

平成30年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14978

研究課題名（和文）海藻バイオマスの効果的物質変換に資するマリンビブリオ触媒の一貫バイオプロセス化

研究課題名（英文）Developments of marine vibrio biocatalysts in efficient conversion of seaweed biomass based on consolidated biological processing approach

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） 2,800,000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、多彩な糖質で構成される海洋バイオマスの効率的利用に適応可能な複数基質の糖化と発酵を統合（一貫バイオプロセス（CBP）化）した生物触媒の開発を行い、アルギン酸分解性マリンビブリオを核としてポリウロン酸、糖アルコール、グルカンを利用可能な海洋細菌触媒および増殖能が高いマリンビブリオを核としてガラクトースからもエタノール生産性の高い株を得た。

研究成果の概要（英文）：An aim of the study is to develop marine microbial biocatalysts implemented multiple substrate utilizing phenotypes based on consolidated biological processing (CBP) in efficient biofuel production. We created new marine vibrio biocatalysts showing 1) polyuronide-sugar alcohol-glucan utilizing phenotype and 2) higher ethanol producing phenotype from D-galactose.

研究分野：微生物学

キーワード：再生可能エネルギー 一貫バイオプロセス 水産学 バイオマス 微生物

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進展しているが、2030年頃を見据えた中長期的生産拡大の展望では国土面積が制限要因となる原料作物の生産がボトルネックとされる。海洋バイオマスはこのボトルネックを解消する潜在性があり、かつ大型褐藻類の約3割(dw)を占めるものの酸化度が高く、バイオ燃料への生物変換が極めて困難なアルギン酸をエタノールへと変換可能な陸生細菌触媒が創出されている(e.g. 京都大学 *Ener Environ Sci*, 4, 2575, 2011; アメリカ企業 *Science*, 335, 308, 2012)。しかし、海藻バイオマス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や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持続する「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。

申請者は、これまでに、科研費補助金・新学術ゲノム支援活動・水産庁所管事業・JST国際交流事業を通じ、高塩分条件下で海藻に含まれる糖質を発酵し、エタノールや水素を生成可能なマリニビブリオを見だし、これらの全ゲノム配列決定や海藻糖質代謝のダイナミクスの理解を進めてきた(Springer *Handbook of Marine Biotechnol.*, 1163, 2015)。また、挑戦的萌芽研究(H23-25)などの成果として「アルギン酸からエタノールを生成する代謝改変マリニビブリオの創出」に成功し、この生物触媒は糖アルコールとの共代謝によりアルギン酸からのエタノール生産を相乗的に高めることを見いだした。この成果は、多彩な糖質を含む海洋バイオマスを一種の生物触媒で効果的に燃料変換する新技術の開発に挑戦するアイデアを着想するモチベーションとなった。

CBPは糖化と発酵を統合化した生物触媒を用いるプロセスで、燃料やファインケミカルなどの物質変換プロセスのコストダウンや効率化に有効である。陸上セルロース系バイオマスの変換技術基盤が蓄積しているが、海洋バイオマスを対象としたCBP化生物触媒の研究例は極めて少ない。申請する研究課題では、海洋バイオマス(大型海藻や微細藻)を構成する糖質であるグルカン・ガラクトン・ポリウロン酸・糖アルコールを同時に分解・利用・物質変換する「複数の基質利用系を有するCBP(msCBP)生物触媒」の開発を進める。

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燃料の生産に向け、海洋バイオマスの燃料変換技術の基盤強化が必要である。申請者は科学研究費挑戦的萌芽研究などの支援を受け、海藻特有の糖質をエタノールや水素に変換する新規マリニビブリオを得て、これを核とした「アルギン酸からエタノールを生産可能な代謝改変マリニビブリオ株の構築に初めて成功し」、かつ還元度の高い糖質とアルギン酸の共代謝がアルギン酸からのエタノール生産効率を相乗的に高めることを見いだした。多彩な糖質で構成される海洋バイオマスの効率的利用に適応可能な複数基質の糖化と発酵を統合(一貫バイオプロセス(CBP)化)した生物触媒の開発は理想的であるため、本課題では、海藻糖質からの燃料生産効率を向上させうるmsCBP化した海洋微生物触媒の創出に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 海洋微生物ゲノムおよびメタゲノム解析
各地の海域や公的機関から得た微生物株や海洋試料から核酸を抽出精製し、それをもとに常法に従いドラフトゲノム塩基配列を得た。また、一部の細菌ではロングリード配列を取得し、可能な限り完全なゲノム配列の構築をすすめた。

(2) *Vibrio haliotocoli* の msCBP 化

V. haliotocoli はアルギン酸の分解能および利用能を有し、マンニトールからのエタノール生産が可能である。*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の遺伝子カセット(PETオペロン)を本菌に組み込むことにより、アルギン酸からのエタノール生産が達成されている。しかし、本菌はデンプンの分解および利用系遺伝子は有するものの、デンプン分解の表現形質は観察されない。本菌を、ポリウロン酸と糖アルコールに加え、グルカン利用能を付加するため他種ビブリオ由来のアミラーゼ遺伝子を組み込んだ。

(3) *Vibrio natriegens* の msCBP 化

上述した *V. haliotocoli* はガラクトースおよびガラクトンの利用系をもたない。ガラクトンを基質とした発酵動態の基礎を理解するために *V. natriegens* に PET オペロンを導入し、ガラクトースからのエタノール生成動態およびガラクトースと他の糖質が共存する場合のエタノール生成動態を調べた。なお、*V. natriegens* は細菌の中で最も分裂速度が速い菌として知られ、近年、遺伝子組換え系の構築が進んでいる株でもあり、海洋微生物触媒を作出する上で多くの利点をもつ。

4. 研究成果

(1) msCBP 化に資する個別海洋細菌ゲノム情報の取得と解析

Vibrio natriegens, *Pseudoalteromonas carragenovora* を含む 7 種の海洋細菌のドラフトゲノムを得た。後述する *V. natriegens* では、デンプンの分解に加え、グルコース、ガラクトース、マンニトールの利用に必要な遺伝子セットを有し(図1),その表現形質も確認された。なお、これらの遺伝子解析の折、ピブリオ科の新属と同定される2種の株を見だし (*Thaumasiovibrio occultus* gen. nov., s. nov. および *Thaumasiovibrio subtropicus* sp. nov.として提案),一方はN-アセチルグルコサミン利用が可能であった。また、*Vibrio halioticoli* においては完全ゲノムを構築することができ、アルギン酸やマンニトールに加え、デンプン、キチン、セロピオースの利用に關与する遺伝子セットを有していた。

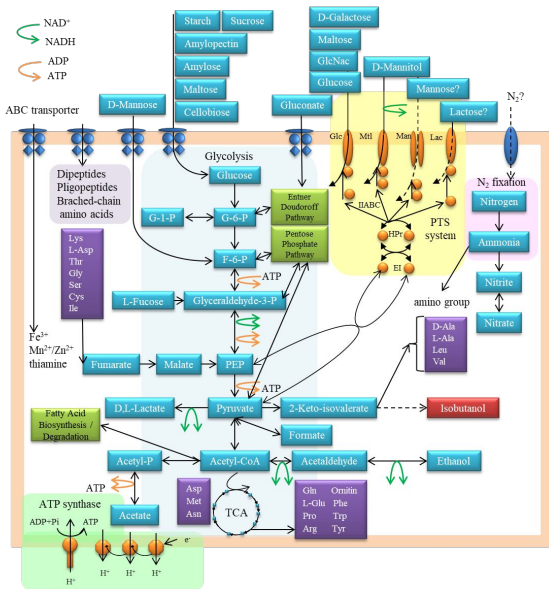


図1. *Vibrio natriegens* のゲノム解析で予想された代謝系。

(2) *Vibrio halioticoli* の msCBP 化

V. halioticoli はアルギン酸の利用性に加え、デンプンの利用に關する遺伝子セットも有する。しかし、この細菌の表現形質として、アルギン酸分解利用能は有するものの、デンプンの分解および利用能は觀察されない。他種のピブリオが有するアミラーゼ遺伝子を *V. halioticoli* に導入したところ、デンプン分解能が付与されるとともに、増殖およびエタノール生産性が向上した(図2)。ポリウロン酸に加え、グルカン利用能を有する株に改変可能であることを示した。

(3) *Vibrio natriegens* の msCBP 化

世界で最も速く増殖し、グルコース、ガラクトース、マンニトールを基質として発酵を行うことができる *V. natriegens* の msCBP 化を進展させた。本菌に、*Zymomonas mobilis* 由来のピルビン酸脱炭酸酵素 (*pdc*) とアルコール脱水素酵素 II (*adhII*) 遺伝子カセットである PET オペロンを組み込んだ。この組

換え株を用いて海藻バイオマスの構成単糖を用いたエタノール産生ダイナミクスを調べた結果、D-ガラクトースを基質とした場合においても 9 g/L を超えるエタノール生成が可能な条件を見いだした(図3), D-グルコース存在時に強いカタボライト抑制が觀察されたが、共存するグルコースの添加量が低い場合やグルコースの添加時期を遅らせることで、糖共存時にガラクトースからのエタノール生成も可能である条件を見いだした。*V. natriegens* は相同組換えなどの様々な遺伝子組換え技術が多数報告されるようになっているため、mCBP 化の最適条件設定に資する優れた海洋微生物触媒になる。

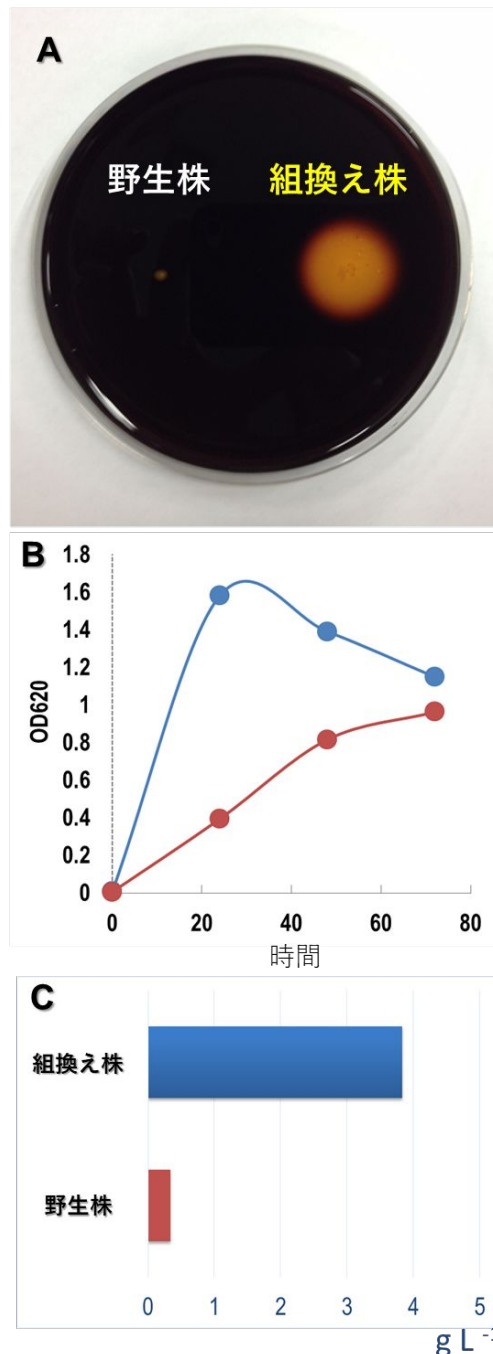


図2. *Vibrio halioticoli* へのアミラーゼ遺伝子の導入. A:デンプン分解性付与, B: 増殖の向上, C: エタノール生産性の向上.

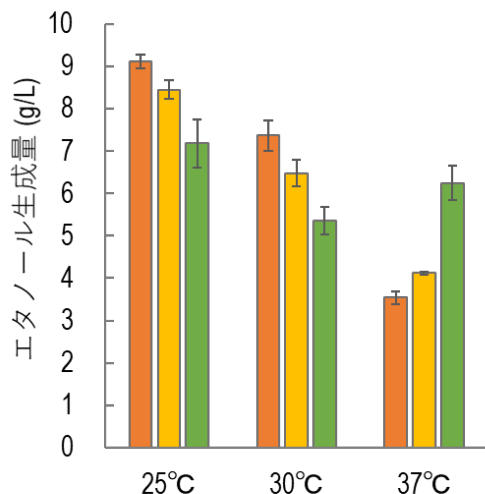


図3. *Vibrio natriegens*:PET 株による D-ガラクトースからのエタノールの生成. オレンジ: pH 6.5, 黄色: pH 7.0, 緑: pH 7.5.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

A.K.M. Rohul Amin, Mami Tanaka, Nurhidayu Al-saari, Feng Gao, Sayaka Mino, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Pedro Milet Meirelles, Fabiano L. Thompson, Bruno Gomez-Gil, Toko Sawabe, and Tomoo Sawabe, 2017, *Thaumasiovibrio occultus* gen. nov., sp. nov., and *Thaumasiovibrio subtropicus* sp. nov., within the family *Vibrionaceae*, isolated from coral reef seawater off Ishigaki Island, Japan, Syst. Appl. Microbiol. 40:290-296. doi: 10.1016/j.syapm.2017.04.003. 査読有.

〔学会発表〕(計1件)

吉藤千織・美野さやか・澤辺智雄, 海洋バイオマスからのバイオ燃料生産に適する海洋微生物触媒の一環バイオプロセス化, ConBio2017 2017年12月6日~12月9日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

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

美野さやか (MINO SAYAKA)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教
研究者番号: 00755663