

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(探索研究期間)

令和2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]

[国立大学法人東海国立大学機構 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：令和2年4月1日～令和3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
- ・ニトロゲナーゼ遺伝子導入グルコース耐性株の窒素枯渇条件での育種

(2)「山篠」グループ(名古屋大学)

① 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)

② 研究項目

- ・ニトロゲナーゼ Fe タンパク質 NifH のシロイヌナズナにおける発現
- ・ニトロゲナーゼの発現を支える軸性器官の肥厚成長に関する研究

(3)「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

- ・*nifH*の機能的発現の検証
- ・金属クラスター合成系遺伝子の発現

(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 の機能解析
- ・*L. boryana* CnfR-DNA 複合体の立体構造解析に向けた試料調製
- ・*In vitro* ニトロゲナーゼアッセイに用いるタンパク質群の発現・精製

§2. 研究開発実施の概要

藤田グループでは窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* において窒素固定と光合成を両立させる分子機構を明らかにするために、トランスポゾンによる変異導入を行い、約 4,500 株の Tn 導入株から、窒素固定生育に異常を来す変異株を 51 株単離した。非窒素固定性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に *nif* 遺伝子群を導入した CN1 株に対し、欠損により呼吸活性が向上する遺伝子 *cytM* の欠損を加え CN1 Δ *cytM* 株を新たに単離し、そこからグルコース耐性株を単離した。この株を窒素欠乏条件において継続的に培養することで、窒素固定的生育が可能となった株の育種を進めている。山篠グループでは、シロイヌナズナに *nifH* を導入した形質転換体を単離し、その抽出液における NifH タンパク質の存在を Western blotting で確認した。シロイヌナ

ズナで発現させた Fe タンパク質の活性を確認するためのシアノバクテリアの抽出液を使った評価系を確立した。また、根の軸性器官の肥厚成長に関わる転写制御タンパク質 LBD3/4によって制御される遺伝子群を明らかにするために、RNA-seq 解析を行った。松尾グループでは、クラミドモナスの葉緑体 DNA に導入した *nifH* の発現を確認し、Fe タンパク質としての活性について検討を進めている。また、ニトロゲナーゼの他の遺伝子群を核ゲノムに導入した形質転換体の単離を進めている。和田グループでは、シアノバクテリアの窒素固定遺伝子群のマスターレギュレーター CnfR の生化学的解析を進め、CnfR が認識して結合するモチーフを明らかにした。また、*in vitro* ニトロゲナーゼ活性測定に供するためにフェレドキシンおよびフェレドキシン-NADP⁺還元酵素を、大腸菌発現系を利用して精製し、山籾グループに供給した。