

氏名	佐藤 剛			
学位の種類	博士 (理学)			
学位記番号	博甲第 214 号			
学位授与の日付	2017 年 3 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学位論文の題目	ヘテロシスト形成型シアノバクテリアと紅色光合成細菌における ニトロゲナーゼによる水素生産			
論文審査委員	主査	神奈川大学	教授	井上 和 仁
	副査	神奈川大学	教授	箸本 春 樹
	副査	神奈川大学	准教授	鈴木 祥 弘
	副査	東京工業大学	教授	久堀 徹

## 【論文内容の要旨】

本論文はヘテロシスト形成型シアノバクテリアと紅色光合成細菌における窒素固定酵素ニトロゲナーゼの副反応により生じる水素生成反応を利用した光生物学的な水素生産に関して、シアノバクテリアにおける代替ニトロゲナーゼであるバナジウム型ニトロゲナーゼによる水素生産、紅色光合成細菌の取り込み型ヒドロゲナーゼの不活化による水素生産性の増大、シアノバクテリアと紅色光合成細菌の培養層の二層化による水素生産に利用できる太陽光の波長領域の拡大についての研究を行った。以下、各章ごとにその要旨を記載する。

### 第 1 章 研究の背景

ここではまず、本研究の背景を示し、特に本研究の必要性を明確にした。

### 第 2 章 ヘテロシスト形成型シアノバクテリアにおける V 型ニトロゲナーゼを利用した水素生産

窒素固定酵素であるニトロゲナーゼの反応では  $N_2$  の還元に伴って、 $H^+$  の還元も起こり、必然的な副産物として水素が生産される。窒素固定能を持つ細菌は、中心金属にモリブデンを持つ Mo 型ニトロゲナーゼを普遍的に持つが、細菌種によっては Mo 型に加えて、中心金属がバナジウムに置き換わった V 型や中心金属が鉄だけから構成される Fe-only 型ニトロゲナーゼを持つものがある。 $N_2$  の還元と  $H^+$  の還元を利用される電子の配分比率はニトロゲナーゼの種類により異なっており、窒素固定に対する電子配分は Mo 型、V 型、Fe-only 型の順に高く、水素生産に対しては逆の順となる。第 2 章では、まず、Mo 型と V 型の二種類のニトロゲナーゼを持つ *Nostoc* sp. PCC 7422 株において Mo 型のサブユニットである NifH の遺伝子破壊株を作製した。この株は Mo 型が不活化されているが、それだけで V 型の発現は誘導されず、培地中に含まれる Mo を徹底的に取り除かなければ V 型が発現しない結果を得た。次いで、Mo 型のみを保有する *Anabaena* sp. PCC 7120 株から Mo 型のサブユニット遺伝子を除去し、さらに V 型の遺伝子を導入した株を作製した。この株は窒素固定が必要とされる生育条件で、V 型を発現し、水素を生産することを確認した。

### 第3章 紅色光合成細菌における取込み型ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊が水素生産性について与える影響

プロテオバクテリア門に属する細菌は、さらに、五つのサブグループに分類され、そのうち、 $\alpha$ -プロテオバクテリア、 $\beta$ -プロテオバクテリア、 $\gamma$ -プロテオバクテリアの三つのサブグループに光合成能を持つ種が分布し、これらを総称して紅色光合成細菌と呼ぶ。紅色光合成細菌の多くはニトロゲナーゼを持ち、窒素固定を行いながら水素も生産する。これまで、 $\alpha$ -や $\gamma$ -プロテオバクテリアに属する紅色光合成細菌を利用した水素生産については多くの研究があったが、 $\beta$ -プロテオバクテリアにおける研究は少なかった。本章では、 $\beta$ -プロテオバクテリアに属する *Rubrivivax gelatinosus* IL144 株を研究材料に、まず、ニトロゲナーゼにより生産された水素を再吸収する反応を触媒する取り込み型ヒドロゲナーゼ **Hup** を不活化した株を作製した。作製した株について水素生産性を評価し、**Hup** を不活化した株は親株に比較して約 30%程度の水素生産性が増大することを明らかにし、 $\beta$ -プロテオバクテリアに属する紅色光合成細菌を光生物学的な水素生産に利用できることを示した。

### 第4章 ヘテロシスト形成型シアノバクテリアと紅色光合成細菌を用いた積層バイオリアクターによる単位面積当たりの水素生産量の増大

紅色光合成細菌とシアノバクテリアでは光合成の電子供与体が異なり、シアノバクテリアは水を、紅色光合成細菌は乳酸やピルビン酸等の有機酸あるいは硫化水素などの無機硫黄化合物を電子供与体とする。光生物学的な水素生産では、資源量を考えた場合、シアノバクテリアが圧倒的に有利であるが、シアノバクテリアと紅色光合成細菌の特徴を組み合わせたシステムを構築することで光エネルギーの利用効率を高めることが期待される。シアノバクテリアは可視光(400 – 700 nm)を利用して光合成を行うが、紅色光合成細菌は可視光よりも長波長(~900 nm)の光を光合成に利用できる。本章では、バイオリアクターの二層化を図り、上層にシアノバクテリアの培養層、下層に、第3章で構築した *Rubrivivax gelatinosus* IL144 の **Hup** 破壊株の培養層を置き、水素生産に利用される太陽光の有効波長領域について検討した。培養濃度を様々に変え、水素の蓄積を追跡し、シアノバクテリアと紅色光合成細菌のバイオリアクターの積層により光エネルギーの利用効率を有意に高めることができることを実証した。

### 第5章 総合討論

本章においては前章までの研究を踏まえて、本研究の総括、議論を行っている。

## 【論文審査の結果の要旨】

近年、大気中の二酸化炭素を含む温室効果ガス濃度の上昇による気候変動への悪影響が懸念されており、化石燃料を代替する再生可能エネルギー資源の創出が望まれている。本研究は、シアノバクテリアと紅色光合成細菌のニトロゲナーゼによる光合成に依存した水素の生産を大規模かつ安価に生産するための基礎的な研究を行ったものである。特に、V型のニトロゲナーゼの活性のみで窒素固定と水素生産を行う改良株は、本研究によって初めて作製されたもので貴重である。また、 $\beta$ -プロテオバクテリアに属する紅色光合成細菌を光生物学的な水素生産に利用できることを示した点も意義深い。さらに、シアノバクテリアと紅色光合成細菌のバイオリアクターの積層により光エネルギーの利用効率を有意に高めることができることを実証した点も高く評価できる。

論文審査ではV型ニトロゲナーゼの発現を免疫染色で確認する必要があるとの指摘を受けた。この指摘は今後の課題であろう。いずれにしろ、シアノバクテリアと紅色光合成細菌のニトロゲナーゼにより生産される水素が光合成を利用した再生可能エネルギー資源として有望であることを実証した本研究は、関連する分野における先駆的な業績として高く評価される。

以上の理由により、審査員一同は一致して本論文の学術的価値を高く評価し、博士（理学）の学位論文として十分価値があると認定した。