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_review.pdf, 審査の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：松　村　佑　太

| | | |
|---|---|---|
| 審査委員 | 主査　教授 | 尾島　孝男 |
| | 副査　教授 | 澤辺　智雄 |
| | 副査　助教 | 美野　さやか |

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。このため海藻バイオマスを基質とした高効率な水素生産を達成するためには，これらの問題の解決に資する新規海洋微生物触媒の開発が必要不可欠である。本研究では海産軟体動物の消化腺から単離した新種のビブリオ属細菌 *Vibrio tritonius* AM2 株が塩存在下においても高い水素生産能を示すことから，本菌の水素生成機構の解明を目的とし，水素生成能の比較生理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水素生成に関与する因子の同定を進め，本菌が特有のギ酸水素リアーゼ複合体を有することを明らかにした。特に評価される成果は以下の通りである。

1. *V. tritonius* AM2 株の塩存在下における水素生産能を評価したところ，培地の pH および温度をそれぞれ 6.0 および 37°C とした条件下で水素収率は 1.7 mol $H_2$/mol マンニトールに達した。これは理論収率の 85%に相当する高い値である。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，マンニトールは AM2 株の水素生産のための基質として優れていた。さらに，この培養条件下において，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。

2. 次に, AM2 株の全ゲノム配列を決定し，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（FHL）複合体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。ヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードする遺伝子に，ニッケル結合モチーフが見いだされたため, AM2 株のヒドロゲナーゼは[NiFe]タイプと判断した。
3. さらに 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い，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 (*V. gazogenes, V. rhizosphaerae, V. ruber, V. 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に関与する遺伝子を持たないことを明らかにした。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*) のみを有することを明らかにした。
4. 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を行えることが指摘されている。AM2 株のトランスクリプトーム解析により，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を明らかにした。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の類似性を示唆した。

以上，*V. tritonius* が海水塩存在下においても海藻糖質から高い効率で水素を生産可能な新規海洋微生物であることを明らかにし，海藻バイオマスを原料としたプラクティカルな水素生産に活用できることを示した。さらに，その水素生成は，大腸菌では存在が指摘されていたものの遺伝子発現が認められなかったことからベールに包まれていた，Hyf 型 FHL 複合体により行われることを見いだした。これは水素生成と共役してエネルギー合成を駆動させることができる複合体とも考えられていることから，生体エネルギー研究分野にも一石を投じる成果でもある。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。