

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380129

研究課題名（和文） マリンビブリオを活用した海藻糖質のバイオエタノール変換技術プラットフォームの構築

研究課題名（英文） Establishment of A Marine Vibrio Platform in The Bioconversion of Seaweed Carbohydrates to BioEthanol

研究代表者

澤辺 智雄（SAWABE TOMOO）

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：30241376

研究成果の概要（和文）：

再生可能な新エネルギーの開発に向けて、海洋バイオマス由来のバイオ燃料の開発は技術基盤の成熟が待たれている。本研究では、海藻糖質を基質にバイオエタノール生産能を示す2種類のマリンビブリオに着目し、これら海洋細菌が有する海藻糖質の発酵代謝系の再構成、各酵素遺伝子の機能解析及びそれら遺伝子群の網羅的解析を実行し、マリンビブリオを活用した海藻糖質のバイオエタノール変換技術プラットフォームの構築を進めた。

研究成果の概要（英文）：

In maintaining a sustainable ecosystem in this period of global warming, development of key technologies in the field of renewable energy sources has become an important challenge; a method of biofuel production from marine biomass could be one of the most crucial technologies in the future. In this study, we investigated genome wide metabolic pathway prediction, functional analysis of the genes responsible for the alginate degradation and ethanol production, and the transcriptomic analysis in two unique marine vibrios, both of which are capable of producing bioethanol from seaweed carbohydrates. We successfully reconstructed the metabolic pathway with functional and transcriptomic information as a marine vibrio platform.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
一年度	—	—	—
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：代謝・酵素、バイオ燃料

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や原油価格の急激な変動によりエネルギーをめぐる問題は、今まで以上に地球環境や経済活動に大きな影響を与えて

いる。化石燃料の代替エネルギーを開発することは、人類の生存基盤を保障する学術的及び社会的要請が高い重要な課題である。化石燃料の燃焼によるCO₂の放出を抑制し、地球

温暖化の防止に資するべく、CO₂ 吸収能を持つ生物（例えば穀物、草本、廃木材）由来の炭水化物や脂質をバイオ燃料化する夥しい数の研究が世界中で展開している（Bioenergy, ASM press, 2008）。しかし、例えばトウモロコシを原料とするバイオエタノールは、人類の主食となる食糧との競合による経済的不安定要因ともなるなど、主食と競合しないバイオ燃料源を見いだすことが重要な課題となっている。日本では「バイオマス・ニッポン総合戦略」が策定され、温室効果ガスの削減を具体的な目標とし、次世代に豊かな資源と美しい環境に恵まれた地球を残す取り組みを始めている。これに伴い、日本では廃木材や海藻が主食と競合しないバイオマスとして注目され、植物セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産プロジェクトが（財）地球環境産業技術研究機構や神戸大学などで進展している。

このような状況下で、研究代表者は科学研究費補助金や水産庁所管の研究プロジェクトを通じて、高塩分条件下でも、海藻糖質から 1%程度のエタノール産生能を持つ 2 種類のマリンビブリオを見いだした（澤辺、2011：発表論文の項参照）。一つはアワビの消化管から見いだした *Vibrio halioticoli* でありマンニトールを発酵源として 0.8%のエタノール生産を達成している。この細菌はエタノール発酵能に加え、少なくとも 6 種類のアルギン酸リアーゼを持つ新規なマリンビブリオである（IJSB 48:573, 1998; Mar. Biotechnol. 2: 65, 2000）。もう一つは *Vibrio* sp. AM2 株である。これはアメフラシの消化腺から見いだされた新種の細菌で、*V. tritonus* と命名した（澤辺、2011）。この細菌はマンニトールを基質とした場合、回分培養で最大で 1.2%のエタノール生産を達成している。また、マリンビブリオでは珍しく、発酵過程で多量のガスを産生する特異な代謝を持っている。申請時には、海藻糖質からのエタノール生産に成功した研究例はなく、本研究課題は日本がイニシアティブをとることができるものである。しかし、現在までの研究代表者の一連の研究では、単一の化学物質をエタノール発酵源に用いているだけであるため、多種多様な化学物質を含む海藻やその他の海洋バイオマス資源をバイオ燃料に変換するためには、10 段階にも及ぶ複雑なエタノール発酵代謝の最適なバランスを理解する研究基盤、すなわち「マリンビブリオによる海藻糖質のバイオエタノール変換技術プラットフォーム」を構築することが必須であると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

バイオ燃料生産性を飛躍的に向上させるためには、有望な微生物の代謝を、ゲノム解

析、遺伝子発現解析そして代謝関連酵素の機能解析により総合的に理解する「微生物変換技術プラットフォームの構築」を行わなければならない。特に、海藻糖質を発酵的に代謝する過程における関連酵素遺伝子の発現バランスを変化することが重要となる。

微生物による発酵は 10 段階にも及ぶ数多くの代謝過程を経る複雑な生化学反応である。また、申請者が考える海洋バイオマスのバイオ燃料化研究の最終段階では、単一の発酵源ではなく、より複雑な成分が混在する海洋生物材料を原料とするため、これらがバイオエタノール生産に及ぼす影響を十分に理解する必要がある。

海藻に含有される糖質として、6 炭糖を骨格とした主として 3 つの形態のものがある。グルコースに代表されるアルドース、この 6 位が還元されたマンニトールを代表とする糖アルコール及び同 6 位がカルボキシル基に酸化されたアルギン酸を代表とするウロン酸である。マリンビブリオではこれらの異なる化学形態の糖質を代謝しエタノール発酵する遺伝子セットは持つと予想されるものの（例えば Nature 406:477, 2000）各反応を進める酵素遺伝子の発現バランス及び各代謝反応の化学平衡は代謝される糖質の酸化還元度に大きく依存する。例えば、研究代表者の知見では、マンニトールを代謝させた場合には、細胞内に取り込まれたマンニトールはマンニトール 1 リン酸 5-脱水素酵素の作用でフラクトース 6 リン酸に触媒される過程で大きな還元力 (NADH) を発生させ、還元度の高い発酵産物であるエタノールの生成量が増加するのに対し、アルギン酸の代謝では、取り込み時に還元力が消費されエタノール生成反応には傾かない。

そこで、本研究課題では、グルコース、糖アルコール、ウロン酸及びそれらポリマーの「取り込み」から「エタノール発酵」に至る全ての代謝遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析、発現タンパク質の生化学的性状の解明及び各遺伝子の発現バランスの解析を行い、マリンビブリオが海藻糖質をバイオエタノール変換する経路を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

①マリンビブリオのエタノール及びバイオ水素の生成に関連する遺伝子群の決定：海藻糖質がエタノールやバイオ水素に物質変換される過程でマリンビブリオは 3 種類の主要な糖代謝系を利用すると考えられる。それらは、Embden-Meyerhof 経路 (EMP)、Entner-Doudoroff 経路 (ED) 及びペントースリン酸経路 (PP) で、ありそれぞれ 5-6 段階の生化学的反応を経て、ピルビン酸に至る。ピルビン酸を中心とした「ピルビン酸ノー

ド」から、乳酸、ギ酸、酢酸、エタノールなどの有機酸やアルコールが生成される代謝が始まる。さらにギ酸からは水素が生成される。この複雑な代謝系の全貌解明が「マリンビブリオのバイオエタノール生産プラットフォーム」の構築に直結することになる。そのため、本研究では「ゲノム支援」も受けながら、当初目的としていた研究対象細菌である *V. halioticoli* と *V. tritonius* の2種類のマリンビブリオの全ゲノム配列解析を行った。両細菌由来の染色体 DNA を抽出精製後、ロシュ 454 ゲノムシーケンサープラットフォームにより、ドラフトゲノム配列を得た。また、*V. tritonius* ではサンガー法によりギャップを閉じた後、イルミナシーケンサープラットフォームにて配列修正を行った。この塩基配列を基に、自動アノテーション

(MiGAP) を行った後、生命システム情報統合データベースである KEGG 及び BLAST を用いて代謝系の全貌推定を行った。

②マリンビブリオが有する海藻多糖分解及びバイオ燃料生成に関与する遺伝子産物の酵素化学的性質：前項のゲノム解析で見いだされたアルギン酸分解酵素、エタノール生成に関与するアルコール脱水素酵素に類似性が高い遺伝子に関して、大腸菌細胞を用いた発現系を構築し、その機能を調べた。本実験では、大腸菌細胞で発現した組換えタンパク質の検出が in gel 染色で可能な Lumio ベクター (インビトロジェン) を用いた。また、アルギン酸分解酵素活性は透明帯形成法あるいは TBA 法で行った。ADH 活性の測定は、エタノールの酸化で生じる NADH の上昇を 340 nm の波長の吸光値でモニタリングすることにより行った。

③マリンビブリオにおける海藻糖質からのエタノール及びバイオ水素生成過程における網羅的遺伝子発現解析：2 種のマリンビブリオのエタノール発酵代謝関連遺伝子の取得と機能解析に続いて、グルコース、糖アルコール、ウロン酸及びそれらのポリマーを単一の発酵源にした場合において、全代謝遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法と比較した。

4. 研究成果

①マリンビブリオのバイオエタノール生成代謝系の推定：全ゲノム塩基配列から予想された2種類のマリンビブリオの「ハイブリッド代謝系」を図2に示した。従属栄養細菌に見られる一般的な糖の中央代謝系 (EMP、ED 及び PP)、TCA サイクル、発酵代謝系 (乳酸、ギ酸、酢酸、エタノール) が再構成された。これに加え、海藻糖質の分解や輸送系として、マンニトールのフォスフトランスフェラ

ーゼシステム、アルギン酸分解酵素及びアルギン酸分解物の細胞内輸送に関与すると考えられるタンパク質遺伝子が見いだされた。興味深いことに、*V. halioticoli* では①高級アルコールの一種であるブタノールの生成経路で機能する酵素遺伝子群及び②15 種にもおよぶアルギン酸分解酵素様遺伝子が、*V. tritonius* では①大腸菌の *hyf* オペロンに類似したギ酸水素リアーゼ遺伝子群、②19 種に及ぶアルコール脱水素酵素の存在が見いだされ、本研究の解析対象としたマリンビブリオは海藻糖質からのバイオ燃料生産に機能する独特な遺伝子を保有していることが示唆された。現在、さらに 15 種におよぶマリンビブリオのドラフトゲノムデータ (H22 及び H24 ゲノム支援) も得ており、その解析を進めている。

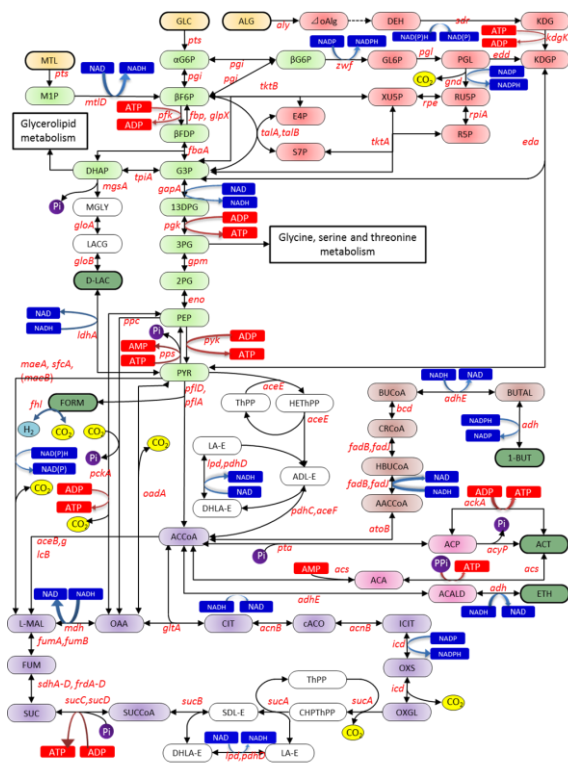


図2. マリンビブリオの全ゲノム配列に基づき構成した主要な海藻糖質の代謝経路。

②海藻糖質の分解及びエタノール発酵に関与する遺伝子産物の酵素化学的特徴：海藻糖質の分解酵素では、*V. halioticoli* のドラフトゲノム配列に基づき見いだされた 15 種のアルギン酸分解酵素様遺伝子を、大腸菌細胞を用いてクローニングとタンパク質発現解析を行い、その中で9種類がアルギン酸分解酵素として機能することを明らかにした。また、その中で、7種類の遺伝子産物は、大腸菌の菌体外に分泌され、2種類は細胞質内で発現していた。さらに、菌体外分泌タイプの酵素のほとんどがポリグルロン酸ブロック特異的であると考えられ、本菌が複数のアルギン酸分解酵素システムを有することが明らか

かになった。

V. tritonius は、*V. haliotocoli* と比較しエタノールの生産能が1.5倍近く高いため、そのアルコール脱水素酵素 (ADH) 遺伝子のタンパク質発現を進め、その特徴を調べることとした。その結果、NAD(P)依存性を示す19種類のADH遺伝子の中で、この中で、4種は亜鉛イオン依存性の長鎖ADHが属するグループ1酵素、15種は金属イオン依存性のポリオール脱水素酵素(グループ3)と分類された。グループ2の酵素は見いだされず、グループ3酵素の多様性が高いことは *V. haliotocoli* (グループ1、2及び3がそれぞれ2、4及び5遺伝子) と異なる点であった。また、大腸菌(グループ1、2及び3がそれぞれ4、0及び5遺伝子)や *Zymomonas mobilis* (グループ1、2及び3がそれぞれ2、0及び2遺伝子)と比較しても、*V. tritonius*のADHは多様であった。さらに、この中で5種の遺伝子を可溶性タンパクとして発現させることができ(図3)、1種類のHLADH類似酵素は既報の組換えHLADHよりも高い非活性を示すことを示唆した。

③アルギン酸及びマンニトール代謝時におけるマリンビブリオの網羅的遺伝子発現：*V. haliotocoli* のマンニトール及びアルギン酸代謝過程に関連する50近くの遺伝子(図1)について網羅的な遺伝子発現パターンを調べることに成功した。特にユニークな発見を以下に挙げる；マンニトールを代謝している細胞では、①マンニトールのPTSによる輸送と輸送後のマンニトール1リン酸の酸化反応で働く遺伝子群が対照(Glc)に比べ5倍以上の上方発現を示し、②EM経路の25%以上の遺伝子が2倍以上の発現を示し、③数種のアルコール脱水素酵素遺伝子が2倍以上の上方発現を示した。さらに、本菌のアルギン酸代謝過程においては、前項で酵素活性を有する

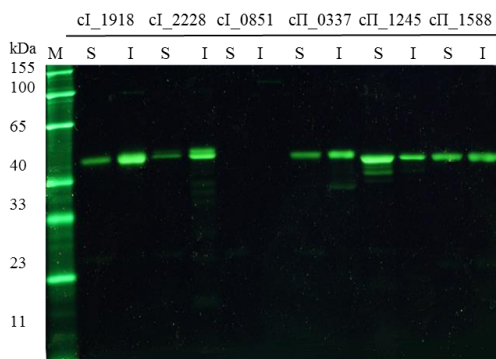


図3. マリンビブリオのADH遺伝子の発現。N末端に Lumio tagを融合させ、各ADHの発現を観察した。可溶性画分に発現したのはtAM2_cl_1918 (FucOとのアミノ酸相動性:59%)、tAM2_cl_2228 (HLADH:48%)、tAM2_cPI_0337 (YqhD:61%)、tAM2_cPI_1245 (YqhD:52%)及びtAM2_cII_1588 (Bdh:59%)の5種類であった。tAM2_cl_0851 (AdhE-78%)の発現は検出されなかった。M:マーカー。

ことが確認された菌体内酵素及び細胞内に取り込まれた不飽和アルギン酸由来ウロン酸の還元を触媒すると考えられる酸化還元酵素遺伝子が4倍以上に上方発現していた。

また、*V. tritonius*では、ギ酸水素リアーゼの構成に必要なヒドロゲナーゼの大サブユニットをコード遺伝子の発現解析を行ったところ、pH依存的に発現量が高くなったことから、これが本菌の水素生成の鍵酵素であることを示した。さらにこの遺伝子クラスターがオペロンである可能性を実験的に示した。

以上、本研究を通して海藻糖質からエタノールやバイオ水素を生成可能なマリンビブリオのエタノール発酵代謝関連遺伝子セットに加え、バイオ水素生成に関与する遺伝子クラスターなど数々のユニークな遺伝子資源を見出すことができた。これらは、海洋バイオマスのバイオ燃料化研究および産業育成で貴重な財産となるであろう。現在、この結果を基に、海藻糖質から効果的にバイオ燃料を生成するマリンビブリオの代謝改変に着手している。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計14件)

①佐藤一道・澤辺智雄、Characterization and practical application of hydrogen producing marine vibrios、平成25年3月18日、日本細菌学会総会、幕張メッセ(千葉市)、招待講演

②佐藤一道・澤辺智雄・他6名、マリンビブリオの持つ水素生産能の比較解析、第6回細菌学若手コロッセウム、平成24年8月8日~10日、八王子セミナーハウス(東京都)

③T.Sawabe、Toward the creating marine microbial cell factory for biofuel production、9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference、平成24年7月13日~16日、高知市文化プラザカルポート(高知市)

④K.Kuga・T.Sawabe・他8名、Gene expression in *Vibrio haliotocoli* during mannitol metabolism、9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference、平成24年7月13日~16日、高知市文化プラザカルポート(高知市)

⑤Y.Matsumura・T.Sawabe・他5名、Molecular Characterization of gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius*、9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference、平成24年7月13日~16日、高知市文化プラザカルポート(高知市)

⑥K.Sato・T.Sawabe・他6名、Comparison of

hydrogen productivity among marine vibrios, 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 平成 24 年 7 月 13 日~16 日、高知市文化プラザカルポート (高知市)

⑦Y. Matsumura・T. Sawabe・他 5 名、Hydrogen evolution of *Vibrios tritonius* sp. nov., Vibrio2011, 平成 23 年 11 月 2 日、サンチャゴ・デ・コンポステラ大学 (スペイン)

⑧T. Sawabe・他 2 名、Diversity of vibrios possessing gas metabolism, Vibrio2011, 平成 23 年 11 月 2 日、サンチャゴ・デ・コンポステラ大学 (スペイン)、招待講演

⑨松村佑太・澤辺智雄・他 5 名、*Vibrio tritonius* の水素生成遺伝子群の構造、日本水産学会秋季大会、平成 23 年 9 月 29 日、長崎大学水産学部 (長崎市)

⑩T. Sawabe・他 5 名、*Vibrio tritonius* sp. nov., a novel hydrogen-producing vibrio isolated from the gut of sea hare, IUMS2011, 平成 23 年 9 月 7 日、札幌市コンベンションセンター (札幌市)

⑪川原佳子・澤辺智雄・他 6 名、水素及びフオスファーゲンが *Vibrio halioticoli* の海藻糖質エタノール発酵に与える影響、日本水産学会秋季大会、平成 22 年 9 月 23 日、京都大学・吉田キャンパス (京都市)

⑫澤辺智雄、マリンビブリオを活用した海藻糖質のエタノール発酵、日本マリンバイオテクノロジー学会、平成 22 年 5 月 30 日、広島大学・東広島キャンパス (東広島市)、招待講演

⑬若林敬史・澤辺智雄・他 7 名、海藻糖質をエタノール-水素発酵するビブリオの種同定、日本水産学会春季大会、平成 22 年 3 月 28 日、日本大学・藤沢キャンパス (藤沢市)

⑭澤辺智雄、Ethanol fermentation of seaweed carbohydrates by marine vibrios, Vibrio2009, 平成 21 年 11 月 6 日、リオデジャネイロ連邦大学 (ブラジル)、招待講演

[図書] (計 1 件)

①澤辺智雄、マリンビブリオを活用した海藻からのエタノール生産、海藻バイオ燃料、CMC 出版、pp. 117-128, 2011

[その他]

(1) テレビ報道、UHB スーパーニュース、平成 23 年 7 月 5 日

(2) 受賞

①KIOST Excellent Award, 2012, 9th APMBK Kochi (受賞対象者: 高峰)

②若手奨励賞、2012、細菌学若手コロッセウム、八王子 (受賞対象者: 猪原悠太郎・佐藤一道)

③大会会長賞、2011、日本マリンバイオテ

クノロジー学会、静岡 (受賞対象者: 松村佑太)

(3) 公開シンポジウムなどでの発表

①澤辺智雄、ゲノムから探る海洋微生物のバイオマス燃料生産ポテンシャル、次世代ゲノム科学の最前線 (文部科学省 科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」公開シンポジウム)、平成 25 年 2 月 19 日、京都大学芝蘭会館 (京都市)

②T. Sawabe 他 6 名、Toward the creating marine microbial cell factory for biofuel production, International Symposium on Genome Science (文部科学省 科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」国際シンポジウム)、平成 25 年 1 月 9-10 日、東京大学伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール (東京都)

③澤辺智雄、海洋微生物を活用したバイオマス燃料変換技術の創成、生命科学・医学の発展を支える研究基盤の未来 (文部科学省新学術領域研究「生命科学系 3 分野支援活動(がん、ゲノム、脳) 合同シンポジウム)、平成 24 年 7 月 6 日、東京ステーションコンファレンス (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤辺 智雄 (SAWABE TOMOO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 30241376

(2) 研究分担者

尾島 孝男 (OJIMA TAKAO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 30160865

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号: 70435832

(H21: 研究分担者)