二国間交流事業 共同研究報告書

令和6年4月19日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
名古屋大学・大学院生命農学研究科
[職・氏名]
教授・藤田祐一
[課題番号]
JPJSBP 120222502

1. 事業名 相手国:チェコ振興会対応機関:CAS)との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 多階層レベルでの可視化が明らかにするシアノバクテリアによる海洋窒素固定の制御

(英文) Visualization of nitrogenase in cyanobacteria at gene, protein and activity levels: Path to unveiling the regulation mechanism of nitrogen fixation

3. 共同研究実施期間 2022年4月1日～2024年3月31日(2年0ヶ月)

【延長前】 年 月 日 ～ 年 月 日 (年 月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Czech Academy of Science, Professor, Ondrej Prasil

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額	4,256,660 円
内訳	
1年度目執行経費	1,764,690 円
2年度目執行経費	2,491,970 円
3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	10名
相手国側参加者等	6名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	0	2	1(0)
2年度目	3	2	3(0)
3年度目	-	-	(-)

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣:委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

本研究では、海洋の窒素循環の要となる窒素固定を担うシアノバクテリアの窒素固定酵素遺伝子の発現制御を転写(情報センシングと転写活性化)・タンパク質・活性及び細胞集団の視点から明らかにすることを目標とし、淡水性糸状性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* および海洋性単細胞性シアノバクテリア *Crocospaera watsonii* および *Cyanothece* sp. ATCC 51142 を用いて下記の3課題に取り組んだ。

1) 淡水性および海洋性シアノバクテリアのニトロゲナーゼタンパク質の蛍光観察及びレポーター系の確立
L. boryana の形質転換系及びシャトルベクターを用いた異種発現系を活用して、ニトロゲナーゼ遺伝子群の発現検出系を確立した。チェコ側参加者は、当研究室の訪問時にその技術を習得してその技術を *Cyanothece* sp. ATCC 51142 に応用した。応用した技術は、チェコ側参加者 Tatsuhiro Tsurumaki 研究員が主著者となって両国の参加者共著で、2022 年 8 月英国リバプールで開催された 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP2022) でポスター発表を行った。日本側からもこの国際会議で日本側代表者藤田祐一がポスター発表を行った。

チェコ側から提供された情報に基づき、日本側で蛍光タンパク質 TFP を用いた *L. boryana* における *nifB* プロモーター活性を検出するレポーター系を構築し、窒素固定条件での *nifB* プロモーターの活性化を蛍光強度の上昇によって評価できる系を構築することができた。

また、海洋性シアノバクテリアにおいて確立している特異抗体を使った免疫蛍光法を、チェコチームの T. Tsurumaki 研究員が来日した際に日本側参加者が技術習得した。さらにチェコ側で確立していた NanoSIMS を用いた窒素固定活性の可視化技術を *L. boryana* に適応し、多数の細胞から成る糸状体の細胞において、窒素固定活性が均質にあるいは不均質に分布しているのかについて解析を行った。

2) 海洋性シアノバクテリア培養とニトロゲナーゼ活性の検出 形質転換系の確立を目指して海洋性シアノバクテリア *Crocospaera watsonii* 及び *Cyanothece* sp. ATCC 51142 について固体培養(寒天培地での生育)を確立した。タンパク質レベルのニトロゲナーゼ活性および窒素固定の活性の検出方法を確立して両国の参加者が共著となって *Journal of Visualized Experiments (Jove)* に論文を発表した。

3) ニトロゲナーゼ Fe タンパク質(NifH)の精製と化学修飾の検討 *L. boryana* の NifH タンパク質にアフィニティタグを連結した融合タンパク質発現系を確立し、その精製を行った。さらに *C. watsonii* のニトロゲナーゼの NifH タンパク質を抗原とする抗 NifH 抗血清を調製し、これを用いて明暗周期での培養において暗期に集菌した細胞の抽出液試料に対してウェスタン解析を実施し、2 本の NifH シグナルが観察された。これは、以前の *Trichodesmium* の NifH タンパク質を抗原とする抗 NifH 抗血清を用いたウェスタン解析が再現されており、その結果が抗血清による非特異的シグナルではなく、NifH タンパク質の翻訳後修飾であることが確認された。さらに、*C. watsonii* においてこの NifH タンパク質の修飾は暗期に再現性よく進行することがわかった。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

日本チームのもつシアノバクテリアに対する遺伝子操作技術を、チェコチーム単細胞性シアノバクテリアに応用

したことにより、海洋の単細胞性シアノバクテリアで初となる *nifH* の発現レポーターシステムを用いた細胞の可視化に向けて大きく前進した。逆に、チェコチームのもつ窒素固定活性の可視化技術を、淡水性シアノバクテリア *L. boryana* に応用することにより、*diazocytes* と呼ばれる限られた細胞集団のみが窒素固定を行う海洋性の糸状性シアノバクテリア *Trichodesmium* が示す窒素固定活性の不均一な分布とは異なり、*L. boryana* ではすべての細胞が同程度の活性で窒素を固定するという均質分布である可能性が高いことが明らかになり、ヘテロシストを作らない窒素固定シアノバクテリアにおいてその窒素固定制御のシステムが大きく異なっていることがわかった。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学术交流することによって得られた成果)

共同研究期間中、チェコチームから Ondrej Prasil 教授、Roman Sobotka 博士、Tatsuhiko Tsurumaki 研究員が来日し、それぞれセミナーを開催し、シアノバクテリアの光合成および窒素固定に関連して活発な意見交換を行った。日本チームからは増田貴子研究員および日本側代表者藤田祐一がチェコ科学アカデミー微生物研究所の Prasil 教授の研究室を訪問し、増田は *L. boryana* の窒素固定活性の可視化のための実験を行い、藤田は窒素固定シアノバクテリアの窒素固定特性、特にニトロゲナーゼへの還元力の供給について意見交換を行った。これらの成果として、国際会議 (ISPP2022) において両国の参加者の共著のポスター(主著者 Tatsuhiko Tsurumaki 研究員)がポスター賞を受賞し、さらに2本の原著論文を発表することができた。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

本共同研究では海洋性窒素固定生物にレポーターシステムを応用することが最も大きなチャレンジであった。期間中にシステムの完成まではできなかったものの、海洋性の窒素固定生物にもレポーターシステムが適用可能であることが確かめられた。窒素固定は一部の原核生物に限られた能力と考えられてきたが、最近、海洋の単細胞性シアノバクテリア UCYN-A が真核藻類に共生し、細胞内に共生したシアノバクテリアが最終的に宿主藻類細胞の窒素固定に特化した細胞小器官(ニトロプラストと呼ぶことが提唱されている)となって、窒素固定を行うことが発見された(Coale et al. (2024) *Science* 384, 217-222)。真核生物においても窒素固定能を有する生物が見つかったことで、遺伝子組換えによって窒素固定能が植物(光合成真核生物)に移植できる可能性を強く支持することになる。窒素固定能が植物/藻類に付与することができれば、エネルギー的に効率的ではないハーバー・ボッシュ法で生産される窒素肥料の大量施肥に依存した農業/水産業から、生物窒素固定を活用した農業/水産業へ移行することが期待され、この技術が実用化されるとその社会的影響ははかり知れない。本共同研究ではこれまで淡水のシアノバクテリアで確立してきた遺伝子操作技術を海洋のシアノバクテリアでも適応可能であることを示すとともに、淡水性窒素固定シアノバクテリアが海洋性窒素固定シアノバクテリアとは異なる窒素固定戦略を採用していることを実験的に実証することにもつながる。このことは、窒素固定能の移植とその生物での作動は、宿主生物の生理学的特徴を反映させる必要があることを示唆しており、窒素固定植物の作出に向けた基盤的研究を継続する必要性を強調している。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

日本チームの増田貴子研究員が、本二国間共同研究の過程で得られた着想に基づき、JST 戦略的創造研究推進事業さきがけ「海洋バイオスフィア・気候の相互作用解明と炭素循環操舵」領域に応募したところ、採択され、2023年9月からさきがけ研究者を兼任することになった。

チェコチームの Tatsuhiko Tsurumaki 研究員が国際会議 (ISPP2022) にてポスター賞を受賞した。

Sobotka 博士と Prasil 教授が名大を訪問された際には、各大学院生・研究員と一対一で対話する時間を設け、自分の研究と成果を紹介してもらい、彼らからの質問に答える機会とした。大学院生、研究員にとって海外の高

名な研究者と個別に英語で対話する貴重な体験となった。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本事業の実施により、海洋性シアノバクテリアにおいて蛍光レポーターシステムを適応することで、窒素固定を遺伝子発現レベル・タンパク質レベルとして細胞単位という多階層で可視化・評価することが可能であることが実証された。今後このシステムが完成し、多様な海洋性シアノバクテリアに適用することができれば、海洋の主要な窒素固定生物であるシアノバクテリアの窒素固定制御の分子機構の理解が飛躍的に前進するだけでなく、海洋の窒素循環の定量的評価にも大きく貢献する。さらに、淡水性窒素固定シアノバクテリア *L. boryana* においても新たに蛍光レポーター系が確立されたことで、より簡便にニトロゲナーゼ活性の変動をモニターすることが可能となり、同シアノバクテリアでの窒素固定と光合成の酸素パラドクス統御の分子機構解明に大きく貢献することとなる。この分子機構解明は、将来的に窒素固定能を植物に付与するための基盤となる。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

本事業で得られた成果に基づき、増田貴子博士はさきがけ研究者として新たな研究課題「シングルセル解析を用いた海洋生産性の再評価」を展開することになった。

本事業で得られた成果は、JST 共創の場形成支援プログラム「再生可能多糖類植物由来プラスチックによる資源循環社会共創拠点」において藤田祐一が担当している課題 1「肥料に依存しない植物の作出」において、さらに展開させていく予定である。