

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658172

研究課題名(和文) バイオマス燃料生産に適する最少遺伝子セットを持つマリンビブリオセルの創成

研究課題名(英文) Creation of marine vibrio cells with minimum gene sets for efficient biofuel production

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

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マリンビブリオに着目し、トランスクリプトーム、代謝産物解析、および合成生物学的代謝改変技術を導入し、バイオマス燃料生産に適する最少の遺伝子セットを持つビブリオセルの創成を行った。

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 performed global transcriptome, fermentation product profiling, and metabolic engineering to design marine vibrio cells with efficient ethanol production from marine biomass.

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 マリンビブリオ 海洋微生物 アルギン酸 代謝改変 バイオエタノール

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っている。化石燃料に代わるエネルギーの開発は、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、廃木材や海藻など、主食と競合しないバイオマスのエネルギー変換技術の開発研究が活発化し、(財)地球環境産業技術研究機構、京都大学、神戸大学などで研究が進展している。しかし、海洋バイオマスのバイオマス燃料変換に関する技術開発は、水産庁と申請者の共同研究グループ、あるいは東北大学で進められているが、効率的生産に向けた微生物の分子育種技術に関する基盤的知見は極めて少ないのが現状である。

このような状況下で、申請者は文部科学省所管の科学研究費補助金基盤研究、水産庁所管の研究プロジェクト、および民間の研究支援を受け、高塩分条件下で海藻の糖質を発酵し、エタノールやバイオ水素など直接的に燃料となる物質だけではなく、メタンや水素前駆物質を生産可能なマリネビブリオを見いだした。さらに、文科省・新学術領域研究『生命科学系3分野支援活動』のゲノム支援活動にも採択され、これらマリネビブリオの全ゲノム解析研究を進展させている。

自己組織化や自己複製に關与する最少遺伝子セットを持つ細胞(ミニマムセル)の創成は、生物学の最終目的である。システム生物学や合成生物学と呼ばれる新領域が誕生しているほどである。しかし、海洋微生物を対象としたミニマムセルの創成は行われていないのが現状である。このような背景から、バイオマス燃料生産に適する最少の遺伝子セットを持つビブリオセルの創成に挑戦する研究を着想した。

2. 研究の目的

陸上バイオマスや淡水に依存しないバイオマス燃料の生産として、海洋バイオマスの燃料変換技術基盤の効率化が喫緊の課題である。申請者は科学研究費や他省庁所管の国策プロジェクトの研究費支援を受け、海藻特有の糖質をバイオエタノールやバイオ水素に変換するマリネビブリオを見だし、バイオマス燃料生産の最適化と全ゲノム配列に基づく代謝系の予測を可能とした。

しかし、より効率的にバイオマス燃料を生産するためには「マリネビブリオの細胞(すなわちセル)の中で淀みなく流れる代謝経路の予測」と「この流れを阻害する代謝を破壊したセルを用いた実測」が必要である。本研究課題は、バイオマス燃料生産に適する最少の遺伝子セットを持つマリネビブリオセル(ミニマムセル)の創成を目的とした挑戦的な研究である。

ビブリオは混合有機酸発酵代謝系を持ち、

10段階以上の複雑な生化学反応を経て、糖の取り込みからバイオ燃料あるいはその前駆物質を生産する。本研究では、エタノールの生産に最適な代謝経路の推定と遺伝子組換えによる実証を進める。前者ではマリネビブリオの全ゲノム配列から再構成した代謝ネットワークをもとに、海藻バイオマスを資化させている細胞における遺伝子発現応答を実測することで、海藻バイオマスからバイオ燃料の生成に必要な最小遺伝子セットを推定する。後者では、予測に基づき、代謝改変株を作製し、生産量の実証を行い、ミニマムセルの創成に向けた知見を得る。

3. 研究の方法

アルギン酸塩の分解と利用能が高く、かつドラフトゲノム配列の情報がある *Vibrio halioticoli* をモデルとし、糖の中央代謝系とそれに付随する代謝系の再構成、海藻糖質からエタノール生産に適する代謝ネットワークの推定を通して、バイオ燃料の効率的かつ高生産性に結びつく代謝系を検討した。

また、アルギン酸塩やマンニトールを代謝する過程で働いている遺伝子をグローバルトランスクリプトーム解析により解明する。このグローバルトランスクリプトーム解析は、文科省・新学術領域研究『生命科学系3分野支援活動』の公募課題の採択を受け、東京大学・鈴木研究室、宮崎大学・林研究室、および東京工業大学・黒川研究室の支援により進めた。

さらに、発酵産物は、ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。

推定された代謝系を基に、アルギン酸からエタノールを生産可能な代謝改変マリネビブリオ株の構築を行った。

4. 研究成果

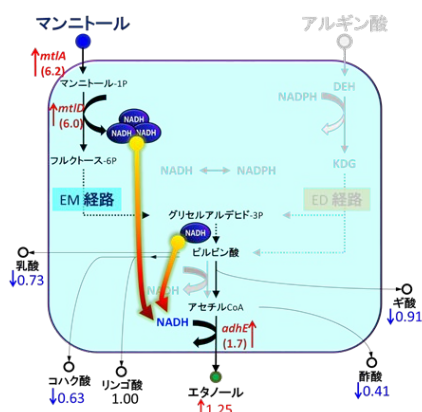
(1) RT-qPCR による遺伝子発現解析

これまでに、海藻糖質を代謝している細胞の RT-qPCR による遺伝子発現解析技術を確立し、アルギン酸のような多糖を高濃度で含有する培養条件下で培養した菌体から、RNA が抽出でき、かつ PCR 阻害も見られず、遺伝子発現応答を調べることができるようになっている。海藻糖質は単一種の成分から構成されていることは稀であること、そして、糖の種類により還元度が異なり、それらを代謝する細菌細胞内のレドックスバランスに影響を及ぼす。

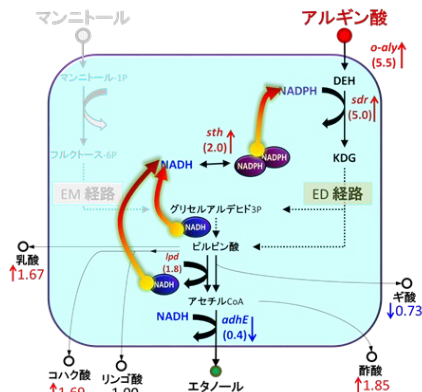
V. halioticoli は、優れたアルギン酸資化能を有することから、本菌をプラットフォームとした生物触媒の開発を進めてきた。マンニトール、アルギン酸、あるいは両者をほぼ同量混合した培養系を用い、エタノール生成に至る中央代謝系の遺伝子発現応答を調べた。その結果、マンニトール代謝細胞およびアルギン酸代謝細胞では、それぞれ基質の取り込み系をコードする遺伝子の発現が上昇

し、マンニトール代謝細胞ではアルコール脱水酵素遺伝子の一種 *adhE* の発現を高め、生成された還元力をエタノール生成に利用するが、アルギン酸代謝細胞ではこの *adhE* 遺伝子の発現は上昇せず、余剰の還元力が生じないため、エタノールも生成されないものと示唆された(図 1AB)。興味深いことに、マンニトールとアルギン酸を同時に代謝している細胞では、両基質の取り込み系をコードする遺伝子の発現は上昇するものの、*adhE* 遺伝子の発現は上昇せず、マンニトールの酸化で生じる還元力だけでは、アルギン酸由来の炭素をエタノール生成に導けなかった(図 1C)。培地組成の改善でアルギン酸のような酸化度の高い糖を、還元度の高いバイオ燃料へ導くことが如何に困難であることを示している。

(A) マンニトール代謝細胞



(B) アルギン酸代謝細胞



(C) マンニトール+アルギン酸代謝細胞

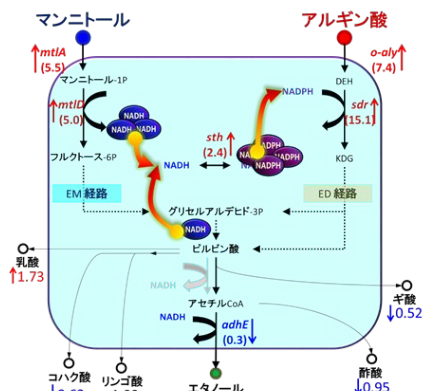


図 1. 遺伝子発現と発酵産物の動態。

(2) RNA-Seq によるグローバルトランスクリプトーム

RT-qPCR では、一部の代謝系の遺伝子発現動態を調べることに制限されるため、RNA-Seq を用いたゲノムワイドな網羅的遺伝子発現(グローバルトランスクリプトーム)解析を実行した。その結果、マンニトール代謝細胞では、アルギン酸代謝細胞に比し、マンニトール PTS、EM 経路および *adhE* 遺伝子のみならず、トレオニン合成系、硫黄代謝およびグルタチオン代謝に関わる遺伝子の発現が上昇するという新知見が得られた。さらに鉄輸送系遺伝子の発現量も高く、細胞内に取り込まれた鉄が、鉄依存性酵素でもある AdhE の働きを活性化していることを示唆した。一方、アルギン酸代謝細胞では、細胞内外に局在するアルギン酸分解酵素、アルギン酸輸送体ポリリンおよび細胞膜局在性 Na^+ 共輸送体をコードする遺伝子が顕著に上方発現していた。さらに、 Na^+/H^+ 逆輸送体、シトクロム複合体、ATP 合成酵素および TCA 回路をコードする遺伝子の発現も観察され、これらがアルギン酸の代謝に関与する可能性を示唆した。

(3) 代謝改変株の構築

培地組成の調整を含む培養条件の改善のみでは、酸化度の高いアルギン酸からエタノールなど還元度が高いバイオ燃料を生成させることは困難である。そこで、研究が良く進んでいる *Zymomonas mobilis* ZM4 株のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子およびアルコール脱水酵素遺伝子の両者を直列に並べて挿入したプラスミドを作製し、この組換えプラスミドを *V. haliotocoli* IAM 14569^T 株の細胞に導入することで、還元力の消費を節約しながら、最短経路でピルビン酸からエタノールを生成する代謝改変を施した遺伝子組換え株を作成した。本株は、海水が存在する培養条件において、アルギン酸からエタノールを生成可能であった。また、本株は pH 7.5 および 20 °C で、アルギン酸からのエタノール生成が高くなった。

以上、エタノール生成が極めて困難な酸化度の高いアルギン酸から、エタノール生成が可能な代謝改変を施した海洋細菌を作製することができた。この経路は、供試したマリンビブリオの海藻糖質の代謝ネットワークを考慮すると、還元力を節約した最小のステップである。また、グローバルトランスクリプトームにより、各海藻糖質の代謝に敏感に応答する遺伝子の候補も見つけられた。この知見をもとに、究極のミニマムセルの構築に向けて、様々な観点から研究を進展させる必要がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

猪原悠太郎・中川聡・澤辺智雄、*Vibrio*

halioticoli の代謝改変 : *Zymomonas mobilis* 由来のピルビン酸脱炭酸酵素およびアルコール脱水素酵素 II の発現、平成 25 年 9 月 18 日 ~ 20 日、日本生物工学会大会 (広島市)

久我康太・中川聡・丸山史人・小椋義俊・林哲也・黒川顕・澤辺桃子・澤辺智雄、海藻糖質の代謝過程における *Vibrio halioticoli* の遺伝子発現解析、平成 25 年 9 月 18 日 ~ 20 日、日本生物工学会大会 (広島市)

澤辺智雄、海洋微生物を利用したバイオ燃料生産、平成 25 年 9 月 18 日 ~ 20 日、日本生物工学会大会 (広島市)

久我康太・水越草太・中川聡・丸山史人・小椋義俊・林哲也・黒川顕・澤辺桃子・澤辺智雄、海藻糖質の代謝過程におけるマリンビブリオの遺伝子発現解析、平成 25 年 8 月 7 日 ~ 9 日、第 7 回細菌学若手コロッセウム (東広島市)

猪原悠太郎・中川聡・澤辺智雄、マリンビブリオのアルギン酸分解機構の解明と代謝改変、平成 25 年 8 月 7 日 ~ 9 日、第 7 回細菌学若手コロッセウム (東広島市)

F. Gao, T. Tachioka, K. Kuga, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe, and T. Sawabe, Functional extracellular alginate lyases of *Vibrio halioticoli* IAM 14596^T are up-regulated in the alginate metabolism、平成 25 年 6 月 1 日 ~ 2 日、日本マリンバイオテクノロジー学会大会 (那覇市)

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

[図書] (計 1 件)

T. Bruce, A. Gonzales, Y. Nakashimada, Y. Matsumura, F.L. Thompson, and T. Sawabe, Potential of marine microbial diversity for biofuel innovation. Springer Handbook of Marine Biotechnology, ed. S.-K. Kim. Springer, New York, in press, 2014.

[その他]

(1) 受賞

若手奨励賞、2013、第 7 回細菌学若手コロッセウム、東広島 (受賞対象者 : 猪原悠太郎)

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

細川 雅史 (MASASHI HOSOKAWA)

北海道大学・大学院水産科学研究院
・准教授
研究者番号 : 10241374