

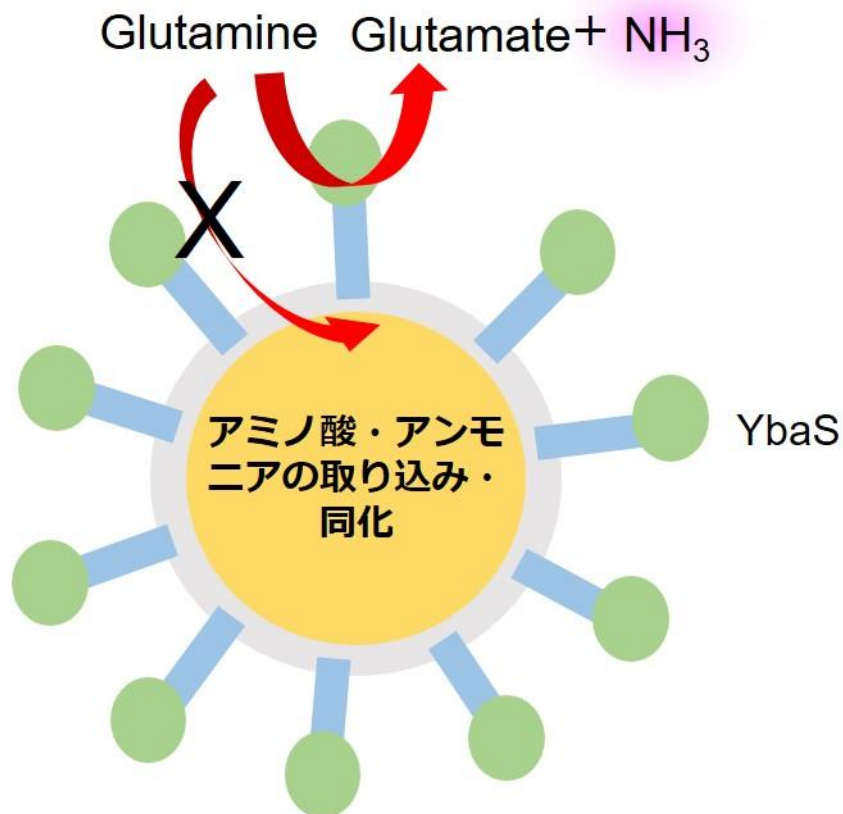
# 脱炭素・次世代エネルギーとしてのアンモニアの食品加工廃棄物からの バイオ生産プラットフォーム

—脱炭素社会構築へのバイオテクノロジーによる貢献をめざして—

## 概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の植田充美教授（現在、産官学連携部特任教授）、青木航助教、渡邊幸夫博士課程学生（現在、富山県立大学「くすりのシリコンバレーTOYAMA」特定研究員）は、大学と JST との COI-NEXT プロジェクト「食サイクルのイノベーション（フード&アグリテック）未来共創拠点」事業の中で、独自の細胞工学手法を用いて、世界で、最多の食品加工廃棄物であるマメ科食品加工廃棄物（日本では、オカラなど）から、水素の液体運搬キャリアや新しいカーボンフリーの内燃燃料であるアンモニアを大量に生産できるプラットフォームの構築に成功しました。

本成果は、2021年8月24日にスイスの国際学術誌「Sustainability」にオンライン掲載されました。



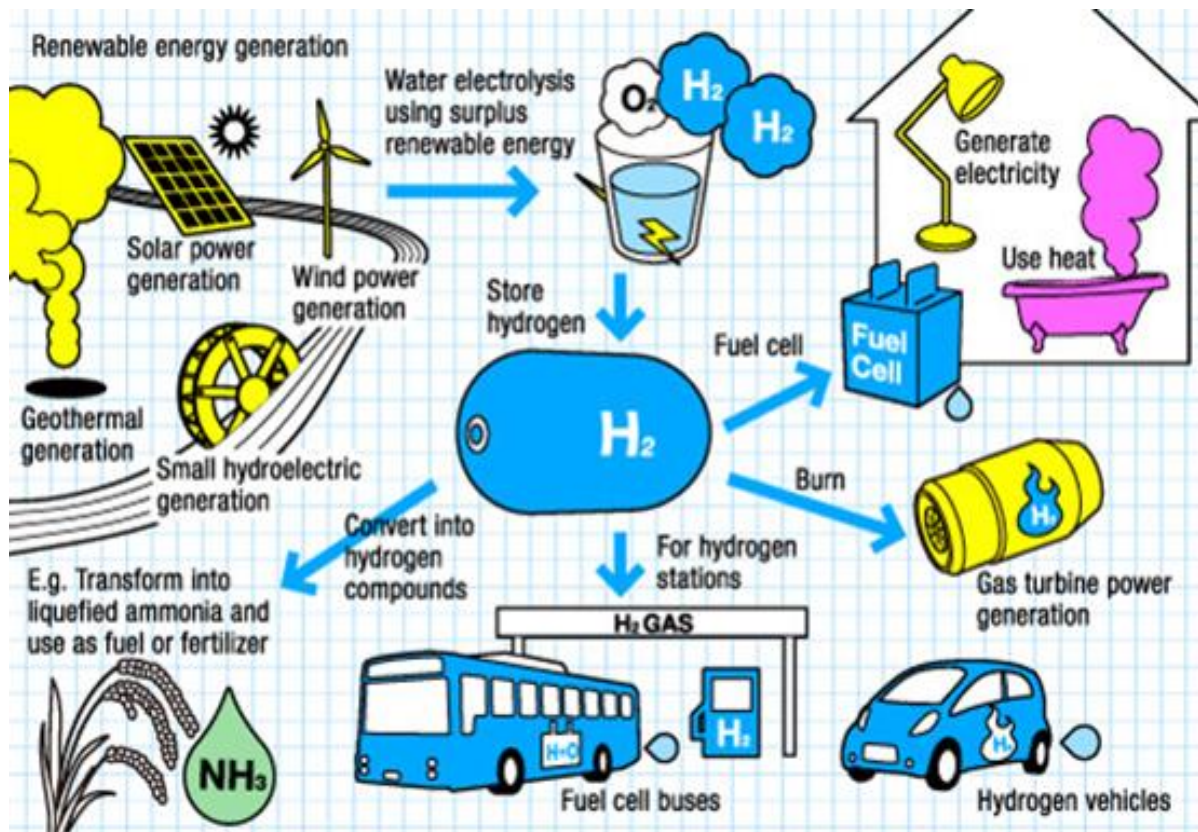
アミノ酸からアンモニアを生産できる細胞表層酵母

## 1. 背景

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、肥料原料として地球上の人類発展に貢献してきましたが、その製造へのエネルギーは全世界のエネルギーの1-2%を占め温暖化の一因ともなっています。国連で宣言された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ますが、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、気候変動の原因となっています。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ます。代表的なバイオ燃料はバイオエタノールですが、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ます。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（カーボンニュートラル）。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ます。また、水素発生時の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ります（図1）。

近年、先進国を中心に大量に食品加工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ます。例えば、世界最多である食品加工廃棄物である大豆残渣（表1）を土壌に埋め立ててしまうと、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います。

したがって、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た研究を行った結果の一部です。



(<http://hori.way-nifty.com/synthesist/images/2011/12/30/renewableh2society.jpg>)

図1 水素エネルギー社会

表1 世界の食品加工廃棄物発生量

食品加工廃棄物名称	年間発生量 (トン)
グレープフルーツの皮	3,000,000
オリーブ残渣	3,000,000
レモンの皮	5,000,000
トマト残渣	10,000,000
リンゴジュース粕	17,000,000
サトウキビ残渣	23,000,000
ジャガイモの皮	48,000,000
<b>大豆残渣 (オカラ)</b>	<b>261,000,000</b>

引用 : Renew. Sustain. Energy Rev, Volume 26, October 2013, Pages 521-531

International Scholarly Research Notices, vol. 2013, Article ID 423590, 8 pages, 2013.

## 2. 研究手法・成果

### 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

生体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ります。産業的に様々な利点を持つ酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 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ます。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ました。

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 *Escherichia coli* が宿主の大腸に住み着く過程で、中和によって胃酸による分解を防ぐ目的で生産される酵素グルタミナーゼ (YbaS) がすでに知られています。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<sup>注 1)</sup>を含んだ酵母細胞壁アンカータンパク質である  $\alpha$ -アグルチニンの遺伝子を融合して、YbaS 提示酵母を作製しました (図 2)。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%の収率で生産しました。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豆腐からの「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ました (図 3)。

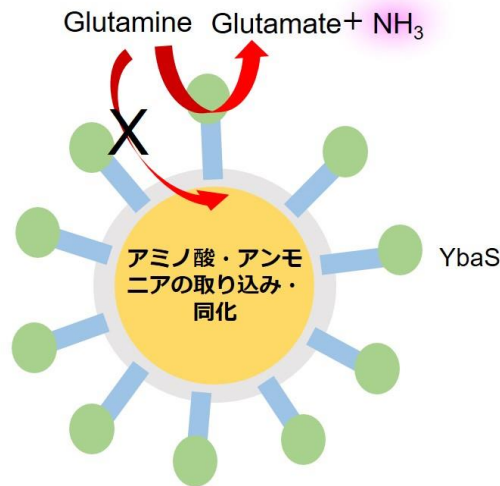


図2 アミノ酸からアンモニアを生産できる細胞表面酵母

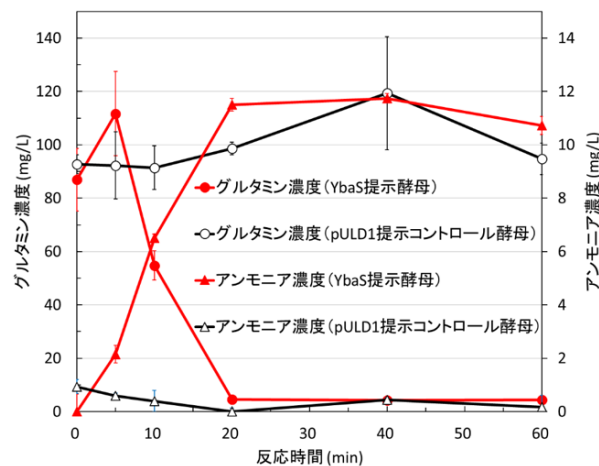


図3 前処理オカラのグルタミンからのアンモニア生産

## 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す。この特異性の低さを利用して土壌中の窒素源であるアミノ酸を分解し、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に起因します。しかし、この酵素の利用はあまり進んでおらず、本研究では、*H. cellulovorans* 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ (HcLAAO) を、細胞表面工学の手法を用いて酵母細胞表面上に提示し、混合アミノ酸溶液からのアンモニア生産に供しました。

L-アミノ酸オキシダーゼは、通常補酵素として FAD<sup>注2)</sup>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ところ、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ました。FAD はアミノ酸オキシダーゼと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ました。

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いました。

た。すると、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ました。これは理論収率の 63.0%でした。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いました。結果として、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ました（図 4）。この結果から、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とともに、付加価値の高い  $\alpha$ -ケト酸の生産系の構築にも成功しました。

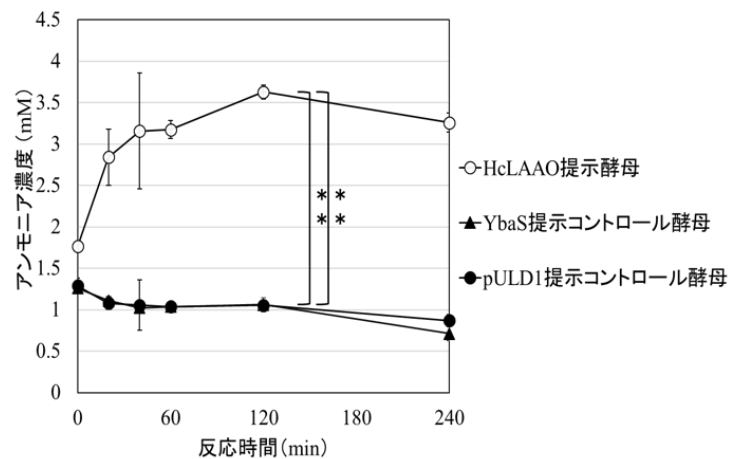


図 4 前処理オカラからのアンモニア生産

### 3. 波及効果、今後の予定

食品加工廃棄物の活用リサイクルは、地球環境の保全からも最も望ましいです。一方、ニトロゲナーゼなどの酵素を用いて、空中窒素からのアンモニア固定は理想ですが、ニトロゲナーゼという酵素は、酸素に非常に弱いため、好気条件下では、失活して利用できません。この酵素が好気条件でも働いている微生物の発見もあり、今後、アンモニア合成の原料問題も絡んで、このカーボンフリーの脱炭素エネルギーであるアンモニアの生産は、長く人類を支えてきた環境負荷の大きいハーバーボッシュ法への挑戦として、環境保全型の前途有望なバイオ生産技術になることが予想されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

JST-COI-NEXT (grant number JPMJPF2008) 「食サイクルのイノベーション（フード&アグリテック）未来共創拠点」の支援により推進されました。

#### <用語解説>

注 1) GPI アンカーアタッチメントシグナル配列とは、真核細胞の細胞表層タンパク質がもつ細胞表層を標的とするアミノ酸配列のこと。

注 2) FAD とは、酸化酵素がもつ補酵素のこと。

#### <研究者のコメント>

アンモニアは、100 年以上も前からハーバー・ボッシュ法を用いて高温・高圧下でつくられ、肥料として人

類の食に貢献してきましたが、その製造でのエネルギー消費は温暖化の一因ともなっています。近年、アンモニアは、水素エネルギーの液体キャリアーとして、さらにカーボンフリーの燃料として、注目を集めています。ところで、先進国を中心に食品廃棄物の増加が環境に負荷をかけ始めているため、この廃棄物から効率よくアンモニアを生産できれば、SDGs に適合する食品ロス 0 の技術の創出にもつながります。そこで本研究では 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてアミノ酸異化酵素による、効率的な新規アンモニア生産酵母の構築を行い、食品加工廃棄物の有効利用にも大きな貢献が可能であり、ハーバーボッシュ法に依存しないアンモニアのバイオ生産プラットフォーム形成に成功しました。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル：Sustainable biological ammonia production towards a carbon-free society（脱炭素社会の構築に向けた環境負荷をかけない生物学的なアンモニア生産）

著 者：Yukio Watanabe, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda

掲 載 誌：Sustainability 13, 9496 (2021) DOI：10.3390/su13179496



青木航助教、渡邊幸夫

#### <お問い合わせ先>

植田 充美（うへだ みつよし）

京都大学産官学連携本部・特任教授（JST-COI-NEXT PL）

TEL：075-753-9154

E-mail: ueda.mitsuyoshi.7w@kyoto-u.ac.jp

#### <報道・取材に関するお問い合わせ先>

京都大学 総務部広報課国際広報室

TEL：075-753-5729 FAX：075-753-2094

E-mail：comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp