## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28年 6月 8日現在

機関番号: 10101

研究種目: 挑戦的萌芽研究 研究期間: 2014~2015

課題番号: 26660168

研究課題名(和文)バイオ燃料生産性を飛躍させる光エネルギー駆動型マリンビブリオファクトリーの創成

研究課題名(英文) Creation of A Light-Driven Marine Vibrio Factory for Biofuel Production

### 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):より効率的に海藻原料をバイオ燃料へと生物変換するために,「光エネルギー」を効果的に利用する生物触媒の開発を目的として, Nonlabens sediminisが有するプロテオロドプシン遺伝子の発現、 新規カロテノイド生合成遺伝子群の収集とクローニングを行った。また,マリンビブリオで適応可能な効率な遺伝子改変システムの開発に向け,マリンビブリオにおけるCRISPR/Casシステムの特徴を調べた。

研究成果の概要(英文): An aim of the study is to develop light-driven marine vibrio biocatalysts in efficient biofuel production. We performed 1) gene expression of a Nonlabens sediminis proteorhdopsin gene, and 2) a cloning of a myxol synthetic gene cluster of Nonlabens ulvanivorans. We also accumulated fundamental knowledge on CRISPR/Cas system for further developments of a genome editing approach working in marine vibrio cells.

研究分野: 微生物学

キーワード: 再生可能エネルギー 光栄養性 水産学 バイオマス 微生物 プロテオロドプシン 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 リ,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である。日本では 「バイオマス・ニッポン総合戦略」が策定さ れ,主食と競合しない陸上バイオマスのエネ ルギー変換技術の開発研究が活発である。こ れに加え,大型海藻を中心としたマリンバイ オマスを原料としたバイオリファイナリー 研究も進展しており,京都大学(Energy Environ. Sci., 4, 2575, 2011) 及びアメリカの ベンチャー企業 (Science, 335, 308, 2012) などでは,大型褐藻類の約3割(乾燥重量) を占めるものの還元度が高く,バイオ燃料へ の生物変換が極めて困難なアルギン酸を,バ イオエタノールに生物変換可能な陸生細菌 の創出に成功している。しかし,海藻バイオ マス原料の輸送コストや海水の使用可能性 を考慮すると,その生産基盤を海上あるいは 臨海に設置するアドバンテージは高く, それ らの陸生細菌に代わり,海水中でも高い生産 性を有する「海洋微生物を核とした新規生物 触媒の開発」が必要不可欠であり、これに挑 戦し続けなければならない。

「光」は細胞内の酸化還元バランスやエネルギーバランスを劇的に変化させる因子である。マリンビブリオの中には、プロテオロドプシンと呼ばれる光駆動型のプロトンポンプを持ち、「光」を化学的エネルギーに換可能な株が存在し、その遺伝学的な解析も進んできた(PLoS ONE, 7, e38749)。申請する研究課題では、上述した代謝改変対場では、プロテオロドプシンや光捕まカロテノイド遺伝子からなる「光駆動型エネルギー生成サーキット」を組込み、バイオ燃料の生産性を向上させた新規マリンビブリオ株の創成に挑戦する。

### 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。我々は、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ンビブ リオを見いだし,マリンビブリオによるバイ オ燃料生産システムの最適化のみならず 「アルギン酸からエタノールを生産可能な 代謝改変マリンビブリオの創成に世界で初 めて成功した」。しかし、より効率的に海藻 原料をバイオ燃料へと生物変換するために は、「光エネルギー」の効果的な利用も欠か せない。本研究課題は,アルギン酸からエタ ノール生産可能な代謝改変マリンビブリオ に, さらに「光駆動型エネルギー変換サーキ ット」を付与したバイオ燃料生産性の高い株 の創出に挑戦することを目的とする。

### 3.研究の方法

(1)プロテオロドプシン遺伝子の探査と発現 北海道および石垣島の海洋試料から分離 されたカロテノイド生産菌やビブリオ属細 菌のドラフトゲノムを常法に従って得た。こ れらのゲノム塩基配列を基に、プロテオロド プシン遺伝子の探索を行い、既知のプロテオ ロドプシンの分子系統解析に基づくグルー プ分けに従い、見いだされたプロテオロドプ シン遺伝子のグループ分けを行った。

また,プロテオロドプシン遺伝子は PCR 法で増幅し,ビブリオ接合伝播用ベクターにクローニングし,大腸菌細胞での発現を試みた。

## (2) myxol 合成遺伝子のクローニング

N. ulvanivorans NR17 株が有する全長約 8 kb の myxol 生合成遺伝子を同定した後, long-PCR 法で増幅し, pGEM ベクターを利用して大腸菌にクローニングを行った。

# (3) マリンビブリオにおける CRISPR/Cas システムの特徴

50 種を超えるビブリオ科細菌のドラフトゲノムデータを用い、CRISPRdbのアプレットである CRISPRfinder を用い各細菌のゲノム上に存在する CRISPR に特有のダイレクトリピート(DR)を検索した。また、ゲノム塩基配列を RAST などでアノテーションし、cas 遺伝子の同定とクラス分けを行った。

#### 4.研究成果

(1) プロテオロドプシン遺伝子の探査と発現 北海道および石垣島の海洋試料から分離 された細菌のドラフトゲノムを得て、プロテ オロドプシン遺伝子の探索を行った。 Nonlabens sediminis と同定された Ara13 株 はプロトン排出型のプロテオロドプシン (pR)遺伝子に加え,ナトリウムイオン輸送 型のプロテオロドプシン遺伝子も有してい ることが示唆された(図1)。また, N. ulvanivorans と同定された NR33 株は pR 遺 伝子を保有していることが示唆された。両菌 株とも,βカロテン15,15'-モノオキシゲナー ゼ(blh)様のタンパク質をコードする遺伝子 を有していた。関連する細菌のドラフトゲノ ム配列は,データベースに登録し,その特徴 を公表した。なお,環境分離株のゲノム解析 の過程で , 新種の細菌を見いだしたことから , それらの記載も行った。

N. sediminis Ara13 株由来のプロトンポンプ型 pR 遺伝子候補を大腸菌にクローニングし all-trans レチナールを加えて,強発現させたところ,pR 遺伝子の発現に伴う淡橙色の菌体を得ることができたことから,本遺伝子が pR 遺伝子であることが示唆された(図2)。今後,この遺伝子産物の吸収スペクトル測定とプロトン排出能を見積もる。さらに,ビブリオへの組込みと発現確認を進める。

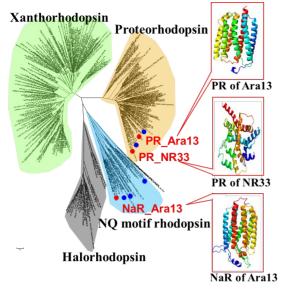


図 1. プロテオロドプシン遺伝子の探索.



図 2. Ara13 株の pR 遺伝子の発現.

### (2) myxol 合成遺伝子のクローニング

N. ulvanivorans NR17 株が有する myxol の生合成に必要な crtE を除く遺伝子群を大腸菌にクローニングした。本カロテノイドの生成を確認できなかったことから, crtE遺伝子を導入したカセットを作成し,今後,これらの遺伝子資源を活用して効率的なカロテノイド合成遺伝子カセットの作成とこの遺伝子カセットを活用したビブリオ生物触媒の作成を進める。

# (3) マリンビブリオにおける CRISPR/Cas システムの特徴

マリンビブリオのゲノム編集の可否を検討するため 50 種以上のマリンビブリオについて特徴付けをおこない, Type I 型に属するサブタイプを有するものが多い傾向にあった。Type II 型のものは見いだされなかった。今後,マリンビブリオ独自の機構を活用したゲノム編集の可能性について検討を進める。

表 1. マリンビブリオにおける CRISPR/Cas システムの特徴

	Vibrionaceae	Sequence	CRISPR														
Clade	Species			I-A	I-B	I-C	I-D	ŀΕ	I-F	Ш	III-A	III-B	III-C	III-D	IV	V	
Profundum	P. profundum SS9 chr1	complete	Q					Υ									
r rorumoum	P. profundum SS9 chr2	complete	1						Υ								
Gazogenes	V. aerogenes	draft	10						Υ			Υ					
	V. gazogenes	draft	10					Υ				Υ					
	V. gazogenes ATCC43941	draft	N					Υ				Υ				Г	
	V. rhizosphaerae	draft	3						Υ							Г	
Pectenicida	V. caribbeanicus ATCC BAA 2122	draft	2													Г	
	V. tritonius AM2 chr1	complete	N													Г	
Porteresiae	V. tritonius AM2 chr2	complete	1													Т	
Vulnificus	V. navarrensis ATCC51183	draft	5			Υ			v1					Y		T	
	V. vulnificus YJ016 chr1	complete	N			Ť					_					H	
	V. vulnificus YJ016 chr2	complete	2								_			>		H	
														•	_	۰	
	V. vulnificus CladeA-yb158	draft	-1								_				_	-	
	V. anguillarum NB10 chr1	complete	N					Υ	v1		_				_	┺	
	V. anguillarum NB10 chr2	complete	N													_	
	V. ordalii ATCC33509	draft	Q														
Cholerae	V. fluvialis	draft	2						Υ							ı	
	V. furnissii	draft	N													Г	
	V. furnissii CIP102972	draft	N													Г	
	V. metschnikovii CIP6914	draft	6		<b>—</b>	Υ										T	
	V. mimicus CAIM602	draft	N								_				Н	t	
	V. mimicus VM603	draft	N 1	<del>                                     </del>	<del>                                     </del>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	V.	<b>—</b>	$\vdash$	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	-	H	
	V. breoganii 1C10			-	<del>                                     </del>	-	-	-		-	<b>—</b>	-	-	-	<del> </del>	۰	
Halioécoli		draft	Q	$\vdash$	$\vdash$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>—</b>	۰	
	V. ezurae	draft	Q			_	_	_	_	_		_	_	_	Ь.	L	
	V. gallicus HT21	draft	2						Υ						_	L	
	V. halioticoli IAM14596 chr1	gap-closed	- 1												_	L	
	V. halioticoli IAM14596 chr2	gap-closed	N	1	1			Υ								Γ	
	V. superstes	draft	2	1	l -											Т	
Harveyi	V. alginolyticus NBRC15630 chr1	complete	N	1	l -											Т	
	V. alginolyticus NBRC15630 chr2	complete	N								_					H	
	V. alginolyticus V1	draft	1						v1						_	H	
			N			_	_	_	VI.	_	_	_	_	_	_	۰	
	V. alginolyticus V2	draft													_	┺	
	V. azureus NBRC104587	draft	4					Υ	v1							L	
	V. campbellii ATCC 1116 chr1	complete	N														
	V. campbellii ATCC 1116 chr2	complete	1													ı	
	V. harveyi ATCC14126	draft	Q													Г	
	V. harveyi S20	complete	N													T	
	V. mityli CAIM528	draft	2													t	
	V. natriegens	draft	N								_				_	H	
	V. owensii LMG25430	draft	1			_	_	Υ	_	_	_	_	_	_	_	۰	
						_	_	Y		_	_	_	_			H.	
	V. rotiferianus LMG21460	draft	1						v1					i.c.	i.c.	Ĺ	
	Vibrio sp. EYJ3	complete	N													_	
	Vibrio sp. Ex25	complete	Q														
Mediterranei	V. maritimus JCM19235	draft	Q													ı	
	V. maritimus JCM19240	draft	N													Г	
	V. variabilis JCM19239	draft	Q													t	
Nereis	V. nereis DSM19584	draft	Q						~		_				_	H	
	V. nigripulchritudo ATCC27043	draft	Q			_	_	_		_	_	_	_	_	_	٠	
regripuscrinado	V. litoralis DSM17657					_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	╄	
Corallillyticus		draft	Q			<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<u> </u>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	Ь—	۰	
	V. rumoiensis 1S-45	draft	Q			_	_	_	_	_		_	_	_	Ь.	L	
	V. coralillyticus OCN14 chr1	complete	N	_	_										_	L	
	V. coraliilyticus OCN14 chr2	complete	- 1	Ш.	<u> </u>	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ᆫ	L	
	V. neputunius	draft	Q	L							ш				ш	Γ	
	V. diazotrophicus	draft	Q	1	1											Г	
Diazotrophicus	V. diazotrophicus NBRC103148	draft	N	T	T											т	
Orientalis	V. brasiliensis LMG20546	draft	N	<b>!</b>	<b>†</b>											t	
	V. hopatarius DSM19134	draft	1	_	<del>                                     </del>						_				Н	t	
	V. nepararius DSM19134 V. orientalis ATCC33934			-	-	$\vdash$	$\vdash$	$\vdash$	۰								
		draft	N	-	-	$\vdash$	$\vdash$	$\vdash$	۰								
	V. sinaloensis DSM21326	draft	N	⊢	⊢	_	_	_	_	_	_	_	_	_	Ь.	۰	
	V. tubiashii ATCC19109	complete	N	⊢	⊢	_	_	_	_	_	_	_	_	_	Ь.	۰	
Scopthalmi	V. ichthyoenteri	draft	N													L	
	V. ponticus JCM19238	draft	- 1	Ш.	<u> </u>	ш	ш	Y	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ᆫ	L	
	V. scophthalmi LMG19158	draft	N	ட	┖_	ш¯	ш¯	ш¯	ш¯	ш¯	╙_	ш¯	ш¯	ш¯	╙.	L	
Damselae	P. damselar subsp. pisciolda DI21	draft	N													Γ	
Enterovibrio	E. calvensis 1F-230	draft	Q	┕	┕											L	
Fischeri	V. fischeri ES114	complete	N	⊢	⊢	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	1	
Grimontia Spiendidus	G. indica AK16	draft	0			<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<u> </u>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<u> </u>	۰	
	V. crassostreae J520 V. crassostreae LGP7	draft draft	Q	-	-	$\vdash$	$\vdash$	$\vdash$	۰								
	V. crassostreae LGP107	draft	0	_	_	_	_	_	_	_	-	_	_	_	-	H	
	V. fortis	draft	N	<b>!</b>	<b>†</b>											T	
	V. kanaloe 5S-149	draft	Q	T	T											Г	
	V. lentus	draft	N													Γ	
	V. splendidus LGP32	complete	N													Γ	
Unknown	V. albensis ATCC14547	draft	1					Υ								Γ	
	V. jascida CAM1864	draft	Q	⊢	⊢	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	┺	
	V. meteocus V. proteolyticus NBRC13287	draft draft	Q N	$\vdash$	$\vdash$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰	
	V. proteoryticus NBHC13267 Vibrio sp. F10	draft	Q	-	<del>                                     </del>	<b>—</b>	_	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	-	<del></del>	-	<b>—</b>	⊢	

# 5.主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Feng Gao, Nurhidayu Al-saari, A.K.M. Rohul Amin, Kazumichi Sato, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Ohkuma, Paulo liboshi Hargreaves Costa, Pedro Milet Meirelles, Fabiano L. Thompson, Cristiane Thompson, Bruno Gomez-Gil, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe, 2016, Vibrio ishigakensis sp. nov., in Halioticoli clade isolated from seawater in Okinawa coral reef area, Japan, Syst. Appl. Microbiol. In Press. 查読有.

Nurhidayu Al-saari, Feng Gao, Amin A.K.M. Rohul, Kazumichi Sato, Keisuke Sato, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Ohkuma, Pedro M. Meirelles, Fabiano L. Thompson, Cristiane Thompson, Gilberto M. A. Filho, Bruno Gomez-Gil, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe, 2015, Advanced Microbial Taxonomy Combined with Genome-Based-Approaches Reveals that Vibrio astriarenae sp. nov., an Agarolytic Marine Bacterium, Forms a New Clade in Vibrionaceae, PLoS

One, 10: e0136279. doi:10.1371/journal.pone.0136279. 查読有.

Nurhidayu Al-saari, Pedro Milet Meirelles, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Ohkuma, Fabiano L. Thompson, Bruno Gomez-Gil, Toko Sawabe, and <u>Tomoo Sawabe</u>. 2014. Draft Genome Sequence of Two Vibrionaceae species, Vibrio ponticus C121, and *Photobacterium aphoticum* C119, Isolated as Coral Reef Microbiota. Genome Announc. 2: e01236-14. 查読有.

Naoki Takatani, Masato Nakanishi, Pedro Meirelles, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Ohkuma, <u>Masashi Hosokawa</u>, Kazuo Miyashita, Fabiano L. Thompson, Ako Niwa, Toko Sawabe, and <u>Tomoo Sawabe</u>. 2014. Draft Genome Sequence of Marine Flavobacteria *Algibacter lectus* strains SS8 and NR4. Genome Announc. 2: e01168-14. doi: 10.1128/genomeA.01168-14.94. 查読有.

Naoki Takatani, Masato Nakanishi, Pedro Meirelles, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Masashi Hosokawa, Ohkuma. Kazuo Miyashita, Fabiano L. Thompson, Ako Niwa, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe. 2014. Genome Sequence of Marine Flavobacteria Jejuia pallidilutea Strain 11shimoA1 and the Pigmentation Mutants. Genome Announc. 2: e01236-14. doi: 10.1128/genomeA.01236-14. 查読有.

### [学会発表](計 3 件)

遠藤祥子・美野さやか・<u>澤辺智雄</u>,ビブリオ科細菌が有する CRISPR/Cas システムの特徴,第67回生物工学会,2015年10月26日~10月28日,城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市).

中西誠人・高谷直己・高峰・宮下和夫・細川雅史・大熊盛也・大島健志朗・服部正平・ <u>澤辺智雄</u>,海洋細菌が有するカロテノイド合成系の体系的理解,日本水産学会,2014年09月14日~2014年09月17日,九州大学(福岡県福岡市).

N. Al-saari, F. Gao, A.K.M.R. Amin, K. Sato, K. Sato, P.M. Meirelles, F.L. Thompson, G.M.A. Filho, <u>T. Sawabe</u>, Biodiversity and species identification of novel Vibrionaceae associated with coral reef ecosystem, 10th APMBC、Academia Sinica(台湾台北市)、2014年5月4-8日.

# [その他](計 1 件)

#### (1)受賞

The Best Poster Award (Gold prize),2014, 10th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference,台北(受賞対象者:Nurhidayu Al-saari)

### 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