

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
終了報告書(探索研究期間)

令和3年度
研究開発終了報告書

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29年11月1日～令和4年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(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

- ・非窒素固定シアノバクテリアへのニトロゲナーゼ活性付与とその向上
- ・窒素固定シアノバクテリアにおける窒素固定と光合成の両立機構の解析
- ・ニトロゲナーゼ活性を付与した非窒素固定シアノバクテリアの窒素枯渇条件での育種

(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

- ・内生夜型遺伝子の探索
- ・レポーター系を用いた CnfR および内生プロモーターによる発現制御法の確立
- ・*nifHDK* 発現系の確立
- ・不足因子の追加と窒素固定能の検証

(3)「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 タンパク質サブユニット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)「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 の構造機能解析
- ・Nif タンパク質群の発現検出用の抗体作製

§ 2. 研究実施の概要

本研究では、窒素固定能の植物への移入を目指し、光合成生物のモデルとしてシアノバクテリア、緑藻、シロイヌナズナを用い、各々の生物の特性を生かし窒素固定(*nif*) 遺伝子導入によってニトロゲナーゼの機能的発現を試みた。また、光合成生物における窒素固定活性の構造基盤を明らかにするためにニトロゲナーゼ関連タンパク質の構造機能相関について研究を行った。

藤田グループでは、窒素固定シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* が、酸素に脆弱なニトロゲナーゼと酸素を発生する光合成を両立する分子機構を明らかにするために、トランスポゾン(Tn) 変異導入系を確立し(Tomatsu et al. 2018)、この系を活用して窒素固定生育に異常を来した変異株を多数選抜し、ゲノムリシーケンシングにより Tn 挿入部位を特定し、窒素固定と光合成の両立に関わる遺伝子群を推定した。また、*L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターの解析を進め、NifW, NifX/NafY, NifZ が窒素固定生育に必須の役割を

担うことを明らかにした (Nonaka et al. 2019)。非窒素固定シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム中立部位に *L. boryana* の *nif* 遺伝子群 (25 遺伝子及び転写制御タンパク質 CnfR 遺伝子) を導入した形質転換体 CN1 を単離し、光合成生物に初めてニトロゲナーゼ活性を付与することに成功した (Tsujiimoto et al. 2018)。当初得られたニトロゲナーゼ活性は、*nif* 遺伝子供与生物 *L. boryana* の約 0.3% (乾燥重量比) であったが、活性酸素除去系遺伝子の導入、有機酸添加等の処理により最大 1.4% まで向上させた。

松尾グループは、ニトロゲナーゼ構造遺伝子 (*nifH*, *nifD*, *nifK*) を緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の葉緑体ゲノムに導入することで機能発現を試みた。特に、発現を夜間に限定することで、光合成と時間的に隔離することを目指した。そのために2つの方法を試みた。一つは、シアノバクテリア *nif* 遺伝子群のマスター転写因子である CnfR による遺伝子発現制御系を、クラミドモナス葉緑体へ移入する方法である。もう一つは、クラミドモナス葉緑体ゲノムで夜間に発現する遺伝子を探索し、そのプロモーターを発現系に利用する方法である。結果として後者が機能し、夜間に特異的に発現する *chlL* プロモーターを用いてニトロゲナーゼ構造遺伝子の発現を試みた。その結果、葉緑体ゲノムに導入した *nifHDK* の mRNA を検出することに成功した。さらに、発光レポーターを用いた解析により、夜間における NifH タンパク質の蓄積を確認した。緑藻は NifDK 複合体 (MoFe タンパク質) が成熟型となるために必須のコファクター (FeMo-co) を合成できないため、クラミドモナスにおける FeMo-co 生合成系の構築にも取り組み、主要な 5 遺伝子 (*nifBENVU*) を核ゲノムに導入し、発現させることに成功した。

山篠グループでは、ニトロゲナーゼ Fe タンパク質をコードする *nifH* を、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の核ゲノムに導入した形質転換体を作製した。形質転換体の種々の組織における NifH 発現量をウェスタン法で解析し、連結した葉緑体ターゲティングシグナルが機能し NifH が葉緑体に局在していること、葉よりも花茎において多く発現することを確認した。*L. boryana* の MoFe タンパク質画分を使った Fe タンパク質の活性評価系を確立し、形質転換体の抽出液における Fe タンパク質活性の検出を試みたが、活性は認められなかった。

これに並行して、ニトロゲナーゼの有力な機能発現の場として根に注目し、根の軸性器官の肥厚成長の制御について研究を行った。その結果、サイトカイニン誘導性の転写因子 LBD3/4 を同定し、その転写因子が中心柱における細胞壁合成を調節することで二次肥厚成長を促進していることを明らかにした。

和田グループでは、酸素に脆弱な性質をもつ窒素固定関連タンパク質の機能発現機構を明らかにすることを目的として、関連タンパク質の構造機能解析を進めた。*L. boryana* の *nif* 遺伝子群のマスター転写因子 CnfR は低酸素・窒素枯渇に応答して *nif* 遺伝子群の転写を活性化する。この低酸素の感知とそれに応じた転写活性化の分子機構を明らかにするために、無酸素状態で実験を進めることによって低酸素感知に関わる Fe-S クラスターを保持した状態で大量に精製することに成功した。この Fe-S クラスターは酸素にさらされると急速に分解されるが、変異導入 (Y45H) により Fe-S クラスターの酸素安定性を約 20% 向上させることに成功した。また、DNA 分解プロテクションアッセイを利用した CnfR 結合 DNA 配列を探索する実験系を確立した。CnfR の結合部位は、*L. boryana* ゲノム上の *nifP* と *nifB* 間の非翻訳領域配列に複数存在し、その共通配列を決定した。この配列と CnfR を利用することにより、異種における窒素固定の制御機構、特に窒素枯渇・低酸素条件下での発現制御系の開発が可能になることが期待される。さらに、*L. boryana* Nif タンパク質群 (NifU, NifS, NifE, NifN, NifV) に特異的かつ高感度で反応するポリクローナル抗体を作製した。今後、植物やクラミドモナスなど異種発現研究に必須となる窒素固定遺伝子群のタンパク質発現の検出を可能にした。

Tsujiimoto, R., Kotani, H., Yokomizo, K., Yamakawa, H., Nonaka, A., and Fujita, Y. (2018)

Functional expression of an oxygen-labile nitrogenase in an oxygenic photosynthetic organism. *Sci. Rep.* **8**, 7380

Nonaka, A., Yamamoto, H., Kamiya, N., Kotani, H., Yamakawa, H., Tsujimoto, R., and Fujita, Y. (2019) Accessory proteins of the nitrogenase assembly, NifW, NifX/NafY, and NifZ, are essential for diazotrophic growth in the nonheterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Front. Microbiol.* **10**, 495