

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292122

研究課題名(和文) マリンビブリオを核とした海洋バイオ水素生産技術のビッグバン

研究課題名(英文) Development of high performance hydrogen production system using marine vibrios as biocatalysts

研究代表者

澤辺 智雄 (Sawabe, Tomoo)

北海道大学・水産科学研究科(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) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：高い水素生成能を有するマリンビブリオを生物触媒として、連続的かつ安定的なバイオ水素生産を達成するための連続培養系の構築、および発酵残滓の高付加価値化を検討し、マンニトールを基質として70日間にわたり連続的に水素の生成が可能な培養系の構築、2種類のマリンビブリオ生物触媒を利用した、アルギン酸水素生成システムの構築、および種々の新規・希少カロテノイド生合成遺伝子資源の獲得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Aims of the study are to establishment of 1) continuous culture system and 2) biorefinery of hydrogen producing marine vibrios as biocatalysts. We did succeeded 1) continuous hydrogen production for 70 days with appropriate hydrogen producing rates and yields, 2) alginate-hydrogen conversion using 2 kinds of biocatalysts, and 3) bioprospects of new and rare carotenoid producers and their genome information.

研究分野：微生物学

キーワード：再生可能エネルギー 水素 水産学 バイオマス 微生物 生物工学 カロテノイド

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。このため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およ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、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進めている。その中で、再生可能エネルギー政策は重要な柱である。エネルギー自給率が極めて低い日本では、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ている。また、地政学的観点から国土面積の制約と食料との競合が常に重荷となる陸上バイオマスだけでは、再生可能なバイオマスエネルギー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をも最大限に活用するための研究レベルと生産技術の基盤を強固にしなければならない。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、海洋バイオマスからのバイオ燃料研究は京都大学、水産庁、民間のベンチャー企業などで進められている。

このような状況の中で、申請者は科学研究費補助金をはじめとするプロジェクトを通じて、高塩分条件下でも、海藻糖質を発酵し、水素とエタノールを同時生成可能なマリニブリオ (*Vibrio tritonius*) を見いだした。本菌は、5 L 回分培養系で、褐藻類の主要糖質の一種であるマンニトールを原料とし、理論モル収率の 75% の水素と約 2% (v/v) に達する高いエタノール生産が可能である。さらに、海藻を原料とした 5 L 回分培養系を組み立て、水素-エタノール同時生産に成功し、約 24 L の水素生産を達成した。さらに、科研費や文科省ゲノム支援事業などで、本菌の完全ゲノム解析に成功し、海藻糖質代謝の全容が明らかになった。本菌のような、海水ベースの培地において、海藻糖質をここまで効率よく発酵可能な海洋細菌は、まだ知られておらず、バイオ水素生成効率の高い腸内細菌の能力を凌ぐ。

2. 研究の目的

マリニブリオの 1 種 *V. tritonius* は効率的な水素生成能を示し、海藻を原料とした回分培養にも成功した。しかし、(1) 連続的かつ安定的なバイオ水素生産を達成するための連続培養系の構築、(2) 発酵残滓の高付加価値化および(3) 持続可能な発酵原料供給技術の開発、が重要な研究課題として残されている。

特に、本研究では、前者の 2 つのポイントに焦点を絞り、「マリニブリオを核とした次世代型海洋バイオ水素生産技術」の構築を進めることを目的とした。

具体的には、本マリニブリオを用いて 2 週間程度の長期にわたりバイオ水素生産を高い効率で維持するための培養系の構築、およびアルギン酸から水素生産系の構築を目指した。さらに、本水素生成マリニブリオを核として、水素に加え、有用物質生産能を付加した生物触媒の開発に向けて、種々の機能性カロテノイド生合成遺伝子クラスターを探索し、遺伝子コレクションの拡充を目指した。

3. 研究の方法

(1) 連続的水素生産系の構築

ガス生産能を有する 7 種のマリニブリオを供試し(図 1)、グルコース (Glc) およびマンニトール (Man-ol) を基質として培養を行い、水素生成量、基質消費量、水素生産速度、水素生成モル収率を比較することで、連続培養に用いる菌株を選択した。選択した株を用い、3L 容量のジャーファーメンターを用いフェドバッチ培養を行った。さらに、同菌株を用い、200 mL 容量の連続培養を検討した。

(2) アルギン酸からの水素生成系の構築

V. tritonius の水素生成過程におけるギ酸塩代謝を各種代謝産物のプロファイリングをすることにより検討した。また、アルギン酸塩資化能を有するマリニブリオにより生成されたギ酸塩を *V. tritonius* を生物触媒としたリアクターを用いて水素化可能であるかを調べた。

(3) 網羅的遺伝子発現解析および代謝産物の解析

基質を活発に代謝している *V. tritonius* 細胞を材料として、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) およびメタボローム解析 (HPLC および CE-TOFMS) を行った。

(4) 新規および希少カロテノイド生合成遺伝子コレクションの拡充

生産される新規および希少カロテノイドの同定は、常法により各種機器分析により行った。特徴的なカロテノイドを生産する細菌はゲノム塩基配列を取得し、相同性検索により生合成遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 連続的水素生産系の構築

まず、7 種のガス生成ビブリオについて、水素の生成能の比較を進め、水素生成速度と収率から、*V. tritonius* AM2 株を用いた水素生成系の構築を目指した(図 1)。

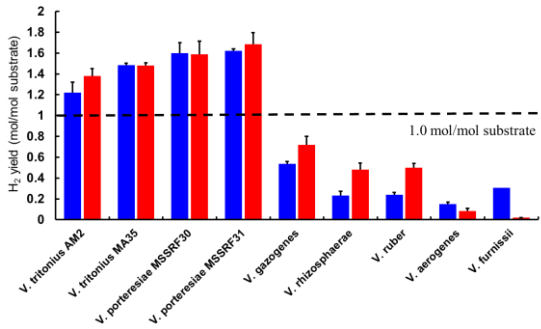


図 1. マリンビブリオの水素生成能の比較. 青 Glc, 赤 Man-ol.

この AM2 株を用いたフェドバッチ培養の開発を進め、2 度の基質追加を行うことにより、6 日間にわたり水素生成が可能であることを示した (図 2)。最終的な水素生成量は 50 L に達した。

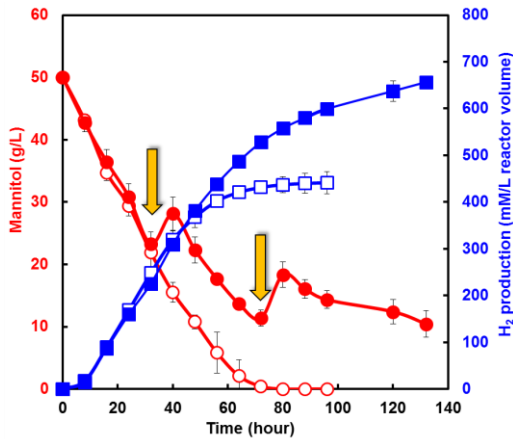


図 2. フェドバッチ培養の開発. ■フェドバッチ培養により生産された水素量の変化. 矢印の時間に基質を追加.

さらに、マンニトールを基質として、70 日間にわたり、バイオ水素を連続的に生産させることに成功した (図 3)。平均水素生成量は一日当たり 3 L/L reactor volume であった。水素生産速度はフェドバッチ培養系には劣るものの、本菌を用いた安定した水素生産が可能であった。

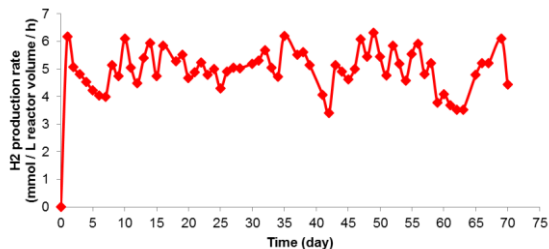


図 3. 連続培養系の開発.

(2) アルギン酸からの水素生成系の構築

V. tritonius は、発酵で生成されたギ酸を再取り込みし水素化することが明らかになった (図 4)。

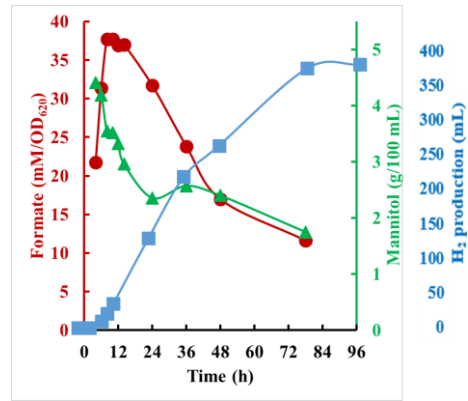


図 4. *V. tritonius* によるギ酸塩の再取込み.

50 mM のギ酸塩をリアクターに添加した時、最も高い水素生成量が観察された (図 5)。アルギン酸資化能を有する *Vibrio gallicus* により、アルギン酸から発酵的に生産されたギ酸からも、*V. tritonius* は水素化した (図 6)。このことから、海洋細菌を生物触媒として、アルギン酸から水素生成が可能であることが明らかになった。しかし、このアルギン酸からの水素変換効率は 4% と低く、今後、改善が必要である。

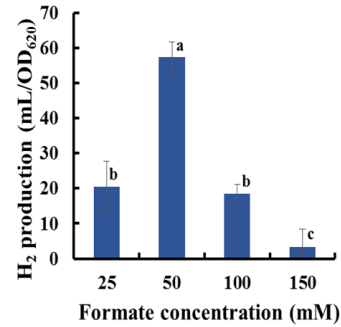


図 5. 水素生産での至適ギ酸塩濃度の決定.

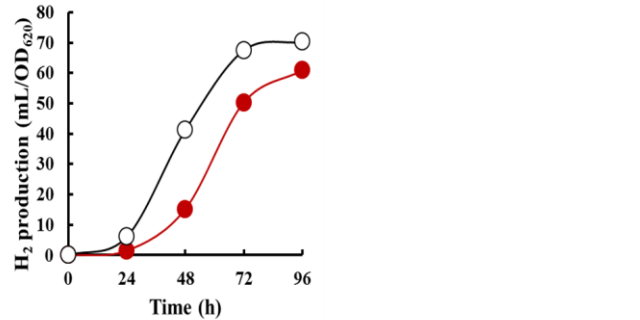


図 6. アルギン酸由来のギ酸の水素化 (●). ○陽性対照 (ギ酸塩).

(3) *V. tritonius* の水素生成遺伝子群の発現動態

V. tritonius の RNA-Seq 解析を行い、本菌の発酵的水素生成の鍵タンパク質複合体をコードするギ酸水素リアーゼ (FHL) 遺伝子クラスターの発現は pH の変動による変化が少ないことがわかった。また、FHL 遺伝子クラスターは、少なくとも 4 つのトランスクリプトに転写されていることが示唆された。さ

らに、このトランスクリプトームの結果に、メタボローム解析の結果を加えて総合的に検討したところ、pH 6 ではピルビン酸の菌体内生成量が相対的に高いこと、およびピルビン酸ギ酸リアーゼ (*pfl*) 遺伝子の転写が他の pH 条件よりも高まることから、水素生成の基質となるギ酸プールの多さが高い水素生成に寄与していると示唆された。

(4) 新規および希少カロテノイド合成遺伝子コレクションの拡充

海藻表面から分離した *Jejuia pallidilutea* 11shimoA1 株は、アルカリ条件下で新規カロテノイドである 2'-isopentenylsaproxanthin を生成するが、その細菌のドラフトゲノム配列を得た。また、沖縄の海水から分離し修飾基のない *myxol* を生成するフラボバクテリア科の細菌のドラフトゲノム配列を得た。これらのゲノム情報を基に、カロテノイド合成系の同定を進展させた。さらに、単環式カロテノイドの一種である *myxol* を合成する細菌の多くが *Nonlabens* 属の種であり、ほぼ同一の *myxol* 合成遺伝子クラスターを有していることが明らかになった。希少カロテノイドである *nostoxanthin* および新規カロテノイドである 2-hydroxy flexixanthin を合成する海洋細菌のゲノム解析を進め、それらの合成遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

① Yuta Matsumura, Hidayu Al-saari, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, Fumito Maruyama, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe, 2015, Identification of a gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* strain AM2 with transcriptional analyses, *Int. J. Hydrogen Energy*, 40: 9137-9146. 査読有.

② Takatani N, Nishida K, Sawabe T, Maoka T, Miyashita K, Hosokawa M. 2014. Identification of a novel carotenoid, 2'-isopentenylsaproxanthin, by *Jejuia pallidilutea* strain 11shimoA1 and its increased production under alkaline condition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98:6633-6640. doi: 10.1007/s00253-014-5702-y. 査読有.

③ Yuta Matsumura, Kazumichi Sato, Nurhidayu Al-saari, Satoshi Nakagawa, Tomoo Sawabe, 2014, Enhanced hydrogen production by a newly described heterotrophic marine bacterium, *Vibrio tritonius* strain AM2, using seaweed as the feedstock, *Int. J. Hydrogen Energy*, 39: 7270-7277. 査読有.

④ Tomoo Sawabe, Yoshitoshi Ogura, Yuta Matsumura, Gao Feng, AKM Rohul Amin, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, Toko

Sawabe, Ramesh Kumar, Yohei Fukui, Masataka Satomi, Ryoji Matsushima, Fabiano L. Thompson, Bruno Gomez-Gil, Richard Christen, Fumito Maruyama, Ken Kurokawa and Tetsuya Hayashi, 2013, Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4: 414, doi: 10.3389/fmicb.2013.00414. 査読有.

〔学会発表〕(計 8 件)

① 澤辺智雄、水越草太、美野さやか、松村佑太、澤辺桃子、水素生成マリンビブリオの網羅的遺伝子発現解析, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 東京海洋大学 (東京都港区), 2015 年 05 月 30 日~2015 年 05 月 31 日.

② 天田愛梨・澤辺智雄, マリンビブリオを生物触媒としたギ酸塩の水素変換条件の最適化, 日本生物工学会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014 年 09 月 09 日~2014 年 09 月 11 日.

③ 水越草太、丸山史人、小椋義俊、林哲也、黒川頭、澤辺智雄, 水素生成マリンビブリオの網羅的遺伝子発現解析, 日本生物工学会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2014 年 09 月 09 日~2014 年 09 月 11 日.

④ T. Sawabe, Hydrogen production potential of vibrios: the efficiency, genome structure, and expression, *Vibrio2014*, スターリング大学 (スコットランド・エディンバラ), 2014 年 04 月 01 日~2014 年 04 月 04 日.

⑤ K. Sato, E. Amada, S. Nakagawa, T. Sawabe, The development of hydrogen producing system from seaweed carbohydrate using marine *Vibrio*, *Asia BioHyLink 2013*, 大阪市立大学 (大阪府大阪市), 2013 年 11 月 22 日~2013 年 11 月 24 日.

⑥ E. Amada, K. Sato, S. Nakagawa, T. Sawabe, Can the marine vibrio make bioconversion of formate to biohydrogen? *Asia BioHyLink 2013*, 大阪市立大学 (大阪府大阪市), 2013 年 11 月 22 日~2013 年 11 月 24 日.

⑦ 佐藤一道・天田愛梨・中川聡・澤辺智雄, *Vibrio tritonius* AM2T を用いた海藻糖質からの水素生産システムの構築, 日本生物工学会, 広島国際会議場 (広島県広島市), 2013 年 8 月 18 日~2013 年 8 月 20 日.

⑧ 高谷直己・西田健太郎・澤辺智雄・宮下和夫・細川雅史, 海洋細菌 *Jejuia pallidilutea* A1 株の新規カロテノイド合成とストレス応答, 日本バイオテクノロジー学会大会, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県那覇市), 2013 年 6 月 01 日~2013 年 6 月 01 日.

[図書] (計 3 件)

① Tomoo Sawabe, Nurhidayu Al-saari, Yuta Matsumura, Kazumichi Sato, Sayaka Mino, and Toko Sawabe. H₂ Production by Marine Vibrios: Unexpected Diversity on Bioenergetics Machinery. Bruce and Amaro, eds. in "Molecular Diversity of Environmental Prokaryotes". CRC Press, In Press.

② T. Bruce, A.D. Gonzales, Y. Nakashimada, Y. Matsumura, F.L. Thompson, T. Sawabe (2015). Biofuel innovation by microbial diversity. S.-K. Kim ed. Springer Handbook of Marine Biotechnology. 1512(1163-1180).

③ Bruno Gomez-Gil, Cristinane C. Thompson, Yuta Matsumura, Toko Sawabe, Tetsuya Iida, Richard Christen, Fabiano Thompson, Tomoo Sawabe (2014). The Family Vibrionaceae. In: (ED.), M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, And E. Stackebrandt. (Org.). The prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiology community. 4th ed. New York, 2014. 768(659-747).

[その他] (計 1 件)

(1) 受賞

① Student Poster Award , 2013 , Asia BioHyLink 2013, 大阪 (受賞対象者 : K. Sato)

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 (HOSOKAWA MASASHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院

・ 准教授

研究者番号 : 10241374

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