

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04976

研究課題名(和文) 海洋バイオ水素生成技術の革新に向けたマリンビブリオの分子育種基盤の創成

研究課題名(英文) Creation of Molecular Biotechnology Basis for Marine Vibrios Toward Innovation of Marine Biohydrogen Production

研究代表者

澤辺 智雄 (Sawabe, Tomoo)

北海道大学・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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：水素生成能の高いマリンビブリオが有する水素生成分子マシナリーの細胞生理学的特性と遺伝子発現制御の解明および分子育種の進展を目的とし、マリンビブリオの水素生成に適する合成培地の開発、水素生成マリンビブリオの比較生理とゲノム解析、網羅的遺伝子発現解析、および窒素固定と水素生成の関連性検討、などを進めた。また、アルギン酸から水素を生成可能な新規マリンビブリオを見だし、その生理およびゲノムの特徴を明らかにし、マリンビブリオを核とした分子育種基盤を集積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素社会の形成に向けて水素生成技術基盤の強化が求められている。研究代表者のグループで見出した新規マリンビブリオは、海藻に含まれるユニークな炭水化物群を効率よく水素化する。海洋バイオマスは地政学的制限の少ない資源であり、日本沿岸の推定現存量は極めて多い。これら資源をバイオ水素の生産に向けることができれば、日本の工業的水素生産に貢献できる可能性がある。本研究では、マリンバイオマスを原料にバイオ水素を生成する微生物が有する水素生成分子マシナリーの細胞生理学的特性と遺伝子発現制御の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Aims of the study are to understand physiology and genomics of hydrogen production marine vibrios. We did achieve 1) optimized synthetic medium, 2) physiological and genome comparison among hydrogen producing marine vibrios, 3) a RNA-Seq, and 4) effects of nitrogen fixation on hydrogen production. We also discovered a new marine vibrio which is capable of producing hydrogen from alginate.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：海洋微生物 マリンバイオマス 水素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化・気候変動・原油価格急変など、エネルギー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り、化石燃料代替エネルギーの開発は人類の生存基盤を保障する学術的および社会的要請の高い重要課題である。日本では、2014年に、新たなエネルギー基本計画が策定され、水素エネルギーの導入促進が盛り込まれた。再生可能エネルギー由来の余剰電力を水素化に向けた「Power to Gas 構想」や再生可能エネルギー由来のバイオ水素も水素社会に取り込む「HyGrid 構想」などが提案され、水素社会の形成に向けた研究開発が以前にもまして活発化している(1)。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る。地政学的観点から国土面積の制約と食料との競合が重荷となる陸上バイオマスのみではバイオ燃料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も最大限に活用するための研究レベルと生産技術基盤を強固にしなければならない。

このような状況の中で、研究代表者のグループは、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新規マリンビブリオ(*Vibrio tritonius*)を見いだした(2,3)。本菌は5L培養系で褐藻類の主要糖質の一種、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)に達するエタノールを生産し、海藻を原料としたプラクティカルな水素生産(18L/5L培養系)も達成した(3)。さらに、本菌を用いたマンニトールを基質とした連続的水素生産(約22L/10L培養系/日)やギ酸を介したアルギン酸からの水素生産も可能になった。その上、本菌の完全ゲノム解析を達成し、この *V. tritonius* は、ギ酸水素リアーゼ(formate hydrogen lyase; FHL)経路を介して発酵的に水素を生成し、この経路はゲノム上に唯一存在するFHL複合体が触媒する、ことを明らかにした(2,4-6)。興味深いことに、本菌が有するFHLは、大腸菌ではFHL-2(Hyf)システムと称される水素生成には寄与していない機能不明の複合体と構造上の類似性が高く、かつ、細胞呼吸の重要な分子マシナリーであるComplex Iとの構造類似性も見られる(4,7)。HyfにはH⁺輸送を介したH⁺濃度勾配の形成(エネルギー保存)への寄与が推定されているが、その証明はなされていない(8)。さらに面白いことに、ビブリオはComplex Iをもたず、その生息海洋環境を反映するNa⁺輸送型NADH:キノンオキシドレダクターゼ(Na⁺-Nqr)を有する。コレラ菌のNa⁺-Nqrは2014年(9)に構造が解かれたばかりであるが、Nqrが触媒するNADHの酸化で得られたエネルギーはComplex IやNa⁺-NqrそのものによるH⁺やNa⁺イオン輸送に利用され細胞の生命維持に必須な細胞内外のイオン濃度勾配が形成される。*V. tritonius*は、Complex Iに構造的類似性があるアクティブなHyfとNqrの両者を有するため、本菌の生体エネルギーの流れに対する両者の役割分担や水素生成への相乗効果を調べる格好の生物材料である。さらに、興味深いことに、本菌は、窒素固定(Nif)やNa⁺-ATPaseとの共役が示唆されるNa⁺輸送分子マシナリーRnf遺伝子群も有し、細菌の嫌気・好気代謝で重要な4種の生体エネルギー生成マシナリーを有する(4,5)。しかし、これらの分子レベルでの機能解明は手つかずである。Hyfがどのような条件下で発現制御され、最大水素生成能を示すのか、この分子機構の理解は遅れ、マリンビブリオを活用した水素生成技術研究のボトルネックとなっている。そこで、本菌の水素生成機構の分子レベルでの理解を深め、本課題の成果に基づき「海洋バイオ水素生成技術の革新に向けたマリンビブリオの分子育種基盤の創成」を目的とする研究課題を着想した。

2. 研究の目的

水素社会の形成に向けて水素生成技術基盤の強固化が求められている。申請者の見いだした新規マリンビブリオは、海藻に含まれるユニークな炭水化物群を効率よく水素化する。海洋バイオマスは地政学的制限の少ない資源であり、日本沿岸の推定現存量は極めて多い。これら資源をバイオ水素の生産に活用することができれば、日本の工業的水素生産に貢献できる可能性がある。しかし、海洋微生物を活用したバイオ水素変換技術の基盤、特にマリンビブリオの水素生成能を高める分子育種技術は未成熟であり、水素生産性の飛躍的向上のボトルネックとなっている。本申請研究課題では、水素生成能の高いマリンビブリオが有する水素生成分子マシナリーの細胞生理学的特性と遺伝子発現制御の解明および分子育種の進展を目的とする。

3. 研究の方法

*V. tritonius*は海藻を原料とした水素生産技術基盤に有益な知見を与えた。しかし、連続・安定的なバイオ水素生産系の確立および発酵残滓の高付加価値化など現在進展中の研究に加え、持続可能な原料供給技術開発および水素生産能を高いレベルで制御するマリンビブリオの分子育種技術の開発が残された重点研究課題である。そこで、本申請課題では、第4の課題である「海洋バイオ水素生成技術の革新に向けたマリンビブリオの分子育種基盤」の創成を進めた。この目的達成に向け、本菌のHyfをはじめとする分子マシナリーの「細胞生理学的能力評価」、 「遺伝子発現制御機構解明」および「分子育種技術基盤の構築」を進めた。

細胞生理学的能力評価では、Hyfなど分子マシナリーがその活性中心に金属クラスターを形成することから、分子の成熟や活性化を的確に把握できる「最適化された合成培地」を開発し、Hyfがマリンビブリオ細胞内で最大の水素生成能を示す最適微量金属バランスなどを検討した。また、20年間未解明であるHyfのH⁺やNa⁺輸送能と生体エネルギー保存能の理解を深めた。遺伝子発現制御機構では、24 kbのHyf複合体の構造および形成に関わる遺伝子領域(4)のレギュロンの構造をRNA-Seq技術を活用して検討した。

4. 研究成果

(1) 合成培地の最適化

Vibrio tritonius AM2 株を供試し、Minitab17 を用いた実験計画法 (DOE) を活用し、水素生成に適する合成培地組成を決定した。その結果、Ni, Fe, Mo の三つの微量元素が水素生成に大きく関与することがわかった。最終的に、応答局面解析を用いることで、Ni, Fe, Mo の最適濃度は 22.0 μM、1.3 μM および 0.26 μM と予想され、それらの濃度で添加された合成培地における水素産生量は 195.3 ml / 100 ml reactor に達することが予測された (図 1)。

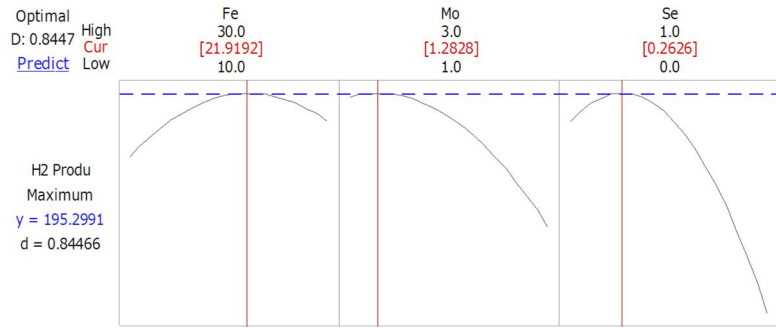


図 1. マリンビブリオの水素生成を高める合成培地成分の決定。

(2) 比較生理および比較ゲノム

まず、*V. tritonius* AM2 株の種々の NaCl 濃度下における水素生成キネティクスを測定した結果、本菌は 0.5% ~ 3.0% NaCl 存在下で水素生成能を有する海洋環境に適した細菌であることが明らかとなり、PeeJ 誌に公表した (10)。

次に、75%海水に匹敵する濃度に調整した培養条件下において、水素生成能を示す 7 種のマリンビブリオの水素生成能を比較したところ、マリンビブリオの中でも *V. tritonius* AM2 株に加え *V. porteresiae* で水素生成が高く、両者は Porteresiae clade に属していた。その他 5 種は Gazogenes clade と Cholerae clade に属するが、水素生成能は *V. tritonius* の半分以下であった (図 2)。

さらに、これらマリンビブリオについて、ドラフトゲノム塩基配列を得て、ギ酸水素リアーゼ (FHL) 複合体遺伝子構造比較を行った結果、水素生成能が高い Porteresiae clade のマリンビブリオはニッケルトランスポーター遺伝子の種類が相違していた (図 3)。

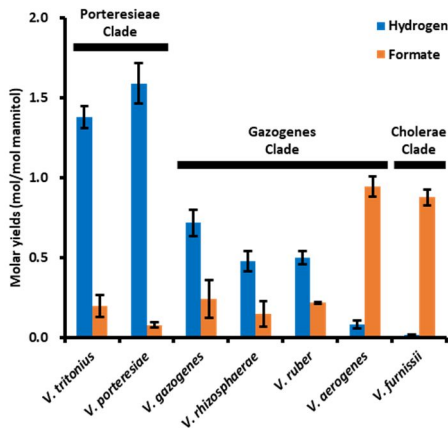


図 2. 水素生成能比較。

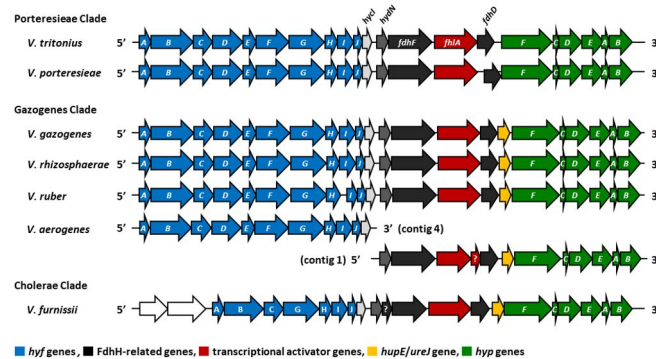


図 3. 水素生成に関する FHL 複合体遺伝子の構造比較。

(3) *Vibrio tritonius* を対象とした RNA-Seq

V. tritonius AM2 株の FHL 遺伝子群は、ギ酸の添加で 1 時間程度で発現誘導されることが示唆された (図 4)。特に、ヒドロゲナーゼ複合体の 5'末端側に位置するいくつかの遺伝子は、ギ酸無添加時に比較し、有意に上方発現されていた。さらに、ギ酸添加による H⁺-ATPase 遺伝子の有意な発現上昇が観察され、FHL 複合体が関与する H⁺輸送が示唆された。

(4) アルギン酸から水素を生成可能な新規マリンビブリオの発見

本研究課題を進める中で、アルギン酸から水素を生成する新種のマリンビブリオを見いだした。アルギン酸は酸化された多糖であるため、水素のような還元された化合物の生成

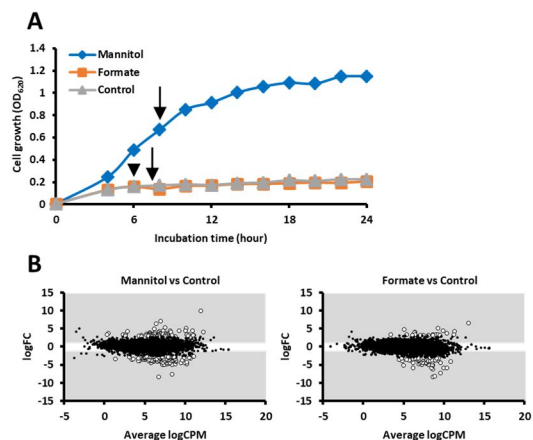


図 4. マリンビブリオの RNA-Seq.

に適する基質ではないと考えていたため、この予想に反するユニークな細菌を発見する機会となった。

本菌の完全ゲノムを決定し、ゲノム分類学的手法に基づき新種であることを確認し、*V. aphrogenes* と命名することを提案した。これらに関連する成果は PLoS One および PeerJ 誌に掲載された(11,12)。*V. aphrogenes* と単系統性が強く示唆される全 6 種の完全ゲノムを取得し、比較ゲノムを行い、アルギン酸から水素を生成する代謝系に関連する遺伝子を保有しているのは、*V. aphrogenes* のみであることを明らかにした(図 5)(11)。さらに面白いことに、*V. aphrogenes* は、アルギン酸を基質とした場合の水素生成モル収率が D-グルコースを基質とした場合のそれとほぼ同程度であることを明らかにした。

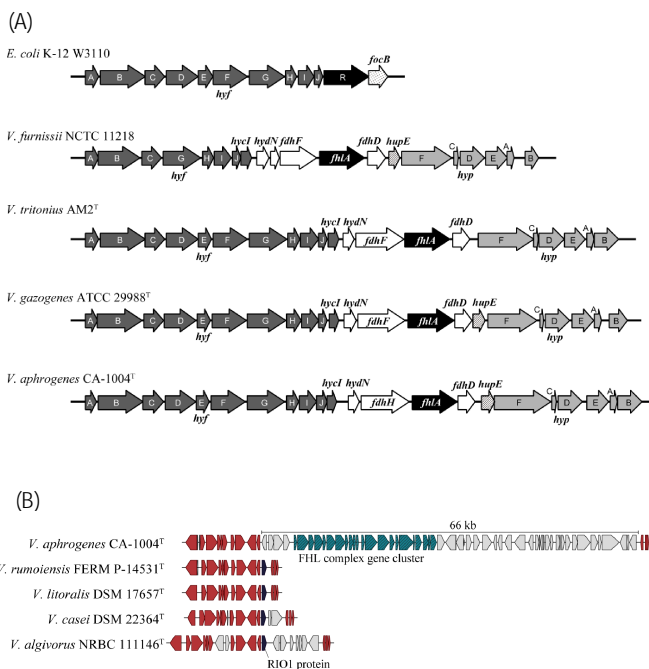


図 5. *Vibrio aphrogenes* の FHL 複合体遺伝子領域比較。

(5) 窒素固定能と水素生成

V. tritonius AM2 株の窒素枯渇条件下におけるゲノムワイドな遺伝子発現解析に成功し、*nif* 遺伝子群および *mif* 遺伝子群が有意に上方発現していることを観察した。窒素固定由来の水素生成は、窒素制限にならないと検出されないことから、本菌の発酵的水素生成の高さとは比べ物にならないほど低いことが明らかになった。

<引用文献>

1. NEDO 水素エネルギー白書 (2015) https://www.nedo.go.jp/library/suiso_ne_hakusyo.html.
2. Y. Matsumura, K. Sato, N. Al-saari, S. Nakagawa, T. Sawabe. 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 (2014).
3. T. Sawabe, Y. Ogura, Y. Matsumura, S. Mino, M. Satomi, F.L. Thompson et al. 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 (2013).
4. Y. Matsumura, S. Mino, T. Sawabe et al. Identification of a gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* strain AM2 with transcriptional analyses. *Int. J. Hydrogen Energy* 40:9137-9146. (2015).
5. N. Al-saari, T. Sawabe, Y. Matsumura, K. Sato, S. Mino, T. Sawabe. Microbial biofuels – potential and challenges. CRC Press. pp.285-294. (2016).
6. 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. pp.117-128. CMC 出版. 東京. (2011).
7. B. C. Marreiros, A. P. Batista, A. M.S. Duarte, M. M. Pereira. A missing link between complex I and group 4 membrane-bound [NiFe] hydrogenases. *Biochem. Biophys. Acta* 1827:198-209 (2013).
8. S. C. Andrews, B. C. Berks, J. McClay, A. Ambler, M. A. Quail, P. Golby, J. R. Guest. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (Hyf) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* 143:3633-3647 (1997).
9. J. Steuber, G. Vohl, M. S. Casutt, T. Vorburger, K. Diederichs, G. Fritz. Structure of the *V. cholerae* Na⁺-pumping NADH:quinone oxidoreductase. *Nature* 516:62-67 (2014).
10. N. Al-Saari, E. Amada, Y. Matsumura, M. Tanaka, S. Mino, T. Sawabe. Understanding the NaCl-dependent behavior of hydrogen production of a marine bacterium, *Vibrio tritonius*. *PeerJ* 7:e6769 (2019).
11. M. Tanaka, S. Endo, F. Kotake et al. *Vibrio aphrogenes* sp. nov., in the Rumoiensis clade isolated from a seaweed. *PLoS One* 12:e0180053 (2017).
12. M. Tanaka, S. Mino, Y. Ogura, T. Hayashi, T. Sawabe. Availability of Nanopore sequences in the genome taxonomy for *Vibrionaceae* systematics: Rumoiensis clade species as a test case. *PeerJ* 6:e5018 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 T. Mami, S. Mino, Y. Ogura, T. Hayashi, T. Sawabe	4. 巻 6
2. 論文標題 Availability of Nanopore sequences in the genome taxonomy for Vibrionaceae systematics: Rumoiensis clade species as a test case	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e5018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.5018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 N. Al-saari, E. Amada, Y. Matsumura, M. Tanaka, S. Mino, T. Sawabe	4. 巻 7
2. 論文標題 Understanding the NaCl-dependent behavior of hydrogen production of a marine bacterium, <i>Vibrio tritonius</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e6769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.6769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 M. Tanaka, S. Mino, T. Sawabe et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 <i>Vibrio aphrogenes</i> sp. nov., in the Rumoiensis clade isolated from a seaweed	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0180053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0180053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮坂信城・美野さやか・澤辺智雄
2. 発表標題 マリンビブリオを生物触媒とした連続的水素生産
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Tanaka, S. Mino, T. Sawabe et al.
2. 発表標題 Comparative Genomics of Ecophysiolegically Unique Rumoiensis Clade Species, Vibrionaceae
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田仲真実, 美野さやか, 澤辺智雄
2. 発表標題 水素生成ビブリオVibrio aphrogenesのゲノムの特徴
3. 学会等名 第52回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮坂信城・美野さやか・澤辺智雄
2. 発表標題 マリンビブリオを生物触媒とした連続的水素生産システムの開発
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田仲真実・美野さやか・澤辺智雄ら
2. 発表標題 アルギン酸から水素を生成可能な新規ビブリオ属細菌の分類学的検討
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 N. Al-saari, S. Mino, T. Sawabe
2. 発表標題 A strategic approach for optimizing the fermentative hydrogen production of <i>Vibrio tritonius</i> AM2T using Design of Experiment
3. 学会等名 第18回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 水越草太・松村祐太・N. Al-saari・美野さやか・澤辺智雄・澤辺桃子
2. 発表標題 <i>Vibrio tritonius</i> AM2株のギ酸水素リアーゼ遺伝子群のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 天田愛梨・松村祐太・N. Al-saari・美野さやか・澤辺智雄・澤辺桃子
2. 発表標題 マリンビブリオを生物触媒としたアルギン酸の水素変換
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 N. Al-saari, Tomoo Sawabe, Y. Marsumura, K. Sato, S. Mino, Toko Sawabe	4. 発行年 2016年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 379(288-294, 286-288)
3. 書名 Molecular Diversity of Environmental Prokaryotes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	美野 さやか (MINO Sayaka) (00755663)	北海道大学・水産科学研究院・助教 (10101)	