

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12848

研究課題名(和文)新種の海藻分解菌Myt-1株による廃棄海藻の減容化と持続可能な再活用法の開発

研究課題名(英文) Reduction of waste seaweeds by a novel seaweed-degrading bacterium strain Myt-1 and development of sustainable recycling methods

研究代表者

酒徳 昭宏 (SAKATOKU, Akihiro)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：20713142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食品加工場などから年間数万tが廃棄されている海藻残渣や、沿岸域に漂着する流れ藻を「マリンバイオマス」として捉えた持続可能な有効活用法の開発は重要な研究課題である。申請者は、複数種の海藻藻体を分解することができるSaccharophagus属の「新種(My-1株)」を富山湾の海底堆積物から単離することに世界で初めて成功した。

本研究では、Myt-1株が産生する海藻分解産物の有効性を検証し、Myt-1株から海藻多糖分解酵素をクローニングしてその特徴を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも海藻藻体そのものを分解することができる細菌の単離報告はあるが、褐藻、紅藻、緑藻の3種全ての海藻藻体を分解できる細菌の報告はほとんどない。そのような中、我々は、富山湾の海底堆積物から3種全ての海藻藻体を分解できる細菌(My-1株)の単離に成功した。

このMyt-1株が海藻を分解することによって産生したオリゴ糖には、抗酸化活性が認められたことから、廃棄海藻をマリンバイオマスとして捉えた有効利用に繋がる可能性が強く示唆された。さらに、Myt-1株が産生するアルギン酸リアーゼ(AlgMytE)は耐塩性と界面活性剤耐性が高く、様々な産業への利用が期待された。

研究成果の概要(英文)：It is an important research subject to develop the sustainable and effective utilization of seaweed waste as "marine biomass". We isolated a novel Saccharophagus species (strain Myt-1), which can degrade several types of seaweed, from marine sediment of Toyama Bay. In this study, the effectiveness of seaweed degradation products produced by Myt-1 strain was verified, and polysaccharides degrading enzymes were cloned from strain Myt-1, and the features were analyzed.

研究分野：環境微生物学

キーワード：海藻分解菌 バイオマス 廃棄海藻 多糖分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界における海藻の年間の収穫量は、2014年度の報告で約2,380万tと大量であり(国際農林業協働協会2014, 世界漁業・養殖業白書), 食品だけでなく, 機能性素材, 医薬品, 化粧品, バイオマス燃料, 養殖用餌料など様々な分野で利用されつつある。しかし, そのような利用の過程で, 色落ちした藻体, 藻体断片, 根, 茎などの廃棄される海藻残渣も多量に発生している。その量は, 日本国内のワカメだけでも20万t以上になると試算されている。一方で, 海洋の富栄養化や海藻養殖域の拡大によって, 沿岸域への漂着海藻やアオサなどの異常発生も増え, それらが枯死・腐敗し, 悪臭を発生させる問題も増加しつつある。このような廃棄海藻の処理に, 横浜市では, 年間約4,000万円もの費用を費やしている。現在, これら海藻残渣や漂着海藻は, そのほとんどが埋立・焼却処分されていることから, その減容化や活用が期待されている。

海藻は, 褐藻類, 紅藻類, 緑藻類の3種類に分類され, 構成している多糖類の種類や量が異なっていることが知られている。これまでも, 世界中で海藻やその構成多糖類の分解細菌の単離が報告されてきたが, それらは1菌株で1種類の藻体の分解しか報告されていなかった。さらに, 海藻藻体の分解様式を詳細に調べた報告もない。そのような中, 我々は, 2009年に富山湾の堆積物中から3種全ての海藻藻体を分解できる *Saccharophagus* 属の「新種 (Myt-1株)」の単離に成功した。予備的な実験の結果, 本菌株は10種類以上の海藻多糖類を分解することができたことから, 多くの多糖類分解酵素遺伝子をゲノム上に持っていると考えられた。さらに, これまでに Myt-1 株の DNA からショットガンクローニング法によって単離した1つのアルギン酸リアーゼと1つのセルラーゼの酵素学的な諸性質は, 好アルカリ性 (pH 9.0-10.0) であつたり, 界面活性剤耐性が非常に高かつたりと, 既報の酵素と比べて大変新規性の高いものだった。

2. 研究の目的

我々は, これまでに, 世界で初めて複数種の海藻藻体を分解できる *Saccharophagus* 属の新種, Myt-1 株を富山湾の海底堆積物から分離することに成功した。さらに, ショットガン法によって2つの多糖分解酵素遺伝子の単離し, 大腸菌により大量発現させた産物の酵素学的諸性質を報告してきた。そこで, Myt-1 株を用いて, 廃棄海藻をマリンバイオマスとして捉えた持続可能な有効活用を目指して, 本申請では, Myt-1 株の培養日数毎の海藻分解様式を詳細に調べるとともに, Myt-1 株が増殖し, 且つ, 海藻を分解できる最小の栄養素を探る。また, Myt-1 株の海藻藻体そのものの分解機構を解明するために, 次世代シーケンサーを用いて, Myt-1 株が持つ多糖類分解酵素遺伝子の網羅的な検出を行う。そして, 検出された多糖類分解酵素の様々な酵素学的諸性質について詳細に調べる。また, 海洋生態系における海藻分解菌の役割を推定する第一歩として, 富山湾の海藻分解菌の密度, 季節的な出現・消失など分布調査も行い, 基礎的知見を蓄積する。

3. 研究の方法

- (1). 各海藻種に対する藻体分解活性の測定: Myt-1 株を緑藻, 褐藻, 紅藻などの藻体断片を含む培養液に植菌し, その後, 一定時間毎に試料を採取し, 位相差顕微鏡と血球計算盤を用いて, 単細胞体の数や大きさを計測することで, 分解・細粒化の速度(分解活性)を調べる。さらに, 培地中に含ませる海藻の種類を変化させ, 培養日数毎に発現している分解酵素の活性を詳細に測定する。まず, 各種海藻藻体断片の入った培地で Myt-1 株を培養し, その上澄試料を得る。得た試料を, 各種多糖を含んだ buffer 中で一定時間反応させ, 産生された還元糖量を測定することで酵素活性を算出する。
- (2). 分解に必要な栄養素の探索: 廃棄海藻の持続可能な有効活用を目指して, 天然海水を基本として, 細菌が増殖し, 且つ, 海藻を分解できる最小の栄養素を探る。
- (3). 多糖分解酵素遺伝子の網羅的検出: Myt-1 株のゲノム中に存在する多糖分解酵素遺伝子を次世代シーケンサー (miseq) を用いて網羅的に検出する。
- (4). 多糖分解酵素の大量発現系の構築と精製・酵素学的諸性質の検討: 同定した遺伝子と発現用 pET ベクター, 発現用大腸菌 BL21 を用いて各種酵素を大量発現させ, Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィで精製する。その後, 得られた酵素(発現産物)の至適温度や至適 pH, 耐熱性, 金属イオンやキレート剤, 界面活性剤の活性への影響など酵素学的諸性質を調べる。
- (5). 富山湾における海藻分解菌の分布調査: 海水中の海藻分解菌の分布域を調べるために, ワカメ藻体を含んだ培地による培養法と 16S rRNA 遺伝子やセルラーゼ遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法によって, 富山湾沿岸域の海水から海藻分解菌の検出・分離を試みる。なお, サンプルング定点は, 富山湾全体を網羅できるようにする。

4. 研究成果

- (1). 各海藻種に対する藻体分解活性の測定: 褐藻類 (ワカメ・コンブ), 緑藻類 (アオサ), 紅

藻類（マクサ）に対する藻体分解活性を測定した。その結果、3種全ての藻体の細粒化を再確認するとともに、特に褐藻類の分解が顕著であることが明らかとなった（図1）。さらに、培養液上澄中の還元糖量と分解に關与する多糖類分解酵素（アルギン酸リアーゼ、セルラーゼ、アガラーゼ）の活性を測定した結果、細菌の増殖や藻体の分解に伴って、酵素活性及び還元糖量が増加していくことが明らかとなり、酵素遺伝子の単離や糖類の機能性に期待が持たれた。

(2). 分解に必要な栄養素の探索：廃棄海藻の持続可能な有効利用を目指して、分解に必要な栄養素の探索を行った。天然海水を基本として、様々な濃度・種類のリン源、窒素源、ビタミン源を添加することで、細菌が増殖し、且つ、海藻を分解できる最小の栄養素を探った結果、0.1% (w/v) 無機態窒素を添加するだけで速い増殖と強い分解が見られた。

(3). 多糖分解酵素遺伝子の網羅的検出：研究成果1に示したように、1種類の細菌株が複数種の海藻藻体を分解できる報告はこれまでにない。この結果から、Myt-1株は海藻藻体を構成する各種多糖類の分解酵素を複数持っている可能性が強く示唆された。そこで、Myt-1株のゲノム中に存在する多糖分解酵素遺伝子を次世代シーケンサー (miseq) を用いて網羅的に検出することを試みた。その結果、驚いたことに、Myt-1株は93種類もの多糖分解酵素遺伝子を保持していることが明らかとなった。

(4). 多糖分解酵素の大量発現系の構築と精製・酵素学的諸性質の検討：研究成果3で検出した93種類の多糖分解酵素遺伝子の中でも新規性の高かったアルギン酸リアーゼ (AlgMytE) について、大量発現系の構築とその発現産物の特徴を解析した。その結果、AlgMytEはこれまでに4報しかないPL family18に属しており、AlgMytEは1M NaCl存在下でも最大活性の75%の活性を示したことから高い耐塩性を持っていた。また、0.01%の様々な界面活性剤存在下でも無添加時の60%以上の活性を保持していたことから、高い界面活性剤耐性を持つと考えられた。さらに、TLCを用いてAlgMytEによるアルギン酸ナトリウムの分解産物を調べた結果、3-5糖を主に生成するとともに、微量ながら2糖も産生した。このような分解様式を示すアルギン酸リアーゼはこれまでに報告例がない。

(5). 富山湾における海藻分解菌の分布調査：DGGEを用いて富山湾表層海水中に生息する海藻分解菌の分布調査を行った。その結果、複数種の海藻分解菌が年間を通して生息しており、それらの群集構造は湾全体で比較的均一で、緩やかに季節変動している可能性が示唆された。さらに、採取する年度に関わらず、同じ月の群集構造は非常に似ていたことから、富山湾沿岸の海藻分解菌の群集構造は緩やかな季節変動をしながら、周年性を持つことが推察された。

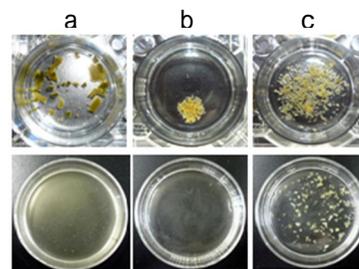


図1. Myt-1株による海藻藻体分解の様子。a: ワカメ (褐藻類), b: マクサ (紅藻類), c: アオサ (緑藻類)。上段: 植菌直後, 下段: 培養7日後。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akihiro Sakatoku, Takuya Fujimura, Michiko Ito, Seigo Takashima, Tadashi Isshiki	4. 巻 493
2. 論文標題 Newly isolated bacterium <i>Tenacibaculum</i> sp. strain Pbs-1 from diseased pearl oysters is associated with black-spot shell disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 61-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2018.04.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kai Jiang, Jing Zhang, Akihiro Sakatoku, Shota Kambayashi, Toshiro Yamanaka, Toshiyuki Kanehara, Katsunori Fujikura, Vivian Helena Pellizari	4. 巻 8
2. 論文標題 Discovery and biogeochemistry of asphalt seeps in the North Sao Paulo Plateau, Brazilian Margin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30928-2	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 該当する

1. 著者名 Tanaka Daisuke, Sato Kei, Goto Motoshi, Fujiyoshi So, Maruyama Fumito, Takato Shunsuke, Shimada Takamune, Sakatoku Akihiro, Aoki Kazuma, Nakamura Shogo	4. 巻 7
2. 論文標題 Airborne Microbial Communities at High-Altitude and Suburban Sites in Toyama, Japan Suggest a New Perspective for Bioprospecting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2019.00012	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下陽也, 田中大祐, 中村省吾, 酒徳昭宏
2. 発表標題 新規海藻分解菌 <i>Zobellia</i> sp. TY-1株の単離とキャラクターゼーション
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山拓生, 田中大祐, 中村省吾, 酒徳昭宏
2. 発表標題 富山湾表層海水中の海藻分解菌の分布
3. 学会等名 第19回マリンバイオテクノロジー学会仙台大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川雅仁, 田中大祐, 中村省吾, 酒徳昭宏
2. 発表標題 海藻分解菌Saccharophagus sp. Myt-1株の海藻分解機構
3. 学会等名 第19回マリンバイオテクノロジー学会仙台大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒徳昭宏
2. 発表標題 廃棄海藻の減容化とマリンバイオマスとして捉えた有効利用
3. 学会等名 平成29年度日本応用糖質科学会東日本支部ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro SAKATOKU
2. 発表標題 Isolation and characterization of a novel seaweed-degrading bacterium
3. 学会等名 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION (Universidad de La Frontera, Temuco, Chile) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----