

( 続紙 1 )

|  |   |    |       |
|--|---|----|-------|
| 京都大学   | 博士 ( 農 学 )  | 氏名 | 立道 祐輝 |
| 論文題目   | Construction of genetically-engineered <i>Escherichia coli</i> for sustainable ammonia production<br>(持続可能なアンモニア生産のための遺伝子組換え大腸菌の構築) |    |       |
| (論文内容の要旨)  |   |    |       |
| <p>代表的なアンモニア生産法であるハーバー・ボッシュ法は、原料となる水素の製造や窒素固定反応の進行に多量の石油や天然ガスを要するため、その持続可能性への懸念が広がっている。これに代わる、微生物を利用した環境負荷の低いアンモニア生産法の開発に近年注目が集まっている。例えば、微生物のアミノ酸異化能力によって未利用資源からアンモニアを生産する方法、窒素固定細菌の遺伝子を利用して、他の生物に窒素固定能力を付与する方法などが検討されている。しかし、これら生物機能を利用したアンモニア生産法には、生産効率に課題がある。</p> <p>本研究では、持続可能なアンモニア生産法の確立と生産効率向上を目標に、窒素を豊富に含む食品副産物からの効率的なアンモニア生産法と、窒素固定細菌 <i>Azotobacter vinelandii</i> 由来の遺伝子群の異種発現による生物学的窒素固定法について検討した。</p>   |   |    |       |
| 1. 食品副産物からの効率的なアンモニア生産法の開発   |   |    |       |
| <p>未利用資源のうち、タンパク質を多く含むにも関わらず有効活用されていない食品副産物を原料とし、野生型大腸菌 <i>Escherichia coli</i> のアミノ酸異化反応を用いてアンモニアを効率的に生産する方法を検討した。まず食品副産物（しょうゆ粕、みりん粕、トマト粕、おから）をプロテアーゼとセルラーゼで処理して過した酵素処理食品副産物含有培地と、汎用培地（M9 改変培地、LB、YPD）に野生型 <i>E. coli</i> を添加し、アンモニアを生産させた。培養上清中のアンモニア量と各培地中のアミノ酸総量との相関を調べたが、これらの値に相関は見られず (<math>R^2=0.05</math>)、アミノ酸からのアンモニアへの異化反応に影響を与える要因の存在が示唆された。次に、アンモニア生産量に影響を与える要因を同定するため、各培地中のアミノ酸、有機酸、糖などの親水性成分を定量し、アンモニア生産量と親水性成分量との関係を部分的最小二乗回帰 (Partial Least Squares Regression: PLSR) により解析した。その結果を反映することで、培地中の親水性成分量からアンモニア生産量を精度よく予測することができた (<math>R^2=0.69</math>)。各成分のアンモニア生産量への寄与度を調べたところ、プロリン、グルタミン、グルタミン酸、セリンはアンモニア生産量を上昇させること、グルコース、フルクトースがアンモニア生産量を低減させることが統計的に示唆され、実験によってグルコースによるアンモニア生産阻害効果を明らかにした。さらに、グルコースによるアンモニア生産阻害効果を回避するための遺伝子改変を行った。菌体内へのグルコース取込みとアンモニアの同化反応を抑えるため、グルコーストランスポーター遺伝子 <i>ptsG</i> とグルタミンシンテターゼ遺伝子 <i>glnA</i> を破壊した。おからの酵素分解物を含む培地において、各遺伝子の単独破壊株ではアンモニア生産効率がわずかに向上するにとどまったが、二重破壊株においてはアンモニア生産効率が大幅に向上し、35.4 mM のアンモニアが生産された（遊離アミノ酸全窒素 75.9 mM に対して収率 47%）。以上のように、グルコースが多量に存在する食品副産物を原料とする場合、<i>E. coli</i> の <i>ptsG</i> と <i>glnA</i> の二重破壊がアンモニア生産性の向上につながることを明らかにした。</p> |   |    |       |
| 2. <i>A. vinelandii</i> 由来のニトロゲナーゼ関連タンパク質を生産する組換え大腸菌の構築  |   |    |       |
| <p><i>A. vinelandii</i> は酸素高感受性のニトロゲナーゼを生産するが、未知の機構により好氣的な条件下でも窒素固定が可能である。<i>A. vinelandii</i> の <i>nif</i> (nitrogen fixation) 関連遺伝子を異種発現させることは、好気条件下での生物学的窒素固定法を確立する</p>   |   |    |       |

ための有望な戦略であると考えられる。まず、*A. vinelandii* のニトロゲナーゼを大腸菌で再構成するため、Overlap Extension PCR によって *A. vinelandii* ゲノムに散在する *nif* 関連遺伝子 (*nifHDKBUSVQENXYWZMF* および *iscA*) とプロモーター配列とを融合した人工遺伝子クラスターを構築し、シームレスクローニングにて発現プラスミドに挿入し、これらのプラスミドを *E. coli* に導入した。*E. coli* 形質転換体の *nif* 関連遺伝子の発現を RT-qPCR により転写レベルで解析したところ、IPTG 誘導により、17 種類の *nif* 関連遺伝子の転写レベルが 2.9~8.7 倍に上昇したことが示された。さらに、17 種類の *nif* 関連遺伝子の発現をタンパク質レベルで確認するため、*E. coli* 形質転換体からタンパク質を抽出し、そのトリプシン分解物を LC-MS/MS にて定量した。ニトロゲナーゼ MoFe タンパク質の  $\alpha$  サブユニット (NifD)、 $\beta$  サブユニット (NifK)、MoFe タンパク質に電子を供給する Fe タンパク質 (NifH)、およびニトロゲナーゼの成熟に関与する NifS、NifV、NifB、NifQ、NifU、NifE、NifN のタンパク質発現レベルは *A. vinelandii* に比べて有意に高いことが分かった。さらに、アセチレン還元法にて *E. coli* 形質転換体のニトロゲナーゼ活性を測定したところ、嫌気条件下で 4.96 nmol/mL のエチレンを生産し、これは *A. vinelandii* の生産量 (5.69 nmol/mL) と同程度であった。一方、微好気条件下では 4.13 nmol/mL に減少し、同様の条件下での *A. vinelandii* の生産量 (25.8 nmol/mL) よりも低い値であった。

### 3. *A. vinelandii* 由来ニトロゲナーゼ活性向上因子の探索

*E. coli* 形質転換体のニトロゲナーゼ活性向上に寄与する遺伝子を、*A. vinelandii* から探索した。*A. vinelandii* は窒素源の有無や酸素濃度に応じて遺伝子転写プロファイルが大きく変動する。特に培地中に窒素源を含まない条件では、ニトロゲナーゼ関連遺伝子群の転写量が大きく上昇することが知られている。そこで、ニトロゲナーゼ関連遺伝子群と同様の転写変動を示す遺伝子群の中に、*E. coli* 形質転換体のニトロゲナーゼ活性を向上させる遺伝子が含まれることを想定して実験を進めた。まず、候補遺伝子同定のために、窒素源の有無と試験管ヘッドスペース酸素濃度 (5、10、20%) の 2 因子の組合せ、全 6 条件にて RNA-seq による比較トランスクリプトーム解析を行った。得られた各遺伝子のリード数を元に階層的クラスタリング解析を実施したところ、ニトロゲナーゼ関連遺伝子群と同様の転写変動を示すクラスターに 213 種類の遺伝子が分類された。この遺伝子群の中から、*nifH* などすでに発現させている *nif* 関連遺伝子、ncRNA および rRNA を除き、一方でオペロンにて同時に転写される遺伝子を追加することで、合計 202 種類の遺伝子を大腸菌発現用プラスミドにクローニングした。このプラスミドをニトロゲナーゼ発現 *E. coli* に導入し、ニトロゲナーゼ活性を測定した。微好気条件培養時において、ニトロゲナーゼ活性が 2.4 倍以上に向上した形質転換体が 20 種類得られ、そのうち 12 種で糖代謝関連遺伝子が導入されていた。糖代謝関連遺伝子は細胞内の還元力を高めることでニトロゲナーゼ活性を向上させたのではないかと考え、*E. coli* 形質転換体の  $\text{NAD}^+$  および  $\text{NADH}$  を測定した。対照株 (empty vector) では、 $\text{NADH}$  濃度が低く  $\text{NAD}^+$  濃度が高いため、非常に高い  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  値を示した。一方、ニトロゲナーゼ活性が向上した株では、 $\text{NADH}$  濃度が上昇し、 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  値が低下した。以上の結果から、*A. vinelandii* より同定した、*E. coli* 形質転換体のニトロゲナーゼ活性向上遺伝子群は、細胞内の還元力を高めることでニトロゲナーゼ活性の向上に寄与していることが示唆された。

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)

世界のアンモニア生産はハーバー・ボッシュ法に依存しており、そのプロセスに膨大な化石燃料が投入されている。持続可能な社会の実現に向けた動きが本格化する中、環境負荷の低いアンモニア生産法の開発は世界的な課題である。本研究では、未利用資源である食品副産物からのアンモニア生産技術と、ニトロゲナーゼ異種発現によるアンモニア生産技術を確立することで、アンモニア生産の環境負荷低減を目指した。評価すべき点は以下の通りである。

1. *E. coli* を酵素処理食品副産物を含む培地で培養した時に得られたアンモニア生産量と、培地中に含まれる親水性成分濃度との関係を PLSR で解析することで、グルコースがアンモニア生産阻害物質であることを見出した。さらに、*E. coli* の *ptsG* と *glnA* の二重破壊によって、グルコースによるアンモニア生産阻害効果を回避し、効率的なアンモニア生産（遊離アミノ酸全窒素 75.9 mM に対して収率 47%）を達成した。
2. *A. vinelandii* 由来の *nif* 関連遺伝子 17 種類とプロモーター配列とを融合させた人工遺伝子クラスターを構築し、*E. coli* に発現させた。各遺伝子の発現を mRNA とタンパク質のレベルで確認し、さらにニトロゲナーゼ活性の検出に成功した。
3. *A. vinelandii* の比較トランスクリプトーム解析により、窒素固定の重要遺伝子を選抜した。選抜した遺伝子を、*nif* 関連遺伝子発現大腸菌に導入することで、ニトロゲナーゼ活性向上を達成した。さらにニトロゲナーゼ活性向上株の細胞内代謝物の解析により、糖代謝が向上し細胞内 NADH 濃度が高く維持されていることを見出した。

以上のように、本論文は、これまで有効活用されてこなかった食品副産物からの効率的なアンモニア生産に成功するとともに、*A. vinelandii* の *nif* 関連遺伝子発現大腸菌のニトロゲナーゼ活性の検出、及び、活性化遺伝子を選抜と導入による改善を達成しており、持続可能なアンモニア生産法確立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、応用微生物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 4 年 2 月 9 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）