

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06000・19K21143

研究課題名（和文）高等植物における窒素固定酵素ニトロゲナーゼの機能発現

研究課題名（英文）Functional expression of nitrogen fixing enzyme, nitrogenase on higher plants

研究代表者

山本 治樹（YAMAMOTO, Haruki）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：80615451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では分子状窒素をアンモニアへと還元する酵素ニトロゲナーゼを高等植物に導入し、窒素固定可能な作物植物を創り出す基盤を作ることを目指した。ニトロゲナーゼの還元コンポーネントであるNifHの発現を指標に植物体内における最適なニトロゲナーゼの発現部位の探索を行った。昨年までの研究により、植物細胞における葉緑体、ミトコンドリア、細胞質において局所的にNifHを発現させることに成功し、花茎において最もNifHの発現量が高くなることが明らかとなった。本年度は植物細胞内で発現したNifHについて、その活性を検出するためその精製手法の確立と、in vitroでの活性測定方法の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では分子状窒素をアンモニアへと還元する酵素ニトロゲナーゼを高等植物に導入し、窒素固定可能な作物植物を創り出す基盤を作ることを目指した。ニトロゲナーゼの還元コンポーネントであるNifHの発現を指標に植物体内における最適なニトロゲナーゼの発現部位の探索を行った。本研究では植物体内で発現したNifHの活性の確認はできなかったが、時間的、空間的に分離したサンプリングによって、植物組織内でNifHの安定性について新たな知見をもたらし、今後の植物体におけるニトロゲナーゼ発現に関する研究の礎となる実績となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to introduce nitrogenase, an enzyme that reduces molecular nitrogen to ammonia, into higher plants to create a basis for creating crop plants that can fix nitrogen. We searched for the optimal expression site of nitrogenase in plants using the expression of NifH, which is the reducing component of nitrogenase, as an index. Studies up to last year revealed that NifH was successfully expressed locally in chloroplasts, mitochondria, and cytoplasm in plant cells, and that the expression level of NifH was highest in flower stems. In this year, we established a purification method to detect the activity of NifH expressed in plant cells and constructed an in vitro nitrogenase activity assay method.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ニトロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

高等植物を含む真核光合成生物では窒素源として硝酸やアンモニアを要求する。しかし窒素固定が可能な一部のシアノバクテリアや光合成細菌、窒素固定細菌などは空気中の窒素分子からアンモニアを生成するニトロゲナーゼという酵素により窒素源を確保することが可能である。これらの生物の持つニトロゲナーゼを作物植物などで機能させる試みは、窒素肥料に依存しない農作物の創出の可能性を持っている。ニトロゲナーゼは酸素に対して非常に不安定な性質を持つ酵素のため、酸素発生を伴う光合成を行う植物体においてニトロゲナーゼを機能させるにはできるだけ酸素に被曝しない環境を選ぶ必要がある。高等植物におけるニトロゲナーゼの機能発現は様々な試みが行われているが、本研究では植物と同様の酸素発生型光合成を行うシアノバクテリア由来のニトロゲナーゼを用いること、植物体でのニトロゲナーゼ発現を時間、組織、細胞内局在性について網羅的に解析を行い、植物体内における最適なニトロゲナーゼ発現環境の探索を試みる。

2. 研究の目的

本研究では分子状窒素をアンモニアへと還元する酵素ニトロゲナーゼを高等植物に導入し、窒素固定可能な作物植物を創り出す基盤を作ることを目指す。ニトロゲナーゼの還元コンポーネントであるNifHを指標に植物体内における最適なニトロゲナーゼの発現部位を探索する。

3. 研究の方法

シロイヌナズナにおいて、シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* 由来のNifH (ニトロゲナーゼの還元コンポーネント)を細胞内小器官をターゲットして発現させる形質転換体を作成する。細胞内での発現部位として葉緑体とミトコンドリア、細胞質の3つを想定する。それら3種類の形質転換体について、長日条件で生育させたのち、昼と夜の各タイミングで植物組織ごとに分取してサンプリングを行い、時間と器官、そして細胞内小器官の条件を変えた各細胞内環境でNifHの発現量を確認する。NifHは恒常的な35Sプロモーターによって発現されるため、

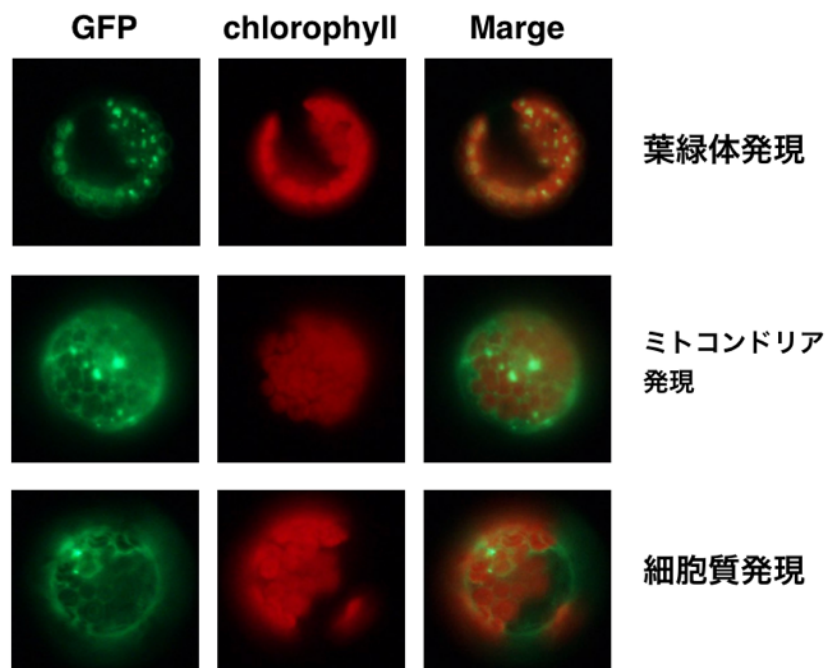


図1 プロトプラストを用いたNifHの局在性の確認

葉緑体、ミトコンドリア、細胞質でそれぞれ選択的に発現させるためのシグナルペプチドをN末端に融合したNifHにさらにC末端にGFPを融合することで、局在性を可視化した。右のレーンがGFPのシグナルを示し、中央のレーンはクロロフィルの自家蛍光を観察することで葉緑体の位置を示している。

NifHの発現量はNifHの安定性を反映するものと考えられ、このNifHの発現量を指標に植物体内におけるニトロゲナーゼの機能発現に最適な環境を模索する。

4. 研究成果

1)各細胞内小器官でのNifHの選択的な発現系の構築

プロトプラストを用いた各オルガネラでのNifH発現テストではそれぞれ葉緑体、ミトコンドリア、細胞質で発現するように適切なシグナルペプチドをNifHのN末端に付加し、その発現を確認した。C末端に融合したGFPの局在性を蛍光顕微鏡で検出することで、NifHがそれぞれ適切なオルガネラへ輸送

されており、想定されるターゲットにおいてNifHが発現していることが確認された(図1)。さらに各オルガネラ内で発現するNifHが活性型であるホモ二量体を形成しているかどうか、split YFPを用いたBiFCアッセイにより確認を行った(図2)。その結果、各オルガネラでNifHを発現するプロトプラストにおいてYFPの蛍光を確認することができたため、すべての発現部位においてNifHが二量体を形成していることが示唆された。

2)それぞれの器官、細胞内小器官におけるNifHの発現の確認

各オルガネラでの発現が確認されたそれぞれのシグナルペプチドを用いてシロイヌナズナ植物体でのNifH発現株の作成を行った。恒常的に発現を誘導するプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの制御下に各シグナルペプチドと融合したNifHを発現するDNAコンストラクトをアグロバクテリアを利用してシロイヌナズナのゲノムDNAに導入した。植物組織で発現するNifHは抗NifH抗体を用いたウェスタンブロット解析によって検出を行った。SDS-PAGEによる電気泳動の移動度から葉緑体とミトコンドリアへと輸送されたNifHはシグナルペプチドを含むN末端側の消化が確認され適切にオルガネラへの輸送処理が行われていることが明らかになった。また花茎、葉、根といった部位ごとに分取して植物組織を採取し、各組織におけるNifHの発現量の比較検討を行った(図3)。その結果、花茎において有意にNifHの発現量が高いことが確認された。光合成が活発に行われる葉ではNifHの発現量は低かった。また地表の組織については採取のタイミングを明期と暗期でそれぞれNifHの発現量を比較したが有意な差は見られなかった。

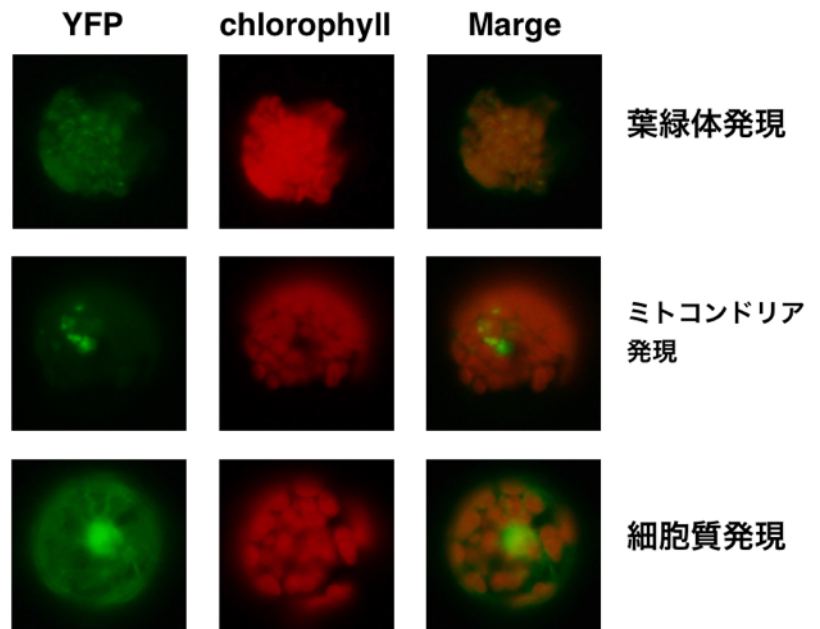


図2 Split YFPを用いたBiFCアッセイによるNifH二量体形成の確認
それぞれのオルガネラで選択的に発現するNifHのC末端にそれぞれYFPを二つに分けたnYFPとcYFPを融合させ、それらを共発現させてYFPの再構成ができるか確認を行った。右のレーンはYFPのシグナルを示し、中央のレーンはクロロフィルの自家蛍光を観察することで葉緑体の位置を示している。

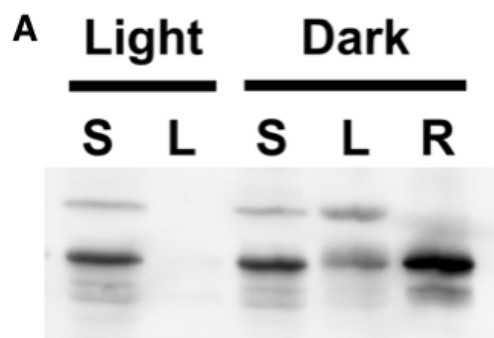
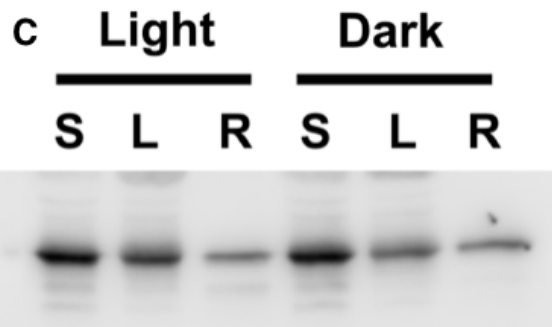
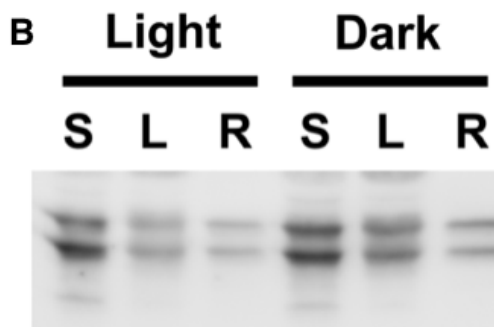


図3 植物体各組織におけるNifHの発現確認

植物体における葉緑体(A)、ミトコンドリア(B)、細胞質(C)でそれぞれ発現するNifHの発現パターン。Sは花茎、Lは葉、Rは根のサンプルをロードした。それぞれのサンプルは長日条件で生育させた植物体を明期(Light)と暗期(Dark)でサンプリングを行った。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nonaka Aoi, Yamamoto Haruki, Kamiya Narumi, Kotani Hiroya, Yamakawa Hisanori, Tsujimoto Ryoma, Fujita Yuichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Accessory Proteins of the Nitrogenase Assembly, NifW, NifX/NafY, and NifZ, Are Essential for Diazotrophic Growth in the Nonheterocystous Cyanobacterium <i>Leptolyngbya boryana</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.00495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本治樹、山篠貴史、藤田祐一
2. 発表標題 Arabidopsis thalianaでのニトロゲナーゼ遺伝子nifHの発現
3. 学会等名 農芸化学会中部支部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院生命農学研究科ゲノム情報機能学研究室HP https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~microbio/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----