

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04387

研究課題名(和文)植物への窒素固定能移入に向けた基盤構築

研究課題名(英文)Transfer of nitrogen fixing ability to plants: Model experiments in cyanobacteria

研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80222264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：窒素固定能を植物に移入することを最終目標とし、光合成と窒素固定を両立する唯一の生物であるシアノバクテリアに着目し、1)トランスポゾンタギングによる変異導入系を確立し、光合成と窒素固定の両立に関わる遺伝子の探索を行った。2)植物に移入するべき遺伝子セットを特定するために、窒素固定能をもたないシアノバクテリアに窒素固定遺伝子を導入し、光合成生物として初めてニトロゲナーゼ活性を付与することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We established transposon-tagging mutagenesis in the nonheterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. Using this technique, we identified one gene that is involved in mechanism for coexisting nitrogenase and photosynthesis. To identify a gene set for transfer of nitrogen fixing ability to plants we isolated transformants in which the 20-kb *nif* gene cluster from *L. boryana* was integrated into a genome neutral site of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. To activate the expression of the *nif* genes the *cnfR* gene encoding the transcriptional activator for the *nif* genes was also integrated into another genome neutral site. A low but significant activity of nitrogenase was successfully detected in the transformants. This is the first example for functional expression of nitrogenase in oxygenic photosynthetic organisms.

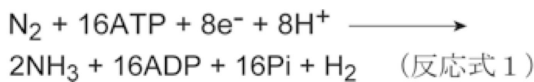
研究分野：植物生化学

キーワード：窒素固定 ニトロゲナーゼ シアノバクテリア トランスポゾンタギング 光合成 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

現在 70 億超の人口は、20 世紀中頃に育種選抜された高収量の穀類によって支えられている。しかし、それらの品種の高収量は、工業的窒素固定でつくられる窒素化学肥料の大量施肥によって初めて可能となっている。工業的窒素固定は、空気中の窒素 (N<sub>2</sub>) を金属触媒存在下で水素 (H<sub>2</sub>) と 500°C、200~500 気圧という高温高压で反応させてアンモニアに変換する。そのエネルギー消費は全世界のエネルギーの 5% 近くを占め、その化石燃料消費による二酸化炭素排出は膨大である。加えて、作物の窒素利用効率はそれほど高くないため、作物に利用されず環境に流出する固定窒素による環境汚染、生物多様性の減少、健康問題は看過できない状況にある。

生物による窒素固定は、ニトロゲナーゼという酵素をもつ一部の原核生物によって担われている (図 1)。ニトロゲナーゼによって触媒される窒素固定反応 (反応式 1) は常温常圧で進行し、工業的窒素固定に比べきわめて効率的である。

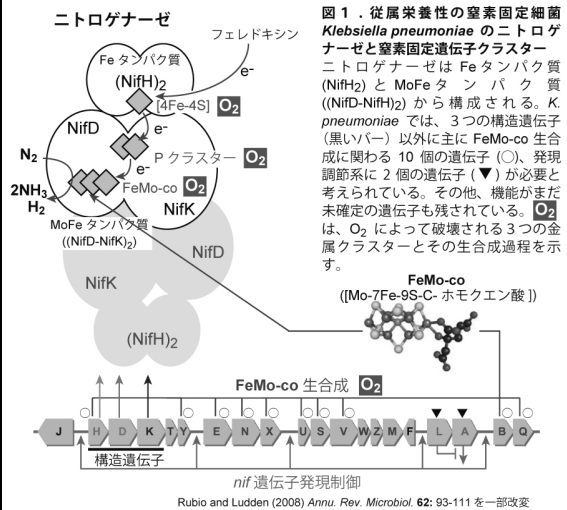


このニトロゲナーゼの触媒能力を作物に付与できれば、空気中の窒素を肥料として利用でき、窒素化学肥料に対する依存性を大幅に低減できる可能性がある。

ところが、ニトロゲナーゼは、酸素 (O<sub>2</sub>) に触れると直ちに不可逆的に不活性化されてしまう脆弱性をもつ。ニトロゲナーゼは、特有の補因子として金属クラスター ([4Fe-4S]、P クラスター、FeMo-co (FeMo コファクター); 図 1) をもちいて一連の電子伝達反応と窒素分子還元を行っており、これらの金属クラスター群は酸素によって速やかに酸化分解されてしまう。さらに、これら金属クラスターの生合成にはニトロゲナーゼの構造タンパク質以外の多数のタンパク質が関与する (図 1)。その上、これら生合成タンパク質において一過的に生成する生合成中間体の金属クラスターもまた酸素に対して脆弱である。植物は酸素を発生する光合成で生育する。このため、作物の細胞でニトロゲナーゼを発現させても、空気中の

酸素のみならず細胞内で生じる酸素によってニトロゲナーゼは速やかに破壊されてしまうことが想定される。

加えて、ニトロゲナーゼは反応を駆動するために大量の ATP を必要とする (反応式 1) ため、窒素十分な条件でニトロゲナーゼをつくらせると大量の ATP が無駄に加水分解されてしまうため、その発現は窒素枯渇条件に限定するなど適切に制御する必要がある。



このようなニトロゲナーゼ特有の性質が、植物でのニトロゲナーゼの機能的発現による窒素固定能付与の試みを極めて困難な課題としている。

シアノバクテリアは、植物と同じ酸素を発生する光合成を行う原核生物であり、植物の葉緑体の起源と考えられている。実際、多くの分子生物学的観点からシアノバクテリアと葉緑体の高い類似性が指摘されている。シアノバクテリアには、窒素固定能を有する種と有さない種が含まれている。窒素固定能を有するシアノバクテリアは、光合成と窒素固定を何らかの機構で両立させており、自身の光化学系 II から発生する酸素からニトロゲナーゼを防御する系やニトロゲナーゼの発現を適切に制御する系を併せもつと推察される。ニトロゲナーゼ遺伝子群に加えて、それらの防御系・制御系を含めて移入することで植物への窒素固定能付与が可能となるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本課題では、

- (1) 窒素固定性シアノバクテリアの窒素固定と光合成の両立機構の解析

(2) 窒素固定能をもたないシアノバクテリアへ窒素固定能移入

という2つの研究を通して、光合成による内生酸素に対する防御機構や制御機構を解明し、窒素固定能付与に必要とされる遺伝子セットを特定し、それをモデル植物において検証する。これらの試みを通して、植物への窒素固定能付与“空気を肥料とする農業”のための基盤確立を目指す。

### 3. 研究の方法

本課題は、以下の2つの方向で研究を推進する。

(1) 窒素固定性シアノバクテリアの窒素固定と光合成の両立機構の解析：窒素固定(*nif*)遺伝子群の遺伝子解析と変異株のスクリーニングにより両立機構に関わる遺伝子群を特定する。

(2) 窒素固定能をもたないシアノバクテリアへ窒素固定能移入：*nif* 遺伝子群を、窒素固定能をもたないシアノバクテリアに導入した形質転換体を作成し、窒素固定移入のモデル実験を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 窒素固定性シアノバクテリアの窒素固定と光合成の両立機構の解析

2種のシアノバクテリアで開発されたトランスポゾンベクター-pKUT-Tn5-Sm/Sp(Watabe et al., 2014)を*L. boryana*で利用可能かどうかを検討した。pKUT-Tn5-Sm/Spを保持する*E. coli* S17-1  $\lambda$ pir と*L. boryana*を混合し、寒天培地にスポットすることで*E. coli*から*L. boryana*へのトランスポゾンベクターの接合伝達を促した。ストレプトマイシンを含有する選択培地で現れた*L. boryana*の形質転換体コロニーを集め、硝酸塩含有寒天培地と窒素固定寒天培地(硝酸塩非添加)でのレプリカを作製し、嫌気条件下で生育させ、窒素固定的条件での生育に異常を来す形質転換体を選抜した。1,839個のコロニーをこの方法でスクリーニングした結果、3個の形質転換体(CT889, CT1590, CT1799)を選抜した。

このうち、CT889は窒素固定的生育がまったくできないNif<sup>-</sup>形質を示した。一方、CT1590は窒素固定条件での生育が有意に遅いNif<sup>S</sup>形質を示した。CT1799は窒素固定的

な生育が野生型よりも有意に促進された。これらの変異株のニトロゲナーゼ活性をみると、CT889は野生型の3%程度の活性しか示さず、Nif<sup>-</sup>形質とよく一致した。CT1590は、野生型とほぼ同じ活性を示すことから、Nif<sup>S</sup>形質は、ニトロゲナーゼ活性低下ではなくそれ以外の過程に問題が生じていることを示唆している。興味深いことに、CT1799は、野生型よりも20%程度高い活性を示した。各条件での生育量を定量的に比較すると、CT1799は嫌気条件下で生育が促進していることがわかった。したがって、ニトロゲナーゼ活性の向上は、嫌気条件下での生育向上によってもたらされたと推察される。

次に、これらの変異株のトランスポゾン挿入部位を特定するためにゲノムリサーチを行った。また、トランスポゾンタギングによりゲノムにどの程度ランダムにストレプトマイシン耐性(Sm<sup>R</sup>)カセットが挿入されたかどうかを検討するために、これら3株に加えて9株(計12株)のゲノムリサーチを行った。

その結果、全12株についてSm<sup>R</sup>カセットの挿入位置を特定することができた。9株でSm<sup>R</sup>カセットは単一コピーとしてゲノムに挿入されていたが、他の3株では2コピーもしくは3コピーが異なる部位に挿入されていた。挿入部位の分布はゲノム上にほぼランダムに分布していた。このことは、pKUT-Tn5-Sm/Spをもちいたトランスポゾンタギングによる変異株作製が*L. boryana*でも可能であることを示している。

窒素固定生育能が失われたCT889では、Sm<sup>R</sup>カセットが*nif*遺伝子クラスター上の*nifU-nifH*遺伝子間領域に転写方向と同じ方向に挿入されていた。*nifH*はニトロゲナーゼのFeタンパク質をコードする遺伝子で、*nifU*はニトロゲナーゼのFeタンパク質やMoFeタンパク質の鉄硫黄クラスターの生合成の初期段階でクラスター形成の足場となるタンパク質をコードしている。この*nif*遺伝子クラスターの転写は、*nifU*の上流に位置する*nifB*と*nifP*の遺伝子間領域から両方向に向かって進行し、*nifU*も*nifH*もその下流の*nifD*、*nifK*、*nifV*、*nifZ*、*nifT*と共に*nifB*プロモーターからの共転写物として転写される。したがって、*nifU-nifH*間のSm<sup>R</sup>カセットの挿入は、共

転写物の安定性を著しく低下させ *nifH* 転写物量を大幅に減少させる効果をもたらすと推察される。このことから、CT889 が窒素固定的生育能を失った原因は、*nifU-nifH* 間への Sm<sup>R</sup> カセットの挿入によると結論づけた。

CT1590 の Nif<sup>S</sup> 形質は、遺伝子 LBDG\_29640 への Sm<sup>R</sup> カセットの挿入によりその機能が失われて生じたと推定される。BLAST 検索によると、LBDG\_29640 は、Cu 輸送型 P 型 ATPase をコードしていることが示唆された。*Synechocystis* sp. PCC 6803 においてこの遺伝子ホモログと推定される *ctaA* (*slr1950*) 遺伝子欠損株の形質が報告されている (Tottey et al. 2003)。その報告では、*ctaA* 欠損株では細胞内の Cu レベルが低下しており、細胞が Cu 不足の応答 (プラストシアニンは Cu 中心を有するため、Cu 不足条件では、ヘムを活性中心とするシトクロム *c<sub>6</sub>* に置換される) を示すことを記している。シアノバクテリアにおける Cu を有するタンパク質として末端酸化酵素 (シトクロム *c* 酸化酵素; COX) もあげることができる。そこで、CT1590 を暗所従属栄養条件での生育を調べたところ、野生株や他の変異株が良好に生育したのに対し、CT1590 はまったく生育できなかった。すなわち、CT1590 では Cu 輸送型 P 型 ATPase の欠損のため Cu 不足となり COX の活性が大きく低下しているようである。ヘテロシストを形成するシアノバクテリアである *Anabaena* sp. PCC 7120 では、COX 欠損株はニトロゲナーゼ活性が大幅に低下することが報告されている。ヘテロシストをつくらぬシアノバクテリアである *L. boryana* でも COX 活性がニトロゲナーゼに重要なはたらきを果たしていることが示唆される。この遺伝子は、ニトロゲナーゼそのものやその生合成系と直接関係がなく、Cu の輸送を通して COX 活性を維持することでニトロゲナーゼの活性維持に大きく貢献している。その点で、LBDG\_29640 は、酸素パラドクスの統御機構の一環を構築していることが示唆される。

非ヘテロシスト形成型シアノバクテリア *L. boryana* で確立されたトランスポゾンタギング法は、今後、酸素パラドクスの統御機構に関わる遺伝子同定に大きく寄与することが期待される。

## (2) 窒素固定能をもたないシアノバクテリアへ窒素固定能移入

光合成生物のモデルの一つとして広く活用されている *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、もともと窒素固定能をもたない単細胞性シアノバクテリアである。本研究に先立ち、私たちは、*L. boryana* の *nif* 遺伝子クラスターの中央部分に当たる 20.8 kb の遺伝子断片とその転写活性化遺伝子 *cnfR* を挿入した CN1、CN1 に *mop* 遺伝子を追加した CN2、*mop* および *coxB2-coxA2-coxC2* を導入した CN3 を単離していた。

本研究では、これらの形質転換体のニトロゲナーゼ活性を詳細に検討した。当初、これらの形質転換体において有意な活性を検出することができなかった。しかし、酸素消去剤であるジチオナイト (DTH) 添加とインキュベーション時間の延長など、活性の評価を慎重に行ったことによりこれら形質転換体でニトロゲナーゼ活性を初めて検出することに成功した。すなわち、アセチレン 10% -アルゴン 90% の気相下で、DTH 添加時のみエチレン生成が認められた。野生型では同条件でエチレンはまったく検出されない。ただし *L. boryana* でのエチレン生成量に比べると極めて少なかった。*L. boryana* と *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、細胞の形態や大きさが大きく異なるため、活性の比較はむずかしい。そこで、それぞれの種について濁度 OD<sub>730</sub> と乾燥重量 (cell dry weight, CDW) の相関を実験的に決定し、CDW 当たりのエチレン生成量として比較を行った。その結果、DTH 添加時において CN1 の活性は *L. boryana* の 0.26% であった。また、CN2 と CN3 の活性を CN1 と比較すると、CN2 の活性が最も低く CN3 の活性は CN1 の活性を超えることはなかった。

ウェスタン解析により CN1 の細胞抽出液にニトロゲナーゼサブユニットタンパク質 (NifH, NifD および NifK タンパク質) を検出した。検出されたニトロゲナーゼサブユニットタンパク質は、*L. boryana* と比較すると、NifH, NifD および NifK タンパク質で各々 17%, 6.4% および 23% であった。これらの値を活性値と比較すると、CN1 で生産されたニトロゲナーゼサブユニット NifH, NifD および NifK タンパク質のわずか 1.5%, 4.1% および 1.1%

しか活性型としてアセンブルしていないと推察される。

さらに、これらの形質転換体の窒素固定条件的生育能を検討した。窒素枯渇-嫌気条件で *L. boryana* は、窒素固定により窒素源を窒素分子から得ることができるため良好に生育したが、いずれの形質転換体でも有意な生育は認められなかった。CN 1 を始めとしこれら形質転換体では、ニトロゲナーゼ活性が低すぎるため窒素固定的生育には至らないと推察される。おそらく、*Synechocystis* sp. PCC 6803 において酸素を除去する活性が不十分であるため、環境を嫌気条件としても光合成で生じる内生の酸素によって大半のニトロゲナーゼが不活性化されてしまうと推察される。今後は、酸素を除去する効果をもつさまざまなタンパク質・酵素の遺伝子を導入し、ニトロゲナーゼ活性の向上を目指す。

トランスポゾンタギング法の確立により、*L. boryana* がヘテロシスト非形成型シアノバクテリアの窒素固定の分子生物学的研究のために格好のモデルとなることが期待される。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 への遺伝子導入によるニトロゲナーゼ活性の付与は、光合成生物に対しては初めての例であり、今後植物へのニトロゲナーゼ活性付与に向けた大きな一歩となる。

#### 参考文献

- Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2014). *Plant Cell Physiol.* **55**, 2017-2026.
- Tottey, S., Rich, P.R., Rondet, S.A. and Robinson, N.J. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 19999-20004.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

1. Tomatsu, C., Uesaka, K., Yamakawa, H., Tsuchiya, T., Ihara, K., and Fujita, Y. (2018) *In-vivo* transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *FEBS Lett.*, **592**, 1634-1642, DOI: 10.1002/1873-3468.13079 (査読有り)
2. Tsujimoto, 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, DOI:10.1038/s41598-018-25396-7 (査読有り)
3. Yamamoto, H., Kusumi, J., Yamakawa, H. and Fujita, Y. (2017) The effect of two amino acid residue substitutions via RNA editing on dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase in the black pine chloroplasts. *Sci. Rep.*, **7**, 2377, DOI:10.1038/s41598-017-02630-2 (査読有り)
4. Terauchi, K., Sobue, R., Furutani, Y., Aoki, R., and Fujita, Y. (2017) Isolation of cyanobacterial mutants exhibiting growth defects under microoxic conditions by transposon mutagenesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 131-138, DOI: 10.2323/jgam.2016.08.004 (査読有り)
5. Tsujimoto, R., Kamiya, N., and Fujita, Y. (2016) Identification of a *cis*-element in nitrogen fixation genes recognized by CnfR in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Mol. Microbiol.* **101**, 411-424, DOI: 10.1111/mmi.13402 (査読有り)
6. Nomata, J., Terauchi, K. and Fujita, Y. (2016) Stoichiometry of ATP hydrolysis and chlorophyllide formation of dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 704-709, DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.070 (査読有り)
7. Tsujimoto, R., Kotani, H., Nonaka, A., Miyahara, Y., Hiraide, Y. and Fujita, Y. (2015) Transformation of the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* by electroporation. *Bio-protocol*, **5**, 24, e1690, <https://bio-protocol.org/e1690> (査読有り)
8. Yamanashi, K., Minamizaki, K. and Fujita, Y. (2015) Identification of the *chlE* gene encoding oxygen-independent Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 1328-1333; DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.124 (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)(招待講演のみ)

1. Fujita, Y. Characterization of the transcriptional regulator CnfR for the *nif* genes in nitrogen fixing cyanobacteria. 20<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation, September 5, 2017, Granada, Spain (Plenary lecture)
2. Fujita, Y., Yamakawa, H., Tsujimoto, R. and Kotani, H. Transfer of cyanobacterial nitrogen fixation genes into the nondiazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 4<sup>th</sup> Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, October 17, 2016, Penang, Malaysia
3. Fujita, Y., Nitrogenase-like reductases in bacteriochlorophyll biosynthesis: Reaction mechanism and plasticity. The 5<sup>th</sup> International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis “Chemical Science for Future Societies”, Jan 29, 2016, Nagoya University, Japan
4. Fujita, Y., Reaction mechanism of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase. 19<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation, October 4, 2015, Pacific Grove, CA, USA
5. Hiraide, Y., Uesaka, K., Ihara, K. and Fujita, Y., Loss of the *cytM* encoding cytochrome *c<sub>M</sub>* stimulates dark heterotrophic growth of cyanobacteria. International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, August 5, 2015, Tübingen, Germany

〔図書〕(計2件)

1. Fujita, Y. and Yamakawa, H. (2017) Biochemistry of chlorophyll biosynthesis in photosynthetic prokaryotes. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes-Metabolism, Bioenergetics, and Omics*, Hallenbeck, P. eds., pp. 67-122, Springer.
2. 藤田祐一・山本治樹 (2015) 第21章 窒素の固定 「光合成のエネルギー変換と物質変換」 pp.215-219、化学同人

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース (2018年5月9日)

空気を肥料とする農業に向け大きく前進  
～光合成生物に窒素固定酵素を導入～

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/201805>

09/index.html

5月10日(木)中日新聞朝刊

5月29日(火)日刊工業新聞

academist journal 「空気を肥料とする植物は可能か? - 光合成生物で窒素固定酵素を作動させる試み」

<https://academist-cf.com/journal/?p=7683>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 80222264

(2) 研究分担者

藤田 祐一 (FUJITA, Yuichi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 80222264

(3) 連携研究者

杉田 護 (SUGITA, Mamoru)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授  
研究者番号: 70154474

(4) 研究協力者

山川 壽伯 (YAMAKAWA, Hisanori)

辻本 良真 (TSUJIMOTO, Ryoma)

井原 邦夫 (IHARA, Kunio)

上坂 一馬 (UESAKA, Kazuma)

小谷 弘哉 (KOTANI, Hiroya)

戸松 千映 (TOMATSU, Chie)

横溝 この実 (YOKOMIZO, Konomi)

山本 治樹 (YAMAMOTO, Haruki)