

空気と電気から含窒素有機化合物を製造する革新的発酵プロセスの創出に向けた基盤研究

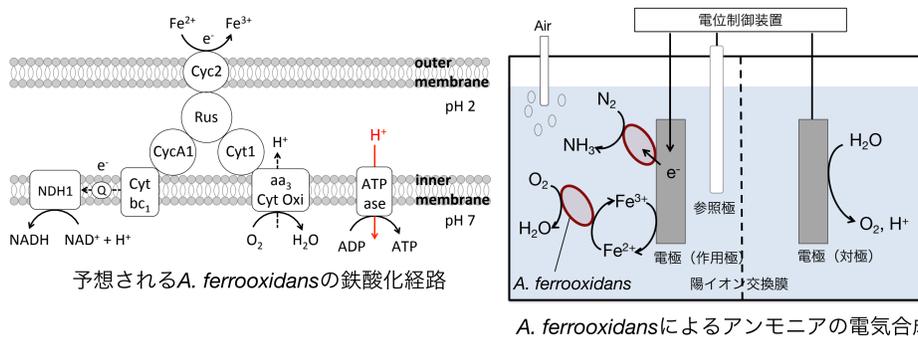
高妻篤史
東京薬科大学 生命科学部

背景・目的

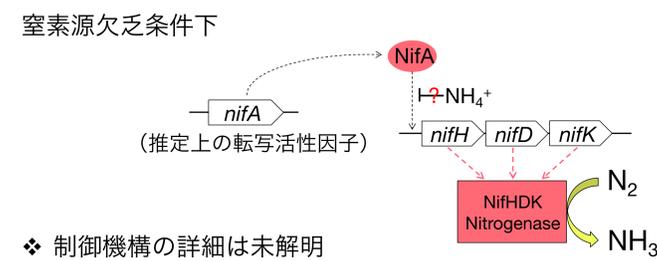
本研究では、大気成分 (CO₂とN₂) と電気エネルギーから含窒素有機物を生産する発酵プロセスを創出するための技術基盤を確立することを目的とした。具体的には、電気エネルギーを利用して炭酸固定と窒素固定が可能な細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*のニトロゲナーゼ活性を増強するとともに、本細菌の電気化学培養法の改良を行った。ニトロゲナーゼ活性は厳密な制御を受けるため、含窒素化合物の生産にはその制御系の改変が必要となる。本研究ではニトロゲナーゼ遺伝子の転写活性化因子であるNifAの過剰発現株 (*nifA*-OE株) が野生株よりも高いニトロゲナーゼ活性を示すとともに、電気培養時に細胞外にアンモニウムイオンを分泌することを明らかにした。また、一槽式電気化学セルの使用により、アンモニア生産を高効率化した。今後はこれらの知見を元に、アミノ酸等の含窒素有機物を生産可能なプロセスの構築を行う予定である。

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

- 至適培養条件: pH 2, 30°C
- 電気培養が可能
数倍~100倍の増殖促進
- N₂, CO₂固定能を有する
- 全ゲノム解読済み



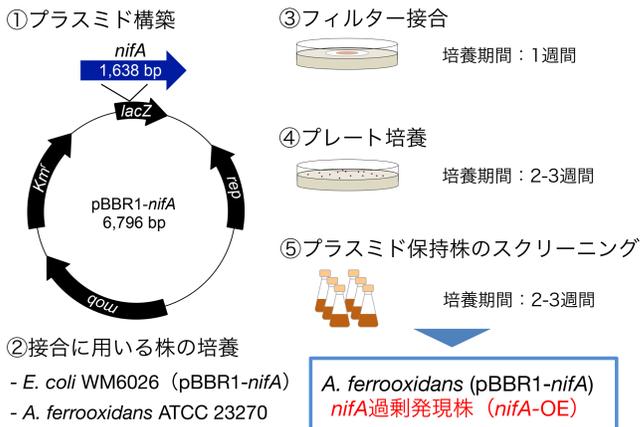
ゲノム情報から予想される窒素固定制御系



Levicán G et al. BMC Genomics. 2008. 3:9-518

2. *nifA*過剰発現によるニトロゲナーゼ活性の増強

1) *nifA*過剰発現株の作製

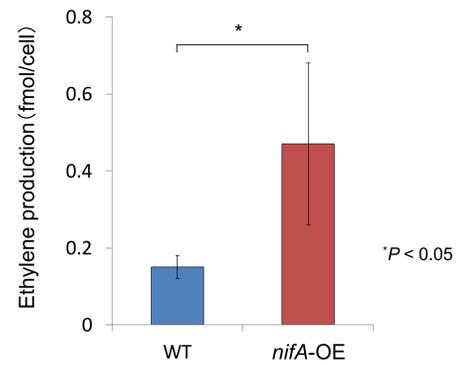


2) トランスクリプトーム解析

培養条件: Fe9K (Fe²⁺ 108 mM) N (NH₄⁺)-free, pH 2.0, 30°C
使用株: *nifA*-OE vs. 野生株 (ベクターコントロール) (p < 0.05)

Gene name	Gene production	Fold change
AFE_1508	nitrogen fixation protein NifU	17.4
AFE_1509	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	18.9
<i>nifE</i>	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifE	18.4
<i>nifK</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	33.7
<i>nifD</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	35.7
<i>nifH</i>	nitrogenase reductase	60.1
AFE_1523	response regulator	4.9
<i>draT</i>	NAD(+)-dinitrogen-reductaseADP-D-ribosyltransferase	3.8
<i>nifA</i>	Nif-specific regulatory protein	7.4
<i>nifB</i>	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	18.6

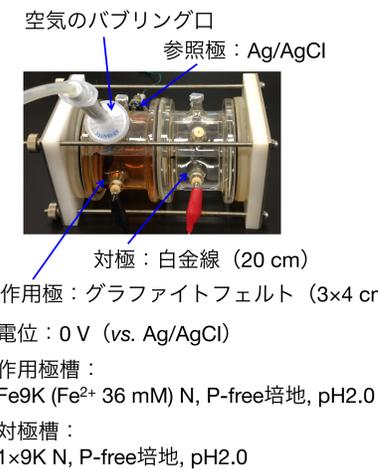
3) ニトロゲナーゼ活性の評価



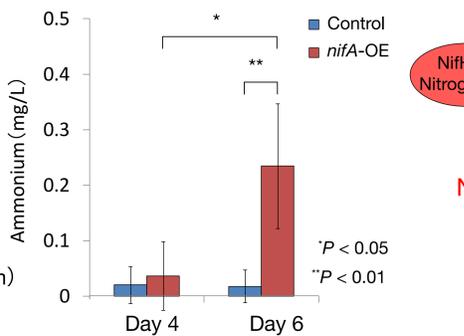
*nifA*の過剰発現によりニトロゲナーゼ遺伝子 (*nifHDK*) の発現とニトロゲナーゼ活性が顕著に増加した

3. 電気培養によるアンモニア合成の実証

1) 二槽式電気化学セル

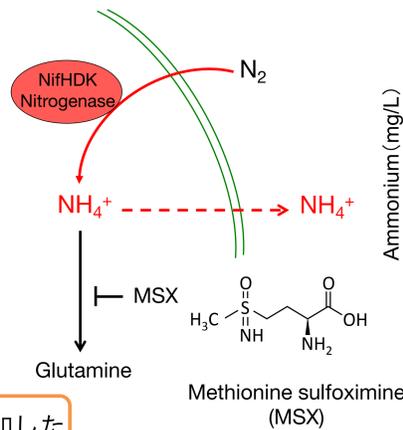


2) アンモニア蓄積量

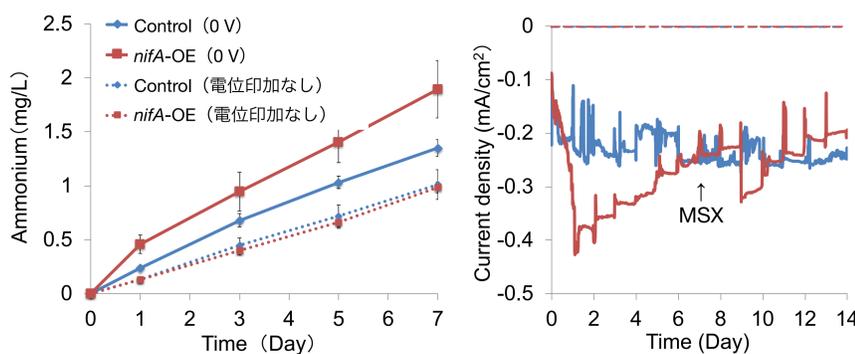


nifA-OE株のみNH₄⁺が有意に増加した

3) グルタミン合成酵素阻害剤 (MSX) 添加時のアンモニア蓄積量



4) 電気培養時の電流密度



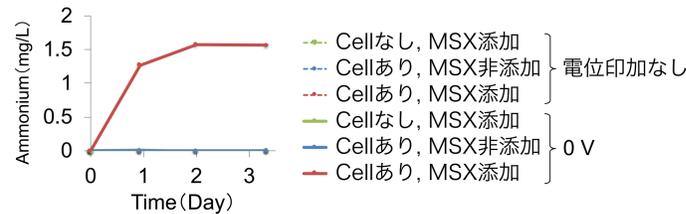
*nifA*の過剰発現によって窒素固定能力が向上し、電気エネルギー依存的にアンモニアが合成された

4. アンモニア生産の高効率化

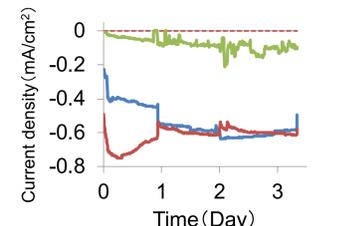
1) 一槽式電気化学セル



2) アンモニア蓄積量



3) 電気培養時の電流密度



- MSX添加および細胞・電位依存的なアンモニアの合成が示された
- Fe²⁺濃度を低下させた培養条件と一槽式セルを用いることで二槽式セルと比較してアンモニア生産速度が向上した

総括

- ◆ NifA転写因子が窒素固定系遺伝子を含む多くの遺伝子の発現を制御するグローバルレギュレーターとして機能することが示された
- ◆ *nifA*遺伝子の過剰発現によって窒素固定能力が向上し、アンモニア生産が促進された
- ◆ 電気化学セルの改良によってアンモニアの生産速度が顕著に向上した
- ◆ 含窒素有機化合物の電気合成法の開発に向け、有用な知見を与えるものと考えられる

