

## 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* proteorhodopsin 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変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、上述した代謝改変マリンビブリオに、プロテオロドプシンや光捕集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」を組み込み、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成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査を行い、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 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査を行った。*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、 $\beta$  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、ビブリオへの組み込みと発現確認を進める。



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

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 Tomoo Sawabe. 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. 査読有.

Naoki Takatani, Masato Nakanishi, Pedro Meirelles, Sayaka Mino, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Moriya Ohkuma, Masashi Hosokawa, Kazuo Miyashita, Fabiano L. Thompson, Ako Niwa, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe. 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. 査読有.

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

〔学会発表〕(計 3 件)

遠藤祥子・美野さやか・澤辺智雄, *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・澤辺智雄, *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, T. Sawabe, *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