HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Hydrogen-producing ability and its ecophysiological roles in vibrios [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	松村, 佑太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13102号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70175
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Matsumura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：松　村　佑　太

学位論文題目

Hydrogen-producing ability and its ecophysiological roles in vibrios
（ビブリオ属細菌の水素生産能とその生理生態学的役割）

微生物による発酵的水素生産は，再生可能かつカーボンニュートラルなエネルギー生産系として，その技術の応用展開が期待されている。海洋バイオマスである大型海藻類は高い生産性と炭水化物量，そしてリグニンを含まない特性から発酵基質として優れている一方，藻体に多く含まれる塩分が微生物の水素生産を阻害することが課題となっている。そこで，海藻を基質とした高効率な水素生産を達成するため，本研究では海産軟体動物の消化管から単離した新種のビブリオ属細菌 *Vibrio tritonius* AM2 株の有する塩存在下における水素生産能に着目した。

微生物の有する水素生産能については腸内細菌や一部の好熱性細菌で研究が大きく進展しており，アミノ酸配列や構成するサブユニットの特徴から様々なタイプのヒドロゲナーゼ複合体がその役割を担っていることが知られている。海洋に広く分布するビブリオ属細菌は現在までに百種以上が記載されているが，水素生産能が確認されているのは僅か 11 種のみである。そのため，ビブリオ属細菌の水素生産能とその制御因子，さらには水素生産能の生理生態学的な役割については未だ不明な点が多い。そこで本研究では，水素生成能の比較解析およびゲノミクス・トランスクリプトミクスを駆使したアプローチにより，ビブリオ属細菌の水素生産能と遺伝子レベルでの制御因子の解明を試みた。さらに，取得したゲノム情報に基づき生理生態学および進化的な側面からもビブリオの有する水素生産能の役割について考察した。

まず，*V. tritonius* AM2 株の塩存在下における水素生産能を評価するために，pH 制御とガス捕集バッグを備えた 100 mL スケールの回分培養システムを構築した。この培養システムを用いた様々な pH や温度制御のもと，5% (w/v) のグルコースまたは海藻糖質の 1 つであるマンニトールを含むマリンブロスを用いて，AM2 株の水素生産能を評価した。その結果，pH 6.0, 37°C の条件下で水素収率は 1.7 mol H_2/mol マンニトールに達し，これは理論値の 85% に相当する値であった。また，pH 5.5 から 7.5 の範囲においてマンニトールはグルコースよ

りも高い水素収率を示し，マンニトールがAM2株の水素生産のための基質として優れていることが示された。さらに，決定した至適pH，温度条件下において，31.1% (w/w) のマンニトールを含む褐藻粉末を基質とした場合においても，本菌は1.6 mol H_2/mol マンニトールの収率で水素を生産した。以上，*V. tritonius* は塩存在下において海藻糖質から高い効率で水素を生産する能力を有していることを明らかにした。

次に，水素生産に関わる遺伝子を同定するために，454 GS FLX Titanium システム (Roche社) と MiSeq (illumina社) を用いて AM2 株の全ゲノム配列を決定した。Blast によるアノテーションの結果，第一染色体上に[NiFe]-ヒドロゲナーゼとギ酸デヒドロゲナーゼ (Fdh-H) の合成に必要な21遺伝子からなる全長約24 kbのギ酸水素リアーゼ複合体（FHL）遺伝子およびその形成にかかわるタンパク質遺伝子クラスターを同定した。本菌ゲノムからは，これ以外のヒドロゲナーゼ遺伝子は同定されなかった。アミノ酸配列のモチーフ解析により，ヒドロゲナーゼの大サブユニットにニッケル結合領域が見いだされたため，AM2株のヒドロゲナーゼが[NiFe]タイプであることを支持した。さらに，AM2株のヒドロゲナーゼ複合体は膜貫通サブユニットを含む点で大腸菌の Hyf 複合体と類似していた。また，Hyf 複合体中の主要タンパク質遺伝子である *hyfG* 遺伝子の発現量を定量 PCR により測定した結果，pH の低下に従って遺伝子発現量は増加し，*V. tritonius* の pH 依存的水素生産と相関した。以上，*V. tritonius* は酸性条件下で Hyf 駆動型の水素生産を行うことを示唆した。

Hyf 複合体遺伝子群は大腸菌ゲノム上においても同定されている。しかし，大腸菌野生株ではその遺伝子群はほとんど発現していないことが報告されており，その機能特性の解明が求められている。唯一，大腸菌遺伝子の類似度解析から，Hyf 複合体は Group 4 に分類される[NiFe]-ヒドロゲナーゼを有し，膜貫通サブユニットを介したプロトン輸送能と共役したエネルギー合成能を持つ可能性が指摘されている。従って，*V. tritonius* の Hyf 複合体はその発現制御因子，酵素活性，生化学的機能，さらにはヒドロゲナーゼの分子進化プロセスの解明に適した研究対象と考えられる。そこで，*V. tritonius* とは異なる7種の水素生産ビブリオのドラフトゲノム配列を新たに取得し，水素生産能と保有遺伝子の比較解析を行うことで，ビブリオ属細菌の水素生産能を制御する遺伝的因子の探索を試みた。その結果，1) *V. porteresiae* と *V. tritonius* が分類される Porteresiae クレードの菌株の水素収率が最も高いこと，2) Porteresiae および Gazogenes クレード種 (*Vibrio gazogenes*, *Vibrio rhizosphaerae*, *Vibrio ruber*, *Vibrio aerogenes*) は類似したエネルギー保存型 FHL 複合体遺伝子群を有すること，3) Cholerae クレードに分離される *V. furnissii* の FHL 複合体はプロトン輸送能を有し

ていないことが示唆された。また，大染色体上の全 CDS と FHL 遺伝子群間のコドン使用頻度が類似していたことから，*V. tritonius* の FHL 遺伝子群は最近の水平伝播により獲得されたものではないことが示唆された。さらに興味深いことに，Porteresiae クレード種のみがゲノム上にニッケル ABC 輸送体をコードする *nik* オペロンおよびニッケル-コバルト透過酵素遺伝子を有しており，一方で他の水素生産ビブリオはニッケル輸送体遺伝子 (*hupE*) のみを有することが明らかになった。この結果より，Hyf 複合体の活性の主要な役割を担うニッケルの獲得形態がビブリオ属細菌の水素生産能に影響するものと推察した。

一方，AM2 株のトランスクリプトーム解析を行った結果，マンニトールを基質とした発酵代謝時に呼吸鎖に関わる遺伝子発現が低下している一方で，Hyf 複合体および FoF1-ATP 合成酵素の遺伝子発現が有意に上昇していることが明らかになった。この遺伝子発現プロファイルは Hyf 複合体のエネルギー保存モデルを支持した。さらに，ギ酸添加時に Hyf 複合体の遺伝子発現の上昇が確認されたことから，*V. tritonius* の有する FHL 複合体遺伝子群はギ酸により発現が制御されるギ酸レギュロンを構成している可能性が高く，大腸菌で報告されている制御系と類似していることが示唆された。

以上の結果から，本研究により 1) *V. tritonius* は塩存在下においても海藻糖質から高効率な水素生産を行うこと，2) Hyf 複合体によりエネルギー合成と共役した水素生産を行う可能性があること，3) ニッケル輸送能がビブリオ属細菌の水素生産能の制御因子である可能性があること，および 4) *V. tritonius* の FHL 遺伝子群はギ酸レギュロンであること，が示された。また，*V. tritonius* の有する高効率な Hyf 駆動型水素生産は海洋性軟体動物消化管という嫌気的かつ海藻糖質の豊富な環境において効率的行われ，エネルギー代謝にも貢献する点で生存に有利に働いていることが推察された。