

令和 5 年 7 月 23 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05800

研究課題名（和文）窒素固定能を付与した大腸菌による窒素源添加が不要な発酵生産プロセスの基盤構築

研究課題名（英文）Development of a novel fermentation process using N2-fixing Escherichia coli

研究代表者

駒 大輔（Daisuke, Koma）

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員

研究者番号：80443547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：窒素源をハーバー・ボッシュ法に依存しない新たな発酵生産プロセスの開発を目指した。具体的には、より好気的な条件下（発酵生産条件下）で、窒素固定できる大腸菌の作製を目指した。大腸菌と同じ科に属するKlebsiellaのニトロゲナーゼクラスターの遺伝子をクローニングし、大腸菌の染色体に導入することで、より野生型の窒素固定菌に近い状態を作り出して発現させることを試みた。リアルタイムPCRの結果から、すべての遺伝子が目的どおりに発現していることが明らかとなったが、ニトロゲナーゼの活性は、窒素固定を行うには不十分な値であった。よって、活性を増強させるようなさらなる遺伝的改変が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な意義として、14種類のKlebsiellaの遺伝子を導入しただけでは、大腸菌は窒素固定せず、窒素固定の達成には別のファクターが必要であることを明らかにした。開発した菌株は染色体改変株であるので、さまざまな遺伝的改良が容易で、今後、ひとつのプラットフォーム菌株としての活用が可能であり、学術貢献度は高い。また収集した各種遺伝子も同様な貢献が可能である。

社会的な意義として、現在、窒素をエネルギーキャリアーとして利用するための研究、また食料問題を解決するための研究など、窒素固定研究は非常に白熱している。今回、微生物による窒素固定活用という新しい分野に貢献できたことは、社会的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a new fermentation process that does not depend on the Haber-Bosch process for its nitrogen source. Specifically, we aimed to produce E. coli that can fix nitrogen under more aerobic conditions (fermentation conditions). We cloned the genes for the nitrogenase cluster of Klebsiella, which belongs to the same family as E. coli, and introduced it into the chromosome of E. coli in an attempt to create and express a condition more similar to that of wild-type nitrogen-fixing bacteria. The results of real-time PCR showed that all genes were expressed as intended, but the activity of nitrogenase was insufficient for nitrogen fixation. Therefore, it was suggested that further genetic modification is necessary to enhance the activity.

研究分野：合成生物学

キーワード：窒素固定 大腸菌 ニトロゲナーゼ 合成生物学 アセチレンアッセイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオマスなどの再生可能資源を有用物質へと変換するバイオプロセスは、低炭素社会の実現に向けた重要技術であり、微生物による発酵生産はその中核を担っている。これまでは、化石資源から製造される化合物をいかにバイオマス資源から製造するか(炭素源の転換)、ということが検討されてきた。しかし実際の発酵生産には、炭素源以外にも窒素源やリン源などが必要である。なかでも窒素は炭素に次いで必要量が多い。ここに新たな低炭素化の鍵があると思われた。大腸菌やコリネ菌を用いた一般的な発酵生産ではアンモニアやその塩類が窒素源として利用されている。しかし、現在のアンモニア製造は多大な化石エネルギーの消費を伴うハーバー・ボッシュ法に依存しており、それにより生じる二酸化炭素の排出量はグルタミン酸発酵だけでも年間100万トンに達する。したがって、窒素源をハーバー・ボッシュ法に依存しない発酵生産プロセスの開発は、将来の低炭素社会実現に向けた重要課題である。

窒素固定菌はニトロゲナーゼにより大気中の窒素をアンモニアへと変換し、生育に利用することができる。この窒素固定能を発酵生産菌に付与すれば、ハーバー・ボッシュ法に依存しない革新的な発酵生産プロセスを構築できると考えた。しかしながらニトロゲナーゼは「10~20種類の遺伝子から成る巨大なクラスターにコードされており大腸菌などでの異種発現が困難」なことや、「酸素に触れると短時間で不可逆的に失活するため大腸菌などで異種発現すると活性が十分にでない」ことが大きな問題であった。そこで本研究では、合成生物学的なアプローチに基づき、窒素固定菌を模倣した大腸菌を作製することで問題の解決を試みた。すなわち、野生型の窒素固定菌を模倣して、10種類以上の遺伝子をプラスミドではなく、染色体DNAに遺伝子を導入して嫌気条件下で安定に発現させることを試みた。また、野生型の窒素固定菌と同様に酸素に対する防御機構を付与することで、微量な酸素存在下でも窒素固定を行うことが可能になり、発酵生産や窒素固定に必要なエネルギーを十分に補充することが可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では窒素源添加が不要な発酵生産プロセスを確立するための基盤技術の構築を目指した。具体的には、モデル生物であり、発酵生産菌でもある大腸菌を用いて以下の4点の項目について達成を目指した。

大腸菌にニトロゲナーゼの遺伝子クラスターを導入して窒素固定能を付与する。

ニトロゲナーゼ活性を評価するための系を確立する。

ニトロゲナーゼを酸素から防御するためのシステムを導入して、微量な酸素存在下での窒素固定能を向上させる。

窒素固定能を利用して、大気中窒素を分子内に取り込んだグルタミン酸等を生合成する。

3. 研究の方法

・ *nif*遺伝子のクローニング

*nif*遺伝子はGenewiz社(現Azenta社)で受託合成した。ただし、3000bpを超えるサイズは価格単価が大幅に向上するために、3000bp以内のサイズに収まるように小さな断片に分割して合成した。合成した3000bp以下のDNA断片は必要に応じてoverlap extension PCR法により連結し、必要なサイズのDNA断片を得た。得られたDNA断片はGibson assemblyにより*NdeI-XhoI*消化したpET21a-FRTプラスミド(Koma *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol 93:815-29., 2012)に連結した。ま

たは、各断片をPCRで増幅後、Gibson assemblyにより各断片と*NdeI-XhoI*消化したpET21a-FRTプラスミドに連結した。

・酸素防御に関わる遺伝子のクローニング

酸素防御に関わるリグヘモグロビン等の遺伝子は、大腸菌用にコドン最適化し、人工合成した(pUC57に連結)。それらを制限酵素*NdeI-XhoI*で消化し、同じ制限酵素で消化したpET21a-FRTプラスミドにサブクローニングした。

・*nif*遺伝子クラスターの染色体への挿入、および集約による窒素固定大腸菌の作製

*nif*遺伝子のクラスターは50bpのホモロジーアームを設計したプライマーでPCR増幅し、Red相同組み換えにより染色体の各位置に挿入した。次に、P1ファージを用いてそれらの菌株を溶菌化し、各菌株のP1ライセートを得た。P1ライセートを大腸菌K12およびK12の派生株(任意の*nif*クラスターを挿入した菌株)と反応させ、カナマイシン耐性株を選抜した(P1形質導入)。得られた菌株はFLP/FRT部位特異的相同組み換えにより、カナマイシン耐性遺伝子を除去し、再度のP1形質導入の受容菌株として使用した。繰り返しP1形質導入を行い、*nif*遺伝子クラスターを段階的に1つの菌株に集約した。Red相同組み換え、P1形質導入、FLP/FRT部位特異的相同組み換えの方法は先行論文を参照した(Koma *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol 93:815-29., 2012)。

・窒素固定菌の培養

培地にはHCF培地を用いた(Koma *et al.* J. Agric. Food Chem. 71:9451-59, 2023)。HCF培地のMgイオンの濃度は規定の1/5とした。また、グルコース濃度は1% w/vとした。培地中のアンモニウムイオンを除く場合には、培地のリン酸アンモニウムを等濃度のリン酸水素2カリウムに変更した。寒天培地で培養する場合には、この培地に寒天を2% w/vとなるように添加した。より具体的な操作としては、2倍濃度のフィルターろ過したHCF培地に4% w/vのオートクレーブ滅菌した培地(適当な温度に冷えたもの)を加えて攪拌し、シャーレに注いで固めた。液体培地の場合には、フィルターろ過した培地10mLを50mLのバイアルに入れ、除菌フィルターを通した窒素ガスでパージした後に、ゴム栓をしてアルミキャップを締め付けてバイアルを密閉した。培地には必要に応じて終濃度0.2mMでIPTGを加えた。

寒天培地の場合、菌株をストリークし、アネロパックに入れて27℃で保管した。菌株ははじめLB寒天培地で培養し、次に作製した培地(N源有り)で嫌氣的に培養した後、作製した培地(N源無し)に植え継いで嫌氣的に培養した。液体培地の場合、初めにLB液体培地で菌株を培養し、1mLの滅菌済みシリンジを用いて1滴を作製した培地(N源有り)に植菌した。1週間27℃で培養後、1mLの滅菌済みシリンジで菌液を適量抜き取り、1滴を作製した培地(N源無し)に植え継いで同様に培養した。この植え継ぎは2回行った。

・リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いてリアルタイムPCRを行った(Koma *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 86:e00525-20, 2020)。プライマーはPrimer3を用いて設計した。

・ニトロゲナーゼ活性の測定

アセチレンアッセイ法により、アセチレンの還元により生成したエチレンをGCで定量することにより活性を求めた(Wang *et al.* PLoS Genet 9:e1003865, 2013)。

4. 研究成果

・ニトロゲナーゼ遺伝子のクローニングと窒素固定大腸菌の作製

まず大腸菌の染色体に導入するためのニトロゲナーゼ遺伝子クラスターを選別し、それを人工合成し、さらに大腸菌の染色体に導入することを目指した。そこで、クローニングするニトロゲナーゼ遺伝子クラスターの候補を、さまざまな微生物種のゲノム情報や文献の中から調査した。その結果、非常によく研究されている*Paenibacillus*由来のニトロゲナーゼではなく、大腸菌の近縁種である*Klebsiella oxytoca*由来の物を選択した。

候補のニトロゲナーゼ遺伝子クラスターは巨大であり、20種類の遺伝子から構成されていた。それをそのまま合成することや、クローニングすることは困難であった。また、この大きさのDNAを大腸菌の染色体DNAに挿入することも困難であり、また、DNAのハンドリングの困難さも予想された。そこでまず、ニトロゲナーゼ遺伝子クラスターから不必要な遺伝子を取り除くことを考えた。これまでの報告から、ニトロゲナーゼクラスター中には機能未知な遺伝子や、活性発現には関与しないとされている遺伝子がいくつか存在する。Yangらは、様々な検討の結果、活性発現に必要な*Klebsiella oxytoca*由来の遺伝子を14にまで絞りこんでいる (Yang *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115:E8509-E8517, 2018)。それらは、*nifB*、*nifD*、*nifE*、*nifF*、*nifH*、*nifJ*、*nifK*、*nifM*、*nifN*、*nifS*、*nifU*、*nifV*、*nifW*、*nifY*であった。Yangらはこれらの遺伝子を5つのクラスターに分割し、1つのプラスミドに挿入して大腸菌に導入していた。その際、クラスター内の遺伝子は1つのタンパク質の塊として発現した後に、タバコモザイクウィルスのプロテナーゼ (TEVプロテアーゼ) で消化されてそれぞれのタンパク質となるように設計されていた (Polyprotein strategy)。そこで、その手法を模倣できるように熟考し、最終的に9つのクラスターを設計し、それぞれを人工的に合成した (大きなクラスターは合成価格が高くなるため、3000bp以下のサイズのクラスターとなるように設計して合成した)。人工合成した遺伝子をさらにoverlap extension PCR等によってつなぎ合わせ、5つの遺伝子クラスター (*nifJöVöW*、*nifUöS*、*nifHöDöK*、*nifEöNB*、*nifFöMöY*) を得た (öはTEVプロテアーゼの認識配列)。なお、それらの遺伝子クラスターは、大腸菌の染色体に導入するためのベクターpET21a-FRTにつないだ。

宿主の大腸菌にはK12株の原栄養要求性株を用いた。一般的に、実験によく用いられるK12株の派生株として、MG1655株、W3110株、BW25113株などがあるが、これらはチアミン要求性であり、N源となりうる化合物を培地に添加する必要がある。また、より野生型に近い菌株の方が、いくつかの遺伝子に変異や欠失を有する菌株よりも生育能が高いと考えられたため、K12株を選んだ。

Red相同組み換え、P1形質導入、FLP/FRT部位特異的相同組み換えを用いて、K12株の染色体の6か所の位置 (*adhE*、*pflDC*、*pykA*、*mtlA*、*acs*、および*ascF*) に、各*nif*クラスターおよびTEVプロテナーゼ遺伝子を挿入した。挿入する位置の選択は次の3点を考慮して選択した； 欠失により生育に影響しない、各位置が他位置と十分な距離を保っている (100kbp以上)、*lacZ* や*gfp*などのモデル遺伝子を用いた実験で、遺伝子が高発現することが確認されている。作製した菌株の染色体の模式図を図1に示す。

作製した菌株は 窒素固定を利用した生育テスト、アセチレンアッセイ法によるニトロゲナーゼ活性の評価、の2つの方法により評価した。生育テストでは、N源を含まない最小合成寒天培地とアンモニウムイオン

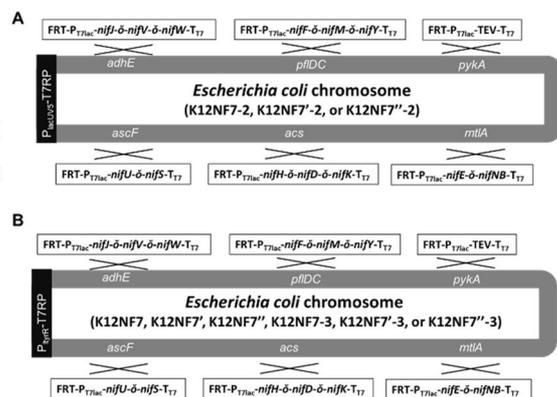


図1 Polyprotein strategyを利用した染色体挿入型の窒素固定菌の染色体模式図
A: T7RNAポリメラーゼを*lacUV5*プロモーターに連結 (IPTG誘導型)
B: T7RNAポリメラーゼを*tyrR*プロモーターに連結 (構成性)

を含む最小合成寒天培地を作製し、それぞれに菌株を植菌した後、アネロパックに入れて嫌気培養し菌株の生育を確認した。アセチレンアッセイは、図2に示すような流れで、最終的にGCで生じたエチレンのピーク面積を測定し、比活性に変換して評価した。

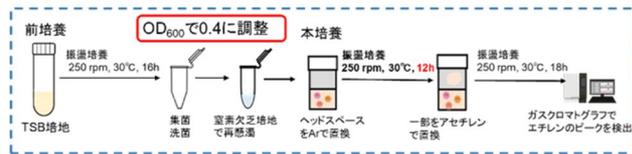


図2 アセチレンアッセイ法による活性測定の流れ

生育テストの結果、アネロパックに入れて嫌気培養した大腸菌は、アンモニウムイオンを添加した場合には生育したが、アンモニウムイオン無添加の場合には生育しなかった。すなわち、作製した大腸菌は窒素固定を行い生育することができなかった。

アセチレンアッセイによるニトロゲナーゼ活性の評価では、試験した9株中、6株でエチレンの生成が確認された(図3)。先に報告されている*Paenibacillus*の*dnif*クラスターを用いた*E. coli* WLY78株(窒素固定して生育しない)が300Uの活性を示すことや(Wang et al. PLoS Genet 9:e1003865, 2013)、窒素固定により生育する*Paenibacillus*の野生株が数千Uの活性を示すことから、今回得られた数十Uというニトロゲナーゼの活性値は低い値であった。そこで、Polyprotein strategyではなく、従来用いてきた各遺伝子を個別にタンパク質として発現する系を構築し、新たな窒素固定大腸菌を作製することを試みた。

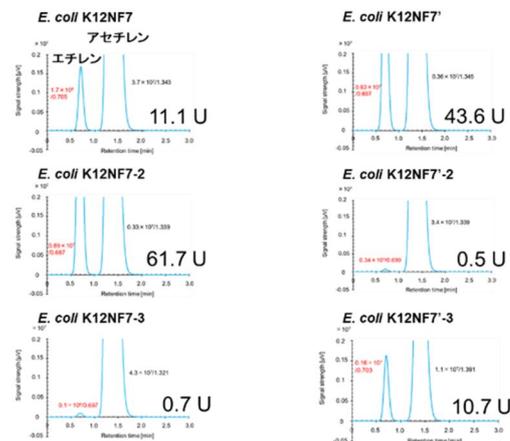


図3 作製した菌株によるエチレンの生成(アセチレンアッセイ)
1Uは、含まれるたんぱく質1mgあたり、1時間で、1nmolのエチレンを生成する酵素量。

・人工オペロンの構築と新規な窒素固定大腸菌の作製

先に構築したPolyprotein strategyのプラスミドを鋳型としてPCRで増幅し、各遺伝子の前にリボソームの結合部位を配置するようにした。この人工オペロンによる発現手法は、以前に芳香族アミノ酸の高生産菌を作製する際に使用した手法である(Koma et al, Appl. Environ. Microbiol. 86:e00525-20, 2020)。コロニーダイレクトPCRにより、各遺伝子を増幅し、各遺伝子が挿入されていることを確認した。また、作製した菌株について、各遺伝子が正常に発現しているかどうか(転写されているかどうか)をリアルタイムPCRにより解析した。その結果、すべての*nif*遺伝子が正常に高発現していることを確認した。

次に、作製した菌株について、窒素固定による生育テスト、およびニトロゲナーゼ活性の測定(アセチレンアッセイ)を行った。しかしながら、作製したK12NF15株は、窒素固定能がなく、かつニトロゲナーゼ活性も認められなかった。

・酸素防御に関わる遺伝子のクローニング

次の遺伝子をpET21a-FRTを用いてクローニングした。

Leghemoglobin A (*Glycine max*)、 Leghemoglobin C (*Glycine max*)、 Bacterial hemoglobin (*Vitreoscilla stercorari*)、 Bacterial hemoglobin (*Methanosarcina acetivorans*)、 Bacterial hemoglobin (*Aeropyrum pernix*)、 Myoglobin (*Cyanobacterium*, Cyanoglobin)、 Myoglobin (*Mycobacterium GlnN*)、 Myoglobin (Human myoglobin)、 Uptake hydrogenase (*Cyanothecce sp. hupL* and *hupS*)、 Flavodiiron protein (*Giardia intestinalis*)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	古屋 俊樹 (Furuya Toshiki) (20367064)	東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授 (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関