

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03041

研究課題名（和文）海洋バイオ水素生成技術の革新に向けたマリンビブリオの分子育種基盤の構築

研究課題名（英文）Studies on hydrogen producing machineries of marine vibrios

研究代表者

澤辺 智雄（SAWABE, Tomoo）

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：30241376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：化石燃料代替エネルギー生産技術開発は、学術的・社会的要請が高い地球規模課題である。海洋バイオマスのエネルギー変換技術の開発もその一つであり、マリンビブリオ触媒による水素生成能の高度理解に向けて、バイオ水素生成マリンビブリオ全種の完全ゲノムの取得とそれを活用したHyf型FHLの構造予測および水素生成マリンビブリオ触媒の能力比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた研究成果は、マリンビブリオの主要水素生成マシナリーであるHyf複合体を精製し、構造機能相関のさらなる理解に活用し、海洋バイオ水素生成能の飛躍的な向上にフィードバックするための基盤的知見と技術の進展を進める。また、得られた知見は、二つのタイプのFHL複合体成立への道筋とComplex 1への分子共生進化への解釈にも活用できる。

研究成果の概要（英文）：New alternative energy production is one of the global issues toward sustainable future society. Marine bio-energy production is involved in this study area. We have studied characterization of marine hydrogen-producing vibrios using genome comparison and cellular physiological approaches.

研究分野：微生物学

キーワード：バイオ水素 マリンバイオマス 海洋微生物

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化・気候変動・原油価格急変など、エネルギー問題が地球環境や経済活動に比類なき影響を及ぼす時代になり、化石燃料代替エネルギーの開発は人類の生存基盤を保障する学術的および社会的要請の高い重要課題である。日本では、2014年に、新たなエネルギー基本計画が策定され、水素エネルギーの導入促進が盛り込まれた。再生可能エネルギー由来の余剰電力を水素化に向けた「Power to Gas 構想」や再生可能エネルギー由来のバイオ水素も水素社会に取り込む「HyGrid 構想」などが提案され、水素社会の形成に向けた研究開発が以前にもまして活発化している（NEDO 水素エネルギー白書, 2015）。日本では、脱炭素社会と原子力安全確保の情勢から、再生可能エネルギーの技術レベルと依存度の向上が期待される。地政学的観点から国土面積の制約と食料との競合が重荷となる陸上バイオマスのみではバイオ燃料の持続的供給は困難であり、海洋で生産されるバイオマスも最大限に利活用するための研究レベルと生産技術基盤を強固にしなければならない。国内では、平成30年に発生した北海道胆振東部地震による影響で北海道全域 295 万戸が電力を失う事態におちいり、エネルギーミックスの重要性と実現に向けた技術基盤の成熟が急務であることが再認識された。

このような経緯のもと、申請者は、塩分条件下においても、海洋バイオマスをバイオ水素やエタノールへと変換する海洋微生物触媒の探査を進め、極めてユニークなバイオ水素生成を行う2種の新規なマリネビブリオを見いだした。いずれのマリネビブリオともに、大腸菌では発現が乏しく機能解析が進まない Hyf 複合体が、ビブリオ科の海洋細菌群が活性を保持した状態で維持していることを見いだした（Matsumura et al., IJHE, 39, 7270, 2014; Matsumura et al., IJHE, 40, 9137, 2015）。この Hyf 複合体がマリネビブリオではアクティブであり、発酵的水素生成の主要マシナリーである。FHL 複合体は、ギ酸脱水素酵素、ヒドロゲナーゼおよび複数の電子伝達を担うタンパク質から構成される巨大な膜結合タンパク複合体であり、ギ酸の酸化により CO₂ を生成するとともに、同時に生成される H⁺ を、ギ酸から引き抜いた e⁻ を使って還元し、水素ガスを生成する触媒活性を担う。主として、大腸菌を含む通性嫌気性細菌の発酵的水素生成の主要マシナリーであるため、その生化学、生理機能、遺伝子構造は、100 年以上にわたり研究が進展し、高度に知見が蓄積している（McDowall et al., PNAS, E3948, 2014）。大腸菌では、ヒドロゲナーゼの抗原性と遺伝子構造が異なる FHL-1 および FHL-2 の二つの複合体が知られる。FHL-1 は、大腸菌で3番目に見いだされたヒドロゲナーゼ複合体を核とする Hyc 複合体で構成され、大腸菌の発酵的水素生成の主要マシナリーである。一方、4番目に見いだされた Hyf 型ヒドロゲナーゼ複合体をコードする FHL-2 システムは、大腸菌で遺伝子クラスターの確認がなされているものの、遺伝子発現が乏しく、機能未知のままである。Hyf は Hyc に比べ、膜貫通タンパク質サブユニットが3種類多い。FHL は、Complex I との構造類似性が指摘され、分子進化的研究には欠かせない。

水素生成能が高いマリネビブリオ株では、大腸菌の水素収率を凌ぐ。大腸菌では、海水存在下における発酵的水素生成は著しく低減するが、このマリネビブリオではそのようなことはなく、海洋バイオ水素の生成に適する海洋微生物触媒である。しかし、なぜマリネビブリオが活性型の Hyf 複合体を維持しているのか？その複合体の構造と特性は大腸菌の Hyc 複合体とどの程度異なるのか？Hyf 複合体の細胞内局在性・密度を効率的な水素生成と関連づけられるのか？海洋バイオマスの完全水素化に必要な知見であるが、活性型 Hyf の精製が障害となり、達成されないままである。

2. 研究の目的

エネルギー問題が地球環境や経済活動に比類なき影響を及ぼす時代になり、化石燃料代替エネルギー生産技術開発は、引き続き人類の生存基盤を保障するより学術的・社会的要請が高い地球規模課題である。我が国でも、陸海由来のバイオマスのエネルギー変換技術開発を推進されてきたが、海洋バイオマスはアルギン酸やガラクトンなど難燃料化成分を多く含むため、その完全変換に向けさらなる新機軸が必要である。申請者は、高塩分条件下においても、海洋バイオマスをバイオ水素やエタノールへと変換する海洋微生物触媒の探査を進め、極めてユニークなバイオ水素生成を行う2種の新規なマリネビブリオ (*Vibrio tritonius* および *Vibrio aphrogenes*) を見いだした（Sawabe et al., Frontier Microbiol, 4, 414, 2013; Tanaka et al., PLoS One, 12, e0180053, 2017）。*V. tritonius* は褐藻類の主要糖質の一種（マンニトール）を基質とし、理論モル収率の75%の水素と約2% (v/v) に達するエタノールを生成することができる。この細菌を用いることで、海藻を原料とした5Lリアクターを用い、プラクティカルな水素生産を達成した（Matsumura et al., 2014）。これに加え、連続的水素生産（約22L/10Lリアクター/日）やギ酸を介したアルギン酸からの水素生産も可能にした。さらに、本菌の完全ゲノム解析を達成し（Matsumura et al., 2015）、このマリネビブリオが Hyf 複合体を用いて発酵的水素生成を行っていることを明らかにした（Matsumura et al., 2014; 2015）。したがって、*V. tritonius* が活性型の Hyf を保有していることは、100 年以上続く FHL を対象とした研究に、新たな一石を投じる知見である。それと同時に、海

洋微生物に秘められている水素生成マシナリーの多様性と独特さも示すものでもある。さらに、ピブリオは Complex I をもたず、その生息海洋環境を反映する Na⁺輸送型 NADH:キノンオキシドレダクターゼ (Na⁺-Nqr) が呼吸鎖の主要マシナリーであるが、*V. tritonius* は Complex I に構造的類似性をもつアクティブな Hyf と Nqr の両者を有する初めてのマリンピブリオである。*V. aphrogenes* はアルギン酸から水素を直接生成可能な初めての海洋細菌である (Tanaka et al., 2017)。アルギン酸は酸化度の高い多糖であり、その代謝過程において還元力とエネルギーの消費を伴うため、還元度の高いバイオ燃料物質の生成には向かないと考えられていた。

そこで、本申請課題では、これらのユニークなマリンピブリオが保有する活性型 Hyf 複合体の特徴を理解し、多彩な海洋バイオマスからのより効率的な水素生成が可能な海洋微生物触媒の構築にフィードバックさせることを目的とする。

3. 研究の方法

マリンピブリオの主要水素生成マシナリーである Hyf 複合体の構造機能相関の理解を通じて、海洋バイオ水素生成能の飛躍的な向上にフィードバックするための基盤的知見と技術の集積を行った。特に、1) バイオ水素生成マリンピブリオ全種の完全ゲノムの取得とそれを活用した構造予測など、および 2) 水素生成マリンピブリオ触媒の能力比較のための種々の細胞生理学的実験を行った (Tanaka et al., Environ. Microbiol., 22:3205, 2020; Jiang et al., Cur. Microbiol., 79:10, 2022a; Matsumura et al., Cur. Microbiol. 79:360, 2022; Jiang et al., Front. Mar. Sci., 9:844983, 2022b; Jiang et al., Environ. Microbiol., 24:4587, 2022c)。

4. 研究成果

化石燃料代替エネルギー生産技術開発は、学術的・社会的要請が高い地球規模課題である。海洋バイオマスのエネルギー変換技術の開発もその一つであるが、アルギン酸などの難燃料化成分が多く、その完全変換にはさらなる技術革新が必要である。我々が見いだした新規マリンピブリオは、Hyf 複合体を核とするギ酸水素リアーゼ (FHL) 複合体を介した独特の水素代謝を示し、海藻由来の種々の糖を水素化する。しかし、マリンピブリオ触媒の水素生成能を高める分子育種基盤の構築は発展途上であり、海洋バイオ水素生産性向上のボトルネックでもある。Hyf 複合体の分子レベルで特徴を理解するためには、マリンピブリオは恰好の生物材料であるため、本研究では、マリンピブリオが有する活性型 Hyf 複合体の特徴を理解し、多彩な海洋バイオマスからのより効率的な水素生成が可能な海洋微生物触媒の構築にフィードバックさせる知見を得ることを目的に研究を進めた。その結果以下の成果を得た。

1) バイオ水素生成マリンピブリオ全種の完全ゲノムの取得とそれを活用した Hyf 型 FHL の構造予測

水素生成能が観察されているほぼ全種を含む 17 種のピブリオ科細菌の完全ゲノムを取得した (Tanaka et al., 2020; Jiang et al., 2022; Matsumura et al., 2022; Jiang et al., 2022a; 2022b; 2022c)。得られた完全ゲノムを活用した多面的な比較を行い、1) FHL の遺伝子構造に基づき、複数のタイプに分かれることを明らかにした、2) FHL 複合体などに関連する 21 遺伝子の配列に基づき FHL とピブリオ科の系統は平行進化してきたことが示唆され、ピブリオ科の共通祖先は *hyf* 型 FHL を保有していたものと推察された、3) *Photobacterium* 属では FHL 複合体遺伝子群の様々な領域で転移が生じていることを明らかにした、4) ピブリオ科ではギ酸脱水素酵素の構造類似性が高く、水素生成能の差異を生じさせるものとは考えられなかった、および 5) Hyf 型 FHL の全体構造予測を進め 8 割程度の構造予測結果を得た。

2) 水素生成マリンピブリオ触媒の能力比較

水素生成マリンピブリオ触媒の能力比較のための細胞生理学的実験を行い、1) 水素生成が確認された 16 種について、Glc を基質とした場合の水素生成プロファイルを調べ、Porteresiae のクレードの水素生成種における高いギ酸の生成および再取り込み能が、マリンピブリオの水素生成能と関連することを示唆した、2) プロトノフォアを用いた *V. tritonius* の細胞生理学実験を立ち上げ、ある種のプロトノフォアで細胞内のギ酸塩漏出に伴うと考えられる水素生成現象を観察した、3) 1 細胞当たりのギ酸取り込み能と水素生成能を測定する細胞生理学実験手法の基盤を構築することに成功し、*V. tritonius* において 1 細胞当たりの水素生成能を初めて見積もることに成功した、4) Porteresiae クレードの 2 種のマリンピブリオについて、解糖系を介さない基質からの水素生成において、FHL 遺伝子群の発現に及ぼす影響を調べ、解糖系を介した還元力生成の必要性を示唆した。

これらの成果は、マリンピブリオの主要水素生成マシナリーである Hyf 複合体を精製し、構造機能相関のさらなる理解に活用し、海洋バイオ水素生成能の飛躍的な向上にフィードバックするための基盤的知見と技術の進展を進める。また、得られた知見は、二つのタイプの FHL 複合体成立への道筋と Complex I への分子共生進化への解釈にも活用する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chunqi Jiang, Mami Tanaka, Sayo Nishikawa, Sayaka Mino, Jesus L Romalde, Fabiano L Thompson, Bruno Gomez-Gil, Tomoo Sawabe	4. 巻 79
2. 論文標題 Vibrio Clade 3.0: New Vibrionaceae Evolutionary Units Using Genome-Based Approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-021-02725-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Chunqi Jiang, Sayaka Mino, Tomoo Sawabe	4. 巻 9
2. 論文標題 Genomic Analyses of Halioticoli Clade Species in Vibrionaceae Reveal Genome Expansion With More Carbohydrate Metabolism Genes During Symbiotic to Planktonic Lifestyle Transition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontier in Marine Science	6. 最初と最後の頁 844983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2022.844983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mami Tanaka, Daiki Kumakura, Sayaka Mino, Hidetaka Doi, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Isao Yumoto, Man Cai, Yu-Guang Zhou, Bruno Gomez-Gil, Toshiyoshi Araki, Tomoo Sawabe	4. 巻 22
2. 論文標題 Genomic characterization of closely related species in the Rumoiensis clade infers ecogenomic signatures to non-marine environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 3205-3217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1462-2920.15062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsumura Yuta, Kazumich Sato, Chunqi Jiang, Sayaka Mino, Tomoo Sawabe	4. 巻 79
2. 論文標題 Comparative physiology and genomics of hydrogen-producing vibrios	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-022-03065-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chunqi Jiang, Hisae Kasai, Sayaka Mino, Jesus L. Romalde, Tomoo Sawabe	4. 巻 24
2. 論文標題 The pan-genome of Splendidus clade species in the family Vibrionaceae: Insights into evolution, adaptation, and pathogenicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 4587-4606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.16209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 JIANG Chunqi, MINO Sayaka, SAWABE Tomoo
2. 発表標題 The pangenome of Halioticoli clade in Vibrionaceae
3. 学会等名 令和2 年度日本水産学会 北海道支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川 紗代, 美野 さやか, 澤辺 智雄
2. 発表標題 マリンビブリオにおけるギ酸水素リアーゼ複合体遺伝子構造の進化と水素生成
3. 学会等名 2020年度 日本農芸化学会北海道支部 / 第50回 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川紗代・田仲真実・美野さやか・澤辺智雄
2. 発表標題 水素生成ビブリオGazogenesクレードのゲノム比較
3. 学会等名 第53回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川紗代・田仲真実・美野さやか・澤辺智雄・小椋義俊・林哲也
2. 発表標題 水素生成マリンビブリオのギ酸水素リアーゼ (FHL) 複合体遺伝子群の構造比較
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 SAWABE Tomoo
2. 発表標題 Hydrogen production of marine vibrios: recent progress
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤吉裕・美野さやか・澤辺智雄
2. 発表標題 代謝経路の異なる基質がマリンビブリオの水素生成に及ぼす影響
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 遥・美野さやか・澤辺智雄
2. 発表標題 マリンビブリオの水素生成マシナリーの理解：ギ酸脱水素酵素遺伝子群の多様性
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 JIANG Chunqi, MINO Sayaka, and SAWABE Tomoo
2. 発表標題 Pangenome of Splendidus clade in the family Vibrionaceae reveals core gene sets acting as a marine animal pathogen
3. 学会等名 令和4年度マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tomoo Sawabe, A.K.M. Rohul Amin, Sayaka Mino	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 8
3. 書名 Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria; Thaumasiovibrio	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	美野 さやか (MINO Sayaka) (00755663)	北海道大学・水産科学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------