

未来社会創造事業 探索加速型
「地球規模課題である低炭素社会の実現」領域
年次報告書(探索研究)

令和元年度 研究開発年次報告書

平成 29 年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：藤田 祐一]

[名古屋大学大学院生命農学研究科・教授]

[研究開発課題名：空気を肥料とする窒素固定植物の創出]

実施期間：平成 31 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

§1. 研究開発実施体制

(1)「藤田」グループ(名古屋大学)

① 研究開発代表者: 藤田 祐一 (名古屋大学大学院生命農学研究科、教授)

② 研究項目

- ・トランスポゾン変異導入による窒素固定生育異常株の単離と原因遺伝子の特定
- ・ニトロゲナーゼ活性向上のためのグルコース耐性株の単離

(2)「松尾」グループ(名古屋大学)

① 主たる共同研究者: 松尾 拓哉 (名古屋大学遺伝子実験施設、講師)

② 研究項目

- ・内生夜型遺伝子を利用した NifHDK 発現系の開発
- ・NifH の機能的発現の検証

(3)「山篠」グループ(名古屋大学)

③ 主たる共同研究者: 山篠 貴史 (名古屋大学大学院生命農学研究科、准教授)

④ 研究項目

- ・サイトカニン情報伝達経路で誘導される転写因子の機能解明
- ・ニトロゲナーゼ Fe タンパク質をコードする NifH のシロイヌナズナにおける発現

(4)「和田」グループ(宮崎大学)

① 主たる共同研究者: 和田 啓 (宮崎大学医学部、准教授)

② 研究項目

- ・窒素固定遺伝子群のマスターレギュレーター CnfR の構造解析
- ・CnfR が結合する DNA 配列の探索
- ・Nif タンパク質群の発現検出用の抗体作製

§2. 研究開発実施の概要

窒素固定能の植物への移入を目指し、シアノバクテリア、緑藻、シロイヌナズナを用いて、各々、窒素固定 (*nif*) 遺伝子を導入した非窒素固定性シアノバクテリアでのニトロゲナーゼ活性の向上および窒素固定性シアノバクテリアにおける酸素パドクス統御に関わる遺伝子の同定、緑藻およびシロイヌナズナの葉緑体でのニトロゲナーゼタンパク質の発現を試みている。また、ニトロゲナーゼとその関連タンパク質の構造機能相関について検討を進めている。シアノバクテリアでは、トランスポゾン (Tn) 変異導入により窒素固定生育に異常を来した変異株を新たに 10 株選抜し、Tn 挿入部位の特定を行ったところ、1 株においてグローバル窒素制御タンパク質をコードする遺伝子内に Tn 挿入が見つかった。これは、*nif* 遺伝子が *cnfR* を介してグローバル窒素制御タンパク質によって発現制御を受ける可能性を支持している。緑藻の葉緑体ゲノムに内生の夜型プロモーター下に *nifH* を導入した形質転換体を単離し、NifH の発現が明暗周期の暗期にピークを示すことを確認し、さらに *nifD-nifK* 遺伝子を挿入した形質転換体を単離した。また、シロイヌナズナの根の二次肥厚に関わる制御タンパク質として以前特定した LBD3/4 に加え新たに bHLH ファミリーの関与を見出した。シロイヌナズナでの NifH 発現を目指して、葉緑体へのターゲティングのために RsbS のトランジットペプチドを連結した NifH 発現形質転換体を単離し、抗 NifH 抗体によりトランジットペプチドが切断された NifH タンパク質の過剰発現を確認した。CnfR タンパク質の結晶構造解析では、微小結晶を得て、X 線回折点の観測に成功した。さらに、CnfR タンパク質により DNA プロテクションアッセイにより CnfR が結合する複数の結合配列を特定した。