素発生を持続できる。発生または吸収された水素は、ガスクロマトグラフィー、水素電極、ガス質量分析法などにより定量される。ガスクロマトグラフィーは、多数のガスサンプルを短時間で簡便に分析するのに適しているので、この方法について紹介する。

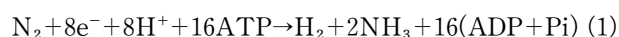
6.2 ニトロゲナーゼによる水素発生

6.2.1 ニトロゲナーゼ反応と水素代謝

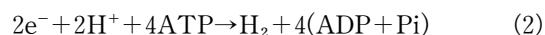
ニトロゲナーゼは、生理的には窒素固定酵素として働

き、シアノバクテリア、光合成細菌などのさまざまな原核生物に分布するが、緑藻などの真核生物には見られない。窒素化合物 (硝酸、アンモニア、尿素など) を含む培地 (+N 培地) からそれらを取り除いた培地 (-N 培地) に細胞を移し培養すると、細胞内が窒素飢餓状態になり、ニトロゲナーゼの遺伝子発現が誘導される。

ニトロゲナーゼ反応の必然的副産物として水素が発生し、反応式は、窒素ガス存在下では次式のように表される：



窒素ガスが存在しない条件下 (例：Ar 気相) では、全ての電子が水素発生に向かう：



この反応は不可逆的に水素発生に向かうので、ヒドロゲナーゼと異なり (後述)、酸素共存下でも逆反応の水素吸収が起こらない。しかし、多くの窒素固定生物は、水素の吸収に働く取り込み型ヒドロゲナーゼ (uptake hydrogenase, 通称 Hup) を持ち、酸素共存下では、ニトロゲナーゼ反応により発生した水素は Hup により再吸収され、エネルギー源として再利用される。このため、取り込み型 Hup 活性を持つ株では、実際に測定される正味の水素発生速度は低くなる。なお、単細胞性の窒素固定シアノバクテリア野生株のごく一部には、取り込み型 Hup の遺伝子または活性が見られず、ニトロゲナーゼによる比較的高い水素発生速度を示すものもいる^{3,4)}。取り込み型 Hup を持つものでも、その遺伝子破壊によって水素再吸収が抑えられるので、野生株と比べて高い水素発生速度を示すことが、これまでに光合成細菌やヘテロシ

1) ミシガン州立大学

2) 神奈川大学光合成水素生産研究所

スト形成するシアノバクテリアで示されている⁵⁻⁸⁾。

6.2.2 各種光合成生物のニトロゲナーゼによる水素発生

光合成細菌のニトロゲナーゼによる水素発生では、ニトロゲナーゼばかりでなく細菌の生育自体も酸素感受性であるため、嫌気条件でなければ持続しない。一方、シアノバクテリアの中には、酸素発生型光合成とニトロゲナーゼ反応とを空間的、または時間的に分離することによって、酸素感受性ニトロゲナーゼが失活することを防ぎ、これらの反応を両立させているものがある^{2,7)}。このようなシアノバクテリア株では、ニトロゲナーゼ誘導のための培養を好氣的条件下（空气中）で行うことができる。特に、ヘテロシスト形成する株（後述）は培養などの取り扱いが容易なため、水素発生の研究材料としてよく用いられている。

空間的分離は、糸状性シアノバクテリアの中の *Anabaena*, *Nostoc* 属等で見られ、窒素栄養欠乏下で通常の酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部が約 10-20 細胞間隔でヘテロシストと呼ばれる異型細胞へ分化し、そこでニトロゲナーゼ反応を行う。ヘテロシストは窒素固定に特化しており、自身は光化学系 I のみを持ち、酸素発生に係わる光化学系 II を持たないので酸素発生型光合成を行わず、さらに呼吸活性を上昇させるなどにより内部の細胞内酸素濃度を低く保つことにより、ニトロゲナーゼを酸素失活から保護している。ニトロゲナーゼ反応には、多量の電子と ATP が必要であるが、前者は栄養細胞から供給される有機化合物（通常の酸素発生型光合成により合成）に依存し、後者は異型細胞内の光化学系 I 周辺の電子伝達に共役した光リン酸化および呼吸によって供給される。ヘテロシストは、一般的に、+N 培地から -N 培地へ移行して約 1 日後に形態学的分化が完了し、ニトロゲナーゼの発現は、ヘテロシスト形成以降（-N 培地移行後、約 1 日目以降）に誘導されてくる。

時間的分離は、窒素固定を行う単細胞性 (*Cyanothece*, *Gloeotheca* 属等) や一部の糸状性シアノバクテリア (*Oscillatoria* (新名: *Planothrix*), *Trichodesmium* 属等) で見られ、ニトロゲナーゼによる水素発生は一般に細胞の概日周期により制御されていると考えられる。この場合、同一細胞が日中（明期）は酸素発生型光合成により CO₂ から有機化合物を合成し、夜間（暗期）は、日中（明期）に合成した有機化合物を利用して呼吸活性を上昇させることにより細胞内酸素濃度を低下させると同時に ATP を生成し、ニトロゲナーゼ反応を行う。ニトロゲナーゼは、暗期に入ってから数時間後に誘導されてくる。一部のものは、日中でもニトロゲナーゼ活性を示すが、こ

れは細胞の一部が異型細胞を形成することなく酸素発生型光合成活性を一時的に失い、ヘテロシスト内と同様な代謝経路により窒素固定を行うと考えられる。

6.2.3 ニトロゲナーゼによる水素発生の分析法

6.2.3.1 ニトロゲナーゼ活性の誘導

ニトロゲナーゼは、細胞を +N 培地から -N 培地に移して培養を続けると誘導される。誘導にかかる時間は生物種や株で異なる。時間的分離により窒素固定するシアノバクテリアでは、-N 培地で暗期に入ってから数時間後に誘導されてくるが、ヘテロシスト形成するシアノバクテリアでは、ヘテロシスト形成以降（-N 培地移行後、約 1 日目以降）に誘導されてくる。ニトロゲナーゼの活性と Ar 気相下で測定した水素発生速度は、ほぼ比例し、それらの活性は -N 培地移行後、対数増殖期に最大になり、それ以降急激に低下していく傾向がある。活性が最大となるタイミングも株や培養条件により数時間から数日異なる。このため、カルチャーの時期によって、水素生産速度は大きく異なることがある。

6.2.3.2 水素発生時の気相条件

酸素共存下では、取り込み型 Hup による水素吸収が原因となり、正味の水素発生速度は低くなり、場合によっては、ニトロゲナーゼの活性はあるが水素発生は検出されないこともある。気相を Ar（アルゴン）ガスに置換することにより、ニトロゲナーゼを経由する電子はすべてが水素生産に振り向けられ（反応式 2）、酸素濃度が低いので取り込み型 Hup による水素吸収活性が抑えられる。Ar 気相下（数%程度の CO₂ を含む）での水素発生は、シアノバクテリア *Anabaena*, *Nostoc* 属の Hup 遺伝子破壊株を用いた実験では、光合成により発生する酸素の共存下で約 1 週間程度は持続させることができるが、窒素栄養が不足して細胞が弱っていくためか、水素発生速度は次第に低下していく傾向がみられる⁵⁾。

6.2.3.3 ガスクロマトグラフィー

検出器に TCD (thermal conductivity detector) を備えたガスクロマトグラフィー（ガスクロ）を用いる。ガスクロには、キャピラリカラム用とパックドカラム用があり、前者の分離能力は非常に優れているが、後者でも水素の分析を十分に行える。ガスクロに装着するガス分離カラムは、molecular sieve 5 A または molecular sieve 13 X を使用する（水素の分離に必要な時間は、molecular sieve 13 X の方が短い）。水素のみの検出を目的とする場合、キャリアーガスに窒素 (N₂) ガスを用いる。また、水素、酸素、窒素ガスを分離する場合、分離カラムに molecular sieve 5 A、キャリアーガスに Ar ガスを用いる。より純度の高いガスをキャリアーガスとし

て用いることで、検出感度を向上させることができる。キャピラリカラム用のガスクロ装置で、molecular sieve 5 A カラム、キャリアーガスに Ar ガスを用いて、水素、酸素、窒素ガスを分離した分析例を図 1 に示す。

6.2.3.4 実験方法

ここでは、嫌気操作の必要がなく、取り扱いが容易なヘテロシスト形成するシアノバクテリアを用いた水素発生の実験手順を紹介する⁵⁻⁷⁾。

1. ニトロゲナーゼを誘導するため、+N 培地 (BG11 または AA/8(+N)) で培養したカルチャーから細胞を遠心で集め、-N 培地 (BG11₀ または AA/8) で 1-2 回洗った後、細胞を新しい -N 培地に移す。その際、-N 培地中の細胞密度が高くなりすぎないようにする (細胞密度が高い光制限下では、ニトロゲナーゼが十分に誘導されないことがある)。
2. -N 培地中でのニトロゲナーゼ誘導に必要な時間は、株や培養条件により異なる。十分に誘導されていないカルチャーでは、水素発生が検出されないこともあるので、-N 培地に移して 1 日目、または必要に応じて 2 日目以降のカルチャーの一部を遠心で濃縮し、適当な濃度に調整する (*Anabaena*, *Nostoc* 株では、濃度 5 $\mu\text{g Chl/ml}$ 前後)。
3. 濃縮した細胞懸濁液を透明なガスクロサンプリング

用バイアル (容量約 7-10 ml 前後) に 1-2 ml 入れ、ゴム栓 (ブチルゴムまたは PTFE/Silicone 栓) をし、上部に穴のあいたスクリーキャップを閉める。ガスクロバイアルは、日電理化硝子や Sigma-Aldrich/Supelco などから購入できる。ブチルゴムまたは PTFE/Silicone のゴム栓は、耐久性、機密性に優れ、何回か針を刺してもガスが漏れることなく使用できる。

4. ガスクロバイアルのゴム栓に 2 本針を刺し、一方の針から Ar ガスを入れ、もう一方を出口として、バイアル内の気相に Ar ガスを通し (Ar ガスの流速にもよるが 5-10 分程度)、気相を Ar に置換する (図 2)。
5. 光照射下で、バイアル内の細胞懸濁液が十分懸濁されるように振とうさせながら、1 時間前後ブレインキュベーションする。
6. 再度、Ar ガスを通して (操作 4)、光照射下に置き、1-2 時間インキュベーションする。1-2 時間程度のインキュベーションであれば、CO₂ は必ずしも必要ないが、数時間~数日間にわたる場合、水素発生を持続させるために、ガスタイトシリンジを用いて CO₂ を加える必要がある。暗所で水素発生する生物の場合は、操作 5, 6 を暗所で行う。
7. バイアル内の気相からガスタイトシリンジで 0.5-1 ml (パックドカラム使用の場合) のガスサンプルを取

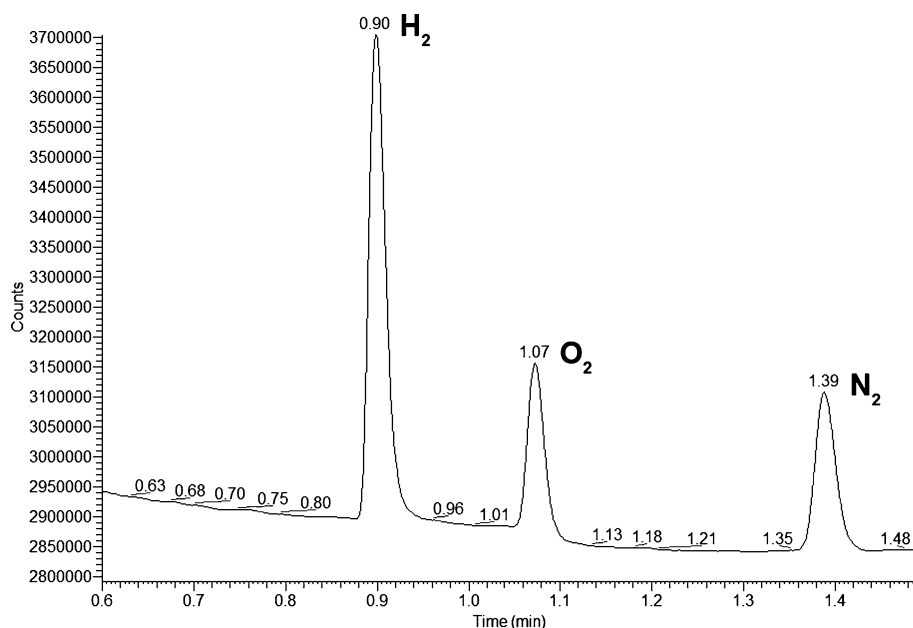


図 1: キャピラリカラム用ガスクロマトグラフィーによる水素、酸素、窒素ガスの分離

水素のピークは 9.4 nmol、ガスサンプル中の水素濃度は約 0.12% (v/v) に相当する。インキュベーション前に Ar ガスを約 10 分間通した場合でも、微量の酸素、窒素ガス (濃度 1% (v/v) 以下) が検出される。これは、(1) 光合成により酸素が発生する、(2) 微量の空気が Ar 置換時やガスタイトシリンジを用いたサンプリング時に残留・混入するためと考えられる。

ガスクロ装置本体: Trace GC Ultra (Thermo Scientific), Column: molecular sieve 5 A (Restec, 30m, 0.53mm ID), Sample size: 0.2 mL, Column temp.: 70°C, Carrier gas: Argon 10 ml/min, Detector: TCD.



図2：気相の Ar 置換

り，TCD を装備したガスクロに注入する（キャピラリーカラム使用の場合，注入量はこれよりも少量でよい（図1 参照））。

8. ガスサンプル分析の前後に，濃度調整された標準水素ガスを用いて校正し，検出した水素量を計算する（自動的に計算されるように機器設定する）。純水素ガスから適当な濃度の標準水素ガスを作成する場合， O_2 を含んだガスと混ぜると，一部が O_2 と反応して水になるおそれがあるので，必ず Ar または N_2 ガスを満たした容器内に純水素ガスを加えて希釈する。しかし，低濃度の正確な標準ガスが必要な場合には，ボンベ入りの標準ガスをメーカー（GL Sciences など）から購入し使用する。

6.3 ヒドロゲナーゼによる水素発生

一部の酸素発生型光合成生物（シアノバクテリア，緑藻）は，光照射下でヒドロゲナーゼによる水素発生を行うことがあるが，これは生理学的には，過剰な電子を水素として排出することにより細胞内が過度に還元的になるのを防ぐという意義があると考えられる。



この反応は，シアノバクテリアでは双方向性ヒドロゲナーゼ（bidirectional hydrogenase，通称 Hox）が，緑藻では Fe 型ヒドロゲナーゼ（可逆性ヒドロゲナーゼ（reversible hydrogenase）とも呼ばれる）が触媒する。

シアノバクテリアのヒドロゲナーゼ（双方向性 Hox および取り込み型 Hup）は，活性中心部位に鉄（Fe）とニッケル（Ni）を結合した NiFe 型に属し，双方向性 Hox の電子供与／受容体は $NAD(P)H/NAD(P)^+$ である。緑藻の Fe 型ヒドロゲナーゼの活性中心は Fe を含むが Ni を含まない Fe 型で，電子供与体はフェレドキシンである。Fe 型ヒドロゲナーゼは，嫌気性細菌や古細菌にも分布するが，シアノバクテリアには見られない。Fe 型ヒドロゲナーゼは，双方向性 Hox と比べて，代謝回転の速度が高く，電子供与体となるフェレドキシンは NADPH よりも酸化還元電位が低いので，水素生産にとって好都合だと考えられる。

ヒドロゲナーゼ反応（反応式 3）は可逆的であるため，光照射，酸素共存下で細胞内が酸化的になると，逆反応により水素を吸収する，または，ヒドロゲナーゼ活性が酸素により失活してしまうため，水素発生が短時間しか起こらない。一つの方法として，通常の光合成により有機物を十分蓄積させた後，暗所嫌気条件下に移し，ヒドロゲナーゼによる水素発生を発酵過程により起こすことができる¹⁰⁾。また，緑藻 *Chlamydomonas* では，通常の光合成による有機物の蓄積後，生育培地を硫黄欠乏培地に変えることにより，光照射，嫌気下で水素発生が起こる¹¹⁾。このメカニズムは，硫黄欠乏下で光化学系 II 活性が次第に低下していき，蓄積している有機物が主な電子供与体となって光化学系 I，フェレドキシン，ヒドロゲナーゼによる水素発生が起こり，光化学系 II より発生するわずかな酸素は有機物を消費する呼吸により消去されると考えられる。

上記のようなヒドロゲナーゼによる水素発生には，嫌気的条件が必要である。発生した水素は，ニトロゲナーゼの場合と同様に，一定時間蓄積させた後，ガスサンプルをガスタイトシリンジでとり，ガスクロで分析する。また， N_2 や Ar などのガスを低速で流し（lifting gas），ガス中の水素を分取または連続的に測定するという方法もある。

生理的条件下で水素発生が見られない場合でも，細胞懸濁液または細胞抽出物に嫌気下（Ar または N_2 ガス気相下）で sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$)（最終濃度 20 mM），methyl viologen（最終濃度 2 mM）を加えた還元的条件で，ヒドロゲナーゼによる水素発生が起こる。この方法で，双方向性または Fe 型（可逆性）ヒドロゲナーゼ活性を簡便に測定することができる¹²⁾。

参考文献

- 1) K. K. Rao & R. Cammack, Hydrogen as a Fuel — Learning from Nature, ed. R. Cammack, M. Frey, R. Robson, Taylor & Francis, 2001, p.201.
- 2) P. Tamagnini, R. Axelsson, P. Lindberg, F. Oxelfelt, R. Wunschiers, & P. Lindblad, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66** (2002) P.1.
- 3) S. Kumazawa & A. Mitsui, Biotechnol. Bioengineer. **44** (1994) P.854.
- 4) S. Kumazawa & H. Asakawa, Biotechnol. Bioengineer. **46** (1995) P.396.
- 5) T. Happe, K. Schütz, & H. Böhme, J. Bacteriol. **182** (2000) P.1624.
- 6) H. Masukawa, M. Mochimaru, & H. Sakurai, Appl. Microbiol. Biotechnol. **58** (2002) P.618.
- 7) H. Sakurai & H. Masukawa, Mar. Biotechnol. **9** (2007) P.128.
- 8) F. Yoshino, H. Ikeda, H. Masukawa, & H. Sakurai, Mar. Biotechnol. **9** (2007) P.101.
- 9) H. Masukawa, K. Inoue, & H. Sakurai, Appl. Environ. Microbiol. **73** (2007) P.7562.
- 10) P. C. Hallenbeck & J. R. Benemann, Int. J. Hydrogen Energy **27** (2002) P.1185.
- 11) A. Melis & T. Happe, Photosyn. Res. **80** (2004) P.401.
- 12) P. Tamagnini, O. Troshina, F. Oxelfelt, R. Salema, & P. Lindblad, Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997) P.1801.