

講演番号：2B04-01

質疑応答日時、会場：3月15日 10:30～ ミーティングルーム B

窒素固定細菌を用いた大気中窒素を由来とする L-グルタミン酸生産法の確立

L-Glutamate production from aerial nitrogen using nitrogen-fixing bacteria

○吉留 大輔¹、伊藤 有亮^{1,2}、古園 さおり^{1,3}、日高 真誠¹、西山 真^{1,3} (1東大院・農生科、²キッコマン株式会社、³東大・微生物連携機構)

○ Daisuke YOSHIDOME¹, Yusuke ITO^{1,2}, Saori KOSONO^{1,3}, Makoto HIDAHA¹, Makoto NISHIYAMA^{1,3} (1Grad. Sch. Agri. & Life Sci., UTokyo, ²Kikkoman Corporation, ³CRIM, UTokyo)

生物窒素固定を窒素化合物生産に応用し、持続可能性を高める試みが盛んになっている。本研究では、イネ根圏より分離した窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* NG13 (NG13 株) を用いて、大気中の窒素より L-グルタミン酸 (Glu) を発酵生産することを達成した。

まず、NG13 株が大気下で高い窒素固定能を発揮しながら増殖する培養方法を検討した。常用されるグルコースを単一炭素源とする窒素固定培地 (KD 培地) よりも、グルコースとクエン酸を混合して炭素源とする培地 (KDC 培地) の方が、NG13 株は高い窒素固定能を発揮しながら増殖した。ただし、どちらの培地でも、培地への Glu の蓄積は起きなかった。そこで、Glu への代謝流量強化のために NG13 株に *Corynebacterium glutamicum* のクエン酸合成酵素遺伝子を導入した NG13-CS 株を作製したところ、Glu の蓄積が認められ、その生産量は KDC 培地の方が KD 培地の 4 倍であった。窒素固定能も KD 培地より KDC 培地の方が 2 倍高い値を示した。また、培養時の窒素ガスを ¹⁵N₂ としたところ、培地に蓄積した Glu の大部分が ¹⁵N で標識された。さらに、KDC 培地中のクエン酸の利用能を高めるために NG13-CS 株において NG13 株が有する Na⁺依存性クエン酸輸送体遺伝子の発現強化を行ったところ、KDC 培地での Glu 生産能がさらに高まった。

In the present study, we have developed a L-glutamate (Glu) production system from aerial nitrogen using *Klebsiella oxytoca* NG13, a diazotroph isolated from the rhizosphere of rice.

First, we investigated the composition of carbon sources to exhibit high nitrogen-fixing ability under the atmospheric condition. The combination of glucose and citrate (KDC medium) led to higher nitrogen-fixing ability of NG13 than glucose as a sole carbon source (KD medium). However, NG13 did not produce Glu in either medium. Next, the gene encoding citrate synthase of *Corynebacterium glutamicum* was expressed in NG13 (NG13-CS) to increase the carbon flux to Glu. NG13-CS produced Glu in KD medium. Further, 4-fold Glu-production and 2-fold nitrogen-fixing ability were observed in KDC medium. Labeling experiments using ¹⁵N₂ gas confirmed that most of the produced Glu was derived from aerial nitrogen. Lastly, we overproduced the Na⁺-dependent citrate transporter in NG13-CS to increase the citrate uptake, resulting in more Glu production in KDC medium.

nitrogen fixation, glutamate production, *Klebsiella oxytoca*

発表責任者：吉留大輔 (babubabu-babubu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)