

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 足立 崇

2. 養成カリキュラム名: 植物による石油代替物質生産のためのポストゲノム手法の確立

3. 養成カリキュラムの達成状況

植物による石油代替物質生産のために、ラン藻の窒素固定遺伝子群の単離と一次構造の解析し、異種生物である、大腸菌にニトロゲナーゼ(窒素固定酵素)サブユニットをコードするnifHDKオペロンを導入し、ポリシストロニックに発現した。さらに異種生物のプロモーターを用いた葉緑体形質転換用ベクターの作成に取り組んでおり、養成カリキュラムは達成に向かって順調に進んでいる。

4. 成果(A4版3枚程度)

海洋単細胞性ラン藻の *Cyanotheca sp.* TU126 を実験材料として選択し、窒素代謝関連遺伝子の取得・解析を実施した。

窒素代謝関連遺伝子の取得

Cyanotheca sp. TU126 の窒素代謝関連遺伝子を探索・取得し、保存・維持管理や実験に供するための増殖が容易にできるよう、当該遺伝子群をクローニングするための技術として BAC (Bacterial artificial chromosome: 大きい(~250)分子の DNA を組み込むことができるベクター。ゲノムプロジェクトの物理的地図やシーケンスに用いられる)ライブラリー作成技術を取得した。

窒素代謝関連遺伝子の解析

海洋性単細胞性ラン藻である *Cyanotheca sp.* TU126 から 21 個の窒素固定遺伝子群(nifJ、nifT、nifZ、nifV、nifP、nifB、fdxN、nifS、nifU、nifH、nifD、nifK、orf3、nifE、nifN、nifX、orf2、nifW、hesA、hesB、fdxH)を取得した。これらの遺伝子は、nifJを除いて、約20kbpの領域にクラスターを形成していた。推定される個々の遺伝子の機能、遺伝子サイズ、アミノ酸数、推定されるアミノ酸サイズ、*Nostoc sp.* PCC7120、*Klebsiella pneumoniae* との推定アミノ酸の相同性を表一に示す。推定される個々の遺伝子機能について、Pyruvate flavodoxin dehydrogenase、Iron-sulfur cofactor synthesis protein、Homocitrate synthase、Serine acetyltransferase、FeMo cofactor biosynthesis、Cysteine desulfurase、Nitrogenase Fe protein、Dinitrogenase alpha-subunit protein、Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain、Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein、Iron-molybdenum cofactor processing protein、Nitrogenase stabilizing/protective protein、2つのFerredoxin、6個の機能未知タンパク質が認められた。*Cyanotheca sp.* TU126 と *Klebsiella pneumoniae* について、お互い存在する遺伝子については、高い相同性が認められたが、窒素固定遺伝子群の遺伝子の並びや、遺伝子構成が異なっていた。*Cyanotheca sp.* TU126 と *Nostoc sp.* PCC7120 について、各遺伝子間における相同性が高く、遺伝子の並び、遺伝子構成も非常に似ていた。しかし、nifT、nifZ、

nifV、nifPについては、*Nostoc sp.* PCC7120は、メインの遺伝子クラスター（nifHDKを含んでいるクラスター）と離れているが、*Cyanothece sp.* TU126においては、同じクラスター内にある事が明かとなった。このnifT、nifZ、nifV、nifPがnifHDKを含んだクラスター内に存在する事については、ラン藻において初めての知見である。また、窒素固定細菌である*Klebsiella*には見られるが、ラン藻に存在が確認されていない遺伝子がいくつか存在している。今後これらの遺伝子の探索を行う予定である。さらに、ラン藻の窒素固定遺伝子群の個々の役割についてはほとんど知見が得られていない。このようなことから個々の遺伝子の役割について検討していく事も考えている。

窒素代謝関連遺伝子を用いた形質転換体の作成

海洋性単細胞性ラン藻である*Cyanothece sp.* TU126から単離した21個の窒素固定遺伝子群の中から先行して、ニトロゲナーゼのサブユニット構成遺伝子であるnifH、nifD、nifK各遺伝子について、T7プロモーターを用いた、大腸菌内での発現を試みた。これらの遺伝子の発現の評価を行うために各遺伝子のC末端側にヒスチジンタグを持たせ、ヒスチジンタグを認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、それぞれの遺伝子産物であるタンパク質の蓄積が見られた。また、これらの組み替えタンパク質を用いてnifH、nifD、nifKそれぞれのタンパク質に対する抗体の作成も行った。さらに、ラン藻の遺伝子の多くは、ポリシストロニックな発現をする事が知られているため、T7プロモーターを用いて、大腸菌内でポリシストロニックな発現が認められるかをnifHDKオペロンを用いて検討した。その結果、nifHDKオペロンは、大腸菌内でポリシストロニックな発現を行う事が確認できた。

ラン藻の窒素固定遺伝子群を、葉緑体への多重遺伝子導入による形質転換を行うためにいくつかの問題点が考えられる。その一つにラン藻のプロモーターが葉緑体で機能するかという問題がある。そこで、ラン藻のプロモーター（今回はnifHDKオペロンのプロモーターについて）を含むと思われる領域をPCRにより増幅し、レポーターとしてGFP（グリーン蛍光タンパク質）を用いて葉緑体形質転換ベクターの構築に取りかかっている。同時に、より、植物に窒素固定能を付与させるための実践的な葉緑体形質転換体を作成するためにラン藻プロモーター、nifHDKオペロン、レポーターとしてのGFPを含んだ葉緑体形質転換用ベクターの構築についても行っている。こちらについて葉緑体形質転換用ベクターを構築する際、大腸菌内でのラン藻プロモーターの機能、nifHDKオペロンのポリシストロニックな発現が確認できるか、上記で作成した、nifH、nifD、nifKタンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロットによる確認を行った。その結果、ラン藻プロモーターが、大腸菌内で機能する事、ならびにポリシストロニックに発現する事が確認された。今後、これらの葉緑体形質転換用ベクターを、タバコにパーティクルガンを用いて葉緑体形質転換を行っていく。さらに、葉緑体形質転換に必要な遺伝子を特定し、特定した遺伝子を全て葉緑体に形質転換し、窒素固定能を付与した植物体を作成していく予定である。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。）
該当なし

(2) 口頭発表（発表済を対象。）
海産単細胞窒素固定シアノバクテリアの窒素固定関連遺伝子クラスターの取得（第45回日本植物生理学会年会 2004年3月）

(3) 特許等（出願番号を記載）
該当なし