



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヘテロシストを形成しない糸状性窒素固定シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> : 新たなモデルシアノバクテリアの可能性
Author(s)	藤田, 祐一; Fujita, Yuichi; 山本, 治樹 他
Citation	低温科学, 83, 23-35
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94822
Type	departmental bulletin paper
File Information	03_p023-035_LT83.pdf



ヘテロシストを形成しない糸状性窒素固定シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana*: 新たなモデルシアノバクテリアの可能性

藤田 祐一¹⁾, 山本 治樹¹⁾, 馬場 真里¹⁾

2024年12月2日受付, 2025年1月6日受理

*Leptolyngbya boryana*は、糸状性シアノバクテリアであり、ヘテロシストを分化せず、嫌気（微好気）環境において窒素固定的に生育することができる。また、完全暗所においてもグルコースなどの糖を利用して従属栄養的に生育することができることから、光合成生育能を欠いた変異株の単離が可能である。全ゲノム配列が既に解読済みであり、電気穿孔法もしくは接合法により形質転換が可能である。シャトルベクターを利用した大量発現系およびレポーター系が利用でき、トランスポゾン変異導入による順遺伝学的解析も可能である。本稿では、*L. boryana*の特徴と研究事例（クロロフィル生合成、窒素固定、細胞外小胞、従属栄養に関する分子生物学的研究）および窒素固定研究の方法を紹介し、今後の展望について述べる。

The nonheterocystous filamentous nitrogen fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*: Potential as a new model cyanobacterium

Yuichi Fujita¹, Haruki Yamamoto¹, Mari Banba¹

Leptolyngbya boryana is a filamentous cyanobacterium that can grow diazotrophically without heterocyst differentiation under anaerobic (microoxic) conditions. Since *L. boryana* can also grow heterotrophically in the dark using respiratory substrates such as glucose, mutants lacking photosynthetic growth capacity can be isolated. The genome has been sequenced, and *L. boryana* is transformable by electroporation or conjugation. Shuttle vector, reporter, and transposon mutagenesis systems have been established in *L. boryana*. Using the *L. boryana*'s characteristics, molecular biological studies on chlorophyll biosynthesis, nitrogen fixation, extracellular vesicles, and heterotrophy have been conducted. In this paper, the characteristics of *L. boryana*, research examples and methods of nitrogen fixation studies are presented, and prospects are discussed.

キーワード: シアノバクテリア, 従属栄養, 窒素固定, 形質転換, ゲノム解析

Cyanobacteria, Heterotrophy, Nitrogen fixation, Transformation, Genome analysis

1. はじめに

シアノバクテリアは、植物と同じ酸素を作る光合成を行う原核生物である。進化的には、祖先シアノバクテリアの

一系統が、祖先真核生物の細胞に取り込まれ細胞内共生を介して、葉緑体となったと考えられる。これまでにモデルシアノバクテリアとして *Synechococcus elongatus* PCC 7942や *Synechocystis* sp. PCC 6803および *Anabaena* sp. PCC

連絡先

藤田 祐一

名古屋大学大学院生命農学研究科

〒467-8601 名古屋市千種区不老町

Tel: 052-789-4089

Email: fujita@agr.nagoya-u.ac.jp

1) 名古屋大学大学院生命農学研究科

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya

University, Nagoya, Japan

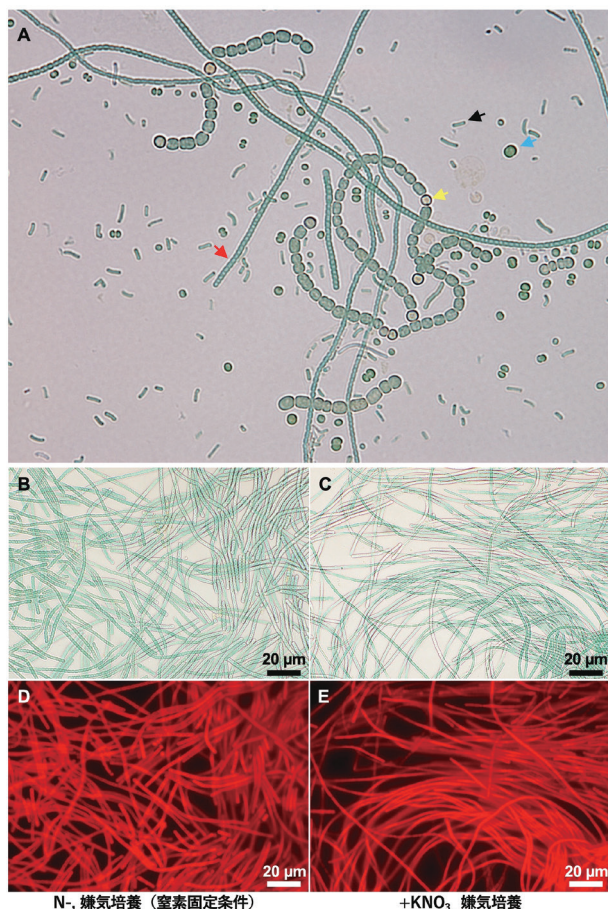


図1 : A. *L. boryana* (赤矢印) とモデルシアノバクテリア3種 ; *Synechocystis* sp. PCC 6803 (青矢印), *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (黒矢印), *Anabaena* sp. PCC 7120 (黄色矢印, ヘテロシスト)

B-E. *L. boryana* (窒素固定による生育と硝酸を窒素源とする生育) 窒素欠乏培地 (B, D) と硝酸栄養培地 (C, E) 上で嫌気・連続光条件下で2週間培養した. 紫外線照射下で観察すると, 光合成色素(クロロフィル, フィコシアニン)による蛍光がすべての細胞において観察され(D, E), 窒素固定生育時にも光合成色素が維持されていることがわかる.

7120が広く光合成や窒素固定研究に活用されてきた. その中で, 私たちは, 糸状性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* (旧学名 *Plectonema boryanum*) を用いて, 既存のモデルシアノバクテリアにはない特徴を活かしながら分子生物学的研究を展開してきた. 本稿では, *L. boryana* の特徴と研究例および窒素固定研究の方法を紹介し, 今後の展望について述べたい.

2. 形態と生育特性

L. boryana は, 細胞が一行につながったまま紐状に増殖していく糸状性のシアノバクテリアである(図1). 細胞は, 概ね2 μmの直径, 高さもほぼ同じ程度の円柱形で, 枝分

かれすることなく直線状につながり, 糸状体 (trichome) を形成する. *Anabaena* sp. PCC 7120の糸状体に比べるとかなり細く, 一つの細胞を比べても *Synechocystis* sp. PCC 6803よりも少し小さい. 窒素固定条件でも均質な細胞であり, ヘテロシストを形成しない(図1B). シアノバクテリアの古典的分類 (Rippka et al. 1979) では, 形態的特徴に基づいて5つのSectionに分類される: Section I (単細胞), II (凝集体, ペオサイト形成), III (糸状性, 細胞分化なし), IV (糸状性, ヘテロシスト分化, 分岐なし), V (糸状性, ヘテロシスト分化, 分岐あり). *L. boryana* は形態的特徴からSection IIIに分類される.

L. boryana IAM M-101は, 淡水性種であり, BG-11培地, 30°Cで光照射下で培養すると光合成独立栄養的に生育する. 例えば, 光強度20 ~ 50 μmol/m²/s程度の光照射下で液体培地で振とう培養すると世代時間5.5 daysで光合成的に生育する (Fujita et al. 1992). より早く生育させるためには, CO₂を2%程度含む空気を通気し, 光強度を200 μmol/m²/s程度まで上げると世代時間約6~7 hで増殖する (Fujita et al. 1998; Yamazaki et al. 2006).

3. 暗所での従属栄養

L. boryana の重要な特徴の一つが高い従属栄養能である. *Synechocystis* sp. PCC 6803では, 暗所従属栄養生育を維持するために毎日15分程度の光照射を必要とする光活性化従属栄養 (Light-activated heterotrophic growth; LAHG) という限定的な従属栄養生育を示す (Anderson and McIntosh 1991) が, *L. boryana* の暗所従属栄養生育ではそのような光照射は必要としない. *L. boryana* は30 mM グルコースを含むBG-11培地 (BG-11Glc) にて完全暗所で従属栄養的に生育することができる. 炭素源としてグルコース以外に, リボース, スクロース, マンニトール, マルトース, フルクトースなどが利用でき, グルコースを使った液体培養では世代時間が12 daysと報告されている (IU-594株, White and Shilo, 1974). *L. boryana* IAM M-101は, BG-11Glc液体培地にて世代時間103 h (4.3 days) で増殖する (Fujita et al. 1992). より早く生育できる暗所適応株を得るために, 野生型を暗所従属栄養条件で長時間 (40 days) 培養することでdg5株が単離された (Fujita et al. 1996). dg5は, 暗所従属栄養での世代時間が59 hと短く, 光照射下での光合成による生育では親株と違いが見られない. このため, dg5が野生型として利用されることが多い (Fujita et al. 1996, Kada et al. 2003).

4. 窒素固定

*L. boryana*のもう一つの特徴は、窒素固定能である (Stewart and Lex 1970). 窒素固定反応を触媒する酵素ニトロゲナーゼが酸素によって速やかに不活性化してしまう性質をもつため、光合成で酸素を作るシアノバクテリアにおいてどのように光合成と窒素固定を両立させるのか、いわゆる“酸素パラドクス”をどのように解決するかが重要な視点となる。これは、単に環境中の酸素に対する防御対応のみの他の窒素固定生物とは異なるシアノバクテリア固有の観点である。シアノバクテリアの“酸素パラドクス”を統御する戦略として最もよく知られているのが、窒素固定に特化した細胞ヘテロシスト分化による、光合成と窒素固定との空間的隔離である (Zeng and Zhang 2022). ヘテロシストは、分厚い細胞壁によって酸素の流入を抑制し、光化学系IIをなくして細胞内で酸素を発生させず、細胞膜の高い呼吸活性によりわずかな酸素も除去することで、ニトロゲナーゼが作動できる十分な嫌気的環境を作り出す。このシステムにより、*Anabaena* sp. PCC 7120を始めとするヘテロシスト形成型シアノバクテリアは、通常の空気下 (21%酸素) という好気的環境でも窒素固定が可能となっている。

ヘテロシストを分化しない糸状性種 *L. boryana* は窒素固定生育には嫌気的環境を必要とする (Stewart and Lex 1970). ただ、嫌気条件においても光合成による酸素発生は継続するため、正確には微好気 (microoxic) 環境と表現するべきかもしれない。ジチオナイト (亜ジチオン酸ナトリウム) を添加すると *in vivo* ニトロゲナーゼ活性が大幅に促進される (Nagatani and Haselkorn 1978). これはジチオナイトが酸素を完全に除去することによる効果と推察される。

一方、窒素固定を夜間に限定して行うことで、光合成と窒素固定とを時間的に隔離して酸素パラドクスを統御する戦略も知られている (Mitsui et al. 1986; Grobbelaar N. et al. 1986). これらのシアノバクテリアでは、窒素固定活性と光合成活性が各々夜間と日中で活性が互いに概日的に振動するという、明瞭な概日リズムで制御されている。このような制御は、*L. boryana* UTEX 594 においても報告されている (Misra and Tuli 2000). なお、ヘテロシストを分化しないシアノバクテリアの窒素固定は、嫌気的 (微好気) 環境を要するタイプ (*L. boryana*), 好気的環境下において概日リズム制御で夜間に限定されるタイプ (*Cyanothece*), 好気的環境で日中に限定されるタイプ (*Trichodesmium*), 明け方と日没直後に限定されるタイプ (温泉微生物マツト

の *Synechococcus*) と多様性が見られる (Bergman et al. 1997, Stal and Zehr 2008).

5. ゲノム解読

L. boryana のゲノムは、主要な環状ゲノム (6,176,364 bp), 1つの環状プラスミド (pLBA, 77,793 bp), 2つの線状プラスミド (pLBX, 504,942 bp; pLBY, 44,369 bp) から構成される。*Synechocystis* sp. PCC 6803 (3,573,470 bp; Kaneko et al. 1996) や *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (4,659,019 bp; Nakamura et al. 2003) よりもかなり大きい。が、*Anabaena* sp. PCC 7120 (主要環状ゲノム 6,413,771 bp; Kaneko et al. 2001) よりやや小さい。

dg5のゲノム解読も行われ、野生型ゲノムとの比較により dg5の暗所従属栄養生育向上をもたらした変異が特定されている (Hiraide et al. 2015). 野生型と dg5のゲノム塩基配列の違いはわずか3ヶ所 (2つの1塩基置換と1塩基挿入) であり、このうち、シトクロム c_M をコードする遺伝子 *cytM* (LBWT_49050) のコード領域の1塩基挿入 (フレームシフトにより *cytM* が機能欠失) が、暗所での従属栄養生育を向上させる原因変異である。シトクロム c_M の機能はまだ不明であるが、*Synechocystis* sp. PCC 6803での *cytM* 欠損株の解析から、シトクロム c_M はグルコース存在下において光合成と呼吸電子伝達系のレドックス制御に関わると推定される (Solymosi et al. 2020).

ゲノム解読の結果、他の多くのシアノバクテリアにおける、*L. boryana* の分子系統的な位置付けがわかってきた (Shih et al. 2013). 主に細胞形態に基づく古典的な分類では Section III とされてきたが、54種の多様なシアノバクテリアで作られた分子系統樹 (Shih et al. 2013) では、*L. boryana* は *Geitlerinema* sp. PCC 7407 を近縁種とするサブクレード D に位置付けられる。また、Komárek らによる分類では、*Synechococcales* 目に分類されている (Komárek et al. 2014, 須田ら 2022). シアノバクテリアの分類はまだ未確定な部分が多く、その中でも特に *L. boryana* とよく似た糸状性の形態の種は多系統を示しており、未だ分類が確立されていない。つまり、*Leptolyngbya* という属名であっても、単に類似した細胞形態に基づき命名されているため、属名だけで互いに系統的に近い関係であるとは必ずしもいえないことは注意を要する。なお、*L. boryana* IAM M-101 とほぼ同一と思われる株は、PCC 6306 (ATCC 27894) (Shih et al. 2013), PCC 6402 (ATCC 27902), PCC 73110 (ATCC 29407) (UTEX 594 (IU 594)) (Schrautemeier et al. 1994), PCC 7410 (ATCC 29136), PCC 7505 (ATCC 29170), NIES-

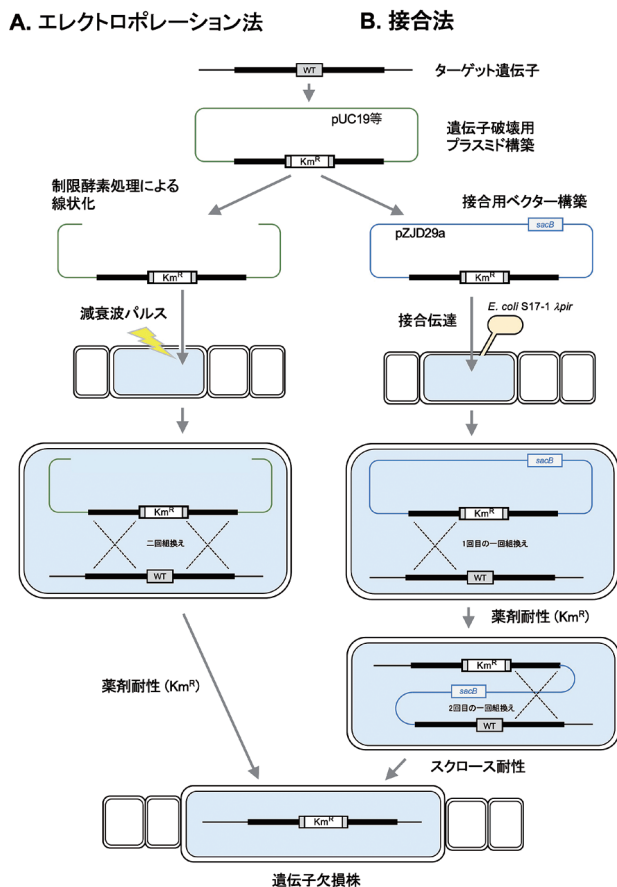


図2: *L. boryana*の形質転換 エレクトロポレーション法 (A) と接合法 (B)

2135 (Hirose et al. 2021), UTEX 485 (Yamazaki et al. 2006) である。

6. 遺伝子操作の基盤技術

6-1 エレクトロポレーションによる形質転換

*L. boryana*の形質転換は、電気穿孔法(エレクトロポレーション)によって行う(図2A, Fujita et al. 1992; Tsujimoto et al. 2015)。特定遺伝子を欠損させた変異株の単離は、まず、ターゲット遺伝子を薬剤耐性遺伝子で分断したプラスミドを構築し、これを電気穿孔法によって細胞に導入し、細胞内でプラスミドとゲノム上のターゲット遺伝子との二回相同組換えを起こした細胞を、薬剤耐性で選抜して単離する。具体的には、プラスミド(あらかじめ制限酵素処理により線状化する)溶液と細胞懸濁液を混合し、電気パルス(電圧12.5 kV/cm, 時定数9~11 ms程度の減衰波パルス)を与えることで、プラスミドを細胞に導入する。パルス印加後、薬剤非添加の明条件で24 h程度培養したのち、

薬剤を含む選択培地に移し、明条件で培養を継続すると、1週間から10日程度で薬剤耐性コロニーが生じる。ただし、薬剤耐性コロニーには、プラスミド上の2つのゲノム相同領域の一方のみゲノムと組換わることで、プラスミド全体がゲノムに取り込まれた一回組換え体が高頻度に含まれる(Fujita et al. 1992)。コロニーPCR等で確認し、一回組換え体を除外し、目的とする二回組換え体を選抜し、ターゲット遺伝子欠損株とする。また、アンピシリンに対する感受性を確認する(ベクター由来のアンピシリン耐性遺伝子が失われている)ことで二回組換え体を選抜することもできる(6-3, 表1参照)。

6-2 接合法による形質転換

上記の電気穿孔法に加え、最近、接合法による形質転換も確立された(図2B; Hida et al. 2024)。ターゲット遺伝子を分断するように薬剤耐性遺伝子を導入したプラスミドのベクター部分を、接合用プラスミドpZJD29a (Masuda and Bauer 2004)に置き換えたプラスミドを構築する。このプラスミドを大腸菌*E. coli* S17-1 λ pirに導入する。pZJD29aは、 λ pirにコードされる π タンパク質に依存して複製される複製起点oriR6Kを有するため、*E. coli* S17-1 λ pirでは維持されるが、 λ pirを有しない*E. coli*やシアノバクテリアの細胞では複製されないため安定に保持されない。このプラスミドを有するS17-1 λ pirと*L. boryana*細胞を混合することで、接合を介してプラスミドを*E. coli*から*L. boryana*細胞に導入する。プラスミド上の一方の相同領域を介した一回相同組換えによってプラスミド全体がゲノムに挿入された一回組換え体を薬剤耐性により選抜、単離する。pZJD29aのベクター部分にはスクロースを致死物質レバンに変換する酵素の遺伝子sacBがコードされており、一回組換え体はスクロース感受性を示す。一回組換え体において、もう一方の相同配列間で2回目の組換えが起こると、ゲノムからプラスミドが除かれ、分断されたターゲット遺伝子のコピーだけがゲノム上に残され、ターゲット遺伝子欠損株が得られる。具体的には、一回組換え体をスクロース(5%)を含むBG-11培地に接種し、スクロース耐性株を選抜する。接合法は、ターゲット遺伝子欠損株を得るために、2回の選抜を必要とするが、その一方、実際の実験操作は、上述の電気穿孔法に比べると簡素であり、概してより多くの形質転換体を得られる。また、接合法では、sacBによる選択を利用した、薬剤耐性遺伝子を用いないターゲット遺伝子欠損株(マーカーレス変異体)の単離も可能である。

表1 *L. boryana*で利用できる抗生物質と耐性遺伝子

抗生物質	使用濃度 (µg/ml)	遺伝子名	薬剤耐性遺伝子由来	参考文献
カナマイシン	15	<i>neo</i>	pKC7	Rao and Rogers 1979
クロラムフェニコール	25	<i>cat</i>	pBR325	Walton et al. 1993
ストレプトマイシン*	10	<i>aadA</i>	pKUT-Tn5-Sm/Sp	Watabe et al. 2014
アンピシリン**	0.5	<i>bla</i>	pUC19	Fujita et al. 1992

* トランスポゾン変異導入でのみ利用実績 (6-4参照, Tomatsu et al. 2018)

** 一回組換え体と二回組換え体を区別するための利用に限定 (接種後24 h程度でコロニーを実体顕微鏡で観察することで感受性/耐性を容易に判別できる)

6-3 薬剤耐性遺伝子

*L. boryana*で利用可能な抗生物質とその耐性遺伝子を表1に示す。カナマイシンが最も広く使われる。シャトルベクター pPBH201 (後述6-5) はクロラムフェニコール耐性遺伝子が選択マーカーとなっている。ストレプトマイシン耐性遺伝子は、トランスポゾン変異導入で利用された (後述6-4)。なお、スペクチノマイシンとジェンタマイシンは、野生型が比較的高い耐性を示すため、薬剤耐性による選抜には利用できない。ジェンタマイシンは接合法においてドナーとなった*E. coli*を排除するために低濃度 (20 ~ 25 µg/ml)で利用される。

6-4 トランスポゾン変異導入系

*L. boryana*においてトランスポゾン (Tn) を活用した*in vivo*変異導入系も確立されている (Tomatsu et al. 2018)。Tn5を有するベクター pKUT-Tn5-Sm/Sp (Watabe et al. 2014)を用いる。このベクターもpZJD29aと同じくπタンパク質に依存した複製起点を有するため、*E. coli* S17-1 λ pirで維持させ、接合法により*L. boryana*の細胞に導入する。*L. boryana*の細胞内で、pKUT-Tn5-Sm/Spにコードされるトランスポゼースの作用により、同じベクターに保持されているME配列に挟まれた薬剤耐性 (ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子) が切り出され、*L. boryana*のゲノムのランダムな位置に挿入される。選抜はストレプトマイシン (Sm) で行う。通常的光合成条件下で培養すると、10日程度でSm耐性のコロニー (トランスコンジュガント) が生じる。Tn挿入は、ゲノム全体にわたってほぼ均等に起こり、位置的な偏りがあるようには見えない。この方法により、形質に基づき順方向の遺伝学的解析 (形質に基づき変異体を単離し、Tn挿入部位から原因遺伝子を特定する) が可能となった。実際に、私たちは、窒素固定生育に必要とされる遺伝子群の特定のためにこの方法を利用した。Sm耐性トランスコンジュガントを、2種

類の寒天培地BG-11およびBG-11₀ (硝酸塩を含まないBG-11) に接種し、嫌氣的に培養し、BG-11で生育するがBG-11₀で生育しないもしくは生育不良を示す株を選抜することで、窒素固定生育に異常を来したトランスコンジュガントを収集した。BG-11₀で生育不良を示した一つのトランスコンジュガントCT1590のゲノム解析の結果、銅イオン輸送体をコードする遺伝子*ctaA* (LBDG_29640) にTnが挿入されていることが判明し、銅イオンの効率的な取り込みが*L. boryana*の窒素固定生育に重要であることがわかった (Tomatsu et al. 2018)。

6-5 シャトルベクター

*L. boryana*では、シャトルベクターを利用し特定の遺伝子を大量発現させることができる。*L. boryana*のシャトルベクター pPBH201は、*Plectonema boryanum* (株名は不明) が有する機能不明の潜在的プラスミドpGL3 (1,504 bp) をpBR322由来の複製起点とpBR325由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結させて構築された (Walton et al. 1993)。このプラスミドの分与を受けて、pPBH202などの一連のシャトルベクターを構築し活用した。シャトルベクター系は、遺伝子欠損株の相補実験や、特定のタンパク質の大量発現のために用いられる。強力なプロモーターとして*E. coli*由来のL. boryanaの光非依存的 (暗所作動型) プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR, dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase) の生化学的解析 (Yamamoto et al. 2009)、大量発現系を相補系として活用したヒメツリガネゴケ葉緑体ゲノムのDPORサブユニットの解析 (Yamamoto et al. 2011)、クロマツ葉緑体ゲノムのDPOR遺伝子のmRNAに対するRNAエディティングの効果の解析が行われた (Yamamoto et al. 2017)。また、光依存型プロトクロロフィリド還元酵素の大量発現 (Yamamoto et al. 2020) によってシアノバクテリア細胞でプロラメラ体

様構造が形成されることを報告した例もある。また、植物のフェレドキシン (Fd) をシャトルベクターで発現させることで、*L. boryana* のFd遺伝子*petF*を欠損させることが可能である。この系を利用し、植物のFdのアイソフォームの生理学的解析が行われた (Kimata-Arigo et al. 2000)。

6-6 レポーター系

レポーター系についても、*luxAB*を使った生物発光による概日リズムの検出の実績がある。pPBH201を使って、Fd遺伝子*petF*とDPORサブユニット遺伝子*chlB*のプロモーターを*luxAB*に連結したプラスミドを構築し、生物発光による概日リズムが測定された (Terauchi et al. 2005)。いずれのプロモーターでも、恒明条件で約24 h周期の明瞭な概日リズムが観察された。また、暗所 (恒暗) 条件でも概日リズムが観察されたが、その周期が約21 hと短周期化していたことは興味深い。

7. *L. boryana*を使った研究紹介

以下、*L. boryana*の特徴 (暗所従属栄養能・窒素固定) を活かした研究例を紹介する。

7-1 葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の機能同定

ゼニゴケの葉緑体ゲノムにおいて、ニトロゲナーゼのFeタンパク質NifHと有意な類似性 (アミノ酸レベルで30%程度) を示すタンパク質をコードする遺伝子*fixC* (ferredoxin にちなんだ暫定的な名称) が見つかった (Ohyama et al. 1986)。ニトロゲナーゼは原核生物にのみ分布することから、*fixC*はおそらく窒素固定ではなく光合成に関係する機能を有すると推定された。暗所従属栄養で生育する能力をもつシアノバクテリア*L. boryana*を葉緑体のモデル生物とし、*fixC*遺伝子の機能の解明を目指した (藤田 2013)。その過程で電気穿孔法による形質転換系を確立し、*fixC*欠損株を単離した。*fixC*欠損株は、光合成条件では野生型と変わらず生育し、特に形質が認められなかったが、暗所従属栄養条件で生育させると異常に青い色調を呈した。色素分析の結果、*fixC*欠損株は暗所生育ではクロロフィルの生合成が停止し、クロロフィル生合成中間体であるプロトクロロフィリドを蓄積することがわかった。この形質から、*fixC*がDPORに関わることが示され、*L. boryana*の高い暗所従属栄養生育能が活用された最初の研究例となった (Fujita et al. 1992)。また、*fixC*欠損株が明所ではクロロフィルが正常に生合成されることから、被子植物の光依存的緑化の鍵酵素として知られていた光依存型

プロトクロロフィリド還元酵素 (LPOR, light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase) が進化的にはシアノバクテリアに由来することが示唆された。その後、*fixC*は機能に基づきバクテリオクロロフィル生合成系でのオルソログ遺伝子の名称 (*bchL*) に合わせて*chlL*と改名された (Suzuki and Bauer 1992)。また、*L. boryana*は、DPORの他の2つのサブユニットをコードする遺伝子 (*chlN*, *chlB*) の同定においても活用された (Fujita et al. 1993; Fujita et al. 1996)。

7-2 シアノバクテリアを使った黄化・緑化過程の解析

*L. boryana*のDPORのサブユニット遺伝子の欠損株 ($\Delta chlL$) では、明条件であればLPORの活性でプロトクロロフィリド還元が進行し、クロロフィル*a*は正常に生合成される。ところが、暗所で従属栄養的に生育させると、クロロフィルの生合成が停止した状態で細胞増殖が進行する。すなわち、クロロフィル含量の低下は、対数的な細胞増殖と鏡像的な関係を示した。このことは、クロロフィルは積極的に分解されず、細胞分裂による希釈によってクロロフィル濃度が低下することを示している。プロトクロロフィリド還元酵素としてLPORのみを利用する被子植物では、種子を暗所で芽生えさせると、クロロフィルが含まれない黄化状態 (いわゆる「もやし」) となる。すなわち、*L. boryana*のDPOR欠損株の暗所培養により、被子植物の黄化芽生えと類似した状況をシアノバクテリア細胞で現出させることができる。さらに、被子植物の芽生えと同様に、光を照射することで緑化 (クロロフィル生合成) を開始させることもできる (Kada et al. 2003)。また、黄化の初期過程で、光化学系Iの方が光化学系IIよりも先に分解されていくことが示された。この過程で光化学系Iサブユニットの遺伝子 (*psaA*, *psaC*) の転写物のレベルは暗所でもほとんど変化しなかったことから、翻訳後あるいは翻訳過程で、クロロフィル供給不足によりタンパク質が不安定化して分解されると推察される。

7-3 細胞外小胞の解析

*L. boryana*の $\Delta chlL$ を暗所で培養すると、DPORの基質プロトクロロフィリドが細胞内に大量に蓄積し、さらに一部は細胞外に漏出し、培地が黄色く変色する。このプロトクロロフィリドの培地への輸送は、細胞外小胞 (EV) を介していることが明らかとなった (Usui et al. 2022)。EVとは、細胞外膜が出芽することで生じる脂質二重膜に囲まれたナノサイズの構造体である。これまでに多様な生物でEVが調べられ、細胞間コミュニケーション、バイオフィーム形成、栄養物排出/吸収、解毒、遺伝子水平移動、代

謝物排出、環境ストレス応答などさまざまな機能を担うことが報告されてきた (Schwechheimer and Kuehn, 2015). *ΔchlL*の解析を通して、シアノバクテリアのEVが光合成色素の分泌という新しい機能を有することが見出された。さらに、最近、*L. boryana*の野生型が光合成もしくは暗所従属栄養で生育する際にも、EVが形成されることが明らかとなった。野生型のEVはカロテノイド(ケトミクソール配糖体とゼアキサンチン)を主要な色素として含むが、加えて、クロロフィル生合成中間体(プロトポルフィリンIX, プロトポルフィリンIXモノメチルエステル, プロトクロロフィリド, クロロフィリドなど)が含まれることが明らかになった (Usui et al. 2024)。EVにはこれらのクロロフィル生合成中間体の40%程度(培養液全体を100%として)が局在していると見積もられ、シアノバクテリアがクロロフィル生合成中間体をEVを介して分泌する能力を有することが強く示唆された。シアノバクテリアのEVは、細胞内(チラコイド膜)にわずかに蓄積する生合成中間体による酸化障害を回避するための安全弁としての機能を果たしているのかもしれない。

7-4 長期にわたる暗所従属栄養生育による微小進化研究

高い暗所従属栄養能を利用して、*L. boryana*を長期にわたって暗所で培養を継続することが可能である。この性質を利用して、長期間の暗所従属栄養による形質変化と変異蓄積を検討した (Hida et al. 2024)。dg5を親株とした6系統(49ヶ月暗所培養)、野生型を親株とした16系統(15ヶ月暗所培養)と6系統(7ヶ月暗所培養)について、生育特性を親株と比較したところ、全ての暗所適応株(28株)が親株よりも暗所従属栄養条件での生育が向上していた。また、光合成条件では、多くの適応株が生育低下を示し、15株は光合成生育能を失っていた。暗所適応株全28株のゲノムリシーケンシングを実施し変異の蓄積を解析した。全株で合計90ヶ所の変異が特定され、うち19ヶ所の変異が一つの遺伝子LBDG_21500に集中して生じていた。すなわち、28株中19株でこの遺伝子への変異が生じていた。LBDG_21500のアノテーションは“serine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit”とされており、原核生物に広く分布する情報伝達システムの一つパートナースイッチングシステム(PSS, partner switching system)で作動するホスファターゼをコードすると思われる。PSSは、3つのコンポーネント; キナーゼ(アンチシグマ因子)、アンタゴニストおよびホスファターゼで構成されており、その多くはシグマ因子依存的な転写を介して多様な細胞過程; ストレス応答, 胞子形成, バイオフィーム形成, 病原性

等を制御している。改めてLBDG_21500の単独欠損株を単離し、形質を調べたところ、光合成条件で生育が低下し、暗所での従属栄養条件で生育が促進された。このことは、*L. boryana*においてこのホスファターゼを含むPSSが、光合成生育と従属栄養生育に関わる遺伝子発現を制御していることを示している。この結果を受け、LBDG_21500を *phsP* (phototroph and heterotroph switching phosphatase) と命名することを提案した。暗所適応株でPSSのホスファターゼ遺伝子に多くの変異が高い頻度で生じたことは、光合成喪失に向かう進化の初期過程で、光合成独立栄養と従属栄養に関わる遺伝子発現制御システムに変異が生じることを示しており、非常に興味深い。

7-5 ヘテロシストによらない窒素固定の解析

窒素固定とは、化学的に不活性な窒素分子を、多くの生物が利用できるアンモニアに変換するプロセスであり、地球の窒素循環において極めて重要な役割を担う。窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼは、酸素によって速やかに分解される金属クラスターを活性中心とする酵素であるため、酸素に触れると秒から分の単位で不活性化されてしまう。このため窒素固定は嫌気的環境を必要とする。シアノバクテリアの約半数種は窒素固定の能力をもつとされているが、光合成で酸素を発生することから、窒素固定をどのように光合成と両立させているのかについての視点は、窒素固定研究でも独特の位置づけとなる。

*L. boryana*を用いた窒素固定研究が開始される以前は、シアノバクテリアの窒素固定に関する分子生物学的知見は主に2種のヘテロシスト形成種 *Anabaena* sp. PCC 7120 および *Trichormus variabilis* ATCC 29413 (旧名 *Anabaena variabilis* ATCC 29413) での実験結果に基づくものであった。*Anabaena* sp. PCC 7120では、栄養細胞からヘテロシストへの分化は、グローバルな窒素制御タンパク質NtcAによる窒素欠乏シグナル感知、ヘテロシスト分化特異的な制御タンパク質HetRとの共同的な制御により初期および中期応答性遺伝子群が活性化され、その中に *nif* 遺伝子の転写を活性化する転写制御タンパク質が誘導されて、ヘテロシスト分化と窒素固定生育が可能となると想定されていた。このため、*nif* 遺伝子の転写活性化には、NtcA、その活性化因子PipX、シグマ因子SigEが関わりと考えられていた (Flores et al. 2015)。*L. boryana*はヘテロシストを形成しないことから、よりシンプルに *nif* 遺伝子の転写制御に焦点を当てた研究が可能である。*L. boryana*を使った研究の初期に、葉緑体ゲノムの *fixC* のオルソログ遺伝子のクローニングと合わせて *nifH* を含む3.4 kb HindIII断片の

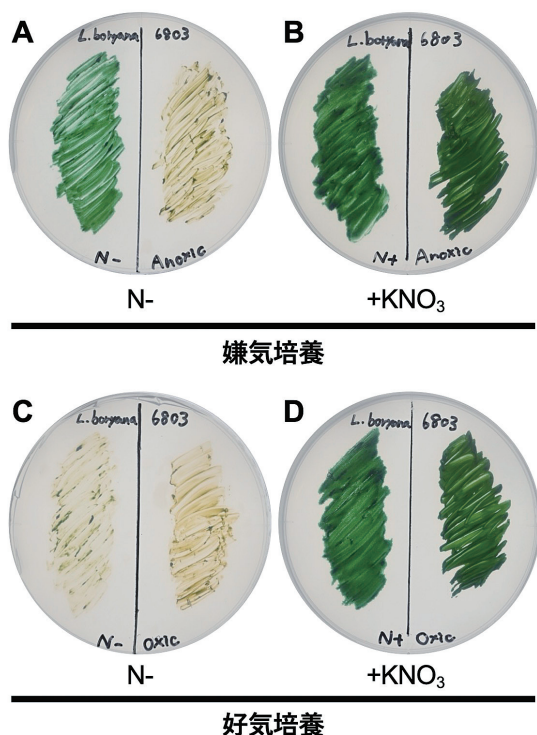


図3 : *L. boryana*の窒素固定生育
窒素欠乏培地と硝酸栄養培地プレートの上側に *L. boryana* dg5, 右側に非窒素固定種 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を接種し、嫌気および好気条件、連続光、30°Cで1週間培養した。窒素欠乏培地において好気条件下では両種が窒素欠乏による生育不良を示すのに対し (C), 嫌気条件下では *L. boryana* は窒素固定により良好に生育する (A)。硝酸栄養培地では嫌気/好気条件の違いで大きな差は見られない (B, D)。

クローニングも行っていた (Fujita et al. 1991)。この断片には、*nifH*のすぐ下流に*nifD*が見つかっており、この断片の前後には他の*nif*遺伝子群が存在すると期待された。*L. boryana*を使った窒素固定研究を開始するに当たって、まず*nifH*周辺の遺伝子解析を実施した。*nifH*の上流と*nifD*の下流に向けた遺伝子ウォーキングの結果、*nifHD*を含む約50 kbにわたって多数の*nif*および*nif*関連遺伝子が集中的にコードされていることが判明し、これを*nif*遺伝子クラスターと名付けた (Tsujiimoto et al. 2014)。この50-kb *nif*遺伝子クラスターには、ニトロゲナーゼの構造遺伝子*nifHDK*とニトロゲナーゼの金属クラスター合成に関わる遺伝子群を始め、フェレドキシン遺伝子、シトクロムc酸化酵素遺伝子、モリブデン輸送体遺伝子、嫌気代謝に関わる遺伝子など50個の遺伝子が含まれていた。その中に、転写制御タンパク質をコードする遺伝子*patB*が見つかった。*patB*は、*Anabaena* sp. PCC 7120で変異が生じるとヘテロシストの形成パターンが異常になる遺伝子として報告され

ていた (Jones et al. 2003) が、ヘテロシストを形成しない *L. boryana*での機能には興味もたれた。*patB*欠損株 ($\Delta patB$) を単離したところ窒素固定生育能が失われ、ニトロゲナーゼ活性は全く検出されず、すべての*nif*遺伝子群の転写物が検出できなかった。*patB*をシャトルベクター pPBH202 を使って $\Delta patB$ で大量発現させると、硝酸イオン存在下でも*nif*遺伝子群が発現しニトロゲナーゼ活性が検出された。これらの結果から、PatBタンパク質が*nif*遺伝子群の転写を活性化するマスターレギュレーターであることが判明した。*patB*は窒素固定シアノバクテリアに普遍的に保存されていることから、この機能に基づき、*patB*という名称を *cnfR* (cyanobacterial nitrogen fixation regulator) とすることを提案した (Tsujiimoto et al. 2014)。

8. 窒素固定生育・ニトロゲナーゼ活性測定法

*L. boryana*の窒素固定は、嫌気条件に限定されており、窒素固定で生育させるためにも、窒素固定を評価するニトロゲナーゼ活性にも嫌気的条件を必要とする。最後に、*L. boryana*を使った窒素固定生育とニトロゲナーゼ活性の測定法を紹介する (Tsujiimoto et al. 2014; Nonaka et al. 2019)。

8-1 窒素固定生育

BG-11寒天培地にて好気条件で光合成的に生育させた *L. boryana* IAM M-101およびdg5を、硝酸イオン・アンモニウムイオンを含まないBG-11寒天培地 (BG-11₀) に接種する。この寒天培地を透明なプラスチックボックス (アネロパック角型ジャー, 三菱ガス化学) に入れ、酸素を除去するためのパウチ (アネロパック・ケンキ10%, 三菱ガス化学) を開封してボックスに入れ、直ちに密閉する。約30分でボックス内の酸素レベルはほぼ0に達する。ボックス内の酸素レベルが十分低下したかどうかは、メチルビオローゲンが塗布された短冊片 (GasPak™ Anaerobic Indicator Strips, BD) が青から白色に変化したことで確認する。ボックスを照射下でインキュベートすると5~7日程度で明瞭な窒素固定生育が認められる (図3)。

8-2 ニトロゲナーゼ活性測定

窒素固定により生成されるアンモニアは細胞内で速やかに同化されるため、アンモニア生成量の測定による窒素固定活性の評価は容易ではない。分子状窒素のニトロゲナーゼによる固定量を直接測定したい場合には安定同位体 $^{15}\text{N}_2$ の取り込み実験を行う必要があるが、取り込みに時間がかかることや感度の低さ、安定同位体ガスが高額

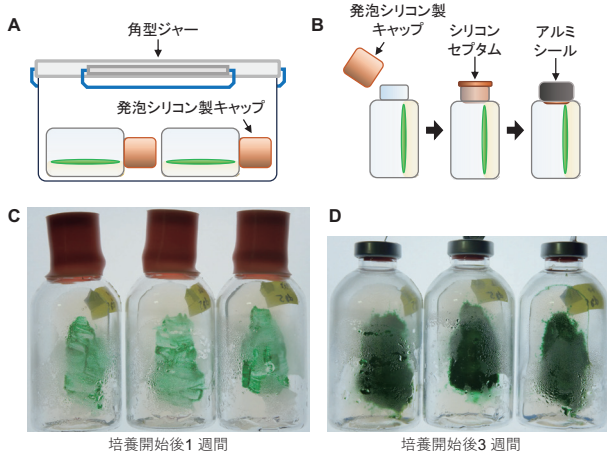


図4：スラント培地を用いたアセチレン還元活性の経時的測定
バイアル内で固化させた窒素欠乏培地 (BG-11₀) に *L. boryana* を接種し、通気可能な発泡シリコン製キャップで蓋をする。バイアルを嫌気処理用の角型ジャー入れ、嫌気・30°C・連続光条件下で培養する (A, C)。アセチレン還元活性を測定する際には嫌気チャンパー内で発泡シリコン製キャップをシリコンセプタムに付け替え、アルミシールで固定する (B, D)。培養開始1週間後 (C, 培養用に発泡シリコン製キャップを装着) と3週間後 (D, 活性測定用にシリコン製セプタムを装着) を比較すると、窒素欠乏培地上でも窒素固定により旺盛に生育していることがわかる。

であるといった要因がネックとなる。そこで、ニトロゲナーゼがアセチレンを基質としてエチレン生成する性質を利用し、アセチレン還元活性を測定することでニトロゲナーゼの活性を見積もる手法が適用されている。ここでは本研究室で使っている3つの方法を紹介する。

8-2-1 窒素固定能誘導直後の高いニトロゲナーゼ活性の検出

BG-11寒天培地にて好気条件下で光合成的に生育させた *L. boryana* の細胞を滅菌水に懸濁し、一定量 (OD₇₃₀ 5.0 の懸濁液 1 ml) を BG-11₀ 寒天培地の中央部に滴下する。寒天培地に液体を完全に染み込ませたのち、上述のように嫌気条件に移し (アネロパック・ケンキ10%を入れた専用角型ジャー)、照射下で16～20 h インキュベートすることで、*nif* 遺伝子群の発現を誘導する。嫌気チャンパーにシャーレを持ち込み、*L. boryana* の細胞を少量 (1 ml) の BG-11₀ 液体培地で懸濁し、ガラスバイアル (30 ml) に回収する。バイアルをブチルゴム製セプタムで密閉してアルミシールで固定し、嫌気チャンパーから持ち出す。ニトロゲナーゼ活性を高めて安定化させるために要時調製した 0.5 M ジチオナイト 10 μl を添加する。アセチレン混合ガス (10% アセチレン-90% アルゴン) をシリンジで10秒間パージすることでバイアル内の気相を完全にアセチレン混合ガスに

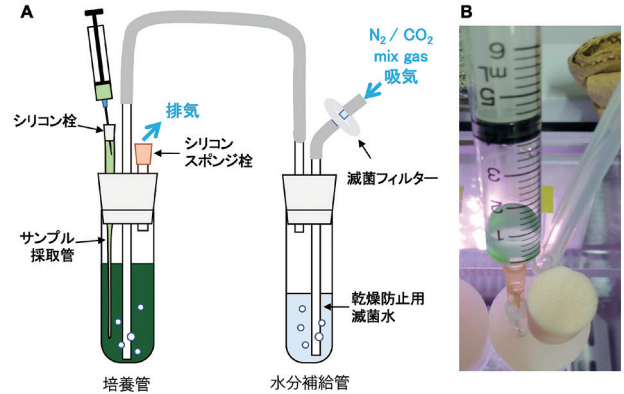


図5：液体通気培養における経時的なニトロゲナーゼ活性測定
液体培養で生育中の *L. boryana* のアセチレン還元活性を測定するためには、空気(酸素)を混入させることなく培養液を採取する必要がある。液体培養管に挿入したバスターピペットの上部を小さなシリコン栓で密閉しサンプリング管とした (A)。このシリコン栓に針を刺しシリンジで培養液を採取する (B)。なお、採取に用いるシリンジはあらかじめ窒素ガスなどで内部の空気を置換しておく。

置換し、30分間、照射下でインキュベートする。バイアルを氷上にて遮光することで活性を停止させ、一定量の気相をガスクロマトグラフにロードし、エチレン生成量を分析する。嫌気チャンパーの使用法は文献 (野亦・藤田 2009)、ガスクロマトグラフの条件は Tsujimoto et al. (2014) を参照してほしい。

8-2-2 窒素固定生育時の経時的なニトロゲナーゼ活性測定方法

横向きに寝かせた 50 ml ガラスバイアル内に BG-11₀ 寒天培地 13 ml を流し入れて固めたスラント培地を作成し、滅菌可能なシリコンセプタムで封じておく。このスラント培地に *L. boryana* を接種し、蓋を通気可能な発泡シリコン製キャップに交換してバイアルごと上述の角型ジャーに入れ、嫌気光合成条件下で窒素固定的に生育させる (図 4A, C)。活性測定時には嫌気チャンパー内で発泡シリコン製キャップをシリコンセプタムに交換しアルミシールで固定した後 (図 4B, D)、上述の方法 9-2-1 でアセチレン還元活性を測定する。この方法では、活性測定後も再度嫌気チャンパー内でセプタムを滅菌済み発泡シリコン製キャップに交換し、アネロパックと共に角型ジャーに密閉して生育を継続させることができる。この方法により、ジチオナイトを添加しないより自然に近い状態でのニトロゲナーゼ活性を、生育期間を通じて経時的に測定することができる。活性はバイアル単位での評価となる。詳

細は他菌種の事例ではあるが Uesaka et al. (2024) を参照されたい。液体に容易に懸濁できない窒素固定種のニトロゲナーゼ活性測定にも有用な方法である。

8-2-3 液体通気培養における経時的なニトロゲナーゼ活性測定方法

上述の方法8-2-1は寒天培地での培養による経時的な測定法だったが、液体通気培養においても経時的な活性測定が可能である。この方法では、通気液体培養サンプルから測定用の菌体を採取する際、空気（酸素）の混入を避けるための工夫がなされている。液体培地での窒素固定生育のためには、綿濾管や滅菌フィルターを介して窒素と二酸化炭素の混合ガス（2% CO₂, 98% N₂）を通気して培養する（図5A）。この培養管にサンプリング用のガラス管（管内の容積が小さくシリンジによる吸出しが容易なパストールピペットを使用）を増設し、小型のシリコン栓で開口部を塞いでおく。このシリコン栓にシリンジの針を刺し、嫌氣的に培養液を吸い出して予め嫌氣的に密閉しておいたガラスバイアルに注入する。こうして培養液を直ちにアセチレン還元活性測定に供することが可能となる（図5B）。サンプリング管の内部に培養液が残った場合はシリンジで窒素ガスを注入して追い出しておく。野生型の *L. boryana* であればジチオナイト添加なしでアセチレン還元活性が確認できるが、ジチオナイトを加えればより高感度な活性の検出が可能となる。活性測定後に濁度や細胞スペクトル、光合成／呼吸活性の測定や、mRNA や SDS-PAGE のためのタンパク質抽出に菌体を供することが可能なので、窒素固定的に生育している細胞の経時的かつ多面的な評価が可能となる。

なお、培養時の光強度には注意を要する。*L. boryana* では、光強度が高い条件では光合成による酸素発生が高まり窒素固定が抑制される傾向がある。液体培養で窒素固定生育させる場合は光合成と窒素固定が両立する光強度をあらかじめ検討しておく必要がある。

9. 今後の展望

以上のように、*L. boryana* は、クロロフィル合成やヘテロシストによらない窒素固定といった、固有の特徴を活用した研究材料とされてきたが、それほど広く活用されてはいない。ある意味、モデルと非モデルの中間的な位置づけのシアノバクテリアと捉えられるかもしれない。長期にわたる暗所従属栄養生育は、他のシアノバクテリアでは容易には実現がむずかしいユニークな実験系であ

り、光合成が喪失していく進化過程を実際に追跡していくことが可能である。暗所従属栄養条件で長期にわたり植え継ぎを継続している系統も維持している（最長1993年から）。また、この能力をDPOR欠損株に応用することで、クロロフィル含量が極めて減少した黄化状態の細胞を作り出すことができ、クロロフィル欠乏状態の細胞の生理学・生化学、光照射により開始される緑化過程の詳細な追跡、といった方向の研究展開が可能である。

L. boryana を寒天培地で培養していると、時折、寒天培地全体に広がっていく運動性を獲得した変異株が自発的に出現することがある。このような運動性を獲得した変異株の原因変異（ジグアニル酸シクラーゼをコードする *dgc2* 遺伝子 (LBDG_02920) への変異）や運動性の詳細な解析も報告されており (Toida et al. 2023)、糸状性シアノバクテリアの運動性に関する研究も本株の特徴を活かした研究方向の一つである。

概日時計に関する研究において、最近、*L. boryana* の KaiC1 とそのパラログ KaiC2 の生化学的解析が報告された (Matsukami et al. 2024)。

窒素固定の研究では、最近、単細胞性の窒素固定シアノバクテリア *Cyanothece* sp. ATCC 51142 でターゲット遺伝子欠損株の単離の報告がある (Min and Sherman 2010; Liberton et al. 2019) が、今後も *L. boryana* はヘテロシストを作らないシアノバクテリアの実験系というユニークな位置付けのモデルとしての活用が期待される。

謝辞

L. boryana の従属栄養能に着目し、モデルシアノバクテリアとして利用できるという慧眼をもたれていた高橋康弘先生・松原史先生、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が広く活用されている中であって主宰研究室で *L. boryana* をモデルシアノバクテリアとして活用していただいた長谷俊治先生、*L. boryana* を用いた研究の初期の頃から応援していただいた小俣達男先生、概日リズム研究等に *L. boryana* を活用されている寺内一姫先生、窒素固定研究で貢献していただいた辻本良真博士、黄化緑化研究で貢献していただいた加田茂樹博士、ゲノム解析で貢献していただいた平出優人博士・井原邦夫先生・上坂一馬博士、そして、卒研究生、大学院生として *L. boryana* 研究に関わってきた多くの学生さんに感謝いたします。

本稿で紹介した研究の一部は、科研費24H02075, 22H19146, 18K19173及びCOI-NEXT (JPMJPF2102) の助成を受けて実施されたものです。

参考文献

- Anderson, S.L. and McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173: 2761-2767.
- Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N. and Stal, L.J. (1997) N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 19: 139-185.
- Flores, E., López-Lozano, A. and Herrero, A. (2015) Nitrogen fixation in the oxygenic phototrophic prokaryotes (Cyanobacteria): The fight against oxygen. In *Biological Nitrogen Fixation*. Edited by de Bruijn, F.J. pp. 879-889. John Wiley & Sons.
- Fujita, Y., Matsumoto, H., Takahashi, Y. and Matsubara, H. (1993) Identification of a *nifDK*-like gene (ORF467) involved in the biosynthesis of chlorophyll in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 34: 305-314.
- Fujita, Y., Takagi, H. and Hase, T. (1996) Identification of the *chlB* gene and the gene product essential for the light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 37: 313-323.
- Fujita, Y., Takagi, H. and Hase, T. (1998) Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 39: 177-185
- Fujita, Y., Takahashi, Y., Chuganji, M. and Matsubara, H. (1992) The *nifH*-like (*frxC*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 81: 81-92.
- Fujita, Y., Takahashi, Y., Shonai, F., Ogura, Y. and Matsubara, H. (1991) Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the filamentous nitrogen-fixating cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol* 32: 1093-1106.
- Grobbelaar, N., Huang, T.C., Lin, H.Y. and Chow, T.J. (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol Lett* 37: 173-177.
- Hida, S., Nishio, M., Uesaka, K., Banba, M., Takatani, N., Takaichi, S., et al. (2024) Microevolution toward loss of photosynthesis: Mutations promoting dark-heterotrophic growth and suppressing photosynthetic growth in cyanobacteria. *BioRxiv*: doi.org/10.1101/2024.1104.1108.588626.
- Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., et al. (2015) Loss of cytochrome *c_M* stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol* 56: 334-345.
- Hirose, Y., Ohtsubo, Y., Misawa, N., Yonekawa, C., Nagao, N., Shimura, Y., et al. (2021) Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade. *DNA Res* 28: 1-11.
- Jones, K.M., Buikema, W.J. and Haselkorn, R. (2003) Heterocyst-specific expression of *patB*, a gene required for nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 185: 2306-2314.
- Kada, S., Koike, H., Satoh, K., Hase, T. and Fujita, Y. (2003) Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of Photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Mol Biol* 51: 225-235.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., et al. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* 8: 205-213.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3: 109-136.
- Kimata-Arigo, Y., Matsumura, T., Kada, S., Fujimoto, H., Fujita, Y., Endo, T., et al. (2000) Differential electron flow around photosystem I by two C4-photosynthetic-cell-specific ferredoxins. *EMBO J* 19: 5041-5050.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J. and Johansen, J.R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335.
- Liberton, M., Bandyopadhyay, A. and Pakrasi, H.B. (2019) Enhanced nitrogen fixation in a *glgX*-deficient strain of *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142, a unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium. *Appl Environ Microbiol* 85: e02887-18.
- Masuda, S. and Bauer, C.E. (2004) Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in

- Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 186: 235-239.
- Matsukami, Y., Oyama, K., Azai, C., Onoue, Y., Fujita, Y. and Terauchi, K. (2024) KaiC family ATPases in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Sci Rep* 14: 30949.
- Min, H. and Sherman, L.A. (2010) Genetic transformation and mutagenesis via single-stranded DNA in the unicellular, diazotrophic cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Appl Environ Microbiol* 76: 7641-7645.
- Misra, H.S. and Tuli, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol* 122: 731-736.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. and Arai, T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photosynthetically. *Nature* 323: 720-722.
- Nagatani, H.H. and Haselkorn, R. (1978) Molybdenum independence of nitrogenase component synthesis in the non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema*. *J Bacteriol* 134: 597-605.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., et al. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res* 10: 137-145.
- Nonaka, A., Yamamoto, H., Kamiya, N., Kotani, H., Yamakawa, H., Tsujimoto, R., et al. (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.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., et al. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- Schrautemeier, B., Cassing, A. and Böhme, H. (1994) Characterization of the genome region encoding an *fdxH*-type ferredoxin and a new 2[4Fe-4S] ferredoxin from the nonheterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* PCC 73110. *J Bacteriol* 176: 1037-1046.
- Schwechheimer, C. and Kuehn, M.J. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13: 605-619.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., et al. (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1053-1058.
- Solymosi, D., Nikkanen, L., Muth-Pawlak, D., Fitzpatrick, D., Vasudevan, R., Howe, C.J., et al. (2020) Cytochrome *c_M* decreases photosynthesis under photomixotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 183: 700-716.
- Stal, L.J. and Zehr, J.P. (2008) Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean: Diversity, regulation, and ecology. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Edited by Herrero, A. and Flores, E. pp. 423-446. Caister Academic Press.
- Stewart, W.D. and Lex, M. (1970) Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum* strain 594. *Arch Mikrobiol* 73: 250-260.
- Suzuki, J. and Bauer, C. (1992) Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene *chlL* (*frxC*). *Plant Cell* 4: 929-940.
- Terauchi, K., Katayama, M., Fujita, Y. and Kondo, T. (2005) Circadian rhythm of the facultative cyanobacterium *Plectonema boryanum*. In *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives*. Edited by van der Est, A. and Diner, B. pp. 729-730. Allen Press.
- Toida, K., Kushida, W., Yamamoto, H., Yamamoto, K., Ishii, K., Uesaka, K., et al. (2023) The GGDEF protein Dgc2 suppresses both motility and biofilm formation in the filamentous cyanobacterium. *Microbiol Spectr* 11: e0483722.
- 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.
- Tsujimoto, R., Kamiya, N. and Fujita, Y. (2014) Transcriptional regulators ChIR and CnFR are essential for diazotrophic growth in nonheterocystous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6762-6767.
- 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: e1690.
- Uesaka, K., Banba, M., Chiba, S. and Fujita, Y. (2024)

- Restoration of the functional *nif* gene cluster by complex recombination events during heterocyst development in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Calothrix* sp. NIES-4104. *Plant Cell Physiol.* 65: 1050-1064.
- Usui, K., Yamamoto, H., Mori, H. and Fujita, Y. (2025) Extracellular vesicle-mediated secretion of chlorophyll biosynthetic intermediates in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Cell Physiol.* 66: 214-228.
- Usui, K., Yamamoto, H., Oi, T., Taniguchi, M., Mori, H. and Fujita, Y. (2022) Extracellular vesicle-mediated secretion of protochlorophyllide in the cyanobacterium. *Plants (Basel)* 11: 910.
- Walton, D., Gendel, S. and Atherly, A. (1993) DNA sequence and shuttle vector construction of plasmid pGL3 from *Plectonema boryanum* PCC 6306. *Nucleic Acids Res* 21: 746.
- Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2014) Development of a highly-frequent *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 55: 2017-2026.
- White, A.W. and Shilo, M. (1975) Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga *Plectonema boryanum*. *Arch. Microbiol.* 102: 123-127.
- Yamamoto, H., Kojima-Ando, H., Ohki, K. and Fujita, Y. (2020) Formation of prolamellar-body-like ultrastructures in etiolated cyanobacterial cells overexpressing light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Leptolyngbya boryana*. *J Gen Appl Microbiol* 66: 129-139.
- Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. (2009) Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Cell Physiol* 50: 1663-1673.
- Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. (2011) Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Cell Physiol* 52: 1983-1993.
- 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.
- Yamazaki, S., Nomata, J. and Fujita, Y. (2006) Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Physiol* 142: 911-922.
- Zeng, X. and Zhang, C.C. (2022) The Making of a Heterocyst in Cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 76: 597-618.
- 藤田 (2013) 「私の論文」 No. 11. pp. https://photosyn.jp/column-mypub_11.php.
- 藤田, 野亦 (2009) 嫌気条件下でのタンパク質精製. In 低温科学 67巻「光合成研究法」pp. 423-427.
- 須田, Hutabarat, Handung, 上原 (2022) シアノバクテリア／ラン藻の分類の現状と今後 藻類 70: 13-23.