

酸素に弱いニトロゲナーゼを有酸素条件でも機能させるための重要因子を発見 —化石燃料を必要としない脱炭素社会の基盤形成に向け、 空中窒素の固定を介した生物学的アンモニア生産へ期待—

概要

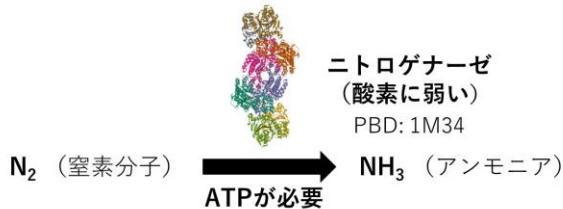
京都大学大学院農学研究科の黒田浩一 准教授、植田充美 同教授（現・産官学連携本部特任教授）、滝本廉 同修士課程学生、キッコーマン株式会社の立道祐輝 研究員らの共同研究グループは、好気性窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* に着目し、窒素源や酸素に対する転写応答を網羅的に解析することで、本菌が好気条件下でもニトロゲナーゼ^{*1}の活性を高く維持するための遺伝子を明らかにしました。また、得られた知見をニトロゲナーゼの異種発現に応用し、好気条件下でのニトロゲナーゼ活性を世界で初めて大幅に向上させることに成功しました。

近年、アンモニアは植物の肥料や化成品原料だけでなく、水素社会の実現に伴う水素キャリアーとしてますますその価値を高めています。しかし現行のアンモニア生産はハーバー・ボッシュ法に依存し、多量の化石燃料を必要とすることから持続可能性に問題を抱えています。そこで注目を集めているのがニトロゲナーゼです。ニトロゲナーゼは窒素固定細菌と呼ばれる一部の細菌が産生する酵素で、化石燃料を必要とせずに ATP（アデノシン三リン酸）を用いて大気中の窒素分子からアンモニアを生産することができます。しかし、酸素に触れると機能を失ってしまうため、効率的な利用は達成できていませんでした。今回の研究成果は、ニトロゲナーゼを好気条件下で機能させる上で非常に有用であり、その効率的利用だけでなく、様々な酸素感受性酵素の好气的利用に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2022年3月9日に、国際学術誌「Scientific Reports」に掲載されました。

背景

- ニトロゲナーゼの反応



- 過去の異種発現の試み

ニトロゲナーゼ
生産大腸菌

	酸素無 (嫌気条件)	酸素有 (好気条件)
ATP供給	△	○
ニトロゲナーゼの機能	○	×
アンモニア生産能	△	×

成果

- Azotobacter vinelandii*

好気条件下でも
高いアンモニア生産能

機構に関わる遺伝子を同定
異種発現に応用

ニトロゲナーゼ
生産大腸菌 + 同定した遺伝子

	酸素無 (嫌気条件)	酸素有 (好気条件)
ATP	○	○
ニトロゲナーゼの機能	○	○
アンモニア生産能	△	大幅に向上

本研究の概要図

1. 背景

アンモニアは植物の肥料や化成品原料として、また、カーボンフリーな燃料として、さらに、水素社会の実現に伴う水素キャリアーとして重要な物質であり、更なる需要の増加が見込まれます。しかし、アンモニア生産の大部分を占めるハーバー・ボッシュ法は多量の化石燃料を必要とするため、より持続可能性の高いアンモニア生産法が求められています。そこで注目を集めるのが、窒素固定細菌と呼ばれる一部の細菌が生産するニトロゲナーゼを用いたアンモニア生産法です。ニトロゲナーゼは ATP（アデノシン三リン酸）をエネルギー源として窒素分子をアンモニアへと変換する自然界で唯一の酵素であり、化石燃料を必要としません。非常に有用な酵素ですが、ATP 供給量を増やすために好気条件にしたい反面、酸素に触れると不可逆的に活性を失ってしまうというジレンマを抱えています。そのため、ニトロゲナーゼの効率的な利用に向けたモデル生物での異種発現は、扱いの困難な嫌気条件下でしか行うことができず、ニトロゲナーゼ研究の進展を妨げる障壁の一つとなっていました。

本研究では、好気性窒素固定細菌の一種 *Azotobacter vinelandii* に着目し、このジレンマを打開することを目指しました。*A. vinelandii* は生育に酸素を必要とするにも関わらず、酸素に弱いニトロゲナーゼを用いてアンモニアを生産できるというユニークな性質をもちます。そこで、本菌が好気条件下でも高いニトロゲナーゼ活性を保つための機構（以下、活性維持機構と呼びます。）を網羅的に解析し、そこで得られた知見を好気条件下でのニトロゲナーゼ異種発現に応用しました。

2. 研究手法・成果

2-1. 活性維持機構に関わる候補遺伝子を網羅的に探索

活性維持機構に関わる候補遺伝子を、RNA-seq 解析^{※2} を用いて網羅的に探索しました。候補遺伝子は好気条件下でのニトロゲナーゼ活性の維持に関わるため、ニトロゲナーゼが作られる条件（培地中にアンモニアなどの窒素源が含まれない条件）でのみ転写され、かつその転写は酸素によって誘導されると考えました。そこで、*A. vinelandii* を 5%、10%、20%の酸素濃度条件下、窒素源あり／なしという計 6 条件で培養したのちに、RNA-seq 解析を行いました。その結果、上記の挙動を示す候補遺伝子 213 個の同定に成功しました（図 1）。

2-2. 機能未知遺伝子 *nafU* が好気条件下でのニトロゲナーゼ活性維持に寄与していることを発見

同定した 213 個の遺伝子の中で、機能未知遺伝子 *nafU* は酸素濃度 20%の窒素源を含まない培地で最も強く転写が誘導されていました。そこで *A. vinelandii* において *nafU* を欠損もしくは過剰発現させることで、この遺伝子の好気条件下でのニトロゲナーゼ活性への影響を評価しました。その結果、*nafU* の欠損によって好気条件下でのニトロゲナーゼ活性が減少し、*nafU* の再導入によって活性が回復することが分かりました（図 2 左）。一方、過剰発現によって活性が上昇することも分かりました（図 2 右）。

2-3. *nafU* により好気条件下でのニトロゲナーゼ異種発現における活性を上昇させることに成功

nafU が好気条件下でのニトロゲナーゼ活性の維持に重要であることを見出したため、この遺伝子を好気条件下でのニトロゲナーゼ異種発現に応用しました。ニトロゲナーゼの発現に必要な遺伝子群を導入した大腸菌に、*nafU* を発現するプラスミド、もしくは空のプラスミドを導入し、好気条件下でのニトロゲナーゼ活性を評価しました。その結果 *nafU* の導入によって、ニトロゲナーゼ活性を 9.7 倍と大幅に上昇させることに成功しました（図 3）。これは、好気条件下でのニトロゲナーゼ異種発現において、活性を上昇させた世界で初めての例です。

2-4. NafU が膜に局在し、細胞内部の酸素濃度を減少させる機能を有することを示唆

NafU がどのようにして好気条件下でのニトロゲナーゼ活性維持に寄与しているのかを推定するため、NafU と構造が似ており、かつ機能が既に知られているタンパク質を探索しました。構造予測ツールを用いた探索の結果、SlyB という放線菌が持つタンパク質が NafU と構造が類似していることが分かりました。SlyB は細胞膜に局在し、膜の安定性を高めることで、細胞内部をストレスから保護します。そこで NafU も同様の機能を持つのではないかと考え、NafU の局在を調べるとともに、酸素応答遺伝子の転写レベルを定量解析することで、細胞内部の酸素濃度を評価しました。その結果、NafU は細胞膜に局在し、細胞内部の酸素濃度を減少させていることを示唆する結果が得られました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究成果は *A. vinelandii* が好気条件下で高いニトロゲナーゼ活性を維持する機構の解明につながるものです。また、異種発現したニトロゲナーゼを好気条件下で機能させるうえで重要な戦略を提供すると考えられます。さらに、ニトロゲナーゼに限らず様々な酸素感受性酵素の好气的利用にもつながる可能性があります。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、Kikkoman Corporation および JST の COI-NEXT (JPMJPF2008) の支援のもと実施されたものです。

<用語解説>

※1. ニトロゲナーゼ：大気中の窒素分子を還元してアンモニアに変換する酵素

※2. RNA-seq 解析：細胞の中に存在する mRNA を網羅的に解読して、各遺伝子の発現量を定量する手法

<研究者のコメント>

A. vinelandii がどのようにして好気条件下でも高いニトロゲナーゼ活性を維持しているのかについては様々な説が唱えられているものの、それらの知見がニトロゲナーゼ異種発現に応用された例はありませんでした。本研究ではそうした活性維持機構の網羅的解析にとどまらず、得られた知見を異種発現にも応用できたことから、ニトロゲナーゼ研究において基礎面・応用面で大きなインパクトをもたらすものであると考えています。(黒田浩一)

<論文タイトルと著者>

タイトル： A critical role of an oxygen-responsive gene for aerobic nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* and its application to *Escherichia coli* (*Azotobacter vinelandii* にて好気条件下でのニトロゲナーゼ活性に重要な役割を果たす酸素応答性遺伝子と *Escherichia coli* への応用)

著者： Ren Takimoto, Yuki Tatemichi, Wataru Aoki, Yuishin Kosaka, Hiroyoshi Minakuchi, Mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda*

掲載誌： Scientific Reports DOI: 10.1038/s41598-022-08007-4



黒田浩一 准教授、滝本廉

<参考図表>

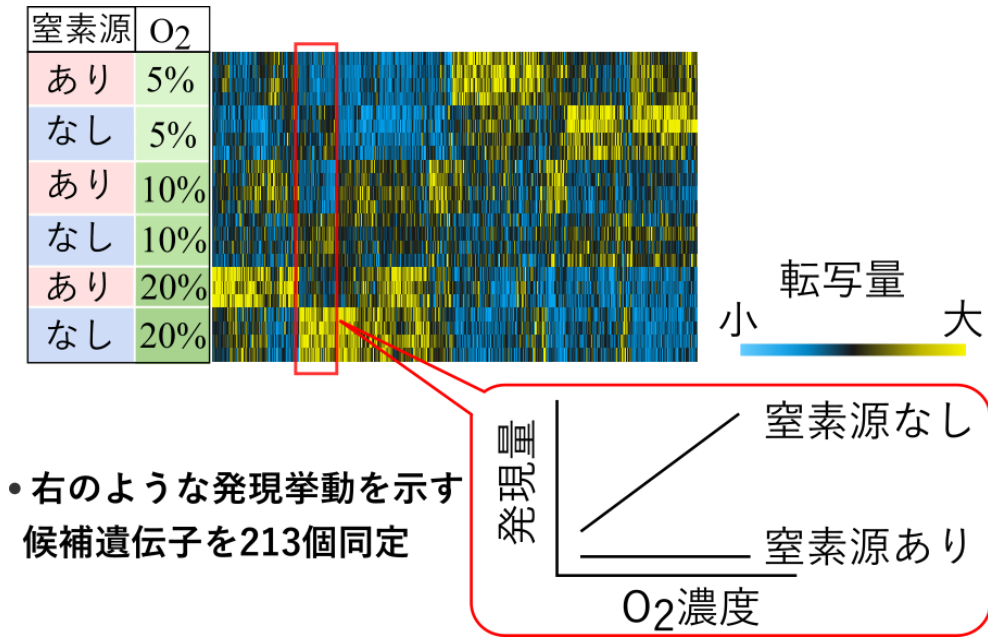


図1 RNA-seq 解析の結果

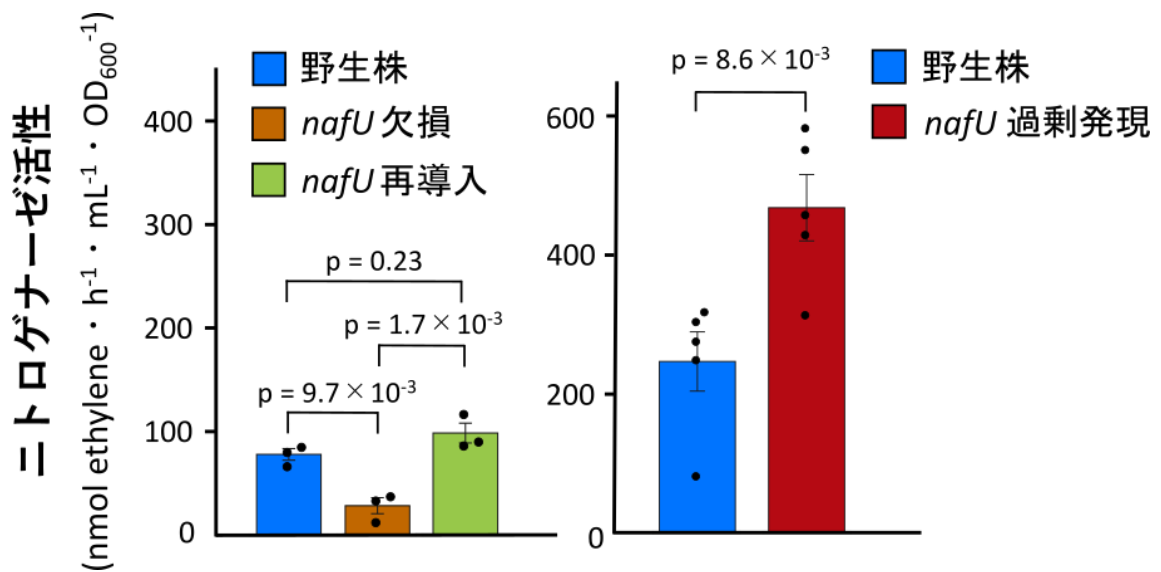


図2 *A. vinelandii* における各株の好気条件下におけるニトロゲナーゼ活性

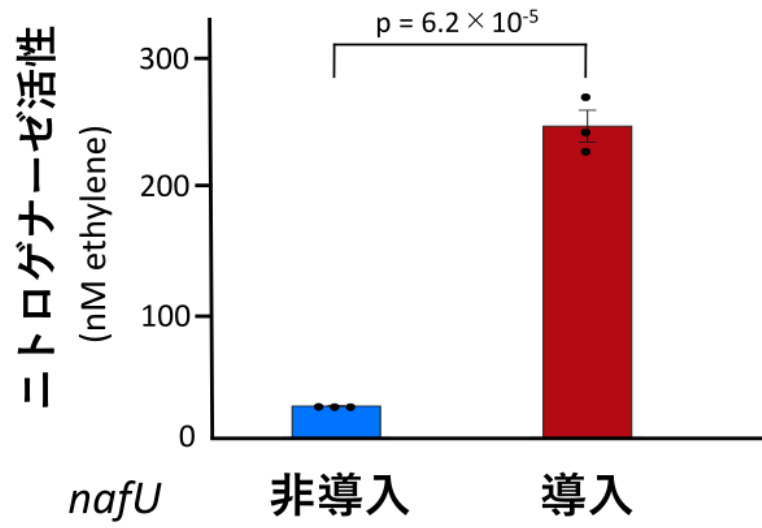


図3 ニトロゲナーゼ発現大腸菌における好気条件でのニトロゲナーゼ活性