

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	渡邊 幸夫
論文題目	Molecular breeding of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for effective ammonia production from food processing wastes (食品加工廃棄物から効果的なアンモニア生産のための酵母の合成生物学的育種)		
(論文内容の要旨)			
<p>アンモニアは、100年以上も前からハーバー・ボッシュ法で高温・高圧下でつくられ、肥料原料として貢献してきたが、その製造へのエネルギーは地球温暖化の一因でもある。国連でSDGsが宣言されて以来、研究者の間では環境への取り組みへの関心が高まっている。SDGsには、地球温暖化やクリーンエネルギーなどの環境問題についての宣言が含まれているが、これらの問題は膨大な量の化石燃料の消費によって引き起こされたものであり、気候変動や海洋酸性化の原因となっている。そこで、バイオ燃料のような代替エネルギーを利用した持続可能な社会づくりが必要とされている。代表的なバイオ燃料はバイオエタノールであるが、次世代バイオ燃料としてアンモニアにも注目が集まり始めている。炭素を原料とするエタノールは、燃焼後に二酸化炭素を発生させる。一方、アンモニアは完全分解時に水と窒素のみを排出するため、環境に温室効果ガスを排出せず、より環境に優しいカーボンフリーの燃料と考えられている。また、水素発生アンモニア燃料電池が普及すれば、水素エネルギーの液体キャリアとなる。一方、近年、先進国を中心に大量に食品廃棄物が排出されており、食品ロスなど環境問題に影響を与えている。例えば、食品加工廃棄物である大豆残渣(オカラ)を土壌に埋め立ててしまうと、土壌環境中の微生物の働きにより二酸化窒素が発生し、環境に負荷をかけてしまう。</p> <p>したがって、本研究では、食品加工廃棄物からアンモニアを製造し、より環境にやさしいバイオ燃料を生産するための有効な手段を開発することを目的として研究を行った。</p>			
1. 細胞表層工学による細胞外でのグルタミンからのアンモニア生産			
<p>生物の生育に重要なアミノ酸であるグルタミンからアンモニアを生産するには、細胞内の代謝に影響しないよう、細胞外でアンモニアへの変換を行う必要がある。産業的に様々な利点を持つ酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> は、アンモニア同化能が強く、直接アンモニア同化にかかわる遺伝子をノックアウトすると生育に悪影響が出る。そのため、まず、酵母細胞表層上にグルタミンからアンモニアを生産する酵素であるグルタミンアンモニアリアーゼを提示することで、効率よくグルタミンからアンモニアを生産することを目的とした。</p> <p>強力なグルタミンアンモニアリアーゼ活性を持つ酵素として、大腸菌 <i>Escherichia coli</i> 由来の酵素グルタミナーゼ(YbaS)が知られている。本酵素は、大腸菌が宿主の大腸に住み着く過程で、胃酸による分解を中和によって防ぐ目的で生産される。YbaSを酵母細胞表層上に提示するため、YbaSのN末端側に分泌シグナル、C末端側に GPI アンカーアタッチメントシグナル配列を含んだ酵母細胞壁アンカータンパク質であるα-アグルチニンの遺伝子を融合して、YbaS提示酵母を作製した。作製した YbaS 提示酵母を177 mMグルタミン水溶液と反応させたところ、アンモニアを83.2%の収率で生産した。さらに、これまでほとんど行われてこなかった、実際の食品加工廃棄物の一つである「オカラ」をセルラーゼとプロテアーゼで前処理し、反応に供したところ、前処理「オカラ」中に含まれるグルタミンから高収率でアンモニアを生産することに成功した。</p>			

2. L-アミノ酸オキシダーゼによるアミノ酸混合溶液からのアンモニア生産

ワカフサタケ属の一種 *Hebeloma cylindrosporum* は、タンパク質構成アミノ酸の多くを効率よく分解し、アンモニアを生産できる。これは本菌が生産するL-アミノ酸オキシダーゼの基質特異性が低いためである。本菌は、この特異性の低さを利用して土壌中の窒素源である多様なアミノ酸を分解し、アンモニアとして摂取するという本菌の生態メカニズムを特徴づけている。しかし、この酵素の研究や利用はあまり進んでいない。本研究では、*H. cylindrosporum* 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ

(HcLAAO) を、細胞表層工学の手法を用いて酵母細胞表層上に提示し、混合アミノ酸溶液からのアンモニア生産に供した。

L-アミノ酸オキシダーゼは、通常補酵素として FAD を必要とすることが知られていたため、FAD の添加による混合アミノ酸溶液からのアンモニア生産を検討した。

HcLAAO 提示酵母は FAD を添加しなかった場合においても、FAD を添加した場合と同様にアミノ酸混合溶液からアンモニアを生産できた。FAD はアミノ酸オキシダーゼと生合成時に共有結合を形成する可能性がすでに報告されていたため、本研究で用いた HcLAAO も細胞内ですでに FAD を共有結合している可能性が示唆された。

HcLAAO の発現条件検討を行ったのち、最適な条件でアミノ酸混合溶液からのアンモニア生産を行った。その結果、各アミノ酸を1 mMを含む20 mM のアミノ酸混合溶液から 12.6 mM のアンモニアを生産できた。これは理論収率の63.0%であった。

HcLAAO がアミノ酸混合溶液からアンモニアを効率よく生産できることが示されたため、前処理した「オカラ」懸濁液を用いてアンモニア生産を行った。結果として、前章で使用した YbaS 提示酵母に比べて「オカラ」1g あたり、3倍以上の濃度のアンモニア生産に成功し、変換効率としてはこれまで報告されている中で最も高かった。以上のように、細胞に提示した HcLAAO によって食品加工廃棄物のアミノ酸からアンモニアを効率よく生産できる系の構築に成功した。

3. L-アミノ酸デアミナーゼ提示酵母によるアミノ酸混合溶液からのアンモニア生産効率の向上

H. cylindrosporum 由来の L-アミノ酸オキシダーゼは、20種のタンパク質構成アミノ酸のうち、12種類からアンモニア生産を行うことができるが、親水性アミノ酸のセリン・スレオニンや、分岐鎖アミノ酸のバリン・イソロイシン、ほかにはプロリンやグリシンなどに対して活性を示さない。現在知られている酵素の中で、これらのアミノ酸に対して活性を示す、*S. cerevisiae* 由来のセリン・スレオニンデアミナーゼである CHA1 とスレオニンデアミナーゼ Ilv1、*Bacillus subtilis* 由来グリシンオキシダーゼ yjbR などがある。それらを提示した酵母株のうち、CHA1 提示株は、HcLAAO の基質には適合しなかったセリンからアンモニアを生産できた。CHA1 提示酵母と HcLAAO 提示酵母を最適比で混合し反応に供した結果、HcLAAO 提示酵母単独の場合に比べて実際アンモニア生産量が約1.2倍に向上した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

世界のアンモニアの生産方法はハーバー・ボッシュ法に依存しており、その生産方法は膨大な化石燃料を使用することから環境への負担が大きいため、アンモニアの持続可能な方法での生産は世界規模で重要な課題である。本研究では、酵母細胞表層工学を用いることで、世界的にこれまで有効利用されてこなかった食品加工廃棄物としての「オカラ」からアンモニアを生産する技術を開発した。成果として評価すべき点は以下の3点である。

1. 大腸菌 *E. coli* 由来グルタミナーゼ YbaS の酵母細胞表層提示によって、酵母では初めてのグルタミン溶液からの効率的なアンモニア生産に成功した。また、作製した YbaS 細胞表層提示酵母を用いて食品廃棄物としての前処理「オカラ」溶液に含まれるグルタミンからも効率よくアンモニアを生産することに成功した。
2. 基質特異性の低いことで知られる担子菌 *H. cylindrosporium* 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ (HcLAAO) を、細胞表層工学の手法を用いて酵母細胞表層上に提示し、混合アミノ酸溶液からのアンモニア生産に供した結果、効率よくアミノ酸からアンモニアを生産できることを示した。また、前処理「オカラ」溶液に含まれるアミノ酸からも効率よくアンモニアを生産し、これまで報告された中で最も高いアンモニア生産効率を示した。
3. *H. cylindrosporium* 由来の L-アミノ酸オキシダーゼが活性を示さないセリン・スレオニンに対して活性を示す、*S. cerevisiae* 由来のセリン・スレオニンデアミナーゼである CHA1 を提示した酵母株を用いて、セリンからアンモニアを生産することに成功した。CHA1 提示酵母を用い、CHA1 提示酵母と HcLAAO 提示酵母を最適比で混合し反応に供すると、HcLAAO 提示酵母単独の場合に比べて、実際アンモニア生産量は約1.2倍に向上した。

以上のように、本論文は、これまで困難とされてきた酵母を用いてアミノ酸からアンモニアを効率よく生産することに成功した。また、実際の食品加工廃棄物としての「オカラ」からも効率よくアンモニアを生産することに成功しており、地球規模での食品加工廃棄物の有効利用への貢献が期待できる。これらの結果は、生体高分子化学、バイオマス変換学、微生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和3年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）