

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7618570号
(P7618570)

(45)発行日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(24)登録日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10 Z N A
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00 A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
A 2 3 L	7/10 (2016.01)	A 2 3 L	7/10 Z
		請求項の数 18 (全234頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-553130(P2021-553130)	(73)特許権者	317002869
(86)(22)出願日	令和2年3月6日(2020.3.6)		コモンウェルス サイエнтиフィック
(65)公表番号	特表2022-523586(P2022-523586 A)		アンド インダストリアル リサーチ オ
(43)公表日	令和4年4月25日(2022.4.25)		ーガナイゼーション
(86)国際出願番号	PCT/AU2020/050216		オーストラリア国オーストラリアン・キ
(87)国際公開番号	WO2020/181324		ャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アク
(87)国際公開日	令和2年9月17日(2020.9.17)	(74)代理人	100099759
審査請求日	令和5年3月6日(2023.3.6)		弁理士 青木 篤
(31)優先権主張番号	2019900780	(74)代理人	100123582
(32)優先日	平成31年3月8日(2019.3.8)		弁理士 三橋 真二
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)	(74)代理人	100117019
(31)優先権主張番号	2019903818		弁理士 渡辺 陽一
(32)優先日	令和1年10月10日(2019.10.10)	(74)代理人	100141977
最終頁に続く			弁理士 中島 勝
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 植物細胞におけるニトロゲナーゼポリペプチドの発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）に翻訳融合するNifDポリペプチドを含むNifD融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、前記NifDポリペプチドが、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（配列番号101）以外のアミノ酸配列を含み、前記外来ポリヌクレオチドが、前記NifDポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されており、かつ、前記ヌクレオチド配列を前記植物細胞の中で発現させるプロモータを含む、植物細胞。

【請求項2】

前記MTPが前記NifDポリペプチドのN末端に翻訳融合されている、請求項1の植物細胞。

【請求項3】

前記NifD融合ポリペプチドが、ミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ（MPP）によって前記MTP内で切断されてMPP切断産物を生成し、前記MPP切断産物は、（i）そのN末端に、前記MTPからのC末端ペプチド（瘢痕ペプチド）を含むか、または（ii）前記MTPからのC末端ペプチドを含まないかのいずれかである、請求項1または2の植物細胞。

【請求項4】

（i）NifKポリペプチド（NK）をコードする外来ポリヌクレオチド、ここで、前記NKをコードする前記外来ポリヌクレオチドが、前記NKをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて植物細胞の中で前記ヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、前記NifDポリペプチド（ND）がC末端を持ち、前記NKがN末端を持ち、（i）前記NKが

、MTPを含むNifK融合ポリペプチドであるか、または(ii)前記NDと前記NKが、オリゴペプチドリンカーを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドとして翻訳融合され、前記オリゴペプチドリンカーが前記NDのC末端と前記NKのN末端に翻訳融合されているかのいずれかである；

(ii) NifH融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチド、ここで、前記NifH融合ポリペプチドをコードする前記外来ポリヌクレオチドが、前記NifH融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて前記ヌクレオチド配列を前記植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、前記NifH融合ポリペプチドがMTPを含む；

(iii) NifVポリペプチド(NV)をコードする外来ポリヌクレオチド、ここで、前記外来ポリヌクレオチドは、前記NVをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて前記植物細胞の中で前記ヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、前記NVが前記植物細胞の中でホモクエン酸を産生する；

(iv) NifMポリペプチド(NM)をコードする外来ポリヌクレオチド、ここで、前記NMをコードする前記外来ポリヌクレオチドは、前記NMをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて前記植物細胞の中で前記ヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含む；および

(v) NifS融合ポリペプチド(NS)とNifU融合ポリペプチド(NU)をコードする外来ポリヌクレオチド、ここで、これら外来ポリヌクレオチドは、それぞれ、前記Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて前記植物細胞の中で前記ヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、前記NVと前記NUは、それぞれ、MTPを含む、

の1つ以上、またはすべてを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の植物細胞。

【請求項5】

少なくとも8つまたは少なくとも9つのNif融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、これら外来ポリヌクレオチドが、それぞれ、Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて前記植物細胞の中で前記ヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、それぞれのNif融合ポリペプチドは独立にMTPを含み、前記Nif融合ポリペプチドは、(i) NifH、NifB、NifF、NifJ、NifS、NifU、およびNifV融合ポリペプチドを含むとともに、(ii) NifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチド、または(iii) C末端を持つNifD配列と、オリゴペプチドリンカーと、N末端を持つNifK配列とを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド(ただしその中のオリゴペプチドリンカーは、前記NifD配列のC末端と前記NifK配列のN末端に翻訳融合されている)のいずれかを含み、少なくとも前記NifH、NifF、NifS、およびNifU融合ポリペプチドのMPP切断産物は、それぞれ、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(ii)のNifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、前記植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるか、または(iii)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、前記植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるかのいずれかであり、前記NifV融合ポリペプチドおよび／またはそのMPP切断産物は、前記植物細胞の中でホモクエン酸を産生し、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、請求項1～4のいずれか1項に記載の植物細胞。

【請求項6】

前記植物細胞においてそれぞれのNif融合ポリペプチドがそのMTP配列内で少なくとも部分的に切断されて独立にMPP切断産物を生成させ、それぞれのMPP切断産物が、長さ1～45個のアミノ酸のアミノ酸からなるペプチド(瘢痕ペプチド)を含み、前記瘢痕ペプチドが前記MPP切断産物のN末端に翻訳融合されている、請求項2～5のいずれか1項に記載の植物細胞。

【請求項7】

請求項4～6のいずれか1項に記載の植物細胞において、前記外来ポリヌクレオチドが、

(i) AnfH融合ポリペプチドであるNifH融合ポリペプチドをコードするとともに、(ii) AnfD融合ポリペプチドであるNifD融合ポリペプチドと、AnfK融合ポリペプチドであるNifK融合ポリペプチド、または(iii) AnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドであるNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドをコードし、前記植物細胞が、(iv) MTPを含むAnfG融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドをさらに含み、前記AnfG融合ポリペプチドをコードする前記外来ポリヌクレオチドが、前記AnfG融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されており、前記ヌクレオチド配列を前記植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、前記AnfG融合ポリペプチドのMPP切断産物が植物細胞のミトコンドリアの中で少なくとも部分的に可溶性である、植物細胞。

【請求項 8】

前記外来ポリヌクレオチドの1つ以上またはすべてが前記植物の核ゲノムに組み込まれる、および／または前記植物の核の中で発現する、請求項1～7のいずれか1項に記載の植物細胞。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の植物細胞を含むか、請求項1～8のいずれか1項に規定されている、Nif融合ポリペプチドをコードする前記外来ポリヌクレオチドにとってトランスジェニックである、植物またはその部分。

【請求項 10】

NifDポリペプチド(ND)に翻訳融合したミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)を含むNifD融合ポリペプチド、または前記NDを含むその切断産物であって、前記NifD融合ポリペプチドまたはその切断産物が、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY(配列番号101)以外のアミノ酸配列を含む、NifD融合ポリペプチドまたはその切断産物。

【請求項 11】

(i) 請求項10のNifD融合ポリペプチドまたはその切断産物と、(ii) NifKポリペプチド(NK)に翻訳融合したMTPを含むNifK融合ポリペプチド、またはそのMPP切断産物の組み合わせであって、前記NifK融合ポリペプチドまたはそのMPP切断産物が植物細胞の中で生成するとき、前記NifK融合ポリペプチドまたはそのMPP切断産物が前記植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である組み合わせ。

【請求項 12】

請求項10のポリペプチド、または請求項11の組み合わせをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項12のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 14】

トランスジェニック植物細胞を作製するための、請求項12に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13のベクターの使用。

【請求項 15】

種子から得られる穀物粉末、全粒粉、デンプン、油、種子ミール、または他の製品を製造する方法であって、請求項9の植物またはその部分の種子から、穀物粉末、全粒粉、デンプン、油、または他の製品を取り出すか、前記種子ミールを製造することを含む方法。

【請求項 16】

請求項9のトランスジェニック植物またはその部分、および／またはその種子から製造される製品であって、請求項10に記載のポリペプチドまたはMPP切断産物、および／または請求項12に記載のポリヌクレオチドを含む製品。

【請求項 17】

食料品を調製する方法であって、請求項9の植物またはその部分の種子、または前記種子からの穀物粉末、全粒粉、デンプン、油、種子ミール、または他の製品を、別の食品成分と混合することを含む方法。

【請求項 18】

動物に給餌する方法であって、請求項9の植物またはその部分またはその種子、または請求項16の製品を前記動物に提供することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物細胞のミトコンドリア内でニトロゲナーゼポリペプチドを産生させるための方法と手段に関する。

【背景技術】

【0002】

窒素固定菌は、酵素複合体であるニトロゲナーゼを触媒とした生物的窒素固定（BNF）を通じて N_2 ガスからアンモニアを生成させる。それでも近代農業yrでの需要は、固定される窒素のこの供給源を上回っており、その帰結として工業的に製造された窒素性肥料が農業で広く使用されている（Smil、2002年）。しかし肥料の製造と散布の両方が汚染の原因であるため（GoodとBeatty、2011年）、持続可能ではないと見なされている（Rockstrom他、2009年）。世界中で適用されている肥料の大半は作物によって取り込まれず（Cui他、2013年；de Bruijn、2015年）、肥料流出、雑草の促進のほか、河川の富栄養化につながっている（GoodとBeatty、2011年）。その結果として藻類ブルームが酸素レベルを低下させ、環境破壊を局所的に、そして沖合のサンゴ礁全体で引き起こしている（De'ath他、2012年；Glibert他、2014年；Sutton他、2008年）。さらに、過剰な施肥は多くの先進国における問題だが、いくつかの地域では、その利用可能性が作物の収量を制限している（Mueller他、2012年）。肥料の製造それ自体がかなりのエネルギー投入を必要とし、推定で年に1000億USドルのコストがかかる。

【0003】

明らかに、工業的に製造される窒素への依存を低下させる戦略が必要とされている。その目的で、生物的窒素固定が可能な植物を設計するという考え方が長期にわたってかなりの興味を引いてきており（MerrickとDixon、1984年）、最近の報告の焦点になっている（de Bruijn、2015年；OldroydとDixon、2014年）。可能性のあるアプローチに含まれるのは、i) 窒素固定菌の共生関係をマメ類から穀類に拡張すること（Santi他、2013年）、ii) 窒素固定ができるように内部共生微生物を改良すること（Geddes他、2015年）、およびiii) ニトロゲナーゼを遺伝子操作して植物細胞の中に入れること（CurattiとRubio、2014年）である。これらのアプローチのすべてが、技術的に困難であるため野心的かつ投機的である。

【0004】

窒素固定菌の中で生物的窒素固定を可能にする酵素複合体であるニトロゲナーゼは、その生合成と機能のために多遺伝子組み立て経路を必要とすることが、広く報告されている（HuとRibbe、2013年；RubioとLudden、2008年；Seefeldt他、2009年）。標準的な鉄-モリブデンニトロゲナーゼの構成要素には、NifDおよびNifKと名づけられた触媒タンパク質と、電子供与体NifHが含まれる。約12種類の他のタンパク質が窒素固定菌の中のニトロゲナーゼの組み立てに関与しており、その中には、複合体の成熟、足場作り、および補因子挿入における特にNifM、NifS、NifU、NifE、NifN、NifX、NifV、NifJ、NifY、NifF、NifZ、およびNifQが含まれる。遺伝子損傷、非窒素固定原核生物に対する窒素固定菌の間の補完アッセイ、および系統学的分析（Dos Santos他、2012年；Temme他、2012年；Wang他、2013年）から、中心的構成要素と見なされるNifタンパク質のサブセット（NifD、NifK、NifB、NifE、およびNifN）に到達したが、他のものは最適な活性に必要であると考えられるため、補助的であると見なされている。ニトロゲナーゼの組み立てと機能には特定の生化学的条件も必要とされる。その中の第1は、ニトロゲナーゼが極度に酸素感受性であることである（RobsonとPostgate、1980年）。さらに、大量のATP、還元剤、容易に利用できるFe、Mo、S-アデノシルメチオニン、およびホモクエン酸が、金属タンパク質触媒中心の生合成と機能に必要とされる（HuとRibbe、2013年；RubioとLudden、2008年）。これらの因子のすべてが、植物細胞の中で機能的ニト

ロゲナーゼ複合体を生成させるという技術的困難に寄与している。

【発明の概要】

【0005】

本発明の発明者らは、植物細胞の中で機能的NifDを産生させる際に観察された困難に鑑み、植物細胞の中で二次切断／分解に対して抵抗性であるNifDを発現させることが重要であると判断した。

【0006】

そこで1つの側面では、本発明により、配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性であるNifDポリペプチド（ND）をコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞が提供される。

10

【0007】

関連する1つの側面では、本発明により、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列101）以外のアミノ酸配列を含むNifDポリペプチド（ND）をコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞が提供される。

【0008】

好ましい一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対し、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列101）以外のアミノ酸配列を持つ対応するNDよりも抵抗性である。

【0009】

20

上記の側面の一実施態様では、NDはミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含み、好ましくはMTPはNDのN末端にある。

【0010】

さらなる一実施態様では、NDはMTPの中で、またはMTPの直後で切断することができ、外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現するとき、プロセッシングを受けたNifDポリペプチド（CND）が生成し、そのことによりCNDは、そのN末端に、MTPのC末端アミノ酸からのアミノ酸配列（瘢痕（scar）配列）を含む、または瘢痕配列を含まないのどちらかになる。

【0011】

好ましい一実施態様では、MTPは、植物細胞の中で少なくとも50%の効率で切断される、および／またはCNDが植物細胞の中に、NDよりも高いレベルで、好ましくは2：1よりも大きな比、より好ましくは3：1よりも大きな比、または4：1よりも大きな比で存在する。

30

【0012】

好ましい一実施態様では、CNDはNifD機能を持つ。

【0013】

上記の側面のさらなる一実施態様または別の一実施態様では、外来ポリヌクレオチドは、順番に、NifDアミノ酸配列、リンカーアミノ酸配列（リンカー）、およびNifKポリペプチド（NK）アミノ酸配列を含む融合ポリペプチド（NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド）であるNDをコードする。その中のリンカーアミノ酸配列は、長さが8～50残基、好ましくは約30残基であり、NDとNKに翻訳融合されている。好ましい一実施態様では、NDはミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）をさらに含み、このMTPはNifDアミノ酸配列のN末端に翻訳融合されている。非常に好ましい一実施態様では、NDはMTP内で、またはMTPの直後で切断することができ、外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現するとき、プロセッシングを受けたNifDポリペプチド（CND）が生成し、そのことによりCNDは、そのN末端に、瘢痕配列を含む、または瘢痕配列を含まないのどちらかになる。

40

【0014】

上記の側面の一実施態様では、NDまたはCNDがNifD機能を持つ、またはND（NifD-リンカー-NifKポリペプチド）がNifDとNifLの機能の両方を持つ。一実施態様では、NifDポリペプチドはAnfDポリペプチドであり、NifKポリペプチドはAnfKポリペプチドである。

50

【0015】

上記の側面の一実施態様では、MTPは、本明細書に開示されている任意のMTPを含み、例えばMTPは、F1-ATPアーゼ γ -サブユニットからの長さ約51個のアミノ酸を含む。

【0016】

一実施態様では、CNDは、NifDアミノ酸配列のN末端に翻訳融合された長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～10個または11～20個のアミノ酸からなる癒痕配列を含む。

【0017】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、NDとCNDの一方または両方、例えばNifD-リンカー-NifKポリペプチドが、植物細胞のミトコンドリア内、好ましくは植物細胞のミトコンドリアマトリックス（MM）内にある。

【0018】

さらなる一実施態様では、NDとCNDの一方または両方、例えばNifD-リンカー-NifKポリペプチドが、植物ミトコンドリア内で主に可溶性である。植物ミトコンドリア内のCNDの少なくとも60%または少なくとも75%が可溶性であることが好ましい。可溶性の程度は、実施例に記載されているようにして求めることが好ましい。

【0019】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、ND、例えばNifD-リンカー-NifKポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にチロシン（Y）以外のアミノ酸を含む。

【0020】

一実施態様では、ND、例えばNifD-リンカー-NifKポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にグルタミン（Q）またはリシン（K）を、または配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にロイシン（L）またはメチオニン（M）またはフェニルアラニン（F）を含む。

【0021】

別の一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にQ、K、L、またはMを含む。

【0022】

別の一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にLまたはMを含む。

【0023】

別の一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にQ、K、またはLを含む。

【0024】

別の一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にQ、K、またはMを含む。

【0025】

別の一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にQ、K、またはFを含む。

【0026】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、ND、例えばNifD-リンカー-NifKポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置に配列RRNX（配列番号154）を含む。ただしXは、Y以外の任意のアミノ酸である。

【0027】

一実施態様では、Xは、QまたはKであるか、L、M、またはFであるか、LまたはMであるか、Q、K、またはLであるか、Q、K、またはMであるか、Q、K、またはFである。

【0028】

さらなる一実施態様では、植物細胞は、1つ以上の外来ポリヌクレオチド、好ましくは2～8つの外来ポリヌクレオチドを含む。その外来ポリヌクレオチドは、ND以外の1つ以上

10

20

30

40

50

のNif融合ポリペプチド（NF）をコードしており、それぞれのNFは、NFのN末端のMTPと、（ii）Nifポリペプチド配列（NP）を含み、それぞれのMTPは、独立に、同じであるか異なっており、それぞれのNPは、独立に、同じであるか異なっている。

【0029】

一実施態様では、それぞれのNFは、MTPの中で、またはMTPの直後で切断することができ、1つ以上の外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現するとき、プロセッシングを受けたNifポリペプチド（CNF）が生成し、そのことによりそれぞれのCNFは、そのN末端に、癒痕配列を含む、または癒痕配列を含まないのどちらかになる。

【0030】

一実施態様では、NFポリペプチド配列の少なくとも1つがNifKポリペプチドまたはNifHポリペプチドであるか、NifKポリペプチドとNifHポリペプチドの両方である。

【0031】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、植物細胞はNKアミノ酸配列を含み、このポリペプチドのC末端は野生型NifKのC末端である。すなわちNKは、人工的に付加されたC末端伸長部をまったく欠いている。

【0032】

上記の側面のさらなる一実施態様または別の一実施態様では、外来ポリヌクレオチドは、順番に、NifEアミノ酸配列（NE）、リンカーアミノ酸配列（リンカー）、およびNifNポリペプチド（NN）アミノ酸配列を含むNifE-リンカー-NifN融合ポリペプチド（NifE-リンカー-NifN）をコードする。この中のリンカーアミノ酸配列は、長さが20～70残基、好ましくは約46残基であり、NEとNNに翻訳融合されている。好ましい一実施態様では、NifE-リンカー-NifNポリペプチドはミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含み、このMTPはNEアミノ酸配列のN末端に翻訳融合されている。非常に好ましい一実施態様では、NifE-リンカー-NifNポリペプチドはMTPの中で、またはMTPの直後で切断することができ、外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現するとき、プロセッシングを受けたNifDポリペプチド（CNE）が生成し、そのことによりCNEは、そのN末端に、癒痕配列を含む、または癒痕配列を含まないのどちらかになる。

【0033】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、NifE-リンカー-NifNポリペプチドのリンカーは、長さが少なくとも約30個のアミノ酸、または少なくとも約40個のアミノ酸、または約20個のアミノ酸～約60個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約60個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、または約25個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸、または約35個のアミノ酸、または約40個のアミノ酸、または約45個のアミノ酸、または約46個のアミノ酸、または約50個のアミノ酸、または約55個のアミノ酸である。最も好ましいのは、リンカーが、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドについては長さ約30個のアミノ酸であり、NifE-リンカー-NifN融合ポリペプチドについては長さ約46個のアミノ酸であることである。この文脈では、「約30」は、27、28、29、30、31、32、または33個のアミノ酸を意味し、「約46」は、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、または51個のアミノ酸を意味する。

【0034】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、リンカーは、NDとNK、またはNEとNNが植物細胞または細菌細胞の中で会合して機能的配置になることを可能にするのに十分な長さである。一実施態様では、リンカーは長さが8～50個のアミノ酸である。好ましくは、リンカーは、長さが少なくとも約20個のアミノ酸、少なくとも約25個のアミノ酸、または少なくとも約30個のアミノ酸である。より好ましくは、リンカーは、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドについて長さが25個～35個のアミノ酸である。

【0035】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、融合ポリペプチドは、そのMTPの中で、またはMTPの直後で切断することができ、外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現

10

20

30

40

50

するとき、プロセッシングを受けたポリペプチド（CNK）が生成し、そのことによりCNKは、順番に、オブションの癒痕配列、NifDアミノ酸配列、リンカーアミノ酸配列、およびNKアミノ酸配列を含む。切断がMTPの直後に起こる場合、癒痕配列は存在しない。

【0036】

一実施態様では、植物細胞は、融合ポリペプチド、CDK、またはその両方を含む。

【0037】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、CDKは、長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～10個または11～20個のアミノ酸からなる癒痕配列をNifDアミノ酸配列のN末端に翻訳融合された状態で含む。

【0038】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、CDKは、NifDとNifKの機能の両方を持つ。

【0039】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、植物細胞は、NDとNK以外の1つ以上のNifポリペプチド（NF）をコードする外来ポリヌクレオチドをさらに含む。それぞれのNFは、(i) NFのN末端のMTPと、(ii) Nifポリペプチド配列（NP）を含み、それぞれのMTPは、独立に、同じであるか異なっており、それぞれのNPは、独立に、同じであるか異なっている。

【0040】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、それぞれのNFは、そのMTPの中で、またはMTPの直後で切断することができ、外来ポリヌクレオチドが植物細胞の中で発現するとき、プロセッシングを受けたNifポリペプチド（CNF）が生成し、そのことによりそれぞれのCNFは、そのN末端に、癒痕配列を含む、または癒痕配列を含まないのどちらかになる。

【0041】

一実施態様では、NFポリペプチドの少なくとも1つはNifHポリペプチドである。

【0042】

上記の側面のいずれかの一実施態様では、植物細胞は、(i) NifD、NifH、NifK、NifB、NifE、およびNifNポリペプチドを好ましくは植物細胞のミトコンドリアマトリックスの中に含むNifポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む。

【0043】

上記の側面のいずれかのさらなる一実施態様または別の一実施態様では、それぞれのMTPは、少なくとも10個のアミノ酸を含み、好ましくは10～80個のアミノ酸の長さを持つ。

【0044】

上記の側面のいずれかのさらなる一実施態様または別の一実施態様では、それぞれのMTP、または少なくとも1つのMTP、またはMTPのすべてが、独立に、ミトコンドリアタンパク質前駆体またはそのバリエーションのMTP、好ましくは植物MTPを含む。

【0045】

上記の側面のいずれかのさらなる一実施態様または別の一実施態様では、外来ポリヌクレオチドの1つ以上またはすべてが、細胞の核ゲノムに好ましくは連続した核酸配列として組み込まれる、および／または細胞の核内で発現する。

【0046】

上記の側面のいずれかの一実施態様では、細胞は、*Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）のプロトプラスト以外、または*Nicotiana benthamiana*（ベンサムアナタバコ）細胞以外の細胞である。

【0047】

本発明の発明者らは、植物ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるNifポリペプチドの組み合わせを産生する植物細胞も作製した。

【0048】

そこで1つの側面では、本発明により、ミトコンドリアと、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ

10

20

30

40

50

、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドを含む植物細胞が提供される。ただしNifポリペプチドは、NifF、NifM、NifN、NifS、NifU、NifW、NifY、NifZ、NifV、NifH、およびNifD-NifKからなるグループから選択され、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドのそれぞれは、ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0049】

一実施態様では、植物細胞は、NifVポリペプチドを含む。NifVはホモクエン酸を産生することが好ましい。より好ましくは、NifVポリペプチドは、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。一実施態様では、NifVポリペプチドは本発明のNifVである。

10

【0050】

別の一実施態様では、植物細胞は、少なくともNifSポリペプチドまたはNifUポリペプチドを含むか、NifSポリペプチドとNifUポリペプチドの両方を含むとともに、場合によってはNifVポリペプチドを含む。

【0051】

別の一実施態様では、植物細胞は、少なくともNifHポリペプチドまたはNifMポリペプチドを含むか、NifHポリペプチドとNifMポリペプチドの両方を含むとともに、場合によってはNifV、NifS、およびNifUの1つ以上またはすべてを含む。

20

【0052】

別の一実施態様では、植物細胞は、NifF、NifH、またはNifD-NifKポリペプチドを含むか、NifHとNifD-NifKを含むか、NifF、NifH、およびNifD-NifKを含むとともに、場合によってはNifV、NifS、NifU、NifH、およびNifMポリペプチドの1つ以上またはすべてを含む。

【0053】

一実施態様では、NifDポリペプチドはAnfDポリペプチドであり、NifHポリペプチドはAnfHポリペプチドであり、NifD-NifKポリペプチドはAnfD-AnfKポリペプチドである。好ましい一実施態様では、植物細胞は、ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるAnfGポリペプチドをさらに含む。

【0054】

一実施態様では、MPPによる切断後の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドのそれぞれは、独立に、ミトコンドリア内で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%可溶性である。Nifポリペプチドは、植物細胞のミトコンドリア内で80%まで、または90%まで、それどころか完全に可溶性である。

30

【0055】

一実施態様では、Nifポリペプチドの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個が、それぞれ独立に、ミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)、またはMTPの切断から生じるC末端ペプチドを含む、あるいはMPPによるプロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方の組み合わせが存在し、好ましくは、MTPは、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドのそれぞれのN末端にある、またはMPPによるプロセッシングを受けた形態は、NifポリペプチドのN末端にC末端ペプチドを持たない。

40

【0056】

一実施態様では、それぞれのMTPは、独立に、植物細胞の中で少なくとも50%の効率で切断され、および／または少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なく

50

とも11個のプロセッシングを受けたNifポリペプチドのそれぞれは、独立に、植物細胞の中に、対応するNifポリペプチドよりも高いレベルで、好ましくは1：1よりも大きな比、2：1よりも大きな比、3：1よりも大きな比、または4：1よりも大きな比で存在する。

【0057】

一実施態様では、植物細胞は、順番に、NifDアミノ酸配列（ND）、リンカーアミノ酸配列、およびNifKポリペプチド（NK）アミノ酸配列を含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドを含み、その中のリンカーアミノ酸配列は、長さが8～50個の残基、好ましくは16～50個の残基、より好ましくは約26個または約30個の残基、または最も好ましくは26個または30個の残基を持ち、NDとNKに翻訳融合されている。

【0058】

さらなる一実施態様では、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドが、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）、またはMTPの切断から生じるC末端ペプチドを含む、あるいはMPPによるプロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方の組み合わせが存在し、MTPは、NifD-NifK融合ポリペプチドのN末端に翻訳融合されている。

【0059】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のプロセッシングを受けたNifポリペプチドは、それぞれ独立に、MTPの切断から生じた長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～10個または11～20個のアミノ酸からなるC末端ペプチドを、NifポリペプチドのN末端に翻訳融合されて含む。

【0060】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチド、または少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のプロセッシングを受けたNifポリペプチドは、機能的Nifポリペプチドである。

【0061】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチド、または好ましくは少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のプロセッシングを受けたNifポリペプチドは、植物細胞のミトコンドリア内に、好ましくは植物細胞のミトコンドリアマトリックス（MM）内にある。

【0062】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチド、または好ましくは少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のプロセッシングを受けたNifポリペプチド、またはその両方は、独立に、植物ミトコンドリア内で主に可溶性である（すなわちミトコンドリア内で50%超の可溶性である）。プロセッシングを受けたNifポリペプチドは、植物細胞のミトコンドリア内で好ましくは80%まで、または90%まで、それどころか完全に可溶性である。ポリペプチドの可溶性は本明細書に記載されているようにして求めることができる。

【0063】

一実施態様では、NifD融合ポリペプチド、またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド、またはそのMPP切断産物は植物細胞の中に存在し、（a）配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性である、および／または（b）配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列

10

20

30

40

50

101) 以外のアミノ酸配列を含む。一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にチロシン (Y) 以外のアミノ酸を含む。一実施態様では、NDは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にグルタミン (Q) またはリシン (K) を、または配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にロイシン (L) またはメチオニン (M) またはフェニルアラニン (F) を含む。

【0064】

一実施態様では、MTPは、F1-ATPアーゼ γ サブユニットからの長さ約51個のアミノ酸である。

【0065】

一実施態様では、植物細胞はNKアミノ酸配列を含み、このポリペプチドのC末端は野生型NifKのC末端である。

10

【0066】

一実施態様では、リンカーは、長さが少なくとも約20個のアミノ酸、または少なくとも約30個のアミノ酸、または少なくとも約40個のアミノ酸、または約20個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約60個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、または約25個のアミノ酸、または約30個のアミノ酸、または約35個のアミノ酸、または約40個のアミノ酸、または約45個のアミノ酸、または約46個のアミノ酸、または約50個のアミノ酸、または約55個のアミノ酸である。

【0067】

20

一実施態様では、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、MTPの中で、またはMTPの直後で切断することができてプロセッシングを受けたポリペプチド (CNK) が生成し、そのことによりCNKは、順番に、MTPの切断から生じた最適なC末端ペプチド、NifDアミノ酸配列 (ND)、リンカーアミノ酸配列、およびNKアミノ酸配列を含む。

【0068】

一実施態様では、植物細胞は、融合ポリペプチドまたはCDK、またはその両方をさらに含む。

【0069】

一実施態様では、CDKは、NifDアミノ酸配列のN末端に翻訳融合された長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～10個または11～20個のアミノ酸からなる瘢痕配列を含む。

30

【0070】

一実施態様では、CDKは、NifDとNifKの両方の機能を持つ。

【0071】

一実施態様では、NDはAnfDであり、NKはAnfKである。

【0072】

一実施態様では、MTPは、F1-ATPアーゼ γ サブユニットからの長さ約51個のアミノ酸である。

【0073】

一実施態様では、それぞれのMTPは少なくとも10個のアミノ酸を含み、好ましくは10～80個のアミノ酸の長さを持つ。

40

【0074】

一実施態様では、MTP、または少なくとも1つのMTP、またはMTPのすべては、独立に、ミトコンドリアタンパク質前駆体またはそのバリエーションのMTP、好ましくは植物のMTPを含む。

【0075】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドは、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なく

50

とも11個の外来ポリヌクレオチドによってコードされ、そのうちの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個が、細胞の核ゲノムに好ましくは連続した核酸配列として組み込まれる、および／または植物細胞の核内で発現する。

【0076】

上記の側面のいずれかの別の実施態様では、細胞は、*Arabidopsis thaliana*のプロトプラスト以外の、または*Nicotiana benthamiana*細胞以外の細胞である。

【0077】

本発明の発明者らは、最小ニトロゲナーゼ複合体にとって必要なNifポリペプチドの組み合わせを植物ミトコンドリア内で発現させるのにも成功した。

【0078】

そこで別の1つの側面では、本発明により、ミトコンドリアと、少なくとも8つまたは少なくとも9つのNif融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、これら外来ポリヌクレオチドが、それぞれ、Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて植物細胞の中でそのヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、それぞれのNif融合ポリペプチドは独立にミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含み、Nif融合ポリペプチドは、(i) NifH、NifB、NifF、NifJ、NifS、NifU、およびNifV融合ポリペプチドを含むとともに、(ii) NifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチド、または(iii) C末端を持つNifD配列と、オリゴペプチドリンカーと、N末端を持つNifK配列とを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド（ただしその中のオリゴペプチドリンカーは、NifD配列のC末端とNifK配列のN末端に翻訳融合されている）のどちらかを含み、少なくともNifH、NifF、NifS、およびNifU融合ポリペプチドのミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ（MPP）切断産物は、それぞれ、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(ii)のNifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、または(iii)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるのどちらかであり、NifV融合ポリペプチドおよび／またはそのMPP切断産物は、植物細胞の中でホモクエン酸を産生し、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、植物細胞が提供される。

【0079】

別の1つの側面では、本発明により、ミトコンドリアと、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つのNif融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、これら外来ポリヌクレオチドが、それぞれ、Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて植物細胞の中でそのヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、それぞれのNif融合ポリペプチドは独立にミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含み、Nif融合ポリペプチドは、(i) NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ、または2つ以上、またはすべてを含むとともに、(ii) NifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチド、または(iii) C末端を持つNifD配列と、オリゴペプチドリンカーと、N末端を持つNifK配列とを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド（ただしその中のオリゴペプチドリンカーは、NifD配列のC末端とNifK配列のN末端に翻訳融合されている）のどちらかを含み、少なくともNifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドのミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ（MPP）切断産物は、それぞれ、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(ii)のNifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、または(iii)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるのどちらかであり、ii)のNifD融合ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物、またはiii)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に、(i)のNifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ、または2つ以上、またはすべてをコードする外来ポリヌクレオチドを欠く対応する植物細胞の中に存在するNifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物の量よりも多い量で存在する植物細胞が提供される。

【0080】

別の1つの側面では、本発明により、ミトコンドリアと、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、または少なくとも9つのNif融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、これら外来ポリヌクレオチドが、それぞれ、Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていて植物細胞の中でそのヌクレオチド配列を発現させるプロモータを含み、それぞれのNif融合ポリペプチドは独立にミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)を含み、Nif融合ポリペプチドは、(i) NifH、NifS、およびNifU融合ポリペプチドと、場合によってはMifMポリペプチド、(ii) NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ、または2つ以上、またはすべてを含むとともに、(iii) NifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチド、または(iv) C末端を持つNifD配列と、オリゴペプチドリンカーと、N末端を持つNifK配列とを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチド(ただしその中のオリゴペプチドリンカーは、NifD配列のC末端とNifK配列のN末端に翻訳融合されている)のどちらかを含み、NifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドのミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ(MPP)切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(iii)のNifDおよびNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(iv)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中に存在している場合には、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、(iii)のNifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチドのMPP切断産物、またはiv)のNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞の中にPクラスターとの複合体として存在する植物細胞が提供される。

【0081】

一実施態様では、植物細胞は、AnfH融合ポリペプチドであるNifH融合ポリペプチドを含み、NifD融合ポリペプチドは、存在している場合にはAnfD融合ポリペプチドであり、NifK融合ポリペプチドは、存在している場合にはAnfK融合ポリペプチドであり、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、存在している場合にはAnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドであり、植物細胞は、MTPを含むAnfG融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、AnfG融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドは、AnfG融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、AnfG融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0082】

上記の3つの側面の一実施態様では、NifD融合ポリペプチドまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは植物細胞の中に存在しており、(a) 配列番号18のアミノ酸97~100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性である、および／または(b) 配列番号18のアミノ酸97~100に対応する位置にRRNY(アミノ酸配列101)以外のアミノ酸配列を含む。

【0083】

本発明の発明者らは、彼らが知る限り、ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるNifVポリペプチドを含む植物細胞を作製した最初の者である。そこで別の1つの側面では、本発明により、NifVポリペプチド(NV)を含む植物細胞であって、NVが植物細胞のミトコンドリア内で、好ましくは植物細胞のMM内で少なくとも部分的に可溶性であ

10

20

30

40

50

る植物細胞が提供される。

【0084】

一実施態様では、NVは、細胞の中でホモクエン酸を産生することができる、またはホモクエン酸を産生している。

【0085】

一実施態様では、NVポリペプチドは、配列番号163、206～209、211、または212のいずれか1つとして提供される配列を持つアミノ酸、またはその生物活性な断片を含むか、配列番号163、206～209、211、または212の任意の1つ以上として提供されるアミノ酸配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致するアミノ酸配列を持ち、細胞の中でホモクエン酸を産生することができる。

10

【0086】

この側面の一実施態様では、本発明により、ミトコンドリアと、NifVポリペプチド(NV)をコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、外来ポリヌクレオチドが、NVをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NVは植物細胞の中でホモクエン酸を産生し、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、外来ポリヌクレオチドは、好ましくは植物細胞の核ゲノムに組み込まれ、および／または植物細胞の核内で発現し、場合によってはNVがミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)を含む植物細胞が提供される。

20

【0087】

別の1つの側面では、本発明により、(a)配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性である、および／または(b)配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY(アミノ酸配列101)以外のアミノ酸配列を含むNifDポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、外来ポリヌクレオチドが、NDをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NifDポリペプチドが好ましくはMTPを含む植物細胞が提供される。

30

【0088】

一実施態様では、植物細胞は、NifKポリペプチド(NK)をコードする外来ポリヌクレオチドを含み、NKをコードする外来ポリヌクレオチドは、NKをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NDはC末端を持ち、NKはN末端を持ち、(i)NKは、ミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)を持つ、または(ii)NDとNKは、オリゴペプチドリンカーを含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドとして翻訳融合され、その中のオリゴペプチドリンカーがNDのC末端とNKのN末端に翻訳融合されているのどちらかである。

【0089】

一実施態様では、植物細胞は、NifHポリペプチド(NH)をコードする外来ポリヌクレオチドを含み、NHをコードする外来ポリヌクレオチドは、NHをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NHはミトコンドリア標的型ペプチド(MTP)を含み、好ましくはNHおよび／またはそのMPP切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

40

【0090】

一実施態様では、Nif融合ポリペプチドの少なくとも1つ以上、または好ましくはすべてのMPP切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、好ましくは、NifD、NifK、およびNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドのそれぞれ(植物細胞の中に存在する場合)とNifHポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞のミトコンド

50

リア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0091】

本発明の発明者らは、彼らが知る限り、ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であるNifHポリペプチドを含む植物細胞を作製した最初の者である。そこで別の1つの側面では、本発明により、NifHポリペプチド（NH）を含む植物細胞であって、NHがミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である植物細胞が提供される。

【0092】

一実施態様では、NHは外来ポリヌクレオチドによってコードされ、この外来ポリヌクレオチドは、好ましくは、植物細胞の中に存在する場合にNifD、NifK、およびNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドと連続した核酸配列として、細胞の核ゲノムに組み込まれる。

10

【0093】

別の1つの側面では、本発明により、NifH融合ポリペプチド（NH）をコードする外来ポリヌクレオチドを含む植物細胞であって、外来ポリヌクレオチドが、NHをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NHはミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含み、NHのMPP切断産物は植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、場合によっては前記外来ポリヌクレオチドが、植物細胞の核ゲノムに組み込まれる、および／または植物細胞の核内で発現する植物細胞が提供される。

【0094】

20

上記の側面のそれぞれの実施態様では、植物細胞はさらに、NifMポリペプチド（NM）をコードする外来ポリヌクレオチドを含み、NMをコードするこの外来ポリヌクレオチドは、NMをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NMは場合によってはミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含む。

【0095】

上記の側面のそれぞれの実施態様では、植物細胞は、NifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、これら外来ポリヌクレオチドは、それぞれ、Nif融合ポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、NifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドは、それぞれ、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含む。

30

【0096】

上記の側面のそれぞれの実施態様では、それぞれのNifポリペプチドは、植物細胞の中で、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含むNif融合ポリペプチドとして産生され、それぞれのMTPは、独立に、同じであるか異なっており、好ましくは、MTPは、Nif融合ポリペプチドの少なくとも1つ、または2つ以上、またはすべてのN末端にある。

【0097】

上記の側面のそれぞれの実施態様では、植物細胞の中で産生されたそれぞれのNif融合ポリペプチドは、独立に、(i) MTP配列の中でMPPによって切断されてMPP切断Nifポリペプチドを生成させ、そのことによってこのMPP切断NifポリペプチドがそのN末端に、MTPからのC末端ペプチド（癒痕ペプチド）を含むようになる、または(ii) MTPの直後でMPPによって切断され、そのことによってこのMPP切断NifポリペプチドはMTPからのC末端ペプチドを含まなくなるのどちらかである。

40

【0098】

上記の側面のそれぞれの実施態様では、それぞれのMTPは、独立に、植物細胞の中で少なくとも50%の効率で切断される、および／またはそれぞれの切断されたNifポリペプチドは、独立に、対応する切断されていないNif融合ポリペプチドよりも高いレベルで、好ましくは1:1、2:1、または3:1よりも大きな比で植物細胞の中に存在する。

【0099】

50

上記の側面のそれぞれの実施態様では、それぞれのNif融合ポリペプチドは、植物細胞の中で、そのMTP配列の中で少なくとも部分的に切断されてMPP切断Nifポリペプチドを生成させ、それぞれのMPP切断Nifポリペプチドは、独立に、MTP配列に由来する長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～11個のアミノ酸または11～20個のアミノ酸からなるペプチド（癒痕ペプチド）を、MPP切断NifポリペプチドのN末端に翻訳融合されて含む。複数の実施態様では、癒痕ペプチドの1つ以上は、独立に、長さが2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸である。複数の実施態様では、癒痕ペプチドの1つ以上は、独立に、長さが11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸、または長さが20～30個、20～40個、または20～50個のアミノ酸だが、より短い癒痕配列が好ましい。これらの実施態様では、本明細書で用いられているように、癒痕ペプチドは、Nif配列のN末端に融合された任意のリンカー配列（例えば本明細書の実施例で用いられているGly-Glyリンカーなど）を含む。複数の実施態様では、Nif配列は、そのN末端に、その野生型配列からのMet（翻訳開始Met）を保持し、このMetは癒痕配列には含まれない。その代わりに、翻訳開始MetはNif配列からは省略される。複数の実施態様では、野生型Nif配列と比べて追加されたアミノ酸をNif配列のN末端から切除できるが、切除後のNif配列がそのNif機能を保持していることが条件である。

【0100】

上記の側面のそれぞれの実施態様では、植物細胞はさらに、フェレドキシン融合ポリペプチド、好ましくはFdxN融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、フェレドキシン融合ポリペプチドをコードするこの外来ポリヌクレオチドは、フェレドキシン融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されていてそのヌクレオチド配列を植物細胞の中で発現させるプロモータを含み、前記フェレドキシン融合ポリペプチドは、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含む。

【0101】

一実施態様では、フェレドキシン融合ポリペプチドのMPP切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性であり、好ましくは、外来ポリヌクレオチドは、植物細胞の核ゲノムに組み込まれる、および／または植物細胞の核内で発現する。

【0102】

一実施態様では、植物細胞は、順番に、NifDアミノ酸配列（ND）、オリゴペプチドリリンカー、およびNifKポリペプチド（NK）アミノ酸配列を含むNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドを含み、その中のオリゴペプチドリリンカーは、8～50残基、好ましくは16～50残基の長さ、より好ましくは約26または約30残基の長さ、または最も好ましくは30残基の長さを持ち、NDとNKに翻訳融合されている。

【0103】

一実施態様では、それぞれのNif融合ポリペプチドは植物細胞の中で切断されて、機能的NifポリペプチドであるNifポリペプチドを生成させる。

【0104】

一実施態様では、植物細胞は、NifD融合ポリペプチド（ND）またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、前記NDまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列101）以外のアミノ酸配列を含み、前記NDまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、好ましくは配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にチロシン（Y）以外のアミノ酸を含む。

【0105】

一実施態様では、NDまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にグルタミン（Q）またはリシン（K）を、または配列番号18のアミノ酸100に対応する位置にロイシン（L）またはメチオニン（M）またはフェニルアラニン（F）を含む。

【0106】

一実施態様では、植物細胞は、NifK融合ポリペプチドまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、前記NifK融合ポリペプチドまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドは、野生型NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列と同じC末端アミノ酸配列を持つ。いくつかの実施態様では、配列の少なくとも最後の2個、少なくとも最後の3個、少なくとも最後の4個のアミノ酸は、野生型NifKポリペプチドのアミノ酸と同じである。適切な野生型NifKポリペプチドの配列は、配列番号3のほか、アクセッション番号WP_049080161.1、WP_044347163.1、SBM87811.1、WP_047370272.1、WP_014333919.1、WP_012728880.1、WP_011912506.1、WP_065303473.1、WP_018989051.1、prf | | 2106319A、WP_011021239.1などを含んでいる。

10

【0107】

一実施態様では、NifK融合ポリペプチドまたはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドと、これらに由来するMPP切断産物は、最後の4個のアミノ酸が野生型NifKポリペプチドの最後の4個のアミノ酸と同じであるアミノ酸配列を持つ。

【0108】

一実施態様では、本発明のNifKポリペプチドのアミノ酸配列は、そのC末端に、アミノ酸DLVR（配列番号58）を持つ。別の一実施態様では、NifKポリペプチドは、そのC末端に、アミノ酸DLIR（配列番号239）、DVVR（配列番号240）、DIIR（配列番号241）、DLTR（配列番号242）、またはINW（配列番号243）を持つ。一実施態様では、AnfKポリペプチドは、そのC末端に、アミノ酸LNVW（配列番号244）、LNTW（配列番号245）、LNMW（配列番号246）、LAMW（配列番号247）、またはLSVW（配列番号248）を持つ。

20

【0109】

上記の側面の複数の実施態様では、植物細胞は、AnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドを含み、前記AnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドは、C末端を持つAnfD配列、オリゴペプチドリンカー、およびN末端を持つAnfK配列を含み、その中のオリゴペプチドリンカーは、AnfD配列のC末端とAnfK配列のN末端に翻訳融合され、前記オリゴペプチドリンカーは、少なくとも約20個のアミノ酸、少なくとも約30個のアミノ酸、少なくとも約40個のアミノ酸、約20個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、約30個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、約30個のアミノ酸～約60個のアミノ酸、約30個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、約25個のアミノ酸、約30個のアミノ酸、約35個のアミノ酸、約40個のアミノ酸、約45個のアミノ酸、約46個のアミノ酸、約50個のアミノ酸、または約55個のアミノ酸の長さを持つ。すなわち、これらの実施態様では、上記の実施態様のNifD配列はAnfD配列であり、NifK配列はAnfK配列である。

30

【0110】

一実施態様では、外来ポリヌクレオチドの少なくとも1つ、または2つ以上、または好ましくはすべてが、植物細胞の核ゲノムに組み込まれる、および／または植物細胞の閥内で発現する。

【0111】

一実施態様では、それぞれのMTPは少なくとも10個のアミノ酸を含み、好ましくは10～80個のアミノ酸の長さを持つ。

40

【0112】

一実施態様では、Nif融合ポリペプチドの少なくとも1つは、F1-ATPアーゼ γ -サブユニットからの長さ約51個のアミノ酸であるMTPを含む。

【0113】

一実施態様では、MTP、または少なくとも1つのMTP、またはMTPのすべてが、独立に、ミトコンドリアタンパク質前駆体またはそのバリエーションのMTP、好ましくは植物MTPを含む。

【0114】

一実施態様では、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、

50

少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個のNifポリペプチドが、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個の外来ポリヌクレオチドによってコードされ、そのうちの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、または少なくとも11個が、細胞の核ゲノムに好ましくは連続した核酸配列として組み込まれる。

【0115】

上記の側面の実施態様では、細胞は子孫細胞を生み出すことができず、例えば細胞培養物または生きた植物を再生させることができない。

【0116】

一実施態様では、本発明の植物細胞はさらに、本明細書で言及されている特徴の1つ以上によって規定される。特徴の可能な組み合わせのそれぞれが明確に考慮される。

【0117】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明の植物細胞を含む植物または植物の部分、器官、または組織、好ましくはトランスジェニック植物またはその部分が提供され、前記トランスジェニック植物またはその部分は、Nifポリペプチドをコードする1つ以上の外来ポリヌクレオチドにとってトランスジェニックである。

【0118】

一実施態様では、植物の部分は種子である。一実施態様では、種子は、発芽することができる、またはその代わりに、処理または処置してもはや発芽できなくされている。種子の細胞を再生させて細胞培養物または生きた植物にできない可能性がある。

【0119】

上記の側面の実施態様では、1つ以上の外来ポリヌクレオチドの1つ以上が植物の根において発現し、好ましくは植物の根において植物の葉におけるよりも高レベルで発現する。そのような場合、望む組織特異性である発現を提供するプロモータ配列を用いる。

【0120】

一実施態様では、トランスジェニック植物は、対応する野生型植物と比べて変化した表現型（対応する野生型植物と比べて増大した収量、バイオマス、生長速度、活力、生物学的窒素固定に由来する窒素ゲイン、窒素利用効率、非生物学的ストレス耐性、および／または栄養不足への耐性）を持つ。

【0121】

代わりの一実施態様では、トランスジェニック植物は、対応する野生型植物と同じ生長速度および／または表現型を持つ。

【0122】

上記の側面の複数の実施態様では、植物細胞、植物、またはその部分は、穀物植物細胞、穀物植物、またはその部分、例えばコムギ、イネ、トウモロコシ、ライコムギ、エンバク、オオムギなど、好ましくはコムギである。

【0123】

上記の側面の複数の実施態様では、植物細胞、植物、またはその部分は、1つ以上の外来ポリヌクレオチドにとってホモ接合性またはヘテロ接合性であり、好ましくは外来ポリヌクレオチドのすべてにとってホモ接合性である。

【0124】

上記の側面の複数の実施態様では、植物細胞、植物、またはその部分は、単子葉植物細胞、単子葉植物、またはその部分（例えば穀物植物細胞、穀物植物、またはその部分、例えばコムギ、イネ、トウモロコシ、ライコムギ、エンバク、オオムギなど、好ましくはコムギ）であるか、双子葉植物細胞、双子葉植物、またはその部分である。

【0125】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、トランスジェニック植物は屋外で生長している、または植物植物の部分は、屋外で生長した植物から採取された。あるいは植物

10

20

30

40

50

は、温室の中で生長した。

【0126】

さらなる一実施態様では、本発明により、屋外または温室で生長する本発明による少なくとも100の植物の集団、またはそこから採取された植物の部分が提供される。

【0127】

別の1つの側面では、本発明により、配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性である、単離されるか組み換えられたNifDポリペプチド（ND）が提供される。

【0128】

さらなる1つの側面では、本発明により、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列101）以外のアミノ酸配列を含む、単離されるか組み換えられたNifDポリペプチド（ND）が提供される。

【0129】

単離されたNDまたは組み換えNDはさらに、Nifポリペプチドに適用可能な上に言及されている特徴のいずれかによって規定することができる。特徴のあらゆる可能な組み合わせが、本発明の一部として考慮される。

【0130】

関連する1つの側面では、本発明により、NifDポリペプチド（ND）に翻訳融合されたミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含むNifD融合ポリペプチド、またはNDを含むその切断産物が提供され、前記NifD融合ポリペプチドまたはその切断産物は、（a）配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内の部位でのプロテアーゼ切断に対して抵抗性である、および／または（b）配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNY（アミノ酸配列101）以外のアミノ酸配列を含む。

【0131】

一実施態様では、NifD融合ポリペプチドは、オリゴペプチドリinkerとNifKポリペプチド（NK）をNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドとして翻訳融合されて含み、NDはC末端を含み、NKはN末端を含み、オリゴペプチドリinkerはNDのC末端とNKのN末端に翻訳融合されている。

【0132】

別の1つの側面では、本発明により、本発明のNifD融合ポリペプチドの切断産物が提供される。この切断産物は、ND、オリゴペプチドリinker、およびNKを含み、前記オリゴペプチドリinkerはC末端に翻訳融合されている。

【0133】

一実施態様では、NifD融合ポリペプチドまたはその切断産物は、NifDポリペプチドが植物細胞の中で産生されるとき、前記植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0134】

一実施態様では、NifD融合ポリペプチドはAnfKポリペプチドであり、NKはAnfKポリペプチドであり、NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドはAnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドである。

【0135】

別の1つの側面では、本発明により、NifKポリペプチド（NK）に翻訳融合されたミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含むNifD融合ポリペプチドが提供され、前記NifKポリペプチドまたはその切断産物は、植物細胞の中で生成するとき、前記植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0136】

別の1つの側面では、本発明により、本発明のNifD融合ポリペプチドの切断産物でNKを含むものが提供され、前記切断産物は、植物細胞の中で生成するとき、前記植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0137】

一実施態様では、NKはAnfKポリペプチドである。

【0138】

一実施態様では、NifKポリペプチドは、野生型NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列と同じC末端アミノ酸配列を持つ。適切な野生型NifKポリペプチド配列は本明細書に記載されている。

【0139】

別の1つの側面では、本発明により、(i) NifD融合ポリペプチドの切断産物、(ii) NifK融合ポリペプチドの切断産物、および (iii) Fe-Sクラスター、好ましくはPクラスターを含むタンパク質複合体が提供される。

【0140】

一実施態様では、タンパク質複合体は、植物細胞の中、好ましくは植物細胞のミトコンドリアの中にある。

【0141】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中で発現したとき、植物ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、実質的に精製されるか組み換えられたNifVポリペプチド (NV) が提供される。

【0142】

関連する1つの側面では、本発明により、単離されるか組み換えられたNifVポリペプチド、またはNifVポリペプチド (NV) に翻訳融合されたミトコンドリア標的型ペプチド (MTP) を含むNifV融合ポリペプチド、またはNVを含むその切断産物が提供され、前記NifVポリペプチドおよび／またはNifV融合ポリペプチドおよび／またはその切断産物は、植物細胞の中で発現したとき、前記植物細胞の中で少なくとも部分的に可溶性であり、好ましくは前記植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。

【0143】

一実施態様では、単離されるか組み換えられたNifVポリペプチド、またはNifV融合ポリペプチド、またはその切断産物は、植物細胞の中で、好ましくは植物細胞のミトコンドリア内でホモクエン酸を産生することができる。

【0144】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中で、好ましくはトランスジェニック植物の中で発現したとき、植物ミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である、実質的に精製されるか組み換えられたNifHポリペプチド (NH) が提供される。

【0145】

別の1つの側面では、本発明により、NifHポリペプチド (NH) に翻訳融合されたミトコンドリア標的型ペプチド (MTP) を含むNifH融合ポリペプチド、またはNHを含むその切断産物が提供され、前記NifH融合ポリペプチドまたはその切断産物は、植物細胞のミトコンドリア内で少なくとも部分的に可溶性である。これらの側面の複数の実施態様では、NHポリペプチドは、植物細胞においてそのMTP配列の中で少なくとも部分的に切断されてMPP切断Nifポリペプチドを生成させる。このMPP切断NHは、MTP配列に由来する長さが1～45個のアミノ酸、好ましくは1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～11個のアミノ酸または11～20個のアミノ酸からなるペプチド (癒痕ペプチド) を、MPP切断NifポリペプチドのN末端に翻訳融合されて含む。複数の実施態様では、癒痕ペプチドの1つ以上は、独立に、長さが2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸である。複数の実施態様では、癒痕ペプチドの1つ以上は、独立に、長さが11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸、または長さが20～30個、20～40個、または20～50個のアミノ酸だが、より短い癒痕配列が好ましい。

【0146】

これらの側面の一実施態様では、NHはAnfHポリペプチドである。

【0147】

一実施態様では、NifH融合ポリペプチド、または好ましくはそのMPP切断産物は、1つまたは2つのFe-Sクラスター、好ましくは1つまたは2つのFe₄-S₄クラスターに結合する。

10

20

30

40

50

【0148】

別の1つの側面では、NifVポリペプチド（NV）をコードする単離されたポリヌクレオチドまたは外来ポリヌクレオチドが提供され、前記NVは、植物細胞の中で発現するとき、植物ミトコンドリアの中で少なくとも部分的に可溶性である。

【0149】

一実施態様では、NVポリペプチドは、配列番号163、206～209、211、または212のいずれか1つとして提供される配列を持つアミノ酸、またはその生物活性な断片を含むか、配列番号163、206～209、211、または212の任意の1つ以上として提供されるアミノ酸配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致するアミノ酸配列を持つ。

10

【0150】

一実施態様では、本発明のポリペプチドは、単離されるか組み換えられたポリペプチドである。別の一実施態様では、本発明のポリペプチド（例えば組み換えポリペプチドなど）は、細胞の中に、好ましくは植物細胞の中に存在する。

【0151】

上記の側面のいずれか1つのNifポリペプチドに適したアミノ酸配列は本分野で知られており、本明細書に提示されているものが含まれる。

【0152】

一実施態様では、NifHポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号1；
- ii. 配列番号218；
- iii. 配列番号224；
- iv. アクセッション番号WP_049123239.1；
- v. アクセッション番号WP_048638817.1；
- vi. アクセッション番号WP_013029017.1；
- vii. アクセッション番号WP_013010353.1；
- viii. アクセッション番号WP_014258951.1；
- ix. アクセッション番号WP_011744626.1；
- x. アクセッション番号WP_013718497.1；
- xi. アクセッション番号WP_009565928.1；
- xii. アクセッション番号WP_013099472.1；
- xiii. アクセッション番号WP_007781874.1；
- xiv. アクセッション番号WP_012703362；
- xv. アクセッション番号WP_153472986；
- xvi. アクセッション番号WP_015854293；
- xvii. アクセッション番号WP_123927773；
- xviii. アクセッション番号WP_073538802；および
- xix. アクセッション番号RCV6483

20

30

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0153】

一実施態様では、NifHポリペプチドは、配列番号225～231に示されているアミノ酸配列モチーフの1つ以上を含む。

【0154】

一実施態様では、NifHポリペプチドは、配列番号1に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致

40

50

する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0155】

一実施態様では、NifHポリペプチドは、配列番号218に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0156】

一実施態様では、NifDポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号2；
- ii. 配列番号18；
- iii. 配列番号148；
- iv. 配列番号149；
- v. 配列番号150；
- vi. 配列番号151；
- vii. 配列番号152；
- viii. 配列番号153；
- ix. 配列番号216；
- x. アクセッション番号WP_044347161.1；
- xi. アクセッション番号WP_047370273.1；
- xii. アクセッション番号WP_038902190.1；
- xiii. アクセッション番号WP_024872642.1；
- xiv. アクセッション番号WP_024078601.1；
- xv. アクセッション番号WP_013298320.1；
- xvi. アクセッション番号WP_010877172.1；
- xvii. アクセッション番号WP_014258953.1；
- xviii. アクセッション番号WP_066665786.1；
- xix. アクセッション番号WP_015773055.1；
- xx. アクセッション番号WP_016867598.1；
- xxi. アクセッション番号WP_009512873.1；
- xxii. アクセッション番号WP_012703361；
- xxiii. アクセッション番号WP_075356167；
- xxiv. アクセッション番号WP_038590013；
- xxv. アクセッション番号WP_023922817；
- xxvi. アクセッション番号WP_011021232；および
- xxvii. アクセッション番号OAV73823

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0157】

一実施態様では、NifDポリペプチドは、配列番号2に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0158】

一実施態様では、NifDポリペプチドは、配列番号216に示されている配列と少なくとも

30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0159】

一実施態様では、NifKポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号3；
- ii. 配列番号217；
- iii. アクセッション番号WP_049080161.1；
- iv. アクセッション番号WP_044347163.1；
- v. アクセッション番号SBM87811.1；
- vi. アクセッション番号WP_047370272.1；
- vii. アクセッション番号WP_014333919.1；
- viii. アクセッション番号WP_012728880.1；
- ix. アクセッション番号WP_011912506.1；
- x. アクセッション番号WP_065303473.1；
- xi. アクセッション番号WP_018989051.1；
- xii. アクセッション番号prf | | 2106319A；
- xiii. アクセッション番号WP_011021239.1；
- xiv. アクセッション番号WP_012703359；
- xv. アクセッション番号WP_144571040；
- xvi. アクセッション番号WP_077859050；
- xvii. アクセッション番号WP_122630336；および
- xviii. アクセッション番号WP_088520366

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0160】

一実施態様では、NifKポリペプチドは、配列番号3に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0161】

一実施態様では、NifKポリペプチドは、配列番号217に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0162】

一実施態様では、NifBポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号4；
- ii. アクセッション番号WP_041145602.1；
- iii. アクセッション番号WP_043953592.1；
- iv. アクセッション番号WP_040003311.1；
- v. アクセッション番号WP_011094468.1；
- vi. アクセッション番号WP_048638849.1；
- vii. アクセッション番号WP_011813098.1；
- viii. アクセッション番号WP_048108879.1；

- ix. アクセション番号WP_050355163.1 ;
- x. アクセション番号WP_015850328.1 ; および
- xi. アクセション番号P10930

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0163】

一実施態様では、NifBポリペプチドは、配列番号4に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0164】

一実施態様では、NifEポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号5 ;
- ii. アクセション番号WP_049114606.1 ;
- iii. アクセション番号SBM87755.1 ;
- iv. アクセション番号WP_012764127.1 ;
- v. アクセション番号WP_012728883.1 ;
- vi. アクセション番号WP_003297989.1 ;
- vii. アクセション番号WP_012698965.1 ;
- viii. アクセション番号WP_013190624.1 ;
- ix. アクセション番号WP_025698318.1 ;
- x. アクセション番号WP_013460149.1 ;
- xi. アクセション番号AIS31022.1 ;
- xii. アクセション番号WP_018701501.1 ; および
- xiii. アクセション番号WP_048514099.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0165】

一実施態様では、NifEポリペプチドは、配列番号5に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0166】

一実施態様では、NifFポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号6 ;
- ii. アクセション番号WP_004122417.1 ;
- iii. アクセション番号WP_040968713.1 ;
- iv. アクセション番号WP_035885760.1 ;
- v. アクセション番号WP_039999438.1 ;
- vi. アクセション番号WP_048638838.1 ;
- vii. アクセション番号WP_064006977.1 ;
- viii. アクセション番号WP_012698862.1 ;
- ix. アクセション番号WP_010933399.1 ;
- x. アクセション番号WP_002949173.1 ; および

xi. アクセッション番号WP_039801725.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0167】

一実施態様では、NifFポリペプチドは、配列番号6に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または

10

【0168】

一実施態様では、AnfGポリペプチドは、以下の配列、すなわち

i. 配列番号219；

ii. アクセッション番号WP_012703360；

iii. アクセッション番号WP_144571041；

iv. アクセッション番号HBE76208；

v. アクセッション番号WP_144349445；

vi. アクセッション番号WP_112317428；および

vii. アクセッション番号WP_048515315

20

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0169】

一実施態様では、AnfGポリペプチドは、配列番号219に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または

30

【0170】

一実施態様では、NifJポリペプチドは、以下の配列、すなわち

i. 配列番号7；

ii. アクセッション番号WP_024360006.1；

iii. アクセッション番号WP_044347157.1；

iv. アクセッション番号WP_050533844.1；

v. アクセッション番号WP_064566543.1；

vi. アクセッション番号WP_057084649.1；

vii. アクセッション番号WP_014683040.1；

viii. アクセッション番号WP_013149847.1；

40

ix. アクセッション番号WP_053341220.1；

x. アクセッション番号WP_014454638.1；および

xi. アクセッション番号CSA83023.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0171】

一実施態様では、NifJポリペプチドは、配列番号7に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致

50

する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0172】

一実施態様では、NifMポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号8；
- ii. アクセッション番号WP_064342940.1；
- iii. アクセッション番号WP_004122413.1；
- iv. アクセッション番号WP_044347181.1；
- v. アクセッション番号WP_064566543.1；
- vi. アクセッション番号WP_063105800.1；
- vii. アクセッション番号WP_035885759.1；
- viii. アクセッション番号WP_011094472.1；
- ix. アクセッション番号WP_048638837.1；
- x. アクセッション番号CAA75544.1；
- xi. アクセッション番号WP_051692859.1；および
- xii. アクセッション番号WP_018415157.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0173】

一実施態様では、NifMポリペプチドは、配列番号8に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0174】

一実施態様では、NifNポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号9；
- ii. アクセッション番号WP_064391778.1；
- iii. アクセッション番号WP_047370268.1；
- iv. アクセッション番号WP_014683026.1；
- v. アクセッション番号WP_048638830.1；
- vi. アクセッション番号WP_027147663.1；
- vii. アクセッション番号WP_015195966.1；
- viii. アクセッション番号WP_023593609.1；
- ix. アクセッション番号WP_025677480.1；および
- x. アクセッション番号WP_018306265.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0175】

一実施態様では、NifNポリペプチドは、配列番号9に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0176】

一実施態様では、NifQポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号10；
- ii. アクセッション番号WP_064391765.1；
- iii. アクセッション番号CTQ06350.1；
- iv. アクセッション番号WP_047370257.1；
- v. アクセッション番号WP_043878077.1；
- vi. アクセッション番号WP_008878174.1；
- vii. アクセッション番号WP_011501504.1；
- viii. アクセッション番号WP_027196569.1；
- ix. アクセッション番号GAU06296.1；および
- x. アクセッション番号WP_063239464.1

10

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0177】

一実施態様では、NifQポリペプチドは、配列番号10に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または

20

【0178】

一実施態様では、NifSポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号11；
- ii. 配列番号19；
- iii. アクセッション番号WP_004138780.1；
- iv. アクセッション番号WP_045858151.1；
- v. アクセッション番号WP_047370265.1；
- vi. アクセッション番号WP_014333911.1；
- vii. アクセッション番号WP_055731597.1；
- viii. アクセッション番号WP_014239770.1；
- ix. アクセッション番号WP_054691765.1；
- x. アクセッション番号WP_021802294.1；
- xi. アクセッション番号WP_026894054.1；および
- xii. アクセッション番号WP_061575621.1

30

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0179】

40

一実施態様では、NifSポリペプチドは、配列番号11に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0180】

一実施態様では、NifSポリペプチドは、配列番号19に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、また

50

は一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0181】

一実施態様では、NifUポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号12；
- ii. アクセッション番号WP_049136164.1；
- iii. WP_050887862.1；
- iv. WP_057084657.1；
- v. WP_048638833.1；
- vi. WP_012728889.1；
- vii. WP_055731596.1；
- viii. WP_028587630.1；
- ix. WP_044417303.1；
- x. WP_001051984.1；および
- xi. KIM05011.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0182】

一実施態様では、NifUポリペプチドは、配列番号12に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0183】

一実施態様では、NifVポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号13；
- ii. 配列番号163；
- iii. 配列番号164；
- iv. 配列番号206；
- v. 配列番号207；
- vi. 配列番号208；
- vii. 配列番号209；
- viii. 配列番号210；
- ix. 配列番号211；
- x. 配列番号212；
- xi. 配列番号213；
- xii. 配列番号214；
- xiii. 配列番号215；
- xiv. アクセッション番号WP_049083341.1；
- xv. アクセッション番号WP_045858154.1；
- xvi. アクセッション番号WP_047370264.1；
- xvii. アクセッション番号WP_038912041.1；
- xviii. アクセッション番号WP_048638835.1；
- xix. アクセッション番号WP_011712856.1；
- xx. アクセッション番号WP_037528703.1；
- xxi. アクセッション番号OAA29062.1；および
- xxii. アクセッション番号EKQ56006.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一

10

20

30

40

50

致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0184】

一実施態様では、NifVポリペプチドは、配列番号13に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0185】

一実施態様では、NifXポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号14；
- ii. アクセッション番号WP_049070199.1；
- iii. アクセッション番号WP_064342937.1；
- iv. アクセッション番号WP_044347173.1；
- v. アクセッション番号WP_044612922.1；
- vi. アクセッション番号WP_043953583.1；
- vii. アクセッション番号WP_039999416.1；
- viii. アクセッション番号WP_047608097.1；
- ix. アクセッション番号WP_039800848.1；
- x. アクセッション番号WP_062149047.1；および
- xi. アクセッション番号WP_020165972.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0186】

一実施態様では、NifXポリペプチドは、配列番号14に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0187】

一実施態様では、NifYポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号15；
- ii. アクセッション番号WP_049089500.1；
- iii. アクセッション番号WP_064342935.1；
- iv. アクセッション番号WP_044524054.1；
- v. アクセッション番号WP_049010739.1；
- vi. アクセッション番号WP_047370270.1；
- vii. アクセッション番号WP_039999411.1；
- viii. アクセッション番号WP_037382461.1；
- ix. アクセッション番号WP_014683024.1；
- x. アクセッション番号AEX25784.1；および
- xi. アクセッション番号WP_012698835.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0188】

一実施態様では、NifYポリペプチドは、配列番号15に示されている配列と少なくとも3

10

20

30

40

50

0%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0189】

一実施態様では、NifZポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号16；
- ii. アクセッション番号WP_057173223.1；
- iii. アクセッション番号WP_064342939.1；
- iv. アクセッション番号WP_043875005.1；
- v. アクセッション番号WP_043953588.1；
- vi. アクセッション番号WP_065368553.1；
- vii. アクセッション番号WP_062627625.1；
- viii. アクセッション番号WP_011491838.1；
- ix. アクセッション番号WP_014029050.1；および
- x. アクセッション番号WP_015665422.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0190】

一実施態様では、NifZポリペプチドは、配列番号16に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0191】

一実施態様では、NifWポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号17；
- ii. アクセッション番号WP_064342938.1；
- iii. アクセッション番号WP_049080155.1；
- iv. アクセッション番号WP_095103586.1；
- v. アクセッション番号WP_065877373.1；
- vi. アクセッション番号WP_095699971.1；
- vii. アクセッション番号WP_012764136.1；
- viii. アクセッション番号WP_053085547.1；
- ix. アクセッション番号WP_077299824.1；
- x. アクセッション番号OGI40729；
- xi. アクセッション番号ACO76430.1；および
- xii. アクセッション番号BBA37427.1

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0192】

一実施態様では、NifWポリペプチドは、配列番号17に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0193】

一実施態様では、フェレドキシンポリペプチドは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号232；
- ii. アクセッション番号WP_012703542；
- iii. アクセッション番号WP_065835964.1；
- iv. アクセッション番号WP_069124666.1；
- v. アクセッション番号WP_101942980；
- vi. アクセッション番号WP_049076934.1；
- vii. アクセッション番号WP_072048756.1；
- viii. アクセッション番号WP_130674512.1；および
- ix. アクセッション番号WP_103805005.1

10

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0194】

一実施態様では、フェレドキシンポリペプチドは、配列番号232に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

20

【0195】

上記の側面のいずれかに関係するMTPに適したアミノ酸配列は本分野で知られており、本明細書に提示されているものが含まれる。一実施態様では、MTPは、以下の配列、すなわち

- i. 配列番号36；
- ii. 配列番号21；
- iii. 配列番号20のアミノ酸1～77；
- iv. 配列番号28；
- v. 配列番号29；
- vi. 配列番号30；
- vii. 配列番号31；
- viii. 配列番号32；
- ix. 配列番号33；
- x. 配列番号34；
- xi. 配列番号35；
- xii. 配列番号37；および
- xiii. 配列番号38

30

のいずれか1つ以上と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、または少なくとも99%一致する配列を持つアミノ酸を含む。

40

【0196】

一実施態様では、MTPは、配列番号36に示されている配列と少なくとも30%一致する、少なくとも40%一致する、少なくとも50%一致する、少なくとも60%一致する、少なくとも70%一致する、少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、少なくとも95%一致する、少なくとも97%一致する、少なくとも99%一致する、または一致する配列を持つアミノ酸を含む。

【0197】

別の1つの側面では、本発明により、本発明のポリペプチドの任意の1つ以上をコードす

50

るポリヌクレオチドが提供される。

【0198】

一実施態様では、ポリヌクレオチドのタンパク質コード領域は、植物細胞の中で発現させるため、細菌内の天然のポリヌクレオチドの対応するタンパク質コード領域と比べてコドンが改変されている。一実施態様では、タンパク質コード領域のほとんど、それどころかすべてが、植物細胞、好ましくは本発明の植物細胞の中で発現させるためにコドンが最適化されている。

【0199】

さらなる一実施態様では、それぞれの外来ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモータ、および／またはそのポリヌクレオチドに機能可能に連結された翻訳調節エレメントを含む。

10

【0200】

別の一実施態様では、プロモータは、植物の根、葉、および／または莖の中で1つ以上のポリヌクレオチドを発現させ、好ましくは、プロモータは、植物の種子よりも植物の根、葉、および／または莖の1つ、または2つ以上、またはすべての中で1つ以上のポリヌクレオチドを発現させる。

【0201】

別の一実施態様では、ポリヌクレオチドの1つ以上またはすべてが植物細胞または細菌細胞の中に存在し、好ましくは植物細胞の核ゲノムに例えば葉緑体ゲノム、または好ましくは植物細胞の核ゲノムに組み込まれる連続したDNA配列として組み込まれる。植物細胞は、核ゲノムに例えば多数のT-DNAとして組み込まれた連続的DNA配列の多数のコピーを含有することができる。

20

【0202】

一実施態様では、それぞれのポリヌクレオチド、またはその中にあってポリペプチドをコードしているそれぞれの配列は、プロモータと場合によっては転写終止配列に機能可能に連結されている。

【0203】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、プロモータは、植物の根、葉、および／または莖の中で1つ以上のポリヌクレオチドを発現させ、好ましくはその1つ以上のポリヌクレオチドは、植物の種子よりも植物の根、葉、および／または莖の1つ、または2つ以上、またはすべての中で優先的に発現される。

30

【0204】

さらなる1つの側面では、本発明のポリヌクレオチドを含むかコードするキメラベクターが提供される。

【0205】

別の1つの側面では、本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0206】

一実施態様では、ベクターは、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのNif融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

40

【0207】

別の1つの側面では、本発明により、本発明の上記側面の任意の1つに規定されているNif融合ポリペプチドの少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0208】

一実施態様では、ベクターは、

a) NifD融合ポリペプチドとNifK融合ポリペプチド、またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドと；

b) NifH融合ポリペプチドとNifV融合ポリペプチドと；

c) 場合によっては、AnfG融合ポリペプチドおよび／またはフェレドキシン融合ポリペ

50

プチド

をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0209】

一実施態様では、ベクターは、

a) NifF、NifJ、NifU、およびNifB融合ポリペプチドと、場合によってはNifS融合ポリペプチド；および／または

b) NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドを含む

【0210】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明のポリペプチドの1つ、または2つ以上、本発明による外来ポリヌクレオチドの1つ、または2つ以上、および／または本発明によるベクターを含む細胞が提供される。

【0211】

一実施態様では、細胞は、植物細胞または細菌細胞である。

【0212】

さらなる一実施態様では、植物細胞は、単子葉植物細胞（例えば穀物植物細胞、例えばコムギ細胞、イネ細胞、トウモロコシ細胞、ライコムギ細胞、エンバク細胞、またはオオムギ細胞など、好ましくはコムギ細胞）、または双子葉植物細胞である。植物細胞は、上に言及した特徴のいずれかによって規定されるポリペプチドまたはポリヌクレオチドをさらに特徴とすることができる。上に言及した特徴のあらゆる可能な組み合わせが、植物細胞の文脈と本発明の他の側面において本発明の一部として考慮される。

【0213】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明によるポリペプチドの1つ以上、本発明による外来ポリヌクレオチドの1つ以上、および／または本発明によるベクターを含むトランスジェニック植物またはそのトランスジェニック部分（好ましくは種子）が提供される。

【0214】

一実施態様では、トランスジェニック植物は、単子葉植物（例えば穀物植物、例えばコムギ、イネ、トウモロコシ、ライコムギ、エンバク、またはオオムギなど、好ましくはコムギ）、または双子葉植物である。植物またはその部分は、上に言及した特徴のいずれかによって規定されるポリペプチドまたはポリヌクレオチドをさらに特徴とすることができる。上に言及した特徴のあらゆる可能な組み合わせが、植物またはその部分の文脈と本発明の他の側面において本発明の一部として考慮される。

【0215】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明によるポリペプチドを産生させる方法が提供され、この方法は、細胞の中で本発明によるポリヌクレオチドを発現させることを含む。

【0216】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明による細胞を作製する方法が提供され、この方法は、本発明による1つ以上のポリヌクレオチドおよび／または本発明によるベクターを細胞の中に導入する工程を含む。

【0217】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中でホモクエン酸を産生させる方法が提供され、この方法は、本発明の組み換えNifVポリペプチドまたはNifV融合ポリペプチドを植物細胞の中で発現させることを含み、前記組み換えNifVポリペプチドまたはNifV融合ポリペプチド、および／またはその切断産物が、植物細胞の中でホモクエン酸を産生する。

【0218】

一実施態様では、この方法はさらに、組み換えNifVポリペプチドまたはNifV融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物細胞の中に導入することを含む。

【0219】

10

20

30

40

50

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中でホモクエン酸を産生させるための、本発明のNifVポリペプチドの利用が提供される。

【0220】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中のNifD、NifK、またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドの量を増加させる方法が提供され、この方法は、植物細胞の中でNifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチド（ただしそれぞれのNif融合ポリペプチドは、独立に、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含む）の1つ以上またはすべてを発現させて、植物細胞の中のNifD、NifK、またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドの量を、NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてを発現していない対応する植物細胞よりも増加させることを含む。

10

【0221】

一実施態様では、この方法はさらに、

i) NifD、NifK、またはNifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを植物細胞の中に導入することと；

ii) NifW、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを植物細胞の中に導入することを含む。

【0222】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中のNifYポリペプチドの量を増加させる方法が提供され、この方法は、植物細胞の中でNifW、NifX、およびNifZ融合ポリペプチド（ただしそれぞれのNif融合ポリペプチドは、独立に、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）を含む）の1つ以上またはすべてを発現させて、植物細胞の中のNifYポリペプチドの量を、NifW、NifX、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてを発現していない対応する植物細胞よりも増加させることを含む。

20

【0223】

一実施態様では、この方法はさらに、

i) NifYポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物細胞の中に導入することと；
ii) NifW、NifX、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを植物細胞の中に導入することを含む。

【0224】

別の1つの側面では、本発明により、植物細胞の中のNifYポリペプチドの量を増加させるための、NifW、NifX、およびNifZ融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてをコードする1つ以上のポリヌクレオチドの利用が提供される。

30

【0225】

別の1つの側面では、本発明により、トランスジェニック植物を作製するための、本発明のポリヌクレオチドおよび／または本発明のベクターの利用が提供される。

【0226】

別の1つの側面では、本発明により、トランスジェニック植物を作製する方法が提供され、この方法は、

i) 本発明の1つ以上のポリヌクレオチド、および／または本発明の1つ以上のベクターを植物の細胞の中に導入する工程、

40

ii) 工程i)の細胞から本発明のトランスジェニック植物を再生させる工程、および

iii) 場合によっては、工程ii)で再生させたトランスジェニック植物からトランスジェニック種子および／または子孫植物を生成させる工程を含む。

【0227】

さらなる1つの側面では、本発明により、トランスジェニック種子を作製する方法が提供され、この方法は、

i) 本発明のトランスジェニック植物から種子を採取すること、および／または

ii) 本発明の方法によって生成させた1つ以上のトランスジェニック子孫植物から種子を採取することを含む。

【0228】

50

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明によるポリヌクレオチドがゲノムに組み込まれた植物を作製する方法が提供され、この方法は、

i) 2つの親植物（ただし少なくとも1つの植物は前記ポリヌクレオチドを含む）を交配させる工程、

ii) この交配からの1つ以上の子孫植物をスクリーニングして前記ポリヌクレオチドの存在または不在を探す工程、および

iii) 前記ポリヌクレオチドを含む子孫植物を選択する工程を含み、

そのことによって前記植物を作製する。

【0229】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、親植物の少なくとも1つは四倍体または六倍体のコムギ植物である。

【0230】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、工程ii) は、1つ以上の子孫植物からのDNAを含むサンプルを分析して前記ポリヌクレオチドを探すことを含む。

【0231】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、工程iii) は、

i) 前記ポリヌクレオチドにとってホモ接合性である子孫植物を選択すること、および／または

ii) 前記植物、またはその1つ以上の子孫植物を分析し、前記ポリヌクレオチドの存在および／または発現を、または上に規定した変化した表現型を探すことを含む。

【0232】

一実施態様またはさらなる一実施態様では、この方法はさらに、

iv) 工程i) の交配の子孫を、前記ポリヌクレオチドを欠く第1の親植物と同じ遺伝子型の植物と十分な回数戻し交配し、第1の親の遺伝子型の大半を持つが前記ポリヌクレオチドを含む植物を生成させることと、

v) 前記ポリヌクレオチドを含む、および／または上に規定した変化した表現型を持つ子孫植物を選択することを含む。

【0233】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、この方法はさらに、植物または子孫植物を分析して少なくとも1つの他の遺伝子マーカーを探す工程を含む。

【0234】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明の方法を利用して作製された植物が提供される。

【0235】

さらなる1つの側面では、本発明により、組み換え細胞および／またはトランスジェニック植物を作製するための、本発明によるポリヌクレオチドおよび／または本発明によるベクターの利用が提供される。

【0236】

一実施態様では、トランスジェニック植物は、前記外来ポリヌクレオチドおよび／または前記ベクターを欠く対応する植物と比べたとき、上に規定した変化した表現型を持つ。

【0237】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明によるポリヌクレオチドを含む植物を同定する方法が提供され、この方法は、

i) 植物から核酸サンプルを取得する工程と、

ii) そのサンプルをスクリーニングして前記ポリヌクレオチドの存在または不在を探す工程を含む。

【0238】

一実施態様では、前記ポリヌクレオチドの存在は、植物が、前記外来ポリヌクレオチドを欠く対応する植物と比べたとき、上に規定した変化した表現型を持っていることを示す。

【0239】

10

20

30

40

50

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、この方法は、本発明による植物を同定する。

【0240】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、この方法はさらに、工程i)の前に種子から植物を生成させることを含む。

【0241】

別の1つの側面では、本発明により、本発明の植物細胞、または本発明のトランスジェニック植物から取得した植物細胞を含むトランスジェニック植物の部分が提供される。

【0242】

一実施態様では、植物の部分は、本発明のポリヌクレオチドを含む種子である。

10

【0243】

別の1つの側面では、本発明により、種子から得られる穀物粉末、全粒粉、デンプン、油、種子ミール、または他の製品を製造する方法が提供され、この方法は、

a) 本発明の種子を取得することと、および／または

b) 穀物粉末、全粒粉、デンプン、油脂、または他の製品を抽出すること、または種子ミールを製造することを含む。

【0244】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明のポリペプチドおよび／または本発明のポリヌクレオチドを含む本発明のトランスジェニック植物および／または本発明の植物の部分から製造された製品が提供される。

20

【0245】

一実施態様では、植物の部分は種子である。

【0246】

さらなる一実施態様または別の一実施態様では、製品は、食品成分または飲料成分または食料品または飲料品である。好ましくは、i) 食品成分または製品は、穀物粉末、デンプン、油脂、発酵したパンまたは発酵していないパン、パスタ、麺類、動物の飼料、朝食用シリアル、スナック、ケーキ、麦芽、ペストリー、および穀物粉末をベースとしたソースを含有する食品からなるグループから選択される、またはii) 飲料品は、ジュース、ビール、または麦芽である。このような製品を製造する方法は当業者に周知である。

【0247】

30

代替りの一実施態様では、製品は非食料品である。非食料品の非限定的な例に含まれるのは、フィルム、コーティング、接着剤、建築材料、および包装材料である。このような製品を製造する方法は当業者に周知である。

【0248】

さらなる1つの側面では、本発明により、食料品を調製する方法が提供され、この方法は、本発明の種子を、またはその種子からの穀物粉末、全粒粉、デンプン、油脂、または他の製品を、別の食品成分と混合することを含む。

【0249】

さらなる1つの側面では、本発明により、麦芽を調製する方法が提供され、この方法は、本発明による種子を発芽させる工程を含む。

40

【0250】

さらなる1つの側面では、本発明により、動物の餌としての、または動物が消費する餌または人が消費する食品を製造するための、本発明による植物またはその部分の利用が提供される。

【0251】

さらなる1つの側面では、本発明により、本発明によるポリペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるベクター、本発明による細胞のいずれかと、1つ以上の許容可能な基剤を含む組成物が提供される。

【0252】

さらなる1つの側面では、本発明により、植物細胞の中でニトロゲナーゼタンパク質複

50

合体を再構成する方法が提供され、この方法は、本発明による2つ以上のポリヌクレオチド、本発明による2つ以上の核酸コンストラクト、および／または本発明によるベクターを細胞の中に導入し、この植物細胞を、前記ポリヌクレオチドまたはベクターが発現するのに十分な時間にわたって培養することを含む。

【0253】

本明細書のどの実施態様も、特に断わらない限り、必要な変更を加えれば任意の他の実施態様に当てはまるものとする。例えば当業者であればわかるように、本発明の1つの側面に関して上に概説したNifポリペプチドの例は、本発明の他の側面のいずれにも同様に当てはまる。

【0254】

本発明の範囲が、本明細書に記載されている具体的な実施態様によって限定されることはなく、具体的な実施態様は例示だけを目的としている。機能が同等な製品、組成物、および方法は、本明細書に記載されているように、明らかに、本発明の範囲に入る。

【0255】

本明細書全体を通じ、特に断わらない限り、または文脈が別のことを要求しているのではない限り、単一の工程、物質の組成物、工程群、または物質の組成物群は、これらの工程、物質の組成物、工程群、または物質の組成物群の1つと複数（すなわち1つ以上）を包含するものとする。

【0256】

本発明を、添付の図面を参照して、以下の非限定的な実施例によってこれから説明する。

【図面の簡単な説明】

【0257】

【図1】プロセッシングを受けていない、およびMPPによるプロセッシングを受けた個々のpFAγ51::Nif::HAポリペプチドまたは6×HIS::Nif::HAポリペプチドを*Nicotiana benthamiana*の葉で一過性に発現させた後に検出するための抗HA抗体を用いたウエスタンブロット分析。C、細胞質発現（6×His）；M、ミトコンドリア標的型。

【0258】

【図2】*N. benthamiana*の葉にMTP:Nif遺伝子コンストラクトを導入した後のタンパク質抽出液のウエスタンブロット。各ブロット上の最初と最後のレーンは、Invitrogen Prestained BenchMarkラダーからの分子量マーカーをkDaで示す。各サンプルで使用した遺伝子コンストラクトが各レーンの上方に示されており、それぞれの融合ポリペプチドに含まれるNifポリペプチドがレーンの下方に示されている。コンストラクトSN26～SN32について、ペア式浸透を、MTP-FAγ77::NifK融合ポリペプチドをコードするpRA25の同時浸透あり、またはなしで実施した（WO2018/141030）。ウエスタンブロットはHA抗体で調べた。

【0259】

【図3】*Nicotiana benthamiana*の葉細胞で発現させた後の個々のMTP-FAγ51::Nif::HAポリペプチド（MTP-FAγ51::HA::NifKは除く）と、MPPによるプロセッシングを受けたその産物の、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット分析。T、全タンパク質；I、不溶性分画；S、可溶性分画。

【0260】

【図4】上方のパネルは、野生型NifD融合ポリペプチドから二次切断産物を生成させるために調べた遺伝子コンストラクトの模式図を示している。MTPはFAγ51またはL29配列であり、NifDは野生型*K. oxytoca*（肺炎桿菌）配列であり、HAはHAエピトープであった。下方のパネルは、遺伝子コンストラクトを*N. benthamiana*の葉細胞に導入した後のタンパク質抽出液のウエスタンブロットを示している。ウエスタンブロットはHA抗体で調べた。レーン1は、Prestained Benchmarkラダーを用いた分子量マーカーを示す。ペアにしたレーンは、NifKコンストラクトpRA25の不在（-）または存在（+）を示す。バンド1＝プロセッシングを受けていないMTP::NifD融合ポリペプチド、バンド2＝MPPによるプロセッシングを受けた融合ポリペプチド、バンド3は約48 kDaの分解産物である。

10

20

30

40

50

【0261】

【図5】MTP:NifD遺伝子コンストラクトを*N. benthamiana*の葉細胞に導入した後のタンパク質抽出液のウエスタンブロット。レーン1は、ThermoFisher Prestained Benchmarkラダーを用いた分子量マーカーをkDaで示す。それぞれのサンプルで使用した遺伝子コンストラクトが各レーンの上方に示されている。pRA24はMTP-FA γ ::NifD::HAポリペプチドをコードしており、その中のNifDコード領域はArabidopsis に関してコドンが最適化されていた(WO2018/141030)。それぞれのコンストラクトを植物細胞にpRA25 (MTP-FA γ 77::NifK) とともに導入してNifD融合ポリペプチドの蓄積を増大させた。ウエスタンブロットはHA抗体で調べた。矢印は、NifDからの約48 kDaの二次切断産物の位置を示す。矢印は、NifDからの約48 kDaの二次切断ポリペプチドの位置を示す。

10

【0262】

【図6】MTP:NifD遺伝子コンストラクトを*N. benthamiana*の葉細胞に導入した後のタンパク質抽出液のウエスタンブロット。レーン1は、ThermoFisher Prestained Benchmarkラダーを用いた分子量マーカーをkDaで示す。それぞれのサンプルで使用した遺伝子コンストラクトが各レーンの上方に示されている。SN64は、mMTP-CPN60::NifDポリペプチドをコードしており、その中のmMTP-CPN60のアミノ酸配列はアラニンによるアミノ酸の置換で変化していたため、MPPによる切断に対して抵抗性であった。pRA24はMTP-FA γ ::NifD::HAポリペプチドをコードしており、その中のNifDコード領域はArabidopsis に関してコドンが最適化されていた(WO2018/141030)。ウエスタンブロットはHA抗体で調べた。

20

【0263】

【図7】SN66の中の変異mMTP-FA γ 51アミノ酸配列(配列番号59)とSN10(配列番号122)の中の改変されていないMTP-FA γ 51配列(配列番号21)のアラインメント。連続した5個のアミノ酸残基の領域と連続した8個のアミノ酸残基の領域がアラニンで置換され、MPPプロセッシングが不活性になった。

【0264】

【図8】MTP:Nif遺伝子コンストラクトを植物細胞または酵母細胞に導入した後のタンパク質抽出液をHA抗体で調べたウエスタンブロットであり、酵母細胞におけるNifD二次切断/分解と、Y100Qアミノ酸置換での切断の減少を実証している(SN114、SNY114)。 *N. benthamiana*の葉細胞(SN10、SN196、SN114)または酵母(SNY10、SNY196、SNY114)からのタンパク質抽出液を示されているレーンで電気泳動した。レーン1と8は、ThermoFisher Prestained Benchmarkラダーを用いた分子量マーカーをkDaで示す。約64 kDaの位置のバンドはプロセッシングを受けていないMTP::NifD::HA融合ポリペプチドを表わし、約58 kDaの位置のバンドはMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドを表わす。矢印は、二次切断によって生成した約48 kDaのC末端ポリペプチドを示す。

30

【0265】

【図9】MTP::NifD::HAアミノ酸置換バリエーションをコードする遺伝子コンストラクトを、それぞれSN46 (MTP-Su9::NifK) とともに導入した後の*N. benthamiana*の葉細胞からのタンパク質抽出液のウエスタンブロット。レーン12は、ThermoFisher Prestained Benchmarkラダーを用いた分子量マーカーをkDaで示す。レーン5~11の約58 kDaに位置する最も強いバンドは、MPPによるプロセッシングを受けたMTP-FA γ 51::NifDであった。レーン2と3は、二次切断によって生成した48 kDaのポリペプチドを示す。レーン5~11には48 kDaのポリペプチドが不在であることに注意されたい。

40

【0266】

【図10】野生型NifDポリペプチドで*K. oxytoca* NifD(配列番号18)のアミノ酸49~108に対応する領域のアミノ酸配列アラインメント。1つの代表的な配列を、配列類似性ネットワーク内の少なくとも10個のメンバーを含有する各クラスターから選択した。NifD配列の各クラスター内のメンバーの数は括弧内に示されている。完全に保存されたアミノ酸はアラインメントの上方に示されている。

50

【0267】

【図11】 *K. oxytoca*からのNifDポリペプチドの結晶構造（PDB:1QGU）に示されている提案された二次切断部位の位置。補因子FeMocoは右側に複数の球として示されている。NifK-Ser515、NifK-Asp517、C末端、および左上への構造は、NifKポリペプチドからのものである。Arg97、Arg98、Asn99、Tyr100、Tyr101、Thr102、および右下への構造は、FeMocoを除きNifDからのものである。点線は、Tyr100とSer515、Asp517とArg98のヒドロキシルの間で可能な水素結合を示す。

【0268】

【図12】 6種類の異なる細菌からのNifD融合ポリペプチドのミトコンドリアプロセッシングを示すウエスタンブロット分析。3つのコンストラクトを、隣り合ったレーンで、それぞれのNifD配列について分析した：標準的MPP切断部位でMPPによって切断されなかったmMTP-FAγ51::NifD::HA融合ポリペプチド（Aで示したレーン）、ミトコンドリアを標的としたMTP-FAγ51::NifD::HA（Mで示したレーン）、および細胞質に位置することが予想され、サイズがMPPによるプロセッシングを受けたサイズに対応する6×His::NifD::HA（Cで示したレーン）。

10

【0269】

【図13】 NifD::リンカー(HA)::NifK融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトの模式的マップ（実際の縮尺では描かれていない）。mMTP-FAγは、MPPによる切断を阻止するアラニン置換を持つ変異MTPを意味する。Y100Qは、NifD配列の中にこのアミノ酸置換が存在することを意味する。

20

【0270】

【図14】 *N. benthamiana*の中で発現させた後のNifD-リンカー(HA)-NifKポリペプチドの可溶性。実施例1に記載されているように、浸透された葉サンプルからのタンパク質を「全」タンパク質として単離するか、不溶性分画および可溶性分画に分画した。示されているタンパク質ラダーマーカーは、ThermoFisher Prestained Benchmarkラダーを「全」サンプルと「不溶性」サンプルに関するブロットで使用し、Invitrogen PageRule rラダーを「可溶性」サンプルに関するブロットで使用した。

【0271】

【図15】 SN197上の1つの遺伝子によってコードされるメタキシン融合ポリペプチドと、このポリペプチドの大半がN末端から細胞質の中に入った状態でミトコンドリアの外膜上に位置している模式図。このコンストラクトでは *N. benthamiana* メタキシン配列を使用した。

30

【0272】

【図16】 SN166からのミトコンドリア標的型MTP-FAγ51::NifU::TSを精製すると、プロセッシングを受けた形態のNifUポリペプチドが精製されたことを示すウエスタンブロット。上方のパネル：抗Strep抗体で調べた。下方のパネル：クーマシーブルーで染色したゲル。

【0273】

【図17】 ミトコンドリア標的型scar9::GG::NifU::TSを精製するとscar9::GG::NifS::HAが同時に精製されたことを示すウエスタンブロット。第1の精製実験の精製プロセスにおける工程(i)～(v)からのサンプルに対し、SDS-PAGEと、NifUポリペプチドを検出するための抗Strep抗体、またはNifSポリペプチドを検出するための抗HA抗体を用いたウエスタンブロットティングを実施した。NifSに関する2つのバンドは、プロセッシングを受けていない形態と受けた形態に対応する。溶離液の中のプロセッシングを受けたNifS形態の存在は、同時精製が起こったことを示していた。

40

【0274】

【図18】 第3の精製実験において *N. benthamiana* から精製したNifUのウエスタンブロットであり、NifSがNifUと同時に精製されることを示している。パネルA) *N. benthamiana* に浸透させたコンストラクトの模式図（実際の縮尺では描かれていない）。B) 精製物のウエスタンブロット分析。P=ペレット、S=上清、FT=フロースルー、E=溶離液。全

50

サンプルをデュープリケートでロードし、strep抗体 (α -strep) またはHA抗体 (α -HA) を用いて免疫検出した。C) 溶離液のクーマシー染色であり、NifUに関する主要なバンドとNifSに関する弱いバンドを示している。

【0275】

【図19】ミトコンドリア標的型MTP-FA γ 51::NifS::TSを精製すると、scar9::GG::NifU::HAの同時精製が起こったことを示すウエスタンブロット。工程(ii)～(v)からのサンプルに対し、SDS-PAGEと、NifSポリペプチドを検出するための抗Strep抗体、またはNifUポリペプチドを検出するための抗HA抗体を用いたウエスタンブロットティングを実施した。NifSに関する2つのバンドは、プロセッシングを受けていない形態と受けた形態に対応する。溶離液の中のプロセッシングを受けたNifU形態の存在は、同時精製が起こったことを示していた。

10

【0276】

【図20】この研究において*N. benthamiana* P72026 (配列番号221) とP20586 (配列番号222) の翻訳、*K. oxytoca* NifV (配列番号13)、*Lotus japonicus* (ミヤコグサ) FEN1 (配列番号215)、および *Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌) α -イソプロピルマレイン酸シンターゼ (MtLeuA、配列番号223) とともに選択されたNifV/HCS様アミノ酸配列の最初の300個のアミノ酸残基のClustalWアラインメント。他のHCS配列は、*Thermoanaerobacter brockii* (TbHCS; 配列番号206)、*Thermincola potens* (TpHCS; 配列番号207)、*Saccharomyces cerevisiae* (ScHCS; 配列番号208)、*Nodularia spumigena* (NsHCS; 配列番号209)、*Methanosarcina acetivorans* (MaHCS; 配列番号210)、*Chlorobaculum tepidum* (CtHCS; 配列番号211)、および*Methanocaldococcus infernus* (MiHCS1、配列番号212; MiHCS2、配列番号213; MiHCS、配列番号214) からのものである。LeuAの活性部位の中の保存された残基は*によって特定される。位置R81、D82、H291、H293にある4つのアミノ酸残基はZn²⁺を保持しており、2つのアミノ酸残基E224、T260は、本来の位置にあるZn²⁺とでMtLeuAの基質結合ポケットを形成する (Koon他、2004年)。

20

【0277】

【図21】*N. benthamiana*の葉の中で発現させた後のNifV/HCS様融合ポリペプチド (MTP-FA γ 51::HA::NifV/HCS) の全、不溶性、および可溶性分画の、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット分析。T、全タンパク質; I、全タンパク質の不溶性 (ペレット) 分画; S、全タンパク質の可溶性 (上清) 分画。m、ミトコンドリア標的型ポリペプチド; c、細胞質標的型ポリペプチド。

30

【0278】

【図22】*N. benthamiana*の葉の中で発現させた後の細胞質に局在するNifV/HCS様融合ポリペプチド (HA::NifV/HCS) (ミトコンドリアに局在する対応する融合ポリペプチドとの比較基準として使用した) の全、不溶性、および可溶性分画の、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット分析。T、全タンパク質; I、全タンパク質の不溶性 (ペレット) 分画; S、全タンパク質の可溶性 (上清) 分画。c、細胞質標的型ポリペプチド; m、ミトコンドリア標的型ポリペプチド。

【0279】

【図23】ベースラインを差し引いた後のホモクエン酸標的イオンピーク面積 (log₁₀スケール)

40

【0280】

【図24】TwinStrepエピトープを持つポリペプチドを検出するための抗Strep抗体を用いた、*N. benthamiana*の葉の中の一過性葉発現系におけるNifH融合ポリペプチドの可溶性のウエスタンブロット分析。NifH遺伝子コンストラクトのすべてを、*K. oxytoca*からのNifM融合ポリペプチドをコードするSN44とともに浸透させた。タンパク質サンプルは好気条件下で調製した。

【0281】

【図25】安定に形質転換されたタバコの中のSL6によってコードされるNifH融合ポリペ

50

プチドを精製した結果を示すウエスタンブロット。NifH遺伝子は、MTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HA融合ポリペプチドをコードしていた。精製プロセスの諸段階からの5 μ lのサンプルをウエスタンブロットによって分析し、StrepエピトープまたはHAエピトープを認識する抗体で調べた。全、不溶性、および可溶性分画からのサンプルがレーンの上方に示されている。白色の矢頭はプロセッシングを受けていないNifHポリペプチドを示し、黒色の矢頭はプロセッシングを受けた形態を示す。

【0282】

【図26】 *N. benthamiana*の葉の中に遺伝子コンストラクトを一過性に導入した後のAnf融合ポリペプチドの発現とプロセッシングのウエスタンブロット分析。プロットは、3つの隣り合ったレーンのセットを、（左から右に）AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドについて持っていた。それぞれのセットは、調べる融合ポリペプチドMTP-FA γ 51::HA::Anfと、分子量マーカーとしての2つの対照ポリペプチドHA::AnfとmFA γ 51::HA::Anfを含んでいた。L、分子量マーカーのラダー（kDa）。

【0283】

【図27】 AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドの4つすべてを *N. benthamiana*の葉の中で多遺伝子コンストラクトから発現させたときの発現とプロセッシングを示すウエスタンブロット。A。SL26から発現させたミトコンドリア標的型AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドと、SL31から発現させたプロセッシングを受けていないポリペプチドのウエスタンブロット分析（一過性葉アッセイからの全タンパク質抽出液において検出）。B。SL26からのミトコンドリア標的型AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドと、SL31からのプロセッシングを受けていないポリペプチドの発現から得られたタンパク質のウエスタンブロット分析。C。多遺伝子コンストラクトSL26、SL27、およびSL28、単一遺伝子コンストラクトSL29、および4つの単一遺伝子コンストラクトSN161、SN129、SN130、およびSN131の混合物（Mix）からの融合ポリペプチドの発現とプロセッシングを示すウエスタンブロット。AnfKは、存在するときには、上方のプロセッシングを受けていないバンドと、下方のプロセッシングを受けたバンドを示した。

【0284】

【図28】 *N. benthamiana*の葉細胞の中で単一遺伝子ベクターから発現させた個々のAnfポリペプチドが細胞質またはミトコンドリアに局在化しているときの可溶性を示すウエスタンブロット。上方のパネル、AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドの可溶性分画；下方のパネル、AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドの不溶性分画。C、細胞質局在化；M、ミトコンドリア局在化；A、アラニンで置換されたmMTP-FA γ 51。黒色の矢頭は、MPPで切断されたタンパク質の位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドを示す。プロセッシングを受けていないポリペプチドとMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドにおける各Anfの予想分子量については表20を参照されたい。

【0285】

【図29】 AnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドを接合するリンカーを持つ *A. vinelandii* Anfアミノ酸配列に基づく、Fe-ニトロゲナーゼに関するAnfDKHG複合体の相溶性モデル。20ナノ秒のシミュレーションの前の初期配位体。16アミノ酸リンカーを用いたAnfD::リンカー::AnfKポリペプチドの予想構造は、AnfH二量体およびAnfGと複合体を形成した。AnfHの二量体をAnfHHと記す。

【0286】

【図30】 融合されているか別々のAnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドを発現させるための遺伝子コンストラクトを浸透させた *N. benthamiana*の葉からの全タンパク質抽出液のウエスタンブロット分析。プロットはHA抗体で調べた。SN272～SN275からのAnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドの発現を、ベクターSL26とSL28上の別々の遺伝子からの発現と比較した。SN161とSN129は、それぞれ、AnfDとAnfKを個別に発現させるための対照を提供した。

【0287】

10

20

30

40

50

【図3 1】 AnfD 遺伝子とAnfK遺伝子を発現させるための遺伝子コンストラクトを浸透させた*N. benthamiana*の葉からのタンパク質の(A)可溶性分画と(B)不溶性分画のウエスタンブロット分析。SN272~SN275は、それぞれ、AnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドをコードしていたのに対し、SL26とSL28は別々のポリペプチドを発現した。

【0288】

【図3 2】 *N. benthamiana*の葉においてSL42から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。抗Strep抗体で調べたパネルBは、プロセッシングを受けたNifBポリペプチドを示す。

10

【0289】

【図3 3】 *N. benthamiana*の葉においてSL43から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。抗Strep抗体で調べたパネルBは、プロセッシングを受けたAnfKポリペプチドを示す。

【0290】

【図3 4】 *N. benthamiana*の葉にまとめて導入されたSL42とSL43から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。パネルA)とB)の側方の数字は、第1のレーンのマーカーの分子量(kDa)を示す。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。

20

【0291】

【図3 5】 *N. benthamiana*の葉においてSL48から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。パネルA)とB)の側方の数字は、第1のレーンのマーカーの分子量(kDa)を示す。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。抗Strep抗体で調べたパネルBは、プロセッシングを受けたNifBポリペプチドを示す。

30

【0292】

【図3 6】 *N. benthamiana*の葉においてSL49から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。抗Strep抗体で調べたパネルBは、プロセッシングを受けたAnfKポリペプチドを示す。

40

【0293】

【図3 7】 *N. benthamiana*の葉にまとめて導入されたSL48とSL49から産生されたポリペプチド(全(T)、不溶性(I)、および可溶性(S)分画を含む)のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HA抗体(パネルA)または抗Strep抗体(パネルB)を用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。

【0294】

【図3 8】 *N. benthamiana*の葉においてSN292、SN291、SN299、およびSN300から

50

産生されたポリペプチド（全、パネルA）、不溶性、パネルB）、および可溶性、パネルC）分画を含む）のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HAを用いた。側方の数字は、第1のレーンのマーカーの分子量（kDa）を示す。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示し、*は、FdxNタンパク質の潜在的な二量体を示す。

【0295】

【図39】 *N. benthamiana*の葉に個別に導入されたSN192、SL50、およびSL54と、まとめて導入されたSL50とSL54から産生されたポリペプチド（全（パネルA）、不溶性（パネルB）、および可溶性（パネルC）分画を含む）のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HAを用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。

10

【0296】

【図40】 *N. benthamiana*の葉においてSL50から産生されたポリペプチド（全、パネルA）、不溶性、パネルB）、および可溶性、パネルC）分画を含む）のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HAを用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。

20

【0297】

【図41】 *N. benthamiana*の葉においてSL50とSL49から産生されたポリペプチド（全、パネルA）、不溶性、パネルB）、および可溶性、パネルC）分画を含む）のウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HAを用いた。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けいないポリペプチドのバンドを示す。

【0298】

【図42】 *N. benthamiana*の葉において別々に、または組み合わせたSL47とSL55から産生されたポリペプチドのウエスタンブロット分析であり、検出のため抗HAを用いた。第1のレーンは分子量（kDa）マーカーを示す。黒色の矢頭は、ミトコンドリアにおいてMPPによって切断された後のプロセッシングを受けたポリペプチドバンドの位置を示し、白色の矢頭は、プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドを示す。

30

【0299】

配列リストの鍵

【0300】

配列番号1： *K. oxyyoca*のNifHポリペプチドのアミノ酸配列、293個のアミノ酸。

【0301】

配列番号2：アクセッション番号X13303.1による、*K. oxyyoca*からの野生型NifDポリペプチドのアミノ酸配列、483個のアミノ酸（Temme配列は配列番号18である）。

【0302】

配列番号3：Temmeら（2012年）によると、*K. oxyyoca*からのNifKポリペプチドのアミノ酸配列；520個のアミノ酸。

40

【0303】

配列番号4： *K. oxyyoca*からのNifBポリペプチドのアミノ酸配列；468個のアミノ酸。

【0304】

配列番号5： *K. oxyyoca*からのNifEポリペプチドのアミノ酸配列；457個のアミノ酸。

【0305】

配列番号6： *K. oxyyoca*からのNifFポリペプチドのアミノ酸配列；176個のアミノ酸；NCBIアクセッション番号X03214。

【0306】

配列番号7： *K. oxyyoca*からのNifJポリペプチドのアミノ酸配列；1171個のアミノ酸

50

；NCBIアクセッション番号43862；Cannon他、1988年 Nucleic Acids Res. 第16巻：11379ページ）。

【0307】

配列番号8：K. oxyyocaからのNifMポリペプチドのアミノ酸配列；266個のアミノ酸；NCBIアクセッション番号X05887；PaulとMerrick（1987年）。

【0308】

配列番号9：K. oxyyocaからのNifNポリペプチドのアミノ酸配列、NCBIアクセッション番号P08738；461個のアミノ酸；（Arnold他、1988年）。この配列はK. michiganensis配列アクセッション番号WP_064371582と同じであり、K. oxytoca NifN、アクセッション番号WP_061153953として注釈が付けられた配列と85%一致する。

10

【0309】

配列番号10：KlebsiellaからのNifQポリペプチドのアミノ酸配列。NCBIアクセッション番号WP_004138772。この配列は、NifQ、アクセッション番号AAA25108.1として注釈が付けられた別のK. oxytoca配列と95%一致する。

【0310】

配列番号11：K. oxyyocaからのNifSポリペプチドのアミノ酸配列；400個のアミノ酸。

【0311】

配列番号12：K. oxyyocaからのNifUポリペプチドのアミノ酸配列；274個のアミノ酸。NCBIアクセッション番号P05343.2（Arnold他、1988年）。この配列はアクセッション番号WP_004138782と同じであり、別のK. oxytoca配列、アクセッション番号AA A25155と272/273が同じでもある。

20

【0312】

配列番号13：K. oxyyocaからのNifVポリペプチドのアミノ酸配列；381個のアミノ酸。NCBIアクセッション番号CAA31119.1（Arnold他、1988年）。

【0313】

配列番号14：K. oxyyocaからのNifXポリペプチドのアミノ酸配列；156個のアミノ酸（アクセッション番号P09136）。

【0314】

配列番号15：K. oxyyocaからのNifYポリペプチドのアミノ酸配列；220個のアミノ酸。NCBIアクセッション番号CAA31670（Arnold他、1988年）

30

【0315】

配列番号16：K. oxyyocaからのNifZポリペプチドのアミノ酸配列；148個のアミノ酸。NCBIアクセッション番号P0A3U2（Arnold他、1988年）

【0316】

配列番号17：K. oxyyocaからのNifWポリペプチドのアミノ酸配列。

【0317】

配列番号18：Temmeら（2012年）によると野生型K. oxyyoca NifDのアミノ酸配列。

【0318】

配列番号19：Temmeら（2012年）によると野生型K. oxyyoca NifSのアミノ酸配列。

【0319】

配列番号20：MTP-FA γ 77（アミノ酸1～77）とアミノ酸トリプレットGAP（78～80）を含むN末端伸長部のアミノ酸配列。MPPによる切断はアミノ酸残基42と43の間で起こる。

40

【0320】

配列番号21：追加のN末端MetとC末端GGを有するMTP-FA γ 51ポリペプチドのアミノ酸配列。MPPによる切断はアミノ酸残基43と44の間で起こる。

【0321】

配列番号22：FA γ -scar9ポリペプチドのアミノ酸配列。

【0322】

配列番号23：pRA10によってコードされるMTP-FA γ 77::NifH::HA融合ポリペプチド

50

のアミノ酸配列。アミノ酸1～77はMTP-FA γ 77に対応し、アミノ酸78～80はGAPであり、アミノ酸81～372はK. oxyyoca NifHアミノ酸（開始Metのない配列番号1）に対応し、アミノ酸373～389はHAエピトープを含む。

【0323】

配列番号24：pRA34によってコードされるMTP-FA γ 51::NifH::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～51はMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸52～54はGAPであり、アミノ酸55～346はK. oxyyoca NifHアミノ酸（開始Metのない配列番号1）に対応し、アミノ酸347～363はHAエピトープを含む。

【0324】

配列番号25：SN18によってコードされるMTP-FA γ 51::NifH::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～347はK. oxyyoca NifHアミノ酸（配列番号1）に対応し、アミノ酸348～358はHAエピトープを含む。

10

【0325】

配列番号26：SN29によってコードされるMTP-FA γ 51::NifH::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸54～64はHAエピトープを含み、アミノ酸65～357はK. oxyyoca NifHアミノ酸（配列番号1）に対応し、アミノ酸358～371はC末端伸長部であった。

【0326】

配列番号27：MTP配列の代わりに用いられる6×Hisであり、N末端MetとC末端GGを持つ。

20

【0327】

配列番号28：CPN60 MTPのアミノ酸配列。

【0328】

配列番号29：CPN60/GGリンカーなしMTPのアミノ酸配列。

【0329】

配列番号30：スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）MTPのアミノ酸配列。

【0330】

配列番号31：二重スーパーオキシドディスムターゼ（2SOD）MTPのアミノ酸配列。

【0331】

配列番号32：改変されたスーパーオキシドディスムターゼ（SODmod）MTPのアミノ酸配列。

30

【0332】

配列番号33：改変された二重スーパーオキシドディスムターゼ（2SODmod）MTPのアミノ酸配列。

【0333】

配列番号34：L29 MTP（At1G07830）のアミノ酸配列。

【0334】

配列番号35：Neurospora crassa F0 ATPアーゼサブユニット9（SU9）MTPのアミノ酸配列。

40

【0335】

配列番号36：追加N末端Met のないgATPアーゼガンマサブユニット（FA γ 51）MTPのアミノ酸配列（配列番号21は追加N末端Metを持つ）。MPPによる切断はアミノ酸残基42と43の間で起こる。

【0336】

配列番号37：CoxIV twin strep（ABM97483）MTPのアミノ酸配列。

【0337】

配列番号38：CoxIV 10×His（ABM97483）MTPのアミノ酸配列。

【0338】

配列番号39：GGを持つスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）MTPと、GGを持つ二

50

重スーパーオキシドディスムターゼ (2SOD) MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0339】

配列番号40：GGを持つL29 MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0340】

配列番号41：GGを持つ*Neurospora crassa* F0 ATPアーゼサブユニット9 (SU9) MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0341】

配列番号42：GGを持つgATPアーゼガンマサブユニット (FA γ 51) MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0342】

配列番号43：GGを持つCoxIV twin strep MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0343】

配列番号44：GGを持つCoxIV 10×His MTPで予想される癒痕部のアミノ酸配列。

【0344】

配列番号45：オリゴヌクレオチドプライマーMIT_V2.1_SbflnifH_FW2。

【0345】

配列番号46：オリゴヌクレオチドプライマーMIT_V2.1_SbflnifJ_RV2。

【0346】

配列番号47：オリゴヌクレオチドプライマーMIT_V2.1_SbflnifB_FW。

【0347】

配列番号48：オリゴヌクレオチドプライマーMIT_V2.1_Sbflori_RV。

【0348】

配列番号49：N末端Ile残基が翻訳開始のためのMetで置換されたMTP-FA γ 51からのm scar9のアミノ酸配列。

【0349】

配列番号50：トリプシンペプチド。

【0350】

配列番号51：N末端MetがなくC末端Metを持つMTP-FA γ 9癒痕部のアミノ酸配列。

【0351】

配列番号52～54：オリゴヌクレオチドプライマー。

【0352】

配列番号55：トリプシンペプチド。

【0353】

配列番号56：トリプシンペプチド。

【0354】

配列番号57：C末端伸長部を欠くMTP-FA γ 77::NifK融合ポリペプチド (pRA25) のアミノ酸配列。アミノ酸1～77はMTP-FA γ 77に対応し、アミノ酸78～80はGAPであり、アミノ酸81～599は開始MetのないK. oxyyoca NifKに対応する。

【0355】

配列番号58：K. oxyyocaからのNifKポリペプチドのC末端にある最後の4個のアミノ酸残基のアミノ酸配列。

【0356】

配列番号59：MPPによって切断されない変異MTP-FA γ 51ポリペプチドのアミノ酸配列。

【0357】

配列番号60～107：ペプチド配列。

【0358】

配列番号108～113：オリゴヌクレオチドプライマー。

【0359】

配列番号114：Hypocrea jecorinaセロビオヒドラーゼII (アクセッション番号AAG3

10

20

30

40

50

9980.1) からのリンカー領域からの11残基区画のアミノ酸配列。

【0360】

配列番号115：9残基HAエピトープのアミノ酸配列。

【0361】

配列番号116：NifD::リンカー::NifK融合ポリペプチドのためのリンカーのアミノ酸配列。このリンカーは長さが30残基であり、最終アルギニンがアラニンで置換された配列番号114とその後の9残基HAエピトープ（配列番号115）を持ち、その後にアルギニンがアラニンで置換された配列番号114の別のコピーが続く。

【0362】

配列番号117：オリゴヌクレオチドプライマー。

【0363】

配列番号118：オリゴヌクレオチドプライマー。

【0364】

配列番号119：瘢痕ペプチド配列。

【0365】

配列番号120：瘢痕ペプチド配列。

【0366】

配列番号121：コンストラクトSN197によってコードされるメタキシシン融合ポリペプチドのアミノ酸配列。TwinStrepエピトープはアミノ酸1～31に対応し、mTurquoiseはアミノ酸32～273に、TEV切断部位はアミノ酸274～282に、メタキシシン配列はアミノ酸283～603に対応する。

【0367】

配列番号122：SN10によってコードされるMTP-FA γ 51::NifD::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～536は開始Metを持つK. oxyyoca NifD（配列番号18）に対応し、アミノ酸537～547はHAエピトープを含む。

【0368】

配列番号123：SN30によってコードされるMTP-FA γ 51::NifM::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～320は開始Metを持つK. oxyyoca NifM（配列番号8）に対応し、アミノ酸321～331はHAエピトープを含む。

【0369】

配列番号124：SN31によってコードされるMTP-FA γ 51::NifS::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～454は、Temmeら（2012年）によれば開始Metを持つK. oxyyoca NifS（配列番号19）に対応し、アミノ酸455～465はHAエピトープを含む。

【0370】

配列番号125：SN32によってコードされるMTP-FA γ 51::NifU::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～328は開始Metを持つK. oxyyoca NifU（配列番号12）に対応し、アミノ酸329～339はHAエピトープを含む。

【0371】

配列番号126：SN38によってコードされるMTP-FA γ 51::NifE::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～511は、Temmeら（2012年）によれば開始Metを持つK. oxyyoca NifEに対応し、アミノ酸512～522はHAエピトープを含む。

【0372】

配列番号127：SN39によってコードされるMTP-FA γ 51::NifN::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～515は開始Metを持つK. oxyyoca NifN（配列番号9）に対応し、アミノ酸516～526

10

20

30

40

50

はHAエピトープを含む。

【0373】

配列番号128：SN42によってコードされるMTP-CoxIV-Twin-Strep::NifH::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～61はC末端にGGを持つMTP-CoxIV-Twin-Strepに対応し、アミノ酸62～354は開始Metを持つK. oxyyoca NifH（配列番号1）に対応し、アミノ酸355～365はHAエピトープを含む。

【0374】

配列番号129：SN46によってコードされるMTP-Su9::NifK融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～70はC末端にGGを持つMTP-Su9に対応し、アミノ酸71～590は開始Metを持つK. oxyyoca NifK（配列番号3）に対応する。

10

【0375】

配列番号130：SN51によってコードされるMTP-L29::NifV::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～34はC末端にGGを持つMTP-L29に対応し、アミノ酸35～415は開始Metを持つK. oxyyoca NifV（配列番号13）に対応し、アミノ酸416～426はHAエピトープを含む。

【0376】

配列番号131：SN68によってコードされるMTP-FA γ 51::NifD::リンカー(HA)::NifK融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～536は野生型K. oxyyoca NifDアミノ酸（N末端Metなしの配列番号18）に対応し、アミノ酸537～566はHAエピトープを含むリンカーに対応し、アミノ酸567～1085はN末端Metなしで野生型C末端を持つNifK（配列番号3）に対応する。

20

【0377】

配列番号132：SN75によってコードされるMTP-FA γ 51::HA::NifD::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸54～64は第1のHAエピトープに対応し、アミノ酸65～546は野生型K. oxyyoca NifDアミノ酸（配列番号18）に対応し、アミノ酸547～557はHAエピトープを含む。

【0378】

配列番号133：SN99によってコードされるMTP-FA γ 51::NifD::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～536は、アミノ酸148～152にアラニン置換変異を含むK. oxyyoca NifDに対応し、アミノ酸537～547はHAエピトープを含む。

30

【0379】

配列番号134：SN100によってコードされるMTP-FA γ 51::NifD::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～536は、アミノ酸153～157にアラニン置換変異を含むK. oxyyoca NifDアミノ酸に対応し、アミノ酸537～547はHAエピトープを含む。

【0380】

配列番号135：SN104によってコードされるMTP-Su9::NifW融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～70はC末端にGGを持つMTP-Su9に対応し、アミノ酸71～158は開始Metを持つK. oxyyoca NifW（配列番号17）に対応し、アミノ酸159～167はHAエピトープを含む。

40

【0381】

配列番号136：SN114によってコードされるMTP-FA γ 51::NifD::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～536は、アミノ酸154にY100Q置換変異を含むK. oxyyoca NifDに対応し、アミノ酸537～547はHAエピトープを含む。

【0382】

配列番号137：SN138によってコードされるMTP-FA γ 51::NifF::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FA γ 51に対応し、アミノ酸55～230はK. oxyyoca NifF（配列番号6）に対応し、アミノ酸231～241はHAエピトープ

50

プを含む。

【0383】

配列番号138：SN139によってコードされるMTP-FAγ51::NifJ::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～1225はK. oxyyoca NifJ（配列番号7）に対応し、アミノ酸1226～1236はHAエピトープを含む。

【0384】

配列番号139：SN140によってコードされるMTP-FAγ51::HA::NifK融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸54～64はHAエピトープを含み、アミノ酸65～584は野生型C末端を持つK. oxyyoca NifK（配列番号3）に対応する。

10

【0385】

配列番号140：SN141によってコードされるMTP-FAγ51::NifQ::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～221はK. oxyyoca NifQ（配列番号10）に対応し、アミノ酸222～232はHAエピトープを含む。

【0386】

配列番号141：SN142によってコードされるMTP-FAγ51::NifV::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～435はK. oxyyoca NifV（配列番号13）に対応し、アミノ酸436～446はHAエピトープを含む。

20

【0387】

配列番号142：SN143によってコードされるMTP-FAγ51::NifW::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～140はK. oxyyoca NifW（配列番号17）に対応し、アミノ酸141～151はHAエピトープを含む。

【0388】

配列番号143：SN144によってコードされるMTP-FAγ51::NifX::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～210はK. oxyyoca NifX（配列番号14）に対応し、アミノ酸211～221はHAエピトープを含む。

30

【0389】

配列番号144：SN145によってコードされるMTP-FAγ51::NifY::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～274はTemmeら（2012年）によればK. oxyyoca NifYに対応し、アミノ酸275～285はHAエピトープを含む。

【0390】

配列番号145：SN146によってコードされるMTP-FAγ51::NifZ::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～202はK. oxyyoca NifZ（配列番号16）に対応し、アミノ酸203～213はHAエピトープを含む。

40

【0391】

配列番号146：SN159によってコードされるMTP-FAγ51::NifD(Y100Q)::リンカー(HA)::NifK融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～536はY100Q置換を持つK. oxyyoca NifDに対応し、アミノ酸537～566はHAエピトープを含むリンカーに対応し、アミノ酸567～1085は、N末端Metがなくて野生型C末端を持つNifK（配列番号3）に対応する。

【0392】

配列番号147：SN192によってコードされるMTP-FAγ51::NifB::HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はGGを持つMTP-FAγ51に対応し、アミノ酸55～52

50

2はTemmeら（2012年）によれば*K. oxyyoca* NifBに対応し、アミノ酸523～533はHAエピトープを含む。

【0393】

配列番号148：野生型*Azospirillum brasilense* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、UniProt A0A060DN91；479個のアミノ酸。

【0394】

配列番号149：野生型*Azotobacter vinelandii* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、UniProt C1DGZ7；492個のアミノ酸。

【0395】

配列番号150：野生型*Sinorhizobium fredii* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、504個のアミノ酸。

【0396】

配列番号151：野生型*Chlorobium tepidum* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、UniProt Q8KC89；543個のアミノ酸。

【0397】

配列番号152：野生型*Desulfovibrio vulgaris* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、UniProt B8DR77；544個のアミノ酸。

【0398】

配列番号153：野生型*Desulfotomaculum ferrireducens* NifDポリペプチドのアミノ酸配列、539個のアミノ酸。

【0399】

配列番号154：ペプチド配列（ただしXはTyr以外の任意のアミノ酸である）。

【0400】

配列番号155：NifMからのトリプシンペプチド。

【0401】

配列番号156：NifMからのトリプシンペプチド。

【0402】

配列番号157：CATからのトリプシンペプチド。

【0403】

配列番号158：CATからのトリプシンペプチド。

【0404】

配列番号159：CATからのトリプシンペプチド。

【0405】

配列番号160：SN166によってコードされるMTP-FA γ 51::NifU::TwinStrep融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54は追加の翻訳開始メチオニンとC末端GGを持つMTP-FA γ 51配列であり、アミノ酸55～328はNifU配列であり、アミノ酸329～358はTwinstrepモチーフを含む配列である。

【0406】

配列番号161：SN231によってコードされるMTP-FA γ 51::NifS::TwinStrep融合ポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54は追加の翻訳開始メチオニンとC末端GGを持つMTP-FA γ 51配列であり、アミノ酸55～454はNifS配列であり、アミノ酸455～484はTwinstrepモチーフを含む配列である。

【0407】

配列番号162：scar9からのトリプシンペプチド配列

【0408】

配列番号163：*A. vinelandii* からのNifVポリペプチドのアミノ酸配列（AvNifV；アクセッション番号WP_012698855）。

【0409】

配列番号164：KoNifVバリエント配列のアミノ酸配列（アクセッション番号WP_004138778）。

10

20

30

40

50

【0410】

配列番号165：N末端ScHCS伸長部（瘢痕配列）。

【0411】

配列番号166：N末端AvNifV伸長部（瘢痕配列）。

【0412】

配列番号167：SN43によってコードされるMTP-FAγ51::HA::KoNifMポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGを含むMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGを含むHAエピトープに対応し、アミノ酸65～330は*K. oxyoca*からのNifM配列に対応する。

【0413】

配列番号168：SN178によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～354は*Azospirillum brasilense*からのNifH配列（アクセッション番号WP_014239786）に対応する。

【0414】

配列番号169：SN179によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～356は*Mastigocladus laminosus*からのNifH配列（アクセッション番号WP_016865872）に対応する。

【0415】

配列番号170：SN180によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～348は*Frankia casurinae*からのNifH配列（アクセッション番号WP_0011438842）に対応する。

【0416】

配列番号171：SN181によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～354は*Marichromatium gracile*生物型*thermosulfidophilum*からのNifH配列（アクセッション番号WP_062275270）に対応する。

【0417】

配列番号172：SN182によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～345は*Methanocaldococcus infernus*からのNifH配列（アクセッション番号WP_013099459）に対応する。

【0418】

配列番号173：SN183によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～345は*Hellobacterium modesticaldum*からのNifH配列（アクセッション番号WP_012282218）に対応する。

【0419】

配列番号174：SN184によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～335は*Chlorobium tepidum*からのNifH配列（アクセッション番号WP_010933198）に対応する。

【0420】

配列番号175：SN185によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～350は*Geobacter* sp. M21からのNifH配列（アクセッション番号WP_015837436）に対応する。

10

20

30

40

50

【0421】

配列番号176：SN186によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～355はBradyrhizobium diazoefficiensからのNifH配列（アクセッション番号AHY57040）に対応する。

【0422】

配列番号177：SN187によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～336はMethanobacterium thermoaerophilumからのNifH配列（アクセッション番号AAB86034）に対応する。

10

【0423】

配列番号178：SN188によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～334はMethanosarcinaからのNifH配列（アクセッション番号WP_048121466）に対応する。

【0424】

配列番号179：SN189によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～336はDesulfotomaculum acetoxidansからのNifH配列（アクセッション番号WP_015756624）に対応する。

20

【0425】

配列番号180：SN190によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～336はCarboxydothermus fermentansからのNifH配列（アクセッション番号WP_075859892）に対応する。

【0426】

配列番号181：SN191によってコードされるMTP-CoxIV::TwinStrep::NifHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～31はMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸32～61はC末端にGGを含むTwinStrep配列に対応し、アミノ酸62～335はNostoc calcicolaからのNifH配列（アクセッション番号WP_073644321）に対応する。

30

【0427】

配列番号182：SN81によってコードされるMTP-FAγ51::AnfD::HAポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGリンカーを含むMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸55～572はA. vinelandiiからのAnfD配列に対応し、アミノ酸573～583はHAエピトープに対応する。

【0428】

配列番号183：SN82によってコードされるHA::AnfDポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～12はC末端にGGリンカーを含むHAエピトープに対応し、アミノ酸13～530はA. vinelandiiからのAnfD配列に対応する。

【0429】

配列番号184：SN129によってコードされるMTP-FAγ51::HA::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含むMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はHAエピトープに対応し、アミノ酸65～526はA. vinelandiiからのAnfK配列に対応する。

40

【0430】

配列番号185：SN130によってコードされるMTP-FAγ51::HA::AnfHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含むMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～339はA. vinelandiiからのAnfH配列に対応する。

【0431】

50

配列番号186：SN131によってコードされるMTP-FA γ 51::HA::AnfGポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含むMTP-FA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～196はA. vinelandiiからのAnfG配列に対応する。

【0432】

配列番号187：SN152によってコードされるHA::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～12はC末端にGGリンカーを含むHAエピトープに対応し、アミノ酸13～474はA. vinelandiiからのAnfK配列に対応する。

【0433】

配列番号188：SN153によってコードされるHA::AnfHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～12はC末端にGGリンカーを含むHAエピトープに対応し、アミノ酸13～287はA. vinelandiiからのAnfH配列に対応する。

10

【0434】

配列番号189：SN154によってコードされるHA::AnfGポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～12はC末端にGGリンカーを含むHAエピトープに対応し、アミノ酸13～144はA. vinelandiiからのAnfG配列に対応する。

【0435】

配列番号190：SN155によってコードされるmFA γ 51::HA::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含む変異mFA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～526はA. vinelandiiからのAnfK配列に対応する。

20

【0436】

配列番号191：SN156によってコードされるmFA γ 51::HA::AnfHポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含む変異mFA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～339はA. vinelandiiからのAnfH配列に対応する。

【0437】

配列番号192：SN157によってコードされるmFA γ 51::HA::AnfGポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含む変異mFA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～196はA. vinelandiiからのAnfG配列に対応する。

30

【0438】

配列番号193：SN158によってコードされるmFA γ 51::HA::AnfDポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含む変異mFA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～582はA. vinelandiiからのAnfD配列に対応する。

【0439】

配列番号194：SN161によってコードされるMTP-FA γ 51::HA::AnfDポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～53はC末端にGGリンカーを含むMTP-FA γ 51配列に対応し、アミノ酸54～64はC末端にGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～582はA. vinelandiiからのAnfD配列に対応する。

40

【0440】

配列番号195：SN177によってコードされるMTP-FA γ 51::AnfD::Twin Strepポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～54はC末端にGGリンカーを含むcMTP-FA γ 51配列に対応し、アミノ酸55～572はA. vinelandiiからのAnfD配列に対応し、アミノ酸573～604はTwin Strepエピトープに対応する。

【0441】

配列番号196：SN195によってコードされるMTP-CoxIV::Twin Strep::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～41はC末端にGGリンカーを含むMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸42～61はC末端にGGリンカーを含むTwinStrepエピトープに対応し、ア

50

ミノ酸62～523は*A. vinelandii*からのAnfK配列に対応する。

【0442】

配列番号197：ペプチド配列。

【0443】

配列番号198：リンカー配列。

【0444】

配列番号199：構造のモデル化に用いるAnfD::リンカー16::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列（実施例20）。アミノ酸1～509は、N末端メチオニンが省略されたAnfD配列（*A. vinelandii*）に対応し、アミノ酸510～525は16アミノ酸リンカーに対応し、アミノ酸526～984はAnfK（*A. vinelandii*）に対応する。

【0445】

配列番号200：リンカー配列。

【0446】

配列番号201：AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～517はAnfD配列に対応し、アミノ酸518～543は26アミノ酸リンカーに対応し、アミノ酸544～1004はAnfKに対応する。

【0447】

配列番号202：SN272によってコードされるMTP-FA γ 51::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～64はC末端にGGリンカーを含むMTP-FA γ 51-HA配列に対応し、アミノ酸65～581はAnfD配列（*A. vinelandii*）に対応し、アミノ酸582～607は26アミノ酸リンカー（リンカー26(HA)）に対応し、アミノ酸608～1068はAnfK（*A. vinelandii*）に対応する。

【0448】

配列番号203：SN273によってコードされるMTP-CoxIV::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～61はC末端にGGリンカーを含むMTP-CoxIV配列に対応し、アミノ酸62～578はAnfD配列（*A. vinelandii*）に対応し、アミノ酸579～604は26アミノ酸リンカー（リンカー26(HA)）に対応し、アミノ酸605～1065はAnfK（*A. vinelandii*）に対応する。

【0449】

配列番号204：SN274によってコードされるmFA γ 51::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸1～64は、MPPによる切断を許さないアラニン置換とC末端のGGを含むmFA γ 51配列に対応し、アミノ酸65～581はAnfD配列（*A. vinelandii*）に対応し、アミノ酸582～607は26アミノ酸リンカー（リンカー26(HA)）に対応し、アミノ酸608～1068はAnfK（*A. vinelandii*）に対応する。

【0450】

配列番号205：SN275によってコードされるHIS $\times$ 6::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチド（MTP配列を持たず、細胞質に位置すると考えられる）のアミノ酸配列。アミノ酸1～9はC末端にGGを含むHIS $\times$ 6配列に対応し、アミノ酸10～526はAnfD配列（*A. vinelandii*）に対応し、アミノ酸527～552は26アミノ酸リンカー（リンカー26(HA)）に対応し、アミノ酸553～1013はAnfK（*A. vinelandii*）に対応する。

【0451】

配列番号206：TbHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号CP002466）。

【0452】

配列番号207：TpHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号CP002028）。

【0453】

配列番号208：ScHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号CP036483）。

【0454】

配列番号209：NsHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号CP007203）。

【0455】

配列番号210：MaHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号AE010299）。

10

20

30

40

50

【0456】

配列番号211：CtHCSポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号AE006470）。

【0457】

配列番号212：MiHCS1ポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号ADG13125）。

【0458】

配列番号213：MiHCS2ポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号ADG13175）。

【0459】

配列番号214：MiHCS3ポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号ADG14004）。

【0460】

配列番号215：LjFEN1ポリペプチドのアミノ配列（アクセッション番号BAI49592）。

【0461】

配列番号216：A. vinelandiiからのAnfDのアミノ酸配列（アクセッション番号WP_012703361）；518個のアミノ酸。

【0462】

配列番号217：A. vinelandiiからのAnfKのアミノ酸配列（アクセッション番号WP_012703359）；462個のアミノ酸。

【0463】

配列番号218：A. vinelandiiからのAnfHのアミノ酸配列（アクセッション番号WP_012703362）；275個のアミノ酸

【0464】

配列番号219：A. vinelandiiからのAnfGのアミノ酸配列（アクセッション番号WP_012703360）；132個のアミノ酸。

【0465】

配列番号220：ペプチド配列。

【0466】

配列番号221：N. benthamiana P72026のアミノ酸配列；606個のアミノ酸。

【0467】

配列番号222：N. benthamiana P20586のアミノ酸配列；470個のアミノ酸。

【0468】

配列番号223：Mycobacterium tuberculosis α -イソプロピルマレイン酸シンターゼ（MtLeuA）のアミノ酸配列；644個のアミノ酸。

【0469】

配列番号224：A. vinelandiiからのNifHポリペプチド（AvNifH；アクセッション番号WP_012698831）のアミノ酸配列；290個のアミノ酸。

【0470】

配列番号225：ペプチド配列、AnfHモチーフI（ただしXは任意のアミノ酸を表わす）。

【0471】

配列番号226：ペプチド配列、AnfHモチーフII。

【0472】

配列番号227：ペプチド配列、AnfHモチーフIII。

【0473】

配列番号228：ペプチド配列、AnfHモチーフIV。

【0474】

配列番号229：ペプチド配列、AnfHモチーフV（ただしXは任意のアミノ酸を表わす）。

【0475】

配列番号230：ペプチド配列、AnfHモチーフVI。

【0476】

10

20

30

40

50

配列番号231：ペプチド配列、AnfHモチーフVII（ただしXは任意のアミノ酸を表わす）。

【0477】

配列番号232：A. vinelandiiのFdxNタンパク質のアミノ酸配列；アクセッション番号WP_012703542；92個のアミノ酸。

【0478】

配列番号233：SN291のMTP-FAγ51-FdxN-HA融合ポリペプチドのアミノ酸配列；157個のアミノ酸。アミノ酸1～54はGGリンカーを持つMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸55～145はN末端メチオニンなしのFdxN配列に対応し、アミノ酸146～157はHAエピトープに対応する。

【0479】

配列番号234：SN292のMTP-FAγ51-HA-FdxN融合ポリペプチドのアミノ酸配列；156個のアミノ酸。アミノ酸1～53はGGリンカーを持つMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～156はN末端メチオニンなしのFdxN配列に対応する。

【0480】

配列番号235：SN299のmFAγ51-HA-FdxN融合ポリペプチドのアミノ酸配列；156個のアミノ酸。アミノ酸1～53はGGリンカーを持つMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～156はN末端メチオニンなしのFdxN配列に対応する。

【0481】

配列番号236：SN300のHA-FdxN融合ポリペプチドのアミノ酸配列；104個のアミノ酸。アミノ酸1～12はGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸13～104はN末端メチオニンなしのFdxN配列に対応する。

【0482】

配列番号237：SN254のMTP-FAγ51-HA-NifV融合ポリペプチドのアミノ酸配列；448個のアミノ酸。アミノ酸1～53はGGリンカーを持つMTP-FAγ51配列に対応し、アミノ酸54～64はGGリンカーを持つHAエピトープに対応し、アミノ酸65～448はA. vinelandiiからのNifV配列に対応する。

【0483】

配列番号238：A. vinelandiiからのNafVポリペプチドのアミノ酸配列（AvNafY；アクセッション番号AGK13761）。

【0484】

配列番号239：NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0485】

配列番号240：NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0486】

配列番号241：NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0487】

配列番号242：NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0488】

配列番号243：NifKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0489】

配列番号244：AnfKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0490】

配列番号245：AnfKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0491】

配列番号246：AnfKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【0492】

配列番号247：AnfKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【0493】

配列番号248：AnfKポリペプチドのC末端アミノ酸配列。

【発明を実施するための形態】

【0494】

一般的な技術と定義

【0495】

特に断わらない限り、本明細書で用いられているあらゆる科学技術用語は、（例えば細胞培養、分子遺伝学、植物分子生物学、タンパク質化学、および生化学の）当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を持つものとする。

【0496】

特に断わらない限り、本発明で用いられている組み換えタンパク質、細胞培養、および免疫学の技術は、当業者に周知の標準的な手続きである。そのような技術はさまざまな出典の中の文献全体を通じて記載され説明されており、その出典の例は、J. Perbal、『A Practical Guide to Molecular Cloning』、John Wiley and Sons社（1984年）、J. Sambrook他、『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbour Laboratory Press（1989年）、T.A. Brown（編者）、『Essential Molecular Biology: A Practical Approach』、第1巻と第2巻、IRL Press社（1991年）、D.M. GloverとB.D. Hames（編者）、『DNA Cloning: A Practical Approach』、第1巻～第4巻、IRL Press社（1995年と1996年）、およびF.M. Ausubel他（編者）、『Current Protocols in Molecular Biology』、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience社（1988年、現在までのあらゆる改訂を含む）、HarlowとDavid Lane（編者）『Antibodies: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbour Laboratory（1988年）、およびJ.E. Coligan他（編者）『Current Protocols in Immunology』、John Wiley & Sons社（現在までのあらゆる改訂を含む）である。

【0497】

「および／または」という表現、例えば「Xおよび／またはY」は、「XとY」または「XまたはY」を意味すると理解され、両方の意味、またはどちらかの意味の明示的な支持を与えると解釈されるものとする。

【0498】

本明細書では、約という用語は、それに反する記載がないのであれば、指定された値の±10%、より好ましくは±5%を意味する。

【0499】

本明細書全体を通じ、「含む（comprise）」またはそのバリエーションである「comprises」または「含んでいる（comprising）」は、記載されている要素、整数、または工程や、一群の要素、整数、または工程を包含すると理解されるが、いかなる他の要素、整数、または工程や、一群の要素、整数、または工程も除外しない。

【0500】

ニトロゲナーゼ

【0501】

ニトロゲナーゼは真正細菌と古細菌の中にある酵素であり、窒素（N₂）の強力な三重結合を還元する触媒となってアンモニア（NH₃）を生成させる。ニトロゲナーゼは自然界では細菌にだけ見いだされる。ニトロゲナーゼは別々に精製することのできる2つの酵素、すなわちジニトロゲナーゼとジニトロゲナーゼレダクターゼの複合体である。ジニトロゲナーゼは成分Iまたはモリブデン-鉄（MoCo）タンパク質とも呼ばれていて、2つのNifDポリペプチドと2つのNifKポリペプチドの四量体（ $\alpha_2\beta_2$ ）であり、2つの「Pクラスター」と2つの「FeMo補因子」（FeMo-co）も含有している。NifD-NifKサブユニットの各ペアは、1つのPクラスターと1つのFeMo-coを含有している。FeMo-coはホモクエン酸分子との複合体になったMoFe₃-S₃クラスターからなるメタロクラスターであり、ホモクエン酸分子はモリブデン原子に配位結合し、3つの硫黄リガンドによってFe₄-S₃クラスターに架橋している。FeMo-coは細胞内で別に組み立てられた後、アポ-MoFeタンパク質に組み込

まれる。Pクラスターもメタロクラスターであり、8個のFe原子と7個の硫黄原子を含有していて、FeMo-coと似てはいるが異なる構造を持つ。Pクラスターはジニトロゲナーゼの $\alpha\beta$ サブユニット界面に位置し、両方のサブユニットからのシステイニル残基によって配位結合している。ジニトロゲナーゼレダクターゼは成分IIまたは「鉄タンパク質」とも呼ばれていて、NifHポリペプチドの二量体であり、サブユニット界面にある単一のFe₄-S₄クラスターと、2つのMg-ATP結合部位（各サブユニットに1つ）も含有している。この酵素はジニトロゲナーゼにとって必須の電子供与体であり、この酵素の中で電子がFe₄-S₄クラスターからPクラスターに移動し、次いで還元のための部位であるFeMo-coに移動する。
【0502】

Mo含有ニトロゲナーゼは細菌の中で最も一般的に見られるニトロゲナーゼだが、遺伝子は異なるものの補因子とサブユニットの組成が似た2つの相同なニトロゲナーゼが存在している。すなわちバナジウム含有ニトロゲナーゼとFeだけのニトロゲナーゼであり、それぞれVnf（バナジウム窒素固定）遺伝子とAnf（代替窒素固定）遺伝子によってコードされている。自然界のいくつかの細菌は、3つのタイプのニトロゲナーゼをすべて保持しており、他の細菌（例えば*Klebsiella pneumoniae*（肺炎桿菌））は、MoとVを含有する酵素だけ、またはMoを含有する酵素だけを含有する。

【0503】

FeMo-coを生合成し、ニトロゲナーゼの構成要素を成熟させてその触媒活性な形態にするには多彩な窒素固定（Nif）遺伝子が必要とされる。FeMo-co合成におけるNifB、NifE、NifH、NifN、NifQ、NifV、およびNifXポリペプチドの役割は以前に記載されている（RubioとLudden、2008年）。

【0504】

原核生物の酵素であるニトロゲナーゼを触媒とする生物学的N₂固定は、合成N₂肥料の使用に代わる1つの方法である。酸素に対するニトロゲナーゼの感受性が、植物（例えば穀類作物）へのNif遺伝子の直接的な導入によって生物学的窒素固定を操作することに対する主要な障害である。

【0505】

本発明の発明者らは、植物細胞のミトコンドリアマトリックス（MM）をNifポリペプチドに向かわせると酸素感受性の問題を克服できる可能性があると考えた。MMは酸素を消費する酵素を保持しており、それら酵素が、酸素感受性Fe-Sクラスターを含有する他の酵素が機能することを可能にする。ミトコンドリアFe-Sクラスター組み立て機構は窒素固定菌等価物に似ている（BalkとPilon、2011年；LillとMuhlenhoff、2008年）。したがって、ニトロゲナーゼの生合成に必要な要素のいくつかはすでにMM内の適切な位置に存在しているため、再構成に必要なNif遺伝子の数が減る可能性がある。ATPの大きな還元能力と濃度も存在している（GeigenbergerとFornie、2014年；MackenzieとMcIntosh、1999年）。その両方とも、ニトロゲナーゼ酵素の触媒作用の必要条件である。それに加え、ミトコンドリア内のグルタミン酸シンターゼの存在が、ニトロゲナーゼによって固定されるあらゆるアンモニアが植物の代謝に入るための侵入点を提供する。これらの特徴があるため、そしてミトコンドリアそのものが α -プロテオバクテリア起源であるという事実があるため、本発明の発明者らは、このオルガネラがニトロゲナーゼの機能再構成を試みるための場所としてよく適していると考えた。

【0506】

植物細胞のミトコンドリアの中でニトロゲナーゼを再構成することに向けた最初の一歩として、個々のNifタンパク質をMMに正しく向かわせることができるという証拠が必要とされた。この目的で、本発明の発明者らは、モデル植物*Nicotiana benthamiana*を発現プラットフォーム（Wood他、2009年）として選択し、導入遺伝子を単独で、またはより重要なことだが組み合わせで発現させる。MMに位置する大半のタンパク質は核によってコードされているため、本発明の発明者らは、細胞内シグナル伝達と輸送のプロセスの理解における最近の進展に頼り（Huang他、2009年；Murcha他、2014年）、以前に特微づけられているN末端ペプチド標的型シグナル（Lee他、2012年）を利用した。

【0507】

モデル窒素固定菌 *Klebsiella pneumoniae* は、ニトロゲナーゼの生合成と触媒機能のために16種類の独自のタンパク質を利用している。本発明の発明者らは、植物MMに向かわせるため *K. pneumoniae* からの16種類のNifタンパク質すべての再操作を実施し、*N. benthamiana* の葉におけるその発現とプロセッシングを評価した。16種類のNifポリペプチドすべてを一過性に発現させ、配列特異的MMプロセッシングを調べた。本発明の発明者らは、16種類のNifポリペプチドすべてをMTP:Nif融合ポリペプチドとして植物の葉細胞の中で発現させることが可能であることを明確にした。さらに、本発明の発明者らは、これらのタンパク質を、ニトロゲナーゼ機能を発揮する可能性のある細胞内の場所であるミトコンドリアマトリックス(MM)に向かわせることができ、ミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼ(MPP)によって切断できるという証拠を提示する。これは、植物の中で内在性窒素固定を操作するという目的に向けての大きな進歩である。

【0508】

植物におけるミトコンドリアタンパク質の取り込み

【0509】

ほぼすべてのミトコンドリアタンパク質は核によってコードされていて細胞質ゾルの中で翻訳されるため、それらをミトコンドリアの中に転移させる必要がある。これらポリペプチド内のシグナル配列が、ミトコンドリア内の4つの異なる場所、すなわち外膜(OM)、膜間腔(IS)、内膜(IM)、またはマトリックス(MM)へのこれらポリペプチドの取り込みを指示する。これらシグナル配列はその生化学的特性によって識別され、ポリペプチドを4つの場所の1つ以上へと向かわせる少なくとも4つの異なる取り込み経路を通じた輸送をガイドする(Chacinska他、2009年)。これら4つの輸送経路は、(1)一般的な取り込み経路(「古典的」プレ配列経路とも呼ばれ、ポリペプチドをMM、IS、またはIMに向かわせる)；(2)担体輸送経路(IMへの取り込みに用いられる)；(3)ミトコンドリア膜間腔(MIA)組み立て経路；および(4)ポリペプチドをOMに輸送するのに利用されるソーティング・組み立て機構(SAM)経路である。一般的な取り込み経路は、切断可能なプレ配列(シグナル配列としても知られる)を持つポリペプチドを取り込む。これらポリペプチドは、疎水性ソーティングシグナル(HSS)も持っている可能性がある。担体取り込み経路は、シグナルなどの内部プレ配列と疎水性領域を持つポリペプチドを取り込む。MIA経路は、ツインシステイン残基を持つポリペプチドを取り込む。SAM経路は、βシグナルと推定TOM20シグナルを含有するポリペプチドを取り込む。これら経路のすべてが外膜のトランスロカーゼ(TOM)を利用しており、第1と第2の経路は膜間複合体のTIM23トランスロカーゼも利用する。第1の経路だけが、マトリックスプロセッシングペプチダーゼ(マトリックスプロセッシングプロテアーゼ、MPP)を利用する。

【0510】

すべてのミトコンドリア標的型ポリペプチドに共通する1つの特徴は、ポリペプチド内にあって正確な場所への輸送をガイドする少なくとも1つのドメインの存在である。それらのうちで最もよく研究されているのは、マトリックス内でMPPによって切断される「古典的」N末端プレ配列ドメインである(Murcha他、2004年)。植物と動物のミトコンドリアタンパク質の約70%が切断可能なプレ配列を持つと推定されているが、内部シグナル配列とC末端シグナル配列の両方も見いだされている(PfannerとGeissler(2001年)、SchleiffとSoll(2000年)に概説されている)。シロイヌナズナ属では、これらプレ配列は長さが11~109個のアミノ酸残基の範囲であり、平均長は50個のアミノ酸残基である。第1の経路のためのプレ配列を完全に規定するコンセンサス配列は存在しないが、プレ配列は疎水性アミノ酸と正に帯電したアミノ酸を大きな割合で含有する傾向がある。さらなる1つの特徴は、それが両親媒性α-ヘリックスを形成する能力であり、α-ヘリックスは通常は最初のアミノ酸残基10個以内で始まっている(Roise他、1986年)。これらドメインは、疎水性アミノ酸残基(Ala、Leu、Phe、Val)、ヒドロキシル化されたアミノ酸残基(Ser、Thr)、および正に帯電したアミノ酸残基(Arg、Lys)が豊富であり、酸性アミノ酸が欠けている。多数のミトコンドリアタンパク質全体で、セリン(16~17%)

とアラニン（12～13%）がミトコンドリアシグナルペプチドの中で多くを占めすぎており、アルギニンが豊富である（12%）。MPP切断点は、大半のプレ配列にとって、保存されたアルギニン残基の存在によって規定され、大半の他の場合には、通常はP2位（切れやすい結合から-2個のアミノ酸）またはP3位である（Huang他、2009年）。

【0511】

ミトコンドリアプレ配列は、疎水性残基を通じてTom20受容体と相互作用する。 α -ヘリックスの疎水性表面がTOM取り込み複合体のTOM20構成要素によるペプチドの認識を容易にするのに対し、正電荷はTOM22サブユニットによって認識されることが、研究によって示されている（Abe他、2000年）。最後に、大半のプレ配列は、Hsp70と会合してポリペプチドの輸送をガイドするため、ほぼすべての植物プレ配列は、Hsp70分子シャペロンのための少なくとも1つの結合モチーフを含有している（ZhangとGlaser、2002年）。シャペロンHsp70はタンパク質の折り畳みに関与し、タンパク質の凝集を阻止し、分子モーターとして機能し、前駆体を引っ張ってミトコンドリア膜を横断させる。内膜を横断する膜電位（ $\Delta\psi$ ）（約100 mV、内側がマイナス）も、正に帯電したプレ配列の転移を、電気泳動効果を通じて駆動する。

【0512】

切断可能なプレ配列を有するタンパク質の大半は、外膜（TOM）複合体の輸送体と内膜23複合体（TIM23）の輸送体を利用する一般的な輸送経路を通じてミトコンドリアマトリックスに向かうことが運命づけられている。しかし切断可能なプレ配列を持ついくつかのタンパク質は、内膜に集合する（Murcha他、2004年）か、それらタンパク質が疎水性ソーティングシグナル（HSS）も含有している場合には内膜腔に集合することができる（Glick他、1992年）。切断されるプレ配列を持たないマトリックス局在化タンパク質の例は非常に少数である。シロイヌナズナ属では、グルタミン酸デヒドロゲナーゼだけが、プロセッシングを受けていない完全長プレ配列を持つマトリックスの中に見いだされている。

（Huang他、2009年）

【0513】

マトリックスを標的としないタンパク質のためには、多彩な内部切断不能局在化シグナルが使用される。これらは典型的には特定の輸送経路と関係しており、その特別なクラスのタンパク質にさらに適合するようにされる。植物では、これまでのどの研究も、何が内膜腔タンパク質のための内部シグナル配列を明確に構成しているかを明らかにしていない。しかしツインシステイン残基を持つモチーフが、ミトコンドリア内膜腔組み立て経路（MIA）を通じた輸送と関係しているように見える（Carrie他、2010年；Darshi他、2012年）。最後に、切断不能内部配列は、多数の膜貫通領域を持つタンパク質の挿入にTOM装置とTIM22装置を利用する担体経路を通じて内膜に向かうことを運命づけられたタンパク質によっても利用される（Kerscher他、1997年；Sirrenberg他、1996年）。これらの配列は、典型的には、疎水性領域とそれに続くプレ配列様内部配列を含有しているため、N末端プレ配列と似ているが、そのコグネイトタンパク質内のこれら配列の内部位置によって識別される。

【0514】

光合成生物では、核がコードするミトコンドリアタンパク質は、葉緑体への輸送とミトコンドリアへの輸送を区別する必要があるが、それでもこれら2つのオルガネラとそのプロテオームの間には多くの類似性がある。ミトコンドリアプレ配列にたいして現われる α ヘリックスは、通常、葉緑体プレ配列には不在である（ZhangとGlaser、2002年）。葉緑体プレ配列は、より構造化されていない傾向があり、高度な β シートドメイン構造を示す（Bruce、2001年）。

【0515】

植物では、MPPは内膜に結合したCytbc₁複合体に係留されるが、活性なMPP部位はマトリックスの正面に位置するため、これら2つのタンパク質の機能は独立である（GlaserとDessi、1999年）。

【0516】

ミトコンドリア標的型ペプチド

【0517】

本明細書では、「ミトコンドリア標的型ペプチド」または「MTP」という用語は、長さが少なくとも10個のアミノ酸、好ましくは10～約80個のアミノ酸残基を含んでいて標的タンパク質をミトコンドリアに向かわせるアミノ酸配列を意味し、これをMTP-標的タンパク質翻訳融合において異種的に使用して、選択された標的タンパク質（Nifポリペプチド、Gus、GFPなど）をミトコンドリアに向かわせることができる。

【0518】

MTPは、典型的には、そのN末端に、このMTPの出所であるポリペプチドの翻訳開始メチオニンを含む。MTPは、標的タンパク質の開始Metに対応するMet残基へのペプチド結合によって Nifポリペプチドまたは「標的タンパク質」に翻訳融合される。あるいはMet残基は省略することができて、ペプチド結合が、野生型では標的タンパク質の第2アミノ酸であるアミノ酸残基に直接融合される。MTPは、典型的には、塩基性アミノ酸とヒドロキシル化されたアミノ酸が豊富であり、通常、酸性アミノ酸、または伸長された疎水性ストレッチを欠いている。MTPは、両親媒性ヘリックスを形成することができる

【0519】

理論に囚われることは望まないが、MTPは、典型的には、ミトコンドリアの外膜上の受容体に結合する取り込み標的型配列を含む。融合ポリペプチドは、外膜に結合すると輸送チャンネルタンパク質への膜転移を受け、ミトコンドリアの二重膜を通過してミトコンドリアマトリックス（MM）に至ることが好ましい。その後取り込み標的型配列は、典型的には切断されて、成熟融合タンパク質が折り畳まれる。

【0520】

MTPは、その後タンパク質をミトコンドリアのさまざまな領域（ミトコンドリアマトリックス（MM）など）に向かわせる追加シグナルを含むことができる。一実施態様では、取り込み標的型配列は、マトリックス標的型配列である。

【0521】

MTPは、Nifポリペプチドに翻訳融合されるとき、切断可能であっても切断不能であってもよい。したがって一実施態様では、MTP-Nif融合ポリペプチドは、少なくとも部分的に切断される。この点に関し、「少なくとも部分的に切断される」という表現は、植物細胞の中で発現したときのMTP-Nif融合ポリペプチドの切断の検出可能な量を意味する。一実施態様では、細胞内で産生されたMTP-Nif融合ポリペプチドの少なくとも50%がMTP配列内で切断され、好ましくは少なくとも75%が切断され、より好ましくは少なくとも90%が切断される。代替の一実施態様では、MTP-Nif融合ポリペプチドの50%未満が細胞内で切断され、例えばMTPは切断されない。一実施態様では、MTPはMPPのための切断部位を含んでいない。MTPは切断部位を含むことができる。得られるプロセッシングを受けた産物（すなわち成熟NP）のN末端部は、MTPの1つ以上のC末端アミノ酸（本明細書では癒痕配列とも呼ぶ）を含んでいても、癒痕配列を含んでいなくてもよい。癒痕配列は、存在するとき、長さが好ましくは1～45個のアミノ酸、より好ましくは1～20個のアミノ酸、それ以上に好ましくは1～12個のアミノ酸である。あるいは切断部位を融合ポリペプチドの中に位置させ、MTP配列全体が切断されて除去されるようにすること、例えばリナーが切断配列を含むことができる。

【0522】

天然のミトコンドリア標的型ペプチドは前駆タンパク質のN末端に位置し、N末端部分は、典型的には、ミトコンドリアの中に取り込まれている間、または取り込まれた後に切断されて除去される。切断は、典型的には、一般的なマトリックスプロセッシングプロテアーゼ（MPP）によって触媒される。MPPは、植物では呼吸鎖のbc₁複合体に組み込まれている。このプロテアーゼは、ほとんど保存されていない広範なアミノ酸配列を持つほぼ100種類の前駆タンパク質の切断部位を認識する。一実施態様では、MTPはMPPのためのプロテアーゼ切断部位を含む。さらなる一実施態様では、プロセッシングを受けた産物は、MPPの中、またはMPPの直後で融合タンパク質がMPPによって切断されることによって生成

する。この文脈では、「直後」という用語は、MPPによる切断の後を意味し、Nifポリペプチドに融合したMTPからの残留アミノ酸は存在しない。したがって融合ポリペプチドがMTPの「直後」で切断される場合、MPP切断部位は、MTPのC末端アミノ酸の直後にある。

【0523】

「切断された産物」または「切断産物」という用語は、本明細書においてMTP融合ポリペプチドの文脈で使用されるとき、MTPアミノ酸配列の中または直後でのプロテアーゼ切断から生じるポリペプチドを意味する。この点に関し、MTP融合ポリペプチドの切断産物は、MPPによる切断によって取得できる。切断産物は、切断後のMTPからの1個以上のアミノ酸（すなわち瘢痕ペプチド）を保持していても、切断後のMTPからの残留アミノ酸をまったく持たなくてもよい。一実施態様では、本発明のNif融合ポリペプチドの切断産物は、Nif融合ポリペプチド配列の中に存在するアミノ酸の少なくとも95%、またはすべてを含む。

10

【0524】

一実施態様では、MTPは切断されない。本発明の本発明者らは、MTPの組み込みが、必ずしもNifタンパク質の完全なプロセッシングにつながるわけではないことを実証した。いくつかの場合（NifX-FLAG、NifD-HA_{opt1}、およびNifDK-HA）には、プロセッシングを受けたNifタンパク質とプロセッシングを受けていないNifタンパク質の両方が観察された。MTPに関する一般的なコンセンサス配列は存在しないことと、ミトコンドリアを標的とすることに内部タンパク質の配列が影響を及ぼす可能性があること（Becker他、2012年）を考慮すると、Nifタンパク質の間でプロセッシング効率に差があることを本発明の本発明者らが見いだしたのはおそらく驚くべきことではない。

20

【0525】

本発明の文脈で使用できる適切なMTPの非限定的な例に含まれるのは、von Heijne（1986年）またはRoiseとSchatz（1988年）によって明確にされているような一般構造を持つペプチドである。MTPの非限定的な例は、von Heijne（1986年）の表Iに明確にされている、または本明細書に開示されているミトコンドリア標的型ペプチドである。

【0526】

一実施態様では、MTPは、F1-ATPアーゼ γ -サブユニット（MTP-FA γ ）である。適切なFA γ MTPの一例は、*A. thaliana*からのものである（Lee他、2012年）。一実施態様では、MTP-FA γ は長さが77個のアミノ酸であり、それがMMPによって切断されると、融合ポリペプチドのN末端に35個のMTP残基が残る。好ましい一実施態様では、MTP-FA γ は長さが77個未満のアミノ酸である。例えばMTP-FA γ は、長さが約51個のアミノ酸にすることができ、それがMMPによって切断されると、融合ポリペプチドのN末端に9個のMTP残基が残る。

30

【0527】

当業者は、ミトコンドリアタンパク質とそれを標的とする配列を予測するためのソフトウェア（例えばMitoProtII、PSORT、TargetP、およびNNPSL）が存在していることを認識しているであろう。

【0528】

MitoProtIIは、いくつかの生理化学的パラメータ（例えば、N末端部のアミノ酸組成、または17残基ウインドウに関する最高総合疎水性）に基づいて配列のミトコンドリア局在化を予測するプログラムである。PSORTは、配列に由来するさまざまな特徴（配列モチーフの存在やアミノ酸組成など）に基づいて細胞内位置を予測するプログラムである。TargetPは、N末端プレ配列（すなわち葉緑体輸送ペプチド、ミトコンドリア標的型ペプチド、または分泌経路シグナルペプチド）のいずれかの存在が予測されることに基づいて真核細胞タンパク質の細胞内位置を予測する。TargetPは、初期のバイナリ予測因子、SignalP、およびChloroPを利用しており、人工神経回路網（ANN）の2つの層への入力としてN末端配列を必要とする。N末端プレ配列を含有すると予測される配列について、潜在的な切断部位も予測することができる。NNPSLは、アミノ酸組成を利用して4つの細胞内局在

40

50

化（細胞質ゾル、細胞外、核、およびミトコンドリア）のうちの1つを質問配列に割り当てる別のANNベースの方法である。

【0529】

当業者であれば、選択されたMTPが融合ポリペプチドをミトコンドリアマトリックスに向かわせたかどうかを定型的な方法と本明細書中に開示されている方法に基づいて容易に判断できると考えられる。本発明の本発明者らは、プロセッシングを受けたタンパク質の検出を助けるため、シロイヌナズナ属の葉緑体にGFPを輸送できることが以前に実証されていて（Lee他、2012年）比較的長い標的型ペプチドを選択する。本明細書の実施例に示されているように、選択されたMTPは、選択されたニトロゲナーゼタンパク質のすべてをMMに向かわせた。この結論は、いくつかの証拠に基づいている。第1に、*N. benthamiana*が発現したNifポリペプチドで観察されたサイズは、MMペプチダーゼプロセッシングから得られる予想サイズと一致していた。これは、細菌（完全長でプロセッシングを受けていない）と、植物ミトコンドリアが発現した小さなサイズのNif（NifFとNifZ）の間で観察されたサイズ差にも反映されていた。それに加え、MTPがミトコンドリア取り込み機構によるプロセッシングを受けられなくなるMTPの変異により、NifD融合体とGFP融合体の両方でより広いバンドが生じた。これは、プロセッシングを受たタンパク質と受けていないタンパク質の間のサイズに差があることと整合している。最後に、マトリックス内の特異的プロセッシングに関して予測されるように、代表的な融合ポリペプチドの質量分析法から、MTP-NifHがMTPの残基42～43の間で切断されたことが明らかになった。

【0530】

本発明のいくつかの実施態様では、選択された1つのMTPの多数のタンデムコピーを用いることが有用である可能性がある。二重化または多重化された標的型ペプチドのコード配列は、既存のMTPから遺伝子工学によって得ることができる。MTPの量は、細胞を分画した後に例えば定量的なイムノブロット分析によって測定することができる。したがって本発明では、「ミトコンドリア標的型ペプチド」または「MTP」という用語は、標的Nifタンパク質をミトコンドリアに向かわせる1つのアミノ酸ペプチドの1つ以上のコピーを包含する。好ましい一実施態様では、MTPは、選択されたMTPの2つのコピーを含む。別の一実施態様では、MTPは、選択されたMTPの3つのコピーを含む。別の一実施態様では、MTPは、選択されたMTPの4つ以上のコピーを含む。

【0531】

当業者は、MTP配列が天然のMTP配列に限定されることはないが、天然のMTPと比べてアミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を含む可能性があることを理解するであろう。ただし、その配列バリエーションがミトコンドリアを標的とする機能を維持することが条件である。

【0532】

当業者は、MTPが、クローニング戦略の結果としてそのN末端またはC末端にアミノ酸が隣接してもよいこと、そしてリンカーとして機能できることを理解するであろう。これらの追加アミノ酸は、MTPの一部を形成すると見なすことができる。

【0533】

当業者は、MTPのN末端またはC末端がオリゴペプチドリンカーおよび／またはタグ（エピトープタグなど）に融合していてもよいことも理解するであろう。好ましい一実施態様では、植物細胞の中で産生される本発明のNif融合ポリペプチドの1つ以上またはすべてが、対応する野生型Nifポリペプチドと比べて、付加されるエピトープタグを欠いている。

【0534】

ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）-Nif融合ポリペプチド

【0535】

本発明は、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）-Nif融合ポリペプチドと、その切断されたポリペプチド産物に関する。本発明のMTP-Nif融合ポリペプチドが植物細胞の中で発現するとき、MTP-Nif融合ポリペプチドおよび／または切断されたポリペプチド産物はミトコンドリアマトリックス（MM）を標的とする。融合ポリペプチドは、植物細胞にニ

トロゲナーゼレダクターゼ活性および／またはニトロゲナーゼ活性を与えること、または細菌内の対応する野生型Nifポリペプチドによって与えられるのと同じ活性を与えることが好ましい。

【0536】

本明細書では、「融合ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって共有結合した2つ以上のポリペプチドドメインを含むポリペプチドを意味する。典型的には、融合ポリペプチドは、本発明のキメラポリヌクレオチドによって単一のポリペプチド鎖としてコードされる。一実施態様では、本発明の融合ポリペプチドは、ミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）とNifポリペプチド（NP）を含む。この実施態様では、MTPのC末端はNPのN末端に翻訳融合される。代替の一実施態様では、本発明の融合ポリペプチドは、MTPとNPのC末端部分を含み、このC末端部分はMPPによるMTPの切断から生じる。MTPのこのようなC末端部分を本明細書では「瘢痕」配列と呼ぶ。この実施態様では、MTPのC末端部のC末端アミノ酸はNPのN末端アミノ酸に翻訳融合される。これらの実施態様では、融合ポリペプチドは、MTPとNPの間の1つ以上の追加アミノ酸（Gly-Gly配列など）、および／または翻訳開始アミノ酸としての追加メチオニンを含むことができる。一実施態様では、融合ポリペプチドは、2つのNifポリペプチド、好ましくはリンカー配列を介してNifKポリペプチドに翻訳融合されたNifDポリペプチドまたはリンカー配列を介してNifNポリペプチドに翻訳融合されたNifEポリペプチドを含む。これらの融合されたポリペプチドの両方が存在することができる。これらの実施態様では、融合ポリペプチドの中の第2のNifポリペプチドはその野生型C末端を持つ、すなわちC末端伸長部が欠けている。

【0537】

本明細書では、「N末端に翻訳融合された」という表現は、MTPポリペプチドまたはリンカーポリペプチドのC末端がペプチド結合によってNPのN末端に共有結合することで融合ポリペプチドになっていることを意味する。一実施態様では、NPは、対応する野生型NPと比べて、その天然の翻訳開始メチオニン（Met）残基、またはその2つのN末端Met残基を含まない。代替の一実施態様では、NPは、例えばNifDのための野生型NPポリペプチドの翻訳開始Metを含むか、2つのN末端Met残基の一方または両方を含む。

【0538】

このようなポリペプチドは、典型的には、MTPをコードするヌクレオチドの翻訳リーディングフレームがフレーム内でNPをコードするヌクレオチドのリーディングフレームに接合されたキメラタンパク質コード領域の発現によって産生される。当業者は、MTPのC末端アミノ酸をリンカーなしで、または1個以上のアミノ酸残基（例えば1～5個のアミノ酸残基）からなるリンカーを介してNPのN末端アミノ酸に翻訳融合できることがわかるであろう。このようなリンカーもMTPの一部と見なすことができる。タンパク質コード領域を発現させた後、植物細胞のMMの中でMTPを切断することができ、このような切断は、（もし起こる場合には）本発明の融合ポリペプチドの産生という概念に含まれる。

【0539】

融合ポリペプチドまたはプロセッシングを受けたNifポリペプチドは、機能的なNif活性を持つことが好ましい。好ましい一実施態様では、活性は、対応する野生型Nifポリペプチドの活性と似ている。融合ポリペプチドまたはプロセッシングを受けたNifポリペプチドの機能的活性は、細菌アッセイと生化学的補完アッセイにおいて求めることができる。好ましい一実施態様では、融合ポリペプチドまたはプロセッシングを受けたNifポリペプチドは、野生型Nif活性の約70～100%の活性を持つ。Nif機能を持たないNifポリペプチドはそれでも、例えば遺伝子コンストラクトからの発現レベルを調べるための、または他のNifポリペプチドとの会合を調べるための研究ツールとして有用である。

【0540】

融合ポリペプチドは、2つ以上のMTPおよび／または2つ以上のNPを含むことができ、例えば融合ポリペプチドは、MTP、NifDポリペプチド、およびNifKポリペプチドを含むことができる。融合ポリペプチドは、例えば2つのNPを連結するオリゴペプチドリンカーも含むことができる。リンカーは、2つ以上の機能的ドメイン、例えば2つのNP（NifDと

NifK、またはNifEとNifNなど）が植物細胞の中で会合して機能的な配置になることを可能にするのに十分な長さであることが好ましい。好ましい一実施態様では、NifDポリペプチドはAnfDポリペプチドであり、NifKポリペプチドはAnfKポリペプチドである。このようなリンカーは、AnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドについては長さが8～50個のアミノ酸残基、好ましくは長さが約25～35個のアミノ酸、より好ましくは長さが約30個のアミノ酸残基、または長さが約26個のアミノ酸残基であることが可能である。融合ポリペプチドは、従来手段によって、例えば適切な細胞の中で前記融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を遺伝子発現させる手段によって得ることができる。

【0541】

本明細書では、「実質的に精製されたポリペプチド」は、例えば細胞内でそのポリペプチドに通常は付随する他の成分（例えば脂質、核酸、炭水化物）を実質的に含まないポリペプチドを意味する。実質的に精製されたポリペプチドは、前記成分を少なくとも90%含まない。

【0542】

本発明の植物細胞、トランスジェニック植物、およびその部分は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明のポリペプチドは、植物細胞の中、特に植物細胞のミトコンドリアの中では自然に生じることがないため、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを本明細書では外来ポリヌクレオチドと呼ぶことができる。なぜならそれは植物細胞の中で自然に生じることがなく、その植物細胞または前駆細胞の中に導入されたからである。したがって本発明のポリペプチドを産生する本発明の細胞、植物、および植物の部分は、組み換えポリペプチドを産生すると言うことができる。ポリペプチドの文脈における「組み換え」という用語は、細胞によって産生されたとき、外来ポリヌクレオチドによってコードされているポリペプチドを意味し、そのポリヌクレオチドは、その細胞の中か、組み換えDNA技術または組み換えRNA技術（例えば形質転換など）による前駆細胞の中にすでに導入されている。典型的には、植物細胞、植物、または植物の部分は、その植物細胞または植物のライフサイクルの少なくともある時点である量のポリペプチドを産生させる非内在遺伝子を含む。外来ポリヌクレオチドは、植物細胞の各ゲノムに組み込まれる、および／または細胞の核の中で転写される。

【0543】

一実施態様では、本発明のポリペプチドは、天然のポリペプチドではない。代替の一実施態様では、本発明のポリペプチドは天然だが、それが天然に生じることはない植物細胞の中、好ましくは植物細胞のミトコンドリアの中に存在している。

【0544】

一実施態様では、本発明のポリペプチド（例えばMTP融合ポリペプチドまたはその切断産物）は、植物細胞のミトコンドリアの中で少なくとも部分的に可溶性である。この文脈では、「少なくとも部分的に可溶性」という表現は、植物細胞のミトコンドリアを含む均一化されたサンプルの可溶性分画の中でポリペプチドが検出可能であることを意味する。ポリペプチドの可溶性を検出する適切な方法は本分野で知られており、実施例1に記載されている方法が含まれる。一実施態様では、細胞内に存在するポリペプチドの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%が可溶性である。

【0545】

Nifポリペプチド

【0546】

本明細書では、「Nifポリペプチド」と「Nifタンパク質」という用語は交換可能に用いられ、アミノ酸配列がニトロゲナーゼ活性に関与する天然のポリペプチドと関係しているペプチドを意味する。なお本発明のNifポリペプチドは、NifDポリペプチド、NifHポリペプチド、NifKポリペプチド、NifBポリペプチド、NifEポリペプチド、NifNポリペプチド、NifFポリペプチド、NifJポリペプチド、NifMポリペプチド、NifQポリペプチド、Nifs

ポリペプチド、NifUポリペプチド、NifVポリペプチド、NifWポリペプチド、NifXポリペプチド、NifYポリペプチド、およびNifZポリペプチドからなるグループから選択される（そのそれぞれは本明細書に定義されている）。本発明のNifポリペプチドには、「Nif融合ポリペプチド」が含まれ、これは本明細書では、天然のNifポリペプチドのポリペプチドホモログであって、対応する天然のNifポリペプチドと比べてN末端とC末端の一方または両方に接合された追加アミノ酸残基を持つものを意味する。上述のように、Nif融合ポリペプチドは対応する野生型Nifポリペプチドと比べて翻訳開始Metまたは2個のN末端Met残基を欠いている可能性がある。Nif融合ポリペプチドのアミノ酸残基であって、天然のNifポリペプチド（すなわちN末端とC末端の一方または両方に接合された追加アミノ酸残基のないNifポリペプチド）に対応するアミノ酸残基も、本明細書ではNifポリペプチド（この場合には「NP」と略する）またはNifDポリペプチド（「ND」）などと呼ぶ。好ましい一実施態様では、「N末端とC末端の一方または両方に接合された追加アミノ酸残基」は、NPのN末端に接合されたミトコンドリア標的型ペプチド（MTP）またはプロセッシングを受けたMTP、またはNPにとってN末端とC末端の一方または両方であるエピトープ配列（「タグ」）、またはMTPまたはプロセッシングを受けたMTPとエピトープ配列の両方を含む。【0547】

天然のNifポリペプチドは、窒素固定菌を含むいくつかの細菌の中でだけ生じ、窒素固定菌には、自由生活性窒素固定菌、協同的（associative）窒素固定菌、および共生的窒素固定菌が含まれる。自由生活性窒素固定菌は、他の生物との直接的な相互作用なしに有意なレベルの窒素を固定することができる。前記自由生活性窒素固定菌の非限定的な例に含まれるのは、（好気性生物に分類される）アゾトバクター属、バイエリンキア属、クレブシエラ属、シアノバクテリア属のメンバーと、クロストリジウム属、デスルホビブリオ属のメンバーと、紅色硫黄細菌、紅色非硫黄細菌、および緑色硫黄細菌と命名されたものである。協同的窒素固定菌は、イネ科（草本）のいくつかのメンバーと密接な関係を形成することのできる原核生物である。これらの細菌は、宿主植物の根圏内にかなりの量の窒素を固定する。アズスピリラム属のメンバーは、協同的窒素固定菌の代表例である。共生的窒素固定菌は、宿主植物とパートナーを組むことによって共生的に窒素を固定する細菌である。植物は光合成から糖を提供し、それが、窒素固定菌により、窒素固定に必要なエネルギーとして利用される。リゾビア属のメンバーは、協同的窒素固定菌の代表例である。【0548】

本発明のNifポリペプチドまたはNif融合ポリペプチドは、NifH、NifD、NifK、NifB、NifE、NifN、NifF、NifJ、NifM、NifQ、NifS、NifU、NifV、NifW、NifX、NifY、およびNifZポリペプチドからなるグループから選択される。これらポリペプチドの機能は、最近Burenら（2020年）によって概説された。【0549】

本発明の他のポリペプチドは、V-ニトロゲナーゼとFe-ニトロゲナーゼにそれぞれ関与するVnfGとAnfG、ニトロゲナーゼ関連因子（Nafポリペプチド）である例えばNafYなど、およびフェレドキシンポリペプチド（FdxNポリペプチドなど）であると考えられる。これらポリペプチドは、ミトコンドリアを標的とするためにMTP融合ポリペプチドとしてコードされて発現することが好ましい。【0550】

ポリペプチド、またはポリペプチドのクラスは、そのアミノ酸配列が参照アミノ酸配列と一致する程度（%一致）によって、および／またはいくつかのアミノ酸モチーフまたはタンパク質ファミリードメインの存在によって、または1つの参照アミノ酸配列が別の参照アミノ酸配列よりも大きな%一致を持つことによって決めることができる。ポリペプチド、またはポリペプチドのクラスは、配列の一致の程度に加え、天然のNifポリペプチドと同じ生物活性を持つことによって決めることもできる。【0551】

ポリペプチドの%一致は、ギャップ生成ペナルティ=5とギャップ延長ペナルティ=0.3にしたGAP（NeedlemanとWunsch、1970年）分析（GCGプログラム）によって、また

10

20

30

40

50

はBlastpバージョン2.5またはそのアップデートバージョン（Altschul他、1997年）によって求められ、それぞれの場合に分析では、参照配列を含む2つの配列をその参照配列の全長にわたってアラインメントする。本明細書では、参照配列に、*K. pneumoniae* (*K. oxytoca*と名称変更された)からの天然のNifポリペプチドに関して与えられている配列（配列番号1～17）が含まれる。

【0552】

以下の定義では、配列番号として示されている参照配列とのアミノ酸配列の一致の程度は、標的配列の最大数が10,000に設定されている点は除き、デフォルトパラメータを用いたBlastpバージョン2.5またはそのアップデートバージョン（Altschul他、1997年）によって求められ、参照アミノ酸配列の全長に沿って求められる。

【0553】

天然の細菌内のNifHポリペプチドはニトロゲナーゼ複合体の1つの構造要素であり、鉄（Fe）タンパク質と呼ばれることがしばしばある。NifHはホモ二量体を形成しており、そのサブユニットと2つのATP結合ドメインの間に結合したFe₄S₄クラスターを持つ。NifHはニトロゲナーゼタンパク質（NifD/NifKヘテロ四量体）への必須の電子供与体であるため、ニトロゲナーゼレダクターゼ（EC 1.18.6.1）として機能する。モリブデン型のNifHもFeMo-coの生合成とアポ-MoFeタンパク質の成熟に関与する（Jasniewski他、2018年）。その中で概説されているように、NifHは認められている3つの主要な機能を持つ。すなわち、(i) FeMo-coの合成においてMoとホモクエン酸を挿入することへの関与（NifE-NifN複合体も関与する）、(ii) P*クラスターと名づけられたものからNifD-NifK上にPクラスターを形成する際のレダクターゼ機能（それには小さなシャペロン様ポリペプチドNifZも関与する可能性がある）、および(iii) ニトロゲナーゼタンパク質への電子供与体としての機能である。

【0554】

本明細書では、「NifHポリペプチド」は、配列が配列番号1として示されているアミノ酸配列と少なくとも41%一致するアミノ酸を含むとともに、ドメインTIGR01287、PRK13236、PRK13233、およびcd02040の1つ以上を含むポリペプチドを意味する。TIGR01287ドメインは、モリブデン-鉄ニトロゲナーゼレダクターゼ（NifH）、バナジウム-鉄ニトロゲナーゼレダクターゼ（VnfH）、および鉄-鉄ニトロゲナーゼレダクターゼ（AnfH）のそれぞれの中に存在するが、光非依存型プロトクロロフィドレダクターゼからの相同なタンパク質は除外される。したがって本明細書で用いられるNifHポリペプチドには、配列が配列番号1と少なくとも41%一致するアミノ酸を含む鉄結合ポリペプチドのサブクラス、VnfH鉄結合ポリペプチド、およびAnfH鉄結合ポリペプチドが含まれる。天然のNifHポリペプチドは、典型的には260～300個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約30 kDaの分子量を持つ。多数のNifHポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifHポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis*（アクセッション番号WP_049123239.1、配列番号1と99%一致）、*Brenneria goodwinii*（WP_048638817.1、93%一致）、*Sideroxydans lithotrophicus*（WP_013029017.1、84%一致）、*Denitrovibrio acetiphilus*（WP_013010353.1、80%一致）、*Desulfovibrio africanus*（WP_014258951.1、72%一致）、*Chlorobium phaeobacteroides*（WP_011744626.1、69%一致）、*Methanosaeta concilii*（WP_013718497.1、64%一致）、*Rhodobacter*（WP_009565928.1、61%一致）、*Methanocaldococcus infernus*（WP_013099472.1、42%一致）、および*Desulfohalobium* *youngiae*（WP_007781874.1、41%一致）から報告されている。NifHポリペプチドは、Thiel他（1997年）、Pratte他（2006年）、Boison他（2006年）、およびStaples他（2007年）の中に記載され、概説されている。

【0555】

本明細書では、機能的NifHポリペプチドは、他の必要なサブユニット（例えばNifDとNifK、およびFeMo-、FeV-、またはFeFe-補因子）と合わさって機能的ニトロゲナーゼ複合体を形成することのできるNifHポリペプチドである。

10

20

30

40

50

【0556】

本明細書では、「AnfHポリペプチド」は、保存されたドメインPRK13233を含有していて、*Azotobacter vinelandii* AnfHポリペプチド（配列番号218：アクセッション番号WP_012703362）と少なくとも69%が、配列番号218の完全長に沿って測定するとき一致するニトロゲナーゼ保存スーパーファミリーcl25403のメンバーであるNifHポリペプチド（TIGR01287）である。このアミノ酸配列を本明細書ではAnfHの参照配列として用いる。TIGR01287：AnfHはニトロゲナーゼ成分IIの全鉄バリエーションであり、ニトロゲナーゼレダクターゼとしても知られる。本明細書では、AnfHポリペプチドはNifHポリペプチドのサブセットである。AnfHポリペプチドにはモリブデン型NifHポリペプチドとバナジウム型NifHポリペプチド（VnfH）は含まれない。配列データベースの中のAnfHポリペプチドのアミノ酸配列は通常はAnfHポリペプチドと注釈されていた。2020年1月の時点でNCBIタンパク質データベースのAnfHセットの中に314種類の具体的なアミノ酸配列が存在しており、そのすべてがAnfHに特異的なアミノ酸残基を持っていたため、モリブデン型のNifHおよびVnfHとは明確に異なっていた。モリブデン型のNifHとVnfHのサブセットは、より類似していたが、それでも明確に異なっていた。天然のAnfHポリペプチドの例に含まれるのは、*Rhodocyclus tenuis*（アクセッション番号WP_153472986；92.36%一致）、*Dickeya paradisiaca*（アクセッション番号WP_015854293；88.36%一致）、*Thermodesulfitimonas autotrophica*（アクセッション番号WP_123927773；78.91%一致）、*Clostridium kluyveri*（アクセッション番号WP_073538802；76.36%一致）、および*Methanophagales archaeon*（アクセッション番号RCV64832；69.37%一致）からのAnfHポリペプチドであり、それぞれ配列番号218を参照している。

【0557】

本明細書の実施例23に記載されているように、16個のアミノ酸が、AvNifHのモリブデン型NifH配列と比べて保存されていてAnfHポリペプチドに特徴的であったAnfH配列の所定の位置に同定された。これらを用いて、AnfHポリペプチドを、16個のアミノ酸すべては共通に含まない他のNifH配列から識別することができる。AvNifH、KoNifH（配列番号1）、および他のモリブデン型NifH配列は、モチーフIIIとIVを持っていたが、モチーフI、II、V～VIIは持っていなかったため、これらのモチーフ（配列番号225～231）もAnfHサブセットを他のNifHポリペプチドから識別するのに使用できた。

【0558】

機能的AnfHポリペプチドは、他の機能的NifHポリペプチドと同様、FeFe複合体に対する必須の電子供与体であるニトロゲナーゼレダクターゼとして機能することができる。AnfHは、モリブデン型NifHと同様、FeFe-の生合成とアポ-FeFe複合体（AnfD-AnfK-AnfG）の成熟に関与している可能性がある。

【0559】

本明細書では、「NifDポリペプチド」は、配列が配列番号2として示されていて、(i) ドメインTIGR01282とCOG2710の一方または両方（その両方とも、配列番号2に示されているアミノ酸配列を持つポリペプチドを含む鉄-モリブデン結合ポリペプチドに見いだされる）、または(ii) 鉄-バナジウム結合ドメインTIGR01860（この場合にはNifDポリペプチドがVnfDポリペプチドのサブクラスの中にある）、または(iii) 鉄-鉄結合ドメインTIGR1861（この場合にはNifDポリペプチドがAnfDポリペプチドのサブクラスの中にある）を含むアミノ酸配列と少なくとも33%一致するアミノ酸を含むポリペプチドを意味する。NifDポリペプチドは融合ポリペプチドの一部であることが可能であり、例えばMTPおよび／またはNifKに融合される。あるいはNifDポリペプチドはN末端伸長部またはC末端伸長部をまったく含まなくてもよい。好ましい実施態様では、NifDポリペプチドは、NifKポリペプチドと会合するとき、FeMo補因子に結合する。

【0560】

本明細書では、NifDポリペプチドは、配列が配列番号2、VnfD鉄-バナジウムポリペプチド、およびAnfDポリペプチドと少なくとも33%一致するアミノ酸を含む鉄-モリブデン（FeMo-co）結合ポリペプチドのサブクラスを含んでいる。天然のNifDポリペプチドは、

典型的には、470～540個のアミノ酸の長さを持つ。多数のNifDポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifDポリペプチドは、*Raoultella ornithinolytica*（アクセッション番号WP_044347161.1、配列番号2と96%一致）、*Kluyvera intermedia*（WP_047370273.1、93%一致）、*Dickeya dadantii*（WP_038902190.1、89%一致）、*Tolomonas* sp. BRL6-1（WP_024872642.1、81%一致）、*Magnetospirillum gryphiswaldense*（WP_024078601.1、68%一致）、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*（WP_013298320.1、42%一致）、*Methanothermobacter thermautotrophicus*（WP_010877172.1、38%一致）、*Desulfovibrio africanus*（WP_014258953.1、37%一致）、*Desulfotomaculum* sp. LMa1（WP_066665786.1、37%一致）、*Desulfomicrobium baculatum*（WP_015773055.1、36%一致）、*Fischerella muscicola*からのVnfDポリペプチド（WP_016867598.1、34%一致）、およびOpitutaceae bacteriumからのAnfDポリペプチドTAV5（WP_009512873.1、33%一致）から報告されている。NifDポリペプチドは、LawsonとSmith（2002年）、KimとRees（1994年）、Eady（1996年）、Robson他（1989年）、Dilworth他（1988年）、Dilworth他（1993年）、MillerとEady（1988年）、Chiu他（2001年）、Mayer他（1999年）、およびTezcan他（2005年）に報告され、概説されている。

【0561】

鉄-モリブデンサブクラスのNifDポリペプチドは、ニトロゲナーゼ複合体の鍵となるサブユニット（ニトロゲナーゼの中心に位置する $\alpha_2\beta_2\text{MoFe}$ タンパク質複合体の α サブユニットである）であるとともに、FeMo補因子による基質還元部位である。本明細書では、機能的NifDポリペプチドは、機能的ニトロゲナーゼタンパク質を他の必要なサブユニット（例えばNifHやNifK）およびFeMoまたは他の補因子とで形成することのできるNifDポリペプチドである。

【0562】

本明細書では、「プロテアーゼ切断に対して抵抗性であるNifDポリペプチド（ND）」は、植物ミトコンドリアの中にMTPを用いてNDが導入されるとき、所定の部位または所定の領域内（例えば配列番号18のアミノ酸97～100に対応するアミノ酸配列内）での切断に対して抵抗性である。本明細書では、「プロテアーゼ切断に対して抵抗性である」は、植物ミトコンドリアの中にMTPを用いてNifDポリペプチドが導入されるとき、10%未満の切断を生じさせることを意味する。好ましい実施態様では、このNifDポリペプチドの5%未満が前記部位または前記領域内で切断され、より好ましくは実質的に切断されないか、切断が検出されない。このNifDポリペプチドは、配列番号18に示されているアミノ酸配列を含むNifDポリペプチドと比べて「切断に対して比較的抵抗性である」ことができ、配列番号18に示されているアミノ酸配列を含むNifDポリペプチドの少なくとも1/5の頻度で、好ましくは少なくとも1/10の頻度で切断される。

【0563】

本明細書では、「配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にある、RRNY（配列番号101）以外のアミノ酸配列」は、配列番号18のアミノ酸97～100に対応する位置にRRNYではない4個の残基を含む配列を意味する。

【0564】

本明細書では、「AnfDポリペプチド」は、保存されたドメインTIGR01861を含有していて、*Azotobacter vinelandii* AnfDポリペプチド（配列番号216；アクセッション番号WP_012703361）と少なくとも71%アミノ酸配列が、配列番号216の完全長に沿って測定するときに一致する特にオキシドレダクターゼニトロゲナーゼ保存スーパーファミリーc130843のメンバーであるNifDポリペプチドである。このアミノ酸配列を本明細書ではAnfDの参照配列として用いる。TIGR01861：AnfDは、ニトロゲナーゼ成分I α 鎖の全鉄バリエーションを表わす。したがって本明細書では、AnfDポリペプチドはNifDポリペプチドのサブセットである。AnfDポリペプチドにモリブデン型NifDポリペプチドとバナジウム型NifDポリペプチド（VnfD）は含まれず、プロトクロロフィリドまたはクロロフィリドレダ

クターゼポリペプチドも含まれない (BoydとPeters、2013年)。タンパク質配列データベースの中のAnfDポリペプチドのアミノ酸配列は通常、AnfDポリペプチドとして注釈されている。2020年1月の時点でNCBIタンパク質データベースのAnfDセットの中に156種類の具体的なアミノ酸配列が存在していた。天然のAnfDポリペプチドの例に含まれるのは、Desulfovibrio sp. DV (アクセッション番号WP_075356167; 87.47%一致)、Paenibacillus sp. FSL H7-0357 (アクセッション番号WP_038590013; 85.52%一致)、Rhodobacter capsulatus (アクセッション番号WP_023922817; 80.31%一致)、Methanosarcina acetivorans C2A (アクセッション番号WP_011021232; 77.13%一致)、およびBacteroidales bacterium Barb7 (アクセッション番号OAV73823; 71.25%一致) からのAnfDポリペプチドであり、それぞれ配列番号216を参照している。さらなる例は、McRose他 (2017年) に報告された。

10

【0565】

機能的AnfDポリペプチドは、機能的な他のNifDポリペプチドと同様、 β タンパク質 (AnfK) と δ タンパク質 (AnfG) を持つ $\alpha_2\beta_2\delta_2$ ヘテロ六量体ニトロゲナーゼの α タンパク質構造要素として機能することができ、二窒素還元のための触媒性複合体結合FeFe-coを提供する。

【0566】

本明細書では、「NifKポリペプチド」は、配列が配列番号3として示されているアミノ酸配列と少なくとも31%一致するアミノ酸を含んでいて、保存されたドメインcd01974、TIGR01286、またはcd01973の1つ以上を含むポリペプチド (その場合にはNifKポリペプチドはVnfKポリペプチドのサブクラスの中にある) または保存されたドメインTIGR02931を含有するcl02775を含むポリペプチド (その場合にはNifKポリペプチドはAnfKポリペプチドのサブクラスの中にある) を意味する。本明細書では、NifKポリペプチドに、鉄-バナジウムニトロゲナーゼからのVnfKポリペプチドと、AnfK鉄結合ポリペプチドが含まれる。天然のNifKポリペプチドは、典型的には430~530個のアミノ酸の長さを持つ。多数のNifKポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifKポリペプチドは、Klebsiella michiganensis (アクセッション番号WP_049080161.1、配列番号3と99%一致)、Raoultella ornithinolytica (WP_044347163.1、96%一致)、Klebsiella variicola (SBM87811.1、94%一致)、Kluyvera intermedia (WP_047370272.1、89%一致)、Rahnella aquatilis (WP_014333919.1、82%一致)、Tolomonas auensis (WP_012728880.1、75%一致)、Pseudomonas stutzeri (WP_011912506.1、68%一致)、Vibrio natriegens (WP_065303473.1、65%一致)、Azoarcus toluclasticus (WP_018989051.1、54%一致)、Frankia sp. (prf | | 2106319A、50%一致)、およびMethanosarcina acetivorans (WP_011021239.1、31%一致) から報告されている。データベースには「NifK」と注釈されたポリペプチドの例がいくつか存在するが、それらポリペプチドは、配列番号3との一致が31%未満だが、上に列挙されているドメインのどれも含有しないため、本明細書のNifKポリペプチドには含まれない。NifKポリペプチドは、KimとRees (1994年)、Eady (1996年)、Robson他 (1989年)、Dilworth他 (1988年)、Dilworth他 (1993年)、MillerとEady (1988年)、IgarashiとSeefeldt (2003年)、Fan

20

30

40

【0567】

鉄-モリブデンサブクラスのNifKポリペプチドはニトロゲナーゼ複合体の鍵となるサブユニットであり、これはニトロゲナーゼの中心に位置する $\alpha_2\beta_2\text{MoFe}$ タンパク質複合体の β サブユニットである。本明細書では、機能的NifKポリペプチドは、機能的ニトロゲナーゼタンパク質複合体を他の必要なサブユニット (例えばNifDやNifH) およびFeMoまたは他の補因子とで形成することのできるNifKポリペプチドである。好ましい一実施態様では、配列番号3のアミノ酸配列とアラインメントさせるとき、本発明のNifKポリペプチドのアミノ酸配列は、そのC末端にアミノ酸DLVR (配列番号58) を持ち、アルギニンがC末端のアミノ酸である。すなわち本発明のNifK融合ポリペプチドは、天然のNifKポリペプチ

50

ドと同じC末端を持つことが好ましい。つまり本発明のNifK融合ポリペプチドは、C末端に人工的な追加部を持たない。このような好ましいNifKポリペプチドは、NifDポリペプチドおよびNifHポリペプチドと機能的ニトロゲナーゼ複合体をよりよく形成することができる。

【0568】

鉄-モリブデンサブクラスのNifKポリペプチドはニトロゲナーゼ複合体の鍵となるサブユニットであり、これはニトロゲナーゼの中心に位置する $\alpha_2\beta_2\text{MoFe}$ タンパク質複合体の β サブユニットである。本明細書では、機能的NifKポリペプチドは、機能的ニトロゲナーゼタンパク質複合体を他の必要なサブユニット（例えばNifDやNifH）およびFeMoまたは他の補因子とで形成することのできるNifKポリペプチドである。好ましい一実施態様では、配列番号3のアミノ酸配列とアラインメントさせるとき、本発明のNifKポリペプチドと本発明の切断されたNifKポリペプチドのアミノ酸配列は、そのC末端にアミノ酸DLVR（配列番号58）を持ち、アルギニンがC末端のアミノ酸である。他の好ましい実施態様では、本発明のNifKポリペプチドと本発明の切断されたNifKポリペプチドのアミノ酸配列は、そのC末端に、典型的には天然のAnfK配列に存在しないアミノ酸配列DLIR（配列番号239）、DVVR（配列番号240）、DIIR（配列番号241）、DLTR（配列番号242）、またはINVW（配列番号243）を持つ。本発明のNifKポリペプチドおよびNifK融合ポリペプチドと、これらから得られる切断されたNifKポリペプチドは、天然のNifKポリペプチドと同じC末端を持つことが好ましい。すなわちそれは、C末端に人工的な追加部を持たず、天然のNifKポリペプチドとアラインメントするとき、C末端からいかなるアミノ酸も欠失していない。このような好ましいNifKポリペプチドは、NifDポリペプチドおよびNifHポリペプチドと機能的ニトロゲナーゼ複合体をよりよく形成することができる。

【0569】

本明細書では、「AnfKポリペプチド」は、保存されたドメインTIGR02931を含有していて、*Azotobacter vinelandii* AnfKポリペプチド（配列番号217；アクセッション番号WP_012703359）と少なくとも54%アミノ酸配列が、配列番号217の完全長に沿って測定するときに一致するオキシドレダクターゼニトロゲナーゼ保存スーパーファミリーcl02775のメンバーであるポリペプチドである。このアミノ酸配列を本明細書ではAnfKの参照配列として用いる。TIGR02931：AnfKは、ニトロゲナーゼ成分I β 鎖の全鉄バリエーションを表わす。本明細書では、AnfKポリペプチドとして、配列番号3と少なくとも31%アミノ酸が一致するNifKポリペプチドが可能である。他のAnfKポリペプチドは相同性がより少なく、配列番号3と25~31%しか一致しないが、それでも本発明のAnfKポリペプチドに含まれる。AnfKポリペプチドにモリブデン型NifKポリペプチドとバナジウム型NifKポリペプチド（VnfK）は含まれない。本発明のAnfK融合ポリペプチドと切断されたAnfKポリペプチドは、天然のAnfKポリペプチドと同じC末端を持つことが好ましい。すなわちそれは、C末端に人工的な追加部を持たず、天然のNifKポリペプチド（配列番号217など）とアラインメントするとき、C末端からいかなるアミノ酸も欠失していない。好ましい実施態様では、本発明のAnfK融合ポリペプチドと切断されたAnfKポリペプチドは、そのC末端にアミノ酸LNVW（配列番号244）、LNTW（配列番号245）、LNMW（配列番号246）、LAMW（配列番号247）、またはLSVW（配列番号248）を持つ。タンパク質配列データベースの中のAnfKポリペプチドのアミノ酸配列は通常、AnfKポリペプチドとして注釈されている。2020年1月の時点でNCBIタンパク質データベースのAnfKセットの中に155種類の具体的なアミノ酸配列が存在しており、これらはモリブデン型のNifKポリペプチドとVnfKポリペプチドの配列とは明確に異なっていた。天然のAnfKポリペプチドの例に含まれるのは、*Azomonas agilis*（アクセッション番号WP_144571040；91.34%一致）、*Clostridium* sp. BL-8（アクセッション番号WP_077859050；78.35%一致）、*Lucifera butyrica*（アクセッション番号WP_122630336；62.34%一致）、および*Rhodoblastus acidophilus*（アクセッション番号WP_088520366；54%一致）からのAnfKポリペプチドであり、それぞれ配列番号217を参照している。

【0570】

機能的AnfKポリペプチドは、機能的な他のNifKポリペプチドと同様、 α タンパク質構造要素（AnfD）と δ タンパク質構造要素（AnfG）を有する $\alpha_2\beta_2\delta_2$ ヘテロ六量体ニトロゲナーゼの β タンパク質構造要素として機能し、FeFe-co上に二窒素還元のための活性部位を有する複合体を形成することができる。

【0571】

天然の細菌の中のNifBポリペプチドは、[4Fe-4S]クラスターをNifB-co（中心にC原子を持つ核性がより高いFe-Sクラスターであり、FeMo-co、FeV-co、およびFeFe-coを合成するための前駆体として機能する）に変換するタンパク質である（Guo他、2016年）。したがってNifBは、FeMo-co、FeV-co、およびFeFe-coの合成経路における第1の関与工程の触媒となるため、ニトロゲナーゼの機能にとって不可欠である。NifBのNifB-co産物はNifE-NifN複合体に結合することができ、メタロクラスター担体タンパク質NifXによるNifBからNifE-NifNへの往復輸送が可能である。

【0572】

本明細書では、「NifBポリペプチド」は、アミノ酸配列が配列番号4として示されているアミノ酸配列と少なくとも27%一致するアミノ酸を含むポリペプチドを意味する。大半のNifBポリペプチドは、保存されたドメインTIGR01290、NifBの保存されたドメインcd00852、NifX-NifBスーパーファミリーの保存されたドメインcl00252、およびRadical_SAMの保存されたドメインcd01335のうちの1つ以上を含んでいる。本明細書では、NifBポリペプチドに、NifB機能を持つと注釈されているがこれらドメインの1つを持たない天然のポリペプチドが含まれる。クレブシエラ属、アゾトバクター属、リゾビウム属、ブラディリゾビウム属、および他の細菌からのNifBポリペプチドはC末端NifX様伸長部を持つのに対し、大半の古細菌のNifBポリペプチドはNifX様ドメインを欠いているため、「切断型NifBポリペプチド」と呼ばれる。天然のNifBポリペプチドは、典型的には、440~500個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約50 kDaの分子量を持つ。多数のNifBポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifBポリペプチドは、*Raoultella ornithinolytica*（アクセッション番号WP_041145602.1、配列番号4と91%一致）、*Kosakonia radicincitans*（WP_043953592.1、80%一致）、*Dickeya chrysanthemi*（WP_040003311.1、76%一致）、*Pectobacterium atrosepticum*（WP_011094468.1、70%一致）、*Brenneria goodwinii*（WP_048638849.1、63%一致）、*Halorhodospira halophila*（WP_011813098.1、59%一致、NifXドメインを欠く）、*Methanosarcina barkeri*（WP_048108879.1、50%一致、NifXドメインを欠く）、*Clostridium purinilyticum*（WP_050355163.1、40%一致、NifXドメインを欠く）、および*Desulfovibrio salexigens*（WP_015850328.1、27%一致）から報告されている。本明細書では、「機能的NifBポリペプチド」は、[4Fe-4S]クラスターからNifB-coを形成することのできるNifBポリペプチドである。機能的NifBは、その機能のためにS-アデノシル-メチオニン（SAM）を必要とする。NifBポリペプチドは、Curatti他（2006年）とAllen他（1995年）に記載され、概説されている。

【0573】

Boydら（2011年）は、40の分類群からのAnf/Vnf/NifDKENとNifBの関係を調べ、以下の結論を下した。すなわち、（1）C末端NifXドメインを欠くNifBをコードするNifKクラスターの水平な遺伝子伝播がメタノサルキナ目の中のメタン菌の先祖から嫌気性フィルミクテスの先祖へと起こり、これら2つの生物が嫌気性環境で共存してモリブデンを利用できるようになり、（2）この水平な遺伝子伝播イベントの後、NifBとNifXの融合がフィルミクテスの中で起こり、そこから窒素固定菌の系譜が進化した。この理論を支持する以下の証拠が提示された。すなわち、（1）メタン生成古細菌（メタノコックス目、メタノサルシナ目、およびメタノバクテリウム目）のどれも、C末端NifXドメインを有するNifBを持たない、（2）メタノバクテリウム目とメタノコックス目からのNifB配列は、メタノサルシナ目と細菌のNifB配列からの初期分岐を示す、（3）C末端NifXドメインのないNifBを持つ嫌気性のフィルミクテス、クロロフレクサス、およびプロテオバクテリアのいく

つかは、初期に、おそらくNifの水平な遺伝子伝播イベントのしばらく後に、フィルミクテス系譜から分岐した。

【0574】

NifBポリペプチドの中にC末端NifXドメインが存在しているか不在であるかを判断するため、Constraint-based Multiple Alignment Tool (COBALT、NCBI、www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) を用いてNifBアミノ酸配列を代表的なNifB配列（例えば*Klebsiella michiganensis* NifB（アクセッション番号P10930）、*Klebsiella michiganensis* NifX（KZT46636.1）、NifY（KZT46633.1）、*A. vinelandii* NifX（AGK13791.1）、NifY（AGK13792.1）、NafY（AGK13761.1）、およびNifX/NifY/NafY/VnfXファミリータンパク質（AGK14217.1）からの配列）とアラインメントさせることができる。各配列内の「ジニトロゲナーゼFeMo-補因子結合部位」（PfamファミリーPF02579）は、期待値を10に設定したPfam-Aデータベースを用いてPfamScan（EMBL-EBI、www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/pfamscan/）によって同定することができる。

10

【0575】

NifEN複合体は、ジニトロゲナーゼを正確に組み立てるのに必要とされる足場複合体であり（NifB-coが成熟してFeMo-coになる足場として機能するが、このプロセスはNifH機能も必要とする）、ジニトロゲナーゼと構造が似てもある（Fay他、2016年）。NifEN複合体は、NifEとNifNそれぞれの2つのサブユニットからなり、ヘテロ四量体を形成する（本明細書では $EN\alpha_2\beta_2$ と呼ぶ）。天然の細菌の中のNifEポリペプチドは、NifNポリペプチドとの $EN\alpha_2\beta_2$ 四量体の α サブユニットであるポリペプチドであり、この $EN\alpha_2\beta_2$ 四量体はFeMo-coの合成に必要であり、表面でFeMo-coが合成される足場としての機能が提案されている。

20

【0576】

本明細書では、「NifEポリペプチド」は、配列が配列番号5として示されているアミノ酸配列と少なくとも32%一致するアミノ酸を含むとともに、ドメインTIGR01283とPRK14478の一方または両方を含むポリペプチドを意味する。TIGR01283ドメインタンパク質ファミリーのメンバーは、スーパーファミリーcl02775のメンバーでもある。天然のNifEポリペプチドは、典型的には、440~490個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約50 kDaの分子量を持つ。多数のNifEポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifEポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis*（アクセッション番号WP_049114606.1、配列番号5と99%一致）、*Klebsiella variicola*（SBM87755.1、92%一致）、*Dickeya paradisiaca*（WP_012764127.1、89%一致）、*Tolomonas auensis*（WP_012728883.1、75%一致）、*Pseudomonas stutzeri*（WP_003297989.1、69%一致）、*Azotobacter vinelandii*（WP_012698965.1、62%一致）、*Trichormus azollae*（WP_013190624.1、55%一致）、*Paenibacillus durus*（WP_025698318.1、50%一致）、*Sulfuricurvum kujense*（WP_013460149.1、44%一致）、*Methanobacterium formicicum*（AIS31022.1、39%一致）、*Anaeromusa acidaminophila*（WP_018701501.1、35%一致）、および*Megasphaera cerevisiae*（WP_048514099.1、32%一致）から報告されている。本明細書では、「機能的NifEポリペプチド」は、NifNと合わさって機能的四量体を形成することのできるNifEポリペプチドであり、この複合体はFeMo-coを合成することができる。FeMo-coの合成には他のポリペプチド（NifHとNifBが含まれる）が関与しており、NifXが関与する可能性がある。NifEポリペプチドは、Fay他（2016年）、Hu他（2005年）、Hu他（2006年）、およびHu他（2008年）に記載され、概説されている。

30

40

【0577】

天然の窒素固定菌の中のNifFポリペプチドは、NifHへの電子供与体であるフラボドキシンである。本明細書では、「NifFポリペプチド」は、配列が配列番号6として示されているアミノ酸配列と少なくとも34%一致するアミノ酸を含むとともに、*Azobacter*と他の細菌属PRK09267からのNifタンパク質で見いだされたフラボドキシン長ドメインドメインT

50

IGR01752とフラボドキシンFLDAドメインの一方または両方を含むポリペプチドを意味する。NifFポリペプチドには、非窒素固定菌におけるピルビン酸ギ酸リアーゼ活性化とコバロリン依存性メチオニンシンターゼ活性に関連するフラボドキシンが包含されるが、より広い機能に關与する他のフラボドキシンは除外される。天然のNifFポリペプチドは、典型的には160~200個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約19 kDaの分子量を持つ。多数のNifFポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifFポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis* (アクセッション番号WP_004122417.1、配列番号6と99%一致)、*Klebsiella variicola* (WP_040968713.1、85%一致)、*Kosakonia radicincitans* (WP_035885760.1、76%一致)、*Dickeya chrysanthemi* (WP_039999438.1、72%一致)、*Brenneria goodwinii* (WP_048638838.1、62%一致)、*Methylobacterium methanica* (WP_064006977.1、56%一致)、*Azotobacter vinelandii* (WP_012698862.1、50%一致)、*Chlorobaculum tepidum* (WP_010933399.1、39%一致)、*Campylobacter showae* (WP_002949173.1、37%一致)、および*Azotobacter chromococcum* (WP_039801725.1、34%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifFポリペプチド」は、NifHポリペプチドへの電子供与体になることのできるNifFポリペプチドである。NifFポリペプチドは、Drummond (1985年) に記載され、概説されている。

【0578】

本明細書では、「AnfGポリペプチド」は、保存されたドメインTIGR02929を含有するとともに、*Azotobacter vinelandii* AnfGポリペプチド (配列番号219; アクセッション番号WP_012703360) と少なくとも42%アミノ酸配列が、配列番号219の完全長に沿って測定するときに一致するニトロゲナーゼ保存スーパーファミリーcl03910 (pfam03139-AnfG) のメンバーである。このアミノ酸配列を本明細書ではAnfGの参照配列として用いる。TIGR02929は、ニトロゲナーゼ成分I δ 鎖の全鉄バリエーションを表わす。AnfGポリペプチドにバナジウム型NifGポリペプチド (VnfG) は含まれない。タンパク質配列データベースの中のAnfGポリペプチドのアミノ酸配列は通常、AnfGポリペプチドとして注釈されている。2020年1月の時点でNCBIタンパク質データベースのAnfGセットの中に150種類の具体的なアミノ酸配列が存在していた。天然のAnfGポリペプチドの例に含まれるのは、*Azomonas agilis* (アクセッション番号WP_144571041; 84.73%一致)、*Firmicutes bacterium* (アクセッション番号HBE76208; 70.37%一致)、*Sporomusa term* itida (アクセッション番号WP_144349445; 68.75%一致)、*Rhodovulum viride* (アクセッション番号WP_112317428; 57.14%一致)、および*Megasphaera cerevisiae* (アクセッション番号WP_048515315; 42.86%一致) からのAnfGポリペプチドであり、それぞれ配列番号219を参照している。

【0579】

機能的AnfGポリペプチドは、 $\alpha_2\beta_2\delta_2$ ヘテロ六量体ニトロゲナーゼの δ タンパク質構造要素として機能することができる。

【0580】

天然の細菌の中のNifJポリペプチドは、NifHへの電子供与体であるピルビン酸：フラボドキシン (フェレドキシン) オキシドレダクターゼである。本明細書では、「NifJポリペプチド」は、配列が配列番号7として示されているアミノ酸配列と少なくとも40%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR02176を含むポリペプチドを意味する。天然のNifJポリペプチドは、典型的には1100~1200個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約128 kDaの分子量を持つ。多数のNifJポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifJポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis* (アクセッション番号WP_024360006.1、配列番号7と99%一致)、*Raoultella ornithinolytica* (WP_044347157.1、95%一致)、*Klebsiella quasipneumoniae* (WP_050533844.1、92%一致)、*Kosakonia oryzae* (WP_064566543.1、82%一致)、*Dickeya solani* (WP_057084649.1、78%一致)、*Rahnella aquatilis* (WP_014683040.1、72%一致)、*Thermoanaerobacter mathr*

anii (WP_013149847.1、64%一致)、*Clostridium botulinum* (WP_053341220.1、60%一致)、*Spirochaeta africana* (WP_014454638.1、52%一致)、および *Vibrio cholerae* (CSA83023.1、40%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifJポリペプチド」は、NifHポリペプチドへの電子供与体であることができるNifJポリペプチドである。NifJポリペプチドは、Schmitz他(2001年)に記載され、概説されている。

【0581】

天然の細菌の中のNifMポリペプチドは、NifHポリペプチドのすべてではなくていくつかの成熟に必要なポリペプチドである。NifMがないと、*K. oxytoca* NifHは、異種性発現させたとき、大腸菌(*E. coli*)と酵母の中に低レベルでしか存在していなかったため、NifD-NifKに電子を供与することができなかった。本明細書では、「NifMポリペプチド」は、配列が配列番号8として示されているアミノ酸配列と少なくとも26%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR02933を含むポリペプチドを意味する。NifMポリペプチドは、プロリンイミドペプチド結合のシス-トランス異性化を触媒することによってタンパク質の折り畳みを促進する一群の酵素であるペプチジル-プロピルシス-トランスイソメラーゼ(PPIアーゼ)と相同であり、PpiC型ドメインを持つため、いくつかのNifHポリペプチド(その中に少なくともいくつかのVnfHとAnfHポリペプチドが含まれる)に比べてのアクセサリタンパク質であるように見える。天然のNifMポリペプチドは、典型的には240~300個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約30 kDaの分子量を持つ。多数のNifMポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifMポリペプチドは、*Klebsiella oxytoca* (アクセッション番号WP_064342940.1、配列番号8と99%一致)、*Klebsiella michiganensis* (WP_004122413.1、97%一致)、*Raoultella ornithinolytica* (WP_044347181.1、85%一致)、*Klebsiella variicola* (WP_063105800.1、75%一致)、*Kosakonia radicincitans* (WP_035885759.1、59%一致)、*Pectobacterium atrosepticum* (WP_011094472.1、42%一致)、*Brenneria goodwinii* (WP_048638837.1、33%一致)、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CAA75544.1、28%一致)、*Marinobacterium* sp. AK27 (WP_051692859.1、27%一致)、および *Teredinibacter turnerae* (WP_018415157.1、26%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifMポリペプチド」は、NifHポリペプチドの成熟のためにNifHポリペプチドと複合体になることのできるNifMポリペプチドである。NifMポリペプチドは、Petrova他(2000年)に記載され、概説されている。

【0582】

天然の細菌の中のNifNポリペプチドは、NifEポリペプチドとの $EN\alpha_2\beta_2$ 四量体の β サブユニットであり、この $EN\alpha_2\beta_2$ 四量体は、FeMo-coの合成に必要とされ、表面でFeMo-coが合成される足場としての機能が提案されている。本明細書では、「NifNポリペプチド」は、(i) 配列が配列番号9として示されているアミノ酸配列と少なくとも76%一致するアミノ酸を含むポリペプチド、および/または(ii) 配列が配列番号9として示されているアミノ酸配列と少なくとも34%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR01285、cd01966、およびPRK14476の1つ以上を含むポリペプチドを意味する。NifNは構造がモリブデン-鉄タンパク質 β 鎖NifKと関係している。保存されたTIGR01285を含むポリペプチドは、NifNポリペプチドの大半の例をカバーするが、いくつかのNifNポリペプチド、例えば *Chlorobium tepidum* の推定NifNは除外されるため、NifNの定義は、保存されたTIGR01285ドメインを含むポリペプチドに限定されない。PRK14476ドメインタンパク質ファミリーのメンバーはスーパーファミリーcl02775のメンバーでもある。天然のNifNポリペプチドは、典型的には410~470個のアミノ酸の長さを持つが、自然界でNifEに融合しているときには約900個のアミノ酸残基であり、この天然の単量体は約50 kDaの分子量を持つ。多数のNifMポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifNポリペプチドは、*Klebsiella oxytoca* (アクセッション番号WP_064391778.1、配列番号9と97%一致)、*Kluyvera int*

10

20

30

40

50

ermedia (WP_047370268.1、80%一致)、Rahnella aquatilis (WP_014683026.1、70%一致)、Brenneria goodwinii (WP_048638830.1、65%一致)、Methylobacter tundripaludum (WP_027147663.1、46%一致)、Calothrix parietina (WP_015195966.1、41%一致)、Zymomonas mobilis (WP_023593609.1、37%一致)、Paenibacillus massiliensis (WP_025677480.1、35%一致)、および Desulfitobacterium hafniense (WP_018306265.1、34%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifNポリペプチド」は、NifEと合わさって機能的四量体を形成することのできるNifNポリペプチドであり、この複合体はFeMo-coを合成することができる。NifNポリペプチドは、Fay他(2016年)、Brigle他(1987年)、Fani他(2000年)、およびHu他(2005年)に記載され、概説されている。

10

【0583】

天然の細菌の中のNifQポリペプチドは、おそらく初期 MoO_4^{2-} プロセッシングにおいてFeMo-coの合成に関与するポリペプチドである。保存されたC末端システイン残基が金属の結合に関与する可能性がある。本明細書では、「NifQポリペプチド」は、配列が配列番号10として示されているアミノ酸配列と少なくとも34%一致するアミノ酸を含んでいて、CLO4826ドメインタンパク質ファミリーとpfam04891ドメインタンパク質ファミリーのメンバーであるポリペプチドを意味する。天然のNifQポリペプチドは、典型的には160~250個のアミノ酸の長さを持つが、350個のアミノ酸残基という長さが可能であり、この天然の単量体は約20 kDaの分子量を持つ。多数のNifQポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifQポリペプチドは、Klebsiella oxytoca (アクセッション番号WP_064391765.1、配列番号10と95%一致)、Klebsiella variicola (CTQ06350.1、75%一致)、Kluyvera intermedia (WP_047370257.1、63%一致)、Pectobacterium atrosepticum (WP_043878077.1、59%一致)、Mesorhizobium metallidurans (WP_008878174.1、46%一致)、Rhodopseudomonas palustris (WP_011501504.1、42%一致)、Paraburkholderia sprentiae (WP_027196569.1、41%一致)、Burkholderia stabilis (GAU06296.1、39%一致)、およびCupriavidus oxalaticus (WP_063239464.1、34%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifQポリペプチド」は、 MoO_4^{2-} のプロセッシングが可能なNifQポリペプチドである。NifQポリペプチドは、Allen他(1995年)とSiddavattam他(1993年)に記載され、概説されている。

20

30

【0584】

天然の細菌の中のNifSポリペプチドは、鉄-硫黄(FeS)クラスターの生合成に関与するシステインデスルフラナーゼであり、例えばFe-Sクラスターの合成と修復に硫黄を動員することに関与する。本明細書では、「NifSポリペプチド」は、(i) 配列が配列番号19として示されているアミノ酸配列と少なくとも90%一致するアミノ酸を含むポリペプチド、および／または(ii) 配列が配列番号19として示されているアミノ酸配列と少なくとも36%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR03402とCOG1104の一方または両方を含むポリペプチドを意味する。TIGR03402ドメインタンパク質ファミリーには、拡張された窒素固定系にほぼ常に見いだされる分岐群に加え、この第1の分岐群よりもIscSとより密接に関係しているNifS様／NifU様系の一部でもある第2の分岐群が含まれる。TIGR03402ドメインタンパク質ファミリーは、代わりにTIGR03403の中に構築されたイプシロンプロテオバクテリア(例えば文献ではNifSとも名づけられているHelicobacter pylori)に見いだされるより遠い分岐群には拡張されない。COG1104ドメインタンパク質ファミリーには、システインスルフィナーゼ／システインデスルフラナーゼ、または関連する酵素が含まれる。いくつかのNifSポリペプチドは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼドメインcl18945を含む。天然のNifSポリペプチドは、典型的には370~440個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約43 kDaの分子量を持つ。多数のNifSポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifSポリペプチドは、Klebsiella michiganensis (アクセッション番号WP_004138780.1、配列番号19と99%一致)、Raoultella terrigena (W

40

50

P_045858151.1、89%一致)、*Kluyvera intermedia* (WP_047370265.1、80%一致)、*Rahnella aquatilis* (WP_014333911.1、73%一致)、*Agarivorans gilvus* (WP_055731597.1、64%一致)、*Azospirillum brasilense* (WP_014239770.1、60%一致)、*Desulfosarcina cetonica* (WP_054691765.1、55%一致)、*Clostridium intestinale* (WP_021802294.1、47%一致)、*Clostridiisalibacter paucivorans* (WP_026894054.1、36%一致)、および*Bacillus coagulans* (WP_061575621.1、42%一致しておりCOG1104の中にある)から報告されている。本明細書では、「機能的NifSポリペプチド」は、鉄-硫黄(Fe-S)クラスターの生合成および/または修復において機能することのできるNifSポリペプチドである。NifSポリペプチドは、Clausen他(2000年)、Johnson他(2005年)、Olson他(2000年)、およびYuvaniyama他(2000年)に記載され、概説されている。

10

【0585】

天然の細菌の中のNifUポリペプチドは、ニトロゲナーゼ成分の鉄-硫黄(FeS)クラスターの生合成に関与する分子足場ポリペプチドである。本明細書では、「NifUポリペプチド」は、配列が配列番号12として示されているアミノ酸配列と少なくとも31%一致するアミノ酸を含むとともに、ドメインTIGR02000を含むポリペプチドを意味する。TIGR02000ドメインタンパク質ファミリーのメンバーは特にニトロゲナーゼの成熟に関与する。NifUは、N末端ドメイン(pfam01592)とC末端ドメイン(pfam01106)を含む。互いに異なっているが相同な3つのFe-Sクラスター組み立て系、すなわちIsc、Suf、およびNifが記載されている。Nif系(NifUはその一部である)は、多数の窒素固定種においてFe-Sクラスターをニトロゲナーゼに供与することに関係している。ヘリコバクター属およびカンピロバクター属と同等なドメインアーキテクチャを持つIscホモログとSufホモログは、本明細書のNifUの定義からは除外されるため、ニトロゲナーゼの成熟に関与するNifUポリペプチドに特異的である。NifUのN末端領域のホモログを含む(例えば大腸菌と*Saccharomyces cerevisiae*と*Homo sapiens*からの)IscUタンパク質である関連するTIGR01999ドメインタンパク質ファミリーのメンバーも、本明細書のNifUの定義からは除外される。天然のNifUポリペプチドは、典型的には260~310個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約29 kDaの分子量を持つ。多数のNifUポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifUポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis* (アクセッション番号WP_049136164.1、配列番号12と97%一致)、*Klebsiella variicola* (WP_050887862.1、90%一致)、*Dickeya solani* (WP_057084657.1、80%一致)、*Brenneria goodwinii* (WP_048638833.1、73%一致)、*Tolomonas auensis* (WP_012728889.1、66%一致)、*Agarivorans gilvus* (WP_055731596.1、58%一致)、*Desulfocurvus vexinensis* (WP_028587630.1、54%一致)、*Rhodopseudomonas palustris* (WP_044417303.1、49%一致)、*Helicobacter pylori* (WP_001051984.1、31%一致)、および*Sulfurovum* sp. PC08-66 (KIM05011.1、31%一致)から報告されている。本明細書では、「機能的NifUポリペプチド」は、鉄-硫黄(Fe-S)クラスター生合成に関与する分子足場ポリペプチドとして機能することのできるNifUポリペプチドである。NifUポリペプチドは、Hwang他(1996年)、Muhlenhoff他(2003年)、およびOuzounis他(1994年)に記載され、概説されている。

20

30

40

【0586】

NifSは、ピリドキサルリン酸(PLP、ビタミンB6)依存性システインデスルフラゼであり、システインからFe-Sクラスターを合成するのに必要な無機スルフィドを生成させる。この反応は、副生成物としてアラニンを生産させる。この反応は、システイン-PLP付加物上の非常に保存されたシステイン残基(*Azotobacter vinelandii*の中のCys325)の求核攻撃によって形成されるタンパク質結合システインペルスルフィド中間体を通じて進行する(Zheng他、1994年)。このスルフィドがNifUに提供されて、 $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターと $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターが順番に形成される。NifS酵素は、細菌の中でホモ二量体として機能する。

50

【0587】

NifUはホモ二量体として機能し、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを形成するための足場を提供する。NifUポリペプチドは、3つのドメイン、すなわちN末端足場ドメイン、中央ドメイン、およびC末端足場ドメインを含有している（Smith他、2005年）。N末端ドメインは、細菌からのIscUタンパク質および真核生物からのIsuタンパク質との配列相同性が大きい。C末端ドメインは、ミトコンドリアと葉緑体に見いだされるNfuタンパク質と相同である。中央ドメインは、安定性が理由で他のNifタンパク質に移らないと考えられる恒久的レドックス活性 $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ クラスターをNifUサブユニット1つにつき1つ含有している。このクラスターは4個の保存されたシステイン残基（*A. vinelandii* NifU 中のCys137、139、172、および175）によって配位結合すると考えられる（Fu他、1994年）。NifUはホモ二量体を形成し、そのN末端ドメインは、単量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターに結合することができる。単量体中の $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターは還元融合してNifU二量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを形成することができる。その後、一対の $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターがNifUからNifBに供給されてプロセッシングを受け、NifB上の8Feコアになり、それがその後FeMocoの合成に使用される。Fe-Sクラスターのための分岐経路では、NifUのN末端またはC末端足場ドメインのどちらかに結合した1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターがアポ-NifHに移されてNifHタンパク質であるニトロゲナーゼレダクターゼが成熟する（Smith他、2005年）。NifUはまた2つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターNifD-NifKタンパク質複合体に供与すること（本明細書ではステージ0 D-Kと名づける）と、NifHがそのクラスターのペアを縮合させて成熟Pクラスター $[\text{Fe}_8\text{S}_7]$ にすることが提案されてきた（Dos Santos他、2004年）。これらN末端クラスターは極端に不安定であると考えられており、精製中に保持されない（Smith他、2005年）。C末端ドメインは単量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを保持することができる。N末端クラスターとは異なってC末端 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターの組み立ては迅速であり、中間体 $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターは検出されていない（Smith他、2005年）。C末端クラスターはN末端クラスターよりも安定であるため、精製中に保持することができる。しかし亜ジチオン酸塩で還元すると、C末端クラスターは急速に分解される（Smith他、2005年）。Dos Santosと共同研究者は、NifUの中でのシステインからアラニンへの変異を利用してN末端クラスターとC末端クラスターの両方をアポ-NifHに移せることを示した。

【0588】

Lopez-Torrejonら（2016年）は、NifHとNifMの両方の発現を通じ、ホロNifD-NifKに電子を供与することのできるNifHタンパク質を酵母ミトコンドリアの中で産生させることを報告した。彼らは、酵母細胞において、NifSとNifUが、この機能を持つNifHタンパク質の産生に必要とされないことを見いだした。彼らは、酵母細胞の中の内在性鉄硫黄クラスター組み立て経路（おそらくは、酵母内の互いに関連したタンパク質である、ミトコンドリアに位置するNfs1タンパク質とNfu1タンパク質）が、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターをNifHに供与できると結論した。したがってNifSとNifUは、酵母の中でNifHタンパク質、Feタンパク質、またはジニトロゲナーゼレダクターゼを再構成するのには必要とされないであろうが、NifSとNifUは、NifBおよび／またはNifD-NifKの成熟と機能には必要とされる可能性がある。植物ミトコンドリアが、ニトロゲナーゼ活性にとって十分な $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを形成する同様な内在能力を有するかどうかは未知である。

【0589】

天然の細菌の中のNifVポリペプチドはホモクエン酸シンターゼ（EC2.3.3.14）であり、アセチル-コエンザイムA（アセチル-CoA）からアセチル基を2-オキソグルタル酸に転移することによってホモクエン酸を生成させる。その後ホモクエン酸は、FeMo-co、FeV-co、およびFeFe-coの合成に使用される。本明細書では、「NifVポリペプチド」は、配列が配列番号13として示されているアミノ酸配列と少なくとも39%一致するアミノ酸を含むとともに、ドメインTIGR02660とDRE_TIMの両方を含むポリペプチドを意味する。TIGR02660ドメインタンパク質ファミリーのメンバーは、窒素固定以外のプロセスに関連する2-イソプロピルマレイン酸シンターゼ、(R)-シトラマレイン酸シンターゼ、およびホ

モクエン酸シンターゼを含む酵素と相同である。cd07939ドメインタンパク質ファミリーは、*Heliobacterium chlorum*と*Gluconacetobacter diazotrophicus*のNifVタンパク質も含んでおり、これらはFrbCとオーソログであるように見える。このファミリーはDRE-TIMメタロリアーゼスーパーファミリーに属する。DRE-TIMメタロリアーゼには、2-イソプロピルマレイン酸シンターゼ (IPMS)、アルファ-イソプロピルマレイン酸シンターゼ (LeuA)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAリアーゼ、ホモクエン酸シンターゼ、シトラマレイン酸シンターゼ、4-ヒドロキシ-2-オキソ吉草酸アルドラーゼ、re-クエン酸シンターゼ、トランスカルボキシラーゼ5S、ピルビン酸カルボキシラーゼ、AksA、およびFrbCが含まれる。これらのメンバーはすべて、8つのアルファ螺旋によって取り囲まれた閉鎖バレルを形成する8本の平行なベータ鎖を有するコアベータ(8)-アルファ(8)モチーフからなる保存されたトリオースリン酸イソメラーゼ (TIM) バレルドメインを共有している。このドメインは、バレルのコアにキャップを被せる不変残基のクラスターによって形成される2価カチオン結合部位を含有する触媒中心を有する。それに加え、この触媒部位は、「DRE-TIM」という名称のドメインのための基礎であり、3つの不変残基、すなわちアスパラギン酸 (D)、アルギニン (R)、およびグルタミン酸 (E) を含む。天然のNifVポリペプチドは、典型的には長さが360~390個のアミノ酸だが、いくつかのメンバーは長さが約490個のアミノ酸残基であり、この天然の単量体は約41 kDaの分子量を持つ。多数のNifVポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開データベースで入手できる。例えばNifVポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis* (アクセッション番号WP_049083341.1、配列番号13と95%一致)、*Raoultella ornithinolytica* (WP_045858154.1、86%一致)、*Kluyvera intermedia* (WP_047370264.1、81%一致)、*Dickeya dadantii* (WP_038912041.1、70%一致)、*Brenneria goodwinii* (WP_048638835.1、59%一致)、*Magnetococcus marinus* (WP_011712856.1、46%一致)、*Sphingomonas wittichii* (WP_037528703.1、43%一致)、*Frankia* sp. E15c (OAA29062.1、41%一致)、および*Clostridium* sp. Maddingley MBC34-26 (EKQ56006.1、39%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NifVポリペプチド」は、ホモクエン酸シンターゼとして機能することのできるNifVポリペプチドである。NifVポリペプチドは、Hu他 (2008年)、Lee他 (2000年)、Masukawa他 (2007年)、およびZheng他 (1997年) に記載され、概説されている。

【0590】

*Azotobacter vinelandii*の中のNifXポリペプチドはNifB-co ($\text{Fe}_6\text{-S}_9\text{-C}$) に結合し、それがNifE-NifNに移されてFeMo-coが組み立てられる (Hernandez他、2007年)。NifE-NifNの間でVK-クラスター ($\text{Fe}_8\text{-S}_9\text{-C}$ または $\text{Mo-Fe}_7\text{-S}_9\text{-C}$ 、Jimenez-Vincente他、2015年) を交換することも示されている。これは、FeMo-co前駆体のための一時的なリザーバとしてのNifE-NifNの役割を示唆する。Hernandezら (2007年) は、NifXが、FeMo-coをアポ-NifD-NifKに移動させている間にNifE-NifN複合体またはNifD-NifK複合体を安定化させるシャペロンとして作用する可能性、および／またはこれらタンパク質をFeMocoにとって有利な向きに再配置してFeMocoの合成を調節するように作用する可能性を報告した。異なるアクセサリタンパク質の組み合わせであるNifY/NafY/NifXが欠けた*A. vinelandii*変異体から抽出されたジニトロゲナーゼを有する外来FeMo-coによるアポ-NifD-NifKの活性化は、NifXがアポ-NifD-NifKのFeMo-co挿入も支援できることを示していた (Rubio他、2002年)。NifXのこの追加機能は、Homerら (1993年) によって示された*Klebsiella nifY*変異体におけるアセチレン還元活性の保持にとって重要である可能性がある。

【0591】

天然の細菌の中のNifXポリペプチドはFeMo-coの合成に関与するポリペプチドであり、少なくともFeMo-co前駆体をNifBからNifE-NifNへ、またはFeMo-coをNifD-NifKへ転移させるのを助ける。本明細書では、「NifVポリペプチド」は、配列が配列番号14として示されているアミノ酸配列と少なくとも29%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR02663とcd00853の一方または両方を含むポリペプチドを意味する。Ni

fXは、いくつかのNifB配列とNifYを含む鉄-モリブデンクラスター結合タンパク質のより大きなファミリーに含まれるため、NifX、NafY、およびいくつかのNifBポリペプチドのC末端領域はすべてpfam02579ドメインを含み、それぞれが、FeMo-co、FeV-co、またはFeFe-coの1つ以上またはすべての合成に関与する。他のNifBポリペプチド、特にメタン生成古細菌といくつかの嫌気性フィルミクテスからのもの（上に言及した*H. halophila*、*M. barkeri*、および*C. purinilyticum*からのNifBが含まれる）は、NifX様ドメインを欠いている（Boyd他、2011年）。いくつかのNifXポリペプチドはデータベースにおいてNifYと注釈されており、逆も同様である。天然のNifXポリペプチドは、それ自体は天然の融合体としてよりもNifBポリペプチドの一部として産生され、典型的には110~160個のアミノ酸の長さを持ち、この天然の単量体は約15 kDaの分子量を持つ。多数のNifXポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifXポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis*（アクセッション番号WP_049070199.1、配列番号14と97%一致）、*Klebsiella oxytoca*（WP_064342937.1、97%一致）、*Raoultella ornithinolytica*（WP_044347173.1、91%一致）、*Klebsiella variicola*（WP_044612922.1、83%一致）、*Kosakonia radicincitans*（WP_043953583.1、75%一致）、*Dickeya chrysanthemi*（WP_039999416.1、68%一致）、*Rahnella aquatilis*（WP_047608097.1、58%一致）、*Azotobacter chroococcum*（WP_039800848.1、34%一致）、*Beggiatoa leptomitiformis*（WP_062149047.1、33%一致）、および*Methyloversatilis discipulorum*（WP_020165972.1、29%一致）から報告されている。本明細書では、「機能的NifXポリペプチド」は、FeMo-co前駆体をNifBからNifD-NifKに移すことのできるNifXポリペプチドである。NifXポリペプチドは、Allen他（1994年）とShah他（1999年）に記載され、概説されている。

【0592】

天然の細菌の中のNifYポリペプチドはFeMo-coの合成に関与するポリペプチドであり、少なくともFeMo-co前駆体をNifBからNifE-NifNに移すのを助ける。本明細書では、「NifYポリペプチド」は、配列が配列番号15として示されているアミノ酸配列と少なくとも34%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインTIGR02663とcd00853の一方または両方を含むポリペプチドである。NifYは、いくつかのNifB配列とNifYを含む鉄-モリブデンクラスター結合タンパク質のより大きなファミリーに含まれるため、NifX、NafY、およびいくつかのNifBポリペプチドのC末端領域はすべてpfam02579ドメインを含み、それぞれが、FeMo-coの合成に関与する。多数のNifYポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開されているデータベースで入手できる。例えばNifYポリペプチドは、*Klebsiella michiganensis*（アクセッション番号WP_049089500.1、配列番号15と99%一致）、*Klebsiella oxytoca*（WP_064342935.1、98%一致）、*Klebsiella quasipneumoniae*（WP_044524054.1、90%一致）、*Klebsiella variicola*（WP_049010739.1、81%一致）、*Kluyvera intermedia*（WP_047370270.1、69%一致）、*Dickeya chrysanthemi*（WP_039999411.1、62%一致）、*Serratia* sp. ATCC 39006（WP_037382461.1、57%一致）、*Rahnella aquatilis*（WP_014683024.1、47%一致）、*Pseudomonas putida*（AEX25784.1、37%一致）、および*Azotobacter vinelandii*（WP_012698835.1、34%一致）から報告されている。本明細書では、「機能的NifYポリペプチド」は、FeMo-co前駆体をNifBからNifE-NifNに移すことのできるNifYポリペプチドである。

【0593】

アポ-NifD-NifKは、*K. oxytoca*または*A. vinelandii*のNifB変異株またはNifN-NifE変異株から単離されるとき、 γ タンパク質と呼ばれる追加ポリペプチドと会合していて（Paustian他、1990年；Homer他、1993年）、NifDポリペプチドおよびNifKポリペプチドとヘテロ六量体（ $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ）を形成する。*K. oxytoca*では、第3のポリペプチドがNifY遺伝子によってコードされており（Homer他、1993年）、触媒活性なニトロゲナーゼを生成させるには、精製されたFeMo-coを精製された六量体 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 複合体に添加すれば

十分であった。FeMo-coを添加した結果としてNifYが複合体から解離し、ホロ酵素 ($\alpha_2\beta_2$) が形成された。A. vinelandiiでは、第3のポリペプチドは、A. vinelandiiにおけるNifY遺伝子 (アクセッション番号AGK13792) の産物とは異なるが関係しており、NafY遺伝子 (ニトロゲナーゼ関連因子Y; アクセッション番号AGK13761、Rubio他、2002年) によってコードされていた。それぞれのケースにおける第3のポリペプチドは、FeMo-coを挿入して活性な酵素を形成するのを助けることに関与すると考えられた。これは、NafYとNifYがFeMo-coに結合する能力によって支持された (Homer他、1995年)。

【0594】

A. vinelandiiのNifYとNafYは、NifD-NifKホロ酵素成熟の異なる段階で、アポ-NifD-NifKのNifDの α -Cys²⁷⁵または α -His⁴⁴²に結合する (NifDのその両方のアミノ酸残基が共有結合でFeMo-coを係留する) (Jimenez-Vincente他、2018年)。すなわち、NifYとNafYがアポ-NifD-NifKに同時に結合することはない。NifYとNafYがアポ-NifD-NifKに結合する順番は今のところわかっていない。FeMo-coの挿入時にNifYがNifD-NifKから解離することはK. oxytocaニトロゲナーゼで実証されており (Homer他、1993年)、FeMo-coの挿入時にNafYがNifD-NifKから解離することはA. vinelandiiで実証されている (Homer他、1995年)。NafYはHis¹²¹を介して、そして恐らくはNifB-coも介してFeMo-coに結合するとも考えられており、これは、FeMo-coまたはFeMo-co前駆インセクターゼとしてのNafYの役割を示唆している (Rubio他、2004年)。A. vinelandii NifYは、nifY変異体における1つの表現型の欠如に基づくと機能的に冗長であるように見える (Rubio他、2002年) ため、NafYは、アポ-NifD-NifKにとって、FeMo-coの挿入をサポートする主要なアクセサリタンパク質であるという提案がなされている。その一方で、クレブシエラ属の種はNafY遺伝子を持たず、アポ-NifD-NifKへのFeMo-coの挿入をサポートするNifYだけを持つが、Klebsiella nifY変異体はアセチレン還元活性の60%をまだ保持していた (Homer他、1993年)。機能のこの保持は、NifYの不在時にNifYの機能を部分的にカバーすることのできる別のアクセサリタンパク質 (上に記載したNifXなど) がクレブシエラ属の中に存在することを示していた。

【0595】

本明細書では、「NafYポリペプチド」は、配列が配列番号238 (A. vinelandii NafY、アクセッション番号AGK13761、243個のアミノ酸) として示されている配列の全長にわたって少なくとも50%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインpfam16844を含むポリペプチドを意味する。長さが約91個のアミノ酸からなるこのドメインは、それ自体が、いくつかのメンバーの中と、より長いNafYタンパク質のアミノ末端の半分の中に見いだされる。この領域は負に帯電しているため、アポ-NifD-NifKを認識して相互作用する機能を持つように見える。天然のNafYポリペプチドは、典型的には長さが230~250個のアミノ酸であり、この天然の単量体は約25~28 kDaの分子量を持つ。多数のNafYポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開データベースで入手できる。いくつかは、NafYとNifXの配列に関連性があるという理由で、NifXポリペプチドとして注釈されている。例えばNafYポリペプチドは、Azotobacter beijerinckii (WP_090728988、配列番号238と93%一致)、Pseudomonas stutzeri (WP_011912501、69%一致)、Halomonas endophytica (WP_102654474、68%一致)、Pseudomonas linyngensis (WP_090313081、67%一致)、Acidihalobacter prosperus (WP_038093031、56%一致)、Oscillatoriales cyanobacterium (WP_009769409、50%一致) から報告されている。本明細書では、「機能的NafYポリペプチド」は、アポ-NifD-NifKとFeMo-coに結合することのできるNafYポリペプチドである。A. vinelandiiからのNafYポリペプチドの三次元構造と、NafYポリペプチドと、NifY、NifX、VnfX、およびNifBポリペプチドの比較および違いは、Dyer他 (2003年) に報告された。

【0596】

天然の細菌の中のNifZポリペプチドは、Fe-Sクラスターの合成に関与するポリペプチドであり、特にMoFeタンパク質の第2のPクラスターの形成における第2のFe₄S₄ペアのカップリングにおいて機能する。NifZはアポ-MoFeタンパク質の少なくとも第2の半分にお

10

20

30

40

50

ける立体配座の変化を誘導するシャペロンとして機能し、NifHと合わさって第2のPクラスターの形成を可能にすると考えられている。A. vinelandiiの中のNifZの欠失によってMoFeタンパク質の活性が66%低下したが、NifH活性に対する効果はなかった。本明細書では「NifZポリペプチド」は、配列が配列番号16として示されている配列と少なくとも28%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたドメインpfam04319を含むポリペプチドを意味する。約75個のアミノ酸残基からなるこのドメインは、いくつかの膜の中と、より長いNifZタンパク質のアミノ末端側の半分の中に、孤立して見いだされる。天然のNifZポリペプチドは、典型的には長さが70~150個のアミノ酸であり、この天然の単量体は約9~約16 kDaの分子量を持つ。多数のNifZポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開データベースで入手できる。例えばNifZポリペプチドは、Klebsiella michiganensis (アクセッション番号WP_057173223.1、配列番号16と93%一致)、Klebsiella oxytoca (WP_064342939.1、95%一致)、Klebsiella variicola (WP_043875005.1、77%一致)、Kosakonia radicincitans (WP_043953588.1、67%一致)、Kosakonia sacchari (WP_065368553.1、58%一致)、Ferriphaselus amnicola (WP_062627625.1、47%一致)、Paraburkholderia xenovorans (WP_011491838.1、41%一致)、Acidithiobacillus ferrivorans (WP_014029050.1、35%一致)、およびBradyrhizobium oligotrophicum (WP_015665422.1、28%一致)から報告されている。本明細書では、「機能的NifZポリペプチド」は、Fe-Sクラスターの合成においてFe₄S₄クラスターをカップリングさせることのできるNifZポリペプチドである。NifZポリペプチドは、Cotton (2009年)とHu他 (2004年)に記載され、概説されている。

【0597】

天然の細菌の中のNifWポリペプチドは、NifZポリペプチドと会合してより高次の複合体を形成するポリペプチドであり (Lee他、1998年)、MoFeタンパク質 (NifD-NifK)の合成または活性に関与する。NifWとNifZは、MoFeタンパク質の形成または蓄積に関与しているように見える (PaulとMerrick、1987年)。本明細書では、「NifWポリペプチド」は、アミノ酸配列が配列番号17として示されているアミノ酸配列と少なくとも28%一致するアミノ酸を含むとともに、保存されたNifWスーパーファミリータンパク質ドメイン (アーキテクチャID番号10505077であり、Pfamily PF03206の中にある)を含むポリペプチドを意味する。多数のNifWポリペプチドが同定されており、多数の配列を公開データベースで入手できる。例えばNifWポリペプチドは、Klebsiella oxytoca (アクセッション番号WP_064342938.1、配列番号17と98%一致)、Klebsiella michiganensis (WP_049080155.1、94%一致)、Enterobacter sp. 10-1 (WP_095103586.1、90%一致)、Klebsiella quasipneumoniae (WP_065877373.1、81%一致)、Pectobacterium polaris (WP_095699971.1、69%一致)、Dickeya paradisiaca (WP_012764136.1、58%一致)、Brenneria goodwinii (WP_053085547.1、36%一致)、Aquaspirillum sp. LM1 (WP_077299824.1、44%一致)、Candidatus Muproteobacteria bacterium RBG_16_64_10 (OGI40729、34%一致)、Azotobacter vinelandii (AC076430.1、32%一致)、およびMethylocaldum marinum (BB A37427.1、28%一致)から報告されている。本明細書では、「機能的NifWポリペプチド」は、MoFeタンパク質の形成、蓄積、または活性の1つ以上を促進または増強するNifWポリペプチドである。機能的NifWは、NifZと相互作用すること、および／またはMoFeタンパク質の酸素保護においてある役割を果たすことができる (Gavini他、1998年)。

【0598】

細菌と真核生物 (植物など) の両方を含むたいの生物は、多数のフェレドキシンを有する。例えばA. vinelandiiのDJとCAのゲノムそれぞれの中には、フェレドキシンまたはフェレドキシン様と注釈される15種類または16種類のタンパク質が存在している。本明細書では、「フェレドキシンポリペプチド」は、反応中心を形成する[2Fe-2S]型、[3Fe-4S]型、および／または[4Fe-4S]型の1つまたは2つの鉄-硫黄クラスターを持つ電子運搬タンパク質である。MatsubaraとSaeki (1992年)による概説を参照されたい。フェレドキシンポリペプチドは、窒素固定に関与していて一般にニトロゲナーゼに関与しないも

のより低分子量のフェレドキシンポリペプチドを含め、多彩な代謝プロセスに関与している。大半の細胞内のフェレドキシンの多様性と、NifB-coの合成に関するFdxNの機能を補完する際のさまざまなフェレドキシンの適合性または特異性についてのいくつかの研究で観察されたバリエーション（Yates、1972年；Jimenez-Vincente他、2014年）に基づく、FdxNなどのフェレドキシンを含むフェレドキシンは、*A. vinelandii* FdxN（配列番号232；アクセッション番号WP_012703542）などの標準的な配列とのアミノ酸の一致よりも鉄-硫黄クラスターの存在とその機能に基づいて最もよく定義される。本明細書では、「FdxNポリペプチド」は、電子を成熟ジニトロゲナーゼレダクターゼNifHに供与するために、および／またはニトロゲナーゼがNifB-coを合成するために機能する、および／または[4Fe-4S]クラスターの間体担体として作用する、フェレドキシンまたはフェレドキシン様ポリペプチドである。FdxNは、電子を成熟ジニトロゲナーゼレダクターゼNifHに供与し、このNifHが次いで電子をNifD-NifKヘテロ六量体に移すことによって（Yang他、2017年；*Rhizobium japonicum* FdxN、Carter他、1980；*R. meliloti* FdxN、Riedel他、1995年；*Rhodobacter capsulatus* FdxN、Jouanneau他、1995年）、またはNifB-co合成のため電子をNifBポリペプチドに供与することによって（*A. vinelandii*；Jimenez-Vincente他、2014年）、または[4Fe-4S]クラスターの間体担体として作用することによって（*A. vinelandii*；Buren他、2019年）、またはこれら機能のいずれかの組み合わせによって、機能することができる。

【0599】

FdxNポリペプチドの代表例に含まれるのは、BLASTPにおける質問として配列番号232を用いて非冗長タンパク質データベースを検索することによって同定された以下のものであり、そこにはその配列とのパーセント一致が示されている：*Pseudomonas syringae*（WP_065835964.1、85.87%）、*Candidatus Thiodiazotropha endolucinida*（WP_069124666.1、70.65%）、*Uliginosibacterium* sp. TH139（WP_101942980、64.47%）、*Klebsiella michiganensis*（WP_049076934.1、44.26%）、*Escherichia coli*（WP_072048756.1、44.26%）、*Rhizobium leguminosarum*（WP_130674512.1、43.86%）、および*Flavobacterium alvei*（WP_103805005.1、28.57%）。

【0600】

配列の一致と置換

【0601】

1つの特定のポリペプチドに関し、上に示されている数字よりも大きい%一致の数字は、好ましい実施態様を包含することがわかるであろう。したがって適用可能である場合には、最小の%一致の数字に照らし、ポリペプチドは、関連する配列番号と、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも35%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも45%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、およびより一層好ましくは少なくとも99.9%一致するアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【0602】

本明細書に規定されているポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を本明細書に規定されている核酸に導入することによって、または望むポリペプチド

のインビトロ合成によって調製することができる。このような変異体は、例えば、1個以上のアミノ酸の欠失、挿入、または置換を含む。欠失変異、挿入変異、および置換変異の組み合わせを生じさせて最終コンストラクトに到達することができるが、その最終ポリペプチド産物が望む特徴を持つことが条件である。好ましいアミノ酸配列変異体は、参照野生型ポリペプチドと比べて1個だけ、2個、3個、4個、または10個未満のアミノ酸変化を持つ。

【0603】

変異（変化した）ポリペプチドは、本分野で知られている任意の技術を用いて調製することができ、例えば指向性進化または合理的設計戦略を利用する（下記参照）。変異した／変化したDNAに由来する産物は、植物におけるその発現がその表現型を対応する野生型植物と比べて変化させたかどうか（例えばそれが発現する結果として、収量、バイオマス、生長速度、活力、生物学的窒素固定に由来する窒素利得、窒素利用効率、非生物学的ストレス耐性、および／または栄養不足に対する耐性が、対応する野生型植物と比べて増大したかどうか）を判断するための本明細書に記載の技術を利用して容易にスクリーニングすることができる。

10

【0604】

アミノ酸配列変異体の設計では、変異部位の位置と変異の性質は、改変する特徴に依存するであろう。変異のための部位は、例えば（1）最初に、選択された保存されたアミノ酸で置換した後、達成される結果に応じてより過激な選択をすること、（2）標的残基を欠失させること、または（3）標的部位の隣に他の残基を挿入することにより、個別に、または順番に改変することができる。

20

【0605】

アミノ酸配列の欠失は、一般に、約1～15個の残基、より好ましくは約1～10個、典型的には約1～5個の連続した残基の範囲である。

【0606】

置換変異体は、ポリペプチド分子の中に除去される少なくとも1個のアミノ酸残基と、その位置に挿入される1個の異なる残基を持つ。所定の活性を維持することが望ましい場合には、関連するタンパク質ファミリーの中で高度に保存されているアミノ酸位置に置換が存在しないか、保存された置換だけが存在するようにすることが好ましい。保存された置換の例は、表1に「代表的な置換」の名目で示されている。

30

【0607】

好ましい一実施態様では、変異／バリエーションポリペプチドは、天然のポリペプチドと比べてとき、1個、または2個、または3個、または4個の保存されたアミノ酸変化を有する。保存されたアミノ酸変化の詳細は表1に示されている。好ましい一実施態様では、変化は、本発明の異なるポリペプチドの間で高度に保存されているモチーフまたはドメインの1つ以上の中には存在しない。当業者には、そのようなわずかな変化は、組み換え細胞の中で発現したときにポリペプチドの活性を変化させないことを合理的に予測できることがわかるであろう。

【0608】

40

50

【表 1】

表1：代表的な置換

元の残基	代表的な置換
Ala (A)	val ; leu ; ile ; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln ; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn ; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro、ala
His (H)	asn ; gln
Ile (I)	leu ; val ; ala
Leu (L)	ile ; val ; met ; ala ; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu ; phe
Phe (F)	leu ; val ; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe、ala

【0609】

本発明のポリペプチドの一次アミノ酸配列を用いてそのバリエーション／変異体を設計することが、密接に関連したポリペプチドとの比較に基づいて可能である。当業者であればわかるように、互いに密接に関連したタンパク質の間で高度に保存されている残基は、特に非保存的置換で変化させうる可能性がより小さいため、より保存されていない残基よりも活性が維持される（上記参照）。保存されたアミノ酸残基を同定するためのより厳密な試験は、同じ機能のより遠い関係のポリペプチドをアラインメントさせるというものである。高度に保存された残基は機能を保持するために維持されねばならないのに対し、保存されていない残基は、機能を維持しつつ置換または欠失がより起こりやすい。

【0610】

本発明の範囲には、細胞内での合成中または合成後に異なる改変が例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、またはタンパク質分解性切断によってなされた本発明のポリペプチドも含まれる。

【0611】

合理的な設計

【0612】

タンパク質は、タンパク質の構造と折り畳みに関する既知の情報に基づいて合理的に設計することができる。これは、一から始める設計（デノボ設計）によって、または天然の足場に基づく再設計によって実現することができる（例えばHellings、1997年と；LuとBerry、『Protein Structure Design and Engineering, Handbook of Proteins 2』、1153～1157ページ（2007年）を参照されたい）。例えば本明細書の実施例10を参照されたい。タンパク質の設計は、典型的には、折り畳まれて所定の構造または標的構造になる配列の同定を含んでおり、コンピュータモデルを利用して実現される。コンピュータによるタンパク質設計アルゴリズムは配列-立体配座空間を検索し、折り畳まれて標的構造になったときにエネルギーが低くなる配列を探す。コンピュータによるタンパク質設計

アルゴリズムは、変異がどのようにタンパク質の構造と機能に影響するかを評価するため、タンパク質エネルギー論のモデルを使用する。これらのエネルギー関数は、典型的には、分子力学、統計（すなわち知識ベース）および他の経験的事項の組み合わせを含む。適切な利用可能なソフトウェアに含まれるのは、IPRO（Iterative Protein Redesign and Optimization）、EGAD（A Genetic Algorithm for Protein Design）、Rosetta Design、Sharpen、およびAbaloneである。

【0613】

リンカー

【0614】

本明細書においてポリペプチドの文脈で用いられている「リンカー」または「オリゴペプチドリンカー」という用語は、2つ以上の機能的ドメイン（例えばMTPとNP、2つのNP、NPとタグ）を共有結合させる1個以上のアミノ酸を意味する。アミノ酸は、リンカー内と、リンカーと機能的ドメインの間の両方で、ペプチド結合を通じて共有結合される。リンカーは、一方の機能的ドメインに他方の機能的ドメインに対する運動の自由度を提供するが、それら2つ以上のドメインの機能に対して実質的に有害な効果を引き起こすことはない。リンカーは、機能的ドメインの一方または両方が適切に折り畳まれて機能することの促進を助けることができる。当業者は、リンカーのサイズを経験的に決定できること、またはタンパク質折り畳み情報に基づいてモデル化できることがわかるであろう。

【0615】

リンカーは、プロテアーゼ（MPPなど）のための切断部位を含むことができる。このようなリンカーは、MTPの一部と見なすこともできる。

【0616】

当業者は、MTPのC末端を、リンカーなしで、または1個以上のアミノ酸残基（例えば1～5個のアミノ酸残基）からなるリンカーを介して、NPのN末端アミノ酸に翻訳融合させることが可能であることがわかるであろう。このようなリンカーはMTPの一部と見なすこともできる。

【0617】

複数の実施態様では、リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸、少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも4個のアミノ酸、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも6個のアミノ酸、少なくとも7個のアミノ酸、少なくとも8個のアミノ酸、少なくとも9個のアミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも12個のアミノ酸、少なくとも14個のアミノ酸、少なくとも16個のアミノ酸、少なくとも18個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも25個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも45個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸、または約100個のアミノ酸を含む。複数の実施態様では、リンカーの最大サイズは、100個のアミノ酸、好ましくは60個のアミノ酸、より好ましくは40個のアミノ酸である。

【0618】

いくつかの実施態様では、リンカーは、融合ポリペプチドの安定性を増大させるため、1つの機能的ドメインが他方の機能的ドメインに対して動けるようにする。望むのであれば、リンカーは、ポリ-グリシンの反復、またはグリシン残基とプロリン残基とアラニン残基の組み合わせを含むことができる。

【0619】

2つのNifポリペプチドを接合するリンカー（NifD-リンカー-NifKやNifE-リンカー-NifNなど）は、リンカー内のアミノ酸の数と配列をいくつかの基準に基づいて選択することが好ましい。その基準とは、望まないジスルフィド結合の形成を回避するためシステイン残基が欠けていること、望まない表面での塩の架橋相互作用の可能性を低下させるため、帯電した残基（Glu、Asp、Arg、Lys）がほとんど存在しないか、好ましくは存在しないこと、疎水性残基（Phe、Trp、Tyr、Met、Val、Ile、Leu）はポリペプチドの表面に浸

10

20

30

40

50

透する傾向を促進する可能性があるため、そのような残基がほとんど存在しないか、好ましくは存在しないこと、および翻訳後修飾される可能性のあるアミノ酸が欠けていることである。この文脈では、「帯電した残基がほとんど存在しない」は、リンカー内にそのアミノ酸残基が10%未満であることを意味し、「疎水性残基がほとんど存在しない」は、リンカー内にそのアミノ酸残基が15%未満であることを意味する。

【0620】

一実施態様では、リンカーはシステイン残基を含まない。

【0621】

一実施態様では、リンカーは、4個、3個、または2個、または1個、または0個の帯電した残基を含む。リンカーは、合計で4個、3個、または2個、または1個、または0個のグルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、およびリシン残基を含むことが好ましい。

10

【0622】

一実施態様では、リンカーは、4個、3個、または2個、または1個、または0個の疎水性残基を含む。リンカーは、合計で4個、3個、または2個、または1個、または0個のフェニルアラニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、メチオン残基、バリン残基、イソロイシン残基、およびロイシン残基を含むことが好ましい。

【0623】

一実施態様では、リンカーの少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%が、トレオニン、セリン、グリシン、およびアラニンから選択される。

20

【0624】

ポリペプチドを改変するのにオリゴペプチドリンカーを使用することは、Chen他（2013年）とZhang他（2009年）に概説されている。

【0625】

タグ

【0626】

特別な一実施態様では、融合ポリペプチドは、この融合ポリペプチドまたはそのプロセッシングを受けた産物の検出または精製に十分な少なくとも1つのタグを含む。タグは、典型的には、融合ポリペプチドのC末端またはN末端ドメインに結合される。好ましい一実施態様では、タグはNifポリペプチドのC末端に結合される。タグは、一般に、1つ以上のリガンド（例えばクロマトグラフィ支持体またはビーズなどのアフィニティマトリックスの1つ以上のリガンド）に結合することのできるペプチドまたはアミノ酸配列であるか、抗体であり、高親和性を持つ。当業者は、タグが融合タンパク質の中で位置するのが好ましいのは、MTPがミトコンドリア内に取り込まれた後に切除されたときNPからタグが除去されない位置であることがわかるであろう。さらに、タグは、ミトコンドリア取り込み機構に干渉してはならない。好ましい一実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは、N末端からC末端への順に、N末端MTP、Nifポリペプチド、および検出／精製タグを含む融合ポリペプチドをコードする。代替の一実施態様では、融合ポリペプチドは、N末端からC末端への順に、N末端MTP、検出／精製タグ、およびNifポリペプチドを含む。

30

【0627】

融合ポリペプチドまたはそのプロセッシングを受けた産物の検出、単離、または精製に有用なタグの追加の非限定的な例に含まれるのは、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（HA）タグ、例えば6個または8個のヒスチジン残基を含むヒスチジントグ、蛍光タグ（フルオレセイン、resourfin、およびこれらの誘導体など）、Argタグ、FLAGタグ、Strepタグ、抗体による認識が可能なエピトープ（（抗c-myc抗体によって認識される）c-mycタグなど）、SBPタグ、Sタグ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、グルタチオンS-トランスフェラーゼタグ、マルトース結合タンパク質、NusA、TrxA、DsbA、Aviタグなどである。

40

【0628】

Nifポリペプチドが関与する翻訳融合体

50

【0629】

学術文献に報告されているように、いくつかのNifポリペプチドに対して翻訳融合体が作られてきた。それらが表2にまとめられているとともに、BurenとRubio（2018年）の中で概説されている。これらの大半は、検出と精製を目的としてタンパク質にエピトープまたは結合ドメイン（ヒスチジンタグまたはStrepタグなど）を人工的に付加することを含み、ほんの少数が植物細胞の中で発現した。細菌の中でNifポリペプチド間に自然に起こる融合に関するいくつかの報告が存在している。細菌宿主におけるアッセイのため、長さの異なるHisタグ（7～10個のヒスチジン）が、NifDに（Christiansen他、1998年）、NifEに（Goodwin他、1998年）、NifMに（Gavini他、2006年）、および完全長型と切断型の両方のNifBに（Fay他、2015年）付加された。細菌において、またはインビトロニトロゲナーゼ再構成アッセイにおいて実証されたように、それぞれの場合に、Nif機能は、

【0630】

【表2-1】

表2：文献に報告されているNifポリペプチドの遺伝子融合体のまとめ

遺伝子融合体	天然または合成	変化したアミノ酸残基の数	機能したか（しない、部分的、した、試験せず）と、どの生物であるか	参考文献
細菌での発現				
GST-NafY	合成	N末端の26 kDa	機能した、細菌で	Rubio 他、2004年
C末端のNifD-7×His	合成	7個の追加ヒスチジン	機能した、細菌で	Christiansen 他、1998年
NifE-NifN	天然： <i>Anabaena variabilis</i>	約10個のアミノ酸の欠失	機能した、細菌で	Thiel 他、1995年
7×His-NifE	合成	N末端の7個のHis	機能した、細菌で	Goodwin 他、1998年
N-(ゼロリンカー)-B	<i>Clostridium pasteurianum</i> の中で自然に生じる		機能した、細菌で	Wiig 他、2011年の中で引用されているDeanとJacobson
8×His-N-ゼロリンカー-B	合成	直接的なNifN-NifB融合、長さゼロのリンカー	機能した、細菌で	Wiig 他、2011年
NifD-NifK	合成	正味3個のアミノ酸の欠失、7個の置換	部分的（50%）、細菌で	Suh 他、2003年
7-10×His-NifM	合成	N末端に不特定の数（7～10?）	機能した、細菌で	Gavini 他、2006年

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

遺伝子融合体	天然または合成	変化したアミノ酸残基の数	機能したか（しない、部分的、した、試験せず）と、どの生物であるか	参考文献
真核生物での発現				
His-NifU	合成	N 末端のエピトープ	機能した、酵母、細胞質の位置、そして酵母が嫌気性で増殖する場合に機能	Lopez-Torrejon 他、2016 年
NifB-切断型-10×His	合成	NifX 様ドメインに関して切断された NifB の C 末端の 10×His	機能した、好気性で増殖する酵母の中で試験	Buren 他、2017 年 a
MTP-Strep タグ-NifB（切断型）	合成	28 個のアミノ酸からなる N 末端 Strep タグ、MTP と NifB の間	植物で発現、MM を標的とする、完全長バージョンよりも大きな可溶性、機能は試験しなかった	Buren 他、2017 年 a
6×His-NifB-切断型	合成	C 末端の NifX 様ドメインに関して切断された NifB の N 末端の 6 His	機能した、酵母で試験した	Fay 他、2015 年 PNAS
CPN-60-NifS	合成	<i>Nicotiana</i> ssp において MTP を標的とする	機能した、インビトロ	US2016/0304842
CPN-60-NifU	合成	<i>Nicotiana</i> ssp において MTP を標的とする	機能した、インビトロ	US2016/0304842
CPN-60-NifH	合成	<i>Nicotiana</i> ssp において MTP を標的とする	機能した、インビトロ	US2016/0304842
CPN-60-NifM	合成	<i>Nicotiana</i> ssp において MTP を標的とする	機能した、インビトロ	US2016/0304842

【0631】

Thielら（1995年）は、藍藻 *Anabaena variabilis* 内の NifE 遺伝子と NifN 遺伝子の間の遺伝子間領域で自然に起こった 29 個のヌクレオチドの欠失、したがって 9 個のアミノ酸と NifE 終止コドンの欠失を同定した。この欠失の結果として、NifE ポリペプチドと NifN ポリペプチドの少なくともいくつかのニトロゲナーゼ機能を保持した NifE-NifN ポリペプチド融合体を得られた。この NifE-NifN 融合ポリペプチドは、融合接合部の領域に他の 19 個のアミノ酸の置換も持っており、それが、未知のやり方ではあるが、Nif 機能に影響を及ぼした可能性がある。融合遺伝子は発現したが、厳しい嫌気条件下においてだけであった。非融合遺伝子と比べて活性の低下があったかどうかは報告されなかった。

【0632】

Sueら（2003年）は、NifD の終止コドンと NifK の翻訳開始コドン（ATG）を含む欠失によって *A. vinelandii* の染色体の NifD 遺伝子と NifK 遺伝子の間に人工的接合部を創出し

、pBG1404と名づけたベクターを形成した。この欠失の結果として、NifKポリペプチドのアミノ酸2～10に正味で3個のアミノ酸の欠失と7個のアミノ酸置換が生じた。pBG1404を含有する*A. vinelandii*宿主細胞は、低窒素培地中では、対応する野生型細菌と比べて増殖が弱められた。

【0633】

Wiigら（2011年）は、*Clostridium pastuerianum*の中に見いだされるNifN遺伝子とNifB遺伝子の間で自然に生じる翻訳融合体を利用し、細菌アッセイと生化学的補完アッセイにおいて、この翻訳融合体がNifN活性とNifB活性に関して機能することを明らかにした。この融合は、いかなるペプチドリンカーもない直接的なものであった。すなわち、NifNのC末端がNifBのN末端に共有結合で直接連結された。

【0634】

酵母細胞と植物細胞の中で翻訳融合体を利用し、核の中にコードされているタンパク質をミトコンドリアマトリックスに向かわせた。酵母発現アッセイにおいて、ミトコンドリアを標的とするペプチド（MTP）といくつかのNifポリペプチド（NifH、NifM、NifS、およびNifU）の翻訳融合体が、好気条件下で増殖するときに機能することが示された（Lopez-Torrejón他、2016年）。エピトープ融合体（FLAGとHIS）も、NifH、NifM、NifS、およびNifUに融合したときに機能することが示されたが、これらの融合体は酵母の細胞質への局所化を意図したものであるため、酵母を嫌気条件下で増殖させたときにだけ機能した。Burenら（2017年）は、NifBの可溶性バリエーションのミトコンドリアマトリックス標的型バージョンが、酵母のミトコンドリアから再単離したときにインビトロ補完アッセイにおいて機能することを示した。このバージョンのNifBは、N末端MTP、NifBの切断型バリエーション（NifX様ドメインなし）、およびC末端10×Hisエピトープタグを含んでいた。多数のMTP-Nif融合体も酵母発現アッセイにおいて生成した。しかし同時に発現する複数タンパク質のこの大きな集団は、酵母の中で活性を示さなかった（Buren他、2017年）。

【0635】

CPN-60遺伝子からのMTPは、NifH、NifM、NifS、およびNifUのN末端に融合させると、このFeタンパク質を10%酸素という低酸素分圧下で生長させた植物から再単離したときに機能することが、インビトロ補完アッセイによって示された（US2016/0304842）。

【0636】

ポリヌクレオチド

【0637】

「ポリヌクレオチド」と「核酸」という用語は本明細書では交換可能に用いられる。これらの用語は任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を意味し、ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのどちらか、またはその類似体である。本明細書に規定されているポリヌクレオチドは、ゲノム、cDNA、半合成、または合成を起源とする一本鎖または好ましくは二本鎖のものが可能であり、その起源または操作により、（1）天然状態で会合しているポリヌクレオチドの全体または部分と会合していない（例えば天然のプロモータをコードする配列を含まないNifポリヌクレオチド）、（2）天然状態で連結していポリペプチド以外のポリヌクレオチドに連結している（例えばMTPをコードするヌクレオチド配列および／または非天然のプロモータをコードする配列に連結されたNifポリヌクレオチド）、または（3）自然には生じない（例えば本発明のMTP-Nif融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連鎖解析から明確にされた複数の遺伝子座（1つの遺伝子座）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、任意の配列のキメラDNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド（メチ

ル化されたヌクレオチドやヌクレオチド類似体など）を含むことができる。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合には、ポリマーの組み立て前または組み立て後に与えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド要素によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、例えば標識要素と複合体を形成することなどによる重合の後にさらに修飾することができる。

【0638】

「単離されたポリヌクレオチド」は、通常はそのポリヌクレオチドに連結している（例えば調節配列）か会合している構成要素を実質的に含まない。したがって単離されたポリヌクレオチドは、組み換え技術によって作製されるときには他の細胞材料または培地を実質的に含まず、化学的に合成されるときには化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。単離されたポリヌクレオチドは、好ましくは前記構成要素を少なくとも60%含まず、より好ましくは少なくとも75%含まず、より好ましくは少なくとも90%含まない。

【0639】

本明細書では、「外来ポリヌクレオチド」という用語は、その外来ポリヌクレオチドが中に存在する細胞または生物の外部に由来する配列を持つポリヌクレオチドを意味する。

【0640】

本明細書では、「遺伝子」という用語はその最も広い文脈で捉えるべきであり、構造遺伝子の転写される領域と、翻訳される場合のタンパク質コード領域を含むとともに、コード領域の5'末端と3'末端の両方に各端部の少なくとも約2 kbの距離にわたって隣接して位置して遺伝子の発現に関与する配列を含むデオキシリボヌクレオチド配列を包含する。この点に関し、遺伝子は、制御シグナル（天然状態で所定の遺伝子と関連しているプロモータ、エンハンサ、翻訳と転写の終止および／またはポリアデニル化のシグナルなど）、または異種制御シグナル（この場合には遺伝子は「キメラ遺伝子」と呼ばれる）を含む。タンパク質コード領域の5'に位置していてmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。タンパク質コード領域の3'または下流に位置していてmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA形態とゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」、または「介在配列」と呼ばれる非コード配列で中断されていてもよいコード領域を含有する。イントロンは、遺伝子のうちで核RNA（nRNA）に転写されるセグメントである。イントロンは、エンハンサなどの調節エレメントを含有することができる。イントロンは、核または一次の転写産物から除去される、すなわち「スプライスされて除かれる」ため、イントロンはmRNA転写産物の中には存在しない。mRNAは、翻訳中に、生まれるポリペプチドの中のアミノ酸の配列または順序を指定する機能を持つ。「遺伝子」という用語には、本明細書に記載されている本発明のタンパク質のすべてまたは一部をコードする合成分子または融合分子と、上記のいずれか1つと相補的なヌクレオチド配列が含まれる。

【0641】

本明細書では、「キメラDNA」（本明細書では「DNAコンストラクト」とも呼ぶ）は、自然界には見いだされず、2つのDNA部分を人工的に結合して単一の分子にした任意のDNA分子を意味しており、その各部分は自然界に見いだされるが、全体は自然界に見いだされない。例えば本発明のMTP-Nif融合ポリペプチドをコードするDNAコンストラクト。典型的には、キメラDNAは、実際には自然界では一緒に見いだされることのない調節配列と、転写されるかタンパク質をコードする配列を含む（例えば非天然プロモータをコードする配列に連結されたNifポリヌクレオチド）。したがってキメラDNAは、異なる供給源に由来する調節配列とコード配列、または同じ供給源に由来するが、自然界に見いだされるのとは異なるやり方で配置された調節配列とコード配列を含むことができる。オープンリーディングフレームは、その天然の上流調節エレメントと下流調節エレメントに連結されていてもいなくてもよい。オープンリーディングフレームは、例えば植物ゲノム内の非天然位置に組み込むこと、またはそれが自然界で見いだされることのないレプリコンまたはベクター（細菌プラスミドまたはウイルスベクターなど）の中に組み込むことができる。

「キメラDNA」という用語は、宿主中で複製可能なDNA分子に限定されることはなく、例

えば特定のアダプタ配列によって連結してレプリコンの中に入れることのできるDNAを含む。

【0642】

「導入遺伝子」は、形質転換手続きによってゲノムに導入された遺伝子である。この用語には、子孫細胞、植物、種子、非ヒト生物、またはその部分の中にある遺伝子で、これらのものの前駆細胞のゲノムの中に導入されつつあったものが含まれる。このような子孫細胞などとして、初代形質転換細胞であった前駆細胞から少なくとも3世代目または4世代目の子孫が可能である。子孫は、有性生殖によって、または例えばジャガイモの塊茎またはサトウキビの新芽などからの栄養によって生成させることができる。「遺伝子改変された」という用語とそのバリエーションはより広い用語であり、その中には、形質転換または形質導入によって遺伝子を細胞に導入すること、細胞内の遺伝子を変異させること、および細胞の中、または上記のように改変された任意の細胞の子孫の中の遺伝子の調節を遺伝子レベルで改変または調整することが含まれる。

10

【0643】

「ゲノム領域」は、本明細書では、ゲノム内で、1つの導入遺伝子または一群の導入遺伝子（本明細書ではクラスターとも呼ぶ）が細胞またはその先祖に挿入された位置を意味する。このような領域は、ヒトが介入することによって（例えば本明細書中に記載されている方法によって）組み込まれたヌクレオチドを含むだけである。

【0644】

本発明の「組み換えポリヌクレオチド」は、人工的な組み換え法によって構成または改変された核酸分子を意味する。組み換えポリヌクレオチドは、その天然状態と比較して、（例えばmRNAの場合には）変化した量で細胞中に存在するか、変化した割合で発現する可能性がある。一実施態様では、ポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドを天然状態では含まない細胞に導入される。典型的には、外来DNAがmRNAの転写のための鋳型として使用され、次いでそのmRNAが形質転換された細胞内で翻訳されて、本発明のポリペプチドをコードするアミノ酸残基の連続配列になる。別の一実施態様では、ポリヌクレオチドは細菌細胞に内在し、その発現が組み換え手段によって変化する。例えば外来制御配列が興味ある内在遺伝子の上流に導入されて、その遺伝子によってコードされるポリペプチドを形質転換された細胞が発現することが可能になる。

20

【0645】

本発明の組み換えポリヌクレオチドには、細胞に基づく発現系または無細胞発現系の中に存在していてその系の他の構成要素から分離されていないポリヌクレオチドと、細胞に基づく前記発現系または前記無細胞発現系において生成した後、少なくともいくつかの他の構成要素から精製されたポリヌクレオチドが含まれる。ポリヌクレオチドは、自然界に存在するヌクレオチドの1つの連続したストレッチ（例えばNifポリヌクレオチド）であること、または接合されて単一のポリヌクレオチド（例えばMTPをコードするヌクレオチド配列および／または非天然プロモータをコードする配列に連結されたNifポリヌクレオチド）を形成するため（天然および／または合成の）異なる供給源に由来するヌクレオチドの2つ以上の連続したストレッチを含むことが可能である。典型的には、そのようなキメラポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする少なくとも1つのオープンリーディングフレームを、興味ある細胞の中でこのオープンリーディングフレームの転写を駆動するのに適したプロモータに機能可能に連結された状態で含む。本明細書における「プロモータ」への言及は、単一のプロモータ、または複数のプロモータを包含する。

30

【0646】

特定のポリヌクレオチドに関し、上に示されている数字よりも大きい%一致の数字は、好ましい実施態様を包含することがわかるであろう。したがって適用可能である場合には、最小の%一致の数字に照らし、ポリヌクレオチドは、関連する配列番号と、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少な

40

50

くとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、およびより一層好ましくは少なくとも99.9%一致するポリヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

【0647】

本発明のポリヌクレオチド、または本発明で有用なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で本明細書に規定されているポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズすることができる。本明細書では、ストリンジェントな条件は、(1) ハイブリダイゼーション中に、ホルムアミドなどの変性剤（例えば、0.1% (w/v) のウシ血清アルブミン、0.1% のFicoll、0.1% のポリビニルピロリドンを含む50% (v/v) のホルムアミド、750 mM のNaCl、75 mM のクエン酸ナトリウムを含むpH 6.5の50 mM のリン酸ナトリウムバッファ）を42℃で用いる条件；または(2) 50% のホルムアミド、5×SSC (0.75 M のNaCl、0.075 M のクエン酸ナトリウム)、50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1% のピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA (50 g/ml)、0.1% のSDS、および10% の硫酸デキストランを、0.2×SSCと0.1% のSDSの中で42℃にて用いる条件、および／または(3) 洗浄のために低イオン強度かつ高温を（例えば、0.015 M のNaCl／0.0015 M のクエン酸ナトリウム／0.1% のSDSを50℃で）用いる条件である。

【0648】

本発明のポリヌクレオチドは、天然の分子と比較するとき、1つ以上の変異（ヌクレオチド残基の欠失、挿入、または置換）を持つことができる。参照配列と比べて変異を持つポリヌクレオチドは、天然のもの（すなわち天然の供給源から単離されたもの）、または（例えば上述のように核酸に対して部位特異的突然変異誘発またはDNAシャフリングを実施することにより）合成されたものが可能である。

【0649】

本発明のポリヌクレオチドは、植物細胞の中で発現させるためコドンを変更することができる。当業者は、タンパク質コード領域を、例えば窒素固定菌の中の天然ポリヌクレオチドのコード領域と比べて最適化されたコドンにできることがわかるであろう。

【0650】

核酸コンストラクト

【0651】

本発明には、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクト、これら核酸コンストラクトを含有するベクターと宿主細胞、これらを作製して利用する方法、およびこれらの利用が含まれる。本発明は、機能可能に接続または連結されたエレメントに言及する。「機能可能に接続された」または「機能可能に連結された」などは、ポリヌクレオチドエレメントが機能的な関係で連結されていることを意味する。典型的には、機能可能に接続された核酸配列は連続的に連結されており、必要な場合には2つのタンパク質コード配列が連続的にリーディングフレームの中で接合される。1つのコード配列が別のコード配列に「機能可能に接続される」のは、RNAポリメラーゼがその2つのコード配列を転写して単一のRNAにするときであり、その単一のRNAは、翻訳される場合には、その後翻訳されて、両方のコード配列に由来するアミノ酸を持つ単一のポリペプチドになる。複数のコード配列が互いに連続している必要はないが、発現した配列が最終的にプロセッシングを受けて望むタンパク質を生成させることが条件である。

【0652】

本明細書では、「シス作用性配列」、「シス作用性エレメント」、または「シス調節領域」、または「調節領域」という用語、または同様の用語は、適切な位置にあって発現可

能な遺伝子配列に接続されているとき、その遺伝子配列の発現を少なくとも部分的に調節することのできる任意のヌクレオチド配列を意味すると理解されるものとする。当業者は、シス調節領域が、転写レベルまたは転写後レベルで、遺伝子配列の発現、および／または細胞タイプ特異性、および／または発達特異性のレベルを活性化すること、沈黙させること、増強すること、抑制すること、または他のやり方で変化させることが可能であることがわかるであろう。本発明の好ましい実施態様では、シス作用性配列は、発現可能な遺伝子配列の発現を増強または刺激するアクチベータ配列である。

【0653】

プロモータエレメントまたはエンハンサエレメントを転写可能なポリヌクレオチドに「機能可能に接続する」は、転写可能なポリヌクレオチド（例えばタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または他の転写産物）をプロモータの制御下に置くことを意味し、そのプロモータがその後、そのポリヌクレオチドの転写を制御する。異種プロモータ／構造遺伝子の組み合わせを構成するとき、プロモータまたはそのバリエーションを転写可能なポリヌクレオチドの転写開始部位から離して配置することが一般に好ましく、その距離は、自然な設定（すなわちプロモータが由来する遺伝子）において、そのプロモータとそれが制御するタンパク質コード領域を隔てている距離にほぼ等しい。本分野で知られているように、この距離のいくらかの変動が、機能の喪失なしに可能である。同様に、調節配列エレメント（例えばオペレータ、エンハンサなど）の、その制御下に置かれる転写可能なポリヌクレオチドに対する好ましい配置は、そのエレメントの自然な設定（すなわちそのエレメントが由来する遺伝子）での配置によって決まる。

【0654】

「プロモータ」または「プロモータ配列」は、本明細書では、一般にRNAコード配列の上流（5'）にあって興味ある細胞の中で転写の開始とレベルを制御する遺伝子の領域を意味する。「プロモータ」には、古典的ゲノム遺伝子の転写調節配列（TATAボックスやCCAATボックスの配列など）のほか、発生および／または環境の刺激に応答して、または組織特異的または細胞タイプ特異的なやり方で、遺伝子の発現を変化させる追加調節エレメント（すなわち上流活性化配列、エンハンサ、およびサイレンサ）が含まれる。プロモータは、通常は、構造遺伝子上流に位置してこの遺伝子の発現を調節するが、必ずしもその位置にある必要はない（例えばいくつかのPolIIIプロモータ）。さらに、プロモータを含む調節エレメントは、通常、遺伝子の転写開始部位から2 kb以内に位置する。プロモータは、細胞内での発現をさらに増強するため、および／またはそのプロモータが機能可能に接続されている構造遺伝子の発現のタイミングまたは誘導能力を変化させるため、開始部位からより離れて位置する追加の特殊な調節エレメントを含有することができる。

【0655】

「構成的プロモータ」は、生物（植物など）の多くの組織またはすべての組織の中で機能可能に連結されていて転写された配列の発現を指示するプロモータを意味する。「構成的」という用語は、本明細書では、ある遺伝子があらゆるタイプの細胞の中で同じレベルで発現することを必ずしも示しておらず、その遺伝子は広い範囲のタイプの細胞で発現するが、レベルのいくらかの変動をしばしば検出できることを示す。「選択的発現」は、本明細書では、ほぼ排他的に例えば植物の特定の器官（例えば、胚乳、胚、葉、果物、塊茎、または根など）で発現することを意味する。好ましい一実施態様では、プロモータは、植物（好ましくは穀物植物）の根、葉、および／または茎で選択的または優先的に発現する。したがって選択的発現は、植物が経験する大半の条件下またはあらゆる条件下での植物の多くの組織またはすべての組織における発現を意味する構成的発現とは対照的である可能性がある。

【0656】

選択的発現の結果として、特定の植物組織、器官、または発達段階において遺伝子発現産物の区画化が起こる可能性もある。特定の細胞内位置（色素体、細胞質ゾル、液胞、またはアポプラストスペースなど）における区画化は、遺伝子産物の構造の中に、必要な細胞区画に輸送するための適切なシグナル（例えばシグナルペプチド）を含めることによっ

て、または半自律的オルガネラ（色素体とミトコンドリア）の場合には、適切な調節配列を持つ導入遺伝子をオルガネラのゲノムに直接組み込むことによって実現できる。

【0657】

「組織特異的プロモータ」または「器官特異的プロモータ」は、例えば植物の1つの組織または器官の中で、他の多くの組織または器官（好ましくは、すべてではなくとも大半の他の組織または器官）と比べて優先的に発現するプロモータである。典型的には、プロモータは、特定の組織または器官の中で、他の組織または器官よりも10倍高いレベルで発現する。

【0658】

一実施態様では、プロモータは、莖特異的プロモータ、葉特異的プロモータ、または植物の空中部分（少なくとも莖と葉）における遺伝子発現を指示するプロモータ（緑色組織特異的プロモータ）であり、その例はリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ（RUBISCO）プロモータなどである。

【0659】

莖特異的プロモータの非限定的な例に含まれるのは、US 5,625,136に記載されているプロモータである。

【0660】

一実施態様では、プロモータは、根特異的プロモータである。根特異的プロモータの非限定的な例に含まれるのは、酸性キチナーゼ遺伝子のためのプロモータと、CaMV 35Sプロモータの特定のサブドメインである。

【0661】

本発明で考慮するプロモータは、形質転換される宿主植物にとって天然のもの、またはその領域が宿主植物の中で機能する場合には、代替りの供給源に由来するものが可能である。他の供給源に含まれるのは、アグロバクテリウムT-DNA遺伝子、例えばノパリン、オクタピン、マンノピンを生合成するための遺伝子のプロモータ、または他のオピンプロモータ、組織特異的プロモータ（例えばUS 5,459,252とWO 91/13992を参照されたい）；ウイルス（宿主特異的ウイルスを含む）からのプロモータ、または一部または全体が合成されたプロモータである。単子葉植物と双子葉植物において機能する多数のプロモータが本分野で周知であり（例えばSalomon他、1984年；Garfinkel他、1983年；Barker他、1983年を参照されたい）、その中には、植物とウイルスから単離されたさまざまなプロモータ、例えばカリフラワーモザイクウイルスプロモータ（CaMV 35S、19S）が含まれる。プロモータの活性を評価するための非限定的な方法は、Medberry他（1992年、1993年）、Sambrook他（1989年、上記文献）、およびUS 5,164,316に開示されている。

【0662】

その代わりに、またはそれに加えて、プロモータとして、導入されたポリヌクレオチドの発現を例えば植物の適切な発達段階で駆動することのできる誘導性プロモータまたは発達調節プロモータが可能である。使用できる他のシス作用性配列に含まれるのは、転写および／または翻訳のエンハンサである。エンハンサ領域は当業者に周知であり、ATG翻訳開始コドンと隣接配列を含むことができる。含まれているときの開始コドンは、配列全体が翻訳される場合にその配列全体の翻訳を保証するため、外部または外来のポリヌクレオチドと関係するコード配列のリーディングフレームと位相が合っていないなければならない。翻訳開始領域は、転写開始領域の供給源から、または外部または外来のポリヌクレオチドから提供することができる。その配列は、転写を駆動するために選択されるプロモータの供給源に由来することも可能であり、mRNAの翻訳を増やすため特異的に改変することができる。

【0663】

本発明の核酸コンストラクトは、転写終止配列が含まれている可能性のある約50～1,000個のヌクレオチド塩基対の3'非翻訳配列を含むことができる。3'非翻訳配列は、転写終止シグナル（ポリアデニル化シグナルは含まれていてもいなくてもよい）と、mRNAのプ

ロセシングに影響を与えることのできる任意の他の調節シグナルを含有することができる。ポリアデニル化シグナルは、mRNA前駆体の3'末端にポリアデニル酸配列を付加する機能がある。ポリアデニル化シグナルは標準形態5' AATAAA-3'との相同性の存在によって一般に認識されるが、この標準形態のバリエーションは一般的でないわけではない。ポリアデニル化シグナルを含まない転写終止配列には、4個以上のチミジン列を含む、PolIまたはPolIII RNAポリメラーゼのターミネータが含まれる。適切な3'非翻訳配列の例は、*Agrobacterium tumefaciens*のオクトピンシンターゼ（ocs）遺伝子またはノパリンシンターゼ（nos）遺伝子からのポリアデニル化シグナルを含有する、転写されるが翻訳されない3'領域である（Bevan他、1983年）。適切な3'非翻訳配列は、リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ（ssRUBISCO）遺伝子などの植物遺伝子に由来するものが可能だが、当業者に知られている他の3'エレメントを用いることもできる。

10

【0664】

翻訳開始部位とコード配列の開始の間に挿入されるDNA配列（すなわち非翻訳5'リーダー配列（5'UTR））は、それが転写されるとともに翻訳される場合には遺伝子の発現に影響する可能性があるため、特別なリーダー配列を用いることもできる。適切なリーダー配列に含まれるのは、外来DNA配列または内在DNA配列の最適な発現を指示するよう選択された配列を含むものである。例えばこのようなリーダー配列には、例えばJoshi（1987年）が記述しているように、mRNAの安定性を増大させるか維持するとともに、翻訳の不適切な開始を阻止することのできる好ましいコンセンサス配列が含まれる。

【0665】

20

ベクター

【0666】

本発明は、遺伝子コンストラクトの操作または導入のためのベクターの利用を含む。ベクターは、外来遺伝子材料を別の細胞の中に人工的に運搬するのに使用できる核酸分子、好ましくはDNA分子であり、その細胞内でその複製または発現が可能になる。外来DNAを含有するベクターは「組み換えベクター」と呼ばれる。ベクターの非限定的な例に含まれるのは、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、人工染色体である。ベクターは転移可能なエレメントを含むことができる。

【0667】

ベクターは、二本鎖DNAであって1つ以上の独自の制限部位を含有しており、特定の宿主細胞（標的細胞または標的組織、または前駆細胞またはその組織）の中で自律的な複製が可能であること、または特定の宿主細胞のゲノム、好ましくは核ゲノムへの組み込みが可能であり、クローニングされた配列が複製可能であることが好ましい。したがってベクターは、自律的に複製するベクター、すなわち染色体外存在物（例えば直線状プラスミドまたは閉鎖された環状プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体）として存在するベクターが可能であり、その複製は、染色体の複製とは独立である。ベクターは、自己複製を保証する任意の手段を含有することができる。その代わりに、ベクターとして、細胞の中に導入されたとき、レシピエント細胞のゲノム、好ましくは核ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と合わさって複製されるベクターが可能である。ベクター系は、単一のベクターまたはプラスミド、2つ以上のベクターまたはプラスミド（これらが合わさって、宿主細胞に導入される全DNAを含有する）、またはトランスポゾンを含むことができる。ベクターの選択は、典型的にはそのベクターと、そのベクターが導入される細胞の適合性に依存するであろう。ベクターは、選択マーカー（抗生剤耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子、または適切な形質転換体の選択に使用できる他の遺伝子など）も含むことができる。このような遺伝子の例は当業者に周知である。

30

40

【0668】

本発明の核酸コンストラクトはベクター（プラスミドなど）に導入することができる。プラスミドベクターは、典型的には、原核細胞および真核細胞における発現カセットの容易な選択、増幅、および形質転換を提供する追加の核酸配列を含み、例えばpUC由来ベクター、pSK由来ベクター、pGEM由来ベクター、pSP由来ベクター、pBS由来ベクター、ま

50

たはバイナリーベクターが、1つ以上のT-DNA領域を含む。追加の核酸配列は、ベクターの自律的複製を提供する複製起点、選択マーカー遺伝子（抗生剤または除草剤に対する耐性をコードしていることが好ましい）、核酸コンストラクトの中にコードされた核酸配列または遺伝子を挿入するための複数の部位を提供する独自の多重クロニング部位、および、原核細胞と真核（特に植物）細胞の形質転換を増強する配列を含む。

【0669】

「マーカー遺伝子」は、そのマーカー遺伝子を発現している細胞に明確な表現型を与えることで、形質転換されたそのような細胞を、そのマーカーを持たない細胞から識別することを可能にする遺伝子を意味する。選択マーカー遺伝子は、選択剤（例えば除草剤、抗生剤、放射線、熱、または形質転換されていない細胞に損傷を与える他の処置）に対する耐性に基づいて「選択する」ことを可能にする形質を与える。スクリーニング可能なマーカー遺伝子（またはレポータ遺伝子）は、観察または試験、すなわち「スクリーニング」（例えばβ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、GFP、または形質転換されていない細胞に存在しない他の酵素活性）を通じて同定することのできる形質を与える。マーカー遺伝子と興味あるヌクレオチド配列が連結されている必要はない。

【0670】

形質転換体の同定を容易にするため、核酸コンストラクトは、選択マーカー遺伝子またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を外来ポリヌクレオチドとして、または外来ポリヌクレオチドに加えて含むことが望ましい。マーカーの実際の選択は、宿主細胞（好ましくは植物宿主細胞）との組み合わせで機能する限りは重要ではない。マーカー遺伝子と興味ある外来ポリヌクレオチドが連結されている必要はない。なぜなら、例えばUS 4,399,216に記載されているように、連結されていない遺伝子の同時形質転換も植物の形質転換では効率的なプロセスだからである。

【0671】

細菌選択マーカーの例は、アンピシリン耐性、エリスロマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性、またはテトラサイクリン耐性などの抗生剤耐性、好ましくはカナマイシン耐性を与えるマーカーである。植物形質転換体を選択するための代表的な選択マーカーの非限定的な例に含まれるのは、ハイグロマイシンB耐性をコードするhyg遺伝子；カナマイシン、パロモマイシン、G418に対する耐性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（nptII）遺伝子；除草剤に由来するグルタチオンに対する耐性を与えるラット肝臓由来のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子（例えばEP 256223に記載）；過剰発現したときホスフィノトリシンなどのグルタミンスンテターゼ阻害剤に対する耐性を与えるグルタミンスンテターゼ遺伝子（例えばWO 87/05327に記載）；選択剤ホスフィノトリシンに対する耐性を与える*Streptomyces viridochromogenes*由来のアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（例えばEP 275957に記載）；N-ホスホノメチルグリシンに対する耐性を与える5-エノールシキメート-3-リン酸シンターゼ（EPSPS）をコードする遺伝子（例えばHincheeら（1988年）が記載）；ピアラホスに対する耐性を与えるbar遺伝子（例えばWO91/02071に記載）；プロモキシニルに対する耐性を与える*Klebsiella ozaenae*由来のbxnなどのニトリラーゼ遺伝子（Stalker他、1988年）；メトトレキサートに対する耐性を与えるジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（Thillet他、1988年）；イミダゾリノン、スルホニルウレア、または他のALS阻害化学物質に対する耐性を与える変異したアセト乳酸シンターゼ遺伝子（ALS）（EP 154,204）；5-メチルトリプトファンに対する耐性を与える変異したアントラニル酸シンターゼ遺伝子；または除草剤に対する耐性を与えるダラボンデハロゲナーゼ遺伝子である。

【0672】

好ましいスクリーニング可能なマーカーの非限定的な例に含まれるのは、さまざまな発色基質が知られているβ-グルクロニダーゼ（GUS）酵素をコードするuidA遺伝子；発色基質が知られている1つの酵素をコードするβ-ガラクトシダーゼ遺伝子；カルシウム感受性生物発光検出に利用できるエクオリン遺伝子（Prasher他、1985年）；緑色蛍光タンパク質遺伝子（Niedzheva他、1995年）またはその誘導体；生物発光の検出を可能にするルシ

10

20

30

40

50

フェラーゼ (luc) 遺伝子 (Ow他、1986年) ; および本分野で知られる他のものである。「レポーター分子」は、本明細書では、タンパク質産物を参照することによってプロモーターの活性を求めることを容易にする分析的に同定可能なシグナルを自らの化学的性質によって提供する分子を意味する。

【0673】

核酸コンストラクトは例えば植物のゲノムに安定に組み込まれることが好ましい。したがって核酸は、この分子をゲノムに組み込むことを可能にする適切なエレメントを含む。あるいはコンストラクトは、植物細胞の染色体に組み込むことのできる適切なベクターの中に配置される。

【0674】

本発明の一実施態様は、組み換えベクターを含む。このベクターは、本明細書に規定されている少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、そのポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することができる。このようなベクターは、異種核酸配列、すなわち自然界では本発明の核酸分子の隣に見られることがなく、その核酸分子が由来する種とは別の種に由来する核酸配列を含有する。ベクターは、RNAまたはDNA、原核生物または真核生物のベクターが可能であり、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。

【0675】

本発明の組み換えベクターは、核酸分子を融合タンパク質として発現させる融合配列を含む。

【0676】

組み換えベクターは、本明細書に規定されているポリヌクレオチドの核酸配列の周囲および／または中に介在配列および／または非翻訳配列も含むことができる。

【0677】

組み換えベクターは、宿主細胞（植物細胞など）のゲノムに安定に組み込まれることが好ましい。したがって組み換えベクターは、このベクターを細胞のゲノムまたは染色体に組み込むことを可能にする適切なエレメントを含むことができる。

【0678】

組み換え細胞

【0679】

本発明の別の実施態様は、本発明の1つ以上のポリヌクレオチド、コンストラクト、またはベクターで形質転換された宿主細胞またはその子孫細胞である組み換え細胞（例えば組み換え植物細胞）を含む。「組み換え細胞」という用語は、本明細書では「トランスジェニック細胞」という用語と交換可能に用いられる。

【0680】

核酸分子による細胞の形質転換は、核酸分子を細胞に挿入することのできる任意の方法によって実現できる。形質転換の技術の非限定的な例に含まれるのは、トランスフェクション、電気穿孔、微量注入、リポフェクション、吸着、およびプロトプラスト融合である。組み換え細胞は、単一細胞のままに留まること、または増殖させて組織、器官、または多細胞生物にすることができる。本発明の形質転換された核酸分子は、染色体外に留まること、または発現するその能力が保持されるようにして、形質転換された細胞の染色体内の1つ以上の部位に組み込むことができる。

【0681】

好ましい宿主細胞は、植物細胞、より好ましくは穀物植物の細胞、より好ましくはオオムギまたはコムギの細胞、それ以上に好ましくはコムギ細胞である。

【0682】

組み換え細胞は、培養中の細胞、インビトロの細胞であること、または生物（例えば植物など）または器官（例えば根、葉、または莖など）の中にあることが可能である。細胞は植物であることが好ましく、植物の根、葉、および／または莖の中にあることがより好ましい。

【0683】

一実施態様では、植物細胞における活性なNifDKの発現には、NifD、NifK、NifH、NifB、NifE、NifNの発現と、場合によってはNifU、NifS、NifO、NifV、NifY、NifW、および／またはNifZの発現を必要とする。

【0684】

一実施態様では、植物細胞における活性なNifHの発現には、NifHおよびNifMの発現と、場合によってはNifUおよび／またはNifNの発現を必要とする。

【0685】

一実施態様では、植物細胞におけるニトロゲナーゼ活性の再構成には、少なくともNifD、NifK、NifH、NifB、NifE、NifN、およびNifMの発現を必要とする。

【0686】

当業者には、Nifタンパク質のより小さなサブセットが植物細胞における機能的ニトロゲナーゼの再構成をもたらす可能性があることがわかるであろう。本発明の発明者らが知る限り、任意の光合成生物へのニトロゲナーゼ遺伝子の導入に関する唯一の報告は、クラミドモナス属の葉緑体ゲノムへのNifHの導入を記述していた（Cheng他、2005年）。NifHは、NifH生合成前駆タンパク質であるNifM、NifS、およびNifUが同時に発現しなかったという事実にもかかわらず、クロロフィル生合成変異体を補完することができた。これは、内在性の真核細胞等価物がいくつかのNifタンパク質の機能に置き換わりうることを実証した。実際、大腸菌がわずか8つのNifタンパク質を使用してニトロゲナーゼ機能を再構成できることを実証した最近の報告（Wang他、2013年）は、機能の実現を意味するは、植物はNifタンパク質の完全な補完体を発現するよりも複雑ではない可能性がある。本発明の発明者らには、植物におけるNifHタンパク質の機能を明確にすることがまだ残されているが、生合成される機能的なNifタンパク質のレパートリーを、ニトロゲナーゼ機能をサポートする可能性のある環境において発現させることが可能である見込みがある。

【0687】

植物

【0688】

「植物」という用語は、本明細書で名詞として用いられているときには、植物全体を意味するとともに植物界のあらゆるメンバーを意味するが、形容詞として用いられているときには、植物（例えば植物器官（例えば葉、茎、根、花）、単一の細胞（例えば花粉）、種子、植物細胞など）の中に存在する、植物に由来する、または植物に関係するあらゆる物質を意味する。根とシュートが出た状態の苗木と発芽した種子も「植物」の意味に含まれる。「植物の部分」という用語は、本明細書では、植物から得られてその植物のゲノムDNAを含む1つ以上の植物組織または植物器官を意味する。植物の部分に含まれるのは、生長構造（例えば葉、茎）、根、花器官／構造、種子（胚、子葉、および種皮が含まれる）、植物組織（例えば維管束組織、地下組織など）、細胞とその子孫である。好ましい一実施態様では、植物の部分は種子である。「植物細胞」という用語は、本明細書では、植物から得られる細胞または植物内の細胞を意味し、この用語には、植物に由来するプロトプラストまたは他の細胞、配偶子生成細胞、および再生されて完全な植物になる細胞が含まれる。植物細胞として、培養中の細胞が可能である。「植物組織」は、植物内の、または植物から得られる分化した組織（「外植片」）を意味するか、未熟であるか成熟した胚、種子、根、シュート、果実、塊茎、花粉、腫瘍組織（クラウンゴールなど）、および培養中の植物細胞のさまざまな凝集形態（カルスなど）に由来する分化していない組織を意味する。種子内の、または種子からの代表的な植物組織は、子葉、胚、および胚軸である。したがって本発明には、植物、植物の部分、およびこれらを含む産物が含まれる。

【0689】

本明細書では、「種子」という用語は植物の「成熟した種子」を意味し、成熟した種子は、植物から採取される準備ができていないか、採取されたかのいずれかであり、例えば典型的には、田畑で商業的に、または「生育中の種子」（受精後かつ種子の休眠が確立する前と、採取前に植物の中で起こる）として採取される。

【0690】

「トランスジェニック植物」は、本明細書では、同じ種、変種、または栽培品種の野生型植物には見いだされない核酸コンストラクトを含有する植物を意味する。すなわちトランスジェニック植物（形質転換された植物）は、形質転換前には含有していなかった遺伝子材料（導入遺伝子）を含有する。導入遺伝子は、1つの植物細胞、または別の植物細胞、または非植物供給源、または合成配列から得られるか、これらに由来する遺伝子配列を含むことができる。典型的には、導入遺伝子は人為的な操作（例えば形質転換など）によって植物に導入されているが、当業者が認める任意の方法を用いることができる。遺伝子材料は、植物のゲノム（好ましくは核ゲノム）に安定に組み込まれることが好ましい。導入される遺伝子材料は、同じ種に天然状態で存在する配列を含むことができるが、エレメントが再配列された順番、または異なる配列（例えばアンチセンス配列）になっている。

10

【0691】

好ましい一実施態様では、トランスジェニック植物は、導入されたそれぞれの遺伝子（導入遺伝子）すべてについてホモ接合性であるため、その子孫が望む表現型で分離されることはない。トランスジェニック植物は、例えばハイブリッド種子から生長させたF1子孫におけるように、導入された導入遺伝子についてヘテロ接合性であってもよい。このような植物は、本分野で周知の雑種強勢などの利点を提供できる可能性がある。

【0692】

本発明の文脈で規定されるトランスジェニック植物には、組み換え技術を利用して遺伝子改変された植物の子孫が含まれ、その子孫は、興味ある導入遺伝子を含む。このような子孫は、初代トランスジェニック植物の自家受精によって、またはこのような植物を同じ種の別の植物と交配させることによって得ることができる。これは、一般に、望む植物または植物器官の中で、本明細書に規定されている少なくとも1つのタンパク質の産生を調節するためであると考えられる。トランスジェニック植物の部分には、導入遺伝子を含むその植物のあらゆる部分と細胞（例えば培養された組織、カルス、およびプロトプラストなど）が含まれる。

20

【0693】

トランスジェニック植物は本分野で知られている技術を利用して作製することができ、そのような技術の例は、一般に、A. Slater他、『Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants』、Oxford University Press（2003年）と、P. ChristouとH. Klee、『Handbook of Plant Biotechnology』、John Wiley and Sons社（2004年）に記載されている。

30

【0694】

「非トランスジェニック植物」は、組み換えDNA技術を利用した遺伝子材料の導入による遺伝子改変がなされていない植物である。本明細書では、「同質遺伝子植物と比べて」という表現、またはそれと類似した表現は、トランスジェニック植物と比べて同質だが、興味ある導入遺伝子がない植物を意味する。対応する非トランスジェニック植物は、興味あるトランスジェニック植物の先祖と同じ栽培品種または変種の植物であること、またはコンストラクトを欠く同胞植物系統（「分離個体」と呼ばれることがしばしばある）であること、または「空ベクター」コンストラクトで形質転換された同じ栽培品種または変種の植物であることが好ましく、非トランスジェニック植物であることが可能である。「野生型」は、本明細書では、本発明に従って改変されたのではない細胞、組織、または植物を意味する。野生型の細胞、組織、または植物を対照として用い、外来核酸の発現レベル、または形質改変の程度と性質を、本明細書に記載されているようにして改変された細胞、組織、または植物と比較することができる。

40

【0695】

本発明の文脈で規定されるトランスジェニック植物には、組み換え技術を利用して遺伝子改変された植物の子孫が含まれ、その子孫は、興味ある導入遺伝子を含む。このような子孫は、初代トランスジェニック植物の自家受精によって、またはこのような植物を同じ種の別の植物と交配させることによって得ることができる。トランスジェニック植物の部

50

分には、導入遺伝子を含む、その植物のあらゆる部分と細胞（例えば培養された組織、カルス、およびプロトプラストなど）が含まれる。

【0696】

本発明を実施する際に用いることを考慮する植物には単子葉植物と双子葉植物の両方が含まれる。トランスジェニック植物の非限定的な例に含まれるのは、下記のもの、すなわち穀物（例えばコムギ、オオムギ、ライコムギ、エンバク、イネ、トウモロコシ、モロコシ、および関連する穀物）；ブドウ；ビート（サトウダイコンと飼料ビート）；梨果、核果、および軟果（リンゴ、ナシ、プラム、モモ、アーモンド、サクランボ、イチゴ、ラズベリー、およびブラックベリー）；マメ類（インゲンマメ、レンズマメ、エンドウマメ、ダイズ）；油脂植物（セイヨウアブラナまたは他のアブラナ属、カラシ、ポピー、オリーブ、ヒマワリ、ベニバナ、アマ、ココナツ、ヒマ油植物、カカオマメ、ピーナツ）；ウリ科植物（カボチャ、キュウリ、メロン）；繊維植物（ワタ、アマ、アサ、ジュート）；柑橘類（オレンジ、レモン、グレープフルーツ、ミカン）；野菜（ホウレンソウ、レタス、アスパラガス、キャベツ、ニンジン、タマネギ、トマト、ジャガイモ、パプリカ）；クスノキ科（アボカド、シナモン、ショウノウ）；またはトウモロコシ、タバコ、ナッツ、コーヒー、サトウキビ、茶、ブドウの木、ホップ、芝、バナナ、および天然ゴムの木などの植物のほか、装飾植物（花、低木、広葉樹と常緑樹（針葉樹など））である。植物は穀物植物であることが好ましく、コムギ、イネ、トウモロコシ、ライコムギ、エンバク、またはオオムギであることがより好ましく、コムギであることがそれよりも好ましい。

【0697】

本明細書では、「コムギ」という用語は、コムギ属の任意の種を意味し、その中にはその先祖のほか、他の種との交配によって作製したその子孫が含まれる。コムギには、42本の染色体からなりAABBDDのゲノム構造を持つ「六倍体コムギ」と、28本の染色体からなりAABBのゲノム構造を持つ「四倍体コムギ」が含まれる。六倍体コムギには、*T. aestivum*、*T. spelta*、*T. macha*、*T. compactum*、*T. sphaerococcum*、*T. vavilovii*と、その種間交配物が含まれる。六倍体コムギの好ましい種は、*T. aestivum* ssp *aestivum*（「パンコムギ」とも呼ばれる）である。四倍体コムギには、*T. durum*（本明細書ではデュラムコムギ、または*Triticum turgidum* ssp. *durum*とも呼ぶ）、*T. dicoccoides*、*T. dicoccum*、*T. polonicum*、と、その種間交配物が含まれる。それに加え、「コムギ」という用語には、六倍体または四倍体の*Triticum* sp.の潜在的な先祖（例えばAゲノムについては*T. uartu*、*T. monococcum*、または*T. boeoticum*、Bゲノムについては*Aegilops speltoides*、Dゲノムについては*T. tauschii*（*Aegilops squarrosa*または*Aegilops tauschii*としても知られる）が含まれる。特に好ましい先祖はAゲノムの先祖であり、Aゲノム先祖は*T. monococcum*であることがより一層好ましい。本発明で用いるためのコムギ栽培品種は、上に列挙した種の任意の種に属するものが可能だが、それに限定されない。非コムギ属の種（ライムギ [*Secale cereale*] など）（その非限定的な例にライコムギ属が含まれる）との有性交配において親としてコムギ属の種を用いて従来の技術によって作製される植物も包含される。

【0698】

本明細書では、「オオムギ」という用語は、オオムギ属の任意の種を意味し、その中にはその先祖のほか、他の種との交配によって作製したその子孫が含まれる。植物は、商業的に栽培されているオオムギ属の種（例えば*Hordeum vulgare*の株または栽培品種または変種）、または穀粒の商業的生産に適したオオムギ属の種であることが好ましい。

【0699】

トランスジェニック植物を作製する方法

【0700】

遺伝子を細胞に直接送達する4つの一般的な方法がこれまでに報告されている。すなわち、（1）化学的方法（Graham他、1973年）；（2）物理的方法、例えば微量注入（Capecci、1980年）、電気穿孔（例えばWO 87/06614, US 5,472,869、5,384,253、WO 92/09696、およびWO 93/21335を参照されたい）、および遺伝子銃（例えばUS

4,945,050とUS 5,141,131を参照されたい) ; (3) ウイルスベクター (Clapp、1993年 ; Lu他、1993年 ; Eglitis他、1988年) ; および (4) 受容体を媒介とした機構 (Curiel他、1992年 ; Wagner他、1992年) である。

【0701】

利用できる加速法に含まれるのは、例えばマイクロプロジェクティル照射 (microprojectile bombardment) などである。植物細胞に形質転換用の核酸分子を送達する方法の一例は、マイクロプロジェクティル照射である。この方法は、Yang他、『Particle Bombardment Technology for Gene Transfer』、Oxford Press、オックスフォード、イングランド (1994年) によって概説されている。核酸で被覆され、推進力によって細胞に送達することのできる非生物粒子 (マイクロプロジェクティル)。代表的な粒子に含まれるのは、タングステン、金、白金などからなるものである。マイクロプロジェクティル照射は単子葉植物を再現可能に形質転換する有効な手段だが、それに追加される特別な1つの利点は、プロトプラストの単離も、アグロバクテリウム感染の感受性も必要とされないことである。本発明で用いるのに適した粒子送達系は、Bio-Rad Laboratories社から入手できるヘリウム加速PDS-1000/He銃である。照射のため、未熟な胚または誘導された標的細胞 (未熟胚からの胚盤またはカルスなど) を固体培養培地の表面に配置することができる。

【0702】

代わりの一実施態様では、プラスチドを安定に形質転換することができる。高等植物におけるプラスチド形質転換に関して開示されている方法は、選択マーカーを含有するDNAをパーティクルガンで送達し、相同組み換えを通じてそのDNAにプラスチドゲノムを標的とさせることを含む (US 5,451,513、US 5,545,818、US 5,877,402、US 5,932,479、およびWO 99/05265)。

【0703】

アグロバクテリウムを媒介とした輸送は、遺伝子を植物細胞に導入するのに広く適用できるシステムである。なぜならDNAを植物組織全体に導入することができ、そのことによってプロトプラストから完全な植物を再生させる必要性が回避されるからである。植物細胞へのDNAの導入にアグロバクテリウムを媒介として植物に組み込むベクターを利用することは、本分野で周知である (例えばUS 5,177,010、US 5,104,310、US 5,004,863、US 5,159,135を参照されたい)。さらに、T-DNAの組み込みは比較的正確なプロセスであり、再配置がほとんどない。DNAのうちで輸送すべき領域は境界配列によって規定されており、介在DNAが通常は植物ゲノムの中に挿入される。

【0704】

アグロバクテリウム形質転換ベクターは、大腸菌とアグロバクテリウムの中での複製が可能であり、(Klee他、『Plant DNA Infectious Agents』、HohnとSchell、(編者)、Springer-Verlag社、ニューヨーク (1985年) : 179~203ページに) 記載されているような便利な操作を可能にする。さらに、アグロバクテリウムを媒介とした遺伝子導入のためのベクターにおける技術的進歩により、ベクター内の遺伝子と制限部位の配置が改善されて、さまざまなポリペプチドをコードする遺伝子を発現することのできるベクターの構築が容易になった。記載されているベクターは、ポリペプチドをコードする挿入遺伝子を直接発現させるためのプロモータとポリアデニル化部位が隣接した便利なマルチリンカー領域を有するため、本発明の目的に適している。それに加え、武装Ti遺伝子と非武装Ti遺伝子の両方を含有するアグロバクテリウムを用いて形質転換させることができる。アグロバクテリウムを媒介とする形質転換が効果的である植物品種では、遺伝子導入の容易さと明確な性質を理由として、これが最適な方法である。

【0705】

アグロバクテリウム形質転換法を利用して形成されたトランスジェニック植物は、典型的には1つの染色体上に単一の遺伝子座を含有する。このようなトランスジェニック植物は、付加されたこの遺伝子に関してヘミ接合性であると言える。より好ましいのは、付加された構造遺伝子に関してホモ接合性であるトランスジェニック植物、すなわち、2つの

付加された遺伝子を含有していて、1つの遺伝子が染色体ペアの各染色体上の同じ遺伝子座にあるトランスジェニック植物である。ホモ接合性トランスジェニック植物を取得することは、単一の付加された遺伝子を含有する独立した分離個体トランスジェニック植物を有性交配（自家受精）させ、生成した種子のいくつかを発芽させ、得られた植物で興味ある遺伝子を分析することによって可能である。

【0706】

2つの異なるトランスジェニック植物を交配させて2つの独立な分離外来遺伝子を含有する子孫を生成させることも可能であることも理解されるべきである。適切な子孫の自家受精により、両方の外来遺伝子に関してホモ接合性である植物を生成させることができる。栄養増殖と同様、親植物への戻し交配と、非トランスジェニック植物との異系交配も考えられる。異なる形質と作物に関して一般に利用されている他の育種法の記述は、Fehr、『Breeding Methods for Cultivar Development』、J. Wilcox（編者）American Society of Agronomy、マディソン、ウィスコンシン州（1987年）に見いだすことができる。

10

【0707】

植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレングリコール処理、電気穿孔、およびこれらの処理の組合せに基づく方法を利用して実現することができる。異なる植物品種に対してこれらのシステムを適用できるかは、プロトプラストからその特定の植物株を再生させる能力に依存する。プロトプラストから穀類を再生させるための例となる方法が記載されている（Fujimura他、1985年；Toriyama他、1986年；Abdullah他、1986年）。

20

【0708】

他の細胞形質転換法も利用することができ、その非限定的な例に含まれるのは、植物へのDNAの導入を、花粉の中への直接的なDNA導入によって、植物の生殖器官の中へのDNAの直接的な注入によって、または未熟な胚の細胞の中へのDNAの直接的な注入によって実現した後、乾燥した胚を再水和する方法である。

【0709】

単一の植物プロトプラスト形質転換体、または形質転換されたさまざまな外植片からの植物の再生、生長、および栽培は、本分野で周知である（Weissbach他、『Methods for Plant Molecular Biology』、Academic Press社、サン・ディエゴ、（1988年））。この再生と生長のプロセスは、典型的には、形質転換された細胞を選択する工程を含み、これらの個別化された細胞を培養して胚発生の通常の諸段階を通過させ、根付いた苗木の段階を経過させる。トランスジェニック胚とトランスジェニック種子も同様に再生される。得られる根付いたトランスジェニックシュートはその後、適切な植物生長媒体（土など）の中に植えられる。

30

【0710】

外来遺伝子を含有する植物の生長または再生は本分野で周知である。再生された植物は自家受粉によってホモ接合性トランスジェニック植物を提供することが好ましい。そうでない場合には、再生された植物から得られる花粉を、種子から生長させた農業で重要な系統の植物と交配させる。逆に、これらの重要な系統の植物からの花粉を用い、再生された植物に受粉する。望む外来核酸を含有する本発明のトランスジェニック植物は、当業者に周知の方法を利用して栽培される。

40

【0711】

*Agrobacterium tumefaciens*を用いて双子葉植物を形質転換してトランスジェニック植物を得る方法が、ワタ（US 5,004,863、US 5,159,135、US 5,518,908）；ダイズ（US 5,569,834、US 5,416,011）；アブラナ科（US 5,463,174）；ピーナツ（Cheng他、1996年）；およびエンドウマメ（Grant他、1995年）に関して公開されている。

【0712】

外来核酸の導入によって植物の中に遺伝子のバリエーションを導入するためと、プロトプラストまたは未熟な植物胚から植物を再生させるために穀物植物（コムギやオオムギ）

50

を形質転換する方法は、本分野で周知である（例えばCA 2,092,588、AU 61781/94、AU 667939、US 6,100,447、WO 97/048814、US 5,589,617、US 6,541,257を参照されたい）。他の方法は、WO 99/14314に示されている。トランスジェニックコムギまたはトランスジェニックオオムギは、*Agrobacterium tumefaciens*を媒介とした形質転換手続きによって作製されることが好ましい。望む核酸コンストラクトを運ぶベクターは、組織培養した植物または外植片の再生可能なコムギ細胞、または適切な植物系（プロトプラストなど）に導入することができる。再生可能なコムギ細胞は、未熟な胚の胚盤、成熟した胚、これらに由来するカルス、または分裂組織由来であることが好ましい。

【0713】

トランスジェニック細胞とトランスジェニック植物の中に導入遺伝子が存在することを確認するため、当業者に知られている方法を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅またはサザンブロット分析を実施することができる。導入遺伝子の発現産物は、その産物の性質に応じて多彩な方法のいずれかで検出することができ、方法にはウエスタンブロットと酵素アッセイが含まれる。異なる植物組織の中のタンパク質の発現を定量して複製を検出するのに特に有用な1つの方法は、レポーター遺伝子（GUSなど）を利用することである。トランスジェニック植物が得られると、それを生長させて望む表現型を持つ植物組織または植物の部分を生産させる。植物組織または植物の部分を回収すること、および／または種子を採取することができる。種子は、望む特徴を持つ組織または部分を含む追加の植物を生産させるための供給源として役立てることができる。

【0714】

「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）は、「上流」プライマーと「下流」プライマーからなる「プライマーのペア」または「プライマーのセット」と、重合の触媒（例えばDNAポリメラーゼ、典型的には熱に対して安定なポリメラーゼ酵素）を使用して、標的ポリヌクレオチドの複製コピーが作られる反応である。PCRのための方法は本分野で知られており、例えば『PCR』（M.J. McPhersonとS.G Moller（編者）、BIOS Scientific Publishers Ltd社、オックスフォード（2000年））の中に教示されている。PCRは、本発明のポリヌクレオチドを発現している植物細胞から単離されたmRNAを逆転写して得られたcDNAで実施することができる。しかしPCRを植物から単離されたゲノムDNAで実施する場合には、一般により簡単であろう。

【0715】

プライマーは、標的配列に配列特異的なやり方でハイブリダイズしてPCR中に伸長することのできるオリゴヌクレオチド配列である。アンプリコンまたはPCR産物またはPCR断片または増幅産物は、プライマーと、標的配列の新たに合成されたコピーとを含む伸長産物である。多重PCRシステムは、プライマーの多数のセットを含有しており、2つ以上のアンプリコンを同時に生成させる。プライマーは標的配列と完全に一致していること、または特定の標的配列に制限酵素または触媒性核酸認識／切断部位を導入することになる可能性がある内部ミスマッチ塩基を含有することが可能である。プライマーは、アンプリコンの捕獲または検出を容易にするため、追加配列を含有すること、および／または修飾または標識されたヌクレオチドを含有することもできる。DNAの熱変性、プライマーの、その相補的配列へのアニーリング、およびポリメラーゼによるアニールされたプライマーの伸長という反復サイクルの結果、標的配列が指数関数的に増幅される。標的または標的配列または鋳型という用語は、増幅される核酸配列を意味する。

【0716】

ヌクレオチド配列の直接的なシーケンシングの方法は当業者に周知であり、例えばAusbel他（上記文献）とSambrook他（上記文献）に見いだすことができる。シーケンシングは適切な任意の方法（例えばジデオキシシーケンシング、化学的シーケンシング、またはこれらのバリエーション）によって実施することができる。直接的なシーケンシングは、特定の配列の任意の塩基対におけるバリエーションを明らかにするのに有利である。

【0717】

植物／穀粒のプロセッシング

【0718】

本発明の穀粒／種子（好ましくは穀物の種子）、または本発明の植物の他の部分を本分野で知られている任意の技術を利用して処理して食品成分、食料品、または非食料品にすることができる。

【0719】

一実施態様では、製品は、全粒粉（例えば超微細に粉碎された全粒粉、またはほぼ100%が穀粒からなる粉末）である。全粒粉は、精製された穀物粉末構成成分（精製された穀物粉末、または精製された穀物粉末）と、粗分画（超微細に粉碎された粗分画）を含む。

【0720】

精製された穀物粉末として、例えばクリーンにされた穀粒（コムギまたはオオムギの穀粒）を粉碎し、篩い分けすることによって調製される穀物粉末が可能である。精製された穀物粉末の粒径は、「212マイクロメートル（U.S Wire 70）」と指定されているワイヤで織った布の開口部よりも大きくない開口部を持つ布を98%以上が通過する穀物粉末として記述される。粗分画は、糠と胚芽の少なくとも一方を含む。例えば胚芽は、穀粒の中核内に見いだされる胚性植物である。胚芽は、脂質、繊維、ビタミン、タンパク質、ミネラル、および植物栄養素（フラボノイドなど）を含む。糠はいくつかの細胞層を含んでおり、かなりの量の脂質、繊維、ビタミン、タンパク質、ミネラル、および植物栄養素（フラボノイドなど）を有する。さらに、粗分画は、アリューロン層を含むことができ、そこにも脂質、繊維、ビタミン、タンパク質、ミネラル、および植物栄養素（フラボノイドなど）が含まれる。アリューロン層は、技術的に胚乳の一部であると見なされているが、糠と同じ特徴の多くを示すため、典型的には粉碎プロセスの間に糠および胚芽とともに除去される。アリューロン層は、タンパク質、ビタミン、および植物栄養素（フェルラ酸など）を含有する。

【0721】

さらに、粗分画は、精製された穀物粉末成分と混合することができる。粗分画を精製された穀物粉末成分と混合して全粒粉を形成することができ、したがって精製された穀物粉末と比べて栄養価、繊維含量、および抗酸化能力が向上した全穀粒粉が提供される。例えば焼成製品、スナック製品、および食料品では、精製された穀物粉末または全粒粉の代わりに粗い分画または全粒粉をさまざまな量で使用することができる。本発明の全穀粒粉（すなわち超微細に粉碎された全穀粒粉）を消費者に直接販売し、彼らの手作りの焼成製品で使用してもらうこともできる。代表的な一実施態様では、全穀粒粉の造粒プロファイルは、全穀粒粉の粒子の98重量%が212マイクロメートル未満である。

【0722】

さらなる実施態様では、全粒粉および／または粗分画の糠と胚芽の中に見いだされる酵素を不活化して全粒粉および／または粗分画を安定化させる。安定化は、蒸気、熱、照射、または他の処置を利用して糠と胚芽の層に見いだされる酵素を不活化するプロセスである。安定化された穀物粉末は、その調理特性を維持するとともに、より長い保存期間を持つ。

【0723】

追加の実施態様では、全粒粉、粗分画、または精製された穀物粉末は、食料品の構成要素（成分）であること、食料品の製造に使用することができる。例えば食料品として、ベーグル、ビスケット、パン、パン、クロワッサン、餃子、イングリッシュマフィン、マフィン、ピタブレッド、クイックブレッド、冷蔵／冷凍生地製品、ドー、バイクドビーンズ、ブリトー、チリ、タコ、タマレ、トルティーヤ、ポットパイ、そのまま食べられるシリアル、インスタント食品、詰め物、電子レンジ食品、ブラウニー、ケーキ、チーズケーキ、コーヒークッキー、クッキー、デザート、ペストリー、スイートロール、キャンディーバー、パイ皮、パイの詰め物、ベビーフード、ベーキングミックス、生地、パン粉、グレービーミックス、肉増量剤、肉代用品、シーズニングミックス、スープミックス、グレービー、ルー、サラダドレッシング、スープ、サワークリーム、麺、パスタ、ラーメン、揚げ

麺、汁なし麺、アイスクリーム含有物、アイスクリームバー、アイスクリームコーン、アイスクリームサンドイッチ、クラッカー、クルトン、ドーナツ、エッグロール、押出スナック、果物と穀粒のバー、電子レンジ用スナック製品、栄養バー、パンケーキ、パーベイクドベーカリー製品、プレッツェル、プリン、グラノーラをベースとした製品、スナックチップ、スナック食品、スナックミックス、ワッフル、ピザ皮、動物の餌、またはペットフードが可能である。

【0724】

代わりの実施態様では、全粒粉、精製された穀物粉末、または粗分画は、栄養サプリメントの1つの成分になることができる。例えば栄養サプリメントは、1つ以上の追加成分（典型的には、ビタミン、ミネラル、ハーブ、アミノ酸、酵素、抗酸化剤、ハーブ、スパイス、プロバイオティクス、エキス、プレバイオティクス、および繊維が含まれる）を含有する食事に添加される製品になることができる。本発明の全粒粉、精製された穀物粉末、または粗分画は、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、酵素、および繊維を含む。例えば粗分画は、濃縮された量の食物繊維のほか、健康食品に必須の他の必須栄養素（ビタミンB、セレン、クロム、マンガン、マグネシウム、および抗酸化剤）を含有する。例えば本発明の22グラムの粗分画は、一人の繊維1日推奨消費量の33%を供給する。栄養サプリメントは、個人の全体的な健康を助けるであろう既知の任意の栄養成分（その非限定的な例に含まれるのは、ビタミン、ミネラル、他の繊維成分、脂肪酸、抗酸化剤、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ルテイン、リボース、オメガ3脂肪酸、および／または他の栄養成分である）を含むことができる。サプリメントは、以下の形態、すなわち即席飲料混合物、そのまま飲む飲料、栄養バー、ウエハース、クッキー、クラッカー、ゲルショット、カプセル、チュー、咀嚼錠、およびピルで供給することができるが、それに限定されない。一実施態様は、繊維サプリメントをフレーバー付きのシェイク、またはモルト型の飲料の形態で供給するため、この実施態様は子ども用の繊維サプリメントとして特に魅力的である可能性がある。

【0725】

追加の一実施態様では、粉碎プロセスを利用して、複数の穀粒の粉末または複数の穀粒の粗分画を製造することができる。例えば1つのタイプの穀粒に由来する糠と胚芽を粉碎し、別のタイプの穀物の粉碎された胚乳または全粒粉と混合することができる。あるいは1つのタイプの穀粒の糠と胚芽を粉碎し、別のタイプの穀粒の粉碎された胚乳または全粒粉と混合することができる。本発明は、糠、胚芽、胚乳、および1つ以上の穀粒の全粒粉の1つ以上の任意の組み合わせを混合することを包含すると考えられる。この複数の穀粒というアプローチを利用すると、カスタム生産の穀物粉末を製造するとともに、1つの穀物粉末を製造するのに複数のタイプの穀粒の品質と栄養成分を活用することができる。

【0726】

本発明の全粒粉、粗分画、穀粒製品、および／または穀粒製品は、本分野で知られている任意の粉碎法によって製造できると考えられる。代表的な一実施態様は穀粒を単一の流れで粉碎することを含み、穀粒の胚乳、糠、および胚芽が別々の流れに分離されることはない。クリーンにして硬くした穀粒は、第1の通過グラインダー（ハンマーミル、ローラーミル、ピンミル、インパクトミル、ディスクミル、エアアトリッションミル、ギャップミルなど）に運ばれる。粉碎後、穀粒は排出されてシフターに運ばれる。さらに、本発明の全粒粉、粗分画、および／または穀粒製品は、多数の他のプロセス（発酵、インスタント化、押出し、カプセル化、トースティング、焙煎など）によって改変または増強することができると考えられる。

【0727】

麦芽製造

【0728】

本発明によって提供される麦芽ベースの飲料には、その出発材料の一部または全部として麦芽を用いることによって製造されるアルコール飲料（蒸留飲料が含まれる）と非アルコール飲料が含まれる。例に含まれるのは、ビール、発泡酒（低麦芽ビール飲料）、ウイ

スキー、低アルコール麦芽系飲料（例えば1%未満のアルコールを含む麦芽系飲料）、および非アルコール飲料である。

【0729】

麦芽製造は、制御された浸漬と発芽の後、穀粒（オオムギとコムギの穀粒など）を乾燥させるプロセスである。この一連のイベントは、穀粒の改変（死んだ胚乳の細胞壁を主にばらばらにして穀粒の栄養素を移動させるプロセス）を引き起こす多数の酵素の合成にとって重要である。その後の乾燥プロセスでは、化学的褐変反応によって香りと色を生じさせる。麦芽の第1の用途は飲料の製造だが、麦芽は他の工業的プロセスでも利用され、例えばパン・菓子製造業では酵素源として、食品製造業では着香剤および着色剤として（例えば麦芽または麦芽粉末として、または間接的に麦芽シロップなどとして）利用される。

10

【0730】

一実施態様では、本発明は、麦芽組成物を製造する方法に関する。この方法は、

- (i) 本発明の穀粒（例えばオオムギまたはコムギの穀粒）を用意する工程、
- (ii) 前記穀粒を浸漬する工程、
- (iii) 浸漬した穀粒をあらかじめ決めた条件下で発芽させる工程、および
- (iv) 前記発芽した穀粒を乾燥させる工程

を含むことが好ましい。

【0731】

例えば麦芽は、Hoseney（『Principles of Cereal Science and Technology』、第2版、1994年：American Association of Cereal Chemists、セント・ポール、ミネソタ州）に記載されている任意の方法によって製造することができる。しかし麦芽を製造するための他の適切な任意の方法も本発明で利用することができる（それは特製麦芽の製造法などであり、その非限定的な例に含まれるのは、麦芽を焙煎する方法である）。

20

【0732】

麦芽は主にビールの醸造に使用されるが、蒸留スピリッツの製造にも使用される。醸造は、麦芽汁の製造、主発酵と二次発酵、および後処理を含む。最初に麦芽を粉碎し、水中で攪拌し、加熱する。この「マッシング」の間に、麦芽製造において活性化した酵素が穀粒のデンプンを分解して発酵可能な糖にする。製造された麦芽汁を透明にし、酵母を添加し、この混合物を発酵させ、後処理を実施する。

【0733】

30

ニトロゲナーゼ複合体の検出

【0734】

ニトロゲナーゼ複合体の検出は、NifDKタンパク質複合体とNifHタンパク質の間の相互作用を検出できる任意の方法によって実施することができる。NifDKタンパク質複合体とNifHタンパク質の間の相互作用を検出するのに適した方法には、共免疫沈降、アフィニティプロットティング、プルダウン、FRETなど、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するための本分野で知られている任意の方法が含まれる。

【0735】

あるいはニトロゲナーゼ複合体の検出は、得られたニトロゲナーゼ複合体の活性を測定することによって実施できる。

40

【0736】

ニトロゲナーゼの活性を測定するのに適した方法には、二窒素が酵素によって還元されてアンモニアになり、電子がNifHタンパク質からNifDKタンパク質複合体へと移動することを検出するための本分野で知られている任意の方法が含まれる。例えば窒素固定活性は、アセチレン還元アッセイによって推定することができる。簡単に述べると、この技術は、三重結合した基質をニトロゲナーゼ複合体が還元する能力を利用した間接法である。ニトロゲナーゼ酵素は、アセチレン（ C_2H_2 ）を還元してエチレン（ C_2H_4 ）にする。両方のガスは、ガスクロマトグラフィを利用して定量化することができる。窒素固定は、水素放出アッセイによって測定することもできる。 H_2 は、 N_2 固定の必須の副生成物である。したがってニトロゲナーゼ活性の間接的測定は、ガス流中の H_2 の濃度をフロースルー型 H_2

50

センサーまたはガスクロマトグラフを用いて定量化することによって実現することができる。

【0737】

N₂固定の検出

【0738】

窒素固定は、植物-土壌系の全Nの正味の増加を求め（N収支法）；2）植物のNを、土壌から摂取された分画と、N₂固定に由来する分画に分離し（Nの差、15N天然存在比、15Nアイソタイプ希釈とウレイド法）、3）ニトロゲナーゼの活性を測定すること（アセチレン還元アッセイと水素放出アッセイ）によって推定することができる。

【実施例】

【0739】

実施例1：材料と方法

【0740】

一過性発現系の中の植物細胞における遺伝子の発現

【0741】

遺伝子を、植物細胞の中で、本質的にWoodら（2009年）によって記述されているが下に概要を記載したようなさまざまな改変を伴う一過性発現系を用いて発現させた。*Nicotiana benthamiana*植物を23℃の生長室の中で、白色蛍光灯によって90マイクロモル/分の光強度を与えた16時間：8時間の明：暗サイクル下で生長させた。強力な構成的35Sプロモータまたは増強型35Sプロモータ（e35S；Kay他、1987年）によって植物細胞の中で発現させるコード領域を含有するバイナリーベクターを*Agrobacterium tumefaciens*株GV3101に導入した。WO2010/057246に記載されているように、p19ウイルスサイレンシングサプレッサを発現させるためのキメラバイナリーベクター35S：p19をAGL1の中に別に導入した。このウイルスサイレンシングサプレッサは、これと合わせて導入される導入遺伝子の遺伝子発現を維持するための方法に決まって含まれていた。この組み換え*A. tumefaciens*細胞を、ベクター上の選択マーカー遺伝子に応じて50 mg/lのカルベニシリンまたは50 mg/lのカナマイシンを補足するとともに50 mg/lのリファンピシンを補足したLBブロスの中で28℃にて定常期まで増殖させた。アセトシリンゴンを培養物に添加して最終濃度を100 μMにし、次いでこの培養物を振盪しながら28℃でさらに2.5時間インキュベートした。次にこの細菌を室温にて5000×gで10分間遠心分離することによってペレット化した。上清を廃棄し、ペレットを、10 mMのMES pH 5.7、10 mMのMgCl₂、および100 μMのアセトシリンゴンを含有する溶液の中に再懸濁させた後、OD600を測定した。OD600=0.10という最終濃度に到達するのに必要な体積の各培養物を、ウイルスサプレッサコンストラクト35S：p19を含有する培養物を含め、新しいチューブに添加した。浸透バッファを補足して最終体積にした。次に、葉に培養混合物を浸透させ、植物を、典型的には浸透後のさらに3～5日間にわたって培養した後、分析のためリーフディスクを採取した。ウイルスサプレッサコンストラクト35S：p19だけを持つ対照浸透物が典型的には含まれていた。

【0742】

興味ある2つ以上の遺伝子を組み合わせることで過剰発現させるため、上記のようにしてそれぞれの追加遺伝子を別々に*A. tumefaciens*株の中に導入し、増殖させた。各細菌株がOD600=0.10の最終濃度になるように細菌懸濁液を混合した。ウイルスサイレンシングサプレッサ35S：p19をコードする遺伝子を含有する細菌株は、すべての混合物に同じ濃度で含まれていた。例えば一過性葉アッセイにおいて、4つの遺伝子を、ウイルスサプレッサコンストラクトを含めて発現させるため、浸透した混合物の最終的なOD600は5×0.10=0.50ユニットであった。一過性アッセイの形式において、それぞれが別々のT-DNAベクターに由来する少なくとも5つの遺伝子の植物細胞内での同時過剰発現は、以前に*Nicotiana benthamiana*を用いて実証されている（Wood他、2009年）。

【0743】

N. *benthamiana*の葉の中でNif遺伝子を発現させるためのプラスミドの構築

【0744】

特に断わらない限り、*N. benthamiana*の葉において遺伝子を一過性発現させるためのプラスミドは、Golden Gate組み立て法でモジュール式クローニング系（Weber他、2011年）を利用して構成した。個別のプラスミドとしてのDNA部分（Thermo Fisher Scientific社、ENSA）であって、それぞれが、35S CaMVプロモータ（EC51288）、*Arabidopsis thaliana* F1-ATPアーゼ γ サブユニットの最初の51個のアミノ酸をコードする遺伝子（MTP-FA γ 51）、植物コドンが最適化されたnifH（EC38011）、nifK（EC38015）、nifY（EC38019）、nifE（EC38016）、nifN（EC38024）、nifJ（EC38022）、nifB（EC38017）、nifQ（EC38025）、nifF（EC38021）、nifU（EC38026）、nifS（EC38018）、nifV（EC38020）、nifW（EC38027）、nifZ（EC38029）、nifM（EC38023）、nifX（EC38028）、植物コドンが最適化されたHAエピトープタグ（EC38003）、およびCaMVポリアデニル化配列／転写ターミネータ領域（EC41414）を含有するものを、IIS型制限クローニングを利用して骨格ベクター（EC47772、EC47742、EC47751、EC47761、EC47781）の中で組み立てた。

【0745】

RNAの抽出、cDNAの合成、および分析

【0746】

植物の葉サンプル（アグロバクテリウムが浸透したサンプルなど）からRNAを抽出するため、面積が約2×2 cmの葉片を液体窒素で凍結させ、粉碎して粉末にし、サンプル1つにつき500 μ lのTrizoleバッファ（Thermo Fisher Scientific社）を添加する。その後はTrizoleの供給者の指示に従うが、以下の変更点、すなわちクロロホルム抽出を反復することと、RNAを37℃で溶解させることが異なる。抽出されたRNAをRQ1 DNアーゼ（Promega社）で処理し、抽出されたあらゆるDNAを除去する。次に、このRNA調製物を、Plant RNeasyカラム（Qiagen社）を用いてさらに精製する。cDNAの合成は、実施するときには、オリゴdTプライマーを使用し、Superscript III逆転写酵素（Thermo Fisher Scientific社）を供給者のプロトコルに従って用いて実施する。それぞれのRNAサンプルをRT-PCR分析するため、cDNA合成反応を3回別々に実施する。20 μ lのcDNA反応物を、ヌクレアーゼを含まない水の中で20倍に希釈する。qRT-PCRをQiagen Rotor-Gene QリアルタイムPCR装置で実施する。9.6 μ lの各cDNAを10 μ lの2×sensifast no ROX SYBR Taq（Bioline社）と0.4 μ lの順方向プライマーおよび逆方向プライマー（それぞれ10マイクロモル）に添加して最終反応体積を20 μ lにする。（参照遺伝子と特定の遺伝子の両方について）すべてのqPCR反応を、以下のサイクル条件、すなわち95℃/5分を1サイクル、95℃/15秒、60℃/15秒、および72℃/20秒を45サイクルのもとで、三連で実施する。蛍光を72℃の段階で測定する。その後55℃から99℃への融解サイクルを実施する。Rotor-Geneソフトウェアパッケージの中の比較定量化プログラムを用いて遺伝子発現を規格化するため、構成的に発現した*N. benthamiana* GADPH mRNAの対照増幅を利用する。3つのcDNAからなる各セットの値を平均する（三連アッセイの平均値を表わす）と、平均値の標準誤差（SEM）を計算することが可能になる。

【0747】

細菌細胞からのタンパク質抽出

【0748】

尿素／SDSバッファ（8 Mの尿素、2%のSDS、100 mMのTris-HCl pH 8.5、65 mMのDTT）を用いた抽出によってタンパク質を大腸菌細胞から単離した。300 μ lの抽出バッファを添加し、この混合物を10秒間攪拌し、12,000×gで2分間遠心分離した。抽出されたタンパク質（「全タンパク質」）を含有する上清を-80℃で保管した後、プロセッシングを実施した。微量滴定Bradfordタンパク質アッセイ（Bio-Rad社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）を製造者の指示に従って用いてタンパク質の推定を実施した。そうするため、異なるサンプルから抽出されたサンプルを二連で水中にて2つの希釈度（1：20、1：40）に希釈し、SpectraMax Plusを用いて595 nmで測定した。ウシ血清アルブミン（BSA）基準を0.05 mg/mlからほぼ0.5 mg/mlまでの線形な範囲で使用した。BSAの濃度は

、Australian Proteomics Analysis Facility（シドニー、オーストラリア国）で高感度アミノ酸分析によって求めた。ブランクで補正した基準曲線を二連で走らせた。線形回帰を利用して標準曲線にフィットさせた。

【0749】

葉組織からのタンパク質抽出

【0750】

T-DNAの導入後に植物細胞の中で産生された特定のポリペプチドの量と特性、特にミトコンドリアにおけるプロセシングの1つの指標としてのポリペプチドのサイズを分析するため、*N. benthamiana*の葉サンプルを、特に断わらない限り、浸透の4日後または5日後の浸透領域から約180mm²の葉片を切除することによって採取した。これらを液体窒素の中で凍結させ、プロセシングを実施するときには、乳鉢と乳棒を用いて粉碎して粉末にした。300 μlのバッファを各粉末サンプルに添加した。このバッファは、125 mMのTris HCl pH 6.8、4%(w/v)のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、20%(w/v)のグリセロール、60 mMのジチオトレイトール（DTT）、および0.002%(w/v)のプロモフェノールブルーを含有していた。サンプルを95℃に3分間加熱した後、12000×gで2分間遠心分離した。抽出されたポリペプチドを含有する上清（本明細書では「全タンパク質」と呼ぶ）を取り出し、検出すべきポリペプチドの予想レベルに応じて10 μl～100 μlをウエスタンブロットティングに使用した。

10

【0751】

葉組織からの全、不溶性、および可溶性タンパク質分画の調製

20

【0752】

*N. benthamiana*の葉サンプルを、浸透の4日後または5日後の浸透領域から約180 mm²の葉片を切除することによって採取した。これらを液体窒素の中で凍結させ、プロセシングを実施するときには、乳鉢と乳棒を用いて粉碎して粉末にした。

【0753】

可溶性を調べるため、採取した葉組織を液体窒素の中で粉碎し、抽出バッファ（100 mMのTris pH 8.0、150 mMのNaCl、0.25 Mのマニトール、5%(v/v)のグリセロール、1%(v/v)のTween 20、1%(w/v)のPVP、2 mMのTCEP、0.2 mMのPMSF、10 μMのロイペプチン）を収容したマイクロフュージチューブに移した。サンプルを20,000×gで5分間遠心分離してサンプルを可溶性（上清）分画と不溶性（ペレット）分画に分けた。上清を新しいマイクロフュージチューブに移し、再度20,000×gで5分間遠心分離し、ペレットを抽出バッファで3回洗浄した。得られた可溶性分画と不溶性分画にLaemmliバッファを添加した後、Allen他（2017年）に記載されているようにしてSDS-PAGEに続いてウエスタンブロット分析を実施した。

30

【0754】

粉碎した各サンプルに300 μlの冷たい可溶性バッファを添加した。可溶性バッファは、50 mMのTris-HCl pH 8.0、75 mMのNaCl、100 mMのマニトール、2 mMのDTT、0.5%(w/v)のポリビニルピロリドン（平均分子量40,000）、5%(v/v)のグリセロール、0.2 mMのPMSF、10 μMのロイペプチン、および0.5%(v/v)のTween（登録商標）20を含有していた。サンプルを4℃にて16,000×gで5分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、ペレットを300 μlの冷たい可溶性バッファの中に再懸濁させた。上清（サンプル1）と再懸濁されたペレット（サンプル2）の両方を再度4℃にて16,000×gで5分間遠心分離した。サンプル1からは、上清からサンプルを採取した。それを可溶性分画と呼ぶ。このサンプルを同量の4×SDSバッファと混合した。4×SDSバッファは、250 mMのTris-HCl pH 6.8、8%(w/v)のSDS、40%(v/v)のグリセロール、120 mMのDTT、および0.004%(w/v)のプロモフェノールブルーを含有していた。第2の遠心分離工程の後、サンプル2の上清を廃棄した。ペレットを不溶性分画と呼ぶ。ペレットを300 μlの4×SDSバッファの中に再懸濁させ、300 μlの可溶性バッファを添加した。可溶性分画と不溶性分画を全タンパク質の量と比較したとき、全タンパク質サンプルのための葉片を上記のようにして粉碎した。しかし粉碎されたサンプルを300 μlの4×SDSバッファの中に再懸

40

50

濁させ、300 μ lの可溶性バッファを添加した。全、不溶性、および可溶性分画のためのサンプルを95℃に3分間加熱した後、12000×gで2分間遠心分離した。ゲル電気泳動とウエスタンブロット分析のため、抽出されたポリペプチドを含有する上清20 μ lをNuPAGE Bis Tris 4~12%ゲル (Thermo Fisher Scientific社) にロードした。

【0755】

嫌氣的に抽出されたタンパク質のウエスタンブロット分析のため、抽出は、H₂/N₂雰囲気 (2~3% / 97~98%) を満たした嫌氣的チェンバー (COY Laboratory Products社) の中で実施した。Schlenkラインにおいて、少なくとも4サイクルのN₂排気とパーズングにより、ブチルゴム製隔壁を備えたボトルの中に嫌氣的抽出溶液を調製した。

【0756】

TwinStrepエピトープに融合したポリペプチドの、植物からの精製

【0757】

*N. benthamiana*の葉サンプルを、興味ある遺伝子コンストラクトを含有するアグロバクテリウムを浸透させてから5日後に採取するか、安定に形質転換された植物の葉から採取して、以下のように処理した。スティックブレンダーを5秒間のパルスで6回使用して15~20 gの葉材料を嫌氣性条件 (5 ppm未満のO₂) 下で100 mlの冷たい抽出バッファの中に浸漬した。その間を通じてこの混合物を氷の上に保持した。この均質化された混合物を4層のミラクロスを通過させて濾過し、濾液 (70~80 ml) を4℃にて3800 gで30分間遠心分離した。上清をデカントし、0.45 μ MのフィルタPVDF膜を通過させて濾過し、微粒子をさらに除去した。濾液 (60~70 ml) をStreptactinXTカラム (床の体積2 ml) に2mL/minでロードした。このカラムを20 mlの洗浄バッファで洗浄した後、TSエピトープを含有するポリペプチドを、50 mMのビオチン、50 mMのTris pH 8.0、および75 mMのNaCl (溶離バッファ) を含有するバッファを用いて溶離させた。回収されたそれぞれ3 mlの分画番号2~8を3800×gで30分間遠心分離することにより、10 kDa分子量カットオフ膜 (10Kda MWCO、Amersham社) の上でさらに濃縮した。将来の分析のため、精製されたタンパク質濃縮液を液体窒素の中で瞬間凍結させた。通常の大気でウエスタンブロット分析を実施するため、サンプルを精製プロセスの各工程から確保した。サンプルと分子量マーカー (BenchMarkラダー) を4~20%NuPageゲル上で200 Vにて60分間電気泳動した。そのときレーンごとに20 μ lのサンプルを用いた。iBLOT装置を用いてゲルの中のタンパク質をPVDF膜にブロットし、エピトープを含有するタンパク質を、抗HA抗体 (1:10000) と抗STREP:HRP (1-step) 抗体を用いることによって検出した。

【0758】

ウエスタンブロット分析

【0759】

抽出されたサンプル中のポリペプチドを、NuPAGE Bis Tris 4~12%ゲル上でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を200 Vで約1時間実施することによって分離した。乾燥装置を供給者 (Thermo Fisher Scientific社) の指示に従って用い、分離されたポリペプチドを、3工程の7分間の移動プログラム (20 Vで1分間、23 Vで4分間、および25 Vで2分間) を利用して各ゲルからPVDF膜に移した。ブロッティングの後、ゲルを保持し、クーマシー染色 (SimplyBlue SafeStain、Thermo Fisher Scientific社) で一晩染色した後、水ですすいで残っているタンパク質を可視化し、ポリペプチドの移動が起こったことを確認した。クーマシー染色を利用した染色は、ゲルのレーンごとに同量のタンパク質がロードされたことの1つの指標として非常に豊富なタンパク質 (ルビスコの大サブユニットと小サブユニットなど) のレベルを利用しており、やはりゲルのレーンごとに同量のタンパク質がロードされたことの確認を提供した。ポリペプチドが結合した膜を、5%の脱脂粉乳を含有するTBSTバッファの中で4℃にて一晩ブロックした。TBSTバッファは、50 mMのTris-HCl、pH 7.5、150 mMのNaCl、および0.1%(v/v)のTween (登録商標) 20を含有していた。マウスの体内で生成されたモノクローナル抗HA抗体と、ヤギの体内で生成された抗ウサギIgG (全分子) ペルオキシダーゼ抗体をSigma-AI

10

20

30

40

50

drich社から購入した。Immun-Star Goat Anti-Mouse (GAM)-HRPコンジュゲートをBio-Rad社から購入した。ウサギの体内で生成された抗イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 抗体をAgrisera社から購入した。StrepMABclassic-HRPコンジュゲート抗体をHBA社から購入した。抗GFP抗体は、Leila Blackman (Australian National University、キャンベラ、オーストラリア国) からの贈り物であった。抗HA抗体、抗IDH抗体、および抗GFP抗体を5%の脱脂粉乳を含有するTBST の中で1:5000に希釈して添加し、StrepMABclassic-HRPコンジュゲート抗体を1:10000に希釈して添加した後、膜をこの溶液の中で1~2時間インキュベートした。次に膜をTBSTで3×20分間洗浄した。StrepMABclassic-HRPコンジュゲート抗体を使用したときには、Amersham ECL試薬 (GE Healthcare社) を用いて抗体をこの段階で検出し、膜をAmershamイメージャ600 (GE Healthcare社) で現像した。抗HAと抗GFPについては、二次抗体である抗マウスHRPコンジュゲートを5%の脱脂粉乳を含有するTBST の中で1:5000に希釈して添加した後、膜を1時間インキュベートした。抗IDHについては、二次抗体である抗ウサギペルオキシダーゼを5%の脱脂粉乳を含有するTBST の中で1:5000に希釈して添加した後、膜を1時間インキュベートした。これらの膜をTBSTで3×15分間洗浄した。二次抗体を検出するため、Amersham ECL試薬を使用して膜をAmershamイメージャで現像した。

10

【0760】

LC-MS分析の前の、トリプシンを用いたタンパク質抽出液の処理

【0761】

LC-MS分析に使用するとき、タンパク質サンプルに対し、質量分析に基づく分析の前にタンパク質をオンフィルタ消化させるために用いられる方法であるフィルタ支援サンプル調製 (FASP) (Wisniewski他、2011年) を実施した。簡単に述べると、100 μ l (約200 μ g) のタンパク質を100 μ lの8 M尿素、100 mMのTris-HCl、pH 8.5 (UAバッファ) の中で希釈し、10 kDa分子量カットオフ (MWCO) 遠心分離フィルタ (Merck Millipore社、オーストラリア国) にロードし、室温 (RT) にて20,800 gで15分間遠心分離した。10 kDa超のタンパク質が保持されているフィルタを200 μ lのUAバッファで洗浄し、RTにて20,800 gで15分間遠心分離した。フィルタ上のタンパク質内のジスルフィド結合を化学的に還元するため、50 mMのジチオトレイトール溶液200 μ lを添加し、この混合物を震盪させながら室温で50分間インキュベートした。フィルタを200 μ lの体積のUAバッファで2回洗浄し、各回の遠心分離を20,800 $\times$ gで15分間実施した。システインをアルキル化するため、100 μ lのヨードアセトアミド (IAM) 溶液 (UAバッファの中に50 mMのIAM) を添加し、この混合物を暗所でRTにて30分間インキュベートした後、遠心分離した (20,800 g、15分間)。保持されたタンパク質を200 μ lの体積のUAバッファで2回洗浄し、遠心分離 (20,800 $\times$ g、15分間) した後、50 mMの重炭酸アンモニウムを200 μ l用いたその後2回の洗浄/遠心分離工程を実施した。200 μ lのトリプシン (シーケンシンググレード、Promega社、アレクサンドリア、オーストラリア国) 溶液 (50 mMの重炭酸アンモニウムと1 mMのCaCl₂の中に20 μ g/ml) をフィルタにロードし、湿潤なチェンバーの中で37℃にて1時間~18時間インキュベートした。トリプシンペプチドを遠心分離 (20,800 g、15分間) によって回収した後、50 mMの重炭酸アンモニウムを200 μ l用いて追加洗浄した。1つにまとめた濾液を凍結乾燥させ、-20℃で保管した。

20

30

40

【0762】

タンパク質のLC-MS分析

【0763】

トリプシンで消化させたペプチドを50 μ lの1%ギ酸 (FA) に溶かし、4 μ lのアリコートを6600 TripleTOF MS (SCIEX社、レッドウッド・シティ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国) に直接カップルしたEkspt nanoLC415 (Eksigent社、ダブリン、カリフォルニア州、アメリカ合衆国) にロードしてクロマトグラフィで分離した。ペプチドをChromXP C18 (3 μ m、120オングストローム、10 mm×0.3 mm) タップカラム上で0.1%FAを用いて流速10 μ l / 分にて5分間脱塩した後、流速5 μ l / 分にてChromXP C18 (3 μ m、120オングストローム、150 mm×0.3 mm) カラム上で30℃にて分離した。3~2

50

5%溶媒Bの線形勾配を68分間使用した後、25%Bから35%Bを5分間；35%Bから80%Bを2分間；80%Bで3分間、80から3%Bを1分間；そして8分間再平衡させた。溶媒は、（A）5%DMSO、0.1%FA、94.9%水；（B）5%DMSO、0.1%FA、90%アセトニトリル、4.9%水であった。装置のパラメータは、イオンスプレー電圧5500 V、カーテングス25 psi、GS1 15 psiとGS2 15 psi、加熱したインターフェイス150℃であった。飛行時間（TOF）-MSサーベイ走査の後の30 MS/MS（それぞれ40ミリ秒の蓄積時間）を含むデータを、情報依存性取得（IDA）モードで取得した。初段MS分析を、正イオンモード、質量範囲m/z 400~1250、および0.25秒の蓄積時間で実施した。電荷状態2~5でカウント数が150超/秒であり、ダイナミックエクスクルージョンが15秒間の前駆イオンについてタンデム質量スペクトルを100 ppmの質量誤差で取得した。前駆イオンのサイズと電荷に基づく製造者のローリング衝突エネルギー（CE）を利用して質量範囲m/z 100~1500でスペクトルを取得した。大腸菌から抽出されたタンパク質については、対照クロラムフェニコール耐性タンパク質（CAT/P62577）を含むカスタムのニトロゲナーゼ（Nif+Mit2Nif）データベースと、汚染物質データベース（Common Repository of Adventitious Proteins）とが付属したUniprotデータベースの大腸菌サブセットで検索を実施し、ProteinPilot（商標）5.0ソフトウェア（SCIEX社）を利用してタンパク質を同定した。N. benthamianaから抽出されたタンパク質については、カスタムのニトロゲナーゼ（Nif+Mit2Nif）データベースと汚染物質データベース（Common Repository of Adventitious Proteins）が付属したUniprotデータベースのN. benthamianaのサブセットを用いて検索を実施した。

【0764】

同定されたペプチドから、2つのNifMペプチド、すなわちトリプシンで完全に消化されていて異常な切断および／または修飾を含有せず、MSにおいてピーク強度によって判断したとき高反応を示したDAFAPLAQR（配列番号155）とDYLWQQSQQR（配列番号156）が、大腸菌JM109発現系の中でのニトロゲナーゼ（NifM）タンパク質の検出を確認する多重反応モニタリング（MRM）走査のために選択された。

【0765】

細菌の中でクロラムフェニコール耐性を提供する酵素クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT；P62577）を、改変された、または改変されていないpMIT2.1遺伝子コンストラクトを含有する形質転換されたすべての大腸菌（株JM109）細胞の中で、選択マーカー遺伝子から発現させた。したがってこのポリペプチドは、タンパク質発現レベルを標準化するための対照として選択された。CATのレベルを測定するため、CATポリペプチドから3つのトリプシンペプチド（4つのトランジション／ペプチド）、すなわちITGYTTVDISQWHR（配列番号157）、LMNAHPEFR（配列番号158）、およびYYTQGDK（配列番号159）が選択された。

【0766】

標的型液体クロマトグラフィ-多重反応モニタリング-質量分析（LC-MRM-MS）

【0767】

還元されてアルカリ化されたトリプシンペプチド（5 μl）を、Kinetex C18カラム（2.1 mm×100 mm、Phenomenex社）を0.1%ギ酸の中の5~45%アセトニトリルの線形勾配で用いたクロマトグラフィにより400 μl/分の流速で10分間かけて分離した。データの取得と分析のため、Shimazu Nexera UHPLCからの溶離液を、陽イオンモードで作動するTurboVイオン化源を備えたQTRAP 6500質量分析器（SCIEX社）に向かわせた。MSパラメータは以下の通り、すなわちイオンスプレー電圧、5500 V；カーテングス、35；GS1、35；GS2、40；供給源の温度、500℃；脱クラスター化電位、70 V；および入口電位、10 Vであった。ペプチドを、窒素ガスを満たした衝突セルの中で、前駆イオンのサイズと電荷、サイズと電荷に依存するローリング衝突エネルギーを利用して断片化した。予想保持時間（RT）の周辺の40秒間の検出ウィンドウと0.3秒のサイクル時間にして計画的な多重反応モニタリング（MRM）走査実験を利用した相対的定量化。Analyst v1.7ソフトウェアを用いてデータを取得した。Skyline（MacLean、Bioinformatics 2010）

を用いて4つのMRMトランジションのピーク面積を積分したが、検出のため信号対雑音比 (S/N) を3超かつ強度を1秒当たり1000カウント (cps) 超にして同時溶離させるためには、すべてのトランジションが必要とされた。

【0768】

大腸菌の中でpMIT2.1系を用いたアセチレン還元アッセイ

【0769】

Temme他、2012年に記載されているようにして、大腸菌株JM109の細胞を、抗生剤クロラムフェニコールとスペクチノマイシンに対する耐性をそれぞれ与えるプラスミドpMIT2.1 (または試験中であったその誘導体の1つ) とコントロールプラスミドpN249で形質転換した。形質転換された細胞を、クロラムフェニコール (34 mg/l) とスペクチノマイシン (80 mg/l) を含有するLB培地 (10 g/lのトリプトン、5 g/lの酵母エキス、10 g/lのNaCl) での増殖によって選択した。形質転換された細胞を、抗生剤を含むLB培地の中で、600 nmでの光学密度ODが1.0になるまで嫌氣的に37℃で一晩増殖させた。この培養物を10,000 gで1分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞を、1体積の誘導培地の中に再懸濁させた。この誘導培地はN供給源がなく、25 g/lのNa₂HPO₄、3 g/lのKH₂PO₄、0.25 g/lのMgSO₄・7H₂O、1 g/lのNaCl、0.1 g/lのCaCl₂・2H₂O、2.9 mg/lのFeCl₃、0.25 mg/lのNa₂MoO₄・2H₂O、および20 g/lのスクロース (最少培地) を含有し、1.5 ml/lの10%セリン、600 μl/lの0.5%カザミノ酸、5 mg/lのビオチン、および10 g/lのパラ-アミノ安息香酸が補足されていた (Yang他、2018年)。培地にアルゴンガスを20分間散布した後、細菌および抗生剤と混合した。貯蔵溶液を濾過殺菌した。Nif遺伝子の発現を誘導するため、特に断わらない限り、培地にイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG; Gold Bio#I2481C25 259) を0.1 mM、0.5 mM、または1.0 mMの最終濃度 (一般に1.0 mM) で補足した。細胞懸濁液を3.5 ccの培養フラスコに移し、圧着ロック系を用いて気密ゴムシールで蓋をし、上部空間に純粋なアルゴンガスを20分間散布した。その後この懸濁液を200 rpmで震盪させながら30℃で5時間インキュベートした。その後、0.5 ccの純粋なC₂H₂ (BOCガス、装置グレード; アルゴン中に最終濃度10%のC₂H₂) を注入することによってアセチレン還元アッセイ (ARA) を開始し、さらに18時間インキュベートした。Agilent 6890N GC装置を用い、最終時点でのエチレンの生成を、炎イオン化検出 (GC-FID) を伴うガスクロマトグラフィによって測定した。上部空間のサンプル (0.5 cc) を取り出し、手作業でスプリット/スプリットレス注入口に10:1スプリットモードで注入した。装置は、以下のパラメータ、すなわち入口とFIDの温度200℃、キャリアHeの平均速度35 cm/秒、恒温炉の温度120℃で操作した。RT-Alumina Bond/MAPDカラム (30 m×0.32 mm×5 μm) を、検出器の端部にカップルした5 mの粒子捕捉カラムとともに使用した。装置の分析性能は、適切なブランクと基準を走らせることによって評価した。これらの条件下では、約2.3分の時点でエチレンが、約3.1分の時点でアセチレンがカラムから放出された。このGC系は、0.00001%気圧という低いレベルのエチレンを、この形式における検出可能な他の唯一のピークとしてのアセチレンから明確に分離して検出することができたため、極めて高感度であった。

【0770】

大腸菌株JM109の中で野生型のpMIT2.1とpN249を用いる陽性対照としてのアッセイ系は、IPTGを増殖培地に添加しなかったとき、痕跡レベルのエチレンを生成させただけだったのに対し、IPTGを0.1 mM、0.5 mM、または1.0 mMで増殖培地に添加すると、生成するエチレンの量は大きく増加した。エチレン生成の速度は、3時間のサンプリングから18時間まで大きく増加し、IPTGの濃度が増加するのに合わせた増加も示した。これは、Nif遺伝子発現の増加とともにニトロゲナーゼ活性が増加したことを示している。したがってこのアッセイは一般に、1.0 mMのIPTGと、18時間後のサンプリングを利用する。

【0771】

酵母形質転換と、組み換えタンパク質発現のための培養条件

【0772】

Yeast Transformation Kit (Sigma Aldrich社) を製造者のプロトコルに従って用い

、酵母株INVSc1 (Thermo Fisher Scientific社) の形質転換を実施した。選択マーカーとしてUra遺伝子を持つベクターのため、ウラシル (SCMM-U) 寒天プレートなしの最少培地 (6.7 g/lの酵母窒素ベース、1.92 g/lのウラシルなし合成ドロップアウト培地 (Sigma Aldrich社)、20 g/lのグルコース、および20 g/lの寒天を含有していた) に形質転換混合物を播種することにより、形質転換されたコロニーを選択した。30℃で2~3日間インキュベートした後、単一コロニーを新鮮なSCMM-U寒天プレートに再びなすりつけた。NifD遺伝子または他のNif遺伝子を含む遺伝子コンストラクトの存在は、遺伝子特異的プライマーを用いたPCRによって確認した。その遺伝子コンストラクトを含有していた単一コロニーを (SCMM-U寒天と同じ成分を含有するが寒天なしの) SCMM-U液体培地に接種し、30℃で震盪なしに2日間増殖させた。グリセロールを最終濃度20%になるまで添加し、将来使用するためアリコートで-80℃で保管した。

10

【0773】

遺伝子コンストラクトに含まれる遺伝子を発現させるため、グリセロールストックからの接種株をSCMM-U液体培地の中で震盪しながら30℃で2日間増殖させた。細胞を培養物から遠心分離によって回収し、グルコースを20 g/lのガラクトースに変えた以外はSCMM-U液体培地と同じSCMM-U誘導培地の中に再懸濁させて最終OD600を0.4にした。誘導のためのこの培養物を震盪しながら30℃で2日間増殖させ、タンパク質抽出とウエスタンブロット分析のために酵母細胞を遠心分離によって回収した。

【0774】

実施例2：MTP-Nif融合ポリペプチドを発現させることによる植物細胞のミトコンドリア内でのNifポリペプチドの産生

20

【0775】

本発明の発明者らは、NifポリペプチドのN末端に連結されたミトコンドリア標的型ペプチド (MTP) の翻訳融合体をコードするキメラ遺伝子を導入することによって植物細胞のミトコンドリア内で16種類の異なるNifポリペプチドを産生させることに成功したことを以前に報告した (Allen他、2017年；WO2018/141030)。使用したMTP配列は、*A. thaliana* F1-ATPアーゼ (At2G33040；Lee他、2012年) に由来する長さ77個のアミノ酸 (配列番号20のアミノ酸1~77) の1つを含んでいたため本明細書ではMTP-FA γ 77と名づけた。このMTPは、このMTPをNifポリペプチドの末端に連結するGly-Ala-Pro (GAP) という3アミノ酸リンカーとで、翻訳されたNifポリペプチドに80アミノ酸N末端伸長部を提供した。MPPによる切断は42個のアミノ酸の後に起こり、興味あるNifポリペプチドに融合した38個のアミノ酸残基からなるN末端伸長部が残されたが、35個の残基はMTP-FA γ 77+GAPから来ている。このN末端伸長部をFA γ -scar38と名づけた。各Nifポリペプチドの天然の翻訳開始メチオニン残基はそのことによってscar-38配列で置換された。これらの実験では、産生されたNifポリペプチドの正常な機能を調べなかった。

30

【0776】

本発明の発明者らは、植物細胞の中のNifポリペプチドとともに用いるため、MTP配列をMTP-FA γ 77の77個のアミノ酸から短くしつつ、MTP機能を相変わらず保持したままにすることを試みた。本発明の発明者らは、MTP-FA γ 77のC末端から26個のアミノ酸を除去してMTP-FA γ 51 (配列番号21) と名づけたMTPを生成させることが可能かどうかを調べた。この配列は、クローニング手続きの帰結としてC末端GGを持っていた。本発明の発明者らは、MTP-FA γ 51がMPPによってアミノ酸42の後ろで切断されて、プロセッシングを受けた融合ポリペプチドのN末端の位置のMTP-FA γ 51からの9個のアミノ酸 (ISTQVVRNR；配列番号22) と、クローニング手続きの結果としての連結GGが残ると予測した。この9アミノ酸配列を、FA γ -scar9、または単純にscar9と名づけた。

40

【0777】

MTP-FA γ 51の機能をより長いバージョンと比べて調べるため、NifHに融合されたこのMTPをコードする遺伝子コンストラクトを最初に作製した。改変されたNifH遺伝子は、コードされたポリペプチドがMTP-FA γ 77ではなくてNifHのN末端に融合されたMTP-FA γ 51を持つことを除き、pRA10 (MTP-FA γ 77+GAP::NifH::HAをコードする；配列番

50

号23)の中のNifH遺伝子と同じであった。このポリペプチドは、クローニングを目的としたGAPアミノ酸を相変わらず含んでいた。両方のコンストラクトの中のNifHコード領域は、ヒト細胞の中で発現させるため、pRA10の中のヌクレオチド配列に基づいてコドンが最適化されていた。両方のコンストラクトは、NifポリペプチドのC末端にHAエピトープタグをコードする配列を、HA抗体を用いたこのポリペプチドの検出と精製のために含んでいた。短縮されたコンストラクトをpRA34 (MTP-FA γ 51+GAP::NifH::HAをコードする; 配列番号24) と名づけた。

【0778】

配列番号25として与えられるアミノ酸配列を持つNifH融合ポリペプチドをコードするSN18と名づけた第2のコンストラクトを作製したが、これは、発現レベルを増大させることを目的としてpRA34と比べていくつかの改変を含んでいた。増強型35Sプロモータ (e35S; Kay他、1987年) を用いてこの融合タンパク質を発現させ、追加N末端Metを翻訳開始として付加し、TMV 5'-UTRをタンパク質コード領域の上流に付加し、コドンの利用をA. thalianaのコドンの利用に切り換えた。これらの改変のすべてを実行し、転写レベルと翻訳レベルの両方で発現レベルを増大させた。それに加え、MTPの直後にアミノ酸GGをGAPの代わりに使用した。配列番号26として与えられるアミノ酸配列を持つNifH融合ポリペプチドをコードするSN29と名づけた第3のコンストラクトも作製したが、ここではこのポリペプチドは、HAエピトープタグを、MTP-FA γ 51配列 (配列番号36) の直後かつGG配列とNifH配列 (MTP-FA γ 51::HA::NifH) の前に持っていた。これらコンストラクトの両方をGoldenGateクローニング法 (Weber他、2011年) によって作製した。この方法は、Engler (2014年) が記述しているように、特定の構成要素を持つ遺伝子構成要素の組立体をコンストラクトの中にモジュール方式で提供した。

【0779】

これらコンストラクトをN. benthamianaの葉系の中で試験し、より長いコンストラクトpRA10と比較した。タンパク質抽出液を、浸透された葉組織から生成させ、SDS PAGEと、HA抗体を用いたウエスタンブロット分析を実施し、タンパク質の発現レベルとMPPのプロセッシング効率を評価した。プロセッシングを受けていない融合ポリペプチドのサイズに関する対照として、pRA34とpRA10を発現している大腸菌からのタンパク質抽出液をゲル上の隣のレーンで走らせた。細菌抽出液は、プロセッシングを受けていないMTP::NifHに関して予想されるサイズのポリペプチドバンドを生じさせた。それとは対照的に、これらコンストラクトを浸透させたN. benthamianaの葉組織からのタンパク質抽出液は、MPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドで予想されるサイズに対応するよりも小さなサイズのポリペプチドバンドを生じさせた。pRA34とSN18からのMTP-FA γ 51::NifH::HAの発現と、SN29からのMTP-FA γ 51::HA::NifHポリペプチドの発現は、それぞれ、短縮されたMTP配列を理由としてこれらポリペプチドの間で予想されるサイズの違いに従い、MTP-FA γ 77+GAP::NifH::HAよりも小さなMWのバンドを生じさせた。SN18からの発現は、少なくともpRA34からの発現と同じ強さであり、両方とも強かった。本発明の発明者らは、短縮されたMTP-FA γ 51は、合成NifH融合ポリペプチドを植物細胞のミトコンドリアに向かわせることができ、ミトコンドリアの中でMPPによるプロセッシングを提供すると結論した。

【0780】

NifHポリペプチドをコードするpRA34、SN18、およびSN29での成功に基づき、より短いMTP配列を、対応するMTP-FA γ 51バージョンをコードする他の15種類のNifポリペプチドで試験した。そのため、GoldenGateアプローチ (Weber他、2011年) を利用して一連の遺伝子コンストラクトを作製した (表3と表4)。GoldenGateクローニング系を用いて異なる遺伝子エレメント (プロモータ、5'-UTR、3'-UTR、N末端とC末端の伸長部、およびターミネータが含まれる) を組み立てた。各エレメントは、モジュールの組み立てとエレメントの容易な交換を可能にする明確な境界を持っていた。そこでEnglerら (2014年) によって記載されている構成要素を持つこのクローニング系を利用して、以下の実施例の中のMTP::Nif融合ポリペプチドを作製するための多彩な異なる遺伝子コンストラ

クトを調べた。GoldenGateクローニング系は、認識配列の外側を切断するIIS型制限酵素を利用してため、接合配列内の制限酵素クローニング部位の利用を回避することができた。こうすることで、以前のコンストラクトに存在するGly-Ala-Pro配列がないMTP::Nif融合体をコードする遺伝子を構成することができた。上述のように、MTP::ポリペプチド融合体の接合部にあるGly-Gly架橋を代わりに使用してGoldenGate系を適合させた。グリシンを、MTP配列の-1位に一般に存在するという理由で、この連結のための標準的なアミノ酸として選択した。その1つの例外として、NifK融合ポリペプチドを発現させるためのコンストラクト（SN140）は、MTP-FA γ 51とNifK配列の間にGly-Gly架橋によって隔てられた状態で挿入されたHAエピトープと、野生型C末端を持っていた。このバリエーションを作製したのは、NifKポリペプチドが、活性のため、C末端伸長部のない野生型C末端を必要とすることが以前に観察されていたからである（WO2018/141030）。

【0781】

ミトコンドリアに局在化したポリペプチドではなくて細胞質に局在化したNifポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトの第2の並列なセットを作製した。これは、コンストラクトの中のMTP-FA γ 51コード配列を、6×Hisアミノ酸モチーフをコードするヌクレオチド配列（配列番号27）で置き換えることによってなされた。6×Hisモチーフは、MPPを媒介としたMTP-FA γ 51配列の切断から生じるFA γ -scar9モチーフと分子量が似ていた。6×Hisに融合されたポリペプチドは、他の点ではMTP-FA γ 51::Nif::HAポリペプチドと同じであり、C末端HAエピトープの存在を含んでいた。そうになっていることで、このポリペプチドの6×Hisバージョンは、ウエスタンブロット上で、MPPによるプロセッシングを受けた対応するMTP-FA γ 51::Nif::HAポリペプチドに分子量の適切な対照を提供した。これに対する例外は、6×Hisモチーフではなく、MTP配列なしでN末端に融合されたHAエピトープを持つNifKを発現する対照（細胞質局在化）コンストラクト（SN72）であった。プロセッシングを受けていないFA γ -scar9::Nif::HAポリペプチドと6×His融合ポリペプチドについて、融合ポリペプチドの遺伝子コンストラクトと予想分子量が表3に列挙されている。

【0782】

10

20

30

40

50

【表 3】

表3：N. benthamianaの葉の中で発現するNifポリペプチドのミトコンドリアを標的とする効率とタンパク質可溶性を調べるためプラスミドを構成した。細胞質に局在化するポリペプチドをコードするプラスミドは、MTP配列の代わりに6×Hisモチーフを持っていた。予想されるポリペプチドのサイズ (kDa) はVNtiソフトウェアを用いて計算した。

	ミトコンドリアを標的とする			細胞質に局在化	
Nif	コンストラクトの ID	ポリペプチドの記述	分子量 (kDa)	コンストラクトの ID	分子量 (kDa)
B	SN192	pFAγ51::NifB::HA	59	SN201	54
D	SN10	pFAγ51::NifD::HA	61.1	SN196	56.3
E	SN38	pFAγ51::NifE::HA	57.2	SN203	52.4
F	SN138	pFAγ51::NifF::HA	26.2	SN204	21.4
H	SN18/SN27	pFAγ51::NifH::HA	39.0	SN205	34.2
J	SN139	pFAγ51::NifJ::HA	135.2	SN206	130.4
K	SN140	pFAγ51::NifK::HA	65.3	SN72	59.7
M	SN30	pFAγ51::NifM::HA	37.7	SN207	32.9
N	SN39	pFAγ51::NifN::HA	57.6	SN208	52.8
Q	SN141	pFAγ51::NifQ::HA	26.7	SN209	21.9
S	SN31	pFAγ51::NifS::HA	50.3	SN210	45.5
U	SN32	pFAγ51::NifU::HA	36.5	SN211	31.7
V	SN142	pFAγ51::NifV::HA	48.2	SN212	43.4
W	SN143	pFAγ51::NifW::HA	17.2	SN213	12.4
X	SN144	pFAγ51::NifX::HA	25.3	SN214	20.5
Y	SN145	pFAγ51::NifY::HA	31.5	SN215	26.7
Z	SN146	pFAγ51::NifZ::HA	23.7	SN216	20.9

【0783】

これらの融合体で用いられるNifDとNifSのポリペプチド配列は、Temmeら（2012年）による配列であった。これらのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号18と配列番号19として与えられる。配列番号18のNifDアミノ酸配列は、配列番号2として示されている483個のアミノ酸の配列とは39位、41位、87位、96位、355位、および483位の6個のアミノ酸置換だけが異なっていた。配列番号19のNifSアミノ酸配列は、配列番号11として示されている400個のアミノ酸の配列とは110位、113位、124位、および290位の4個のアミノ酸置換だけが異なっていた。NifD配列またはNifS配列を含有する本明細書でSN番号を与えた遺伝子コンストラクトのすべてで、Temmeら（2012年）による配列を使用した。

【0784】

コンストラクトのそれぞれをN. benthamianaの葉細胞の中に導入してから5日後、浸透された葉組織からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法によって分析した。6×Hisポリペプチドを発現するコンストラクトが、MPPによるプロセッシングを受けた対応するFAγ-scar9::Nif::HAポリペプチド（表3参照）に関するウエスタンブロット上の分子量マーカーとして含まれており、このコンストラクトからのサンプルをゲル上の隣のレーンで電気泳動した。ポリペプチドの検出には、各NifポリペプチドのC末端に融合されたHAエピトープを使用した。

【0785】

MPPによるプロセッシングの結果が図1に示され、表4にまとめられている。MTP-FAγ51は、MTP::Nif融合体として一過性に融合されるとき、Nifポリペプチドのほぼすべてで切断されたMTP::Nifポリペプチドを生じさせたが、すべてが同じ効率ではなかった。NifQはプロセッシングが最も少なく、1つの実験で全タンパク質をウエスタンブロットによって分析したときに検出されたプロセッシングを受けた形態はほんの痕跡であり、別の実験では

検出されなかった。NifF、NifM、NifV、NifX、NifY、およびNifZ融合ポリペプチドは、FAγ51に融合されたときにほんの一部しかプロセッシングを受けなかったのに対し、NifB、NifE、NifK、NifN、NifS、NifU、およびNifWを含む他のNif融合ポリペプチドは効率的にプロセッシングを受けた。これは、異なるNifのプロセッシング効率、その1つのMTPに関して異なる可能性があることを実証している。NifD融合ポリペプチドは低レベルで検出されたが、常に分解産物を示した（下記参照）。発現の相対レベルについては、NifYをコードする遺伝子コンストラクトは、NifDを除いて他のものよりもポリペプチドのレベルが低かった。これは、NifY遺伝子の発現レベルがより低いこと（他のNifタンパク質と比べてより低い翻訳速度および／またはこのポリペプチドの不安定性など）が原因であると考えられた。NifYコード領域をFAγ51とは異なるMTPに融合させることは、ポリペプチド蓄積のレベルを改善する1つのアプローチである。

10

【0786】

いくつかのNifポリペプチドで、ミトコンドリアに局在化するポリペプチドに対する細胞質に局在化するポリペプチド（6×His）の量が異なることが観察された。特に、ミトコンドリア標的型のNifB、NifE、NifH、NifU、およびNifVポリペプチドは、対応する細胞質標的型ポリペプチドよりも大きなレベルで蓄積したのに対し、他のNifポリペプチドの蓄積レベルは、ミトコンドリア形態と細胞質形態の間でほぼ同じであった。この傾向に対する唯一の例外はNifNであり、細胞質標的型ポリペプチドが、対応するミトコンドリア標的型ポリペプチドよりも大きなレベルで蓄積した。

【0787】

20

分子量がより大きくいくつかのポリペプチドのバンドも、NifE、NifH、NifB、NifU、およびNifZをコードするコンストラクトからのウエスタンブロットで観察された（図1）。これらのバンドは、サンプル調製で利用した強い変性条件に対して抵抗性であった二量体化複合体に対応している可能性がある。以前に、同様の高分子量バンドが、さまざまなミトコンドリア標的型Nifタンパク質で異なるMTPを用いて観察された（Allen他、2017年）。

【0788】

pRA10とSN18を比較するウエスタンブロットが図2に示されており、NifH、NifM、NifS、およびNifUをコードするコンストラクトも同様に示されている。図2のサンプルは、MTP-FAγ77::NifK融合ポリペプチドをコードするpRA25の同時浸透あり、またはなしのペア式浸透（WO2018/141030）から抽出されたタンパク質を含んでいたが、それは、NifKの付加が発現および／またはMPPプロセッシングに影響するかどうかを調べるためであった。NifH、NifM、NifS、およびNifUの発現とプロセッシングに関してNifKの付加による差は観察されなかった。

30

【0789】

これらの実験から、MTP-FAγ51アミノ酸配列はNifポリペプチドのすべてを植物細胞内のミトコンドリアマトリックスに向かわせ、NifQポリペプチドのプロセッシングを除いてMPPによるプロセッシングを提供できることが結論された。ポリペプチドの発現レベルとプロセッシング効率は、より長いFAγMTPと同様に優れていた。それに加え、いくつかの場合には、分解産物を示すと考えられるより小さなサイズのより少数のポリペプチドバンドが、HA抗体を用いて例えばpRA34に関するブロットの中に検出された。本発明の発明者らは、より短いMTP配列が予想外にMTP::Nifの分解を減らした可能性があるかと結論した。

40

【0790】

代わりのMTP

【0791】

ある範囲の異なるMTP配列を試験し、Nifポリペプチドを植物細胞のミトコンドリアマトリックスに転移させる性能を評価した。長さが異なる（30～70個のアミノ酸残基）いくつかのMTPを選択した。これらは、MPPによる切断の後にNifポリペプチドのN末端に融合された異なる長さの残留アミノ酸残基（「瘢痕配列」または単に「瘢痕部」）を残すことが予想された（表5）。瘢痕配列は長さが0～36個の範囲のアミノ酸残基であった。G

50

oldenGateクローニング系を利用し、これらのMTPと、植物細胞の中で発現させるためのいくつかのNifの組み合わせを用いて17種類の異なる遺伝子コンストラクトを組み立てた。それは、NifDが、発現させるのが最も難しいNifポリペプチドであったため（WO2018/141030）、特にNifD融合ポリペプチドを発現させるためであった。プロモータ、5'UTRと3'UTR、およびターミネータは、これらコンストラクトで同じであった。

【0792】

これらコンストラクト（それぞれを、P19サイレンシングサプレッサタンパク質を産生するコンストラクトと混合した）を含有する*A. tumefaciens*培養物を実施例1に記載されているようにして個別に*N. benthamiana*の葉の中に導入し、浸透の5日後にタンパク質抽出液を取得した。SDS-PAGEとウエスタンブロット分析をタンパク質抽出液に対して実施した。MTP::NifDコンストラクトを用いた浸透のため、SN46（pSu9::NifK）を同時に浸透させた。なぜならC末端伸長部のないNifKの同時発現はNifDの量を増やすことが示されていたからである（WO2018/141030）。

【0793】

NifDに融合されたCPN60 MTPの2つのバージョンを試験した。1つのバージョンでは、Gly-GlyリンカーがCPN60 MTP（配列番号28）とNifD（SN11）の間に位置するようにMTPを融合させた。それぞれの場合に、存在するときのGly-GlyリンカーはGoldenGateクローニング手続きによって挿入したが、MTP配列の一部であるとみなされる可能性があった。他方のバージョン（SN4）では、CPN60 MTP（配列番号29）をNifDポリペプチドの第1のメチオニンに直接融合させた。CPN60はそのアミノ酸配列の中のC末端チロシンの直後で切断されることが予想されたため、このコンストラクトは理論的には野生型N末端を持つ（すなわち瘢痕部のない）NifDポリペプチドを産生すると考えられるのに対し、SN11コンストラクトは、MTP(GlyGly)::NifD融合体の切断後にGly-Gly伸長部を残すことが予想された。驚くべきことに、これらの非常によく似たコンストラクトは、ウエスタンブロット分析によって実証されたように、異なる結果を生じさせた。SN11は、プロセッシングを受けていないCPN60(GlyGly)::NifDで予想されるサイズの位置にポリペプチドバンドを生じさせたのに対し、SN4は、プロセッシングを受けたポリペプチドとプロセッシングを受けていないポリペプチドの両方に対応するバンドを生じさせ、プロセッシングを受けたポリペプチドよりもプロセッシングを受けていないポリペプチドのほうが多く存在していた。さらに、SN4を用いた浸透からのタンパク質をウエスタンブロットによって並列pRA24+pSN46（FAγ77+GAP::NifD::HA+Su9::NifK）浸透物から抽出されたタンパク質と比較すると、SN4コンストラクトはpRA24コンストラクトよりも正確にプロセッシングを受けたポリペプチドをはるかに少なく生じさせることが明らかであった。したがってCPN60 MTPは融合ポリペプチドを標的とすることができてマトリックスプロセッシングにより野生型NifDポリペプチドを産生させることができるが、発現レベルとプロセッシング効率は低いように見えた（US2016/0304842）。SN11については、CPN60とNifDの間のGly-Gly結合がMTPのプロセッシングを阻止した可能性がある。

【0794】

スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）ポリペプチドに由来するいくつかのMTPも、単一のMTPまたはタンデムMTPとして、Gly-Gly結合の前にC末端のIleとGlnを含めた場合、または含めない場合について調べた。Ile残基とGln残基を含有していなかったSOD MTP（SN15、配列番号32と、SN16、配列番号33）を含有するバージョンでは、ポリペプチドがウエスタンブロット分析によって検出されなかったのに対し、Ile残基とGln残基を保持していたSOD MTP（SN12、配列番号30と、SN13、配列番号31）を持つバージョンは、検出可能なポリペプチドを実際に産生したが、これらはMPPによるプロセッシングを受けなかったように見えた。それとは対照的に、調べた別のMTP（SN17、配列番号34）は、NifDに融合されたときに強いポリペプチドシグナルを生じさせた。このMTPを持つプロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の間にはサイズのわずかな違いがあるため、プロセッシング効率を求めるには追加の実験が必要であろう。L29 MTPは切断されたNifポリペプチドを効率的に生じさせることが予想される。本発明の発明者らは、

MTPのC末端に融合されているがGly-Gly結合の上流であるtwin strepタグ（Buren他、2017年）を有するCoxIV MTP（SN19、配列番号37）も調べた。このMTPは、NifDに融合するとき、ウエスタンブロット分析により、ミトコンドリアマトリックスプロセッシングと合致するサイズの強いシグナルをやはり与えた。

【0795】

【表4】

表4：細菌アッセイにおけるMTP::NifポリペプチドのMPPプロセッシング、植物のミトコンドリアの中での可溶性、およびscar9-Nifの機能性のレベルのまとめ。受けた（p）は、部分的な（50%未満の）MPPプロセッシングを示す。プロセッシングを受けたNifの可溶性スコアは、-、不溶性またはわずかに可溶性；+、部分的な可溶性、++ほとんどまたは完全に可溶性である。Nt：試験せず。機能試験は、MIT2.1ベクター系を用いて大腸菌JM109の中で実施した。

コンストラクトの ID	Nif	MTP	融合ポリペプチドの配列番号	MTP がプロセッシングを受けた	MM における可溶性	JM109 における機能性 (%)
SN192	B	FA γ 51	147	受けた	-	100
SN10	D	FA γ 51	122	受けた (p)	-	50
SN38	E	FA γ 51	126	受けた	-	30
SN138	F	FA γ 51	137	受けた (p)	++	100
SN18/SN27	H	FA γ 51	25	受けた	-	100
SN42	H	CoxIV-twin strep	128	受けた	-	Nt
SN139	J	FA γ 51	138	受けた	-	200
SN140	K	FA γ 51	139	受けた	-	70
SN30	M	FA γ 51	123	受けた (p)	++	10
SN39	N	FA γ 51	127	受けた	+	50
SN141	Q	FA γ 51	140	痕跡	+	100
SN31	S	FA γ 51	124	受けた	+	50
SN32	U	FA γ 51	125	受けた	++	80
SN142	V	FA γ 51	141	受けた	-	90
SN51	V	L29	130	受けた (p)	-	Nt
SN104	W	Su9	135	受けた	++	Nt
SN143	W	FA γ 51	142	受けた	+	85
SN144	X	FA γ 51	143	受けた (p)	+	Nt
SN145	Y	FA γ 51	144	受けた (p)	+	60
SN146	Z	FA γ 51	145	受けた (p)	+	60

【0796】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5：植物においてGoldenGate系を用いて調べるために用いたMTPの詳細。kDa F/P：プロセッシングを受けていない完全長MTPのサイズ／プロセッシングを受けたMTPのサイズ（単位はkDa）。瘢痕部＝MPPプロセッシングの後に残っているN末端伸長部に予想されるアミノ酸配列。

MTP の名称	MTP	kDa F/P	瘢痕部
gATP アーゼガンマサブユニット (FAγ51) ; (Huang 他、2009 年)	MAMAVFRREGRRLLPSIAARPIAAIR SPLSSDQEGLLGVRISTQVVRNRG G (配列番号 36)	5.75/ 1.19	ISTQVVRNRGG (配列番号 42)
CPN60 (At2G33040) (Prasad と Stewart、1992 年)	MYRFASNLASKARIAQNAQVSSRMS WSRNYGG (配列番号 28)	3.77/ 0.13	GG
CPN60/GG リンカーなし (At2G33040) ; (Prasad と Stewart、1992 年)	MYRFASNLASKARIAQNAQVSSRMS WSRNY (配列番号 29)	3.65/ 0	なし
スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) (At3G10920) (Huang 他、2009 年)	MAIRCVASRKTLAGLKETSSRLLRIR GIQGG (配列番号 30)	3.34/ 0.37	IQGG (配列番号 39)
二重スーパーオキシドディスムターゼ (2SOD) (At3G10920) ; (Huang 他、2009 年)	MAIRCVASRKTLAGLKETSSRLLRIR GIQMAIRCVASRKTLAGLKETSSRLL RIRGIQGG (配列番号 31)	6.65/ 0.37	IQGG (配列番号 39)
改変されたスーパーオキシドディスムターゼ (SODmod) (At3g10920) ; (Marques 他、2014 年)	MAIRCVASRKTLAGLKETSSRLLRIR GGG (配列番号 32)	3.1/ 0.13	GG
改変された二重スーパーオキシドディスムターゼ (2SODmod) (At3g10920) (Marques 他、2014 年)	MAIRCVASRKTLAGLKETSSRLLRIR GMAIRCVASRKTLAGLKETSSRLLRI RGGG (配列番号 33)	6.07/ 0.13	GG
L29 (At1G07830) (Huang 他、2009 年)	MFLTRFVGRRFLAAASARSESTAAA AASTIRGG (配列番号 34)	3.5/ 1.36	ESTTAAAAASTIRGG (配列番号 40)
<i>Neurospora crassa</i> F0 ATP アーゼサブユニット 9 MTP (SU9) ; (Buren 他、2017 年)	MASTRVLASRLASQMAASAKVARPAV RVAQVSKRTIQTGSPQLTKRTQMTS IVNATTRQAFQKRAYSGG (配列番号 35)	7.5/ 0.38	YSGG (配列番号 41)
CoxIV twin strep (ABM97483) (Buren 他、2017 年)	MLSLRQSIRFFKPTRTLCSSRYLLQ QKPSAWSHPPQFEKGGSGGGSGGSAW SHPPQFEKGG (配列番号 37)	6.61/ 3.64	QKPSAWSHPPQFEKGGSGGGSGGSAWSHPPQFEKGG (配列番号 43)
CoxIV 10×His (ABM97483) (未公開)	MLSLRQSIRFFKPTRTLCSSRYLLQ QKPGGHHHHHHHHHHGG (配列番号 38)	5.07/ 1.84	QKPGGHHHHHHHHHHGG (配列番号 44)

【0797】

実施例3：植物ミトコンドリアにおけるNif融合ポリペプチドの可溶性

【0798】

ミトコンドリアマトリックスにおけるニトロゲナーゼタンパク質構成要素の可溶性は、植物細胞のミトコンドリアにおけるニトロゲナーゼの機能的再構成の前提条件であると考えられる。Nifポリペプチド (NifDなど) は窒素固定菌の中で可溶性だが、植物細胞の中での合成MTP::NifD融合ポリペプチドの発現が、特にミトコンドリアマトリックスの中で他のNif構成要素と会合することのできる可溶性ポリペプチドを提供するかどうかは知られていなかった。不溶性は多くの因子 (凝集体の形成や、細胞膜との会合が含まれる) の帰

結である可能性があり、機能を妨げる可能性がある。

【0799】

そこで本発明の発明者らは、*N. benthamiana*の葉細胞の中で遺伝子コンストラクト（表4参照）が発現した後のMTP-FAγ51::Nif::HAポリペプチドと他のいくつかのポリペプチドの可溶性を評価した。可溶性分画と不溶性分画のタンパク質抽出液のほか、可溶性タンパク質と不溶性タンパク質の両方を含んでいた分画化されていない「全タンパク質」サンプルを、実施例1に記載されているようにして調製した。可溶性分画を調製するためのバッファは、非イオン性洗浄剤Tween（登録商標）20を含有しており、それを添加して膜を溶解させてミトコンドリアマトリックスタンパク質を放出させた。この穏やかな非イオン性洗浄剤は、Nifポリペプチドを変性させる可能性が小さいと考えられた。それとは対照的に、不溶性分画のタンパク質を可溶化した後、比較的高濃度のSDS（タンパク質を効率的に変性させることが知られている強力なアニオン性洗浄剤）を含有するバッファを用いてゲル電気泳動を実施し、高温で処理した。その後、サンプルに対してゲル電気泳動と、抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングを実施し、プロット上のポリペプチドを検出した。

【0800】

いくつかの観察を実施し、この方法で可溶性タンパク質と不溶性タンパク質が適切に識別されるかどうかを調べた。移動後にゲル上に残留しているポリペプチドのクーマシー染色は、ルビスコが予想通り可溶性分画の中に存在することを示していた。ほんの痕跡量のルビスコが不溶性分画の中に見いだされた。イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）抗体を用いたウエスタンブロットも分析した。IDHはクエン酸回路に関与するオキシドレダクターゼであり、ミトコンドリアマトリックスの中に位置していて可溶性であることが知られている。ウエスタンブロットは、可溶性分画の中にIDHが存在することを示していた。これは、ミトコンドリアがうまく溶解し、可溶性であることが予想されるミトコンドリアマトリックスタンパク質が実際に可溶性分画の中に存在していたことを示す。これらの観察結果は、利用した方法によって可溶性タンパク質がうまく抽出されて可溶性サンプルに分画されたことを示していた。

【0801】

次にこの方法をNif融合ポリペプチドに適用した。代表的なウエスタンブロットが図3に示されており、結果が表4にまとめられている。可溶性分画の中のMPPプロセッシングを受けたNifポリペプチドの量は、pFAγ51::Nif::HAが異なると変化した。MTP-FAγ51::Nif::HA融合ポリペプチド翻訳産物に由来していてMPPによるプロセッシングを受けた以下のポリペプチド、すなわちNifF、NifM、およびNifUは、ミトコンドリアの中で可溶性であるかほとんど可溶性であるように見えた。他の融合ポリペプチドでは、NifN、NifQ、NifS、NifW、NifY、およびNifZが部分的に可溶性／部分的に不溶性であった。NifB、NifD、NifE、NifH、NifJ、NifK（NifK配列のN末端にHAエピトープタグを持つ）、NifV、およびNifXは、不溶性であるかわずかに可溶性であるように見えた。注目すべきことに、pFAγ51::NifQ::HAは、可溶性分画の中に、正確にプロセッシングを受けた形態のサイズとほぼ同じ弱いバンドを生じさせたが、これは全タンパク質のレーンでは検出できなかった。特に重要なのは、（SN10からの）MTP-FAγ51::NifD::HA、（SN38からの）MTP-FAγ51::NifE::HA、および（SN140からの）MTP-FAγ51::HA::NifKポリペプチドのそれぞれが、それ自体を単一のポリペプチドとして発現させたとき実質的に不溶性であり、これらポリペプチドのミトコンドリア可溶形態は、*N. benthamiana*の葉細胞の中にこれらのポリペプチドがかなりの量で蓄積しても、ほとんど検出されなかった。NifH融合ポリペプチドについては、（SN150からの）MTP-FAγ77::NifHは、それ自体を単一のポリペプチドとして発現させたとき実質的に不溶性であったが、ほんの少量の（SN42からの）MTP-CoxIV::twin strep::NifHが、それ自体を単一のポリペプチドとして発現させたときに可溶性であった。さらに、（SN10からの）MTP-FAγ51::NifDポリペプチドは、SN46からのMTP-Su9::NifKポリペプチドと同時に発現させたとき、同様に実質的に不溶性であった。これら4つのそれぞれは、ニトロゲナーゼ機能にとって不可欠なポリペプチド

だが、ミトコンドリアマトリックスに導入して発現させるときには可溶性に関して問題があると結論された。

【0802】

大気中の酸素がNifタンパク質の可溶性に影響するかどうかを評価するため、同じ16種類のpFA γ 51::Nif::HAタンパク質を、浸透された植物から実施例1に記載されているようにして嫌気条件下で単離し、以前のようにしてウエスタンブロット分析を実施した。タンパク質を抽出している間の嫌気条件がNif融合ポリペプチドの可溶性を有意に変化させることはなかった。Nifポリペプチドのいくつかで観察された不溶性は、Nifポリペプチドの多くが酸素感受性であるにもかかわらず、酸素への曝露が原因ではないと結論された。

【0803】

さらに、ウエスタンブロット分析は、(SN192から産生された) MTP-FA γ 51::NifB::HAポリペプチドは不溶性であり、可溶性分画ではバンドが検出されないことを示した。NifBもニトロゲナーゼの機能にとって重要である。MTP-FA γ 51::NifF::HAポリペプチド(SN138)は、MPPプロセシングの前と後のポリペプチドの両方でほぼ完全に可溶性であった。2つのバンドがブロット上に見られ、それらはMPPによるプロセシングを受けた形態とプロセシングを受けていない形態を表わすと見なされた。MTP-FA γ 51::NifJ::HAポリペプチド(SN139)は実質的に不溶性であり、可溶性分画では非常に弱いバンドだけが検出された。MTP-FA γ 51::NifM::HAポリペプチド(SN30)はMPPプロセシングの後にほとんど可溶性であった。MTP-FA γ 51::NifS::HA(SN31)については2つのバンドがブロット上に観察され、それらはMPPによるプロセシングを受けたポリペプチドとプロセシングを受けていないポリペプチドを表わすと推定された。両方とも部分的に可溶性であった。MTP-FA γ 51::NifV::HAポリペプチド(SN142)は実質的に不溶性であり、可溶性分画では非常に弱いバンドだけが検出された。MTP-FA γ 51::NifX::HA(SN144)ポリペプチドはMPPプロセシングの後に部分的に可溶性であった。MTP-FA γ 51::NifY::HAポリペプチド(SN145)はほとんど可溶性であったが、この実験ではほんの低レベルで発現した。MTP-FA γ 51::NifZ::HAポリペプチド(SN146)は可溶性分画の中で部分的、部分的に不溶性であった。この実験では、ルビスコとIDHの両方が「全タンパク質」と可溶性分画の中に存在しており、不溶性分画からは実質的に不在であった。これは、分画するのに使用した方法が有効であり、可溶性タンパク質が実際に抽出されたことを示している。

【0804】

これら可溶性問題の原因を明確にするための試みにおいて、N末端MTP配列を欠くバージョンのNifD、NifH、およびNifK融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトを作製した。これらポリペプチドは、植物細胞のミトコンドリアの中ではなくて細胞質の中に位置することが予想された。NifD(SN33)、NifH(SN71)、NifK(SN72)をコードするコンストラクトを、GoldenGate組み立て法を利用して作製した。それぞれのポリペプチドは、Nif配列のN末端に融合したGly-Gly連結型HAエピトープタグだけを持っていた。例えばSN33は、C末端HAエピトープ配列なしのHA:NifD融合ポリペプチドをコードしていたため、実質的にN末端MTP-FA γ 51配列がHAエピトープ配列で置換されていた。これら3つのコンストラクトのそれぞれを別々に*A. tumefaciens*を通じて*N. benthamiana*細胞に導入し、ポリペプチドのウエスタンブロット分析を可溶性タンパク質分画と不溶性タンパク質分画について実施した。ウエスタンブロットは、ポリペプチドのそれぞれが植物細胞の中で実質的に完全に可溶性であることを示した。NifD、NifH、およびNifK融合ポリペプチドがMTP配列に融合したときの可溶性の問題は、Nifポリペプチドが植物ミトコンドリアを標的とすることといくらか関係していたと結論された。

【0805】

実施例4：MTP切断後のNif融合ポリペプチドの機能試験

【0806】

実施例2は、*N. benthamiana*の葉細胞の中でのNif融合ポリペプチドの産生と、これらの融合ポリペプチドのミトコンドリアへの送達とプロセシングを記述していた。これらの融合ポリペプチドは、NifポリペプチドのN末端に付加されたMTPのフレーム内融合体と、

ときにはN末端伸長部として、だが非常に頻繁にはC末端伸長部として付加されたエピトープタグを持つように設計した。タンパク質の折り畳みと会合のモデル化は、N末端伸長部とC末端伸長部の大半が複合体の形成とニトロゲナーゼの機能を妨げないことを予測したが、本発明の発明者らは、これら伸長部が天然のNifポリペプチドと比べて融合ポリペプチドの機能に影響を与えるかどうかを調べることを望んだ。pMITv2.1ベクターの誘導体（S manski他、2014年；本明細書ではpMIT2.1またはMIT2.1と呼ぶ）を用いてニトロゲナーゼの機能を調べるための細菌系をそのために確立した。ニトロゲナーゼ活性に必要な野生型遺伝子のすべてが単一の細菌発現ベクターpMIT2.1の中に含有されており、そこでは遺伝子の発現が、第2のプラスミドpN249からの誘導性プロモータ／T7-RNAポリメラーゼ系を用いて制御された。大腸菌の中で発現するとき、野生型細菌Nifポリペプチドの完全セットが産生され、それらが合わさってニトロゲナーゼ酵素複合体を提供し、その活性は、ニトロゲナーゼ活性の事実上の測定であるアセチレンからのエチレンの生成によって調べることができた（アセチレン還元アッセイ、ARA）。

【0807】

この系を、他の点は野生型であるニトロゲナーゼ系に付加することにより、それぞれの改変されたポリペプチドを個別に大腸菌の中で調べることが可能になった。これは、野生型NifポリペプチドをコードするpMIT2.1の中であって野生型NifポリペプチドをコードしているNif遺伝子に対応する改変されたNif遺伝子で置換することによってなされた。2つ以上のNifポリペプチドに対する改変の組み合わせも、この系で試験することができた。しかしpMIT2.1ベクターは22,946 bpと非常に大きかったため、遺伝子改変を組み込むには扱いにくかった。pMIT2.1ベクター系をより使いやすくするため、MIT2.1プラスミドを最初にPCRによって二分割した。NifHDKYENJ遺伝子を含む前半部は、それぞれの端部にSbfI制限酵素部位が組み込まれたプライマー、すなわちMIT_V2.1_SbfInifH_FW2 5'-AACCTGCAGGTGACGTCTAAGAAAAGGAATATTCAGCAAT-3'（配列番号45）とMIT_V2.1_SbfInifJ_RV2 5'-AACCTGCAGGGCTAACTAACTAACCACGGACAAA AAACC-3'（配列番号46）を用いて増幅し、レシピエントベクターpCR Blunt II TOPO（Thermo Fisher Scientific社）に連結し、本明細書でpTopoH-Jと名づけたベクターを形成した。NifBQFUSVWZM遺伝子を含むNif遺伝子クラスター後半部は、やはりそれぞれの端部にSbfI制限酵素部位が組み込まれたプライマー、すなわちMIT_V2.1_SbfInifB_FW 5'-AACCTGCAGGTACTCTAACCCCATCGGCCGTCTTA-3'（配列番号47）とMIT_V2.1_Sbflori_RV 5'-AACCTGCAGGTACGTAGCAATCAACTCACTGGCTC-3'（配列番号48）を用いて増幅した。このPCR産物をSbfIで消化させ、自己連結させて自己複製ベクターを形成し、本明細書ではpB-oriと名づけた。pMIT2.1とその誘導体を改変するため、pTopoH-JとpTopoH-Jの両方、または改変を持つ誘導体をSbfIで消化させ、Nif遺伝子クラスターの2つの半分を互いに連結させた。

【0808】

実施例2に記載されているように、MTP-FAγ51アミノ酸配列は植物ミトコンドリアの中で切断されて、プロセッシングを受けたNif融合ポリペプチドのNifポリペプチドのN末端に融合された9個のアミノ酸残基（FAγ-scar9；配列番号22）が残り、SNコンストラクトの場合にはそれに介在Gly-Glyリンカーが加わる。融合ポリペプチドのそれぞれについて、その機能を、他の点は野生型であるニトロゲナーゼ複合体において調べるため、上記の9個のアミノ酸でN末端のIle残基が翻訳開始用のMetで置換されている点が異なるものをコードするDNA断片（MSTQVVRNR、配列番号49、mscar9と名づける）を、上記の戦略を用いて、pMIT2.1の中の各Nif遺伝子の翻訳開始コドンのすぐ上流に挿入した。例外はNifXであった。なぜならpMIT2.1はNifXを含んでいないため、改変されたNifXは、この系で調べることができなかったからである。それぞれのコンストラクトについてDNA断片を設計し、このDNA断片がNifポリペプチドのいずれか1つをコードする遺伝子の開始コドンのすぐ上流にフレーム内で融合されるとき、このキメラ遺伝子が、選択されたNifポリペプチドへの翻訳融合体をコードするようにした。翻訳開始Metは大腸菌の中で翻訳後に除去されることが予想された。なぜなら2位のセリンは、酵素MAPによる開始Metの除

去を促進することが知られているからである (Hirel 1989年、Xiao 2010年)。それが起こる場合には、得られるN末端伸長部は8個のアミノ酸残基になるであろう。開始Met残基の除去は、Q-TRAP液体クロマトグラフィタンデム質量分析を利用して半トリプシンペプチドSTQVVR (配列番号50) のイオンをモニタする、標的多重反応の増強生成イオン走査によって確認された (下記参照)。

【0809】

細菌内で翻訳後に翻訳開始Met残基が除去された野生型細菌Nifポリペプチドについて、各Nifタンパク質のN末端伸長部の長さは、Nifの残部に融合したSTQVVRNRM (配列番号51) の配列を持つ9個のアミノ酸であり、この中の末端Metが、Nifポリペプチドの翻訳開始アミノ酸であった。

【0810】

pMIT2.1の改変 (この場合には、9アミノ酸mscar9ペプチドMSTQVVRNR (配列番号49) の翻訳融合体をNifポリペプチドのN末端に導入する) とその試験の一例として、これらアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を、それぞれのNif遺伝子をコードする配列の5'末端にハイブリダイズした順方向プライマーの5'末端に付加した。改変されるそれぞれのNif遺伝子について、特定のNif遺伝子の5'末端に隣接する逆方向プライマーを設計した。増幅したPCR産物を、連結サイクリング反応 (LCR; de Kok他、2014年) を利用して連結した後、改変されなかったpMIT2.1の他方の半分を、SbfIを用いた消化の後に改変された半分に連結させた。例えばMSTQVVRNR (配列番号49) の翻訳融合体をNifBのN末端に導入するため、プライマー5' - ATGTCAACTCAAGTGGTGGCGTAACCGCATGACCTCTTGTTTCGTCGTT-3' (配列番号52) と5' - TTTAGCCCTCCTATGATTGATTTGATGTATTACAGAGAGG-3' (配列番号53) を、pB-oriを鋳型として用いたPCRで使用すると、11,565 bpの産物が得られた。このPCR断片を、Kokら (2014年) の方法を利用してLCRによって架橋オリゴ5' - GGTTACGCACCACTTGAGTTGACATTTTAGCCCTCCTATGATTGATTGATG-3' (配列番号54) に連結させて使用し、大腸菌DH5αを形質転換した。得られたコンストラクトpB-ori_scar9BをSbfIで消化し、改変されていないNifHDKYENJ遺伝子を含有するpTopoH-JからのSbfI断片に連結すると、NifBに付加されたN末端伸長部を持つ融合ポリペプチドをコードする改変されたpMIT2.1ベクターが得られ、それを本明細書ではpS0006と名づけた。得られた改変された遺伝子コンストラクトのヌクレオチド配列は、改変された半部分がpTopoH-J半部であれ、pB-ori半部であれ、その改変された半分のシーケンシングによって正しいことが確認された。

【0811】

それぞれの遺伝子コンストラクトを、pN249を含有する大腸菌株JM109の中に導入し、両方のベクターで形質転換された細胞の培養物を実施例1に記載されているようにして増殖させた。陰性対照として、16個のNif遺伝子のうちの7つが欠けたpB-oriを使用した。NifMを欠く変化したpMIT2.1 (Δ NifMと名づけた) を実験に含めた (参考、Lei他、1999年; Howard他、1986年)。IPTGで遺伝子発現を誘導した後、形質転換された細胞のエチレン生成をアセチレン還元アッセイで調べた。表4と表5にまとめられている結果は、改変されたpMIT2.1を含有する大腸菌JM109におけるアセチレン還元活性として計算したJM109における機能性 (%) を、改変されていないpMIT2.1を含有するJM109で見られた値と比較して示している。対照である改変されていないpMIT2.1は正のエチレン生成を示した。これらのアッセイは、NifBのN末端への9アミノ酸伸長部の付加が、改変されていないpMIT2.1で見られたエチレン生成のレベルと比べたときにニトロゲナーゼの機能をわずかに増大させたことを示していた。

【0812】

同様に、残る15種類のNifもそのそれぞれのN末端に9アミノ酸伸長部を許容し、NifH、NifJ、NifQ、およびNifFは完全に活性だったが、他のNifでは活性のいくつかの低下があった。第1の実験では、NifH、NifD、NifK、NifE、およびNifNのN末端への9アミノ酸伸長部は、改変されていないpMIT2.1の活性と比べてそれぞれ100%、50%、70%、30%、および50%のレベルのアセチレン還元活性を生じさせた。他のNifポリペプチド、す

10

20

30

40

50

なわちNifJ、NifY、NifQ、NifF、NifU、NifS、NifV、NifW、NifZ、およびNifMは、
改変されていないpMIT2.1の活性と比べてそれぞれ200%、60%、100%、100%、80
%、50%、90%、30%、60%、および10%の活性を示した（表4）。

【0813】

実験を多数回繰り返し、平均の日付（n=2~6）を表6に示してある。大腸菌の中での
個々のscar9::Nifポリペプチドのこの機能試験は、活性が16種類のNif融合ポリペプチド
のすべてで保持されているが、異なるNifでは活性レベルのかなりの変動が存在すること
を示した。注目すべきことに、scar9::NifJは陽性対照の3倍の活性を持ち、scar9::NifQ、s
car9::NifH、scar9::NifB、およびscar9::NifFは、対応する野生型Nifポリペプチドと比
べてARA活性が有意に増大していたが、改変されていないpMIT2.1と比べると約130~1
50%の活性を示したため、scar9::NifJで観察された増加よりも少なかった。それとは対
照的に、scar9::NifMだけは野生型NifMと比べて約10%の活性を保持していた。

【0814】

pMIT2.1系の中のscar9-NifJ（pS0028）の活性が大きく、改変されていない対象と比
べて2~3倍活性であるため、NifJを改変する影響をさらに調べた。pMIT2.1のNifJ領域
全体を除去すると、ΔNifJ-MIT2.1（pS0014）が得られた。pS0014を用いたアセチレ
ン還元アッセイから、その活性がpMIT2.1と似ていることが見いだされた。これは、NifJ
が、JM109におけるARAアッセイ系において冗長であったことを示している。したがって
pMIT2.1系の中でのscar9-NifJ（pS0028）の活性増大は、遺伝子量効果に起因していた
可能性がある。

【0815】

本発明の発明者らは、実施例2~4に記載されている実験から、16種類の異なるMTP::N
ifポリペプチドの量、MPPプロセッシング、および可溶性は、それぞれの発現コンストラク
トで同じMPPとプロモータを使用しているにもかかわらずさまざまであると結論した。し
かしこれらNif融合ポリペプチドのすべてが、他のNifタンパク質を野生型ポリペプチドと
して発現させたときに大腸菌の中でニトロゲナーゼ活性に関してある程度機能し、実際
にはいくつかで活性が増大した。観察されたバリエーションは、それぞれのNifポリペプチド
が、蓄積するポリペプチドの量、その輸送、およびMPPによるプロセッシングに影響する固
有の特徴を持つことを示していた。極めて重要な構成要素であるNifHとNifKは容易に発現
して検出された。これらのタンパク質は高レベルのニトロゲナーゼ活性に必要であること
が知られている。しかしこれらは、NifB、NifD、NifE、NifJ、およびNifVと同様に葉の
実験では不溶性であった。NifDを除き、NifY融合ポリペプチドは、これらの実験において
Nifポリペプチドのうちで最低レベルの発現であった。Nifポリペプチドのいくつかはマト
リックス内でMPPによってうまく切断され、細胞質の比較対象よりも高いレベルで蓄積し
た。これは、ミトコンドリア局在化が、融合ポリペプチドをMPPによって切断された後に
安定化させる1つの方法であったことを示唆している。MTP::NifQ融合ポリペプチドは切
断が少なかった。それはおそらく、NifQプレタンパク質が、アンフォールディングまたは
誤った標的化に対する抵抗性が理由でミトコンドリアマトリックスにより入りにくかった
からである。

【0816】

これらの実験では、K. oxytocaからのNifHを持つ融合ポリペプチドは植物ミトコンド
リアマトリックスの中で不溶性であった。NifMは、細菌内でのNifHの安定性と可溶性に
必要とされる可能性がある（Lei他、1999年；Howard他、1986年）ため、その後の実
験で一過性葉アッセイにおいてミトコンドリア標的型のNifHとNifMの組み合わせを調べ
た。

【0817】

K. oxytocaのNifBを持つ融合ポリペプチドは、ミトコンドリアに局在化させたときに不
溶性であった。これは、酵母と植物のミトコンドリアに向かわせたときのA. vinelandii
NifBに関して記述されている結果（Buren他、2017年a）と一致する。

【0818】

本発明の発明者らは、これらのデータを合わせて考慮し、上記のNif融合ポリペプチドのうちの7つ、すなわちNifF、NifN、NifS、NifU、NifW、NifY、およびNifZが優れたレベルで発現し、効率的にプロセッシングを受け、ミトコンドリアマトリックスの中に主に可溶性形態で局在化していたと結論したが、NifYの量は比較的少なかった。これらのN末端融合ポリペプチドは、MPPによる切断の後、合理的なレベルの活性を保持していた（表6）。

【0819】

【表6】

表6：pFA γ 51の9アミノ酸「瘢痕部」（scar9）ペプチドを個々のNifタンパク質に融合させることが大腸菌におけるニトロゲナーゼ活性に及ぼす効果。数値は、pMIT2.1と比較したアセチレン還元活性（%）として表わしてある。pB-ori、陰性対照； Δ NifM、pMIT2.1から除去されたNifMコード配列。

コンストラクトの ID	ニトロゲナーゼ活性（pMIT2.1 に対する %）	標準偏差
pMIT2.1（野生型）	100	18
scar9::NifJ	309	86
scar9::NifQ	158	22
scar9::NifH	148	15
scar9::NifB	144	34
scar9::NifF	131	8
scar9::NifD	110	9
scar9::NifW	95	8
scar9::NifV	81	11
scar9::NifU	80	4
scar9::NifY	65	4
scar9::NifK	60	10
scar9::NifN	46	9
scar9::NifE	42	1
scar9::NifS	41	1
scar9::NifZ	37	18
scar9::NifM	9	1
Δ nifM	6	4
pB-ori（ Δ NifHDKENJ）	0	0

【0820】

実施例5：Scar9-Nif融合ポリペプチドの検出

【0821】

細菌系の中で発現した特定の融合ポリペプチドを検出するため、液体クロマトグラフィ-質量分析（LC-MS）法を採用した。この方法は、液体クロマトグラフィの物理的分離能力と質量分析（MS）の質量分析能力を併せ持ち、トリプシンでタンパク質抽出液を消化させることによって生成した特定のペプチドを検出する。

【0822】

改変されたpMIT2.1ベクターのそれぞれを別々にpN249とともに含有する大腸菌株JM109を培養し、実施例1に記載されているようにしてタンパク質を抽出した。タンパク質サンプルは、還元、アルキル化、およびトリプシン消化の前は-20℃で保管した。実施例1に記載されているようにフィルタ支援サンプル調製（FASP）プロトコルを利用してタンパク質サンプルを還元し、アルキル化し、トリプシンで処理した後、実施例1に記載されているようにしてLC-MSによって分析した。調べたサンプルは表7に掲載されている。サンプル5～19に関するそれぞれの遺伝子コンストラクトは、1つの改変されたNifポリペプチドと、*K. oxytoca*に関して野生型である他の15種類のNifポリペプチドをコードしていた。サンプル1～4は、scar9を含むポリペプチドをまったく持っていなかった。

【0823】

【表 7】

表7：LC-MSによって融合ポリペプチドを検出するのに用いた遺伝子コンストラクト

サンプ ルの ID	JM109 の中の遺伝子コンストラ クト	改変された Nif の記述	Scar9 ペプチドが 検出されたか？
1	pMIT2.1	陽性対照	
2	pB-ori	陰性対照	
3	pS0014	Δ NifJ	
4	pS0051	Δ NifM	
5	pS0006	FA γ -Scar9-NifB	検出された
6	pS0026	FA γ -Scar9-NifE	検出された
7	pS0028	FA γ -Scar9-NifJ	検出された
8	pS0032	FA γ -Scar9-NifF	検出された
9	pS0012	FA γ -Scar9-NifH	検出された
10	pS0029	FA γ -Scar9-NifK	検出された
11	pS0038	FA γ -Scar9-NifM	検出された
12	pS0027	FA γ -Scar9-NifN	検出された
13	pS0031	FA γ -Scar9-NifQ	検出された
14	pS0034	FA γ -Scar9-NifS	検出された
15	pS0033	FA γ -Scar9-NifU	検出された
16	pS0035	FA γ -Scar9-NifV	nd
17	pS0036	FA γ -Scar9-NifW	検出された
18	pS0030	FA γ -Scar9-NifY	検出された
19	pS0037	FA γ -Scar9-NifZ	検出された

nd：実施せず

【0824】

最初に、4つのサンプルをトリプシン消化効率に関して評価した。サンプル5（NifB）と6（NifE）は、トリプシンで2通りのインキュベーション時間、すなわち30分間と一晚（16～18時間）をかけて消化させた。各サンプルから、4 μ lのトリプシンペプチドを、Eksigent microLC を用いて6600 Triple TOF質量分析器に注入した（85分間）。Protein Pilotを利用し、カスタムのデータベースと汚染物質データベース（Uniprot-Swiss Prot 大腸菌＋カスタムのデータベース（Mit2Nif）＋Common Repository of Adventitious Proteins；Mit2Nif＋Mit2.1 Nif-Scar）が添付された種特異的UniProt Knowledgebase（UniProtKB）データベースを参照してデータを処理した。これらのデータベースには、トリプシンを用いたNifタンパク質の消化によって生成することが予想されるペプチドのすべてが含まれていた。FA γ -Scar9-NifBとFA γ -Scar9-NifEをコードするコンストラクトからのタンパク質サンプル5と6は、16種類のNifタンパク質を含有することが期待され、そのうちの15種類が野生型であり、16番目がNifBとNifEのそれぞれにscar9を持っていた。

【0825】

30分間というより短い期間のトリプシン消化により、より長い消化よりも多くのタンパク質／ペプチドが同定された。次に、大腸菌サンプル（#1～19）の全パネルをトリプシンで、一晚ではなく1時間にわたって消化させた。

【0826】

N末端scar9配列についてペプチドの一致を調べた。限定されたIDA（6600TF LC-MS/MS）の証拠が、完全に切断されたMSTQVVR（配列番号55）ペプチドと半トリプシン MSTQVVRNR（配列番号49）ペプチドで見いだされ、ペプチド一致の信頼性は低かった。改変されていないか酸化されたメチオニン残基を持つペプチドもMRMを利用して評価した

。しかし発見6600TF LC-MS/MSとProteinPilotデータベースの検索、または標的型MRM 6500 QTRAP LC-MS/MSを利用してこれらのペプチドを試験サンプルの中で確認することはできなかった。

【0827】

ペプチド一致の信頼性が低いことの説明として、翻訳開始メチオニンが細菌内で翻訳後に切除された可能性を考慮した。組み換えタンパク質が細菌発現系で発現するとき、開始メチオニンは、メチオニンアミノペプチダーゼ（MAP）により、N-メチオニンに隣接する残基のサイズに基づく効率で切除されることがしばしばあると考えられている（Hirel 1989年、Xiao 2010年）。FAγ-scar9-Nifポリペプチドの場合のように2位の残基がSer残基であるとき、N末端Metは切除されることがしばしばあると推定された（効率84%）。

【0828】

したがって追加の改変されたペプチドを、Nif融合ポリペプチド：STQVVR（+1、+2）（配列番号50）と半トリプシンペプチドSTQVVRNR（+2、+3）（配列番号56）から評価した。ペプチドSTQVVR（配列番号50）は短く、おそらく3つの理由で以前の分析では同定されなかった。第1に、このペプチドは、標準的なLC-MSパラメータ（m/zの範囲350～2000）にあるセットよりも小さいm/z値（345.2、+2）を生じさせると考えられる質量（688 Da）を持っていた。第2に、このペプチドは、小さな疎水性を持っていたため、カラムの表面に保持されなかった可能性がある。そして第3に、このペプチドは、データベース検索アルゴリズムで信頼性よく配列にマッチさせるにはあまりに短かった。最初にサンプル#1～19（表7）をプールし、異なる条件（例えば質量範囲をm/z 350から300に下げ、モニタする電荷状態を広げて+2と+5だけでなく+1が含まれるようにする）下で、予想される標的質量を包含する含有リストを規定することにより6600TF LC-MS/MS上を走らせた。これらの変化のどれも、スペクトルデータでもデータベース検索でもSTQVVR（配列番号50）の肯定的な同定を生じさせなかった。

【0829】

次に、トリプシンペプチド：STQVVR（配列番号50）と半トリプシンペプチドSTQVVRNR（配列番号56）を、2つの帯電状態を持つ4つのトランジションを利用し、6500 QTRAP上で多重反応モニタリング（MRM）を利用して評価した。するとSTQVVR（配列番号50）のピークが生じたため、Enhanced Production Ion（EPI）走査によって調べると、標的MRMに関するフル走査MS/MSスペクトルが得られた。これは、N末端Metが欠けた改変された切断型N末端ペプチドの存在の確認であった。勇気づけられることに、特定のFAγ-Scar9-Nifポリペプチドをこの方法によって複合体タンパク質混合物から検出できることが結論された。

【0830】

次に、この方法を利用して、改変されたpMIT2.1ベクターから大腸菌の中で発現させたときの異なるFAγ-Scar9-Nifポリペプチドそれぞれの発現レベルを比較した。230のトランジションを含む包括的MRM法を開発してJM109からのサンプルを評価した（表7）。これは、以下のNifタンパク質、すなわちB、D、E、F、H、K、M、N、Q、S、U、W、Y、およびZについて同定された高応答ペプチド（4トランジション／ペプチド）を含んでいた。FAγ-Scar9とクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼタンパク質（CAT）からの対照ペプチドも含めた。実施例1に記載されているように、各サンプルの中でCATに対して特異的なペプチドの量を測定し、異なるコンストラクトの間のNifレベルを標準化した。サンプルのそれぞれで同じ量の全タンパク質を用いるように注意した。検出されたCAT特異的ペプチドの量は、すべての実験サンプルで同様であった。これは、pN249/pMIT2.1アッセイ系からの異なるサンプルの中で生成したNifポリペプチドの量を適切に比較できたことを示している。FAγ-Scar9に由来するペプチドSTQVVR（配列番号50）の量はサンプル9（FAγ-Scar9-NifH）と11（FAγ-Scar9-NifM）において最大であり、その両方とも、他のものと比べて強く発現し、それに続くのがサンプル10（FAγ-Scar9-NifK）、14（FAγ-Scar9-NifS）、および15（FAγ-Scar9-NifU）であることが観察された。より少ない量が他のサンプル5～19で観察されたが、NifVは例外である可能性がある

。陰性対照サンプル1～4には、MTP-FA γ -scar9配列の不在から予想されるように、STQ VVR（配列番号50）がまったく存在していなかった。

【0831】

実施例1に記載されている標的型液体クロマトグラフィ-多重反応モニタリング-質量分析（MRM-MS）を利用して大腸菌細胞の中のscar9::NifD、scar9::NifK、scar9::NifH、scar9::NifS、およびscar9::NifMポリペプチドの量を測定した。測定結果は、NifS融合ポリペプチドに対する特異的ペプチドの量がすべてのサンプルでほぼ同じであることを示していた。それとは対照的に、最大の違いはscar9::NifMで見られ、NifM融合ポリペプチドの量は、野生型NifMが発現したサンプルと比べて約50倍増加していた。同様に、NifHに融合したscar9ペプチドは、他の株の中の野生型NifHの量と比べてNifHの量が2～3倍増加した。NifM遺伝子が欠失した対照サンプル（ Δ NifM）では、NifMに対して特異的なペプチドは予想通り検出されなかった。同様に、NifD、NifK、およびNifHに対して特異的なペプチドは、これら遺伝子が存在していないpB-ori含有大腸菌からのサンプルでは検出されなかった。これらの分析は、NifDとNifKの量が全サンプルを通じて合理的な一貫性を持っていることも示しているが、注目すべき例外は、scar9::NifYの存在下でNifDとNifKの量が野生型NifYを持つ株に見られるレベルと比べて約30%低下したことである。NifDとNifKのレベルのこの低下は、大腸菌細胞からの抽出液で野生型のNifDまたはNifKポリペプチドに結合する抗体を用いたウエスタンブロット分析によって確認された。本発明の発明者らは、MPPを媒介としてMTP-FA γ 51融合体を切断した産物を表わすNifポリペプチドのN末端にscar9モチーフを付加すると、そのポリペプチドが大腸菌の中で発現したとき、ニトロゲナーゼ機能に関する少なくともいくつかの活性を維持しつつ、そのポリペプチドの蓄積レベルに影響を与えることができると結論した。

【0832】

これらの分析では、NifH特異的ペプチドは、scar9-NifHが細胞の中で産生されたとき、しかもそのときだけ、対照細胞と比べて約2～3倍増加した。それとは対照的に、NifSとNifEは、すべてのpMIT2.1由来ベクターで一貫性のある蓄積をしたポリペプチドの例であり、2つのNifS特異的ペプチドまたは2つのNifE特異的ペプチドと、CATに融合したscar9伸長ペプチドのレベルは、全サンプルを通じて約20%変動しただけであった。これらの結果は、NifHとNifMポリペプチドに対するN末端の変更が、これら2つのタンパク質の量を他のすべてのNifタンパク質およびCATと比べて有意に増加させたことを示していた。

【0833】

これらの結果と表4にまとめられている結果は、ARAによって測定されるニトロゲナーゼ機能におけるNifH、NifM、およびNifEに対するscar9伸長部の性能に関するいくつかの見通しを提供した。scar9-NifHポリペプチドの量はpS0012を含有する細菌の中で約2～3倍増加したが、scar9-NifHはARAアッセイにおいて野生型対照と比べて110%の活性を提供した。他方でscar9-NifMは野生型対照と比べてはるかに多く蓄積したが、ARAアッセイは対照と比べて約10%の活性しか生じさせなかった。この結果は、scar9-NifMポリペプチドの高いレベルがARA機能に対して負の調節因子として作用した可能性があることを示唆していた。

【0834】

LC-MS法を利用して植物細胞の中の特定の融合ポリペプチドも検出した（実施例12）。これはこの方法の一般的な適用可能性を示している。

【0835】

実施例6：植物細胞と酵母細胞において*K. oxytoca* MTP-NifDが発現する結果として二次切断産物が生成する

【0836】

本発明の発明者らからの以前の1つの報告は、16種類のNifポリペプチドすべてのうちで、植物細胞の中で産生させるのが最も難しいのはNifDであることを示した（Allen他、2017年）。彼らは、野生型*K. oxytoca* NifDアミノ酸配列を持つFA γ ::NifD::HA融合ポリペプチドを*N. benthamiana*細胞の中で産生させたとき、より小さな分子量の複数の追加

バンドがウエスタンブロット上に現われたことも報告した。追加バンドは、約48 kDaの強いバンドを含んでいた。これらの追加バンドは、隠れたプロテアーゼ部位での二次切断の結果であるNifD融合ポリペプチドの分解産物、またはおそらくは代わりの転写シグナルまたは翻訳開始シグナルの産物に対応することが示唆された。

【0837】

プロモータとMTP配列を変化させる効果

【0838】

これらの観察結果を確認するとともに、追加バンドがいくつかのプロモータまたはMTP配列とNifD配列の組み合わせに起因するかどうかを調べるため、一連の遺伝子改変をコンストラクトSN10に対して行なった。開始時のSN10はMTP-FAγ51::NifD::HA融合ポリペプチド（配列番号122）をコードしており、その中のNifDアミノ酸配列は配列番号18として示されていて増強型e35Sプロモータから発現され、*N. benthamiana*のためのコドン最適化を利用していた。改変のいくつかでは、SN10のe35Sプロモータを異なるプロモータで（例えば地下クローバースタントウイルス（SCSV）のS4、S4v2、またはS7プロモータ）で置き換えた。他の改変では、MTP-FAγ51を別のMTP（例えばMTP-L29（配列番号34）またはMTP-CPN60（配列番号28））で置き換えた。この実験で使用了コンストラクトは表8に掲載されており、実施例2に記載されているもののいくつかが含まれていた。これらのコンストラクトは、GoldenGateクローニング系（Weber他、2011年）により、Engler（2014年）によって記載されている特別な構成要素を用いて作製された。キメラ遺伝子のいくつかは図4（上方のパネル）に模式的に示されている。

【0839】

*A. tumefaciens*の中のこれらコンストラクトを実施例1に記載されているようにして*N. benthamiana*の葉細胞に浸透させ、タンパク質抽出液を、HA抗体を用いたウエスタンブロットングによって分析した。コンストラクトのそれぞれについて、ペア式浸透を、コンストラクトpRA25の不在下、またはpRA25（MTP-FAγ51::NifK融合ポリペプチドをコードする；配列番号57）の存在下で実施した。なぜならC末端伸長部なしのNifKの同時発現は、NifDの量を増やすことが示されていたからである（WO2018/141030）。代表的なウエスタンブロットが図4と図5に示されている。MPPによるプロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の融合ポリペプチドの両方が各コンストラクトについて生成し、約48 kDaのポリペプチドであることが観察された。pRA25が存在していたすべての場合（図4、下方のパネル）で、約48 kDaのバンドの強度はプロセッシングを受けたMTP::NifDポリペプチド（バンド2）の強度よりも大きかった。これは、異なるMTP配列を用いたバリエーションのすべてでも観察された。48 kDaのポリペプチドが、使用したMTP配列に関係なく、ウエスタンブロット上で強度が最も大きいポリペプチドバンドであった（図5）。再度、MTP-NifK発現コンストラクトの存在が、約48 kDaの位置の優勢なバンドを含めてあらゆるNifDポリペプチドの量をしばしば増加させたことも観察された。

【0840】

Nif融合ポリペプチドをコードする異なるコンストラクトSN46を作製した。このコンストラクトは、増強型e35Sプロモータと、翻訳効率を最大化するためのTMVオメガ断片（35Sポリアデニル化／転写終止配列）を含む5'-UTRを持ち、野生型C末端を持つMTP-Su9::NifKポリペプチド（配列番号58）をコードしていた。コード領域は、pRA25の中でヒトコドン最適化よりはむしろ*N. benthamiana*のためのコドン最適化を利用した。SN46コンストラクトを、NifDコンストラクトを同時に浸透させた後にNifD融合ポリペプチドの蓄積を増加させる効力について、pRA25と比較した。SN46は、NifD融合ポリペプチドの蓄積を増強する上でpRA25と少なくとも同じくらい有効であったが、約48 kDaのポリペプチド産物も蓄積した。代表的なウエスタンブロットが図6に示されている。

【0841】

HA抗体を用いて約48 kDaのポリペプチドが検出されたため、それは、翻訳された融合ポリペプチドがプロテアーゼによって切断されたC末端産物に対応していた。これらの結果は、約48 kDaのC末端ポリペプチドが、その発現に使用したプロモータまたはMTP配列

に関係なく、植物細胞の中で野生型 *K. oxytoca* NifD 融合ポリペプチドから生成したことを示していた。約 48 kDa のポリペプチドを本明細書では NifD 「二次切断産物」 または NifD 「分解産物」と呼ぶ。

【0842】

【表 8】

表 8：植物細胞における MTP-NifD 融合ポリペプチドの産生とプロセッシングを調べるための遺伝子コンストラクト。それぞれのコンストラクトは、野生型 *K. oxytoca* NifD 配列の N 末端に融合された掲載されている MTP を含む融合ポリペプチドをコードしていた。

コンストラクトの ID	プロモータ	MTP	MTP の配列番号
SN4	e35S	CPN60 GG リンカーなし	配列番号 29
SN6	SCSV-S4	FA γ 51	配列番号 21
SN7	SCSV-S4v2	FA γ 51	配列番号 21
SN8	SCSV-S7	FA γ 51	配列番号 21
SN9	35S	FA γ 51	配列番号 21
SN10	e35S	FA γ 51	配列番号 21
SN11	e35S	CPN60	配列番号 28
SN12	e35S	SOD	配列番号 30
SN13	e35S	2SOD	配列番号 31
SN14	e35S	SU9	配列番号 35
SN15	e35S	SODmod	配列番号 32
SN16	e35S	2SODmod	配列番号 33
SN17	e35S	L29	配列番号 34
SN19	e35S	CoxIV twin strep	配列番号 37

【0843】

二次切断はミトコンドリアを標的とすることに起因するか？

【0844】

本発明の発明者らは、NifD 二次切断／分解の原因を明らかにすることを目指し、最初にそれがミトコンドリアへの取り込みの前に起こったか後に起こったかを明らかにすることにした。それを調べるため、NifD コンストラクト (SN34) を作製した。この SN34 は、MTP-FA γ 51 配列が HA エピトープタグで置き換えられたこと以外は SN10 と同じであるため、HA::NifD::HA 融合ポリペプチドをコードしている。MTP を欠くこのポリペプチドは、ミトコンドリアを標的としないと考えられるため、その代わりに植物細胞の細胞質に局在化することが予想された。翻訳産物の両端に HA エピトープを持つため、いかなる内部プロテアーゼ切断によっても N 末端産物と C 末端産物が生成するとは予想されなかった（これらがさらに分解されることがなければ、HA 抗体でその両方を検出することができる）。SN34 から C 末端 HA タグが除去された第 2 の遺伝子コンストラクトを作製した。このコンストラクト (SN33) は HA::NifD 融合ポリペプチドコードしており、サイズが MPP によるプロセッシングを受けた MTP-FA γ 51::NifD ポリペプチドとほぼ同じで、それぞれが 1 つの HA エピトープタグだけを所有していたため、より直接的な比較ができた。

【0845】

SN75 と SN46 を *N. benthamiana* に同時に浸透させ、浸透した葉細胞からのタンパク質抽出液をウエスタンブロット分析した後に、SN33 と SN34 の両方とも、サイズがこれらコンストラクトから翻訳された完全長融合ポリペプチドに対応する離散した強いバンドを生じさせたことが観察された。SN34 に関する主要なポリペプチドバンドは、SN33 に関するポリペプチドバンドよりもわずかに広く、それは SN34 の中の追加 C 末端 HA エピトープの存在に起因すると理解される。これら SN33 と SN34 の NifD 特異的バンドは、SN10 を浸透させた細胞から生じた対応する完全長のバンドよりも強度がかなり大きかった。重要なことだが、SN34 と SN33 の導入後に 48 kDa の C 末端切断／分解産物はまったく観察されな

かった。同様に、SN34ではN末端切断産物がまったく観察されなかった。

【0846】

48 kDaポリペプチドの生成にMTP配列におけるMPPによる第1の切断が必要であるかどうかを調べるため、変異したMTPを持つSN66と名づけたさらなるコンストラクトを作製した。その目的で、SN10にコードされているMTP-FA γ 51を、MTP内の5つの連続したアラニン置換の領域と、MPPによるミトコンドリアでのプロセッシングに対して抵抗性になると考えられる8つの置換がある第2の領域を含有する同じ長さの配列で改変した。具体的な置換は図7に示されている。アラニンが並んだ第2の領域は、MPPのための認識と切断の部位を包含していたため、MPPプロセッシングはこれらの置換が原因で無効になることが予測された。この融合ポリペプチドがミトコンドリアに輸送されるかどうかは知られていなかった。このコンストラクトが*N. benthamiana*の葉細胞に導入されたとき、細胞からのタンパク質抽出液は、ウエスタンブロット分析によって48 kDaの産物を含有していることが観察された。

【0847】

MTP-CPN60配列（配列番号28）と比べてアラニン置換がある同様に変異したMTP配列を持つSN64と名づけた第2のコンストラクトを作製した。このコンストラクトを*N. benthamiana*の葉細胞の中で調べたとき、48 kDaの二次切断産物が再び観察された（図6）。

【0848】

これらの結果が合わさって、MYP::NifD融合ポリペプチドの二次切断／分解が、ミトコンドリアを標的とする帰結であること、そしてそれがミトコンドリアプロテアーゼによって起こると推測されることが実証された。しかし二次切断は、ミトコンドリア内のMPPによるMTP配列の以前の切断に依存していなかった。

【0849】

N末端NifD切断産物の検出が、二次切断がエンドプロテアーゼによって特定の部位で起こったことを実証した

【0850】

48 kDaのC末端切断／分解産物は、明らかに、SN10と、MTP::NifD融合ポリペプチドをコードする他のコンストラクトの導入後に植物細胞の中で産生されたため、本発明の発明者らは、対応するN末端NifD切断産物を植物細胞の中で観察できるかどうか、または分解がN末端からのエキソヌクレアーゼ活性によって起こったかどうかを見ることを望んだ。そこで、Gly-Glyで連結されたHAタグもMTP-FA γ 51の直後かつNifDコード領域の前に含まれていることと、配列番号36をMTP-FA γ 51として使用したこと以外はSN10と同じであった別のコンストラクト（SN75）を作製した。このコンストラクトから生成した融合ポリペプチドがNifD内の同じ特定の位置で切断される場合には、2つのHAタグ付き産物（MTP::NifD抽出液の中に以前に見られたより長い約48 kDaのC末端産物と、より短い約13 kDaのN末端産物）が生成することが予測された。しかしミトコンドリア内の特別なペプチダーゼがMPPによる切断後のN末端切断プレ配列を分解する（Kmiec他、2013年）ため、本発明の発明者らは、N末端切断／分解産物が観察されるかどうかわからなかった。

【0851】

SN75を*N. benthamiana*の葉に浸透させ、タンパク質抽出液のウエスタンブロットティング分析を実施した後、より短い約15 kDaのN末端産物のほか、より長い約48 kDaのC末端産物が検出された。これら2つの産物のサイズの合計は、MPPによるプロセッシングを受けたMTP-FA γ 51::HA::NifD::HAポリペプチド（57.6 kDa）の予想サイズよりもわずかに大きかったが、この差は、マーカーと比べてバンドサイズを過大評価した結果である可能性が大きく、ゲル電気泳動における移動速度に影響するポリペプチドの表面電荷が原因であった可能性がある。しかしこの結果は、融合ポリペプチドのNifD部分の二次切断が特異的かつ離散的であること、NifDポリペプチド内の特定の部位で起こったこと、そしてN末端からの逐次的分解の結果ではないことを実証していた。

【0852】

ミトコンドリア標的型NifDの二次切断／分解は酵母で起こるか？

【0853】

Burenら（2017年b）は、*Azotobacter vinelandii* NifDポリペプチドを酵母ミトコンドリアに向かわせると、NifD抗体によって検出可能な約50 kDaのバンドがより速く移動することを報告した。本発明の発明者らは、植物に最適化された*K. oxytoca* NifD配列も酵母の中で発現するときに同様の切断を示すかどうかを明らかにすることを望んだ。この目的で、SN10からのMTP-FA γ 51::NifD::HAコード配列を含む酵母発現ベクターを作製したが、このコード配列には、この酵母発現ベクターpYES2に入れてクローニングすることを可能にする隣接KpnI/SacI制限部位が伴っていた。このコンストラクトをSNY10と名づけた。非ミトコンドリア局在化のための対照として、SNY10のMTP-FA γ 51が6×Hisエピトープタグで置換された第2の酵母NifDコンストラクトを作製し、SNY196と名づけた。この第2のコンストラクトは、SN10またはSNY10からのプロセッシングを受けたポリペプチドとほぼ同じサイズの細胞質局在化NifDポリペプチドを発現するように設計されており、そのことによってウエスタンブロット上で予想サイズの可視化が可能になった。GAL1プロモータがe35Sプロモータで置換された、SNY196の植物オルソログも作製した（SNY196）。このコンストラクトは、6×HisタグがSN10のMTP-FA γ 51に置き換わったことを除いてSN10と同じであった。

【0854】

SNY10（MTP-FA γ 51::NifD::HA）コンストラクトまたはSNY196（6×His::NifD::HA）コンストラクトを含有する酵母細胞を実施例1に記載されているようにして増殖させ、融合ポリペプチドをコードする遺伝子を発現させた。導入遺伝子の発現を誘導した後にタンパク質を形質転換された細胞から抽出し、HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。結果は図8に示されている。SNY10に関するレーンでは、MPPによるプロセッシングを受けたMTP-FA γ 51::NifD::HAポリペプチドで予想されるサイズ（約58 kDa）により低い強度のバンドが観察された。このポリペプチドは、MPPプロセッシングの後に植物が発現するMTP-FA γ 51::NifD::HAポリペプチド、ならびにSN196からのポリペプチドと同じサイズであった。重要なことだが、約48 kDaのバンド位置にあるはるかに大きな強度のポリペプチドバンドがSNY10から観察され、それはSN10からの植物発現切断／分解産物と同じサイズであった。すなわち酵母が発現するMTP-FA γ 51::NifD::HAのほとんどは、植物細胞における切断と同様のやり方で、それどころか実際には酵母細胞の中ではより一層効率的に、切断された。酵母細胞と植物細胞からのC末端切断産物が同じサイズであるという事実は、プロテアーゼ切断が酵母細胞と植物細胞両方のミトコンドリア内の同じ部位で起こっていることを示していた。それとは対照的に、SNY196を含有する酵母細胞からのタンパク質抽出液は、ミトコンドリアを標的としないNifDで予想されるサイズの単一の離散したバンドを生じさせた。同じ部位での非ミトコンドリア切断を示していたと考えられる約48 kDaの位置にSNY196からの特異的なC末端NifD::HAポリペプチドのバンドが検出されることはなかった。

【0855】

注目すべきことに、MPPによるプロセッシングを受けなかったMTP::NifD融合ポリペプチドがSNY10を含有する酵母細胞からのタンパク質抽出液で検出されることはなく、これは、同じMTP-FA γ 51::NifD::HAポリペプチドを産生する*N. benthamiana*細胞において、ポリペプチドのプロセッシングを受けていない形態とMPPによるプロセッシングを受けた形態の両方が観察されたという観察結果と対照的であった。すなわち酵母では、MTP配列がMPPによる完全なプロセッシングを受けた。これは、その2つの生物の間のプロセッシングの機構と効率の違いを反映していると考えられた。これは、一過性に形質転換されただけの植物細胞とは異なり、酵母細胞が安定に形質転換された細胞であるという事実から来ている可能性もある。

【0856】

これらの結果が合わさって、MTP融合ポリペプチドとして発現した*K. oxytoca*からの野

10

20

30

40

50

生型NifDポリペプチドは、酵母または植物のミトコンドリアを標的とするときには同じ特定の部位で切断されることが、切断はミトコンドリアを標的とすることに依存することを示していた。

【0857】

実施例7：野生型NifDにおける二次切断部位の同定

【0858】

実施例6に記載されている実験の結果は、MTP::NifD融合ポリペプチドの二次切断が、野生型NifD配列内の特定の部位で起こることと、ミトコンドリアを標的とする帰結であることを示していた。この切断はいくつかの理由で望ましくないと考えられたため、本発明の発明者らは、植物細胞における切断を阻止することを目的として、NifDの領域を改変することを望んだ。N末端切断産物とC末端切断産物のサイズから、切断部位は野生型NifD配列（配列番号18）のアミノ酸80～120の領域内にあると考えられた。しかしその特定の部位での切断は、まさに切断部位に隣接するアミノ酸ではなく、遠位配列による影響を受けた可能性が存在していた。それが理由で、本発明の発明者らは、二次切断の特定の部位と、周囲のアミノ酸と、切断に影響を与える可能性のある可能なさらなる領域を同定するのにより広いアプローチを取った。

【0859】

プロセッシングを受けていないアミノ酸配列とMPPによるプロセッシングを受けたアミノ酸配列の両方でNifD内の切断部位を同定する、または少なくともその位置を予測するという最初の試みをMitofateソフトウェア（Fukusawa他、2015年）に入力し、あらゆるMPP部位が予測されるかどうかを見た。Mitofateソフトウェアは、アミノ酸配列の特徴（正に帯電した両親媒性とプレ配列モチーフのほか、アミノ酸組成と物理化学的特性が含まれる）を組み込むことによってMPPによる切断の部位を予測する。このソフトウェアは、酵母訓練データセットのアラインメントされた切断部位のアミノ酸残基-4と+5の間にコンセンサス位置重みマトリックスを生成させることにより、MPPによるプレ配列切断部位も予測する。MTPは一般に長さが10～90個のアミノ酸であり、少数のものは110個のアミノ酸よりも長い（Huang他、2009年）ため、このツールはN末端からの距離に基づく情報も組み込んでいる。

【0860】

プレタンパク質は外側と内側のミトコンドリア膜を通過して移動するため、MPPはMTPの中での最初の切断の後に二次切断部位を認識する可能性があるとして仮定し、初期MPPプロセッシングイベントから得られるアミノ酸配列を、MTP-FA γ の2つの長さ、すなわちFA γ -scar37-NifD（35アミノ酸FA γ scar+GG）とFA γ -scar11-nifD（9アミノ酸FA γ 51 scar+GG）について、Mitofateソフトウェアに入力した。Mitofateによる分析は、配列FA γ -scar37-NifDを用いると、NifDのN末端に対して配列VRGCAY（配列番号60）内のアミノ酸G62の直後の予想切断部位を回答し、配列FA γ -scar11-nifDを用いると、配列RAGRNYTGTG（配列番号61）内のN99の直後の予想切断部位を回答した。したがってMitofate分析は、この領域内のNifD配列が、1つ、それどころか2つのMPPプロセッシング部位という特徴を持つように見えることを示した。下に説明するように、これら予想部位の2番目は、二次切断に関して正しいことが判明した。

【0861】

二次切断に関係するNifD内の領域を同定するための異なるアプローチでは、一連の遺伝子コンストラクトを作製した。そのそれぞれは、NifDの二次切断の大まかな領域内に5個の連続したアミノ酸置換からなるブロックを持ち、非アラニンアミノ酸はアラニンで置換され、元のアラニンアミノ酸はグリシンで置換された。すなわちアラニンは、元のアラニン残基がグリシンで置換されたことを除き、すべての置換で用いられた。これらの一連の置換変異体は、配列番号18のアミノ酸49からアミノ酸108の推定切断部位の約6 kDaに広がっていた。これらのコンストラクトをNifD-Var1～6およびVar9～14と名づけた（表9）。Mitofateが予測した配列VRGCAY（配列番号60）内の可能な切断部位に基づく離散した置換を持つ他の2つのバリエーションを作製し、NifD-Var7およびVar8と名づけた。Ni

fDバリエーションをコードするこれらコンストラクトは他のすべての点でSN10と同じであり、ポリペプチドは、NifDタンパク質コード領域に翻訳融合されたMTP-FAγ51と、あらゆるNifD C末端切断産物の検出を可能にすると考えられるC末端HAエピトープタグを持っていた。

【0862】

これら14種類のコンストラクトを*A. tumefaciens*から*N. benthamiana*の葉細胞に個別に、SN46 (MTP-Su9::NifK) とともに導入した。タンパク質抽出液を、浸透された葉スポットから調製し、SDS-PAGEと、HA抗体を用いたウエスタンブロッティングを実施した。調べた14種類のバリエーションのうちで12種類が相変わらず48 kDaの切断産物を生成させたため、その12種類をそのバンドパターンにおいて野生型NifD配列を持つSN10に由来するバンドと比べて識別することはできなかった。しかしNifD-Var13 (遺伝子コンストラクトSN100) は、48 kDaの切断産物を示さないことと、ウエスタンブロット上のバンドのサイズと強度から、プロセッシングを受けていないFAγ51::NifDに対するプロセッシングを受けたFAγ51::NifDの比が他のバリエーションよりも比較的大きな比を示すことで目立っていた。NifD-Var12 (SN99) については、弱いバンドが48 kDaの位置に検出され、野生型のバンドよりも強度がかなり低かった。ここでも、MPPによるプロセッシングを受けたNifDの、プロセッシングを受けていないNifDに対する比は、NifD-Var12では、野生型、およびNifD-Var13以外のバリエーションと比べて大きかった。NifD-Var12と13において置換されたアミノ酸置換に基づき、配列番号18のアミノ酸94~103に対応するアミノ酸配列RAGRRNYYTG (配列番号61) 内の少なくともいくつかのアミノ酸を含む、NifDポリペプチドの特定の領域が、ミトコンドリアにおけるNifDの二次切断に必要であると結論された。

【0863】

実験と導出された結論に基づき、NifDの中のRAGRRNYYTG (配列番号61) 配列内の1個、2個、または3個のアミノ酸が置換されたアミノ酸バリエーションの第2のセットをコードする遺伝子コンストラクトを作製した。バリエーションのこのセットでは、アラニンが野生型アミノ酸の代わりに使用されておらず、むしろ天然のNifD配列の大きなセットの系統学的分析 (下記参照) に基づく変化が使用され、NifD-NifK構造のモデル化を利用してそれぞれの具体的な位置における置換アミノ酸が同定された。ここでの考え方は、RAGRRNYYTG (配列番号61) 配列の天然のバリエーションはNifD機能を維持する可能性がより大きいということと、二次切断を回避して機能を維持するバリエーションの合理的設計が可能であるということであった。それぞれのコンストラクトは、アミノ酸置換を除いてSN10と同じであったため、NifDに融合したMTP-FAγ51と、その後48 kDaのC末端切断産物の検出を可能にするC末端HAエピトープタグを持つポリペプチドをコードしている。NifDバリエーションのこのセット (NifD-Var15~36と名づける) における置換は表10に掲載されており、代表的なウエスタンブロットは図9に示されている。

【0864】

これら19種類の個々の遺伝子コンストラクト (SN108~SN126) (それぞれがバリエーションNifD配列の1つをコードする) を*N. benthamiana*の細胞に*A. tumefaciens*を通じて導入し、キメラ遺伝子を発現させるための5日間が経過した後、タンパク質を抽出し、SDS-PAGEと、HA抗体を用いたウエスタンブロッティングを実施した。以前にしたのと同様、MTP-Su9::NifKをコードする遺伝子コンストラクトSN46を各NifDバリエーションと同時に浸透させてNifD蓄積のレベルを増大させた。ウエスタンブロットのデータから、3つのグループのバリエーションが観察された。すなわち、(1) 野生型NifD配列を含むSN10で得られたのと同じバンドパターンを示したグループ、すなわちSN108、SN109、SN111~113、SN115、SN116、およびSN121。これらに関しては、MPPによるプロセッシングを受けたNifD (一次切断) に対する48 kDaのバンドの強度の比はSN10での比と実質的に同じであった。これは、二次切断がアミノ酸置換によって影響されなかったことを示している。

(2) 48 kDaの産物を示したが、MPPによるプロセッシングを受けたNifDに対する48 kDaのバンドの強度の比はSN10での比と比べて顕著に小さかったグループ (SN110、SN122、およびSN123)。(3) 1~3個の特定のアミノ酸置換によって48 kDaの二次切断/分

10

20

30

40

50

解産物を示さなかった、すなわち二次切断がないか、検出されない程度に減少したバリエーション (SN114、SN117、SN118、SN119、SN120、SN124、SN125、およびSN126)。最も注目すべきは、この最後のセットの2つ、すなわち (SN114によってコードされる) Y100Q置換を持つNifD-Var21と、Y100K置換を持つNifD-Var29 (SN119) が単一アミノ酸置換を持ち、SN117によってコードされる別のバリエーションVar24は2アミノ酸置換YY100-101QTを持っていたことである。これらの特定のアミノ酸置換がこの効果を持っていたということは、おそらく以前には予想することができなかったであろう。

【0865】

バリエーションのこのセットから、98位のアルギニンの置換だけが二次切断を阻止しなかったように見えた (NifD-Var 19とVar 32)。同様に、99位のアスパラギン (NifD-Var 20)、101位のチロシン (NifD-Var 15とVar 22)、102位のトレオニン (NifD-Var 16とVar 23) の単一アミノ酸置換、または101~103位の2つまたは3つの置換だけだと二次切断を阻止しなかった。しかし100位にチロシンを含む調べた単一の、2つの、または3つの置換 (NifD-Var 21、24、26、29、および30) はすべて、NifDの二次切断を無効にした。切断は、100位にチロシンを含まないアミノ酸の2つまたは3つの置換 (NifD-Var 34、35、および36) によっても無効にされた。二次切断に対して抵抗性であったアミノ酸位置98~102から選択された位置にアミノ酸置換を持つ多数のバリエーションを例えばここに例示したアプローチを通じて容易に同定できることは明らかであった。

【0866】

酵母におけるMTP::NifDの二次切断の無効化

【0867】

植物ミトコンドリアにおけるのと同様、MTP::NifD融合ポリペプチドの切断は酵母細胞内の同じ領域で起こったという実施例6のデータがあるため、Y100Q置換を有するバリエーションを酵母ミトコンドリアで調べた。この目的で、SN114 (MTP-FA γ 51::NifD(Y100Q)::HA) からのタンパク質コード領域をPCRによって増幅して隣接するKpnIとSacI制限酵素部位を提供し、これらを用いて遺伝子を酵母発現ベクターpYES2の中に挿入した。酵母で発現させるためのこのコンストラクトをSNY114と名づけた。SNY114を含有する酵母形質転換体からタンパク質抽出液を取得し、ウエスタンブロッティングによって分析した。注目すべきことに、SNY114を含有する細胞からの抽出液は、植物細胞の中でNifD-Var 29コンストラクトと同じサイズの強いバンドを生じさせ、はるかに少ない量の二次切断が起こった。これは、酵母の中で発現させたときに強い48 kDaの切断／分解産物を産生した野生型NifD配列を用いた図8の結果とは大きく異なっていた。SNY114からは他のサイズのいくつかのタンパク質バンドが観察されたが、それらは、MPPによるプロセッシングを受けた望むMTP::NifD::HAポリペプチドに対応する優勢な完全長バンドよりも弱かった。配列番号18を参照してNifDの98~102位 (例えば100位) にアミノ酸置換が含まれているとき、植物ミトコンドリアにおけるのと同様、完全長の正しくプロセッシングを受けたNifDポリペプチドが酵母ミトコンドリアにおいて優勢なMTP::NifDポリペプチドとして発現することが結論された。

【0868】

10

20

30

40

50

【表 9】

表9：FA γ 51-NifD融合ポリペプチドのアラニン置換バリエーションと、植物細胞における二次切断／分解に対する効果

バリエーション	コンストラクトの番号	野生型配列	改変された配列	配列番号18における位置	二次切断の効率
1	SN52	SNRKS (配列番号 62)	AAAAA (配列番号 63)	49～53	++
2	SN53	QPGVM (配列番号 64)	AAAAA (配列番号 63)	54～58	++
3	SN54	TVRGC (配列番号 65)	AAAAA (配列番号 63)	59～63	++
4	SN55	AYAGS (配列番号 66)	GAGAA (配列番号 67)	64～68	++
5	SN56	KGVVVF (配列番号 68)	AAAAA (配列番号 63)	69～73	++
6	SN57	GPIKD (配列番号 69)	AAAAA (配列番号 63)	74～78	++
7	SN58	TVRGCAYAGS (配列番号 70)	TARACGYGGS (配列番号 71)	59～68	++
8	SN59	AYAG (配列番号 72)	GAGG (配列番号 73)	64～67	++
9	SN96	MAHIS (配列番号 74)	AGAAA (配列番号 75)	79～83	++
10	SN97	HGPVG (配列番号 76)	AAAAA (配列番号 63)	84～88	++
11	SN98	CGQYS (配列番号 77)	AAAAA (配列番号 63)	89～93	++
12	SN99	RAGRR (配列番号 78)	AGAAA (配列番号 75)	94～98	+
13	SN100	NYYTG (配列番号 79)	AAAAA (配列番号 63)	99～103	-
14	SN101	VSGVD (配列番号 80)	AAAAA (配列番号 63)	104～108	++

【0869】

10

20

30

40

50

【表 10】

表10：FA γ 51-NifD融合ポリペプチドのアミノ酸置換バリエーションの第2のセットと、ARA細菌アッセイにおける二次切断／分解に対する効果と機能に対する影響。野生型配列RAGRRNYT_G（配列番号61）を、示されている改変された配列で置き換えた。Nt＝試験せず。

バリエーション	コンストラクトの番号	改変された配列	二次切断の効率	NifD 機能
15	SN108	RAGRRNYFTG（配列番号 81）	++	Nt
16	SN109	RAGRRNYAG（配列番号 82）	++	Nt
17	SN110	RAGRRNYFAG（配列番号 83）	+	Nt
18	SN111	RAGRRNYAA（配列番号 84）	++	Nt
19	SN112	RAGRANYTG（配列番号 85）	++	Nt
20	SN113	RAGRRHYTG（配列番号 86）	++	Nt
21	SN114	RAGRRNQYT _G （配列番号 87）	－	147%
22	SN115	RAGRRNYTTG（配列番号 88）	++	Nt
23	SN116	RAGRRNYV _G （配列番号 89）	++	Nt
24	SN117	RAGRRNQTTG（配列番号 90）	－	107%
26	SN118	RAGRRHKGT _G （配列番号 91）	－	33%
29	SN119	RAGRRNKYT _G （配列番号 92）	－	94%
30	SN120	RAGRRNKAT _G （配列番号 93）	－	67%
31	SN121	RAGRRNYAT _G （配列番号 94）	++	Nt
32	SN122	RAGRKNYYTG（配列番号 95）	+	Nt
33	SN123	RAGRKNYFTG（配列番号 96）	+	4%
34	SN124	RAGRKNYYAG（配列番号 97）	－	1%
35	SN125	RAGRKNYFAG（配列番号 98）	－	2%
36	SN126	RAGRKNYAA _G （配列番号 99）	－	Nt

【0870】

質量分析による二次切断部位の実証

【0871】

4～20%の濃度のポリアクリルアミドを有するゲル（Invitrogen社）を用い、SN14（MTP-Su9::NifD::HA）を浸透させた*N. benthamiana*の葉からのタンパク質抽出液をSDS-PAGEで走らせた。このゲルをAqua染色（Bulldog Bio社）で染色した。水中で脱染色した後、分子量が37～50 kDaにわたる領域を探してゲルから5つの切片を切り出した。これらの切片に、小さな分子量から大きな分子量へと1～5の番号を付けた。各ゲル切片を約1 mm³に切断し、150 μ lの30%メタノールに15分間浸した。酸化した可能性のあるタンパク質を減らすため、バッファを除去し、5 μ lの15%ジチオトレイトールを含む100 μ lの新鮮な25 mM重炭酸アンモニウム（ABC）で置き換え、室温で1時間インキュベートした。5 μ lの40%アクリルアミドを添加することによってシステイン残基を不活化し、室温で1時間インキュベートした後、バッファを注意深く除去した。3回の洗浄工程（それぞれ、50 μ lのABCバッファと50 μ lのアセトニトリル）を実施した後、室温でインキュベートした。100 μ lの100%アセトニトリルを添加することによってゲル切片を2分間乾燥させた後、そのアセトニトリルを廃棄した。その後、乾燥したゲル切片の中のタンパク質を、20 μ lのABCの中の0.1 μ gのトリプシン（Promega社）を用いて37℃で一晩インキュベートすることによって消化させた。1 μ lの50%(v/v)ギ酸溶液でトリプシン消化を停止させ、15分間超音波処理した。10 μ lの水を添加した後にサンプルを濾過し、LCMSバイアルに移した。

【0872】

各ゲル切片から得られたトリプシン消化物を、Orbitrap Fusion Tribrid Mass Spectrometerに直接接続されたDionex Nanomate 3000（ThermoFisher社）ナノ液体クロマトグラフィ（LC）システムに注入した。ペプチドを、Acclaim PepMap C18（300オングストローム、5 mm×300 μ m）捕獲カラムで、溶媒をロードしながら10 μ l/分の流

速で5分間脱塩した後、Acclaim PepMap C18（100オングストローム、150 mm×0.075 mm）カラムで35℃にて0.3 µl/分の流速で分離した。5%から40%まで60分間かける溶媒Bの線形勾配を利用した後、40～99%Bを用いて5分間にわたって洗浄して再平衡させ、99%Bで5分間保持し、6分間かけて5%Bに戻し、7分間保持した。使用した溶媒は、（A）0.1%ギ酸、99.9%水；（B）0.08%ギ酸、80%アセトニトリル、19.92%水であった。ナノLCをOrbitrap Fusion MSのNanospray Flex Ion源に直接カップルさせた。イオンプレートの電圧は2400 Vに設定し、掃引ガスは1 Arbに設定し、イオン輸送管の温度は300℃に設定した。データは、Orbitrap-MS探索走査からなるデータ依存的取得モードで取得し、その後、3秒の期間にわたる120,000分解能での高分解能Orbitrap走査と線形イオントラップにおける多重MS/MSイベントの並列取得を続けた。初段MS分析は、陽イオンモードで質量範囲をm/z 400～1500、AGC標的を 4×10^5 、最大注入時間を50ミリ秒にして実施した。タンデム質量スペクトルを、イオントラップで、強度閾値が電荷状態2～7で1000カウントを超えた前駆イオンについて取得した。スペクトルは、1.6 m/z分離ウィンドウでの四重極分離と、最適なペプチド断片化のための前駆イオンのサイズおよび電荷に基づいて28%に設定した（高エネルギー衝突解離）HDCを利用して取得した。イオントラップの走査速度は速いに設定し、AGC標的を 4×10^3 、最大注入時間を300ミリ秒とし、装置は最大並列化時間を利用する設定にすることで、3秒間のウィンドウの間にトラップにイオンを注入しつつ、Orbitrapが高分解能MSスペクトルを回収していた。ダイナミックエクスクルージョンは、1回の発生後に15秒間隔かつ10 ppmの質量誤差で前駆イオンを除外する設定にした。

【0873】

Proteome Discoverer v2.2（ThermoFisher社）の中Sequestアルゴリズムを利用して、タンパク質を同定するための分析を実施した。アルキル化剤としてカルバミドメチルを選択し、消化酵素としてトリプシンを選択した。NifD上の酸化に関して最大で3つの改変を伴う動的改変を選択した。SN14と*N. benthamiana*プロテオームによってコードされる融合ポリペプチドアミノ酸配列に由来するNifDに関するトリプシンペプチドのデータベース、一般的な汚染物、およびUniProtからの注釈付き生物特異的データベースでタンデム質量分析データを検索した。Proteome Discovererソフトウェア内の内蔵FDRツールによって決められた1%全偽発見率（FDR）を用いてデータベース検索の結果を精選することにより、タンパク質同定が得られた。

【0874】

質量分析した5つのサンプルのうち、分子量が最大のゲル切片からのサンプルであるサンプル5ではNifDペプチドが同定されなかった。それとは対照的に、他のサンプル1～4ではNifDペプチドが同定された。最大のカバー率はサンプル2であり、2番目に低いバンドがゲルから切除され、NifD配列に由来する17個の特別なトリプシンペプチドがそのサンプルの中で同定された。6～11個の特別なNifDペプチドがサンプル1、3、および4で同定された。重要なことだが、ペプチドYYTGVSGVDSFGTLNFTSDFQER（配列番号100）がサンプル2の中で正しく同定された。そのペプチドに関するXCorrスコアは十分に大きく、事後エラー確率（PEP）スコアは十分に低いため、同定が正しいことが確認された。これは、そのペプチド断片イオンが、似たサイズだが異なるペプチドの産物ではなかったことを示している。このペプチドは、分析において、植物細胞の中でNifD配列の特別な切断がRRNY配列（配列番号101）内のアスパラギン（N）残基とチロシン（Y）残基の間で起こった後、トリプシン消化されたことによってSN14から生じたはずであると結論された。このMS分析による切断部位の正しい同定は、上記の変異アプローチと完全に一致していた。

【0875】

実施例8：二次切断部位の周囲のNifDの系統発生分析

【0876】

NifDポリペプチドを含むニトロゲナーゼ酵素は多くの細菌と古細菌門の中で自然に産生される。非常に広い範囲の細菌供給源と古細菌供給源からの1751個の天然NifDアミノ酸

配列のセットをInterProデータベースから2018年12月12日に取り出した。これら配列のすべてが、ニトロゲナーゼモリブデン-鉄タンパク質アルファ鎖として定義されるファミリーIPR005972のメンバーとして掲載されており、これらはすべて、モリブデン-鉄型のNifDポリペプチドである。これらの配列は21の異なる門に由来するものであった。配列の大半はプロテオバクテリア（63.0%）に由来し、フィルミクテス（12.3%）とシアノバクテリア（12.3%）が続いた。メンバーがより少ない他のものは、アクチノバクテリア、アクウフェクス、バクテロイデス、カンディダートゥス・マルグリシバクテリア、カンディダートゥス・スメラエオータ、クロロビウム、クロロフレクサス、脊索動物、クリシオゲネス、デフェリバクター、エルシミクロビウム、ユーリ古細菌、フソバクテリウム、レンティスファエラ、ニトロスピラ、プランクトミケス、スピロヘータ、およびウェルコミクロビウムという門に由来した。

10

【0877】

1751個の配列のセットは、275個の重複した配列を含有していた。重複した配列を除くと、1476個の独自の配列のセットが得られた。これらを調べてK. oxytocaのRAGRNYTGTG配列（配列番号61）に対応する位置におけるアミノ酸配列の多様性を理解した。これらの配列を、FFT-NS-2戦略を利用して多重配列アラインメントプログラムMafftバージョン7をデフォルトパラメータ（すなわちデフォルトの「早くて進歩的な」設定（Katoh他、2013年））で用いてアラインメントさせた。アラインメントされた配列を、ALVISソフトウェア（多重配列アラインメントの対話型非凝集式可視化と探索的分析）（Schwarz他、2016年）を用いて可視化した。NifD配列は長さが362～592残基であった。多重配列アラインメント（「メガアラインメント」）は、アラインメントプログラムに導入された個々の配列に存在する多数のギャップを考慮すると、907個の位置を含有していた。メガアラインメントでは、提案された二次切断部位は、K. oxytoca配列（配列番号18）の残基97～102に対応する270～275位に見いだされた。K. oxytocaのアミノ酸94～103（RAGRNYTGTG；配列番号61）と同じ10個のアミノ酸からなる配列を含有する68個の配列が同定された。

20

【0878】

タンパク質類似性ネットワークをInterProファミリーIPR005972の1476個のメンバーについて生成させた。これは、異なる門の窒素固定菌からの関連する配列のクラスターを示す。代表的な配列を異なるクラスターから選択し（表11）、K. oxytoca HifD配列のアミノ酸49～108に対応する領域でアラインメントさせた。この領域のアラインメントが図10に示されている。高度の配列保存が見られ、その中には、完全に保存された19個のアミノ酸と、高度に保存された他の多くのものが含まれていた。図10には示されていないが、Desulfotomaculum ferrireducens、Halanaerobium saccharolyticum、Clostridium ljungdahlii、Methanosarcina barkeri、Desulfovibrio vulgaris、およびChlorobium tepidumからの配列と、これらのクラスター内の関係する配列は、さらにC末端に向かう50～60個の残基挿入を含有していたため、NifD配列のサブグループを形成する。

30

【0879】

予想される二次切断部位の周囲の位置としてRRNというアミノ酸の直後の-3、-2、-1、+1、+2、および+3を取り、残基の頻度分布を計算した（表12）。位置-3のアルギニン（R）は、セットに含まれていて位置-3と-2の両方に「ギャップ」を示した2つの配列を除いて完全に保存されていた。しかしこれら2つの配列はほんの断片であり、完全なNifD配列（A0A2N4YT47 - Klebsiella variicola、A0A2N5A8Y2 - Klebsiella variicola）ではなく不確実であったため、さらなる分析から除外することができた。位置-2のアルギニンはほぼ完全に保存されていた。その位置にアルギニン以外の残基を含有していたのは1476個のうちで2つの配列だけであった。すなわち、Paenibacillus fujiensis（B9X2A1）からのNifDはシステイン残基を含有し、Alcaligenes faecalis（Q44045）からのNifDはグリシン残基を含有していた。これらの配列がNifDに関して活性であるかどうかは知られていなかった。アスパラギン（N）は1476個の配列の97.83%に存在していて位置-1で高度に保存されていた。1476個の配列の約1.9%が、その位置にヒスチジン、フェニル

40

50

アラニン、アラニン、またはセリン残基をアスパラギンの代わりに含有していた。位置+1に最も多い残基はチロシン（Y、71.54%）であり、その後にグルタミン、ロイシン、およびリシンが続き、これら3つのそれぞれは、頻度が7~11%の範囲であった。チロシン以外のこれらアミノ酸の1つをその位置に持つ天然のNifD配列はかなり多く存在していたため、+1の位置にあるこれらアミノ酸はNifD活性を提供すると結論された。フェニルアラニン、メチオニン、およびグルタミン酸もその位置により低い頻度で存在していた。位置+2の最も頻度の多い残基はチロシン（64.43%）であり、その後にアラニンとトレオニンが、次いで他の6つのアミノ酸の任意のものがより低い頻度で続いた。再度、位置+2のこれらアミノ酸はNifD活性を提供すると結論された。+3の位置の最も頻度の大きい残基はバリン（V、27.24%）であり、その後にイソロイシン、トレオニン、およびリシンが、次いで他の11のアミノ酸の任意のものが続いた。明らかに、*K. oxytoca* HifD配列の残基97~102に対応する6つの位置にあるアミノ酸の保存の程度は、その配列に沿って、NifD機能にとって不可欠であると考えられる2つのアルギニンから、広い変動性を示した位置+3へと低下した。

【0880】

次に、1474個のNifDアミノ酸配列（上に言及した2つの部分配列は除く）で、配列番号18のアミノ酸97~101に対応する位置にRRNY（配列番号101）が、さらに特定するならば配列RRNYY（配列番号102）の中のRRNY（配列番号101）が存在するかどうかを調べた。RRNY（配列番号101）を含む1045個の配列（70.90%）が存在しており、そのうちの935個の配列が配列番号18のアミノ酸97~101に対応するRRNYY（配列番号102）を含んでいた。上に記載した二次切断のデータに基づき、配列RRNY（配列番号101）を持つ1045個の天然のNifDポリペプチドは、真核細胞のミトコンドリアに入るとその配列内で二次切断を受けると考えられるのに対し、配列RRNX（配列番号154）を持つNifDポリペプチド（ただしXはチロシン（Y）以外の任意のアミノ酸である）は、その配列内で二次切断をより受けにくいと考えられると結論された。したがってこれらのNifD配列は、その二次切断の傾向に基づくとは好ましくなかった。それとは対照的に、*K. oxytoca* NifD（配列番号18）のY100に対応する位置にチロシン（Y）以外の任意のアミノ酸を含むNifD配列は、真核細胞のミトコンドリアに導入されると切断に対して抵抗性である可能性が大きかったことに基づくとは、好ましかった。このような配列が、植物細胞の中でMTP-NifD融合ポリペプチドとして発現したときこの領域内での切断に対して抵抗性あることを調べて確認するのは容易である。

【0881】

1474個の配列をさらに調べると、RRNQ（配列番号103）を持つ155個の配列（10.51%）と、RRNK（配列番号104）を持つ95個の配列が存在しており、その両方とも、二次切断の対象とは見なされておらず、したがって4番目の位置にグルタミンまたはリシンを持たない配列よりも好ましかった。これらのNifDポリペプチドは、配列RRNF（配列番号220）を持つNifDポリペプチドよりも好ましいと見なされた。そこでRRNQ（配列番号103）を含む155個のNifD配列のうちの141個は、その直後にトレオニン（T）を持つこと、すなわち配列RRNQT（配列番号105）を含むことが注目された。配列RRNQT（配列番号105）を含むVar24（SN117）によってコードされるポリペプチドはその位置で切断されず、その配列は天然のNifDポリペプチドで比較的頻度が多いことに基づき、配列RRNQT（配列番号105）を含むNifDポリペプチドは、真核細胞のミトコンドリアで使用する

【0882】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表11：広い範囲の窒素固定生物からの代表的なNifD配列

UniProt アク セッション	生物	長さ	門
AOA1S6IX91	<i>Desulfotomaculum ferrireducens</i>	539	フィルミクテス
Q1K0I7	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (株 DSM 6 84 / 11070)	480	プロテオバクテリア
G6E9A1	<i>Geobacter</i> sp. (株 M21)	480	プロテオバクテリア
B0TAP4	<i>Heliobacterium modesticaldum</i> (株 ATC C 51547 / Ice1)	486	フィルミクテス
Q0RAV5	<i>Frankia alni</i> (株 ACN14a)	486	放線菌
AOA089HSS3	<i>Paenibacillus durus</i> (<i>Paenibacillus</i> <i>azotofixans</i>)	485	フィルミクテス
AOA166T5M1	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 20041	481	シアノバクテリア
P00464	<i>Nostoc</i> sp. (株 PCC 7120 / SAG 25. 82 / UTEX 2576)	497	シアノバクテリア
AOA060DN91	<i>Azospirillum brasilense</i>	479	プロテオバクテリア
P19066	<i>Sinorhizobium fredii</i> (株 NBRC 101917 / NGR234)	504	プロテオバクテリア
C1DGZ7	<i>Azotobacter vinelandii</i> (株 DJ / ATCC BAA-1303)	492	プロテオバクテリア
AOA378D475	<i>Klebsiella oxytoca</i>	483	プロテオバクテリア
AOA2J8I7Q6	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	488	プロテオバクテリア
AOA1D7TJ51	<i>Sulfurospirillum halorespirans</i> DSM 13726	484	プロテオバクテリア
E4TZQ3	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> (株 ATCC BAA- 921 / DSM 16994 / JCM 11577 / YK-1)	489	プロテオバクテリア
B8DR77	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (株 Miyazaki F / DSM 19637)	544	プロテオバクテリア
AOA0E3R6R4	<i>Methanosarcina barkeri</i> 227	532	ユーリ古細菌
AOA0W1JIT9	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> (<i>Desul</i> <i>fitobacterium frappieri</i>)	493	フィルミクテス
Q8KC89	<i>Chlorobaculum tepidum</i> (株 ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS) (<i>Chlorobium tepidum</i>)	543	クロロビウム
AOA327XSU0	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i>	539	フィルミクテス
AOA162KU04	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	536	フィルミクテス

【 0 8 8 3】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表12：1476個の天然NifD配列の中の二次切断部位周辺のアミノ酸残基の頻度分布

<i>K. oxytoca</i> のアミノ酸	R97	R98	N99	Y100	Y101	T102
切断部位に 対する位置	-3	-2	-1	1	2	3
最も一般的	R, 1474 (99.86%)	R, 1472 (99.73%)	N, 1444 (97.83%)	Y, 1056 (71.54%)	Y, 951 (64.43%)	V, 402 (27.24%)
2番目に 一般的	ギャップ, 2 (0.14%)	ギャップ, 2 (0.14%)	H, 17 (1.15%)	Q, 159 (10.77%)	A, 240 (16.26%)	I, 374 (25.34%)
3番目に 一般的		C, 1 (0.07%)	F, 7 (0.47%)	L, 114 (7.72%)	T, 148 (10.03%)	T, 147 (9.97%)
4番目に 一般的		G, 1 (0.07%)	A, 3 (0.20%)	K, 108 (7.32%)	M, 44 (2.98%)	K, 135 (9.15%)
5番目に 一般的			X, 2 (0.14%) *	F, 27 (1.83%)	F, 38 (2.57%)	R, 113 (7.66%)
6番目に 一般的			ギャップ, 2 (0.14%)	M, 10 (0.68%)	G, 27 (1.83%)	N, 96 (6.50%)
7番目に 一般的			S, 1 (0.07%)	E, 1 (0.07%)	S, 14 (0.95%)	D, 68 (4.61%)
8番目に 一般的				ギャップ, 1 (0.07%)	V, 12 (0.81%)	S 40 (2.71%)
9番目に 一般的					N, 1 (0.07%)	E, 27 (1.83%)
10番目に 一般的					ギャップ, 1 (0.07%)	Q, 23 (1.56%)
11番目に 一般的						L, 20 (1.36%)
12番目に 一般的						A, 12 (0.81%)
13番目に 一般的						H, 9 (0.61%)
14番目に 一般的						M, 8 (0.54%)
15番目に 一般的						Y, 2 (0.14%)

* 「X」は、*Methylocella palustris* (Q6KCQ3) と *Methylosinus trichosporium* (Q6KCQ2) の配列の中に存在する未知のアミノ酸を意味する

【0884】

実施例9：二次切断部位周辺でのNifDバリエーションの機能試験

【0885】

残基99と100の間の想定部位における切断を示さなかったMTP-FA γ 51::NifDバリエーションのNifD機能を大腸菌内のMIT2.1系の中で以下のようにして調べた。アミノ酸置換をコードする変異をpMIT2.1の中のNifD遺伝子に導入するため、そしてクローニングをより容易にするため、酵素AgeIとSalIのための制限部位を、アミノ酸変化に関する部位に広げる

NifDコード領域に導入した。これは、PCRを媒介とした突然変異誘発により、pTopoH-JコンストラクトのNifD遺伝子にAgeIを挿入するための5'-CTAATGCTACCGGTGAACGTAACCTGGCACTGATTCAAGAAGTACTGGAAGTGTTTC-3'（配列番号108）と5'-GTTACGTTACCGGTAGCATTAGTCATCATCCGG CTCCTCCGCTAGATAAAAAATGTG-3'（配列番号109）、およびSallを挿入するための5'-GTTTCTGGCGTCGACTCTTTCGGCACGCTGAACCTCACCTCTGACTTCCAGGAAC-3'（配列番号110）と5'-CGAAAGAGTCGACGCCAGAAACGCCCGTGTAGTAGTTA CGACGTCCCGCGCG-3'（配列番号111）というオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いてなされた（実施例4）。このAgeIからSallへの断片は、*N. benthamiana*での発現のためにコドンが最適化された。得られたベクターをSbfIで消化させ、SbfIで消化させたB-oriと連結し、野生型NifDと他のNifポリペプチドをコードするpSO043と名づけた陽性対照ベクターを創出した。

【0886】

アミノ酸置換のそれぞれを含有するNifDのAgeI-Sall領域をPCRによって増幅し、pSO043と同じ位置にAgeI制限部位とSall制限部位を付加した。そのために用いたのは、プライマー5'-GACCAATGCTACCGGTGAGAGGAACC-3'（配列番号112）および5'-GTAAAGAGTCCCGAAAGAGTCGACACCAG-3'（配列番号113）と、鋳型としてのコンストラクトSN114、SN118、SN119、SN120、SN123、SN124、およびSN125からのDNAであり、それぞれのコンストラクトは異なるバリエーションNifD配列をコードしていた。次に、増幅されたAgeI-Sall NifDバリエーション断片をpSO043に連結してAgeIとSallで消化させると一連のコンストラクトが得られ、それらをpSO044~050と名づけた。得られたこれらのコンストラクトは、植物細胞の中での発現のために最適化されたAgeI-Sall領域を含有していたのに対し、NifD遺伝子の残部は大腸菌の中での発現のために最適化されていた。SN100（5個のアラニン残基で置換されたアミノ酸残基99と103を持つNifD-Var13）と、*N. benthamiana*コドン最適化NifD遺伝子を持つEC38014をDNA鋳型として用いて別の2つのNifDベクターも同様のやり方で構成すると、pSO052とpSO053がそれぞれ得られた。

【0887】

バリエーションNifD遺伝子を持つ細菌発現コンストラクトを発現誘導ベクターpN249とともに大腸菌JM109の中に導入し、アセチレン還元アッセイ（ARA）を利用してニトロゲナーゼ機能を調べた。細菌を、pSO053（陽性対照、野生型NifD）と、pSO052（残基99~103のアラニン置換）、pSO044（Y100Q）、pSO045（NYY99-101HKG）、pSO046（Y100K）、およびpSO047（YY100-101KA）によってコードされるNifDバリエーションで同時形質転換すると、それぞれがある程度エチレンを発生させた。pSO044、pSO045、pSO046、およびpSO047によって発生したエチレンの量は、それぞれ、陽性対照と比べて147%、33%、94%、および67%であった。pSO052も陽性対照の14%のエチレンを発生させた。しかしpSO048、pSO049、およびpSO050を含有する大腸菌細胞は、すべてが置換R98Kを含んでおり、陰性対照よりも大きな速度で痕跡量のエチレンしか発生させなかった。これは、これらNifD変異体がニトロゲナーゼに関してほとんど不活性であったことを示している。同様に、YY100-101QT二重置換を有するコンストラクトは、野生型NifD対照と比べて107%のARA活性を生じさせた（表10）。したがってY100Q置換とYY100-101QT置換の両方とも、野生型NifD配列と比べて増大したNifD活性を生じさせた。NifD機能には98位のアルギニンが必要であると結論された。これは、活性であると推定できる天然のNifD配列にそれが完全に保存されていることと整合する。

【0888】

より一般に、実質的にNifD機能を維持しているNifDバリエーションが同定され、いくつかのバリエーションでは、実際には完全な、それどころか増大したNifD機能が保持されていて、これらは野生型*K. oxytoca* NifD配列で観察された二次切断を受けなかったと結論された。植物ミトコンドリアの中でのNifDポリペプチドの二次切断に対する抵抗性は、増大したニトロゲナーゼ活性（後者は、細菌系において改変されたNifD配列で実証された）と組み合わせ可能であることも結論された。二次切断を受けていないがNifD機能を喪失した他のNi

fDバリエーションを同定できることも結論された。

【0889】

実施例10：他のNifDポリペプチド

【0890】

NifDにおける二次切断部位周辺のNifD-NifK構造のモデル化

【0891】

PDBに提供されている*K. oxytoca*からのNifDポリペプチドのタンパク質構造1QGUを、PyMOL ソフトウェアを用い、特にNifDが*K. oxytoca*からのNifKポリペプチドに結合したときの二次切断部位の周辺の構造に注目して可視化した。二次切断部位は、複合体の内部にあって重要な補因子FeMocoに近接しているNifDポリペプチドとNifKポリペプチドの界面に位置することが観察された（図11）。静止状態では、NifDのArg97が、FeMocoのFe3とFe7の間に位置する架橋スルフィドリガンド（S5）に配位していたため、なぜArg97が機能的NifDポリペプチドにおいて完全に保存されているかが説明された。それは、クラスター（Fe1-Fe3-Fe7）のより還元された縁部の負電荷を確立する上で重要な役割を果たしていると考えられた（Spatzal他、2016年）。NifDの中のTyr100のヒドロキシル基が、*K. oxytoca*からのNifDの中のArg98のアミノ基、NifKの中のSer515のヒドロキシル基、およびNifKの中のAsp517のカルボキシ基と水素結合を形成した。これも、NifD機能にとってのその重要性を示している。

【0892】

Y100Q置換とY100K 置換を持つNifDバリエーションに関する相同性モデルを、SWISS-MODELサーバー（Waterhouse他、2018年）を利用して準備した。NifD Y100QまたはNifD Y100Kの配列を標的配列として使用した。*K. oxytoca*からのNifKの配列をヘテロ標的としてモデルに再び追加した。Y100Qバリエーションについては、このモデルは、NifDポリペプチドのGln100のアミノ基が、NifKの中のAsp517のカルボキシ基およびNifKの中のTyr514の骨格カルボニル酸素原子と水素結合を形成することを予測した。Y100Kバリエーションについては、このモデルは、Lys100のアミノ基もNifKの中のAsp517およびTyr514と水素結合を形成することを予測した。NifKの中のTyr100とSer515の相互作用は、Gln100またはLys100とNifKの中のTyr514の骨格酸素原子の相互作用に置き換えられた。これらの観察結果は、Y100Q置換とY100K 置換でNifD活性が保持されていることと整合していた。

【0893】

(i) 二次切断部位の周辺の配列が、NifDポリペプチドが折り畳まれてその活性な立体配座になるときにこのポリペプチドの内部にあったという観察結果と、(ii) 野生型*K. oxytoca* NifD配列を含むNifD-リンカー-NifKポリペプチドが切断されたという観察結果は、二次切断が、ミトコンドリアの中でポリペプチドが広げられた状態であった間に、または広げられつつあったときに起こっていたことを示唆していた。

【0894】

上記の系統発生分析（実施例8）は、アミノ酸残基ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、およびグルタミン酸も天然のNifDポリペプチドの中で*K. oxytoca* NifDのY100に対応する位置（すなわち二次切断位置に対して+1の位置）に現われることを示しているため、これらのNifDポリペプチドは機能的であると推測された。これらのポリペプチドでは、アミノ酸100に対応する位置のアミノ酸Leuの後の101位に、アラニン（53個の配列）、メチオニン（41個の配列）、バリン（10個の配列）、トレオニン（4つの配列）、フェニルアラニン（4つの配列）、またはトレオニン（2つの配列）が続いた。100位に対応するアミノ酸がPheであったときには、次のアミノ酸は通常はアラニン（23個の配列）であり、いくつかの場合にはセリン（2つの配列）またはチロシン（2つの配列）であった。100位のMetの後には、アラニン（3つの配列）、メチオニン（3つの配列）、グリシン（2つの配列）、バリン（1つの配列）、またはトレオニンが続いた。100位のGluの後にはトレオニン（1つの配列）が続いた。しかし100位のPhe、Leu、またはMetの存在は、*K. oxytoca*からのNifK においてY100がアミノ酸Ser515およびAsp517との間に持ってい

た水素結合を提供しないと考えられる。

【0895】

機能を調べるため、*K. oxytoca*のNifD配列に対して上記の置換と同様にして実現した置換Y100L、Y100F、およびY100Mを含む遺伝子コンストラクトを作製した。pMIT2.1系を使用し、実施例8に記載されているのと同様にして、NifDバリエーションをコードするこれらコンストラクトで、*N. benthamiana*の葉細胞に導入した後の二次切断の表現型と、大腸菌の中でのNifD機能を調べた。置換Y100L、Y100F、およびY100Mを持つこれらNifDポリペプチドの3つすべてが、相変わらず二次切断の対象であった。これは、その部位のアミノ酸配列が植物ミトコンドリアの中のMPPによって相変わらず認識されたことを示している。100位における他の14通りの可能な置換は、同様のやり方で容易に調べられる。

10

【0896】

切断に関する天然NifD配列の予測と検証

【0897】

変異分析と系統発生分析に基づき、異なる天然NifD配列について、これらの配列が*K. oxytoca*のNifD（配列番号18）のアミノ酸97～102に対応する領域において切断されるか、切断されないか、またはより少なく切断されるかを予測した。これらの予測を検証するため、切断されると予測されるRRNYY配列（配列番号102）を持つメンバーを最も多く含むNifD配列の3つのクラスターのそれぞれから1つの配列を選択した。選択されたこれらNifD配列は、*Azotobacter vinelandii*、*Azospirillum brasilense*、および*Sinorhizobium fredii*からのものであった。これらの配列は配列番号148～150として示される。対応する配列の位置にRRNY配列（配列番号101）を持たず、代わりにRRNQ（配列番号103）、RRNK（配列番号104）、またはRRFK（配列番号106）を持つ他の3つのNifDアミノ酸配列が同定された（表13）。選択されたこれらのNifD配列は、*Clorobium tepidum*、*Desulfotomaculum ferrireducens*、および*Desulfovibrio vulgaris*からのものであり、100位と同等な位置にチロシン残基ではなくグルタミン残基またはリシン残基を含有していた。これらの配列は、配列番号151～153として示される。これら3つのポリペプチドは、これらの配列内でより切断されにくいであろうことが予想された。

20

【0898】

選択されたこれらの配列を、Emboss Needle Pairwise Alignment Tool を用いて*K. oxytoca*配列とアラインメントさせ、一致の程度を求めた。それを表13にも示してある。RRNY配列（配列番号101）を持たない配列番号151～153は、配列番号18との一致が40%未満であることがわかった。

30

【0899】

それぞれの場合の二次切断の程度に関する予測を検証するため、*N. benthamiana*の葉の中に導入するためのMTP-FA γ 51::NifD::HA融合ポリペプチド（その中のNifD配列は天然の配列と同じであった）をコードする遺伝子コンストラクト（SN221～226）を作製した。浸透の5日後にタンパク質抽出液を調製し、SDS-PAGEとウエスタンブロッティングを実施した。*A. vinelandii*と*S. fredii*のNifDからのRRNYY配列（配列番号102）を含む融合ポリペプチドはウエスタンブロットで強い二次切断バンドを生じさせ、ポリペプチドの50%よりもはるかに多くが二次的部位で切断されたのに対し、RRNYY配列（配列番号102）を持たない*D. vulgaris*からのNifDポリペプチドは、二次切断をほとんど示さなかった。*C. tepidum*と*D. ferrireducens*からのポリペプチドはいくらか二次切断を示したが、*A. vinelandii*と*S. fredii*よりも少なかった。

40

【0900】

対照としての遺伝子コンストラクトを含めてこの実験を繰り返した。遺伝子コンストラクトは、MTP-FA γ 51配列におけるアラニン置換を理由として切断されないと考えられる融合ポリペプチド（図12でAと記したレーン）、またはMTP配列を欠くが、代わりに6×Hisモチーフを持つ融合ポリペプチド（Cと記したレーン）をコードしており、MPPによるプロセッシングを受けた形態とサイズが同じであった。ウエスタンブロット分析（図12）は

50

、完全長NifDと二次切断産物の比が、NifD融合ポリペプチドの6つすべてで変動したことを再度示した。Burenら（2017年b）は、酵母ミトコンドリアにおいて、*A. vinelandii* からのNifDの約48 kDaの分解産物を観察した。このポリペプチドのサイズは、RRNYY（配列番号102）部位において予想されるMPPによる二次切断と一致していた。反復実験において、このサイズの分解産物が*A. vinelandii* NifDポリペプチドで観察された。第2の分解産物も約40 kDaの分子量の位置に観察された。これは、第2の隠れた切断部位の存在を示唆している。これら2つの分解産物は、細胞質に局在化した融合ポリペプチド6×His::NifD::HAをコードする遺伝子コンストラクトでは観察されなかった。これは、第2の分解産物もミトコンドリアプロテアーゼ活性から生じたことを示している。植物ミトコンドリアと酵母ミトコンドリアの間でプロセッシングに違いがあることもわかった。植物細胞の中の*A. vinelandii* AvNifD融合ポリペプチドの第2の分解産物の起源を明らかにするにはさらなる研究が必要とされる。

10

【0901】

*A. brasilense*からのNifD配列を含む融合ポリペプチドは、プロセッシングを受けていない形態の中に主に存在していた。これは、AbNifD融合ポリペプチドをミトコンドリアの中に輸送する効率が低かったことを示す。それが理由で、その融合ポリペプチドに関するMPP切断の量を評価することは困難であった。重要なことだが、今回は、*S. fredii*からのSfNifD配列を含む融合ポリペプチドでほんのわずかな分解産物が観察された。

【0902】

MTP51::NifD::HAポリペプチドの相対量は、すべての遺伝子コンストラクトで同じプロモータを用いる場合でさえ大きく変化する。*A. brasilense*、*A. vinelandii*、および*D. vulgaris*からのNifD融合ポリペプチドの量は、*C. tepidum*と*S. fredii*からのNifD融合ポリペプチドと比べて少なかった。

20

【0903】

実施例1に記載されているようにタンパク質抽出液を可溶性分画と不溶性分画に分画することによって実験を拡張した。*C. tepidum*、*D. ferrireducens*、および*S. fredii*からのNifD融合ポリペプチドはある程度可溶性であり、*D. ferrireducens*のNifDについては約50%に達することが観察された。

【0904】

RRNYY配列（配列番号102）を持つ天然NifD配列は、植物ミトコンドリアにおいてその配列内で二次切断が生じる傾向を理由としてより好ましくないが、*S. fredii* NifDなどの例外を見いだすことができると結論された。

30

【0905】

40

50

【表 13】

表13：アミノ酸97～102に対応する配列の位置の野生型NifDポリペプチド配列。配列番号18との%アミノ酸配列一致が示されている。RRNYY配列（配列番号102）を含む最初の3つの配列は切断されると予測されたのに対し、最後の3つの配列はこの領域内で切断されないと予測された。

生物	Genbank アクセッション番号	長さ	%一致	その部位の配列
<i>Azospirillum brasilense</i>	WP_014239785（配列番号 148）	479	69.7	RRNYY （配列番号 102）
<i>Azotobacter vinelandii</i>	WP_012698832（配列番号 149）	492	71.8	RRNYY （配列番号 102）
<i>Sinorhizobium fredii</i>	WP_010875129（配列番号 150）	504	63.8	RRNYY （配列番号 102）
<i>Chlorobium tepidum</i>	WP_010933201（配列番号 151）	543	39.9	RRNQT （配列番号 105）
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	WP_015946243（配列番号 152）	544	35.3	RRNQT （配列番号 105）
<i>Desulfotomaculum ferrireducens</i>	WP_077714465（配列番号 153）	539	38.4	RRNKA （配列番号 107）

【0906】

実施例11：NifD-NifK融合ポリペプチドの文脈におけるNifDバリエーション

【0907】

NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドの文脈におけるNifDのプロセッシングと機能に対するY100Q置換の効果も調べた。そうするため、pMIT2.1ベクターを最初に改変し、それ以外は野生型のNifDコード領域とNifKコード領域に以下のように翻訳融合させた。pMIT2.1の中で別々にNifDポリペプチドとNifKポリペプチドをコードするNifD遺伝子とNifK遺伝子の間のオペロン構造をヌクレオチド配列で置き換え、NifDポリペプチドとNifKポリペプチドがHAエピトープタグ（YPYDVDPYA、配列番号115）を含む30アミノ酸リンカー（ATPPPGSTTTAYPYDVDPYATPPPGSTTTA、配列番号116）によって接合された翻訳融合体を準備した。このNifD::リンカー(HA)::NifKポリペプチドをコードするDNA断片は、NifD::FLAGリンカー::NifKs遺伝子（Allen他、2017年）からのものであったが、FLAGエピトープのアミノ酸をコードするヌクレオチド配列がHAエピトープをコードするヌクレオチド配列で置き換えられて本明細書でpTopoH-J-DHAKと名づけるベクターを形成した点が異なっている。その後、SbfIで消化させたpMIT2.1（NifB-ori）の改変されていない第2の半分を、SbfIで消化させた後のpTopoH-J-DHAKと連結すると、pSO018が得られた。したがってこのコンストラクトは、pMIT2.1におけるようにNifD::リンカー(HA)::NifKと他のNif遺伝子すべての翻訳融合体をコードしており、NifDのアミノ酸配列は野生型*K. oxytoca*配列と比べて改変されていなかった。

【0908】

pTopoH-JとpTopoH-J-DHAKの中のNifDコード領域へのY100Qの導入は、ヌクレオチド置換T298CとC300Aをなすためのプライマー5'-GTCGTAACCAATACACGGGCGTTTCTGGCGTCTCGACTCTTTCTGGCACG-3'（配列番号117）と5'-GCCCCGTGTATTGGTTACGACGTCCCCTCGCGAGAGTACTGGC-3'（配列番号118）を用いた突然変異誘発によって実現され、チロシン（Y）コドンTACがグルタミン（Q）コドンCAAに変化した。融合していない、または融合したNifD（Y100Q）をコードする得られたpTopoH-JベクターをSbfIで

消化させてpSO054 (NifD (Y100Q) をコードする改変されたpMIT2.1であった) とpSO055 (NifD(Y100Q)::リンカー(HA)::NifK翻訳融合ポリペプチドをコードする改変されたpMIT2.1であった) を創出した。

【0909】

これら遺伝子コンストラクトを大腸菌の中でアセチレン還元アッセイによって調べた。pSO054 (融合していないNifD(Y100Q)をコードする) とpSO055 (融合したNifD(Y100Q)::リンカー(HA)::NifKをコードする) は、エチレンを、それぞれの陽性対照pSO005 とpSO018と比べて80%と90%の間で生成させた。これは、Y100Q変異がNifD::リンカー::NifK融合ポリペプチドの文脈でNifD活性を損なわず、活性のほんのわずかな低下であったことを実証した。

【0910】

実施例12：植物ミトコンドリアにおける野生型NifDと配列バリエーションの可溶性

【0911】

実施例3は、ミトコンドリア局在化のためMTP::Nif融合ポリペプチドの形態で発現したNifポリペプチドの多くが、単一のポリペプチドとして発現したとき、実質的に不溶性、またはほんのわずかに可溶性であったことを示す実験を記述している。データは、Nif融合ポリペプチドをミトコンドリアまたはミトコンドリア環境そのものに、またはその両方に向けるプロセスが、細胞質局在化と比べて、少なくともNifD、NifH、およびNifK に関してNifポリペプチドの可溶性に負の影響を与えたことも実証した。ミトコンドリアマトリックス内のニトロゲナーゼタンパク質構成要素の可溶性は真核細胞のミトコンドリア内のニトロゲナーゼの機能的再構成の前提条件であると考えられるため、本発明の発明者らは、Nifポリペプチドの可溶性に関するこれら観察結果の理由を明確にしようとした。特に、NifD、NifH、およびNifKの重要性を考慮し、下に説明するように、これらの決定的に重要なポリペプチドの可溶性を増大させるためのいくつかのアプローチを試験した。ミトコンドリアの中での不溶性は、正しくないタンパク質折り畳み、不適切なグリコシル化または他の翻訳後修飾、凝集体の形成または細胞膜との会合、またはこれらの理由かそれ以外の理由の組み合わせの帰結である可能性がある。

【0912】

NifD融合ポリペプチドの可溶性 - プロモータ配列、MTP配列、およびNifD配列の効果

【0913】

最初に、MTP::NifDポリペプチドを発現する植物のセットで、可溶性を、N末端とC末端の改変が、MPPによるプロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の可溶性に影響を与えることができるかどうかを含めて検証した。この目的で、上記のいくつかのコンストラクトを含むある範囲のMTP::NifDコンストラクトを、*A. tumefaciens*を通じて*N. benthamiana*の葉に浸透させた(表14)。これらのコンストラクトは、発現のためのプロモータ(e35SまたはSCSV S4プロモータ)、またはコードされたMTPまたはNifDポリペプチド配列(二次的部位で切断されるか切断されないか)が異なっていた。これらのすべてが、NifDポリペプチドのC末端に融合されたHAエピトープタグを含有していたが、NifDのN末端とC末端のそれぞれに融合され、したがってNifDポリペプチドに隣接したHAエピトープを持つSN75によってコードされたポリペプチドは別である。可溶性NifDポリペプチドのための陽性対照として、NifDの非ミトコンドリア標的型バージョンをコードする遺伝子コンストラクトSN33(実施例3)も浸透させた。それぞれの場合に、MTP-Su9::NifKをコードするコンストラクトSN46をNifDコンストラクトと同時に浸透させ、NifDの蓄積を増強した。それぞれの浸透について、それぞれの葉スポットからタンパク質を抽出し、実施例1に記載されているようにして可溶性分画と不溶性分画に分画するとともに、いくつかの分画されなかったサンプル(「全タンパク質」)を確保した。SDS-PAGEゲル上の隣り合ったレーンにサンプルをロードし、抗HAを用いたウエスタンブロッティングによってそれらサンプルを分析することにより、MPPによるプロセッシングを受けた、およびプロセッシングを受けていないMTP::NifD::HAポリペプチドとMTP::HA::NifD::HAポリペプチドを検出した。

10

20

30

40

50

【0914】

ウエスタンブロットから、SN33から生成した非ミトコンドリア標的型HA::NifDポリペプチドは、ほぼ完全に可溶性であった（可溶性スコアは4、表14）。それとは対照的に、SN10によってコードされるMTP-FA γ ::NifD::HAポリペプチドと、MPPによるプロセッシングを受けたその誘導体は、可溶性分画の中で検出されないか、ほとんど検出されなかったため、実質的に不溶性であった。SCSV S4プロモータ（SN06）をe35Sプロモータで置き換えることによってプロモータを改変すると、可溶性NifD::HAポリペプチドの量がわずかに増加するように見えた。FA γ 51配列をCPN60配列またはSu9 MTP配列（SN04、SN14）で置き換えることによってMTPを変化させると、NifDの可溶性は顕著に増加しなかった。Y100Qアミノ酸置換をNifDアミノ酸配列に組み込んだとき（SN114）、可溶性のわずかな増加が観察された。これらの改変のどれも、大きな効果を持たなかった。しかしNifDの発現レベルと可溶性の両方における顕著な変化がSN75で発生した。SN75によってコードされる融合ポリペプチド（MTP-FA γ 51とNifD配列の間にHAエピトープタグを含有するほか、第2のC末端HAエピトープタグを含有する）の少なくとも50%が可溶性分画の中に含まれていた。興味深いことに、MTPとNifDの間に位置する異なるN末端エピトープが異なる結果を生じさせた。MTP-CoxIV::TwinStrep::NifD:HAポリペプチド（SN19）をコードするコンストラクトは、ほぼ不溶性のNifDポリペプチドを生じさせた。

10

【0915】

SN75での結果に鑑み、NifKを発現させるため、MTP-FA γ 51（配列番号36）とNifK配列の間にGly-Glyで連結されたHAエピトープタグを有する同様のコンストラクトを作製した（SN140）。SN140を*N. benthamiana*の葉細胞の中に浸透させた後、可溶性、不溶性、および全タンパク質の分画を調製した。しかしSN75とは異なり、SDS-PAGEとウエスタンブロットティングは、NifK融合ポリペプチドが不溶性のままであったことを示した。この結果は、融合ポリペプチドへのHAリンカー-GGの挿入が、タンパク質の可溶性に、そのNifポリペプチドに応じて異なる影響を与えたこと（この場合にはNifD対NifK）を実証した。

20

【0916】

結局、これらの結果は、NifDポリペプチドをミトコンドリアまたはミトコンドリア環境に向かわせるプロセスそれ自体がNifDの可溶性にマイナスの影響を与えることの確認であった。これらの結果は、N末端の改変がこの問題を少なくとも部分的に克服できる可能性があることも示した。

30

【0917】

40

50

【表 14】

表14：植物細胞の中での発現とMPPによるMTPのプロセシングの後のMTP::NifD融合ポリペプチドについて、可溶性分画と不溶性分画のSDS-PAGEとウエスタンブロット分析によって求めた可溶性。それぞれの融合ポリペプチドに可溶性スコアを与えた：0、可溶性である完全長NifDポリペプチドがまったく検出されず；1、可溶性ポリペプチドがほんのわずかに検出された；2、可溶性ポリペプチドが検出されたが、全ポリペプチドの50%未満；3、可溶性ポリペプチドが、全ポリペプチドの50%超検出された；4、全ポリペプチドの少なくとも90%が可溶性ポリペプチドとして検出された。

コンストラクトの ID	プロモータ	MTP	二次切断	エピトープタグ	可溶性スコア
SN33	e35S	なし	あり	5' HA	4
SN10	e35S	FA γ 51	あり	3' HA	1
SN06	S4V2	FA γ 51	あり	3' HA	2
SN04	e35S	CPN60	あり	3' HA	0
SN14	e35S	Su9	あり	3' HA	0
SN19	e35S	CoxIV	あり	5' TwinStr ep 3' HA	0
SN53	e35S	FA γ 51	あり	3' HA	0
SN58	e35S	FA γ 51	あり	3' HA	0
SN75	e35S	FA γ 51	あり	5' HA+ 3' HA	3
SN114	e35S	FA γ 51	なし (Y100Q)	3' HA	2
SN100	e35S	FA γ 51	なし	3' HA	0
SN96	e35S	FA γ 51	あり	3' HA	2
SN97	e35S	FA γ 51	あり	3' HA	2
SN99	e35S	FA γ 51	あり (減少した)	3' HA	1

【0918】

NifD::リンカー::NifK融合ポリペプチドの可溶性

【0919】

これらの結果が与えられた状況で、NifDの可溶性に対する別のC末端伸長部の効果、すなわちNifK配列を付加してMTP::NifD::リンカー(HA)::NifK翻訳融合体にするものの効果を調べた(Allen他、2017年)。その目的で、SN10と同様に発現のための強力なe35Sプロモータと効率的な翻訳のためのTMV-オメガ 5'-UTR領域(Gallie他、1987年)を含有する遺伝子コンストラクトSN68を作製した。SN68は、Gly-GlyリンカーでNifDのN末端に融合されたMTP-FA γ 51、次いでpRA20で以前に用いられたようなHAエピトープタグ配列を含む30アミノ酸リンカー、その後にNifK配列を持つ融合ポリペプチドをコードしていた。これは図13に模式的に示されている。NifDアミノ酸配列は配列番号18に従っていた。タンパク質コード領域は、*N. benthamiana*の中で発現させるためにコドンが最適化された。

【0920】

SN68を*N. benthamiana*に浸透させ、可溶性、不溶性、および全タンパク質分画を単離することによってこのポリペプチドで可溶性を調べた。SDS-PAGEとウエスタンブロット分析をこれらタンパク質分画で実施した。2つのバンドがブロット上に出現した(図14)が、それらは予想よりもわずかに小さかったため、おそらくNifD配列内の二次切断部位での切断を表わしていた。しかしそれにもかかわらず、HAエピトープとNifK配列を含む融合ポリペプチドの大半は可溶性分画の中にあり、ほんの少量が不溶性分画の中にあることが観察された(図14)。本発明の発明者らがほとんど可溶性であるNifKポリペプチドを観察したのはこれが初めてであった。

【0921】

SN68がコードするポリペプチドは、NifDのアミノ酸97~102の間の二次切断に対して

感受性のあるアミノ酸配列を含んでいたため、ミトコンドリアの中でNifDを二次切断から保護することが知られていたY100Qアミノ酸置換を含有する第2の対応するコンストラクトを作製した（実施例6）。この遺伝子コンストラクトをSN159と名づけた。プロセッシングを受けた融合ポリペプチドとプロセッシングを受けていない融合ポリペプチドをSDS-PAGEゲル上で識別し、そのことによってSN159によってコードされる融合ポリペプチドがMTP配列の中でMPPによって切断されるかどうかを明確にするため、MPPによるミトコンドリアプロセッシングに対して抵抗性にすると考えられるアラニン置換によってMTP-FA γ 51配列が改変されたこと以外はSN159と同じ第3のコンストラクトを作製した。SN66ポリペプチドにおけるのと同様に、MTP内で同じアラニン置換を実現した。そこで、MPPによるプロセッシングを受けることがなく、したがってプロセッシングを受けた産物よりも大きなサイズの産物をSN159から生成させるmMTP::NifD::リンカー(HA)::NifK融合ポリペプチドを生成させるための第3のコンストラクトSN160を設計した。さらに、MPP配列が欠けているためミトコンドリアを標的とせず、むしろ細胞質に位置することになる融合ポリペプチドをコードする第4の対照コンストラクト（SN176と名づけた）を作製した。このコンストラクトについて、SN159のMTP-FA γ 51配列を、2つのグリシンによってNifD開始コドンに連結された6×Hisタグで置き換えた。6×His+Gly-Gly配列は、MPPによるプロセッシングの後にMTP-FA γ 51から生成することが予測される瘢痕配列にサイズが非常によく似ていた。SN159が正しくプロセッシングを受ける場合には、SN176とSN159からのタンパク質産物は実質的に同じ長さ（SN176については1040残基／116,251 Da、プロセッシングを受けたSN159については1042残基／116,317 Da）になるであろうことが予測された。

【0922】

実施例1と3に記載されているようにしてこれらのコンストラクトSN68、SN159、SN160、およびSN176を別々に*N. benthamiana*の葉の中に浸透させ、5日後、浸透されたそれぞれの葉領域から3種類のタンパク質分画、すなわち全タンパク質、可溶性タンパク質、および不溶性タンパク質を調製した。これらの分画を、SDS-PAGEと、HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。SDS-PAGEゲルは、ポリペプチドのサイズが大きいことを考慮して通常よりも長く走らせ、よりよい分解能を得た。

【0923】

SN159とSN160の両方が、約120 kDaの分子量を持つ明確なポリペプチドバンドを生じさせ、SN160からの主要なポリペプチドはSN159からのものよりも顕著に大きかった。SN159からのポリペプチドは、MTP配列が欠けたSN176から産生されたのと同じサイズであるように見えた。このことから、SN159から産生されたポリペプチドはMPPによって効率的にプロセッシングを受けたと結論された。それとは対照的に、SN68から産生されたポリペプチドはより小さく、したがってNifD配列内の二次切断からの産物を含むと推定された。Y100Q置換を持たないSN68から産生されたポリペプチドは二次切断を受け、したがって933残基／104,403 Daの産物を産生するであろうことが予測された。このサイズのポリペプチドバンドが観察された。

【0924】

本発明の発明者らにとって最大の喜びかつ驚きであったのは、これらコンストラクトから産生されたポリペプチドの可溶性分析からの結果であった。SN159から産生されたポリペプチドは、不溶性分画よりも可溶性分画の中で多く観察された。本発明の発明者らがこれをミトコンドリア標的型NifDポリペプチドで見たのはこれが最初であった。さらに、プロセッシングを受けたMTP::NifD::リンカー(HA)::NifKポリペプチドは、細菌アッセイ系の中でNifDとNifKのために機能することが示されていた（実施例11）。したがって本発明の発明者らは、Nifポリペプチドの改変に成功し、NifD機能とNifK機能の両方を持っていてRRNYY配列（配列番号102）内でのNifD配列の二次切断に対して抵抗性である可溶性の機能的ポリペプチドが産生されたと結論した。

【0925】

可溶性以外に、個別に発現したNifDとNifD::リンカー::NifKポリペプチドの間にはプロ

セシングのいくつかの重要な違いが存在していた。第1に、野生型NifD配列を含有するMTP::NifD::リンカー::NifKポリペプチド (SN68) は、SN10からのNifDポリペプチドとその置換バリエーション (実施例6) とは異なり、MPPによる完全なプロセシングを受けた。SN10といくつかの他のNifDバリエーションコンストラクトからは約48 kDaの二次切断産物が優勢であったが、RRNYY配列 (配列番号102) 部位で切断されていない完全長NifDポリペプチドが常に検出された。第2に、SN159、SN10、および他のNifDバリエーションで同じMTP-FA γ 51を用いたにもかかわらず、SN159ではMPPによるプロセシングが完全であったように見えたのに対し、NifDが単独で発現したときには、プロセシングを受けた、およびプロセシングを受けていないMTP-FA γ 51::NifDの両方が常に観察された。したがって、幸運なことに、SN159からの融合ポリペプチドは、ミトコンドリア内での二次切断に対して抵抗性であり、可溶性が優勢であっただけでなく、MTP配列内の標準的な部位で完全なプロセシングも受けたように見えた。

【0926】

NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドの単離

【0927】

SN159によってコードされるNifD::リンカー(HA)::NifK融合ポリペプチドを*N. benthamiana*の葉サンプルから以下の免疫選別法によって単離した。12個の葉切片 (それぞれ、サイズが約2 cm²であり、SN159を浸透させた) を10 mlの可溶性バッファの中で粉砕した。可溶性バッファは、100 mMのTris pH 8.0、150 mMのNaCl、0.25 Mのマニトール、5%(v/v) のグリセロール、1%(w/v) のPVP40、0.1%(v/v) のTween 20、2 mMのTCEP、0.2 mMのPMSF、および10 μ Mのロイペプチン含有していた。低レベルの洗浄剤 (0.1%のTween20) を使用すると可溶性タンパク質だけを抽出する結果になることが予想された。粉砕した混合物を4℃にて5500×gで15分間遠心分離し、上清をクリーンなチューブに移した。抗HAアガロースビーズ (Sigma社) を、50 mMのTris pH 8.0と75 mMのNaClを含有するバッファ (TNバッファ) で1回洗浄した後、ビーズを上清に添加してHAエピトープを持つポリペプチドを免疫沈降させた。この混合物をゆっくりと回転させながら4℃で1時間インキュベートしてビーズを沈殿させた。上清のサンプルを「結合しなかったタンパク質」として保持した。ビーズを毎回1 mlのTNバッファで5回洗浄し、室温にて毎回1000×gで2分間遠心分離してビーズを沈殿させた。最後に、60 μ lのLaemmliバッファをビーズに添加し、この混合物を95℃に5分間加熱して結合したタンパク質を放出させ、それを変性させた。サンプルを二連でSDS-PAGEゲルにロードした。

【0928】

ゲルの1つを膜にブロットし、ウエスタンブロットとして処理した。MPPによるプロセシングを受けたNifD::リンカー(HA)::NifKポリペプチドで予想されるサイズの強いポリペプチドバンドのほか、おそらくNifD内の隠れた部位でのプロテアーゼ切断によって生じた分解産物と考えらるより小さいポリペプチドに関する2つのより弱いバンドが観察された。ポリペプチド内のNifD配列はY100Qアミノ酸置換を持っていたため、さらなる切断／分解がNifD内のその部位で起こった可能性は小さく、むしろ1つ以上の新たな部位で起こった。ウエスタンブロットも、免疫沈降で使用した抗HAアガロースビーズの中に存在するマウスIg の50 kDaと25 kDaのポリペプチドを表わすと考えられる2つの強いバンドを示した。

【0929】

第2のSDS-PAGEゲルをクーマシー染色で染色し、NifD::リンカー(HA)::NifKバンド (サンプル1) とより小さな分解産物 (サンプル2) に対応する領域内のゲル切片を切除するのに使用した。実施例1に記載されているようにしてこれらゲル切片の中のタンパク質をトリプシンで消化させ、LC-MSによって分析した。抽出されたトリプシンペプチドを乾燥させ、30 μ lの1%ギ酸の中に再懸濁させた。最初に、消化物のそれぞれからの5 μ lのトリプシンペプチドを、Eksigent microHPLC を利用して6600 Triple TOF MSの表面に注入した (55分間)。残ったトリプシンペプチドを-20℃で保管した。

【0930】

カスタムと外来のデータベース、すなわちUniprot-Nbent+Custom Nifデータベース+Common Repository of Adventitious Proteinが添付された種特異的UniProt Knowledgebase (UniProtKB) データベースに対してProteinPilotを用いてデータを処理した。標的ポリペプチドからのいくつかの特別なペプチドがサンプル1の中で有望であると同定され、その内でNifD配列の中からの2つのペプチドは95%超の信頼性水準で同定され、NifD配列からの他の1つのペプチドとNifK配列内の他の2つのペプチドは、94.9、93.3、および55.3%の信頼性水準で同定された。MTP配列内でのMPPによる切断に由来する2つの痕跡ペプチド、すなわちISTQVVR (配列番号119) とSISTQVVR (配列番号120) は発見データの中に検出されなかったが、6500 Q-trapでより高感度の標的型MRMを6トランジションイオン/ペプチドで利用すると、保持時間がそれぞれ2.83分と3.15分の位置に検出された。優勢なトランジションイオン (+2y6) の評価は、サンプル1の中にペプチドSISTQVVR (配列番号120) がISTQVVR (配列番号119) よりもわずかに多いことを示した。

【0931】

サンプル1が、MPPによるプロセッシングを受けたNifD::リンカー(HA)::NifKポリペプチドを実際に含有していたことと、このポリペプチドが*N. benthamiana*細胞から可溶性形態で抽出されたことが結論された。

【0932】

サンプル2はタンパク質の含量がより少ないため、分析はより難しかった。しかし単一のトリプシンペプチドがNifD配列の中から同定され、それはNifDの中からの第2のペプチドである証拠であった。2つの痕跡ペプチドISTQVVR (配列番号119) とSISTQVVR (配列番号120) は、発見データの中と、650 Q-trapでのより高感度のMRMでは検出されなかった。これらのデータは、サンプル2の中のポリペプチドがNifD配列内の追加切断から得られたことと整合していた。

【0933】

NifKポリペプチドの可溶性の増強

【0934】

本発明の発明者らは、別々のコンストラクトからのNifDポリペプチドとNifKポリペプチドの同時発現が、NifDなしでのNifKの発現と比べてNifKポリペプチドの可溶性を増強するかどうかを調べた。SN140 (MTP-HA::NifK) を用いた上記の実験は、このポリペプチドを単独で発現させたときには実質的に不溶性であることを示した。したがって*N. benthamiana*の葉に、SN140と、SN10、SN114、SN117のいずれかで別々に形質転換した*A. tumefaciens*株の混合物を浸透させた。SN10は野生型NifDをコードしていたのに対し、SN114とSN117はNifDの中にアミノ酸置換を含有していて二次切断を減らした。可溶性分画と不溶性分画を含有するタンパク質抽出液のほか、分画されていないタンパク質を、以前のようにSDS-PAGEとウエスタンブロッティングによって分析した。

【0935】

プロットは、任意のNifDコンストラクトと同時に導入したときにSN140から発現させたNifK融合ポリペプチドの可溶性の実質的な増加を示した。NifDなしだとNifKを可溶性分画の中にほとんど検出できなかったのに対し、NifDの存在下では、可溶性分画と不溶性分画の中にほぼ同量のNifKが見いだされた。MTP::NifKポリペプチドの可溶性は、同じ植物細胞の中でNifDを同時に発現させることによって増大し、別々のポリペプチドとして発現させたときでさえ増大すると結論された。これが、MTP-NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドが可溶性のより大きな形態のNifKポリペプチドを提供したという上記の観察結果に付加された。両方の観察結果が、ミトコンドリアマトリックス内でのNifDポリペプチドとNifKポリペプチドの会合 (NifD-リンカー-NifK融合ポリペプチドに必要であるだけでなく、別々のポリペプチドとして発現させるときにも必要である) を示していることも結論された。

【0936】

実施例13：融合タンパク質と磁性ビーズを用いた植物ミトコンドリアの精製

10

20

30

40

50

【0937】

本発明の発明者らは、ミトコンドリアの中での外来ポリペプチド（彼らがその細胞内オルガネラの中に導入することを望むNifポリペプチドなど）の局在化と機能をよりうまく調べるために植物ミトコンドリアを迅速に精製する1つの方法を考案した。高度に濃縮された植物ミトコンドリアを単離するための伝統的な方法は、典型的には新たに採取した葉材料を必要とし、その葉材料は、さまざまなバッファで処理された後に、一連の遠心分離工程で非ミトコンドリア構成要素が除去されることになる（Millar他、2007年）。これらの方法はかなりの量の出発材料（例えば20～40グラムの植物材料）を必要とするため、精製されたミトコンドリアを使用または分析できる状態になる前にプロセス全体に多くの時間がかかる。より少量の植物材料から出発するより迅速な単離法が開発されている（Mi
llar他、2007年）。しかしこれらの方法がミトコンドリア濃縮法として最良であると見な
されるのは、この生成物が通常は相変わらず他の細胞構成要素を含有するからである（Ca
rrari他、2003年）。

10

【0938】

本明細書に記載されている*N. benthamiana*の葉アッセイでは、8～10箇所またはそれよりも多い「浸透ゾーン」を単一の葉に適用することができ、それぞれのゾーンは、*A. tumefaciens*形質転換体の混合物を通じて導入された単一または複数（約8個まで）の導入遺伝子を発現することができる。このような葉アッセイは、遺伝子の組み合わせのハイスループット検査には理想的であり、一般に、安定に形質転換された植物の中で発現するように最終的に設計された代謝経路を予測した。一般に、それぞれの浸透ゾーンは直径がわ
ずか2～3 cmであり、その結果として新鮮な全重量が浸透ゾーン1つ当たり50～100 mg
になった。このように少量の新鮮な材料は伝統的な植物ミトコンドリア調製物には適しておらず、この調製物では多くの工程がある結果としてミトコンドリアがかなり失われた。したがって本発明の発明者らは、少量（例えば50～100 mg）のサンプルから10分以内に植物ミトコンドリアを1工程で精製するためのプロトコルを確立した。

20

【0939】

植物ミトコンドリアの外膜はさまざまなタンパク質の出入機構を有する。メタキシンは、植物ミトコンドリアの外膜で見いだされた約40 kDaの植物特異的タンパク質であり、ミトコンドリアの中に取り込まれる前のタンパク質の認識に関与している可能性がある（Lister他、2004年）。このタンパク質はミトコンドリアに特に位置するように見える。構造的にはメタキシンは、このタンパク質のC末端に向かう位置にある単一の膜広がり領域を持ち、このタンパク質のN末端は植物細胞質の中に位置している可能性が大きい。メタキシンのN末端にGFPが融合すると、蛍光シグナルが外膜に位置する植物ミトコンドリアになった（Lister他、2004年）。本発明の発明者らは、メタキシンのN末端が実際に細胞質の中に位置している場合には、抗体がアクセスできて結合する可能性が大きく、アフィニティタグに基づく精製法が可能になる可能性があると考えた。さらに、レポータポリペプチド（GFPバリエーションmTurquoiseなど）のN末端にエピトープを配置すると、このエピトープを細胞質の中に押し込むのを助けるであろうと考えた。TwinStrepタグは、N末端に付加されるタグとして選択された。Twin-Strepタグとストレプトアビジンの相互作用は、特異的かつ強固だが可逆性である結合を提供するため、親和性に基づくタンパク質精製における応用が報告されている（Schmidt他、2013年；SchmidtとSkerra、2007年）。翻訳融合体としてのTwin-Strepタグは、操作された結合基質StrepTactinXTに強固だが可逆性の結合を提供するが、このタグはストレプトアビジンにも結合することができる。

30

40

【0940】

本発明の発明者らは、図15に模式的に示されているように、いくつかの構成要素を持つ融合ポリペプチドを考案した。この融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトを設計して作製した。遺伝子合成とGoldenGateクローニング法の組み合わせを利用して、植物細胞の中で発現させるための35Sプロモータを持っていてTwinStrep-mTurquoise-TEV認識配列-メタキシン融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクト（コンス

50

トラクトSN197、配列番号121)を生成させた。N末端Twin-Strepタグエピトープは、抗体を媒介とするアフィニティ精製を可能にするために含め、mTurquoise構成要素は、共焦点顕微鏡を用いて精製をモニタすることを可能にするとともに、メタキシンのN末端をさらに伸長させて植物細胞質ゾルの中に入れ、TEVプロテアーゼ認識配列は、磁性ビーズから植物ミトコンドリアを放出させるため、インビトロでTEVプロテアーゼを媒介としたポリペプチドの切断を可能にした。野生型メタキシンは植物ミトコンドリアの外膜に埋め込まれた状態になるため、植物細胞の中でのSN197からの発現は、融合タンパク質がミトコンドリアの外膜に局在化するという条件で、このオルガネラの精製を可能にすると考えられた。これは、下に説明するようにして調べるまで知られていなかった。

【0941】

SN197を含有する*A. tumefaciens*細胞を、p19サイレンシングサプレッサを発現させるための別のコンストラクト(すなわちMTP-FA γ ::GFP(コンストラクトpRA01)と、細胞質に局在化するNifU::HA(SN211)であり、それぞれODが0.1であるため、全ODは0.4)を含有する細胞の混合物の一部とともに、*N. benthamiana*の葉に浸透させた。これら構成要素のいくつかを持つがすべては持たない適切な対照混合物も、それぞれp19とともに浸透させた。4日後、浸透ゾーンを切除すると、4 cm $\times$ 2 cmの葉切片になった新鮮重量が100 mgのサンプルが得られた。以下の工程は4 $^{\circ}$ Cで実施した。500 μ lのKPBSバッファを用いて乳鉢と乳棒で葉材料を手作業で粉砕した。このバッファは、500 μ lの脱イオン水の中に5.07 gのKClと0.68 gのKH₂PO₄を含有しており、1MのKOHを用いてpH 7.25に調節されていた。スラリーを低速の1000 gで5分間遠心分離して細胞壁デブリをペレットにしたが、懸濁液の中に大半のミトコンドリアが残った。1.5 mlのエッペンドルフ管の中で、300 μ lの上清を、ストレプトアビジンで被覆された50 μ lの磁性ビーズ(直径2.8 μ m、滑らかに被覆されたビーズ、DynaBeads MyOne C1製品コード65002)のスラリーに適用したが、ビーズはその前にKPBSバッファで1回洗浄してあった。決められた時期に磁石を用いて混合物の中の磁性ビーズをチューブの壁に回収し、残りの液体を注意深く除去した。次いで磁性ビーズを1 mlのKPBSで2回洗浄し、以前と同様に毎回磁石で磁性ビーズを回収し、最後に50 μ lのKPBSの中に再懸濁させた。対照サンプルとして、同じビーズ精製プロトコルを、pRA01(MTP-FA γ 77::GFPをコードする)を発現する、SN211(細胞質NifU::HAをコードする)を発現する、およびp19を発現するがSN197のない*N. benthamiana*の葉抽出液に適用した。

【0942】

いくつかの実験を実施し、磁性ビーズを用いたミトコンドリア精製のための最適な条件を求めた。最初に、さまざまなTwinStrep結合ビーズ製品を比較した。MyOne C1ビーズが、DynaBeads MyWay T1、M-280、およびM-270よりも優れていること、またIBT StreptaxtinXT-Agarose製品よりも優れていることが観察された。1、5、10、30、または60分間のインキュベーションを利用してC1ビーズへのSN197サンプルの結合の経時変化を調べると、最大かつ飽和した結合が5分後に起こることが見いだされた。SN197が浸透混合物から除外されたサンプルに関する精製プロトコルの後にはGFPシグナルはまったく検出されなかった。これは、磁性ビーズへのミトコンドリアの非特異的な結合が存在しなかったことを示している。共焦点顕微鏡検査は、mTurquoise(SN197)とGFP(MTP-FA γ 77::GFP)からの蛍光シグナルが、MyOne C1ビーズとのインキュベーションで最大であることを示した。異なる濃度のC1ビーズを抽出液とともにインキュベートした。TwinStrep::mTurquoise::TEV::MetaxinとMTP-FA γ ::GFPの回収はビーズの濃度に依存しており、50 μ lのMyOne C1ビーズスラリーで飽和したため、その量をその後は使用した。

【0943】

共焦点顕微鏡検査を通じて精製プロセスの中の工程を分析し、GFPポリペプチドとmTurquoiseポリペプチドの存在と、植物葉緑体からの自己蛍光を評価した。GFPとmTurquoiseは、それぞれ488 nmと434 nmの励起波長で検出された。SN197、pRA01、およびp19の組み合わせの浸透からのサンプルは、KPBSバッファを用いて粉砕して低速遠心分離

10

20

30

40

50

を実施したとき、GFP蛍光ミトコンドリアが濃縮された。ミトコンドリア以外のほんのいくつかの完全な細胞内オルガネラ（葉緑体、核など）と、細胞デブリのわずかな断片が観察された。2 mlのKPBSバッファと磁性ブルダウンを利用してビーズを洗浄した後に得られた懸濁液の共焦点顕微鏡検査は、蛍光ミトコンドリアが物理的にビーズに付着していることを示した。精製におけるこの工程の後、他のオルガネラと細胞デブリは観察されなかった。

【0944】

精製工程をウエスタンブロットアッセイによっても分析した。そうするため、磁性ビーズに結合したポリペプチドを放出させ、100 μ lのLaemmliバッファ（実施例1）を添加して変性させ、サンプルを95°Cに加熱した。粉碎後だが精製前の植物抽出液のサンプル（「入力サンプル」と名づける）も、MTP-FA γ ::GFPポリペプチドとmTurquoise:メタキシンポリペプチドを検出するためのGFP結合抗体と、NifU::HAポリペプチドを検出するための抗HAを用いたウエスタンブロット分析に含まれていた。ウエスタンブロットは、TwinStrep::mTurquoise::TEV::メタキシンポリペプチドが、約80 kDaの分子量の位置に容易に検出されることを示した。これは、単一の完全な翻訳融合タンパク質に合致している。pRA01を含むサンプルについて、GFPに対する抗体を用いて約30 kDaの位置にバンドが観察された。これは、ミトコンドリア標的型MTP-FA γ ::GFPの予想サイズと一致している。さらに、SN211を有する抽出液からHA抗体を用いて約42 kDaの位置にバンドが観察された。これは、NifU::HAポリペプチドの予想サイズと一致している。潜在的な汚染物質としての非ミトコンドリアタンパク質をチェックするため、細胞質タンパク質 α -チューブリンを対応する抗体（Sigmaカタログ番号T6074、クローンB-5-1-2モノクローナル抗体）で評価した。このタンパク質に関する約52 kDaの位置の特別なバンドは、その入力サンプルを有するレーンでだけ観察された。 α -チューブリンのシグナルは精製されたミトコンドリア抽出液の中には見いだされず、精製が非常に優れていることを示していた。メタキシン融合ポリペプチド（SN197によってコードされるものなど）の使用によって植物ミトコンドリアの効率的かつ迅速な小スケールの単離と精製が可能になることが結論された。融合ポリペプチドは、植物細胞の中で遺伝子コンストラクトを発現させた後に植物ミトコンドリアの外膜内に埋め込むことが可能であることと、N末端TwinStrepエピトープタグがストレプトアビジンで被覆された磁性ビーズにアクセスできることも結論された。

【0945】

単離されて精製されたミトコンドリアをプロテオミクスによって分析したとき、サンプルはミトコンドリアタンパク質が非常に濃縮されており、ルビスコの小さなサブユニットは非常に低レベルであった。このことは、この方法を用いることによる高度の濃縮のさらなる確認になっている。

【0946】

実施例14：植物細胞のミトコンドリアにおけるNifSポリペプチドとNifUポリペプチドの会合

【0947】

ニトロゲナーゼの構成要素は、機能に不可欠ないくつかのメタロクラスターを含有している。触媒となるモリブデン系酵素に関するニトロゲナーゼタンパク質（モリブデン-鉄タンパク質としても知られる）は、NifDポリペプチドとNifKポリペプチドの $\alpha_2\beta_2$ 四量体である。この触媒性四量体は、活性状態では、各 α/β サブユニットの界面にPクラスターと呼ばれる[Fe₈S₇]複合体を含有するとともに、各 α サブユニット内にFeMo補因子（FeMo-co）も含有している。ニトロゲナーゼレダクターゼ構成要素（鉄タンパク質としても知られる）は、サブユニット架橋[Fe₄S₄]クラスターを含有するNifHポリペプチドのホモ二量体である。これらのFe-SクラスターとPクラスターのほか、FeMocoが、N₂を還元するための電子の移動にとって不可欠である。ニトロゲナーゼの合成と構造は、RubioとLudden（2005年）に概説されている。

【0948】

これらメタロクラスターの正確な組み立てと成熟は複雑なプロセスであり、いくつかの

装飾タンパク質が関与する（RubioとLudden、2008年）。成熟プロセスの最初の工程は、基本的なFe-Sクラスターの生成である。これはNifSとNifUによって触媒される。細菌では、これら2つのタンパク質が、完全なニトロゲナーゼ活性に必要とされる。その後Fe-Sクラスターは、NifH、NifBと、おそらくはNifD-NifKに移される。NifSとNifUは、Mo依存性ニトロゲナーゼの組み立てに関与するだけでなく、VFeニトロゲナーゼとFeFeニトロゲナーゼの組み立てにも関与してこれらのFe-Sメタロクラスターを合成する（KennedyとDean、1992年）。

【0949】

これらの活性は細菌でよく研究されてきた。NifSは、ピリドキサルリン酸（PLP、ビタミンB6）依存性システインデスルフラゼであり、システインからのFe-Sクラスターの合成に必要な無機スルフィドを生成させる。この反応によって副生成物としてアラニンが生成する。その後スルフィドはNifUに提供されて $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターと $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターが逐次的に形成される。NifS酵素は細菌の中でホモ二量体として機能する。

【0950】

NifUは $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスター形成のための足場を提供し、細菌の中でホモ二量体として機能する。そのN末端ドメインは、単量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターに結合することができる。単量体の中の $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ クラスターは還元融合してNifU二量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを形成することができる。NifUのC末端ドメインは、単量体1つにつき1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを保持することができる。その後NifUは $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターをNifBに供与し、プロセッシングによりNifB上の8Feコアになり、それがその後FeMocoの合成に用いられる。Fe-Sクラスターのための分岐経路では、NifUのN末端またはC末端の足場ドメインに結合した1つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターがアポ-NifHに移されてNifHタンパク質であるニトロゲナーゼレダクターゼが成熟する（Smith他、2005年）。NifUは2つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターをNifD-NifKに供与することと、NifHがそのクラスターのペアを縮合させて成熟Pクラスター $[\text{Fe}_8\text{S}_7]$ にすることが提案されている（Dos Santos他、2004年）。

【0951】

NifSとNifUは細菌の中で一過性複合体を形成するが強固な複合体は形成しないことが報告されている（Yuvaniyama他、2000年）。NifUは、NifSが*A. vinelandii*から調製された粗抽出液から精製されたときにNifSと同時に精製されなかった（Dos Santos他、2012年）。さらに、NifUまたはNifSの特異的免疫沈降によって他のポリペプチドの同時沈降が起こることはなかった。しかし単離されて精製されたNifUとNifSをインビトロで組み合わせてこの混合物に対してサイズ排除クロマトグラフィを実施したとき、ヘテロ四量体複合体が検出された。しかしこの実験では精製されたタンパク質を使用した。これまでに誰も、植物細胞の中でのNifSとNifUの同時発現を報告しておらず、これらが互いに結合していることを示す報告もないため、NifSが以前に粗抽出液からNifUとともに精製されたことはない。

【0952】

実施例2～4に記載されているように、ミトコンドリアを標的とするNifU融合ポリペプチドはMPPによる効率的かつ正確なプロセッシングを受け、NifS融合ポリペプチドは、遺伝子コンストラクトSN32とSN31のそれぞれから生成するときに部分的にプロセッシングを受けた。これら融合ポリペプチドは、ミトコンドリアを標的とするためのMTP-FA γ 51と、ウエスタンブロッティングによる検出のためのC末端HAエピトープを持っていた。1つの実験では、プロセッシングを受けたNifUポリペプチドの少なくとも90%が植物ミトコンドリアの中に可溶性形態で蓄積したが、量は実験ごとにいくらか変動し、プロセッシングを受けたNifSポリペプチドのいくらか（50%未満）は可溶性形態で蓄積した（図3）。さらに、N末端にFA γ -scar9モチーフを保持するNifSポリペプチドとNifUポリペプチドは、大腸菌の中で機能してニトロゲナーゼ活性をサポートすることが実証された。そのため9アミノ酸N末端伸長部を有するNifSとNifUの両方とも活性なままであった（実施例4）。

【0953】

これらの成功に基づき、本発明の発明者らは、植物細胞のミトコンドリアの中に導入さ

10

20

30

40

50

れたときのNifSとNifUの産生、プロセッシング、可溶性、および機能を調べるさらなる実験を以下のように設計して実施した。

【0954】

TwinStrepエピトープを有する融合ポリペプチドをコードするプラスミドの構築

【0955】

コードされた融合ポリペプチドを植物細胞の中でミトコンドリアを標的として発現させるための2つの遺伝子コンストラクトを設計して作製した。一方はMTP-FA γ 51::NifU::TwinStrep融合ポリペプチド（配列番号160）をコードし、他方はMTP-FA γ 51::NifS::TwinStrep融合ポリペプチド（配列番号161）をコードしている。これら融合ポリペプチドのNifS領域とNifU領域のアミノ酸配列は、*Klebsiella oxytoca*タンパク質のアミノ酸配列に基づいていた。TwinStrepエピトープ（またはタグ）を本明細書では「TS」と略す。TwinStrepエピトープを選択したのは、それが、実質的に生理学的条件下でStrepTactin XT樹脂に対する結合に関して大きな親和性を持つため、低濃度でさえそのエピトープを含むタンパク質の精製に理想的だからである。さらに、溶離条件は穏やかであったため、タンパク質複合体の精製が可能であった。タンパク質コード領域のヌクレオチド配列は、植物細胞の中での発現が改善されるように最適化された。それぞれの遺伝子コンストラクトは、植物細胞の中で発現させるための35S CaMVプロモータ配列（アクセッション番号EC51288）と、Nifコード領域の5'に融合されたMTP-FA γ 51の51個のアミノ酸をコードする領域を含有していた。これらコンストラクトは、上に記載したのと類似した方法を用い、GoldenGate組み立て戦略（Weber他、2011年；Engler他、2014年）を利用して作製した。これらコンストラクトは、NifUについてはSN166と名づけ、NifSについてはSN231と名づけた。

【0956】

別のコンストラクト（SN167）を作製した。これは、MTP-FA γ 51領域を変異させたことで、コードされる融合ポリペプチドが、ミトコンドリアの中でMPPによるプロセッシングをできなくすると考えられるアラニン置換をMTP配列の中に有する点を除き、SN166と同じである。変異した領域をmFA γ 51と名づけた。

【0957】

植物細胞の中での融合ポリペプチドの産生、そのプロセッシングと可溶性

【0958】

これらのコンストラクトと他のコンストラクトで、植物細胞の中でのコードされたポリペプチドの産生とプロセッシング、ならびにこれらの可溶性を調べた。実施例2と3に記載されているように、MTP-FA γ 51::NifS::HA融合ポリペプチドをコードするコンストラクトSN31を*N. benthamiana*の葉に浸透させ、抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによってタンパク質抽出液を分析した。2つのポリペプチドバンドがプロット上に観察された。これらはサイズが、プロセッシングを受けていないポリペプチドとMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドに対応していた（実施例3）。プロセッシングを受けたNifSポリペプチドとプロセッシングを受けていないNifSポリペプチドが、可溶性タンパク質分画と不溶性タンパク質分画の両方に存在していた。これは、部分的な可溶性を示している。それとは対照的に、SN166を別に*N. benthamiana*の葉の中に導入すると、MTP-FA γ 51::NifU::TS融合ポリペプチドはMPPによる効率的なプロセッシングを受け、得られたscar9-NifU::TSポリペプチドはほぼ完全に可溶性であった。その中のscar9は、利用したクローニング手続きから生じるGly-Glyリンカーを含んでいた。実施例4に記載されているように、9個のアミノ酸からなるN末端伸長部を有するNifSポリペプチドとNifUポリペプチドは、他のNifのための野生型*K. oxytoca*タンパク質と組み合わせられたときに活性であり、大腸菌にニトロゲナーゼ機能を提供した。*A. vinelandii*の中のNifSのC末端にあるHisタグがNifH上のFeSクラスターの窒素固定増殖と組み立てを邪魔しないことも示されている（Smith他、2005年）。

【0959】

遺伝子コンストラクトSN166とSN167を別々に*N. benthamiana*の葉に導入し、SN16

10

20

30

40

50

6がコードするポリペプチドの中のMTP配列の有効性と、ミトコンドリアを標的とすることが可溶性とStrepTactinXTカラムでの精製に及ぼす効果を確認した。タンパク質を葉組織から非変性条件下で抽出した。抽出バッファは、100 mMのTris-HCl pH 8.0、150 mMのNaCl、5%(v/v)のグリセロール、2 mMのTCEP、1%(w/v)のPVP（平均MW 40 kDa）、および0.1%のTween 20を含有していた。2 mlのStrepTactinXTカラムを、100 mMのTris pH 8.0、150 mMのNaCl、および2 mMのTCEPを含有するバッファ（洗浄バッファ）で洗浄した後、SN166からのタンパク質抽出液を、またはそれとは別にSN167からのタンパク質抽出液をロードした。カラムを洗浄して結合しなかったタンパク質を除去した後、結合したタンパク質を、50 mMのビオチンを含有する洗浄バッファで溶離させた。4 mlのAmicon Ultra 10 kD MWCO濃縮器を用い、タンパク質を含有するサンプルを200~500 µlの体積に濃縮した。20 µlのアリコートについて、SDS-PAGEと、抗体Streptactin HRPを用いたウエスタンブロッティングを実施した。タンパク質を染色するため、二連のゲルをクーマシーブルーで染色した。

【0960】

ウエスタンブロット（図16、上方の図）は、NifU::TwinStrep融合ポリペプチドが、StrepTactinXTカラムの使用を通じ、SN167が浸透した組織から実際に精製されたことを示した。SN166が浸透した組織からの抽出液は、少量の精製されたNifU::TwinStrepタンパク質を生成させ、その大半はプロセッシングを受けていない形態であるように見えた。クーマシーブルーで染色した対応するゲル（図16、下方の図）から、高度の濃縮が精製プロセスで起こったことが確認された。

【0961】

ゲル切片をクーマシーで染色したゲルから切り出し、これら切片の中のポリペプチドについてN末端アミノ酸分析を実施した。そこから、SN166によってコードされるMTP-FA γ 51::NifU::TwinStrep融合ポリペプチドはMPPによってMTP配列内の想定された部位で切断されたことが確認された。なぜなら精製されたポリペプチドは、想定されるプロセッシングからのN末端配列を持っていたからである。

【0962】

ミトコンドリアに向かわせるNifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドが植物細胞の中で実際に発現し、ミトコンドリアの中でプロセッシングを受け、精製を可能にするのに十分な可溶性形態になったことが、これらのデータから結論された。

【0963】

植物細胞におけるMTP::NifU::TwinStrepとMTP::NifS::HAの同時発現 - NifSとNifUが植物ミトコンドリアの中で会合する

【0964】

発現、プロセッシング、可溶性、および安定性を評価するため、そして植物ミトコンドリアの中でともに生成されたときのNifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドの可能な会合を調べるため、MTP-FA γ 51::NifS::HAポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトSN31（実施例2）と、MTP-FA γ 51::NifU::TSポリペプチドをコードするSN166を、実施例1に記載されている方法を用いてN. benthamianaの葉に同時に浸透させた。葉からタンパク質抽出液を調製し、最初にStrepTactinXTカラムを用いてNifUのアフィニティ精製を実施することによってNifS-NifU複合体の存在を調べ、次いで実施例1に記載されている方法を利用してNifSポリペプチドの同時精製を調べた。簡単に述べると、最初の実験では、12 gの重量の新鮮な葉材料を、非変性条件下であった抽出バッファを用いて嫌気条件下で処理した。第2の反復精製を16.6 gの重量の新鮮な葉材料で開始した。第3の精製は、23 gの重量の新鮮な葉材料を用いて実施し、そのとき使用したバッファは、Fe²⁺とL-システインをそれぞれ2 mMと0.5 mMまで添加した点がわずかに異なっていた。それぞれの実験において、濾過したライセートを、StreptactinXTカラム（IBA Lifesciences社）を通過させ、NifUポリペプチドをそのTSエピトープによって保持した。このカラムを洗浄した後、結合したタンパク質を、ビオチンを含有するバッファを用いて溶離させ、次いで上記のようにして濃縮した。サンプルを精製プロセスの各工程で保持した。それは特

に、(i) 実験開始時の抽出可能な全タンパク質、(ii) 最初の遠心分離後のペレット化された細胞デブリ、(iii) カラムを通過させる前の抽出バッファに溶ける分画であった入力タンパク質溶液、(iv) カラムに結合しなかったフロースルー分画、および(v) ビオチンを用いた溶離後の濃縮された溶離液、からのサンプルである。サンプルをSDSで処理し、95℃まで加熱した後、SDS-PAGE電気泳動とウエスタンブロッティングを実施した。

【0965】

第3の精製から精製されて濃縮されたNifUサンプルは、いくらか茶色に見えた。これは、Fe-Sクラスターの存在を示している。

【0966】

これらサンプルの二連のアリコートで抗Strep抗体または抗HA抗体を用い、免疫検出を伴うウエスタンブロット分析を実施した。第1と第3の精製実験からのウエスタンブロットが図17と図18に示されている。第3の精製実験は、抽出バッファの中に0.5 mlのL-システインと2 mMの Fe^{2+} サプリメントが存在する状態で実施した。ウエスタン分析は、両方のタンパク質が、葉材料から抽出した後の可溶性分画に存在することを示した。NifSについては、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方が可溶性分画の中に存在するのに対し、NifUについては、プロセッシングを受けた形態だけが存在していた。これは、効率的なプロセッシングを示している。抗Strep抗体は、粗サンプルの中と、カラムから溶離したサンプルの中のscar9-NifU-TwinStrepポリペプチドを検出した。溶離液からのシグナルの強度は非常に強く、scar9-NifU-TwinStrepポリペプチドが植物抽出液から精製されて濃縮されたことを示している。電気泳動におけるゲル中のポリペプチドの移動度は、MTP配列内のミトコンドリアプロセッシングと合致しており、このプロセッシングはほとんど完全であるように見えた。

【0967】

膜を、抗strep抗体よりも約20倍感受性が大きかった抗HA抗体に曝露したとき、HAタグ付きポリペプチドは、NifSポリペプチドのミトコンドリアでのプロセッシング、すなわちscar9-NifS::HAとサイズが一致していることが明らかになった。プロセッシングを受けていない形態のNifS融合ポリペプチドはサンプル中に検出されなかった。この実験で使用したNifSポリペプチドはstrepタグを含有していなかったため、これらの結果は、NifSとNifUが複合体を形成したことで、NifSポリペプチドがNifUとの相互作用を通じて同時に精製されたことを示していた。重要なことだが、プロセッシングを受けた形態、すなわちscar9-NifS::HAは、カラムからの溶離液の中で、プロセッシングを受けていない形態に対して非常に濃縮されていることが、カラム精製前の入力サンプル中のその2つの形態の比と比較したときに観察された。これらの観察結果は、NifSとNifUを発現するがこれらポリペプチドの会合は実証されていなかった細菌からの報告に基づく、本発明の発明者らにとって驚きであった。彼らの結論は、タンパク質抽出の実験で利用した嫌気性の非変性条件下では、

(i) NifS融合ポリペプチドがscar9-NifU::TSポリペプチドと同時に精製されたが、これはこの2つのポリペプチドが、ミトコンドリアを標的とする植物細胞の中で同時に発現したときに会合していたことを示す、(ii) MPPによるプロセッシングを受けた形態のNifSポリペプチド、すなわちscar9-NifS::HAは、NifUポリペプチドと会合した形態であった、および(iii) プロセッシングを受けたNifUポリペプチドとプロセッシングを受けたNifSポリペプチドの両方がミトコンドリアの中で少なくとも部分的に可溶性である形態で産生されたため、観察された会合が可能であったというものであった。観察(ii)については少なくとも3つの可能な説明が存在していた。第1に、プロセッシングを受けていないMTP-FA γ 51::NifSは、立体障害または折り畳みの間違いが原因でNifUと相互作用できなかった可能性がある。第2に、プロセッシングを受けていない形態はミトコンドリアの中に取り込まれず、そこにNifUポリペプチドが局在化しなかった可能性がある。そして第3に、プロセッシングを受けていない形態のNifSは十分に可溶性ではなかった可能性があるため、NifUと相互作用することができなかった、あるいはこれらの理由の任意の組み合わせ。

【0968】

本発明の発明者らは、植物ミトコンドリアから、または実際には任意の細胞から単離さ

れたNifS-NifU複合体に関する以前のいかなる報告も知らなかった。

【0969】

第1の精製からのサンプルに対して再度、変性SDS-PAGEを実施した。今度はゲルをクーマシーブルーで染色し（図18、パネルC）、プロセッシングを受けたNifUポリペプチドとNifSポリペプチドに対応するゲル領域をプロテオミクスによって分析し、カラム上で同時に精製された導入ポリペプチドと任意の内在性タンパク質の両方を同定した。ゲル切片を実施例1に記載されているようにして処理し（トリプシン消化が含まれる）、LC-MS/MSによって分析した。分析から、N末端の癒痕ペプチド（配列番号42）のトリプシン消化で予想されるペプチドISTQVVR（配列番号119）の存在が同定された。これは、NifSとNifUの両方がMTP内の予想されるMPP切断部位で正確にプロセッシングを受けたことを示している。標的型MRMから、トリプシン性ペプチドの素性が確認され、そのことによってSDS-PAGEゲルにおいて予想される領域に切断されたポリペプチドが存在することが確認された。

10

【0970】

サイズ排除クロマトグラフィ

【0971】

タンパク質複合体がNifSとNifUの間に形成されたことをさらに確認するため、濃縮された溶離液のサンプルを、Superdex 200 Increase 3.2/300カラムを用いて高分解能サイズ排除クロマトグラフィに適用した。カラムの較正は、天然タンパク質サイズマーカー（Biorad Gel Filtration Standard カタログ番号151-1901）を用いて実施した。カラムからの分画を、変性SDS-PAGE上でのサンプルの電気泳動によってさらに分析した。クロマトグラムとウエスタンブロットの分析は、NifSとNifUが複合体を形成したことを示した。なぜならNifSタンパク質は、NifDで予想されるよりも大きな分子量で溶離したからである。これは、2つのNifSポリペプチドと2つのNifUポリペプチドの会合によってヘテロ四量体が形成されたことを示していた。

20

【0972】

UV/可視分光法がNifU上でiros-硫黄クラスターを検出した

【0973】

第4の実験からのStreptactinXTカラムで精製したNifUとNifSを含有する溶離液を、50 mMのTris-HCl pH 8.0と300 mMのNaClで平衡させたPD10カラム（GE Healthcare社）に適用し、ビオチンと過剰な Fe^{2+} とシステインを除去した。スクリーキャップと通路が1 cmの隔膜が付いた嫌気性キュベットをCary 100 Bio UV/可視分光測光器で使用してスペクトルを取得した。スペクトルは、タンパク質に関してトリプトファンからの吸収に起因することが予想される280 nmに1つの主要なピークを示した。それに加え、第2のピークが325 nmに、肩部が420 nmと460 nmに観察された。これは、NifU上にFe-Sクラスターが存在することを示していた。

30

【0974】

最初にすべてのNifSを精製することによるNifSポリペプチドとNifUポリペプチドの会合のさらなる検証

【0975】

上述のように、植物細胞の中で一過性に発現させるため、MTP-FA γ 51::NifS::TS融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクト（SN231と名づける）を設計して作製した。このコンストラクトは、NifU配列ではなくてNifS配列を持つ点を除き、MTP-FA γ 51::NifU::TS融合ポリペプチドをコードするSN166と同様であった。上述のSN31/SN166の組み合わせと同様にしてSN231とSN32を*N. benthamiana*の葉に同時に浸透させ、タンパク質抽出液を上述のようにして調製した。上清を、StrepTactinXTカラムを通過させ、TwinStrepエпитープを含有するNifS融合ポリペプチドを精製した。溶離されたタンパク質と濃縮されたタンパク質のサンプルをウエスタンブロットングによって分析し、抗Strep抗体と抗HA抗体で調べた。プロット（図19）は、溶離液の中にプロセッシングを受けたscar9::NifU::HAポリペプチドのほかにscar9::NifS::TSポリペプチドが存在しているこ

40

50

とを示した。これは、プロセッシングを受けたNifSポリペプチドとNifUポリペプチドが植物細胞からの抽出液の中で会合していることを再度示している。

【0976】

この精製からの溶離液に対しても上記のようにしてサイズ排除クロマトグラフィを実施し、分画を、抗strep抗体と抗HA抗体を用いたウエスタンブロットによって分析した。ウエスタンブロット分析から、NifUとNifSが複合体を形成したことが確認された。

【0977】

将来、精製されたNifSポリペプチドとNifUポリペプチドがInductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) によって分析されてタンパク質の鉄含量が求めるとともに、メスバウアー質量分析により、ポリペプチドに結合したFe-Sクラスターの存在とタイプとレドックス状態が確認されるであろう。

【0978】

クラスターの形成は、添加された Fe^{2+} とL-システインとのインビトロ反応において示することができる。1つの実験では、野生型NifHポリペプチドを*A. vinelandii*から精製し、Fe-Sクラスターをキレート化によって除去し、アポ-NifHポリペプチドを生成させる。野生型NifD-NifK複合体も*A. vinelandii*から精製する。インビトロARAアッセイは、上述のようにして*N. benthamiana*細胞から精製された精製NifUポリペプチドがFe-Sクラスターをアポ-NifHポリペプチド供与することができ、そのことによってARA活性のためのニトロゲナーゼレダクターゼとしてのNifH活性が再構成されることを示している。

【0979】

実施例15：植物細胞の中でNifVを発現させることによるホモクエン酸の産生

【0980】

緒言

【0981】

(R)-2-ヒドロキシ-1,2,4-ブタン-トリカルボン酸（本明細書では、一般に知られているホモクエン酸と呼ぶ）が、既知のあらゆるニトロゲナーゼ（すなわち、それぞれ、モリブデン（Mo-Fe）ニトロゲナーゼ、バナジウム（V-Fe）ニトロゲナーゼ、および鉄（Fe-Fe）ニトロゲナーゼ）の活性に必要とされる。（HuとRibbe、2016年）。窒素を還元するMo系酵素のためのニトロゲナーゼタンパク質はNifDポリペプチドとNifKポリペプチドの $\alpha_2\beta_2$ 四量体であり、この四量体は、それぞれの α サブユニットの中のFeMo補因子（FeMoco）のほか、それぞれの α/β サブユニットの界面にある $[\text{Fe}_8\text{S}_7]$ 複合体（Pクラスターと呼ばれる）を含有する。ホモクエン酸分子を含むFeMocoは、 N_2 の還元に不可欠である。

【0982】

ホモクエン酸（HC）は、ニトロゲナーゼを発現する細菌の中で不可欠なニトロゲナーゼ補因子FeMoco、FeVco、およびFeFecoの一部を形成し、その補因子のMo、V、またはFe原子にその2-ヒドロキシ基と2-カルボキシ基を通じて結合する。FeMoco、FeVco、およびFeFecoは触媒部位に位置しており、これら3つの補因子は、大まかに同じやり方で N_2 を結合させ、活性化し、還元すると考えられている。FeMoco（Mo-ニトロゲナーゼのMクラスターとしても知られる）は、3つの架橋無機スルフィド（「ベルトスルフィド」と呼ばれる）と1つの間質カーバイド原子を通じて接合された原子 $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$ サブクラスターと $[\text{MoFe}_3\text{S}_3]$ サブクラスターを含有しており（HuとRibbe、2016年）、化学式 $\text{HC-Mo-Fe}_7\text{-S}_9\text{-C}$ を持つ補因子を形成する。バナジウム-ニトロゲナーゼはその補因子FeVcoを含んでおり、最近結晶化された（SippelとEinsle、2017年；Sippel他、2018年）。FeVcoはFeMocoとほぼ同じ金属-硫黄コアを持つが、モリブデン原子がバナジウム原子で置換され、ベルトスルフィドの1つの代わりにカーボネートイオンである点が異なっている。したがってFeVcoは、ホモクエン酸分子がバナジウム原子に連結された $[\text{HC-V-Fe}_7\text{-S}_8\text{-CO}_3\text{-C}]$ クラスターである。触媒性V-ニトロゲナーゼ酵素（VnfDGK）の一部である*Azotobacter vinelandii* VnfDポリペプチドの場合には、メタロクラスターのホモクエン酸がVnfDのアミノ酸C257とH423に配位結合する。これらのリガンドアミノ酸は、Mo-ニトロゲ

10

20

30

40

50

ナーゼのNifDと比べて高度に保存されている。Mo-ニトロゲナーゼとV-ニトロゲナーゼは一酸化炭素(CO)に対する反応性が異なっており、COは前者を抑制するが、後者によって炭化水素に変換される(Sippel他、2018年)。ホモクエン酸は同様にFeFecoの一部を形成し、この補因子はAnfDポリペプチドに同様に結合する。Fe-ニトロゲナーゼはV-ニトロゲナーゼと比べてN₂還元活性が低く、V-ニトロゲナーゼはMo-ニトロゲナーゼよりも活性が低い。これは、3つの系すべてを備える生物は、相対的なMo、V、およびFeの生物学的利用能に応じた優先的な発現に頼っていることを示唆する。例えば細菌*A. vinelandii*は、Mo-、V-、およびFe-ニトロゲナーゼのそれぞれを発現することができるが、それぞれ異なる栄養条件下においてであり、V-ニトロゲナーゼはモリブデンが制限された条件下でだけ、そしてFe-ニトロゲナーゼは、MoとVの両方が制限されているときだけ発現する。

10

【0983】

自由生活性窒素固定菌では、ホモクエン酸はNifV遺伝子産物(アセチル-CoAと α -ケトグルタル酸(α KG)を縮合させてホモクエン酸にする酵素)によって産生される。(Zheng他、1997年)。NifVは、これら細菌の中でホモクエン酸を合成するのに必要な唯一の遺伝子産物である。ホモクエン酸の合成活性は、Zhengら(1997年)の中に記載されている酵素アッセイによって測定することができる。*A. vinelandii* nifV変異体は、完全に活性ないかなる形態のニトロゲナーゼも産生できないが、3つのニトロゲナーゼすべての活性は、増殖培地にホモクエン酸を添加することによって回復した(Zheng他、1997年)。添加されるホモクエン酸がないと、変異体nifV細菌はニトロゲナーゼを媒介とした異常な反応(変化した基質特異性と阻害剤特異性が含まれる)を示した。変異細菌はアセチレンを還元してN₂を発生させたが、N₂を還元しなかった(McLeanとDixon、1981年)。これらの変化した活性は、メタロクラスターの中にホモクエン酸に関係した内在性分子(クエン酸など)が組み込まれたことが原因であった(Hoover他、1988年)。ホモクエン酸は、活性部位の中に基質N₂を正しく配置する能力が独自であるため、完全かつ適切に機能するニトロゲナーゼにとって必要であると考えられる。

20

【0984】

A. vinelandii NifVは最もよく研究されているNifVであり(Zheng他、1997年; 配列番号163)、本明細書ではAvNifVと呼ぶ。大腸菌におけるAvNifVポリペプチドの過剰発現により、約89 kDaの分子量を持つ二量体タンパク質が生成し、単量体は44 kDaの分子量を持っていた。この酵素は酸素に対して不安定であり、酸素を21%含む空気に2時間曝露した後にその活性を約50%失った。その縮合活性のこの酸素感受性は、反応媒体へのMoO₄²⁻、Fe²⁺、またはMg²⁺の添加による影響を受けなかった。反応速度論は、AvNifVがアセチル-CoAに関して0.06 mM、 α KGに関して2.24 mMのKmを持つことを示した。NifVはアセチル-CoAを他のケト酸基質(オキサロ酢酸や α -ケトアジピン酸など)と縮合させることもできる(Zheng他、1997年)。

30

【0985】

マメ科植物-根粒菌共生(例えば*Lotus japonicus*と*Mesorhizobium loti*の間の共生)では、細菌パートナーは、NifV遺伝子によってコードされるホモクエン酸シンターゼ活性を持たない。その代わりに宿主植物*L. japonicus*がホモクエン酸シンターゼLjFEN1を発現し、根粒中での根粒菌による窒素固定のためのこの不可欠な有機酸を供給する(Hakoyama他、2009年)。LjFEN1ポリペプチドは*A. vinelandii* NifVとはどちらかと言えば離れた関係であり、これら2つのポリペプチドは約36%のアミノ酸が一致する。LjFEN1は540個のアミノ酸残基と約58.6 kDaの分子量を持つ。LjFEN1をコードする遺伝子にシグナルペプチド配列は見られなかった。これは、それがおそらく細胞質ゾルタンパク質であったことを示している。*L. japonicus*はFEN1の2つのオルソログ、すなわちアクセッション番号AK339695とAK339656を持ち、これらはLjFEN1とアミノ酸配列がそれぞれ81%と71%一致する。系統学的分析は、AK339695がLjFEN1から進化したことを示唆していた。LjFEN1が変異した*L. japonicus*植物と*M. loti*の間の共生では、その共生微生物(microsymbiont)がAvNifV遺伝子またはFEN1遺伝子の異種コピーを有する場合に、検

40

50

出可能なニトロゲナーゼ活性を持つ完全に機能する根粒が生成した。

【0986】

菌類（酵母*Saccharomyces cerevisiae*など）は、他の多くの真核生物とは異なり、リシン生合成経路においてNifV様酵素を通じて中間体としてのホモクエン酸を産生する（Thomas他、1966年；Verhasselt他、1995年）。その経路において機能するNifV様酵素をコードする遺伝子ORF D1298が変異した酵母は、LjFEN1の過剰発現によって補完された。

【0987】

多数の植物種のゲノム分析は、細菌との共生関係に關与する植物だけが活性なホモクエン酸シンターゼ（LjFEN1など）を発現し、NifV様遺伝子は非マメ科植物には見られないことを示している（Hakoyama他、2009年）。それに加え、高等植物では、中間体としてのホモクエン酸を通じてリシンを合成する代謝経路はこれまでに同定されていない。これらの報告に合致するように、*N. benthamiana*のゲノム配列の調査（Naim他、2012年）からは、NifVまたはFEN1のいかなるホモログも同定されなかった。相同性に関して同定された最も近い遺伝子は、ロイシン生合成に關与するがホモクエン酸合成には關与しない酵素2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（EC. 2.3.3.13）をコードする遺伝子と相同だった1つの遺伝子（QUT *N. benthamiana* Genome and Transcriptome DBアクセッション番号P72026）であった。本発明の発明者らは、*N. benthamiana*がNifVまたはFEN1様酵素によってホモクエン酸を正常に産生することはなかったと結論した。本発明の発明者らは、バニラの鞘に関する1つの報告（Palama他、2009年）以外に、非マメ科植物（タバコ、ワタ、および穀類が含まれる）で産生されるホモクエン酸の報告を知らない。非マメ科植物でホモクエン酸を産生させるのに用いられるFEN1またはNifVの既知の報告は存在しない。

【0988】

結果

【0989】

上記の実施例2～4に記載されているように、*K. oxytoca*アミノ酸配列（KoNifV；配列番号13）に基づいていて植物細胞の中のミトコンドリアを標的とするNifV融合ポリペプチドは、遺伝子コンストラクトSN142から産生されたとき、MPPによる効率的（90%超）かつ正確なプロセッシングを受けた。この遺伝子コンストラクトが発現したときの翻訳された融合ポリペプチドは、ミトコンドリアを標的とするためのN末端MTP-FAγ51と、ウエスタンブロッティングによる検出のためのC末端HAエピトープを持っていた。さらに、*K. oxytoca*アミノ酸配列に基づいていてN末端の位置に融合されたFAγ-scar9モチーフを持つNifVポリペプチドは、大腸菌の中で機能して野生型に近いレベルのニトロゲナーゼ活性をサポートすることが実証された（MIT2.1系の中では野生型と比べて約90%の活性が提供された）ため、9アミノ酸N末端伸長部を持つNifV融合ポリペプチドは活性なままであった（実施例4）。しかしプロセッシングを受けたKoNifVポリペプチドは植物ミトコンドリアの中に不溶性形態で蓄積した（図3）。

【0990】

*N. benthamiana*細胞における*K. oxytoca* NifV融合ポリペプチドの不溶性は、本発明の発明者らにより、植物細胞の中でニトロゲナーゼ機能を構成するのに問題であると見なされた。なぜなら実質的に不溶性のポリペプチドはホモクエン酸を合成するのに十分な酵素機能を提供する可能性が小さかったからである。そこで本発明の発明者らは、ミトコンドリア局在化と検出のための同じMTP配列とHAエピトープ配列に融合された天然NifVと他のHCS様バリエーションの発現により、可溶性がより大きいNifVポリペプチドを探した。

【0991】

バリエーションNifV配列の選択

【0992】

配列データベースを検索し、KoNifVアミノ酸配列と関係するNifVバリエーション配列と他のホモクエン酸シンターゼ（HCS）酵素を探した。配列は、広い範囲の細菌と酵母からの

10

20

30

40

50

ものであり、その中には耐熱性細菌からのいくつかが含まれていた。NifVポリペプチド配列を、UniProtデータベースから、NifVを質問として用いて取り出した。データベースへのアクセス日は2018年9月14日である。2044個のNifV/HCS様アミノ酸配列が同定されてデータベースから取り出された。代表的な配列を選択して調べるため、タンパク質の類似性に基づいてタンパク質ネットワークを確立すると、タンパク質の類似性に基づいてNifV/HCS様ポリペプチドがクラスター化した。そうするため、アミノ酸配列をMAFFT（アミノ酸またはヌクレオチドの配列のための多重アラインメントプログラム）ソフトウェア、バージョン7を用い、サーバー`mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html?aug31`を利用してアラインメントした。5000部位よりも短い10000個未満の配列のための戦略G-large-INS-1を利用した。出力は、オンライン配列コンバータ（`www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html`）を用いて.pir形式から.phy形式に変換した。

【0993】

Cytoscape (`https://cytoscape.org`) ソフトウェアを用い、互いに関係する配列のクラスターを可視化した。距離行列を計算し、Cytoscapeのための入力ファイルの中のデータを用意するため、PHYLP/protodistプログラムを用いてNifV配列についてKimura距離行列を計算した。Notepadを用いて出力ファイルを改変し、Cytoscapeの中のaMATReaderにとって適切な入力形式を用意した。次に距離行列をExcelの中で改変してファイルサイズを小さくし、サブグループを定義した。0.1よりも大きかったすべての値を除去することによってサブグループを作り出し、冗長な配列を除去した。

【0994】

1つの代表的なHCS様アミノ酸配列が、HCSとそれに関係する配列の6つのクラスターのそれぞれから選択された。それに加え、3つのMethanocaldococcus infernus HCS配列が、より耐熱性である可能性が大きく、おそらく安定かつ可溶性であるままに留まるという理由で選択されるとともに、比較用にK. oxytoca (KoNifV) とA. vinelandii (AvNifV) からNifV配列が選択された。KoNifV（アクセッション番号WP_004138778；配列番号164）のバリエーションも、細菌発現コンストラクトMIT2.1の中のアミノ酸配列に基づいて同定された。EC38020の中のKoNifVとMIT2.1の中のNifVのアミノ酸配列は、配列番号13と比べてアミノ酸155～157と232～236が異なっていたが、それ以外は一致していた。1つのSaccharomyces cerevisiae HCS (ScHCS) 配列も選択された。これはS. cerevisiae遺伝子Lys21pに対応しており、Verhasselt他（1995年）の中ではD1298と呼ばれている。S. cerevisiaeの中の相同な酵素Lys20はより活性であり、リシンによる負の調節がより少ないように見えた。

【0995】

選択された配列が、EC38020からのKoNifV（配列番号13）とのパーセンテージ一致とともに表15に掲載されている。アミノ酸配列に関する配列アラインメントが図20として示されており、この図には高度に保存されたアミノ酸が示されている。明らかに、選択された配列はNifV/HCS様配列の広い範囲をカバーした。

【0996】

10

20

30

40

50

【表 15】

表15：調べるために選択されたNifV配列とNifV/HCS様配列

配列の ID	Genbank アクセス	生物	配列一致 (%)	配列番号
KoNifV	AFI71011	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	13
KoNifV (MIT2.1)	WP_004138778	<i>Klebsiella oxytoca</i> , pMITV の中のバリエーション NifV	98	164
AvNifV	CP001157	<i>Azotobacter vinelandii</i>	42	163
TbHCS	CP002466	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	56	206
TpHCS	CP002028	<i>Thermincola potens</i>	65	207
ScHCS	CP036483	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43	208
NsHCS	CP007203	<i>Nodularia spumigena</i>	43	209
MaHCS	AE010299	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	55	210
CtHCS	AE006470	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	27	211
MiHCS1	ADG13125	<i>Methanocaldococcus infernus</i>	44	212
MiHCS2	ADG13175	<i>Methanocaldococcus infernus</i>	42	213
MiHCS3	ADG14004	<i>Methanocaldococcus infernus</i>	40	214
LjFEN1	BAI49592	<i>Lotus japonicus</i>	30	215

【0997】

NifV配列とNifV/HCS様配列を有する融合ポリペプチドをコードするプラスミドの構築

【0998】

次に、表15に掲載されている選択されたNifV配列とNifV/HCS様配列を持つとともにそれぞれのN末端にMTP-FAγ51を持つ融合ポリペプチドについて、植物細胞の中で発現する能力、ミトコンドリアの中でのMPPによるプロセッシング、およびホモクエン酸の産生を調べた。それぞれのミトコンドリア標的型ポリペプチドの可溶性も、実施例1に記載されている方法を用いて調べた。これらの実験は、これらの配列をコードする遺伝子コンストラクトを生成させ、それらを*N. benthamiana*の葉系の中で発現させることによって実施した。それぞれのコードされた融合ポリペプチドは、抗HA抗体で検出するため、MTPとNifV/HCS様配列の間に位置する同じHAエピトープを持っていたが、例外として、SN142によってコードされるKoNifV融合ポリペプチドはそのC末端にHAエピトープを持っていた（表15）。したがってこの実験は、それぞれのNifV/HCS様配列へのN末端伸長部またはC末端伸長部が植物細胞の中でホモクエン酸の産生を相変わらず可能にするかどうかを調べる設計にされた。遺伝子コンストラクトの並列セット（表15）を作り、N末端にMTP-FAγ51配列を欠くが代わりにN末端HAエピトープを持つ細胞質標的型ポリペプチドを発現させた。そうすることにより、それぞれの融合ポリペプチドの発現と機能を、MTPを欠く対応する細胞質ポリペプチドと比較した。

【0999】

それぞれの融合ポリペプチドのためのDNA配列を、GoldenGateクローニングプロトコルに適合する、植物で発現させるためのコドン最適化を利用して合成した。GoldenGateクローニングプロトコルによってモジュール式クローニング系を用いて遺伝子コンストラクトを作製した。SN142を除き、DNA構成要素は、組み立てるために5'から3'への順に、35S CaMVプロモータ（EC51288）、MTP-FAγ51とHAエピトープの後にGGリンカー

をコードするキメラ配列（EC38095）、NifV/HCS様バリエーションのためのコドン最適化コード領域、そして最後に、CaMV 3'ポリアデニル化領域／転写ターミネータ（EC41414）であった。GoldenGate組み立て法に従ってこれらの構成要素を組み立てて望む遺伝子コンストラクトを作り、IIS型制限クローニングを利用して発現ベクターに挿入した（Weber他、2011年）。得られたコンストラクトは表16に掲載されている。MPPプロセシングの前と後のコードされた融合ポリペプチドの分子量は、モノアイソトピック設定でExPASy計算pl/Mw（web.expasy.org/compute_pi/）を用いて計算された。

【1000】

【表16】

表16：N. benthamianaの葉において、または安定に形質転換された植物においてNifV/HCS様融合ポリペプチドを一過性発現させるための遺伝子コンストラクト。MTP、FAγ51ミトコンドリア標的ペプチド；Mw、分子量；na、該当なし。

コンストラクトの ID	融合ポリペプチド	長さ（アミノ酸）	Mw（Da）	プロセシング後の長さ（アミノ酸）	Mw（Da）
SN142	MTP::KoNifV::HA	445	48088	403	43529
SN248	MTP::HA::TbHCS	447	49336	405	44777
SN249	MTP::HA::TpHCS	442	48521	400	43963
SN250	MTP::HA::ScHCS	504	55488	462	50929
SN251	MTP::HA::NsHCS	440	47715	398	43156
SN252	MTP::HA::MaHCS	440	48316	398	43758
SN253	MTP::HA::CtHCS	440	47931	398	43372
SN254	MTP::HA::AvNifV	448	48395	406	43836
SN255	MTP::HA::MiHCS1	575	62818	533	58259
SN256	MTP::HA::MiHCS2	554	60106	512	55548
SN257	MTP::HA::MiHCS3	460	50986	418	46428
細胞質コンストラクト					
SN212	KoNifV::HA	392	42362	na	na
SN258	HA::TbHCS	395	43741	na	na
SN259	HA::TpHCS	390	42926	na	na
SN260	HA::ScHCS	452	49892	na	na
SN261	HA::NsHCS	388	42120	na	na
SN262	HA::MaHCS	388	42721	na	na
SN263	HA::CtHCS	388	42336	na	na
SN264	HA::AvNifV	396	42800	na	na
SN265	HA::MiHCS1	523	57223	na	na
SN266	HA::MiHCS2	502	54511	na	na
SN267	HA::MiHCS3	408	45391	na	na
SN70	HA::LjFen1	552	59962	na	na

【1001】

N. benthamianaの葉における発現と、可溶性とホモクエン酸産生の検査

【1002】

それぞれの遺伝子コンストラクトを、実施例1に記載されている方法を用いてアグロバクテリウムを通じてN. benthamianaの葉に導入した。葉サンプルを浸透の5日後に採取し、タンパク質抽出液を作り、HA抗体を用いたウエスタンブロット法によって分析した（図21と図22）。下に記載されているように、並列の葉サンプルを採取して代謝物を抽出し、GC-MS/MS技術によってホモクエン酸のレベルを測定した。

【1003】

10

20

30

40

50

ミトコンドリア標的型ポリペプチドと細胞質標的型ポリペプチドの両方とも、調べた融合ポリペプチドのすべてがウエスタンブロッティング分析によって容易に検出されたため、植物細胞の中で効率的に発現した。以前に観察されたように（図3）、ミトコンドリア標的型K. oxytoca NifV融合ポリペプチドは優れたレベルで産生されてMPPによる効率的なプロセッシングを受けたが、植物細胞の中では実質的に不溶性であった。同様に、ミトコンドリア標的型MiHCS2、MiHCS3、およびMaHCS融合ポリペプチドも優れたレベルで発現してプロセッシングを受けたように見えたが、不溶性であった。NsHCSとMiHCS1融合ポリペプチドはプロセッシングを受けたように見えたが、ほんの一部が可溶性であった。それとは対照的に、TbHCS、TpHCS、およびCtHCS融合ポリペプチドは、ミトコンドリアを標的としたとき、プロセッシングを受け、実質的に可溶性であるように見えた。ミトコンドリア標的型S. cerevisiae HCS (ScHCS) は他のポリペプチドよりも低いレベルで発現したように見えたが、十分にプロセッシングを受け、可溶性であった。Azotobacter vinelandii NifV (AvNifV) 融合ポリペプチドは、MTP-FA γ 51を用いて植物ミトコンドリアを標的としたとき、優れたレベルで発現し、効率的にプロセッシングを受け、部分的に可溶性（約50%）であった。同様に、Chlorobaculum tepidum HCS (CtHCS) は、MTP-FA γ 51を用いて植物ミトコンドリアを標的としたとき、よく発現し、効率的にプロセッシングを受け、可溶性であった。

【1004】

細胞質標的型ポリペプチドの大半は、KoNifVポリペプチドを含め、ミトコンドリア標的型ポリペプチドとは異なって可溶性であるか少なくとも部分的に可溶性であった（図22）。本発明の発明者らは、不溶性がいくつかの場合にはミトコンドリア局在化に起因すること、そしてポリペプチドはこれら2つの場所で異なるレベルの可溶性を示す可能性があることを結論した。一般に、細胞質標的型ポリペプチドのシグナル強度は、対応するミトコンドリア標的型ポリペプチドと比べて弱かった。例外はScHCS、MiHCS1、およびKoNifVであり、これらの内部で細胞質標的型ポリペプチドは、ミトコンドリアを標的とする対応物と比べて発現レベルが優れているように見えた。

【1005】

ホモクエン酸のレベルを測定するためのガスクロマトグラフィ-タンデム質量分析（GC-MS/MS）

【1006】

遺伝子を導入した後の葉サンプル中のホモクエン酸のレベルを測定し、そのことによってミトコンドリア標的型融合ポリペプチドまたは細胞質標的型融合ポリペプチドのHCS活性を実証するため、GC-MS/MS法を以下のように開発して検証した。あらゆるホモクエン酸を含む極性代謝物を、湿潤な葉の重量当たり10体積（v/w）の抽出溶液の中に抽出した。抽出溶液は、メタノール： H_2O （1：1 v/v）の中に、内部標準として、22 μM のD4クエン酸（Cambridge Isotope Laboratories Inc.社、カタログ番号DLM-3487）、36 μM の13Cフマル酸（Cambridge Isotope Laboratories Inc. 社、カタログ番号CLM-1529）、23 μM の13Cソルビトール（Cambridge Isotope Laboratories Inc. 社、カタログ番号CLM-1565）、31 μM のD3アスパラギン酸（Cambridge Isotope Laboratories Inc. 社、カタログ番号DLM-832）、および54 μM のD5グリシン（Cambridge Isotope Laboratories Inc. 社、カタログ番号DLM-280）を含有していた。1.5 mlのマイクロフュージチューブの中でQiagen組織ライサーと3 mmのタングステンカーバイド製ビーズを用い、葉サンプルを抽出溶液と均質化した。葉サンプルは、あらかじめ-80℃に冷やしたラックの中でチューブの位置を回転させながら1/20 rpmで3分間ずつ2回均質化した。均質化の後、サンプルを4℃にて10,000 $\times g$ で30分間遠心分離して固体物質を除去し、代謝物を含有する得られた上清を回収し、分析するまで-80℃で保管した。30 μl の各上清を代謝物の誘導体化のため真空濃縮器の中で乾燥させた。それは、以下のように手作業で実施した。それぞれの乾燥サンプルに20 mg/mlのメトキシアミンヒドロクロリド10 μl を含むピリジンを追加した。この溶液を15分間隔で攪拌しながら37℃で90分間インキュベートした後、15 μl のN,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド+トリメ

チルククロシラン (BSTFA+TMCS) (99:1) を添加し、この溶液を15分間隔で攪拌しながら37℃で30分間にわたって再度インキュベートした後、5 µlのアルカンミックス (n-ドデカン、n-ペンタデカン、n-オクタデカン、n-エイコサン、n-ペンタコサン、n-ヘプタコサン、n-ドトリアコンタンがそれぞれ0.029%w/v) を添加して混合した。それぞれの誘導体化ミックスは、GC-MS分析の前に周囲温度で60分間放置した。

【1007】

GC-MS代謝産物分析を、DB-5キャピラリーカラム (30 m×0.25 mm ID×1 µmフィルム厚) を備えたShimadzu TQ8050ガスクロマトグラフィタンデム質量分析器で実施した。1 µlを1:10の分割モードで、入口を280℃に加熱したカラムに、キャリアガスとしてヘリウムを用いて注入した。炉の温度を100℃に設定して4分間維持した後、10℃/分で320℃まで上昇させて11分間維持した。質量分析器のインターフェイスを280℃まで加熱し、イオン源を200℃にした。45と600の間の質量を全走査モードで測定した。多重反応モニタリング (MRM) モードのため、同じGCパラメータとMSパラメータで、標的イオンとクオリファイイオンがそれぞれの代謝物誘導体について設定した特定の保持時間ウィンドウの間にある467種類の化合物を含有するShimadzu MRMライブラリを検出に使用した。衝突エネルギー3~45 Vの間でm/z=287、243、147、および73を走査することによって多重反応モニタリング (MRM) パラメータがホモクエン酸4TMSのために開発され、MRM分析プロトコルに含められた。この走査に基づき、以下の2つの断片化パターン、すなわち21 Vでのm/z=287>73と、9 Vでの参照イオンm/z=287/243を保持指数1931での検出に使用した。1つのサンプルから次のサンプルへの注入シリンジの汚染を阻止するため、シリンジを5回洗浄し (毎回、ヘキサンの後に酢酸エチルとアセトンの1:1 v/v溶液を使用)、次いでピリジンでリンスして以前のサンプルからあらゆる残留ホモクエン酸4TMSを除去した。MRMモードで同定された推定化合物を、特定の保持時間の質量スペクトルをNIST17ライブラリおよびGolmメタボロームデータベース (Hummel他、2007年) で検索する全走査モードで得られたクロマトグラムでクロスチェックした。

【1008】

植物細胞におけるホモクエン酸産生の結果

【1009】

サンプルの多くでホモクエン酸がこの方法によって容易に検出されて測定された。NifV/HCS配列なしでp19コンストラクトだけを浸透させた対照である*N. benthamiana*の葉サンプルは、低いバックグラウンドレベルのホモクエン酸を示した。GC-MS/MS法は過度に高感度であったため、低レベルのホモクエン酸が同定されたのは驚くことではなかった。対照植物でのシグナルは真正であると見なされた。なぜならこの方法では、2つの診断イオンと、真正の市販基準に対する保持時間が使用されたからである。品質管理 (QC) 基準ミックスまたは抽出バッファだけの中にはこれらの特定のイオンに関するバックグラウンド雑音は存在していなかった。

【1010】

浸透なしの葉サンプルと、GFPをコードする遺伝子を接種した葉も、低いバックグラウンドレベルのホモクエン酸を示した。3つの陰性対照 (GFP、p19、野生型) のピーク面積のうちで最大値を持つベースラインピーク面積を選択した。NifV/HCS遺伝子を浸透させた各サンプルについて、ベースラインホモクエン酸標的イオンピーク面積を、試験サンプルのピーク面積から差し引いた。規格化したピーク面積をlog₁₀スケールに変換し、そのデータを図23に示してある。

【1011】

データは、*K. oxytoca*からのNifV/HCSポリペプチド (KoNifV) と、*Methanocaldococcus infernus*からの3つすべて (MiHCS1、MiHCS2、およびMiHCS3) が、ミトコンドリア標的型ポリペプチドと細胞質標的型ポリペプチドの両方で、ベースラインレベルよりも上の検出可能なホモクエン酸を生成させなかったことを示した。これらのデータは、ミトコンドリア標的型ポリペプチドで観察されたKoNifVとMiHCSの不溶性 (図20と図21) と合致していたが、細胞質標的型ポリペプチドでのHCS活性の欠如は謎であった。M. i

nfernusポリペプチドは、*N. benthamiana*の生長温度で不活性であった可能性がある。それとは対照的に、他のNifV/HCS配列のうちの7つを含むミトコンドリア標的型と細胞質標的型の融合ポリペプチドの両方とも、葉細胞の中でのホモクエン酸の産生に関して明らかに活性であった。

【1012】

いくつかの特別な観察結果が特に注目に値した。*S. cerevisiae* HCS (ScHCS) ポリペプチドは、調べたポリペプチドの中でホモクエン酸の産生に関して最も活性で、他のポリペプチドよりも10~100倍活性であり、ミトコンドリアに局在化しているか細胞質に局在化しているかには無関係であった。ScHCSのN末端にあるHAエピトープを含めて配列ISTQVVRNRGGYPYDVPDYAGG (配列番号166) を持つ22アミノ酸N末端伸長部 (癒痕配列) は、明らかにHCS機能が可能であった。ScHCSのN末端にあるより短い12アミノ酸癒痕配列MYPYDVPDYAGG (配列番号165) も機能することができた。最も驚いたのは、(MTP::HA::AvNifVをコードしており、プロセッシングを受けてscar9-HA::AvNifVになる) SN254からの406個のアミノ酸からなるAvNifV融合ポリペプチドが、植物ミトコンドリアに向けられたとき、細胞質標的型ポリペプチドと比べて27倍多いホモクエン酸を産生したことである。これは、SN253から産生された*Chlorobaculum tepidum* HCS (CtHCS) にも当てはまったが、その程度はより少なかった。これらの観察結果になることの最もありそうな理由は、AvNifVとCtHCSポリペプチドが両方ともいくらか酸素感受性であり、ミトコンドリアに位置すると酸素からより保護されるため、より大きな活性を生じさせたというものであった。それと同時に、AvNifVとCtHCSが細胞質の中に位置するときの明確なホモクエン酸産生は、これら2つのポリペプチドが酸素をある程度許容する可能性があることを示唆していた。AvNifVの酸素感受性は、Zhengら (1997年) によって報告されている。同様に、*Thermincola potens*、*Thermoanaerobacter brockii*、および*Methanosarcina acetivorans*のHCSも、それがどこに位置するかに関係なくホモクエン酸を産生した。注目すべきことに、これら3つのHCSは、細胞質に位置するときにより活性であった。これは、これらが酸素感受性ではなかったことを示している。ScHCSで観察されたように、AvNifVのN末端に配列ISTQVVRNRGGYPYDVPDYAGG (配列番号166) を持つ22アミノ酸伸長部は、機能することができた。

【1013】

ScHCSはホモクエン酸の産生が最高レベルであったため、高レベルのホモクエン酸産生を望む場合には、植物ミトコンドリアの中で組み換えNif経路の一部として用いるのに最適なNifV/HCSであると本発明の発明者らによって見なされた。しかし他のHCS配列の任意のものをFeMocoの合成に使用できた。なぜならホモクエン酸は、ニトロゲナーゼ反応において使い果たされないため、それほど必要とされない補因子の一部を形成するからである。NifV機能の最適なレベルは経験的に決めることができる。それについては下記の実施例にさらに記載されている。

【1014】

FeMocoの合成とその後のニトロゲナーゼ活性は、Curattiら (2007年) によって報告されているように、NifB、NifX、NifE、NifN、NifH、アポNifD-NifK、NafY、Mo、Fe、S、s-アデノシルメチオニン、ATP再生混合物 (ATP、ホスホクレアチン、クレアチンホスホキナーゼ)、およびR-ホモクエン酸をインビトロで組み合わせることによって実現することができる。これは、この組み合わせ混合物が十分なホモクエン酸を提供する場合には、NifVは他のNif構成要素と物理的に相互作用する必要がないことを示唆している。NifHは特にATP依存性Mo-ホモクエン酸インセルターゼとして機能し、FeMocoを組み立てるためにMo-ホモクエン酸をNifE-NifN複合体に供給すると考えられている (Hu他、2013年)。本発明の発明者らは、植物ミトコンドリアの中でのScHCSによる高レベルのホモクエン酸産生に有害である可能性のある効果が存在する場合には、AvNifVがScHCSよりも組み換えNif経路の一部としてより適していると考えた。というのもAvNifV酵素は、それが産生するホモクエン酸を物理的会合によってNifHに供給する可能性がより大きかったからである。

【1015】

N. benthamiana細胞の中の α -ケトグルタル酸とピルビン酸の測定

【1016】

GC-MS代謝物分析は、 α KGの誘導体である α -ケトグルタル酸(α KG) 1MEOX 2TMSと、ピルビン酸の誘導体であるピルビン酸1MEOX 1TMSも検出した。 α KGと(ピルビン酸デヒドロゲナーゼによるピルビン酸の酸化から生じる)アセチル-補酵素A(Ac-CoA)は、NifV/HCS酵素がホモクエン酸を合成するのに用いる2つの基質である。ScHCSは、N. benthamianaの葉で発現したとき、 α KGとピルビン酸のレベルを、A. vinelandii NifVがミトコンドリアを標的としたとき(α KGとピルビン酸は、NifV/HCSを欠く陰性対照の葉におけるのと実質的に同じレベルであった)と比べて低下させた。 α KGとピルビン酸はミトコンドリアマトリックス内でのTCAサイクルの鍵となる中間体であるため、それらのレベルの低下はミトコンドリア機能全体に対して有害な効果を持つ可能性がある。そのため有害なレベルとなるNifV/HCSの過剰発現は避けるべきである。したがってAvNifVは、AvNifVによって産生されたホモクエン酸を、おそらくより高濃度のホモクエン酸を必要とする拡散を通じてではなくタンパク質-タンパク質相互作用を通じてNifHに供給できる場合には、NifHよりもFeMoco、FeVco、またはFeFecoの組み立てにより適していると考えられると結論された。

10

【1017】

実施例16：植物細胞の中で発現したときのNifHバリエーションの可溶性

【1018】

緒言

20

【1019】

Klebsiella oxytocaからのNifHポリペプチド(KoNifH；配列番号1)は、一過性葉発現系においてMTP配列とHAエピトープ配列を持つ融合ポリペプチドとして発現させたとき、植物ミトコンドリアの中でほとんど不溶性であること、またはいくつかの実験では完全に不溶性であることが見いだされた(実施例3)。NifH融合ポリペプチドは、MTP配列がMPPによって正しく切断されていたにもかかわらず、N. benthamianaミトコンドリアの中では正しく折り畳まれないか、膜と会合したままであったため、その状況でNifHタンパク質として適切に機能する可能性は低かった。それとは対照的に、K. oxytoca NifH配列を含むがN末端にMTP配列を欠いていてミトコンドリアではなく細胞質に向けられたNifH融合ポリペプチドは、一過性葉発現系において可溶性であった。したがってこの融合ポリペプチドの不溶性は、ミトコンドリア局在化と関係していた。以前にLopez-Torrejonら(2016年)は、Azotobacter vinelandiiからのNifHはNifHの電子輸送機能を保持しており、酵母ミトコンドリアの中で可溶性であることを報告した。しかしストックホルム(スウェーデン国)でのある会議で、A. vinelandiiからのNifHは、おそらく低い可溶性のため、一過性葉発現系において植物ミトコンドリアの中に低レベルでしか蓄積しなかったことも報告された(ストックホルムにおけるENFCでのXi Jiang、2018年)。したがって本発明の発明者らには、酵母細胞と植物細胞は、任意の1つの特定のNifHポリペプチドの可溶性および／または機能に関して異なる可能性があるように見えた。

30

【1020】

結果

40

【1021】

N. benthamianaにおける高レベルの発現を調べたKoNifH融合ポリペプチドの明らかな不溶性の問題を回避するため、本発明の発明者らは、以下に記述する方法を利用して、他の生物に由来するNifHタンパク質のホモログの中から、植物ミトコンドリアの中で融合ポリペプチドとして可溶性である可能性があるものを検索した。

【1022】

ファミリーIPR005977(ニトロゲナーゼ鉄タンパク質NifH)を質問として用いてNifHポリペプチド配列をInterProデータベースから取り出した(データベースへのアクセスは2018年4月23日)。4183個のNifHアミノ酸配列が同定されてデータベースから取り出

50

された。代表的な配列を選択して調べるため、タンパク質の類似性に基づいてタンパク質ネットワークを確立すると、配列類似性に基づきNifHポリペプチドがクラスター化された。そうするため、サーバーmafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html?aug31を利用してアミノ酸配列をMAFFT（アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のための多重アラインメントプログラム）ソフトウェア、バージョン7でアラインメントした。5,000部位よりも短い10,000個未満の配列のための戦略G-large-INS-1を利用した。出力は、オンライン配列コンバータ（www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html）を利用して.pir形式から.phy形式に変換した。距離行列を計算してCytoscapeのための入力ファイルのデータを用意するため、PHYLIP/protodistプログラムを用いてNifH配列のためのKimura距離行列を計算した。出力ファイルをNotepad++を用いて改変し、Cytoscapeの中のアMATReaderのための適切な入力形式を用意した。次に距離行列をExcelの中で改変してファイルサイズを小さくし、サブグループを定義した。0.1よりも大きかったすべての値を除去することによってサブグループを作り出し、冗長な配列を除去し、ゼロ値を除去し、数値を3桁に丸めた。

【1023】

この距離行列を、aMATReaderアプリを無向ネットワークとして利用してCytoscapeに取り込んだ。そのとき、取り込みのためにデリミタ、すなわちタブ、非脱選択を用いた。この段階でネットワークは3,114個のノードと450,489個のエッジを含有していた。ネットワークをPrefuse Force Directedレイアウト（重みなし）を利用して可視化した。追加情報（入力名、状態、タンパク質名、遺伝子名、生物、長さ、および分類学的系列（PHYLUM）が含まれる）をUniProt知識ベースから取り出し、Cytoscapeに取り込んだ。ノードを門によって着色し、生化学的分析のために選択された配列を表わすノードをより大きなノードとして表示する。アミノ酸700個よりも長かったタンパク質配列をネットワークから除去した。11個のタンパク質配列が除去された。なぜならこれらの配列の長さ（731～804個のアミノ酸残基）は、260～300個のアミノ酸残基という典型的なNifHタンパク質の長さとは一致していなかったからである。11個の配列のうちの9つはメタノサルキナ属の種であり、1つはAnaerovirgula multivoransから、1つはTreponema azotonutriciumからであった。これらのタンパク質は典型的には「NifEH」と注釈された。それぞれのNifEHの第1の部分は、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスター結合部位であるPループを含むNifJと似た配列を持ち、それぞれの配列の第2の部分は、NifEまたはNifDとそれぞれ関係していた。メタノサルキナ属には、NifDをコードする遺伝子、またはNifEHのための遺伝子の隣に位置する似たポリペプチドが存在する。これらのNifEHポリペプチドはニトロゲナーゼタンパク質と構造的に関係していたが、異なる機能を持つ可能性がある。本発明の発明者らが知る限り、このようなタンパク質は学術文献で言及されたことがなく、いかなる実験データも入手できない。

【1024】

最終ネットワークは、3,103個のノードと450,486個のエッジを含有していた。ネットワークの生成と可視化のために使用したCytoscapeのバージョンは、3.6.1と3.7.0であった。InterProデータベースは、AnfHタンパク質またはVnfHタンパク質の別々のファミリーを含有していなかった。したがってこれらはNifHグループに含まれた。InterProメンバーデータベースからの寄与シグネチャ、すなわちCDD、TIGRFAM、およびHAMAPは、NifH、AnfH、VnfHの三者を識別しなかった。したがってAnfH配列とVnfH配列もアラインメントに含まれていた。AnfH配列のサブセットはNifH配列から同定された。

【1025】

配列選択

【1026】

13を超える配列を含有するそれぞれのクラスター化されたグループの1つの代表が、生化学分析をしてK. oxytoca NifHと比較するため選択された。これは、可溶性と機能を分析するために調べる好熱性窒素固定生物からのNifH配列を含んでいた（表17）。表17の温度の列に、生物のいくつかにとって最適な増殖温度を示した。選択されたNifH配列のそ

れぞれが配列番号1と配列が一致する程度は、表18に示されている。KoNifH以外で選択された、MTP-CoxIV-TwinStrep配列のC末端に融合されたNifHポリペプチドを含む融合ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号168～181に示されている。

【1027】

【表17】

表17: *N. benthamiana*の葉において融合ポリペプチドとして発現したときの可溶性を調べた、窒素固定生物と関連する生物からのNifH配列。

供給源である生物	温度 [°C]	配列番号	遺伝子コンストラクト	参考文献
<i>K. oxytoca</i>		1	SN41	
<i>Azospirillum brasilense</i>		168	SN178	
<i>Mastigocladus laminosus</i> (Fischerella)	45～50	169	SN179	Miyamoto 他 (1979年) ; Khumanthem 他 (2007年)
<i>Frankia casurinae</i>		170	SN180	
<i>Marichromatium gracile</i> 生物型 <i>thermosulfidophilum</i>	最高 44	171	SN181	Serrano 他 (2009年)
<i>Methanocaldococcus infernus</i>		172	SN182	Mehta と Baross (2006年)
<i>Helio bacterium modestum</i>	50 (最高 56)	173	SN183	Kimble 他 (1995年)
<i>Chlorobaculum tepidum</i> (<i>Chlorobium tepidum</i>)	48～50	174	SN184	Wahlund と Madigan (1993年)
<i>Geobacter</i> sp. M21		175	SN185	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>		176	SN186	
<i>Methanobacterium thermotrophicum</i>	40～70 (最適 65)	177	SN187	Smith 他 (1997年)
<i>Methanosarcina</i>		178	SN188	
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	36	179	SN189	
<i>Carboxydothemus pertinax</i>	一酸化炭素資化性 50～70 (最適 65)	180	SN190	Yoneda 他 (2012年)
<i>Nostoc calcicola</i>		181	SN191	

【1028】

*Carboxydothemus pertinax*株はおそらく窒素固定ができなかった。なぜならこの生物のNifDタンパク質コード領域は内部終止コドンを持っていたからである。したがってNifH配列も機能しなかった可能性がある。

【1029】

10

20

30

40

50

【表 18】

表18: K. oxytocaからのNifH (配列番号1) とのアミノ酸配列一致

NifH の出所 : 供給生物	%配列一致
<i>Azospirillum brasilense</i>	72.4
<i>Mastigocladus laminosus</i> (<i>Fischerella</i> 属の種)	72.1
<i>Frankia casuarinae</i> (株 DSM 45818 / CECT 9043 / CcI3)	75.1
<i>Marichromatium gracile</i> (<i>Chromatium gracile</i>)	85.0
<i>Methanocaldococcus infernus</i> (株 DSM 11812 / JCM 15783 / ME)	56.8
<i>Hellobacterium modesticaldum</i> (株 ATCC 51547 / Ice1)	74.9
<i>Chlorobaculum tepidum</i> (株 ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS) (<i>Chlorobium tepidum</i>)	65.8
<i>Geobacter</i> sp. (株 M21)	79.9
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (株 JCM 10833 / IAM 13628 / NBRC 14792 / USDA 110)	74.6
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (株 ATCC 29096 / DSM 1053 / JCM 10044 / NBRC 100330 / デルタ H) (<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>)	59.5
<i>Methanosarcina barkeri</i>	61.4
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> (株 ATCC 49208 / DSM 771 / VKM B-1644)	64.8
<i>Carboxydotherrmus pertinax</i>	61.0
<i>Nostoc calcicola</i> FACHB-389	56.3

【1030】

一過性葉発現系におけるNifHタンパク質の可溶性試験

【1031】

植物ミトコンドリア局在化のためMTP-CoxIV::TwinStrep::NifH融合体として発現したときのさまざまなNifHポリペプチドの可溶性を、strep抗体を用いたウエスタンブロット法によって評価した。TwinStrep配列はMTP配列とNifH配列の間に配置した。このエピトープを使用して、望む場合にNifH融合ポリペプチドのその後の精製が可能になるようにした。タンパク質抽出液を、浸透された葉組織から作り、好気条件下で分画して可溶性分画と不溶性分画を探した。それぞれのNifH融合ポリペプチドの可溶性を、それを(MTP-FAY51::NifM::HAをコードする)遺伝子コンストラクトSN44から発現させたK. oxytoca NifMとともに発現させたときに評価し、NifMとの同時発現が可溶性を増大させるかを見た。NifMはK. oxytocaにおけるNifHの成熟に関与すると考えられている。調べた他の種からのNifHポリペプチドが完全な活性のためにNifM様タンパク質を必要とするかどうかは知られていなかった。プロテオバクテリア以外の生物の大半はそのゲノムの中にNifMホモログを含有していないが、他の非相同タンパク質がNifMの代わりに似た機能を発揮する可能性がある。

【1032】

ウエスタンブロット分析(図24)は、M. laminosus、M. infernus、H. modesticaldum、C. tepidum、Geobacter sp. M21、およびM. thermoautotrophicusからのNifH配列を含む融合ポリペプチドにおいて、可溶性、または少なくとも部分的に可溶性であるNifHタンパク質が検出されたことを示した。K. oxytoca、A. brasilense、F. casuarinae、M. gracile、およびB. diazoefficiensからのNifHを含む融合ポリペプチドでは可溶性分画にNifH融合ポリペプチドがほとんど、またはまったく検出されなかった。植物細胞のミトコンドリアの中で少なくとも部分的に可溶性であったNifHポリペプチドの大半は、おそらくそのようなポリペプチドが中温性細菌からのポリペプチドよりも本来安定であり、そのためにその自然な立体配座への折り畳みと維持がより容易であると考えられることが理由で、好熱性細菌に由来したと結論された。

【1033】

NifH融合ポリペプチドを*K. oxytoca* NifM (*K. oxytoca* NifHを含む)と同時に発現させたとき、可溶性の有意な増加はなかったことも観察された(図24)。上述のように、調べた大半の細菌種の中のNifHタンパク質が、完全に機能するNifHの成熟と産生にNifM様活性を必要とするかどうかは知られていなかった。

【1034】

*N. benthamiana*の葉からの*M. infernus* NifHと*M. laminosus* NifHの精製

【1035】

*M. infernus*と*M. laminosus*からのNifHに関するTwin Strep::NifH融合ポリペプチドは、非変性条件下で抽出した後の浸透された*N. benthamiana*の葉サンプルから、その後StrepTactinXTカラムを利用してうまく精製された。こうすることで、これら2つの種由来でMPPによるプロセッシングを受けたNifH融合ポリペプチドが葉細胞のミトコンドリアの中で実際に可溶性であることが確認された。精製されたタンパク質は生化学的分析(Fe Sクラスターの存在や、NifHポリペプチドが、*A. vinelandii*から単離された精製NifD-NifKに電子を供与する能力の分析など)に利用される。

【1036】

細菌ニトロゲナーゼ系の中のバリエーションNifHポリペプチドの検査

【1037】

葉ミトコンドリアを標的にしたときに可溶性であることが見いだされたNifH候補について、MIT2.1系を用いて大腸菌の中でNifH機能を調べた。XhoI部位を部位指定突然変異誘発によってMIT2.1の中のNifHタンパク質コード領域の3'末端に導入した。この新たに導入されたXhoI制限部位をNifHの上流にある既存のXhoI部位とともに使用し、MIT2.1の中の野生型*K. oxytoca* NifH配列を7つの選択されたNifHバリエーション配列で別々に置き換えた。これらのNifHバリエーション配列は、それぞれのオープンリーディングフレーム：*M. laminosus* NifH (MlNifH; Genbankアクセッション番号Q47917)、*M. infernus* NifH (MiNifH; Genbankアクセッション番号WP_013099459)、*H. modesticaldum* NifH (HmNifH; Genbankアクセッション番号WP_012282218)、*C. tepidum* NifH (CtNifH; Genbankアクセッション番号WP_010933198)、*Geobacter* sp. NifH (Gs pNifH; Genbankアクセッション番号WP_015837436)、*M. thermautotrophicus* NifH (MtNifH; Genbankアクセッション番号AAB86034)、および*Carboxydotherrmus pertinax* NifH (CpNifH; Genbankアクセッション番号WP_075859892)に隣接するXhoI制限部位とともに合成されたものである。NifHバリエーションを*K. oxytoca* NifHDKYENJを含有するpHJ-TOPOで置換し、次いで*K. oxytoca* NifBQFUSVWZMのMIT2.1の後半部を含有するpB-oriを改変されたpHJ-TOPOに連結する操作が、両方のプラスミドをSbfIで消化させた後になされた。

【1038】

NifHバリエーションを含有する得られた改変されたMIT2.1プラスミドを用いて大腸菌株JM109を形質転換し、これらの形質転換体をアセチレン還元アッセイで調べた。ARAにおける陽性対照としての原初のMIT2.1を有するJM109と比較すると、NifHバリエーションを含有する改変されたMIT2.1プラスミドを有するどのJM109株もアセチレンを還元せず、その代わりに陰性対照プラスミドpB-oriを有するJM109と同じバックグラウンドレベルのエチレン生成を示した。この結果に基づき、本発明の発明者らは、NifHバリエーションが*K. oxytoca*からのNifD-NifKタンパク質とともに機能することはなく、その対応するNifDKヘテロ四量体とともに(例えば*C. tepidum* NifHが*C. tepidum* NifD-NifKとともに)機能すると結論した。したがって各NifHのNifD-NifKとの適合性は経験的に判断することができる。

【1039】

実施例17：安定に形質転換された植物におけるNifHとNifMの発現

【1040】

緒言

【1041】

機能的NifHタンパク質（Feタンパク質としても知られる）はニトロゲナーゼ活性にとって不可欠である。それは、ニトロゲナーゼ活性に関するいくつかの既知の機能を有する。すなわち、それは、メタロクラスター（Pクラスターが含まれる）を成熟させるためニトロゲナーゼ酵素に電子を供与するのに必要とされるとともに、Mo-ニトロゲナーゼ、V-ニトロゲナーゼ、およびFe-ニトロゲナーゼそれぞれのための補因子FeMoco、FeVco、およびFeFecoの合成に関与する。以前にRubioと共同研究者は、酵母の中でミトコンドリアを標的として*Azotobacter vinelandii*のNifHとNifMを同時に発現させた。酵母細胞からの精製されたNifHタンパク質は、インビトロで電子をホロ-NifD-NifK複合体に供与することができた（Lopez-Torreon、2016年）が、NifHポリペプチドの他の機能はそのインビトロ系で調べられなかった。この系は、その目的で設計されていなかったからである。植物ミトコンドリアなどのオルガネラへの完全に機能するNifHの導入は、植物の中でニトロゲナーゼを操作するのに不可欠であろう。

【1042】

本発明の発明者らは、*N. benthamiana*の葉の中で一過性の系を用いてMTP配列をKoNifHポリペプチドのN末端に一過性に融合させることにより*Klebsiella oxytoca* NifH（KoNifH）を植物ミトコンドリアに向かわせることが可能であることを以前に示した（Allen他、2017年）。この融合ポリペプチドはよく発現し、MTP配列内の切断によるプロセッシングを受けた。これは、発現した融合ポリペプチドのミトコンドリア局在化を実証している。2つの異なるミトコンドリア標的型ペプチドMTP-FAγ77とMTP-FAγ51は、KoNifHのN末端に一過性に融合させたとき、MTP内の予想された部位で効率的かつ特異的に切断された。プロセッシングを受けたNifH融合ポリペプチドの量は、ミトコンドリアを標的とする他のNifタンパク質と比べて比較的多かった。さらに、本明細書の実施例4に記載されている実験は、ミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ（MPP）による切断の後にKoNifHのN末端に追加Gly-Glyリンカーとともに残されたMTP配列のC末端からの9アミノ酸「瘢痕配列」（すなわち合計で11個のアミノ酸）が、細菌補完形式で調べたときにアセチレン還元活性を低下させないことを実証した。

【1043】

しかしベクターSN18とSN27によってコードされるMTP-FAγ51::KoNifH::HA融合ポリペプチド（配列番号25）の場合には、MPPで切断されたポリペプチドscar9::KoNifH::HAは、ほぼ不溶性タンパク質分画の中にだけ見いだされた（実施例2と3）。NifHの不溶性が標的に向かわせるペプチドに起因するかどうかを調べるため、MTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HA（配列番号128）をコードする別の遺伝子コンストラクト（SN42）を作製し、異なるMTP配列を用いて調べた。MTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HAに由来する正しくプロセッシングを受けた形態は、MTP内の予想された部位で切断された後に一過性葉アッセイで容易に検出されたが、このscar32::KoNifH::HA産物は不溶性タンパク質分画の中にも優勢に見られた。

【1044】

不溶性タンパク質は正しく折り畳まれないか、膜に結合したままであり、したがって機能しない可能性が大きいため、本発明の発明者らは、NifHの可溶性を改善するさまざまな代替法を探した。それを以下に記載する。植物ミトコンドリアにおけるMPPによるMTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HA融合ポリペプチドの切断後に生じるポリペプチドに対応する、KoNifHへの32アミノ酸N末端伸長部の機能的帰結も調べた。

【1045】

*Azotobacter vinelandii*と*Klebsiella oxytoca*を用いた遺伝子と生化学の研究は、これら窒素固定菌の中で機能的で成熟したNifHタンパク質を産生するのにNifMが必要とされることを示した。本明細書の実施例2～4に示されているように、*K. oxytoca* NifMのミトコンドリア標的型バージョンであるMTP-FAγ51::KoNifM::HA（配列番号123）は、植物ミトコンドリアの中で発現し、正確かつ効率的に切断され、可溶性分画の中で検出された。しかしKoNifMのN末端に位置する9アミノ酸瘢痕配列は、大腸菌MIT2.1系の中で

アセチレン還元活性を野生型のレベルのほんの10~20%へと低下させた(表4)。プロセッシングを受けたscar9::NifM::HAポリペプチドを産生する細菌株のプロテオーム分析は、NifMへのこのN末端付加により、改変されたNifMポリペプチドの蓄積が野生型NifMと比べて約50倍増加する結果になったことを示した。ニトロゲナーゼ活性はさまざまなNifタンパク質の発現レベルの変化に敏感であることが知られている(Temme他、2012年)ため、その細菌アッセイ形式での過剰なscar9::NifMがニトロゲナーゼの機能を野生型レベルの10~20%に低下させたのはもっともらしい。

【1046】

N. benthamianaの葉におけるNifHとNifMの同時発現

【1047】

植物ミトコンドリアの中でのNifHの可溶性が、やはりそのオルガネラを標的とするNifM融合ポリペプチドとの同時発現によって増大するかどうかを調べるため、それぞれが異なるベクターを含有する複数のアグロバクテリウム株の混合物を実施例1に記載されているようにしてN. benthamianaの葉に浸透させた。MTP-FAY51::KoNifH::HA(SN18)をコードするベクターまたはMTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HA融合ポリペプチド(SN42)をコードするベクターを含む第1の株と、MTP-FAY51::KoNifM::HA融合ポリペプチドをコードするSN30を含む第2の株を混合して浸透させた。浸透させてから5日後に、全、可溶性、および不溶性タンパク質分画を葉組織から調製し、ウエスタンブロット分析を実施した。これらの組み合わせにおけるNifHポリペプチドの可溶性が単一のベクターを用いた浸透と比べて一貫して増加することはなかった。

【1048】

さらなる試みとして、同じT-DNA上に2つの遺伝子を持つ別のベクターを構成した。一方の遺伝子はMTP-CoxIV::TwinStrep::KoNifH::HA融合ポリペプチド(配列番号128)をコードし、他方の遺伝子はMTP-FAY51::HA::KoNifMポリペプチド(配列番号167)をコードしている。第1の遺伝子は、MTP配列とNifH配列の間のTwinStrepエピトープと、C末端のHAエピトープを持っていた。第2の遺伝子は、MTP配列とNifM配列の間にHAエピトープを持っていた。これら2つの遺伝子を持つ遺伝子コンストラクトをSL6と名づけた。これは、上述のように、GoldenGate法と呼ばれるモジュール式DNA組み立てシステムを利用して構成された。KoNifH融合ポリペプチドをコードする遺伝子は増強型35Sプロモータの制御下にあったのに対し、KoNifMポリペプチドをコードする遺伝子はSCSV S4プロモータ(アクセッション番号AY181084)であった。

【1049】

SL6で形質転換したアグロバクテリウム培養物をN. benthamianaの葉に浸透させた。浸透させてから5日後にサンプルを採取し、全、可溶性、および不溶性タンパク質分画を調製した。タンパク質抽出液のウエスタンブロット分析は、同じベクターからのNifH融合ポリペプチドとNifM融合ポリペプチド両方の同時発現がNifHの可溶性を一貫して増加させることはないことを示したが、少なくとも1つの実験は、可溶性NifHポリペプチドの量の増加を示すように見えた。

【1050】

そこでSL6を用いてN. tabacum(タバコ)とN. benthamianaを形質転換し、T-DNAが植物核ゲノムに組み込まれている安定に形質転換された植物を作製することに決めた。

【1051】

植物形質転換のプロトコル

【1052】

N. benthamiana植物を形質転換するため、植物を、形質転換のための植物材料の供給源としての組織培養物の中で無菌にて生長させた。供給源植物は、表面を殺菌した種子から確立した。そうするため、種子を70%エタノールでリンスした後、5%次亜塩素酸ナトリウムを攪拌しながら用いて表面を10分間殺菌し、次いで水を何回か交換してリンスした。次に、種子を、pH 5.8で3%のスクロースと0.8%の寒天を含有する4.43 g/lのMSO培地(M519、PhytoTechnology Laboratories社)を収容したプレート上で発芽させ

10

20

30

40

50

た。植物を26℃にした生長室の中で16/8時間の光周期を利用して生長させた。約2週間後、生長中の苗を移して深い組織培養プレート1つ当たり苗4本に減らし、同じ条件の培地と生長で培養した。約2週間後、単一のよく確立された植物が組織培養ポットの中に培養されていた。6週齢の*N. benthamiana*植物からの葉を、アグロバクテリウムを媒介とする形質転換に使用した。

【1053】

バイナリーベクターの中に遺伝子コンストラクト (SL6など) を含有する *A. tumefaciens* 株 AGL1 の培養物を、遺伝子コンストラクトの選択を維持するための抗生剤を含む MG/L 培地の中で28℃にて増殖させた。600 nmでの光学密度が0.25~0.5の培養物を用いて *N. benthamiana* 組織に以下のように接種した。組織培養物から生長させた植物から上方の葉を切除し、MG/L 培地に浮かべて使用するまで膨らみを維持し、その後切断して葉の中脈を含む約1 cm²の切片にした。遺伝子コンストラクトを含有するアグロバクテリウム培養物を葉の切片に添加してその外植片が完全に湿潤であることを保証し、時々震盪しながら20~30分間放置して細菌が植物細胞に切断線に沿って結合できるようにした。次に、接種された外植片を殺菌濾過紙の上で軽く拭って過剰なアグロバクテリウムを除去した後、向軸面の側を下にして、抗生剤なしの共培養培地 MS9 に移した。MS9 は、オートクレービングによって殺菌した pH 5.8 で3%のスクロースと0.8%の寒天を含む MS0 培地を含有しており、この MS0-寒天培地をオートクレープして55℃まで冷却した後、植物ホルモンとして1 mg/l の IBA と0.5 mg/l の IAA を添加した。接種された外植片を暗所で26℃にて48時間にわたって同時培養した。培養期間の後、外植片を向軸面の側を上にしてシュート再生培地 (MS9 と、植物ホルモンとして1 mg/l の IBA と0.5 mg/l の IAA +100 mg/l のカナマイシンと150 mg/l の Timentin) に移し、プレート1つ当たり約10個の外植片を播種した。これらの外植片を16/8時間の光周期の照明のもとで26℃にてインキュベートした。外植片を、シュートの発達が起こるまで、2~3週間ごとに新鮮なシュート再生培地に移した。6~8週間後、十分なサイズに生長していたシュートを根開始培地 (1/3 MS0 +100 mg/l のカナマイシン+150 mg/l の Timentin +1 mg/l の IBA) に移した。個々の植物が力強い根を発達させると、DNA抽出のために小さな葉サンプルを採取し、PCRによって選択マーカー遺伝子と望む導入遺伝子の存在を探した。その後、確認されたトランスジェニック植物を土に植え、温室の中で生長させ、その植物が徐々に馴化できるようにした。

【1054】

Nicotiana tabacum 植物の栽培品種 Wisconsin 38 (Wi38) を標準的な方法 (Horsch 他、1985年) によって形質転換した。

【1055】

12本の独立に形質転換された植物を *N. benthamiana* の中で SL6 を用いて生成させ (SL6-1~12 と名づけた)、別の12本を *N. tabacum* の中で生成させた (SL6-13~24 と名づけた)。これらの最初のトランスジェニック植物を T0 世代と名づけた。それぞれの植物の中に T-DNA が存在することを、これら植物からの葉サンプルから調製した DNA で PCR を利用して確認したところ、これら植物のすべてがトランスジェニックであることが確認された。これらの独立に形質転換した植物を成熟するまで生長させ、それぞれの植物の自己受精の後に T1 種子を採取した。1つのラインでの導入遺伝子の分離を調べるため、SL6-13 と名づけた植物からの60個の T1 種子を土に蒔き、標準的な温室条件下で4週間にわたって生長させた。導入遺伝子の存在を PCR によって評価した。20本の植物が導入遺伝子を欠いており (ヌル分離)、40本の植物が PCR 陽性であった。これは、植物 SL6-13 におそらく1つの T-DNA が挿入されたトランスジェニックイベントのコピー数が少ないことを示している。いくつかのヌル分離体が同定され、陰性対照として維持された。

【1056】

トランスジェニック植物の中での NifH 融合ポリペプチドと NifM 融合ポリペプチドの産生を、全タンパク質の抽出と、ウエスタンブロットにおいて抗 Strep 抗体または抗 HA 抗体を用いた検出によって評価した。安定に形質転換されたタバコ植物の中の NifH 融合ポリペ

プチドのレベルは、*N. benthamiana*の葉の中の一過性発現で以前に観察されたレベルよりもはるかに低かった。これらの実験からの以前の結果に照らすと驚くべきことに、そして予想外なことに、SL6-13と名づけた植物を含むタバコ植物は、可溶性分画の中でだけ見いだされた正しくプロセッシングを受けたNifHを検出可能なレベルで生じさせた。同様に、SL6で形質転換された*N. benthamiana*植物は、有意により少ないNifHポリペプチドを産生したが、このポリペプチドは効率的にプロセッシングを受けていたため、やはり可溶性分画の中に見いだされた。

【1057】

子孫トランスジェニック植物の分析

【1058】

さまざまな年齢の葉を子孫植物から採取し、葉の年齢が、NifH融合ポリペプチドとNifM融合ポリペプチドの蓄積、プロセッシング、および可溶性に対してなんらかの影響を及ぼすかを見た。サンプルは、SL6-13からの子孫であった2つの*N. tabacum*植物から採取し、それぞれの植物から若い葉、「中年」の葉、およびより年老いた葉を採取した。それぞれの葉の中で、NifH融合ポリペプチドは抗Strep抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出され、NifMポリペプチドは抗HA抗体で検出された。NifH融合ポリペプチドの蓄積レベルは葉の年齢が上昇するにつれて増大した。

【1059】

安定に形質転換された植物からのNifH融合ポリペプチドの精製

【1060】

TwinStrepタグが付いたNifHポリペプチドは可溶性であり、しかも十分な植物材料を手でできたため、このポリペプチドを、StreptactinXTアフィニティ媒体を用いて精製した。約90 gのSL6-13植物葉材料の抽出を、この材料を非変性培地の中で均質化し、遠心分離で細胞デブリを除去し、0.22 μmのフィルタを通過させて濾過し、StreptactinXTカラムを通過させることによって実現した。ビオチンを用いてカラムから溶離させた後、NifHポリペプチドを含有する分画を回収して濃縮した。サンプルをプロテオミクスによって分析し、抗Strep抗体を用いたウエスタンブロット分析によりNifHポリペプチドを検出し、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット分析によりNifHポリペプチドとNifMポリペプチドの両方検出した(図25)。精製されたタンパク質のN末端分析をしてN末端のアミノ酸配列を明らかにした。これらの分析により、予想されたMPP切断部位でCoxIV MTPが切断されたことが確認された。StreptactinXTカラムへの結合によるNifHの精製も、安定に形質転換された植物から単離されたTwinStrep::KoNifHが可溶性であるという結論を支持した。結局、これらの結果は、安定に形質転換された*N. tabacum*植物から単離されたscar32::TwinStrep::KoNifH::HAタンパク質がミトコンドリアの中で正しくプロセッシングを受けて完全に可溶性であったため、植物内のNifH機能に関する2つの主要な条件を満たしていることを示している。

【1061】

形質転換された*N. benthamiana*植物におけるNifS+NifUとNifH+NifMの同時発現

【1062】

NifS融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクト(SN31)とNifU融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクト(SN32)を、SL6で形質転換された*N. benthamiana*植物に浸透させ、NifS融合ポリペプチドとNifU融合ポリペプチドの同時発現がNifHポリペプチド蓄積のレベルを増大させるかを見た。

【1063】

実施例18：植物細胞におけるAnfポリペプチドの発現

【1064】

緒言

【1065】

鉄だけのニトロゲナーゼ系がいくつかの窒素固定菌(例えば、補因子FeMoco、FeVco、およびFeFecoをそれぞれ用いるモリブデン(Mo)、バナジウム(V)、および鉄だけ

10

20

30

40

50

(Fe)に基づく3つのニトロゲナーゼ系を持つ*A. vinelandii*)で見いだされている(Davis他、1996年; Robson他、1986年)。二窒素の還元を実際に触媒するモリブデン(Mo-ニトロゲナーゼ)酵素とバナジウムニトロゲナーゼ(V-ニトロゲナーゼ)酵素の両方とも既知の結晶構造を持つ。鉄だけのニトロゲナーゼ(Fe-ニトロゲナーゼ)の結晶構造はまだ確定されていないが、バナジウムニトロゲナーゼの結晶構造と似た構造を持つと考えられている(SippelとEinsle、2017年)。V-ニトロゲナーゼまたはFe-ニトロゲナーゼの一方または両方を含有するこれまでに記録されているすべての生物が、Mo-ニトロゲナーゼも含有している。一般に、V-ニトロゲナーゼとFe-ニトロゲナーゼはMo-ニトロゲナーゼの発現によって抑制され、Moの利用可能性が制限されるようになったときにだけ発現する。モリブデン型ニトロゲナーゼと代替のニトロゲナーゼを識別するには同位体アセチレン還元アッセイ(ISARA)を利用することができ、このアセチレン還元アッセイでは¹³C同位体を測定する(Zhang他、2016年)。

【1066】

Fe-ニトロゲナーゼは上記の3つの系のうちで最も研究されていない。この系は、3つの系のうちで最低のニトロゲナーゼ触媒活性を持つが、より少数のタンパク質がニトロゲナーゼ活性に必要とされるため、その生合成はより単純であるように見える。よく研究されている生物*Azotobacter vinelandii*からの既知の6つのFe-ニトロゲナーゼタンパク質、すなわちAnfD、AnfK、AnfH、AnfG、AnfO、およびAnfRが存在しており、これらはFe-ニトロゲナーゼに関して異なっている。これら6つのタンパク質のうちで最初の4つはニトロゲナーゼ酵素の活性に必要であり、その活性に寄与することが知られている。それぞれのニトロゲナーゼ系は、Nif(またはVnfまたはAnf)D、K、およびHと呼ばれる触媒性タンパク質を必要とし、Fe-ニトロゲナーゼはAnfD、AnfK、およびAnfHタンパク質を利用する。V-ニトロゲナーゼとFe-ニトロゲナーゼもそれぞれVnfGまたはAnfGと名づけられた追加の構造タンパク質を必要とするが、それをMo-ニトロゲナーゼは必要としない。anfO遺伝子とanfR遺伝子は他の構造anf遺伝子から下流に位置するが、それらの機能は知られておらず、大腸菌系の中で発現したときにFe-ニトロゲナーゼの活性に影響しないことが示されている(Yang他、2014年)。Fe-ニトロゲナーゼの活性に必要な残る最少アクセサリー遺伝子は、Mo-ニトロゲナーゼ経路と共通のもの、すなわちNifS、NifU、NifB、NifV、NifJ、およびNifFである(Yang他、2014年)。したがって鉄だけのニトロゲナーゼは、大腸菌の中で異種機能のために必要とされる4つのAnfポリペプチドと6つのアクセサリーNifポリペプチドからなる最少セットを持つ(Yang他、2014年)。

【1067】

Fe-ニトロゲナーゼ系では、二窒素還元部位であるジニトロゲナーゼ酵素は、 α ユニットとしての2つのAnfDポリペプチド、 β ユニットとしての2つのAnfKポリペプチド、および δ ユニットとしての2つのAnfGポリペプチドからなるヘテロ六量体であるため、 $\alpha_2\beta_2\delta_2$ の配置になる。ジニトロゲナーゼレダクターゼ酵素はジニトロゲナーゼ酵素への必須の電子供与体であり、同じAnfHポリペプチドを2つ持つホモ二量体である。ジニトロゲナーゼレダクターゼはFeタンパク質としても知られており、そのサブユニットの界面に単一の[Fe₄S₄]クラスターを含有する(Buren、Young他、2017年)。AnfHタンパク質は他の2つの機能も持つことが予測され、その中には、Mo-ニトロゲナーゼとV-ニトロゲナーゼにおけるNifH遺伝子産物およびVnfH遺伝子産物と同様、ジニトロゲナーゼ酵素の成熟に必要とされることが含まれる。

【1068】

Mo-ニトロゲナーゼとV-ニトロゲナーゼに関しては、植物を操作してFe-ニトロゲナーゼを発現させることは難し過ぎると見なされている。鍵となるニトロゲナーゼ酵素のすべてが、過度に酸素感受性であるため特定の生化学的環境を必要とするとともに、還元剤の供給源であるATPを大量に必要とすることに加え、Fe、Mo、V、およびSなどの元素を正しい細胞区画の中で十分な量で利用できねばならない。特に、Anf酵素は酸素に曝露されると迅速に不可逆的に不活性化する。上述のように、4つのAnfポリペプチドと6つのアクセサリーNifポリペプチドからなる最少セットを植物の中に導入する必要があると考えられ

るが、それは技術的な観点から実施が非常に難しい。

【1069】

そこで下に記載するように、Anf遺伝子産物をミトコンドリアに局在化させることを目的として、植物細胞の中でAnf遺伝子を発現させることを試みる実験を実施した。鍵となる4つのAnfタンパク質は、AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGタンパク質であるため、本発明の発明者らは、それぞれが個別のAnf遺伝子を発現する4つの遺伝子コンストラクトを最初に調べ、次いでその4つの遺伝子をまとめて1つのベクターの中の1つのT-DNAに入れた。

【1070】

植物細胞の中でAnf融合ポリペプチドを発現させるための単一遺伝子コンストラクト

【1071】

植物細胞（例えば*N. benthamiana*の葉細胞）の中でAnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGポリペプチドを別々に発現させるため、第1の一連の遺伝子コンストラクトを設計して作製した。それぞれの合成遺伝子は、強力な35Sプロモータと、タンパク質コード領域に隣接したCaMV 3'ポリアデニル化領域／転写ターミネータの制御下にあった。*A. vinelandii*からのAnf配列を用いてコードされたアミノ酸配列を設計し、ヌクレオチド配列は植物細胞の中で発現させるためにコドン最適化した。ミトコンドリア局在化のため、コンストラクトは、N末端に融合されたMTP-FAγ51と、抗HA抗体または抗Strep抗体をそれぞれ用いたウエスタンブロッティングによってポリペプチドを検出するためのHAエピトープまたはTwinStrepエピトープを持つ融合ポリペプチドをコードしていた。HAエピトープはC末端に、またはたいていの場合にはMTPとAnf配列の間に一過性に融合されたのに対し、TwinStrepエピトープはAnf配列のC末端に融合された。ミトコンドリア標的型融合ポリペプチドをコードしていたそれぞれの遺伝子コンストラクトについて、2つの対応する対照コンストラクトも作製した。第1は、MTP配列を欠くポリペプチドをコードしていたためにより小さな細胞質標的型ポリペプチドを発現し、それが、MTP-Anfポリペプチド由来でMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチド（プロセッシングを受けたAnf）のための分子量比較基準をウエスタンブロット上で提供したが、それぞれの場合にMPPによるプロセッシングを受けたそのポリペプチドは、約9個のアミノ酸からなる「瘢痕配列」を含むため、サイズがそれと一致しないという特徴があった。それぞれの場合に第2の対照コンストラクトは、MPPによるプロセッシングを阻止するように設計されており、MTP配列の中にアラニンで置換された13個のアミノ酸を持つ融合ポリペプチドをコードしていた（Allen他、2017年）。したがってこれら第2の対照ポリペプチドは、対応するMTP-Anfコンストラクト由来でプロセッシングを受けていないポリペプチドのための分子量比較基準を提供した。アラニンで変異させたMTP配列を本明細書ではmFAγ51と名づけた。浸透された植物組織からのタンパク質抽出液を分析したとき、それぞれのMTP-Anfコンストラクトからのサンプルとそれに対応する2つの対照コンストラクトをゲル電気泳動の隣り合ったレーンにロードしたため、MTP-Anfポリペプチドのプロセッシングを最もよく検出することが可能になった。その後、MTPモチーフ内の予想切断部位を質量分析によって確認した。

【1072】

AnfK配列を持つ融合ポリペプチドでAnfK機能を保持することが望ましい場合には、野生型ポリペプチドに対するC末端伸長部を回避した。AnfKで野生型C末端配列を用いることが望ましいのは、*K. oxytoca*からのNifKで野生型C末端を用いることと同様であった（WO2018/141030）。なぜならC末端伸長部は機能を喪失させたからである（Yang他、2017年）。

【1073】

単一遺伝子コンストラクトは表19に掲載されており、この表には、ミトコンドリアの中でのMPPによるプロセッシングの前と後の各ポリペプチドの予想分子量（kDa）も掲載されている。表19には、プロセッシングを受けていない融合ポリペプチドの配列番号も掲載されている。これらの遺伝子コンストラクトは、前の実施例に記載されているコンストラクトと同様にGoldenGate組み立て法を利用して作製された。

【1074】

表19に示されているように、AnfDコンストラクト（SN81とSN161）に関する対照コンストラクトは、大まかなサイズがプロセッシングを受けた形態に対応するポリペプチドを産生するSN82と、サイズがプロセッシングを受けていない形態に対応するポリペプチドを産生するSN158であった。したがってこれらコンストラクトからのタンパク質抽出液は、ウエスタンブロット分析のゲル電気泳動工程において隣り合ったレーンで走らせた。AnfKコンストラクトSN129については、対照はSN152とSN155であった。AnfHコンストラクトSN130については、対照はSN153とSN156であった。AnfGコンストラクトSN131については、対照はSN154とSN157であった。

【1075】

HAエピトープの位置をC末端にするかN末端のほうにするか変えること以外に、1つのコンストラクト（SN195）の中に作った別のバリエーションは、MTP-FA γ 51配列の代わりにCoxIV MTP配列（Buren他、2017年）を用いるというものであった。

【1076】

【表19】

表19：植物細胞の中でAnf融合ポリペプチドを発現させるための単一遺伝子コンストラクト（NA：該当なし）

プ ラ ミ ド	発現したポリペプチド	予想分子量（kDa）		プロセッシングなしの 配列番号
		プロセ シン グなし	プロセシン グあり	
SN81	MTP-FA γ 51::AnfD::HA	65.4	60.7	182
SN82	HA::AnfD	59.7	NA	183
SN129	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5	184
SN130	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4	185
SN131	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7	186
SN152	HA::AnfK	52.5	NA	187
SN153	HA::AnfH	31.3	NA	188
SN154	HA::AnfG	16.6	NA	189
SN155	mFA γ 51::HA::AnfK	57.4	NA	190
SN156	mFA γ 51::HA::AnfH	36.3	NA	191
SN157	mFA γ 51::HA::AnfG	21.6	NA	192
SN158	mFA γ 51::HA::AnfD	64.6	NA	193
SN161	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7	194
SN177	MTP-FA γ 51::AnfD::Twin Str ep	69.2	64.5	195
SN195	MTP-CoxIV::Twin Strep::Anf K	57.7	54.7	196

【1077】

N. benthamianaの葉細胞におけるAnf融合ポリペプチドの発現

【1078】

コンストラクトのそれぞれを別々に、実施例1に記載されているようにしてアグロバクテリウムを媒介とした方法によってN. benthamiana植物に導入した。前の実施例に記載されているように、葉サンプルを浸透の4～5日後に採取し、タンパク質抽出液を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）とウエスタンブロットによって分析した。そうすることにより、MTPリーダー配列がMPPによるプロセッシングを受けたことによる発現ポリペプチドのミトコンドリアマトリックスへの取り込みを調べた。さらなる実験では、実施例1に記載されている方法を用いてタンパク質抽出液を可溶性分画と不溶性分画に分画した。

【1079】

粗タンパク質抽出液を、抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析したとき、Anfポリペプチドの予想サイズに一致するポリペプチドバンドが容易に検出された（図26）。AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG配列を含む個々のミトコンドリア標的型ポリペプチドのすべてがよく発現し、ウエスタンブロット手続きにおいて短時間の露出（2分間）の後に見られた。AnfD、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドそれぞれのためのコンストラクトSN161、SN130、およびSN131のそれぞれは、それぞれMTP-FA γ 51配列を持ち、ブロット上で、MTP配列内でMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドで予想される分子量の位置に単一の優勢なバンドを生じさせた。それぞれの場合の対照ポリペプチドに関する隣り合ったレーン内のバンドから、これらのバンドがプロセッシングを受けたポリペプチドに関するものであることが確認された。これら3つの融合ポリペプチドはよく発現し、ミトコンドリアの中で効率的にプロセッシングを受けたと結論された。このプロセッシングはその後、質量分析によって確認された。MTP-FA γ 51::HA::AnfHをコードするSN130からのサンプルも、ゲル電気泳動工程の間にタンパク質の脱変性条件を利用したにもかかわらず、明確さは劣るが、ポリペプチドの二量体にふさわしいサイズのより大きな分子量の位置にはっきりとしたバンドを示した。

【1080】

AnfKコンストラクトのうちの2つに関するレーンは多数のバンドがあってより複雑であった。SN152とSN129からそれぞれ産生されるAnfK細胞質標的型ポリペプチドとAnfKミトコンドリア標的型ポリペプチドは、HA抗体によって検出された追加バンドを示し、それはMTP配列内の切断で予想されるよりも小さかった。これは、AnfKポリペプチドが追加のタンパク質分解性切断を受けたように見えることを示している。未熟な転写または翻訳終止からより小さなポリペプチド（サイズが約4~6 kDa小さい）も生じた可能性がある。AnfKに関するこの観察にもかかわらず、N末端MTP配列を含む遺伝子コンストラクトの4つすべてが、プロセッシングで想定した融合ポリペプチドを発現し（AnfKの場合には部分的）、望むミトコンドリア局在化Anfポリペプチドを提供すると結論された。

【1081】

植物細胞における多遺伝子コンストラクトからのAnf融合ポリペプチドの発現とプロセッシング

【1082】

上記の第1の実験は、個々のAnf融合ポリペプチドを産生させるのに単一遺伝子コンストラクトを使用していた。本発明の発明者らは今、AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドの4つすべてを、これらAnf遺伝子のそれぞれが自らの35Sプロモータと転写ターミネータを持つ単一のベクターから発現させて調べることを決断した。この実験は、これら4つのAnfポリペプチドを同じ植物細胞の中でまとめて発現させたとき、これらポリペプチドの間に相互作用が存在するかどうかを調べることに、特に、個々のポリペプチドの蓄積レベルの変化、またはMPPによるそのプロセッシングの変化を探ることが目的であった。そうするため、バイナリーベクターの単一のT-DNAの中に上記遺伝子の4つすべてを持つ遺伝子コンストラクトを組み立てた。それぞれの遺伝子は、HAエピトープに翻訳融合されたMTP-FA γ 51配列と、それに続くAnf配列を持っていた。単一遺伝子ベクターSN161、SN129、SN130、およびSN131と同じヌクレオチド配列とアミノ酸配列を使用した。得られた遺伝子コンストラクトをSL26と名づけた。2つの対照コンストラクト、すなわち、プロセッシングを受けていないポリペプチドのためのサイズマーカーを産生するためのアラニン変異MTP配列をそれぞれが持つ4つのAnf融合ポリペプチド（mFA γ 51::HA::Anf）をコードするSL31と、プロセッシングを受けたポリペプチドのためのサイズマーカーとしてMTP配列を欠く4つの融合ポリペプチド（HA::Anf）をコードするSL36も作製した。それに加え、ウエスタンブロットの中の多数のポリペプチドバンドの同定を助けるため、3つの追加ベクターを、SL26から1つ、2つ、または3つの遺伝子を段階的に欠失させることによって作製した。すなわちSL27はAnfG遺伝子が欠失し、SL28はAnfH遺伝子とAnfG遺伝子が欠失し、SL29はAnfK遺伝子、AnfH遺伝子、およびAnfG遺伝子が欠失してAnfD

遺伝子だけが残っていた。これら多遺伝子ベクターとその構成遺伝子は表20に掲載されている。

【1083】

これら多遺伝子ベクターのすべてを別々に、実施例1に記載されている方法によって*N. benthamiana*の葉に導入した。タンパク質を以前のように浸透の4または5日後に葉組織から抽出し、ウエスタンブロッティングによって分析した。結果(図27)は、MTP-FAγ51とHA配列に融合したAnfポリペプチドの4つすべてが容易に検出され、単独の強いバンドとしてよく発現することを示した。さらに、N末端MTP-FAγ51リーダー配列を持つAnfD、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドはMTP配列内で効率的にプロセッシングを受け、AnfK融合ポリペプチドは部分的にプロセッシングを受けたことが、隣のレーンでSL31から発現した対応するポリペプチドのサイズとの比較から証明された。これは、MTP配列を持たない4つのHA::Anfポリペプチドをコードしているためウエスタンブロット手続きにおいてプロセッシングを受けていないSL26由来のポリペプチドのためのサイズマーカーを提供する多遺伝子コンストラクトSL36を用いた別の実験で確認された。一連のベクターSL26、SL27、SL28、およびSL29から生じる抽出液のウエスタンブロット(図27、パネルC)が、Mixと表示したレーン内の上記4つの単一遺伝子ベクターの混合物の場合と同様に、混合物の中の上記4つのポリペプチドを同定し、その素性を確認するのを助けた。

【1084】

多遺伝子コンストラクトから発現したときの上記4つのAnfポリペプチドの蓄積レベルを、単一遺伝子コンストラクトの混合物から発現したときと比べることができた。多遺伝子コンストラクトでは、AnfD融合ポリペプチドが他の3つのAnfポリペプチドよりも高いレベルで蓄積した(図27、パネルA)が、それは、*nifD*遺伝子が、Mo-ニトロゲナーゼに関する対応するNifD、NifK、およびNifH遺伝子の中で発現させるのが最も難しかったこと(Allen他、2017年)を考えると驚くべきことであった。さらに、*K. oxytoca*からのNifDでの観察(実施例6と7)とは異なり、AnfDポリペプチドは完全長であるように見えたため、AnfDの中の第2の隠れた切断部位の証拠は存在していなかった。

【1085】

10

20

30

40

50

【表 20】

表20：植物細胞の中でAnf融合ポリペプチドを発現させるための多遺伝子ベクターと、コードされているポリペプチド

プラスミド	コードされている融合ポリペプチド	予想分子量 (kDa)	
		プロセッシングなし	プロセッシングあり
SL23	MTP-FA γ 51::AnfD::HA	65.4	60.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4
	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7
SL26	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4
SL27	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4
SL28	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5
SL29	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7
SL30	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7
	MTP-FA γ 51::AnfD::Twin Strep	69.2	64.5
	MTP-FA γ 51::HA::AnfK	58.1	53.5
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4
SL31	mFA γ 51::HA::AnfD	64.6	NA
	mFA γ 51::HA::AnfK	57.4	NA
	mFA γ 51::HA::AnfH	36.3	NA
	mFA γ 51::HA::AnfG	21.6	NA
SL34	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfD	65.3	60.7
	CoxIV::Twin Strep::AnfK	57.7	54.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4
SL36	HA::AnfD	59.7	NA
	HA::AnfK	52.5	NA
	HA::AnfH	31.3	NA
	HA::AnfG	16.6	NA
SL37	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7
	MTP-FA γ 51::AnfD::HA	65.4	60.7
	CoxIV::Twin Strep::AnfK	57.7	54.7
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4

【1086】

ミトコンドリア局在化とMPPプロセッシングの確認

【1087】

MTP-FA γ 51::HA::Anf融合ポリペプチドのプロセッシングは、SL26から発現したプロセッシングを受けた上記4つのAnfポリペプチドのミトコンドリア局在化を本発明の発明者らに明確に示した。これはさらに、浸透された葉組織から実施例13に記載されているメタキシン媒介法を利用して得られたミトコンドリア分画の濃縮によって確認された。これには、*A. tumefaciens*の中でTwinStrep-mTurquoise-TEV認識配列-メタキシン融合ポリペプチド（配列番号121）をコードする遺伝子コンストラクトSN197を、SL26を含有するア

グロバクテリウムとの混合物に添加することが関係していた。SN197からのポリペプチドのメタキシン領域は、植物細胞の中で一過性に発現するとき、ミトコンドリアの外膜に局在化していた（Lister他、2007年）。こうなっていることでN末端TwinStrepモチーフが細胞質ゾルに曝露され、目印が付いたミトコンドリアを抗Strep抗体で被覆されたビーズを用いて穏やかな条件下で迅速に精製することが可能になった。その結果、同じ細胞内で非ミトコンドリアタンパク質と比べてミトコンドリアタンパク質がかなり濃縮された。

【1088】

これを検証するため、1つの株の中にSN197を含有する*A. tumafaciens*培養物と別の株の中にSL26を含有する*A. tumafaciens*培養物の混合物を*N. benthamiana*の葉に導入した。浸透された組織を5日後に採取した。ミトコンドリアを単離するため、これらの組織を実施例13に記載されているようにして処理した。次いで単離されたミトコンドリアの中のタンパク質をSDS-PAGEと検出用のHA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。Anfポリペプチドのすべてがミトコンドリア分画の中で容易に検出された。ウエスタンブロット上で検出されたバンドは、SL26からのプロセッシングを受けたAnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGポリペプチドのサイズと合致していた。これは、Anfポリペプチドが植物ミトコンドリアに局在化していたことを再度示している。おそらく追加のタンパク質分解切断（上記参照）によって形成されたAnf融合ポリペプチドからのより小さなバンドも、ミトコンドリア分画の中で濃縮されていた。これは、この二次切断がミトコンドリアの中で起こっていたことを示唆している。Anfポリペプチドがプロセッシングを受けたという観察結果は、Anfポリペプチドがミトコンドリアマトリックスに局在化していた証拠であった。

【1089】

MTP配列の中での切断によるプロセッシングを、実施例1に記載されている方法を利用して、タンパク質のトリプシン消化後にLC-MS法によって確認した。SL26から発現したタンパク質抽出液の電気泳動の後に、クーマシーで染色したゲルからタンパク質バンドを単離した。ゲル切片の中のタンパク質の素性は、LC-MSと標的型MRMを通じて確認した。タンパク質の素性は、メタキシン、AnfD、AnfK、およびAnfHと少なくとも95%の信頼性で一致した。AnfGタンパク質は、LC-MS検出を実施したクーマシーゲルの中では同定されなかった。それはおそらく、その蓄積が低レベルであったことに起因する。AnfKを除くAnfタンパク質のすべてが、MTPの効率的な切断の後に、想定されるN末端を伴って検出された。AnfKポリペプチドについては、2つのN末端FA γ 51 MTP標的型ペプチドがMRMによって低いシグナルレベルで検出された。これは、MPPによるAnfK融合ポリペプチドの部分的な切断が起こっていたことを示す。これは、ウエスタンブロット分析での観察と一致しており、部分的切断がMPPによってMTP配列内の想定された部位で起こっていたことの確認であった。

【1090】

植物内で発現した後のミトコンドリアAnf融合ポリペプチドの可溶性

【1091】

本発明の発明者らは、Fe-ニトロゲナーゼタンパク質は、機能するためには、このFe-ニトロゲナーゼ酵素において必要とされるタンパク質-タンパク質相互作用と安定性を可能にするほか、この酵素がその基質および補因子と相互作用することを可能にする可溶性形態で産生されねばならないと考えた。このタンパク質が可溶性形態でない場合には、それは、不適切なタンパク質折り畳み、またはミトコンドリア膜への強い結合を示す可能性があり、ニトロゲナーゼ活性にとって有害である。そこで、発現したAnfポリペプチドが植物ミトコンドリアの中で産生されたときに可溶性形態であるかどうかを検証する実験を実施した。これは、実施例1に記載されている方法を利用してタンパク質抽出液を可溶性（上清）形態と不溶性（ペレット）形態に分画することによって実現した。

【1092】

以前のように、これは、最初に*N. benthamiana*の葉の中で単一遺伝子コンストラクトを用いてなされた。可溶性タンパク質と不溶性タンパク質を得るためのタンパク質抽出液

を、遺伝子コンストラクトを接種された葉から調製し、ウエスタンブロッティングによって分析した（図28）。ウエスタンブロットは、AnfD融合ポリペプチドが*N. benthamiana*の葉のミトコンドリアを標的としたときには実質的に不溶性であり、可溶性分画の中には非常に弱いバンドしか見えないことを示した（図28）。プロセッシングを受けたAnfKポリペプチドとプロセッシングを受けていないAnfKポリペプチドは、可溶性分画の中にだけ実質的に存在していたのに対し、プロセッシングを受けたAnfHポリペプチドは、一部だけが可溶性であった。ミトコンドリア標的型AnfGポリペプチドは可溶性分画の中にだけ存在していた。これは、プロセッシングを受けたAnfG融合ポリペプチドが、*N. benthamiana*のミトコンドリアマトリックスで発現したときに可溶性形態であったことを示す。

【1093】

同時に発現したときのミトコンドリア標的型のAnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGの可溶性を以下のようにして調べた。多遺伝子ベクターSL26から発現したAnfD、AnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドの可溶性を、SL31から発現したポリペプチドの可溶性と比較した。それぞれが単一遺伝子コンストラクトを含有する複数のアグロバクテリウム株の混合物も植物に浸透させるのに用いた。ウエスタンブロットが、図27のパネルBに示されている。

【1094】

多遺伝子ベクターSL26で驚くべき予想外の結果が観察された。今回は、プロセッシングを受けたAnfD融合ポリペプチドのいくつかが可溶性分画の中で明らかに観察された。これは、他のAnfポリペプチドの同時発現がAnfDポリペプチドの少なくとも一部の可溶性を増大させたことを示す。これは、AnfDポリペプチドの一部が、おそらくこのAnfDポリペプチドと他のAnfポリペプチドの1つ以上のタンパク質-タンパク質会合を通じて安定化されたこと、またはAnfDポリペプチドがその適切な立体配座になる折り畳みの増加が起こったことを示唆していた。タンパク質-タンパク質会合の可能性は、次の実施例に記載されているようにして調べた。

【1095】

一連のベクターSL26、SL27、SL28、およびSL29を同様の実験で使用し、AnfDポリペプチドの可溶性を、他のAnfポリペプチドの1つ、2つ、または3つすべてと同時に発現させたときと比較した。多遺伝子ベクターSL26、SL27、およびSL28と単一遺伝子ベクターSL29から発現した融合ポリペプチドで、ポリペプチドの蓄積レベルと、可溶性および不溶性のAnfDポリペプチドを調べた。一過性*N. benthamiana*葉アッセイからの結果は、Anf遺伝子の数が減少するにつれて、特にAnfKの不在下で、AnfDポリペプチドの可溶性も減少することを示した。したがって特にAnfKの存在がAnfDポリペプチドの可溶性を増大させたと結論された。

【1096】

ミトコンドリアに局在化したAnfポリペプチドの可溶性のさらなる確認が、抗HA抗体に連結されたビーズを用いたアフィニティ精製実験によって得られた。粗抽出液をビーズと接触させて結合しなかったタンパク質を洗い流した後、結合したタンパク質を分析したとき、AnfD（プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方）、AnfK（プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方）、AnfH（プロセッシングを受けた形態）、およびAnfG（プロセッシングを受けた形態）融合ポリペプチドをビーズから回収した。クーマシー染色したゲル上で観察されたHA濃縮ポリペプチドバンドを切除し、ゲル切片の中のポリペプチドをLC-MS質量分析法によって分析した。ゲルの中に存在するバンドは、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態のAnfD、AnfK、およびAnfGポリペプチドの両方で正しいサイズであった。AnfGと同定されたポリペプチドは、N末端MTP切断部位に余分なアミノ酸を持つ、部分的にプロセッシングを受けた可能性のあるポリペプチドを含んでいた。これは、SL26からの抽出液のウエスタンブロットでAnfGに関して存在する2つの密接に混ざったバンドという観察と一致した（図27、パネルC）。AnfHに関して存在するバンドは、プロセッシングを受けたサイズに関するものだけであった。これは、MTP配列内での効率的なプロセッシングを示している。ポリペ

10

20

30

40

50

プチドバンドの素性はLC-MS分析を通じて確認された。

【1097】

他のいくつかの多遺伝子ベクターを設計して作製し、その多遺伝子ベクター上のAnf遺伝子の位置、またはHAエピトープの位置がタンパク質の発現と可溶性の一方または両方に影響するかどうかを調べた。これらベクターには、SL23、SL30、SL34、およびSL37と名づけたコンストラクトが含まれていた。多遺伝子ベクター上の遺伝子の位置の違いがタンパク質の発現と可溶性に有意に影響したようには見えなかった。

【1098】

ベクターSL26を用いてタバコ (*N. tabacum*)、*N. benthamiana*、および *Arabidopsis thaliana* という植物を形質転換し、AnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGポリペプチドを発現する安定に形質転換された植物を作製した。

【1099】

考察

【1100】

これらの実験は、AnfD、AnfK、AnfG、およびAnfH融合ポリペプチドをコードするAnf遺伝子を発現させ、これらポリペプチドにプロセッシングを受けさせて植物細胞のミトコンドリアの中に局在化させることが可能であることを実証した。これらのポリペプチドはMTP配列内の想定される部位で切断され、それぞれの場合に融合ポリペプチドのN末端に9アミノ酸「瘢痕配列」を残すことが証明された。ミトコンドリア局在化もいくつかの異なるやり方で実証された。植物 *N. benthamiana* を用いた葉アッセイを利用して単一遺伝子コンストラクトと多遺伝子コンストラクトを導入して発現させた。ミトコンドリアに局在化したAnfポリペプチドの可溶性も調べた。AnfDの可溶性は、多遺伝子コンストラクトを用いてAnfK、AnfH、およびAnfGを同時発現させると増大した。

【1101】

実施例19：植物の葉のミトコンドリア内でのFe-ニトロゲナーゼポリペプチド間の相乗相互作用

【1102】

AnfD、AnfK、およびAnfGタンパク質は、必要な補因子とでジニトロゲナーゼ酵素を構成するヘテロ六量体複合体を形成する (Davis他、1996年; Zheng他、2018年)。この複合体は、二窒素の還元のための触媒性酵素である。この複合体は、活性な酵素であるためにはFeFeco因子と多数のFe-Sクラスターを必要とする。

【1103】

本発明の発明者らは、多遺伝子ベクターから発現した後の植物ミトコンドリア内のAnfポリペプチドのタンパク質-タンパク質相互作用を検出するため、いくつかの実験を設計して実施した。第1の実験においてこれを検証するため、anfD、anfK、anfH、およびanfG遺伝子 (それぞれ、それ自身の35Sプロモータから発現し、SL26と同じ転写ターミネータを持つ) を含有するSL30と名づけたベクター (表20) を設計して作製した。SL26に対する重要な改変は、SL30のAnfD融合ポリペプチドが、穏やかな非変性条件下でAnfDポリペプチドの精製を提供するためAnfDのC末端に融合されたTwinStrepエピトープを持っていたことであった。SL30は、ミトコンドリア局在化のためAnfDのN末端に融合したMTP-FAγ51配列を相変わらず持っていた。SL30によってコードされるAnfK、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドは、SL26のように、これらポリペプチドのN末端に一過性に融合されたMTP-FAγ51配列の後にHAエピトープを、次いでAnf配列を持っていた。SL30の中のそれぞれの個別の遺伝子は、やはりSL26のように、それ自身の35Sプロモータとターミネータを保持していた。

【1104】

SL30を *A. tumefaciens* に導入し、以前のようにして、形質転換されたアグロバクテリウムの培養物を *N. benthamiana* の葉に浸透させた。5日後、葉サンプルを採取し、周囲大気条件で処理して可溶性タンパク質を抽出し、抽出バッファに入れた (実施例14と同じ抽出バッファを使用)。この粗タンパク質混合物を好気条件下でStrep-tactin XTアフィ

10

20

30

40

50

ニティカラムを通過させた。カラムを10カラム分の体積の（実施例14のような）洗浄バッファで洗浄して結合しなかったタンパク質を除去した後、結合したタンパク質を、50 mMのビオチン、pH 7.2を含有する洗浄バッファで溶離させ、SDS-PAGEによって分析するとともに、AnfDポリペプチドを検出するためのStrep-Tactin抗体と、HAエピトープを持つ同時に精製するあらゆるAnfポリペプチドを検出するための抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。

【1105】

抽出されたタンパク質を、Strep-tactin抗体を用いたウエスタンブロット法によって評価した。分析は、精製されたAnfDポリペプチドが溶離液の中に存在することと、プロセッシングを受けた形態に相当する分子量で移動することを示した（図26）。これは、ミトコンドリア標的型AnfDがプロセッシングを受けて可溶性になり、Strep-tactinアフィニティ媒体と相互作用したことを示す。ウエスタンブロットをHA抗体で調べたとき、AnfK融合ポリペプチドに対応する弱い明確に見ることのできるバンドが観察され、MPPによって正しくプロセッシングを受けたAnfKのアイソフォームと一致する速度で移動した。これは、AnfK融合ポリペプチドがAnfDポリペプチドとの会合を通じて同時に精製されたことを示していた。AnfGポリペプチドはウエスタンブロットに見ることができなかった。ウエスタンブロット上には分子量がより小さいいくつかのバンドも存在しており、それは、抽出後に生じたAnfDの分解産物を表わしている可能性がある。

【1106】

第2の類似した実験を同様にして実施したが、新たな多遺伝子コンストラクトSL34を作製して使用した点が異なっていた。このコンストラクトでは、TwinStrepエピトープをMTP配列とAnfK配列の間の位置でAnfK配列に融合させ、AnfDポリペプチドは、SL26によってコードされるポリペプチドと同じであった（表20）、すなわちHAエピトープを持っていた。この構成は、SL26を用いた実験と比較して逆捕獲と検出を調べるために設計されたものであり、AnfKポリペプチドをStrep-tactinカラムで精製し、結合したタンパク質をHA抗体で分析して他のAnfポリペプチドの存在を探ることができた。SL34によってコードされるAnfKポリペプチドは、MTP-FAγ51ではなく、AnfKのN末端に融合されたTwin-strepを持つCoxIV MTPリーダー配列を含有していた。SL34によってコードされるAnfD、AnfH、およびAnfG融合ポリペプチドはそれぞれ、そのポリペプチドのN末端に一過性に融合されたMTP-FAγ51配列とそれに続くHAエピトープを持っていた。CoxIV MTPは、タンパク質を*N. benthamiana*内のミトコンドリアマトリックスに正しく向かわせることが以前に示されている（Buren他、2017年）。

【1107】

SL34を含有する*A. tumefaciens*培養物を*N. benthamiana*の葉に浸透させ、葉のサンプルを5日後に採取した。これらの組織サンプルを、SL30と同じ実験条件を利用して周囲大気下で処理し、得られた粗タンパク質抽出液をStrep-Tactinカラムを通過させて、TwinStrep配列を含有するAnfKポリペプチドを精製した。カラムからの溶離液を、SDS-PAGEと、それぞれHAエピトープとTwinStrepエピトープを持つポリペプチドを検出するためのHA抗体とStrep-tactin抗体の両方を用いたウエスタンブロッティングによって再度分析した。Strep-tactin抗体で調べたウエスタンブロットは、予想通り溶離液の中に精製されたAnfKポリペプチドの存在を示し、このポリペプチドの分子量は、MPPによるプロセッシングを受けたアイソフォームと一致していた。HA抗体を用いてウエスタンブロットをさらに調べると、AnfDポリペプチドの存在が観察された。これは、AnfDポリペプチドがAnfKポリペプチドと同時に精製されたことを示している。AnfDの分子量は、MPPによるプロセッシングを受けたアイソフォームと一致していた。AnfGはウエスタンブロットでやはり観察されなかったが、のちにLC-MS質量分析法によって小さなシグナル強度で検出された。この実験は、SL30を用いた以前の実験と同様、MPPによるプロセッシングを受けて植物細胞のミトコンドリアマトリックスを標的とするAnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドが互いに会合していることを実証した。

【1108】

AnfKのN末端に融合されたMTP-CoxIV配列とTwin-strep配列を持つ融合ポリペプチドと、AnfGポリペプチドのN末端に一過性に融合されたMTP-FAγ51配列とそれに続くHAエピトープを持つAnfH融合ポリペプチドと、AnfHポリペプチドのN末端に一過性に融合されたMTP-FAγ51配列とそれに続くHAエピトープを持つAnfG融合ポリペプチドをコードする別の多遺伝子ベクターSL37（表20）を組み立てた。AnfDポリペプチドもN末端に一過性に融合したMTP-FAγ51 MTPを持っていたが、HAエピトープはAnfD配列のC末端に一過性に融合していた。このコンストラクトは、AnfKポリペプチドが完全長のプロセシングを受けたAnfDポリペプチドと会合しているか、切断型AnfD産物と会合している可能性があるかを調べるために設計された。今回は、タンパク質の抽出とプロセシングを嫌気条件下で実施した。タンパク質抽出液をStrep-tactin XTアフィニティカラムを通過させた後に溶離させる操作をすべて嫌気条件下で実施した。次に、溶離液を、SDS-PAGEと、検出のためのHA抗体とstrep-tactin抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。

10

【1109】

Strep-tactin抗体で調べたウエスタンブロットは、プロセシングを受けたAnfKポリペプチドの存在を示した。さらに、HA抗体で調べたウエスタンブロットは、サイズがプロセシングを受けたAnfDポリペプチドとプロセシングを受けていないAnfDポリペプチドの両方に対応するポリペプチドバンドを示し、より小さいAnfD産物を表わすより小さな分子量のバンドは、抽出後に生成した可能性が大きかった。AnfHポリペプチドとAnfGポリペプチドのサイズのポリペプチドバンドが溶離液の中に観察されたが、AnfKまたはAnfDの強度よりもはるかに小さな強度であった（図26）。

20

【1110】

SL34サンプルとSL37サンプルから生成した溶離液をLC-MS質量分析法と標的型MRMによって分析した。AnfK、AnfD、およびAnfGポリペプチドからのペプチドが両方の溶離液で検出され、AnfHからのペプチドは、嫌気性抽出の後にだけ検出された。

【1111】

上記の実験のための陰性対照として、検出の特異性を調べるため、AnfD、AnfK、AnfG、およびAnfHポリペプチド（すべてが、MTP-FAγ51に融合されていて、N末端にHAエピトープを持つ（表20））をコードするSL26を*N. benthamiana*の葉に導入した。葉組織を上に記載したように好気条件でSL30およびSL34と同じやり方で処理した。Strep-tactinで調べたSL26からのタンパク質抽出液のウエスタンブロットで観察された唯一のポリペプチドバンドは、比較的弱いバックグラウンドのバンドであった。溶離液の中に、Strep-tactinまたはHAで調べたウエスタンブロットに関するAnfポリペプチドのバンドは存在していなかった。この対照実験は、ウエスタンブロット上で観察されたHAエピトープ含有ポリペプチドが、特にAnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドの会合に由来したことを実証した。

30

【1112】

考察

【1113】

これらの実験では、多遺伝子コンストラクトと、エピトープタグの違いを利用して、植物ミトコンドリアマトリックスを標的とするAnfD融合ポリペプチドとAnfK融合ポリペプチドの間の会合を示した。これらの結果は、多種類のAnfポリペプチドを産生させてそれを植物ミトコンドリアの中に局在化させることが可能であることを実証した。これらの実験は、初めて、真核細胞環境の中での、特に植物ミトコンドリアの中での明確なFe-ニトロゲナーゼタンパク質の産生を実証した。単一のベクターから多種類のAnf遺伝子を同時に発現させるとAnfDポリペプチドの可溶性が増大したが、それでも相変わらずほんの部分的な可溶性であった。

40

【1114】

好気条件下で処理したとき、精製されたAnfDポリペプチドのいくつかは、AnfKポリペプチドと同時に精製された。逆実験を、AnfKは一過性にTwinStrepエピトープに融合さ

50

れ、他のAnfポリペプチドはすべてHAエピトープに融合された好気条件下で実施した。AnfDタンパク質のいくらかは、AnfKポリペプチドのほか、少量のAnfGタンパク質と同時に精製された。類似した実験を好気条件下で実施したとき、再びほんの少量のAnfGタンパク質が検出された。これは、AnfD、AnfK、およびAnfGポリペプチドがミトコンドリアの可溶性分画の中で相互作用して複合体を形成したことを示す。AnfKの精製時にAnfGとAnfDがAnfKとともに検出されたというのは、3者間の会合を示していた。好気条件下でAnfGがAnfD-AnfKと同時に精製されることも実証された。FeFeニトロゲナーゼで予想される構造は、AnfDの表面と物理的に相互作用するAnfGポリペプチドを有する（SippelとEinsle、2017年；Zheng他、2018年）。興味深いことに、抽出を好気条件で実施したとき、少量のAnfHタンパク質も溶離液の中に見いだされた。

10

【1115】

AnfGタンパク質がプルダウン実験においてAnfDおよびAnfKよりも少ない量で観察された。AnfGに関する正しいサイズの位置のバンドが、より長時間の現像後に見られた。AnfGがより少なかったというのは、Fe-ニトロゲナーゼヘテロ六量体でサブユニットの最適な比がまだ実現されていないことを示している可能性がある。

【1116】

本発明の発明者らは、これらの実験から、AnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドの会合と、AnfD、AnfK、およびAnfGの3者間の会合が、ニトロゲナーゼを操作するために植物ミトコンドリアの中でこれらのFe-ニトロゲナーゼ構成要素を使用できることを実証したと結論した。

20

【1117】

実施例20：植物ミトコンドリアを標的とするAnfDとAnfKの間の翻訳融合体の作製

【1118】

Fe-ニトロゲナーゼの結晶構造は報告されていないが、Fe-ニトロゲナーゼを有する窒素固定菌の中のFe-ジニトロゲナーゼのAnfD、AnfK、およびAnfGサブユニットは、1:1:1化学量論比であると予想されている（HuとRibbe、2015年；Zheng他、2018年）。AnfD、AnfK、およびAnfGポリペプチドに関するこの比は、Fe-ニトロゲナーゼの最適な機能にとって重要である可能性があり、AnfD構成要素の可溶性に影響を与える可能性がある。この実施例に記載されているように、Fe-ニトロゲナーゼで予想される構造モデルが開発された。このモデルを用いて適切な長さのオリゴペプチドリンカーを設計してAnfDのC末端をAnfKのN末端に接合することにより、AnfDとAnfKの翻訳融合体を生成させた。リンカーの長さは、予想される構造モデルに基づき、このタンパク質複合体の正しい折り畳みが可能になるように設計した。この融合ポリペプチドを発現させる遺伝子コンストラクトを作製して調べた。この融合ポリペプチドは、ミトコンドリアマトリックスにこの融合ポリペプチドを局在化させるMTP配列を持っていた。

30

【1119】

Fe-ニトロゲナーゼの構造モデルの生成

【1120】

AnfD::リンカー::AnfK融合ポリペプチドを設計するため、AnfDKHG複合体に関する相溶性モデルを、*A. vinelandii* V-ニトロゲナーゼの結晶構造PDB ID: 5N6Y（SippelとEinsle、2017年）に基づいて作った。これを使用したのは、Fe-ニトロゲナーゼの結晶構造がこれまでにまったく報告されておらず、V-ニトロゲナーゼは配列相同性が最も近いと考えたからである。相同性モデルは、鋳型としてPDB ID: 5N6Y $\alpha_2\beta_2$ -ヘテロ二量体からの各単量体を用い、*A. vinelandii*の野生型のAnfDポリペプチドとAnfKポリペプチド（配列番号216と217）のそれぞれに関するSWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org/)を利用して構成した。AnfDモデルは、野生型配列のC末端の31残基（NSETLRQYTG GYDS VSKLREREYPAFERKVG、配列番号197）が失われており、AnfKモデルは、N末端の2個のアミノ酸（PH）が失われていた。Chimeraの中のマッチメーカー機能を利用して完全なヘテロ二量体を構成し、AnfD相同性モデルとAnfK相同性モデルを天然の5N6Y $\alpha_2\beta_2$ -ヘテロ二量体に重ね合わせ、その後、Discovery Studio 2018（Dassault Systemes B

40

50

【 1 1 2 1 】

【 1 1 2 2 】

【 1 1 2 3 】

【 1 1 2 4 】

【 1 1 2 5 】

50

トープは最小化法または分子動力学法には含まれていなかった。AnfD配列とAnfK配列の間にあって両者を接合するこのリンカー26(HA)を持つ融合ポリペプチドが、N末端MTP配列（配列番号201）を持っていないか、この融合ポリペプチドのN末端に融合されたMTP-FAγ51（配列番号202）、MTP-CoxIV（配列番号203）、mFAγ51（配列番号204）、または6×His配列（配列番号205）を持っていないと、それぞれの場合にAnfDを許容することが予想された。

【1126】

天然の構造に対して予測される有害な効果がなく適切に会合するAnfK、AnfG、およびAnfHポリペプチド。これらの設計では、AnfGタンパク質はこのリンカー設計に含まれていなかった。なぜならAnfGのN末端とC末端の両方がAnfDの表面近くに埋もれ、リンカーのいかなる伸長も許容しない可能性が大きいように見えたからである。AnfGとAnfKの両方ともC末端アミノ酸伸長部を許容しないことも実証されている（Yang他、2018年）。これは、上記のようにして開発されたFe-ニトロゲナーゼの相同性にに基づくモデルに合致している。

【1127】

この実施例で使用したコンストラクトは表21にまとめられている。

【1128】

【表21】

表21：この実施例で使用した遺伝子コンストラクトのリスト

プラスミド	コードされているポリペプチド	予想分子量 (kDa)	
		プロセッシングなし	プロセッシングあり*
SN272	MTP-FAγ51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK	118	113
SN273	MTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK	118	115
SN274	mFAγ51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK	117	NA
SN275	HIS::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK	112	NA
SN161	MTP-FAγ51::HA::AnfD	65.3	60.7
SN129	MTP-FAγ51::HA::AnfK	58.1	53.5
SL26	MTP-FAγ51::HA::AnfG	22.2	17.7
	MTP-FAγ51::HA::AnfD	65.3	60.7
	MTP-FAγ51::HA::AnfK	58.1	53.5
	MTP-FAγ51::HA::AnfH	36.9	32.4
SL28	MTP-FAγ51::HA::AnfD	65.3	60.7
	MTP-FAγ51::HA::AnfK	58.1	53.5
SN129	MTP-FAγ51::HA::AnfK	58.1	53.5
SN161	MTP-FAγ51::HA::AnfD	65.3	60.7

【1129】

植物細胞の中でAnfD-リンカー-AnfKポリペプチドを発現させるための遺伝子コンストラクトの合成と試験

【1130】

AnfD::リンカー26(HA)::AnfKタンパク質コード領域をコードするDNA配列を化学的に合成して用いるとともに、AnfDとAnfKの*A. vinelandii*アミノ酸配列を使用し、Golden Gateプロトコルを通じて遺伝子コンストラクトのセットを作った。タンパク質コード領域は植物での発現のためにコドンが最適化された。この融合ポリペプチドをコードする遺伝子の植物細胞の中での発現は、35SプロモータとNos3'ポリアデニル化領域／転写ターミネータの制御下でなされた（表21）。ミトコンドリアを標的とするため、MTP-FAγ51::Hをコードする配列を、AnfD::リンカー26(HA)::AnfKタンパク質をコードする領域の上流に付加し、転写されて翻訳されたときにMTPとHAのアミノ酸配列がAnfD::リンカー26

(HA)::AnfKポリペプチドに単一の翻訳産物として翻訳融合されるようにした。この融合ポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトをSN272と名づけた。SN272によってコードされる完全長融合ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号202として示されている。TwinStrep配列を持つCoxIV遺伝子からのMTP配列（Bure他、2017年）がMTP-FA γ 51配列で置き換えられていること以外は同じであるポリペプチドをコードするSN273と名づけた第2のベクターを作製した。SN273によってコードされる完全長融合ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号203として示されている。ミトコンドリアの中での翻訳産物のプロセッシングを検出する分子量マーカーを用意するため、2つの遺伝子コンストラクトを対照として作製した。第1（SN274）は、MTP-FA γ 51配列を欠いていたため細胞質を標的の素と考えらる。第2（SN275）は、MPPによる切断を阻止する変異したMTP-FA γ 51配列（mFA γ 51と名づける）を持っていた。SN274とSN275によってコードされる融合ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号204および205として示されている。

【1131】

実施例1に記載されているアグロバクテリウム媒介法を利用してこれらのベクターを別々に*N. benthamiana*の葉に導入した。さらなる対照として、さまざまな組み合わせの個々のAnfタンパク質を発現するベクターSL26、SL28、SN161、およびSN129も、*N. benthamiana*の葉に浸透させた。葉組織を浸透の4日後に採取し、実施例1に記載されているようにして処理して全タンパク質分画、可溶性タンパク質分画、および不溶性タンパク質分画を求めた。得られたタンパク質分画を、SDS-PAGEと、検出のためのHAエピトープを用いたウエスタンブロッティングによって分析した。

【1132】

ウエスタンブロットは、AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドのすべてが、*N. benthamiana*の葉から単離された全タンパク質分画の中で容易に検出されたことを明らかにした（図30）。各コンストラクトからの主要なポリペプチドバンドの分子量は、110~120 kDaの範囲というポリペプチドの予想サイズと一致していた（表21参照）。完全長（プロセッシングを受けていない）MTP-FA γ 51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドの予想サイズは約118 kDaであった。切断後のプロセッシングを受けたポリペプチドは約113 kDaになることが予想され、SDS-PAGEゲル上とウエスタンブロットにおける異なる移動度により、プロセッシングを受けていないポリペプチドから識別できると考えられる。ウエスタンブロット上で検出されるポリペプチド（図30）の分子量は、SN275によってコードされていてプロセッシングを受けた形態を表わす対照ポリペプチドと一致していた。これは、SN272からのMTP-FA γ 51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドがミトコンドリアの中に効率的に輸送され、*N. benthamiana*細胞の中で切断されたことを示している。同様に、MTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドをコードするコンストラクトSN273から生成したポリペプチドバンドも、効率的かつ正確にプロセッシングを受けたように見えた。SN272からのMTP-FA γ 51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドは2つのHAエピトープを持っていたのに対し、SN273からのMTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドは1つしか持っていなかったため、前者のポリペプチドは、ウエスタンブロットにおいて、ポリペプチド1つ当たりではより効率的に検出された可能性がある。

【1133】

可溶性分画と不溶性分画のウエスタンブロットは、SN161からミトコンドリア標的型AnfDが発現することそのものの結果として不溶性ポリペプチドが優勢になり（図31、パネルA）、非常に弱いバンドしか見えないことを示した。しかしAnfDポリペプチドの可溶性は、同じAnfD遺伝子をSL28からAnfKと同時に発現させたときに増大し、AnfD遺伝子をSL26からAnfK、AnfH、およびAnfGと同時に発現させたときにさらに改善された。AnfD遺伝子とAnfK遺伝子が同時に発現するそれぞれの場合に、AnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドは、同じT-DNAから発現する遺伝子であるにもかかわらず、可溶性分画の中に異なる量で検出された。それとは対照的に、SN272とSN273におけるようにミトコンドリア標的型MTP::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドの形態のAnfDとAnf

Kの翻訳融合体は、AnfDポリペプチドとAnfKポリペプチドに関する1:1という理想的な化学量論比を必ずしも提供しなかった。本発明の発明者らは、リンカー配列を用いた融合ポリペプチドは、上記の2つの遺伝子が1つのT-DNA上で連結されているときでさえ、別々の遺伝子からの上記ポリペプチドの発現と比べて少なくともこの利点を持つと結論した。

【1134】

SN272とSN273から発現したMTP::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドのプロセッシングから得られたポリペプチドは、植物抽出液の可溶性分画と不溶性分画の両方で検出された(図31、パネルA)とB))。ミトコンドリアを標的とするAnfHとAnfGを発現する遺伝子の追加によってミトコンドリア標的型AnfDの可溶性が増大したため、さらなる実験で、ミトコンドリア標的型MTP::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKを、ミトコンドリアを標的とするAnfHおよびAnfGと同時に発現させることにする。

【1135】

MTP-FAγ51::HA::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチドのプロセッシングから得られたポリペプチドを、SN272から遺伝子が発現させた後、親和性に基づく精製法においてHAエピトープを用いて精製した。精製されたタンパク質でプロテオミクス分析を実施し、N末端配列がMPPによって切断されると予測されることを確認した。

【1136】

遺伝子コンストラクトSN272は、アグロバクテリウムを媒介とした形質転換によって安定に形質転換された植物を生成させるのに適していると考えられるバイナリーベクターであり、選択マーカー遺伝子が付加されている。融合ポリペプチドをコードする遺伝子を切除し、適切な選択マーカー遺伝子を含むバイナリーベクターに挿入する。それがなされると、得られたベクターを使用して、安定に形質転換されたタバコと*N. benthamiana*植物を生成させる。融合ポリペプチドが発現し、MTP配列の中の想定される部位でMPPによって切断されることが実証されるとともに、ミトコンドリアの中に存在することが実証される。プロセッシングを受けた融合ポリペプチドの少なくともいくつかは可溶性分画の中に存在する。

【1137】

実施例21: 植物細胞内のFe-ニトロゲナーゼに必要とされていてミトコンドリアを標的とするAnfタンパク質とNifタンパク質の産生

【1138】

緒言

【1139】

Anfタンパク質とNifタンパク質をコードする最少の10個の遺伝子、すなわちAnfD、AnfK、AnfH、およびAnfGポリペプチドをコードする4つの構造Anf遺伝子と、NifV、NifS、NifU、NifJ、NifF、およびNifBをコードする6つのいわゆるアクセサリーNif遺伝子が、大腸菌の中でFe-ニトロゲナーゼを構成するのに必要であると報告されている(Yang他、2014年)。Anfポリペプチドの配列は窒素固定菌*A. vinelandii*に基づいており、他のNifポリペプチドの配列は細菌*K. oxytoca*に基づいていた。大腸菌の中でこの10個の遺伝子のセットを発現させることによって機能的Fe-ニトロゲナーゼが生成したが、低活性であった(Yang他、2014年)。

【1140】

本発明の発明者らは、植物ミトコンドリアの中でAnf融合ポリペプチドとNif融合ポリペプチドが可溶性形態で産生されることを示す本明細書の前の実施例に記載されているデータに基づき、植物細胞を操作してFe-ニトロゲナーゼを産生させる遺伝子の最少セットを生成させ、その遺伝子産物を植物細胞の中のミトコンドリアマトリックスに向かわせることを試みることを決断した。

【1141】

結果

【1142】

一連の実験のために選択された遺伝子産物のセットは、窒素固定菌*A. vinelandii* (Av

10

20

30

40

50

）に基づくAnfD、AnfK、AnfG、およびAnfHポリペプチドと、6つのNifタンパク質、すなわち*K. oxytoca* (Ko) に基づくNifF、NifJ、NifS、およびNifU、*A. vinelandii*からのNifV (AvNifV)、および*Methanocaldococcus infernus*からのNifB (MiNifB)を含んでいた。*N. benthamiana*の葉の中でこれらのポリペプチドを発現させ、N末端MTP配列の一過性融合を通じてミトコンドリアマトリックスに向かわせるための遺伝子コンストラクトを、前の実施例に記載されている遺伝子コンストラクトと同様にして設計して作製した。以前と同様、これらの融合ポリペプチドを発現させるためのヌクレオチド配列は、植物細胞の中での発現のためにコドンが最適化された。これらの融合ポリペプチドをミトコンドリアに向かわせるため、2つの異なるMTP配列、すなわちMTP-FAγ51とMTP-CoxIVを用いた。MTP-FAγ51を持つポリペプチドは、N末端またはC末端に融合されたHAエピトープを持っていたのに対し、MTP-CoxIVを持つポリペプチドは、それとAnf/Nifポリペプチドの間に挿入されたTwinStrepエピトープを持っていた。*N. benthamiana*の中で発現させるため、それぞれの遺伝子は、35Sプロモータとnos 3'ポリアダニル化領域／転写ターミネータの制御下にあった。これらのヌクレオチド配列は、それぞれのタンパク質コード領域のそれぞれ上流と下流にあった。これらのコンストラクトは、以前のようにGolden Gate法を利用して組み立てた。

【1143】

これらの原理と方法を利用して多遺伝子コンストラクトSL42とSL43を作製した。ベクターのそれぞれは、1つのT-DNAの中で連結された5つの異なる別々の遺伝子を持っていた（表22）。SL42は、KoNifS、KoNifU、KoNifJ、KoNifF、およびMiNifB配列を含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を持ち、それぞれが、それ自身のMTPと、一過性に融合されたエピトープ配列を持っていた。SL43は、AvAnfD、AvAnfK、AvAnfH、AvAnfG、およびAvNifV配列を含む融合ポリペプチドをコードする遺伝子を持ち、やはりそれぞれが、それ自身のMTPとエピトープ配列を持っていた。AvNifV配列は、発現、プロセッシング、および可溶性のデータと、実施例15に記載されているように、植物ミトコンドリアを標的とするAvNifVによるホモクエン酸産生の証拠に基づき、多くの入手可能なNifV配列から選択された。

【1144】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表22：植物細胞の中で発現させるFe-ニトロゲナーゼの構成要素をコードする単一遺伝子コンストラクトと多遺伝子コンストラクト

プラスミド	コードされるポリペプチド	予想分子量 (kDa)	
		プロセッシングなし	プロセッシングあり
SL42	MTP-FA γ 51::KoNifF::HA	26.1	21
	MTP-FA γ 51::KoNifJ::HA	135	130
	MTP-FA γ 51::KoNifS::HA	50.3	45
	MTP-FA γ 51::KoNifU::HA	36	31
	MTP-CoxIV::TwinStrep::MiNifB	41.6	38
SL43	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfG	22.2	17.7
	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfD	65.3	60.7
	MTP-CoxIV::TwinStrep::AvAnfK	57.7	54.7
	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfH	36.9	32.4
	MTP-FA γ 51::HA::AvNifV	48.4	43.8
SL48	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfG	22.2	17.7
	MTP-CoxIV::TwinStrep::AvAnfD::リンカー26(HA)::AvAnfK	118	115
	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfH	36.9	32.4
	MTP-FA γ 51::HA::AvNifV	48.4	43.8
SL49	MTP-FA γ 51::KoNifF::HA	26.1	21
	MTP-FA γ 51::KoNifJ::HA	135	130
	MTP-FA γ 51::KoNifU::HA	36	31
	MTP-FA γ 51::HA::MiNifB	41.9	37.3
SN254	MTP-FA γ 51::HA::AvNifV	48.4	43.8
SL50	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfG	22.2	17.7
	MTP-CoxIV::TwinStrep::AvAnfD::リンカー26(HA)::AvAnfK	118	115
	MTP-FA γ 51::HA::AvAnfH	36.9	32.4
	MTP-FA γ 51::HA::AvNifV	48.4	43.8
	MTP-FA γ 51::HA::AvFdxN	16.4	11.9
SL54	MTP-FA γ 51::KoNifF::HA	26.1	21
	MTP-FA γ 51::KoNifJ::HA	135	130
	MTP-FA γ 51::KoNifS::HA	50.3	45
	MTP-FA γ 51::KoNifU::HA	36	31
	MTP-FA γ 51::KoNifB::HA	58	53
SN192	MTP-FA γ 51::KoNifB::HA	58	53
SL78	MTP-FA γ 51::KoNifF::HA	26.1	21
	MTP-FA γ 51::KoNifJ::HA	135	130
	MTP-FA γ 51::KoNifS::HA	50.3	45
	MTP-FA γ 51::KoNifU::HA	36	31
	MTP-FA γ 51::HA::MiNifB	41.9	37.3

【1 1 4 5】

植物細胞の中での融合ポリペプチドの産生

【1 1 4 6】

SL42を含有する*A. tumefaciens*の培養物を実施例1に記載されているようにして5週齢の*N. benthamiana*の葉に浸透させた。浸透の4～5日後、葉サンプルを採取した。全、可溶性、および不溶性タンパク質分画を以下のようにして抽出した。植物で発現するポリペプチドの可溶性を調べるため、葉組織を氷冷抽出バッファ（100 mMのTris pH 8.0、150 mMのNaCl、0.25 Mのマニトール、5% (v/v) のグリセロール、1% (v/v) のTween 20、1% (w/v) のPVP、新たに添加した2 mMのTCEP、0.2 mMのPMSF、および10 μ M

のロイペプチン)の中で粉碎し、マイクロフュージチューブに移した。サンプルを20,000×gで5分間遠心分離してサンプルを可溶性(上清)分画と不溶性(ペレット)分画に分けた。上清を新しいマイクロフュージチューブに移し、再度20,000×gで5分間遠心分離して残ったあらゆる不溶性材料を除去した。ピペットを繰り返して振ることによる散布でペレットを300 µlの抽出バッファの中に再懸濁させることによって不溶性分画を洗浄し、20,000×gで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。この洗浄工程を2回以上繰り返して残留している可溶性タンパク質をすべて不溶性分画から除去した。次にサンプルを、SDS-PAGEと、抗HA抗体と抗Strep抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。抗HA抗体(モノクローナル抗HA、Sigma社)は1:5000の希釈度で使用し、抗Strep/HRPコンジュゲート抗体(Strep-MAB-コンジュゲートHRP、IBA社)は1:10,000の希釈度で使用した。

10

【1147】

SL42に関するウエスタンブロット分析(図32)は、5つのポリペプチドすべてが適切な抗体で容易に検出され、それぞれが、可溶性タンパク質分画の中に存在するポリペプチドバンドを示すことを示した。NifJ融合ポリペプチドはMPPによる完全なプロセッシングを受けたように見えたのに対し、NifU、NifS、およびNifFポリペプチドは、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方として存在していた。これは、MPPによる切断の効率がより低いことを示している。NifJ、NifU、NifS、NifF、およびNifBポリペプチドは、可溶性分画と不溶性分画の両方に存在していた。NifBポリペプチドは、N末端でMTP-CoxIV-Twin-strep配列に一過性に融合されており、抗Strep抗体を検出に用いたときに見ることができた(図31、パネルB)。

20

【1148】

SL43に関するウエスタンブロット分析(図33)も、コードされた5つのポリペプチドすべてが適切な抗体で容易に検出され、それぞれが可溶性タンパク質分画の中に存在するポリペプチドバンドを示すことを示した。重要なことだが、プロセッシングを受けたAnfD、AnfK、およびAnfH融合ポリペプチドはすべて、可溶性分画の中で観察された。これらは不溶性分画の中でも観察された。これは、これら3つの融合ポリペプチドが部分的に可溶性であることを示している。この結果は、単一遺伝子ベクターからの対応する遺伝子の発現で観察されたよりも有意に優れていた。AnfD、AnfG、AnfH、およびNifV融合ポリペプチドはすべて、MPPによって部分的に切断されたように見え、それぞれ、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態のバンドを示した。AnfK融合ポリペプチドは効率的にプロセッシングを受けたように見えた。

30

【1149】

次に、SL42を含有する*A. tumefaciens*の培養物とSL43を含有する*A. tumefaciens*の培養物を混合し、前に記載されているようにして*N. benthamiana*の葉に浸透させた。したがってこの実験は、全部で4つのAvAnf遺伝子と全部で6つのNif遺伝子、すなわち10個の遺伝子の組み合わせを導入した。ウエスタンブロットで観察された驚くべき重要な結果(図34)は、10個のポリペプチドすべてが容易に検出されたことであった。さらに、10個のポリペプチドすべてが可溶性分画の中に存在しており、いくつかはMPPによる効率的なプロセッシングを示した。これらポリペプチドのいくつかは2つのバンドで見られ、上方のバンドはプロセッシングを受けていないポリペプチドを表わし、下方のバンドはMPPによって切断されたポリペプチドを表わすため、ミトコンドリアに取り込まれたことを実証している。プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドがタンパク質AnfD、NifV、NifU、およびNifFで見られたほか、切断されたポリペプチドで予想されるサイズの位置にバンドが存在していた。

40

【1150】

植物細胞の中でのAnfDとAnfKの会合

【1151】

多遺伝子ベクターSL43とSL49(表22)を、別々に、そして組み合わせて、5週齢の*N. benthamiana*植物に浸透させた。SL43は、AnfD、AnfH、AnfG、およびNifVポリペプ

50

チドをコードする4つの別々の遺伝子（それぞれ、翻訳融合されたMTP-FA γ 51配列の後に、NifポリペプチドのN末端に位置するHAエピトープを持つ）と、AnfKのN末端に融合されたMTP-CoxIV配列とTwin-strep配列をコードする第5の遺伝子を持つ融合ポリペプチドをコードしていた。SL49は、NifポリペプチドのN末端に翻訳融合されたMTP-FA γ 51配列の後にHAエピトープをC末端の位置に持つNifJ、NifF、およびNifU融合ポリペプチドと、N末端に融合されたMTP-FA γ 51とHAを持つNifB融合ポリペプチドをコードしていた。これらのコンストラクトは、Twin-Strepエピトープを用いたAnfKポリペプチド産物の精製を可能にするため、そして他のAnfタンパク質またはNifタンパク質の同時精製の可能性を調べるために設計した。

【1152】

同時に浸透された植物サンプルからのタンパク質の抽出とプロセッシングを嫌気条件下で実施した。タンパク質抽出液をStrepTactinXTアフィニティカラムを通過させ、次いで溶離した。ポリペプチド精製プロセスで回収されたサンプルを、SDS-PAGEと、検出のためのHA抗体とStrep-tactin抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。

【1153】

Strep-tactin抗体で調べたウエスタンブロットは、全、入力、ペレット、および溶離分画それぞれの中に、プロセッシングを受けたAnfK融合ポリペプチドの存在を示した。より小さな分子量のバンドは、AnfK由来のより小さな産物を表わしている可能性があり、それはプロテアーゼ汚染物による抽出後の分解によって生成した可能性が大きかった。精製されたAnfK融合ポリペプチドは、ブロット上のAnfKバンドの強度によって示されるように、溶離分画の中では入力分画と比べて大きく濃縮されていた。ウエスタンブロットをHA抗体で再び調べたとき、コードされたAnf融合ポリペプチドとNif融合ポリペプチドはすべて入力サンプルの中で検出されたが、AnfGのバンドはブロットを1分間ではなく20分間現像した後にだけ見ることができた。重要なことだが、HA抗体も、溶離サンプルの中にプロセッシングを受けたAnfDポリペプチドの存在を示した。溶離サンプルの中のAnfDとAnfKの存在は、AnfK融合ポリペプチドが精製されたとき、MPPによるプロセッシングを受けたAnfDポリペプチドが同時に精製されたことを示していた。これは、これら2つの融合ポリペプチドのタンパク質-タンパク質相互作用を示している。

【1154】

浸透された植物細胞の中でのホモクエン酸の産生

【1155】

実施例15に記載されているように、植物コドンが最適化された*A. vinelandii* NifV融合ポリペプチド（AnNifV）は、遺伝子コンストラクトSN254から個別に発現したときにホモクエン酸シンターゼ活性を示した。SL42ベクターまたはSL43ベクター、または両方のベクターの組み合わせを浸透させた葉サンプルで、実施例15に記載されているようにしてGC-MS/MS法を利用してホモクエン酸の存在を調べた。ホモクエン酸は、単独のSL43、またはSL42と組み合わせたSL43を浸透させたサンプルで検出されたが、SL42だけを浸透させたサンプルでは検出されなかった。これは、SL43上のAvNifV遺伝子の存在と整合していた。

【1156】

Anf遺伝子とNif遺伝子の組み合わせのためのさらなるコンストラクト

【1157】

実施例20に示されているように、遺伝子コンストラクトが植物細胞に導入された後、ミトコンドリアを標的としてオリゴペプチドリンカーを介してAnfKに接合されたAnfDを持つ融合ポリペプチドが発現し、効率的なプロセッシングを受けると、可溶性タンパク質分画に優勢に存在することが観察された。そこでSL43上のAnfD遺伝子とAnfK遺伝子がMTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK融合ポリペプチド（配列番号203）をコードするハイブリッド遺伝子で置き換えられた遺伝子コンストラクトを作製した。この新たなベクターをSL48と名づけた。

【1158】

SL48とSL49を別々に*N. benthamiana*の葉に導入したとき、コードされたポリペプチドのすべてが可溶性タンパク質抽出液の中に少なくともある程度存在することがウエスタンブロット分析によって観察された（図35と図36）。SL48とSL49の組み合わせを*N. benthamiana*の葉に導入したときには、コードされるペプチドの8つすべてが、プロセッシングを受けたscar::TwinStrep::AvAnfD::リンカー26(HA)::AvAnfK融合ポリペプチド（図37ではAnfDKと表示）を含め、可溶性タンパク質抽出液の中に存在することがウエスタンブロット分析によって観察された。

【1159】

MTP-FAγ51::NifS::HAをコードする第5の遺伝子が付加されていることを除いてSL49と同じである別のコンストラクトSL78（表22）を作製した。SL48とSL78を別々に、または組み合わせて*N. benthamiana*の葉に浸透させた。全、可溶性、および不溶性タンパク質分画のウエスタンブロットは、コードされた融合ポリペプチドがすべて、可溶性分画と全タンパク質サンプルに存在することを示した。すなわちこれら2つのベクターの組み合わせによってコードされる9つの融合ポリペプチドすべてを、SL48由来でMPPによるプロセッシングを受けたscar9::TwinStrep::AvAnfD::リンカー26(HA)::AvAnfK融合ポリペプチドを含めて検出することができた。したがって大腸菌の中でFe-ニトロゲナーゼを構成するための最少セットとして必要であることが報告されている全部で10個のAnfタンパク質とNifタンパク質（Yang他、2014年）が植物細胞の中で産生され、それらはミトコンドリアを標的としていて、少なくとも部分的に可溶性である形態で存在した。

【1160】

ホモクエン酸の産生が、SL48を受け入れていた浸透された細胞の中で検出される。

【1161】

Nif融合ポリペプチドを産生する植物細胞からのタンパク質精製

【1162】

SL48上のMTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfK遺伝子によってコードされるプロセッシングを受けたポリペプチドは、翻訳融合されたTwinStrepエピトープをそのN末端にあるMTP配列の後に持っていたため、StrepTactinXTカラム精製法を利用して、この融合ポリペプチドを、SL48とSL49を浸透させてあった*N. benthamiana*細胞から精製することができた。精製を上記の方法を利用して実施し、精製されたscar::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドを実施例14に記載されている方法を用いて濃縮した。

【1163】

精製されたポリペプチドを含有する溶液は、サンプルの底部がわずかに茶色を呈しているように見えた。本発明の発明者らは、この色が、scar::TwinStrep::AnfD::リンカー26(HA)::AnfKポリペプチドに結合したFe-Sクラスターの存在に起因しており、植物細胞内の少なくともNifS、NifU、およびAnfH融合ポリペプチドがFe-SクラスターをAnfD-リンカー-AnfK融合ポリペプチドに提供する活動を示していると考えた。これは、単離されたポリペプチドの中のFe²⁺とSの含量を例えば誘導結合プラズマ質量分析（ICPMS）を利用して測定することによって確認されよう。電子常磁性共鳴（EPR）測定は、ポリペプチドに結合したFe-Sクラスターの存在と構造を示す特定の波長シフトを検出することが期待される。

【1164】

結合したFe-Sクラスターの量は、別の遺伝子、すなわちフェレドキシン（*A. vinelandii*または他の窒素固定生物からのFdxNなど）をコードする遺伝子を上記のAnf遺伝子+Nif遺伝子の組み合わせに追加することによって増加することが期待される（実施例22）。

【1165】

実施例22：ミトコンドリアを標的とするFdxNの植物細胞内での発現

【1166】

緒言

【1167】

10

20

30

40

50

FdxN遺伝子は、多くの窒素固定生物（例えば*A. vinelandii*）におけるニトロゲナーゼの最適な機能にとって重要である（Jimenez-Vicente他、2014年；Buren他、2019年）。*A. vinelandii*株CAのゲノム（Setubal他、2009年；www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_021149.1）は16種類のフェレドキシン様遺伝子を持ち、その中には2×[4Fe-4S]クラスターフェレドキシンのクラスに属するFdxN（Jimenez-Vicente他、2014年）が含まれる。フェレドキシンのこのクラスは2つの保存されたモチーフCys-X2-Cys-X2-Cys-X3-CysとCys-X2-Cys-X7-9-Cys-X3-Cys-X3-5-Cysを含有している。これらモチーフは*A. vinelandii* FdxNの中で保存されているが、第2のモチーフの中の最終Cys残基は別である（MatsubaraとSaeki、1992年）。細菌内でニトロゲナーゼのために機能するFdxN遺伝子は、ニトロゲナーゼに関係する他の遺伝子（Nif遺伝子が含まれる）とともに転写されるオペロンの一部に見いだされることがしばしばあるが、必ずしもそうであるとは限らない。例えば*A. vinelandii*の中のFdxNは、NifB、FdxN、NifO-NifQ、RhdN、およびGrx5^{Nif}タンパク質をコードする領域を含有する単一のオペロンの一部である。FdxNは窒素固定菌増殖条件下においてNifBとほぼ同じレベルで転写された（Rodriguez-Quinones他、1993年）。ニトロゲナーゼ酵素が*A. vinelandii*のΔFdxN欠失変異体の中で発現したとき、NifB-coの合成が、そしてその帰結としてニトロゲナーゼ活性が1/5に減少することが観察された。したがって*A. vinelandii*からのFdxN遺伝子は、Mo-、V-、およびFe-ニトロゲナーゼの3つすべてに必要とされるNifB-coの合成に関与するフェレドキシンタンパク質をコードしている。FdxNの欠失は、窒素固定条件下での*A. vinelandii*の増殖速度も野生型の約50%に低下させた。これは、FdxNの完全な不在が増殖とニトロゲナーゼ活性に関しては許容されたが、最適な増殖とニトロゲナーゼ活性のためには必要であったことを示している。*A. vinelandii*の中のFdxNは、NifB-coの産生中にNifBタンパク質に電子を供与するフェレドキシンとして機能するか、NifBへの[4Fe-4S]の中間担体として機能するか、その両方として機能すると考えられている（Buren他、2019年）、

【1168】

それとは対照的に、*Rhizobium meliloti*の中のFdxNは、共生的窒素固定に必要であることが実証された。なぜならfdxN変異体は窒素を固定できないからである。この機能は、FdxNをコードするプラスミドを導入することによって回復した（Klipp他、1988年）。精製された*R. meliloti* FdxNポリペプチドは、インビトロで*Rhodobacter capsulatus* ニトロゲナーゼへの電子輸送を媒介することができた（Riedel他、1995年）。しかし*R. meliloti*の中でのFdxNに関するこの絶対条件は、多くの他の窒素固定菌（*R. capsulatus* など）に反映されていなかった。

【1169】

*K. oxytoca*では再度異なっており、フラボドキシン（NifF）とピルビン酸：フラボドキシンオキシドレダクターゼ（NifJ）が、ピルビン酸からFdxNへではなくニトロゲナーゼへの電子輸送を媒介する（Shah他、1983年）。これと合致するように、大腸菌に移されたときに機能的ニトロゲナーゼを産生する*K. oxytoca* Nif遺伝子クラスターは、NifJHDKTYENXUSVWZMFLABQ遺伝子を持っていたが、FdxNまたはそれと同等の遺伝子は含んでいなかった（Smanski他、2014年；Yang他、2013年；Temme他、2012年）。合成ベクターpMIT v2.1はFdxN遺伝子を含まずに大腸菌の中で機能的ニトロゲナーゼを発現したが、大腸菌内の内在性フェレドキシンがそのような機能を提供した可能性がある。フェレドキシン以外のタンパク質（例えばフラボドキシン）も大腸菌の中でFdxN機能を代替した可能性がある。窒素固定菌の中のニトロゲナーゼは、共通して、1つ以上のフラボドキシンタンパク質（NifHやNifJなど）を電子供与体として利用しているため、NifFがその機能を提供した可能性がある。別の研究では、Yangら（2017年）が*K. oxytoca* ニトロゲナーゼベクターpKU7017のNifFをクラミドモナス属、またはシロイヌナズナ属、トウモロコシ、イネ、およびトウモロコシからの植物プラスチドのフェレドキシンで置き換えると、これらはすべて、NifFを持つ対照と比べてアセチレンを50~100%の割合で減らした。これは、これらフェレドキシンが少なくともNifHとNifD-NifKニトロゲナーゼタンパク質への電子供与の機能に関してNifFに代わりうることを示している。ベクターpKU7017

10

20

30

40

50

は*K. oxytoca*フェレドキシン遺伝子を含んでいなかったが、NifF遺伝子は持っていたため、NifFタンパク質または内在性大腸菌フェレドキシンがNifB-coの形成のためにNifH/NifD-NifKとNifBの一方または両方に電子を提供した可能性がある。それとは異なり、Yates、1972年は、フェレドキシンではなく精製された*A. chromococcum*フラボドキシンが電子を成熟ジニトロゲナーゼに供与できることを見いだした。Jimenez-Vincenteら（2014年）は、FdxNからNifD-NifKへの電子供与の欠如を確認した。したがってFdxNタンパク質の機能と、ニトロゲナーゼ機能のためのFdxNタンパク質の必要性は、異なる細菌については明確でなく、植物の中で発現してミトコンドリアを標的とするときのニトロゲナーゼのためのFdxNタンパク質の必要性は言うまでもない。

【1170】

フェレドキシンと関連タンパク質の構造と多様性が、MatsubaraとSaeki（1992年）によって概説されている。

【1171】

FdxNポリペプチドの系統発生分析

【1172】

A. vinelandii FdxN（配列番号232）を用いたNCBI非冗長タンパク質データベースの検索は、タンパク質ファミリーPRK13795（仮想的タンパク質、仮）のヒットを回答し、これが、スーパーファミリーcl36298の唯一のメンバーであった。しかしPRK13795の中の627個のアミノ酸配列が、古細菌で見いだされたホスホアデノシンホスホ硫酸レダクターゼに関係する酵素をコードしていた。これらは長さが400～800個のアミノ酸であり、[4Fe-4S]結合部位を含有していたが、フェレドキシン様タンパク質は含有していなかった。*A. vinelandii*の株DJからのFdxN（アクセッション番号AC081189.1）と株CAからのFdxN（WP_012703542.1）に関するタンパク質情報は、ファミリーpfam12838に属すると注釈されていた。このドメインの領域名は「Fer4_7 4Fe-4Sジクラスタードメイン」と呼ばれ、pfam12838は、スーパーファミリーcl38378の唯一のファミリーメンバーであった。pfam12838の記述は、「スーパーファミリーは、鉄-硫黄クラスターに結合するドメインを含有するタンパク質を含む」であった。メンバーには、細菌フェレドキシン、さまざまなデヒドロゲナーゼ、およびさまざまなレダクターゼが含まれる。このドメインの構造はアルファ-ベータサンドイッチであり、このドメインは2つのFe₄S₄クラスターを含有していた。206個の代表的なアミノ酸配列がタンパク質ファミリーpfam12838の中に掲載されており、そのうちの26個のアミノ酸配列はアミノ酸160個よりも短いため、サイズカットオフとして使用した。なぜならフェレドキシンと注釈されている16個の*A. vinelandii*配列の最長配列は156残基だったからである。pfam12838の中のアミノ酸93～156個の長さを持つ26個のアミノ酸配列を、NCBI Globalアラインメント（blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast）を用いてアラインメントさせ、配列番号232（WP_012703542.1）とのパーセント一致を求めた。これら26個の配列の配列番号232とのパーセント一致は10～22%の範囲であり、FdxN配列の多様性を示している。この分析で使用した26個の配列は、アクセッション番号Q8KG02_CHLTE、Q3ATN2_CHLCH、Q8KG03_CHLTE、Q9X2D5_THEMA、Q2JP81_SYNJB、Q9I1H8_PSEAE、Q01ZR2_SOLUS、ESU39497、WP_043013856、WP_012106131、WP_018723072、EKY12520、WP_012422852、ABG77170.1、EEX22670、WP_015853105、WP_012455913、WP_020095796、WP_012235387、WP_011973256、WP_015758977、WP_012302957、WP_012301895、WP_036081271、WP_004845399、およびQ39V82_GEO MGからのものであった。

【1173】

植物細胞の中でFdxN融合ポリペプチドを発現させるための単一遺伝子コンストラクト

【1174】

本発明の発明者らは、FdxN遺伝子産物のミトコンドリア局在化を目的として、*A. vinelandii* FdxN融合ポリペプチドをコードする遺伝子を植物細胞の中で発現させることを以下のようにして試みた。MTP-FdxN融合ポリペプチドを自らの表面に発現する2つの遺伝子

10

20

30

40

50

コンストラクト (SN291、SN292) を最初に調べた。その後の実験では、5 遺伝子コンストラクトの中のFdxN遺伝子を、AnfD-リンカー(HA)-AnfK、AnfH、AnfG、およびNifV融合ポリペプチドをコードする遺伝子と組み合わせた (1つのT-DNAベクター上にこれら5つの遺伝子があり、それぞれの融合ポリペプチドは、ミトコンドリアを標的とするためのMTP配列を有する)。さらなる実験は、2つの5遺伝子コンストラクト (すなわち1つのT-DNAベクターの中でAnfD-リンカー(HA)-AnfK、AnfH、AnfG、NifV、およびFdxN融合ポリペプチドをコードするベクター (SL50と名づける) と、SL49) を用いた同時発現実験を含んでいた (実施例21)。

【1175】

FdxN融合ポリペプチド (配列番号233、配列番号234) そのものを植物細胞 (*N. benthamiana*の葉細胞など) の中で発現させるための2つの遺伝子コンストラクトSN291およびSN292と、2つの対照コンストラクトSN299およびSN300を設計して作製した (表23)。合成遺伝子はそれぞれ、タンパク質コード領域に隣接した強力なCaMV 35Sプロモータとnos 3'ポリアデニル化領域／翻訳ターミネータの制御下にあった。C末端にAla残基が付加された*A. vinelandii*からのFdxNのアミノ酸配列 (配列番号232) を用いて各コンストラクトの中のタンパク質コード領域のヌクレオチド配列を設計した。このヌクレオチド配列は、植物細胞の中で発現させるためコドンが最適化されている。ミトコンドリアに局在化させるため、SN291がコードする融合ポリペプチドは、N末端に融合されたMTP-FA γ 51と、抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによってこのポリペプチドを検出するためのC末端HAエピトープを持っていた。HAエピトープは、C末端 (SN291) に、またはMTPとFdxN配列の間 (SN292) に一過性に融合された。1つの対照コンストラクト (SN300) は、MTP配列が欠けたポリペプチドをコードしていたため、細胞質を標的とするより小さなポリペプチドを発現し、それが、MTP-FdxNポリペプチド由来でMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチド (プロセッシングを受けたFdxN) のための分子量比較基準をウエスタンブロット上で提供した。ただし、それぞれの場合にMPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドはアミノ酸約9個の「瘢痕配列」を含んでいたため、サイズは似ていたが同じではなかった。第2の対照コンストラクト (SN299) は、MTP配列の中にアラニンで置換された13個のアミノ酸を持つ融合ポリペプチドをコードしており (Allen他、2017年)、MPPによるプロセッシングを阻止する設計にされていた。したがってこれら第2の対照ポリペプチドは、対応するMTP-FdxNコンストラクト由来でプロセッシングを受けていないポリペプチドのための分子量比較基準を提供した。アラニン変異したMTP配列をmFA γ 51と名づけた。浸透された植物組織からのタンパク質抽出液を分析したとき、それぞれのMTP-FdxNコンストラクトからのサンプルとそれに対応する2つの対照コンストラクトをゲル電気泳動のため隣り合ったレーンにロードした。そのためMTP-FdxNポリペプチドのプロセッシングを最もよく検出することが可能になる。

【1176】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表23：植物細胞の中で発現させるための、FdxNとFe-ニトロゲナーゼ構成要素をコードする単一遺伝子コンストラクトと多遺伝子コンストラクト

プラスミド	発現するポリペプチド	予想分子量 (kDa)		プロセッシングなしの配列番号
		プロセッシングなし	プロセッシングあり	
SN291	MTP-FA γ 51::FdxN::HA	16.6	11.9	233
SN292	MTP-FA γ 51::HA::FdxN	16.4	11.9	234
SN299	mFA γ 51::HA::FdxN	15.8	NA	235
SN300	HA::FdxN	NA	10.8	236
SL50	MTP-FA γ 51::HA::AnfG	22.2	17.7	186
	MTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー-26(HA)::AnfK	118	115	203
	MTP-FA γ 51::HA::AnfH	36.9	32.4	185
	MTP-FA γ 51::HA::NifV	48.4	43.8	237
	MTP-FA γ 51::HA::FdxN	16.4	11.9	233
SL54	MTP-FA γ 51::NifF::HA	26.1	21	137
	MTP-FA γ 51::NifJ::HA	135	130	138
	MTP-FA γ 51::NifS::HA	50.3	45	124
	MTP-FA γ 51::NifU::HA	36	31	125
	MTP-FA γ 51::KoNifB::HA	58	53	147

【1 1 7 7】

植物細胞の中での融合ポリペプチドの産生

【1 1 7 8】

SN291を含有する*A. tumefaciens*の培養物を、実施例1に記載されているように5週齢の*N. benthamiana*の葉に浸透させた。浸透させてから4～5日後、葉のサンプルを採取した。全、可溶性、および不溶性タンパク質分画を以下のようにして抽出した。植物が発現するポリペプチドの可溶性を調べるため、葉組織を氷冷抽出バッファ（100 mMのTris pH 8.0、150 mMのNaCl、0.25 Mのマニトール、5% (v/v) のグリセロール、1% (v/v) のTween 20、1% (w/v) のPVP、新たに添加した2 mMのTCEP、0.2 mMのPMSF、および10 μ Mのロイペプチン）の中で粉碎し、マイクロフュージチューブに移した。サンプルを20,000 $\times$ gで5分間遠心分離し、サンプルを可溶性（上清）分画と不溶性（ペレット）分画に分けた。上清を新たなマイクロフュージチューブに移し、再度20,000 $\times$ gで5分間遠心分離して残った不溶性材料をすべて除去した。ピペットを繰り返して振ることによる散布でペレットを300 μ lの抽出バッファの中に再懸濁させることによって不溶性分画を洗浄し、20,000 $\times$ gで5分間遠心分離して上清を廃棄した。この洗浄工程をさらに2回繰り返し、不溶性分画から残っているあらゆる可溶性タンパク質を除去した。次いでサンプルを、SDS-PAGEと、抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。抗HA抗体（Monoclonal Anti-HA、Sigma社）は1：5000に希釈して使用した。

【1 1 7 9】

SN291のウエスタンブロット分析（図38）は、FdxNポリペプチドが、HA抗体を用いて全タンパク質分画の中で容易に検出されたが、可溶性タンパク質分画と不溶性タンパク質分画の両方にはわずかなポリペプチドが存在していて、見えるようにするにはウエスタン手続きにおいてより長時間の現像を必要とすることを示した。これは、AvFdxN融合ポリペプチドが部分的に可溶性であったことを示している。FdxN融合ポリペプチドは、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態の両方があったため、MPPによって部分的にプロセッシングを受けたように見えた。これは、MPPによる切断が不十分であることを示している。それぞれの場合における対照ポリペプチドのための隣接レーンの中のバンドから、これらのバンドがプロセッシングを受けたポリペプチドとプロセッシングを受

けていないポリペプチドのものであったことが確認された。

【1180】

SN292を含有する*A. tumefaciens*の培養物を、実施例1に記載されているように5週齢の*N. benthamiana*の葉に浸透させた。浸透させてから4～5日後、葉のサンプルを採取した。全、可溶性、および不溶性タンパク質分画を、SN291と同じ方法を用いて抽出した。SN292のウエスタンブロット分析は、FdxNポリペプチドがHA抗体を用いて全タンパク質分画の中に容易に検出されたことを示した。これは、融合ポリペプチドの中のHAエピトープの位置（C末端であるかN末端の側か）がこのポリペプチドの発現レベルに影響しなかったことを示している。再度、FdxNポリペプチドはMPPによって部分的にプロセッシングを受けたように見え、このタンパク質の大半は、プロセッシングを受けた形態にとって正しいサイズであった。それぞれの場合における対照ポリペプチドのための隣接レーンの中のバンドはから、これらのバンドがプロセッシングを受けたポリペプチドのものであることが確認された。

【1181】

植物細胞の中でのFdxNを含む融合ポリペプチドの組み合わせの産生

【1182】

GoldenGate合成法を利用して新たな遺伝子コンストラクト（SL50と名づける）を設計して作製し（表22）、単独で調べる（図40）か、SL49またはSL54と組み合わせて調べた（図41）。SL50上の1つの遺伝子はMTP-CoxIV::TwinStrep::AnfD::リンカー-26(HA)::AnfK融合ポリペプチドをコードしており、他の4つの遺伝子は、AnfH、AnfG、NifV、およびFdxN融合ポリペプチドをコードしており、それぞれが、ポリペプチドのN末端に一過性に融合されたMTP-FAγ51配列とそれに続くHAエピトープを持っていた。遺伝子コンストラクトSL49とSL50を*N. benthamiana*細胞の中に別々に導入し、タンパク質の発現をウエスタンブロットによって分析した。SL50からのコードされた融合ポリペプチドの5つすべてが適切な抗体を用いて検出され、それぞれ、可溶性タンパク質分画の中に存在するポリペプチドバンドを示したが、例外はFdxNポリペプチドであり、可溶性分画と不溶性分画のどちらの中にも見ることはできなかった（図40）。重要なことだが、プロセッシングを受けたAnfD-リンカー-AnfK、NifV、およびAnfH融合ポリペプチドはすべて、可溶性分画と不溶性分画の中で観察されたため、3つすべてが少なくとも部分的に可溶性であった。AnfG、AnfH、NifVポリペプチドはすべて、部分的に切断されているように見え、それぞれ、プロセッシングを受けた形態とプロセッシングを受けていない形態に関するバンドを示した。AnfD-リンカー-AnfKポリペプチドは、効率的にプロセッシングを受けたように見えた。FdxNポリペプチドは、長い現像時間の後によりよく見ることはでき、全タンパク質の中にプロセッシングを受けたサイズでだけ見ることはできた。

【1183】

次に、SL50を含有するアグロバクテリウム培養物とSL49を含有するアグロバクテリウム培養物を混合し、以前と同様にしてこの混合物を*N. benthamiana*の葉に浸透させた。したがってこの実験では、AnfHポリペプチド、AnfGポリペプチド、および融合したAnfD-リンカー-AnfKポリペプチドをコードする3つのAnf遺伝子と、NifF、NifJ、NifU、NifB、およびNifVポリペプチドをコードする、Nif遺伝子のうちの5つと、FdxN遺伝子を、すなわち9個の遺伝子の組み合わせを導入した。ウエスタンブロットで観察された驚くべき結果（図41）は、9つのポリペプチドすべてが容易に検出されたことであった。これらポリペプチドのいくつかは2つのバンドで見られ、上方のバンドはプロセッシングを受けていないポリペプチドを表わし、下方のバンドは、ミトコンドリアに取り込まれたときに切断されたポリペプチドを表わしていた。プロセッシングを受けていないポリペプチドのバンドは、NifV、NifU、およびNifF融合ポリペプチドで見ることができ、切断されたポリペプチドで予想されるサイズの位置にバンドが存在していた。蓄積が低レベルであることを理由として可溶性分画と不溶性分画のどちらの中にも見ることはできなかったFdxNポリペプチドを除き、すべてのポリペプチドが可溶性分画の中に存在していた。

【1184】

GoldenGate合成法を利用して別の遺伝子コンストラクト（SL54と名づける）を設計して作製し（表23）、単独で調べるとともに、SL50と組み合わせて調べた。SL54は、*K. oxytoca*からの配列を用いたMTP-FAγ51::NifB::HA融合ポリペプチド（配列番号147）をコードする遺伝子を持っていたが、それ以外は、SL54は、NifS、NifU、NifJ、およびNifF融合ポリペプチドを発現させるためのSL42（表22）と同じであった。この実験では、*K. oxytoca*配列に基づくNifB融合ポリペプチド（単独で発現させたときに最も不溶性であることが以前に示された）が、他のポリペプチドと組み合わせて発現させたとき、その可溶性を改善するかどうか調べた。

【1185】

最初にSL50とSL54を別々に*N. benthamiana*の葉に導入し、可溶性タンパク質分画と不溶性タンパク質分画のほか全タンパク質分画を調製し、ウエスタンブロット分析によって分析した。コードされたポリペプチドのすべてが、可溶性タンパク質抽出液の中に少なくともある程度と、全タンパク質分画の中に存在することが観察されたが、NifVポリペプチドとFdxNポリペプチドは例外であり、見えないか、似たサイズの他のタンパク質のバンドによってぼかされていた。最小強度のポリペプチドはFdxNポリペプチドであり、より長時間の現像の後にだけ全タンパク質サンプルの中に見ることができた。

【1186】

SL50とSL54をまとめて*N. benthamiana*の葉に導入することとした。AnfH、AnfG、NifV、NifJ、NifS、NifU、およびNifFポリペプチドのほか、プロセッシングを受けたAnfD-リンカー-AnfKポリペプチドのすべてが可溶性タンパク質抽出液の中に少なくともある程度存在することが、ウエスタンブロット分析によって観察された。再度、FdxNポリペプチドは、蓄積が低レベルであるため、可溶性分画と不溶性分画のどちらでも見ることはできなかった。可溶性分画の中のNifBポリペプチドの存在は、そのサイズがSDS-ポリアクリルアミドゲルの中でプロセッシングを受けていないNifSポリペプチドと一致していたため確認できなかった（図39）。

【1187】

サイズと可溶性の対照として、*K. oxytoca* NifBポリペプチドをコードする単一遺伝子ベクター（SN192）を独立に*N. benthamiana*の葉に浸透させた。ウエスタンブロットをHA抗体で調べたとき、NifBポリペプチドは、プロセッシングを受けていない形態とプロセッシングを受けた形態の両方として見ることができ、全タンパク質と不溶性分画の中で見ることができ、NifBを可溶性分画の中で見ることはできなかった（図39）。

【1188】

さらなる実験において、SL50から発現したTwinStrep-AnfD-リンカー-AnfKポリペプチドを精製することにする。さらなる実験において、SL50をSL54のバリエーションと組み合わせて調べることにする。そのバリエーションは、*K. oxytoca*以外の生物に由来するNifBポリペプチドを有する。

【1189】

Anf遺伝子とNif遺伝子で安定に形質転換された植物の作製

【1190】

SL49とSL50それぞれの中の遺伝子のセットを別々に、選択マーカー遺伝子を持つバイナリーベクターに移した。得られたコンストラクトを用い、形質転換された*A. thaliana*植物を生成させた。適切な抗生物質を用いた最初の選択の後、9つのT1形質転換体がSL49に関して取得され、2つのT1形質転換体がSL50に関して取得された。これらのコンストラクトを用いてタバコ（*N. tabacum*）と*N. benthamiana*も形質転換した。これらのトランスジェニック植物は、コードされたポリペプチドのすべてを発現すること、Fe-Sクラスター（Pクラスターなど）をAnfD-リンカー-AnfKポリペプチドとAnfHポリペプチドに組み込むこと、およびホモクエン酸を対応する野生型植物またはNifV遺伝子が欠けた植物よりも多い量で産生することが予想される。これらの植物は、AnfD-リンカー-AnfKポリペプチドとAnfHポリペプチド上のFe-Sクラスター（Pクラスターなど）の生成がプラスであることと、ホモクエン酸を野生型植物よりも多い量で産生することが予想される。これらの

10

20

30

40

50

植物でFe-ニトロゲナーゼ活性を調べる。

【1191】

実施例23：Anfポリペプチドの分析

【1192】

本明細書に記載されているように、AnfHポリペプチドは、ニトロゲナーゼ保存スーパーファミリーcl25403のメンバーであるNifHポリペプチドであり、保存されたドメインPRK13233を含有していて、*Azotobacter vinelandii* AnfHポリペプチド（配列番号218）の275個のアミノ酸の全長に沿って測定したときに配列番号218とアミノ酸配列が少なくとも69%一致する。本発明の発明者らは、データベースの中に存在するAnfHポリペプチド配列を分析し、これらをアラインメントさせ、1つの代表的なモリブデン型NifHと比較した。

10

【1193】

データベースでAnfHのアミノ酸配列を検索した。これらは、PRK13233保存ドメインを持っていて配列番号218と少なくとも69%一致するものとして同定された。こうしてそのような314個の配列が同定された。これらをNCBI COBALTでアラインメントさせ、ギャップを含めて300残基位置を持つ1つのコンセンサス配列を開発した。このコンセンサス配列は配列番号218と89%一致していた。アラインメントされたAnfHのアミノ酸配列は、300位置のうちで、314個の天然AnfHポリペプチドのすべてにおいて一致した137個のアミノ酸と、AnfHポリペプチドの多くにおいて保存されていた他の多くのアミノ酸を持っていた。PRK13233ドメインの中の137個の保存されたアミノ酸はAnfH配列の大半に広がっていたため、PRK13233ドメインはAnfH配列の大半をカバーしていること、そしてPRK13233は1つの特定の配列ではなく配列の1つのファミリーを示すことが結論された。137個の保存されたアミノ酸には、配列モチーフYGKGGIGKSTTXQNT（モチーフI、配列番号225）、IHGCDPKAD（モチーフII、配列番号226）、CVESGGPEPGVGCAGRG（モチーフIII、配列番号227）、DVLGDVVCGGFAMP（モチーフIV、配列番号228）、VASGEMMAXYAANNI（モチーフV、配列番号229）、QSGVR（モチーフVI、配列番号230）、およびCNSRXVD（モチーフVII、配列番号231）が含まれていた。ただしXは任意のアミノ酸を表わす。モチーフI～VIIのすべてが、分析した全314個のAnfH配列に存在していた。

20

【1194】

完全に保存されていた137個のアミノ酸は以下の通りであり、数字は配列番号218のアミノ酸位置を表わし、文字はその位置のアミノ酸を表わす：3R、4K、6A、8Y、9G、10K、11G、12G、13I、14G、15K、16S、17T、18T、20Q、21N、22T、25A、36I、37H、38G、39C、40D、41P、42K、43A、44D、46T、47R、50L、52G、55Q、60D、63R、75V、79G、85C、86V、87E、88S、89G、90G、91P、92E、93P、94G、95V、96G、97C、98A、99G、100R、101G、103I、104T、106I、108L、109M、110E、115Y、119L、120D、125D、126V、127L、128G、129D、130V、131V、132C、133G、134G、135F、136A、137M、138P、140R、142G、143K、144A、146E、148Y、150V、151A、152S、153G、154E、155M、156M、157A、159Y、160A、161A、162N、163N、164I、167G、170K、172A、174Q、175S、176G、177V、178R、180G、181G、184C、185N、186S、187R、189V、190D、192E、198E、199F、204G、212P、213R、215N、217V、218Q、220A、221E、222F、227V、236Q、239E、240Y、243L、247I、250N、254V、255I、256P、258P、265E、272G。A. vinelandii NifH配列（AvNifH；配列番号224）とアラインメントさせると、AnfH配列からの137個の完全に保存されたアミノ酸のうちの121個もAvNifHの対応する位置に存在していた。AnfH配列のすべてにおいて保存されているがAvNifHでは保存されていない16個のアミノ酸は、配列番号218を参照すると4K、22T、37H、52G、60D、63R、108L、109M、142G、151A、174Q、189V、198E、199F、222F、および247Iであった。したがってこれら16個のアミノ酸はAvNifHのモリブデン型NifH配列に対するAnfHの特徴であるため、AnfHポリペプチドを、16個のアミノ酸す

30

40

50

べてを共通して持っていない他のNifH配列から識別するのに使用できる。AvNifH配列、KoNifH配列（配列番号1）、および他のモリブデン型NifH配列は、モチーフIIIとIVを持つが、モチーフI、II、V～VIIは持っていなかったため、これらのモチーフもAnfHサブセットを他のNifHポリペプチドから識別するのに使用できた。

【1195】

実施例24：追加Nifポリペプチドの同時発現でNifD-NifL複合体とNifYの量が改善される

【1196】

成熟Mo-ニトロゲナーゼと触媒活性なMo-ニトロゲナーゼは、2つの金属因子、すなわちPクラスターとFeMo-coクラスターを含んでいる。これらメタロクラスターは、主に*A. vinelandii*を用いた研究に基づき、Burenら（2019年）の論文に報告されている順番のいくつかの工程で組み立てられる。Pクラスターを合成するため、NafHポリペプチドがプレ-アポ-NifD-NifKと呼ばれるタンパク質複合体と相互作用し、NifDポリペプチドとNifKポリペプチドの中の位置にNifUから供与された2つの別々の[Fe₄-S₄]クラスターを配置するのを助ける。その後NafH-NifD-NifK相互作用がNifW-NifD-NifK相互作用で置き換わる。するとNifWポリペプチドは成熟したNifHとNifZによって置換され、この段階で[Fe₄-S₄]クラスターはNifDとNifKの界面で縮合されて1個の硫黄原子が除去された[Fe₈-S₇]クラスター、いわゆるPクラスターになる。Pクラスターが形成されると、プレ-アポ-NifD-NifKは、NafY（γタンパク質とも呼ばれる）および／またはNifYに結合する1つ、おそらく2つの「アポ-NifD-NifK」中間体に変換される。NafYの場合には、構造の研究から、NafY上のN末端ドメインがアポ-NifD-NifKに結合し、C末端ドメインがFeMo-coに結合することが示されている。FeMo-coはNifE-NifN上の別のどこかで形成され、NifXがタンパク質間の金属因子の往復に関与すると考えられている。

【1197】

この逐次的組み立て経路とその想定タンパク質相互作用は*A. vinelandii*ニトロゲナーゼの研究に基づいており、これらの工程のいくつかは、異なっている可能性が大きい、他の生物では異なるタンパク質を使用する。例えば*Klebsiella oxytoca*は、NafHまたはNafYをコードする遺伝子を持たず、そのNifYは、*A. vinelandii*の中のNifYよりもNafYに似ている。*K. oxytoca*の中のNifXは、窒素固定には必要とされなかった（Temme他、2012年）。機能的Feタンパク質（NifH）だけが*Klebsiella*の中でのPクラスターの形成に必要とされる。なぜならNifH遺伝子の欠失はPクラスターの形成と窒素固定菌の増殖を阻止するからである。それとは対照的に、*A. vinelandii*の中でNafY、NifY、NifW、またはNifZをコードしている遺伝子の別々の欠失は、窒素固定菌の増殖を遅延させたが停止はさせなかった。これは、これらの構成要素が部分的に冗長であったこと、または特定のタンパク質の欠如が*A. vinelandii*の中の他の因子によって補償された可能性があることを示している。

【1198】

本発明の発明者らは、植物細胞の中でミトコンドリアを標的とするNafY、NifY、NifW、およびNifZポリペプチドの同時発現がNifD-NifK融合ポリペプチドに及ぼす効果を調べることを決断した。そうするため、SL55と名づけた植物発現コンストラクトをGolden Gateクローニング法を利用して作製した。SL55は、KoNifW、KoNifX、KoNifY、およびKoNifZ融合ポリペプチドをコードする4つのNif遺伝子を持ち、それぞれの融合ポリペプチドは*K. oxytoca*配列に基づいていて、MTP-FAγ51配列へのN末端融合部を持っていた。それぞれのポリペプチドは、ウエスタンブロットで検出するため、C末端に融合されたHAエピトープも持っていた。SL55の構築に使用した構成要素は、SN340（MTP-KoNifW-HA）、SN144（MTP-KoNifX-HA）、SN145（MTP-KoNifY-HA）、およびSN146（MTP-KoNifZ-HA）からのものであった。それぞれの個別の遺伝子は、植物細胞の中で発現させるため35S-プロモータと3'ポリアダニル化領域／転写ターミネータに隣接していた。同時浸透実験で使用した第2の遺伝子コンストラクトは、SN159によってコードされているのと同様、ミトコンドリアを標的とするMTP-FAγ51::KoNifDY100Q::リンカー26(

10

20

30

40

50

HA)::KoNifKをコードするSL47であった。この翻訳融合体は、*K. oxytoca*配列に基づくNifD配列を持っていたが、そのNifD配列の中にはY100Q置換があった。コンストラクトSL55とSL47を別々に、またはまとめて葉に浸透させ、ウェスタンブロット分析のためサンプルを浸透の4日後または5日後に採取した。以前のようにタンパク質を好気条件下で抽出し、4~20%勾配ゲル(SDS-PAGE)上で解像し、抗HA抗体とHRP二次抗体で調べた。

【1199】

葉にSL47だけを浸透させると、scar::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチドのサイズで予想される約110 kDaのポリペプチドに相当する比較的弱いシグナルが生じた(図42)。実施例2と3に記載されているように、単独で浸透させるか、SL47と同時に浸透させたSL55上の4つのMTP-Nif遺伝子を発現している葉は、MPPによるプロセッシングを正しく受けたNifW、NifX、NifY、およびNifZポリペプチドに相当する強いシグナルを生じさせた。驚くべきことに、そして重要なことに、SL55とSL47を同時に浸透させた葉では、正しくプロセッシングを受けたscar::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチドに対応するバンドがはるかに大きな強度になった(図42)。SL55からの約100 kDaの位置に生じたより弱いバンド(おそらく、ミトコンドリア内のscar::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチドの二次分解から生じた)は、SL47をSL55と同時に浸透させたときにはより少なかったことも注目された。正しくプロセッシングを受けたscar::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチドの量はより多かったにもかかわらず、想定される分解産物の量のこの減少が起こった。

【1200】

それに加え、単一遺伝子ベクターSN340、SN144、SN145、およびSN146の組み合わせを同時に発現させると、正しくプロセッシングを受けたNifYのバンドは、単独のSN145からの発現と比べて大きな強度になった。この結果は、SN340、SN144、およびSN146(NifW、NifX、およびNifZ融合ポリペプチド)の組み合わせが植物ミトコンドリアの中でNifY融合ポリペプチドの発現および/または安定性を改善したことを示唆していた。本発明の発明者らは、ミトコンドリアを標的とするNifW、NifX、NifY、およびNifZの1つ、または2つ以上、または組み合わせが、NifDポリペプチドとNifKポリペプチドの翻訳融合の量を改善したと結論した。この実験は、NifW、NifX、およびNifZポリペプチドの同時発現が植物細胞の中のNifYの量を改善することも示した。

【1201】

MPPによるプロセッシングを受けたポリペプチドを植物細胞から精製するため、同様のNifD-NifK融合ポリペプチドをコードするがTwin-strepエピトープを含む別のコンストラクト(SN229)を作製した。SN229をSL55と同時に*N. benthamiana*の葉に浸透させた。タンパク質抽出液を好気条件または嫌気条件で調製してStrep-tactinXRカラムを通過させた。カラムからの溶離液は、精製されたTS::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチドを含有しており、分析してNifW融合ポリペプチドとNifZ融合ポリペプチドの存在を探す。その一方または両方が、NifD-NifKタンパク質と同時に精製されることが予想される。

【1202】

コンストラクトSN299、SL55、および別々のNifH、NifM、NifS、およびNifU融合ポリペプチドをコードする第3のコンストラクト(これらのすべてが、MTPとの融合によってミトコンドリアを標的とする)を*N. benthamiana*の葉に同時に浸透させる。好気条件または嫌気条件でタンパク質抽出液を再度調製してStrep-tactinXRカラムを通過させる。得られた抽出液は、精製されたscar::TS::NifD::リンカー26(HA)::NifKポリペプチド(このポリペプチドに結合してFeMo-coの受け入れに利用できる適切に形成されたPクラスター)、すなわちアポ-NifD-NifKポリペプチドを含有することが予想される。PクラスターのレベルはICP-MSを用いて測定される。

【1203】

本出願は、2019年3月8日に出願されたAU 2019900780、2019年10月10日に出願されたAU 2019903818、および2020年3月5日に出願されたAU 2020900689の優先権を主張するものであり、これらのすべての内容が参照によって本明細書に組み込まれてい

る。

【1204】

当業者は、本開示の広い一般的な範囲を逸脱することなく、多数のバリエーションおよび／または改変を上記の実施態様に対してなすことが可能であることがわかるであろう。本開示の実施態様はしたがってあらゆる点で例示であり、限定ではないと見なされるべきである。

【1205】

本明細書で議論および／または参照したあらゆる刊行物は、その全体が本明細書に組み込まれている。

【1206】

本明細書に含まれている文書、行為、材料、装置、物品などについてのあらゆる議論は、単に本発明の文脈を提供することを目的としている。これら事項のいずれか、またはすべてが、先行技術の基礎の一部を形成していること、または本出願の各請求項の優先日より前に存在していたという理由で本発明が関係する分野の共通一般知識であったことを認めていると取ってはならない。

【1207】

参考文献

- Abe et al. (2000). *Cell* 100:551-560.
- Abdullah et al. (1986). *Biotechnology* 4(12):1087.
- Allen et al. (1994). *Crit. Rev. Biotechnol.* 14:225-249.
- Allen et al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:26890-26896.
- Allen et al. (2017). *Front. Plant Sci.*, 8:287. doi: 10.3389/fpls.2017.00287
- Arnold et al. (1988). *Tree physiology*, 4:291-300.
- Altschul et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Balk and Pilon (2011). *Trends Plant Sci* 16:218-226.
- Barker et al. (1983). *Plant Molecular Biology*, 2(6):335-350.
- Becker et al. (2012). *Trends in Biochemical Sciences* 37:85-91.
- Bevan et al. (1983). *Nature* 304:184-187.
- Boison et al. (2006). *Arch. Microbiol.* 186:367-376.
- Boyd et al. (2011) *Geobiology* 9:221-232
- Boyd and Peters (2013). *Front. Microbiol.* 4:201. doi:10.3389/fmicb.2013.00201.
- Brigle et al. (1987). *J. Bacteriol.* 169:1547-1553.
- Bruce (2001). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1541:2-21.
- Buren et al. (2017a). *Front Plant Sci* 8:1567.
- Buren et al. (2017b). *ACS Synthetic Biology* 6(6):1043-1055.
- Buren and Rubio (2018) *Fems Microbiol Lett* 365:fnx274; doi: 10.1093/femsle/fnx274.
- Buren et al. (2019). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 116:25078-25086.
- Buren et al. (2020). *Chemical Reviews* doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00489.
- Cannon et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:11379.
- Capecci. (1980). *Cell*, 22(2): 479-488.
- Carrari et al. (2003). *Metab. Eng.* 5:191-200.
- Carrie et al. (2010). *Journal of Biological Chemistry* 285:36138-36148.
- Carter et al. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:4213-4223.
- Chacinska et al. (2009). *Cell* 138:628-644.
- Chen et al. (2013). *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1357-1369.
- Cheng et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8):3636-3641.

10

20

30

40

50

- Cheng et al. (2005). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329:966-975.
- Chiu et al. (2001). *Biochemistry* 40:641-650.
- Christiansen et al. (1998) *Biochemistry-Us* 37: 12611-12623.
- Clapp (1993). *Clinics in perinatology*, 20(1):155-168.
- Clausen et al. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3856-3861.
- Cotton (2009). *J. Am. Chem. Soc.* 131: 4558-4559.
- Cui et al. (2013). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 2052-2057.
- Curatti et al. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:5297-5301.
- Curatti et al. (2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (45): 17626-17631.
- Curatti and Rubio (2014). *Plant Sci* 225:130-137.
- Curiel et al. (1992). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6(3): 247-252.
- Darshi et al. (2012). *Journal of Biological Chemistry* 287:39480-39491.
- Davis et al. (1996). *J. Bacteriol.* 178:1445-1450.
- De'ath et al. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:17995-17999.
- de Bruijn (2015). In: *Biological Nitrogen Fixation* pp. 1087-1101. John Wiley & Sons, Inc.
- de Kok et al. (2014). *ACS Synth. Biol.* 3:97-106.
- Dilworth et al. (1988). *Biochem. J.* 249:745-751.
- Dilworth et al. (1993). *Biochem. J.* 289:395-400.
- Dos Santos et al. (2004). *Chem Rev.* 104:1159-73.
- Dos Santos et al. (2012). *BMC Genomics* 13:162.
- Drummond (1985). *Biochem. J.* 232:891-896.
- Dyer et al. (2003). *J. Biol. Chem.* 278:32150-32156.
- Eady (1996). *Chem. Rev.* 96:3013-3030.
- Eglitis et al. (1988). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 241:19-27.
- Emerich and Burris, (1978). *J. Bacteriol.* 134:936-943.
- Engler et al. (2014) *ACS Synthetic Biology* 3(11):839-843.
- Fani et al. (2000). *J. Mol. Evol.* 51:1-11.
- Fay et al. (2015) *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 14829-14833.
- Fay et al. (2016). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016:9504-9508.
- Fujimura et al. (1985). *Plant Tissue Cult Lett.* 2:74-75.
- Fukusawa et al. (2015). *Molecular and Cellular Proteomics* 14:10.1074/mcp.M114.043083, 1113-1126.
- Gallie et al. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15:3257-73.
- Garfinkel et al. (1983). *Cell* 27:143-153.
- Gavini et al. (1998). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 244:498-504.
- Gavini et al. (2006). *Journal of Bacteriology* 188:6020-6025.
- Geddes et al. (2015). *Curr Opin Biotech* 32:216-222.
- Geigenberger and Fernie (2014). *Antioxid Redox Sign* 21:1389-1421.
- Glaser and Deshi (1999). *J Bioenerg Biomembr* 31:259-274.
- Glibert et al. (2014). *Environ Res Lett* 9:e105001; doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105001.
- Glick et al. (1992). *Cell* 69:809-822.
- Goodwin et al. (1998) *Biochemistry-Us* 37: 10420-10428.
- Good and Beatty (2011). *PLoS Biol* 9, e1001124.

10

20

30

40

50

- Graham et al. (1973). *Virology* 52(2) 456-467.
- Grant et al. (1995). *J. Agric. Sci.*, 124 (3): 437-445
- Guo et al. (2016). *Angewandete Chemie* 55:12764-12767
- Fu et al. (1994). *Biochemistry* 1994 33:13455-63.
- Hakoyama et al. (2009). *Nature* 462(7272): 514.
- Hellings (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:19 10015-10017.
- Hernandez et al. (2007). *Mol. Microbiol.* 63:177-192.
- Hirel et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8247-8251.
- Hinchee et al. (1988).
- Homer et al. (1993). *J. Bacteriol.* 175:4907-4910. 10
- Homer et al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:24745-24752.
- Hoover et al. (1988). *Biochemistry* 27: 3647-3652.
- Horsch et al. (1985). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 50:433-437.
- Howard et al. (1986). *J Biol. Chem.* 261:772-778
- Hu et al. (2004). *J. Biol. Chem.* 279:54963-54971.
- Hu et al. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:3236-3241.
- Hu et al. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17119-17124.
- Hu et al. (2008). *Biochemistry* 47:3973-3981.
- Hu and Ribbe (2013). *Bba-Bioenergetics* 1827:1112-1122. 20
- Hu and Ribbe (2016). *Annual Review of Biochemistry* 85:455-483.
- Hu and Ribbe, (2015). *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20(2):435-445. doi:10.1007/s00775-014-1225-3
- Huang et al. (2009). *Plant Physiology* 150(3):1272-1285.
- Hummel et al. (2007). *Metabolomics* 75-95.
- Hwang et al. (1996). *J. Mol. Evol. Nov*; 43:536-540.
- Igarashi and Seefeldt (2003). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38:351-384.
- Jasniewski et al. (2018). *Inorganics* 6(1):25.
- Jimenez-Vicente et al. (2014) *FEBS Letters* 588:512-516.
- Johnson et al. (2005). *Biochem. Soc. Trans.* 33:90-93. 30
- Joshi (1987). *Nucleic Acids Res.* 15:6643-6653.
- Jouanneau et al. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* 1232:33-42.
- Katoh et al. (2013). *Mol Biol Evol.* 4:772-80.
- Kay et al. (1987). *Science* 236:1299-1302.
- Kennedy and Dean, (1992). *Mol Gen Genet.* 231:494-498.
- Kerscher et al. (1997). *The Journal of Cell Biology* 139:1663-1675.
- Khumanthem et al. (2007). *Indian Journal of Microbiology*, 47:345-352.
- Kim and Rees (1994). *Biochemistry* 33:389-397.
- Kimble et al. (1995). *Archives of Microbiology* 163:259-267.
- Klipp et al. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 216:293-302. 40
- Kmiec et al. (2013). *PNAS* 110: 40 E3761-E3769.
- Koon et al. (2004). *Proc Natl Acad Sci USA* 10:8295-8300.
- Lawson and Smith (2002). *Met Ions Biol Syst*; 39:75-119.
- Lee et al. (1998). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 2 498-504.
- Lee et al. (2000). *J. Bacteriol.* 182:7088-7091.
- Lee et al. (2012). *Plant Cell* 24:5037-5057.
- Lei et al. (1999). *Biochem Biophys Res Commun.* 264:186-90.
- Lill and Muhlenhoff (2008). *Annual Review of Biochemistry* 77:669-700.
- Lister et al. (2004). 134:777-789. 50

- Lister et al. (2007). *Plant Cell*, 19:3739-3759.
- Lopez-Torrejon et al. (2016). *Nature Communications* 7:11426.
- Lu et al. (1993). *Sci China B*. 36: 11 1342-51.
- Mackenzie and McIntosh (1999). *Plant Cell* 11:571-585.
- Marques et al. (2014). *Acta Crystallographica Section F* 70(5):669-672.
- Masukawa et al. (2007). *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7562-7570.
- Matsubara and Saeki (1992). *Adv. Inorganic Chem.* 38:223-280.
- Mayer et al. (1999). *J. Mol. Biol.* 292:871-891.
- McLean and Dixon (1981). *Nature*, 292:655.
- McRose et al. (2017). *Frontiers Microbiol.* 8:267 doi:10.3389/fmicb.2017.010267. 10
- Medberry et al. (1992). *The Plant Cell* 4: 2 185-192.
- Medberry et al. (1993). *Plant J.* 1993 3: 4 619-26.
- Merrick and Dixon (1984). *Trends Biotechnol* 2:162-166.
- Mehta and Baross (2006). *Science* 314:1783-1786.
- Millar et al. (2007). *Methods Cell Biol* 80:65-90.
- Miller and Eady (1988). *Biochem. J.* 256:429-432.
- Miyamoto et al. (1979). *Applied and Environmental Microbiology*, 37:454-458.
- Mueller et al. (2012). *Nature* 490:254-257.
- Muhlenhoff et al. (2003). *EMBO J.* 22:4815-4825. 20
- Murcha et al. (2004). *J Mol Biol* 344:443-454.
- Murcha et al. (2014). *Bba-Gen Subjects* 1840:1233-1245.
- Niedz et al. (1995). *Plant Cell Reports* 14: 7 403-6.
- Naim et al. (2012). *PLoS One* 7(12):e52717.
- Oldroyd and Dixon (2014) *Curr Opin Biotechnol* 26:19-24.
- Olson et al. (2000). *Biochemistry*; 39:16213-16219.
- Ouzounis et al. (1994). *Trends Biochem. Sci.* 19:199-200.
- Ow et al. (1986). *Science* 234:856-859.
- Paul and Merrick (1987) *Eur. J. Biochem.* 170:259-265.
- Paustian et al. (1990). *Biochemistry* 29:3515-3522. 30
- Petrova et al. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270:863-867.
- Pfanner and Geissler (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:339-349.
- Prasad et al. (1992). *Plant Molecular Biology* 18(5):873-885.
- Prasher et al. (1985). *Trends in Genetics* 11: 8 320-3.
- Pratte et al. (2006). *J. Bacteriol.* 188:5806-5811.
- Riedel et al. (1995). *Eur. J. Biochem.* 231:742-746.
- Robson and Postgate (1980). *Annual Review of Microbiology* 34:183-207.
- Robson et al. (1986). *Nature*, 322:388-390.
- Robson et al. (1989). *EMBO J.* 8:1217-1224.
- Rockstrom et al. (2009). *Nature* 461:472-475. 40
- Rodriguez-Quinones et al. (1993). *J. Bacteriol.* 175:2926-2935.
- Roise et al. (1986) *The EMBO Journal* 5:1327-1334.
- Roise and Schatz (1988). *J.Biol.Chem.* 263:4509-4511.
- Rubio et al. (2002). *J. Biol. Chem.* 277:14299-14305.
- Rubio et al. (2004) *J Biol Chem* 279: 19739-19746.
- Rubio and Ludden (2005). *J. Bacteriol.* 187:405-414.
- Rubio and Ludden (2008). *Annu Rev Microbiol* 62:93-111.
- Salomon et al. (1984). *EMBO* 3:1 141 - 146.
- Santi et al. (2013). *Ann Bot* 111:743-767.
- Schleiff and Soll (2000) *Planta* 211:449-456. 50

- Schmidt and Skerra (2007). *Nat. Protoc.* 2:1528-1535
- Schmidt et al. (2013). *Protein Expr. Purif.* 92:54-61.
- Schmitz et al. (2001). *FEMS Microbiol Lett.* 195:97-102.
- Schwarz et al. (2016). *Nucleic acids research* 44(8): e77-e77.
- Seefeldt et al. (2009). *Annu Rev Biochem* 78:701-722.
- Serrano et al. (2009). *Systematic and Applied Microbiology*, 32:1-7.
- Shah et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:12064-12068.
- Shah et al. (1999). *J. Bacteriol.* 181:2797-2801.
- Siddavattam et al. (1993). *Mol. Gen. Genet.* 239:435-440.
- Sippel and Einsle, (2017). *Nature Chemical Biology*, 13:956. doi:10.1038/nchembio.2428 10
- Sippel et al. (2018). *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 23(7): 1049-1056
- Sirrenberg et al. (1996). *Nature* 384: 6609 582-5.
- Smil (2002). *Ambio* 31:126-131.
- Smith et al. (1997). *J. Bacteriol.* 179:7135-7155.
- Smith et al. (2005). *Annu. Rev. Biochem.* 74:247-281.
- Smanski et al. (2014). *Nature Biotechnology* 32:1241-1249.
- Spatzal et al. (2016). *Nature communications* 7 (2016): 10902.
- Stalker et al. (1988). *J. Biol. Chem.* 263(13):6310-6314. 20
- Staples et al. (2007). *J. Bacteriol.* 189:7392-7398.
- Suh et al. (2003). *Journal of Biological Chemistry* 278:5353-5360.
- Sutton et al. (2008). *Environ Pollut* 156:583-604.
- Temme et al. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(18):7085-7090.
- Tezcan et al. (2005). *Science* 309:1377-1380.
- Thiel et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9358-9362.
- Thiel et al. (1997). *J. Bacteriol.* 179:5222-5225.
- Thillet et al. (1988). *J. Biol. Chem* 263(25):12500-12508
- Thomas et al. (1966). *Biochemistry* 5(8):2513-2516.
- Toriyama et al. (1986). *Theor. Appl. Genet.* 73:16-19 30
- Verhasselt et al. (1995). *Yeast* 11(10):961-966.
- von Heijne (1986). *EMBO J.* 5:1335-1342.
- Wagner et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6099-6103
- Wahlund and Madigan, (1993). *J. Bacteriol.* 175: 474-478.
- Wang et al. (2013). *PLoS Genet* 9, e1003865.
- Waterhouse et al. (2018). *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303.
- Weber et al. (2011) *PloS one.* 6(2), pp.e16765.
- Wiig et al. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 8623-8627.
- Wisniewski et al. (2011) *Anal Biochem.* 410:307-9.
- Wood et al. (2009). *Plant Biotechnol J.* 7:914-924. 40
- Xia et al. (2009). *Nucleic acids research* 37(suppl_2): W652-W660.
- Xiao et al. (2010). *Biochemistry* 49:5588-5599.
- Yang et al. (2014). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:E3718-E3725.
- Yang et al. (2010). *BMC Plant Biology*, 10. doi:10.1186/1471-2229-10-231.
- Yang et al. (2017). *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E2460-E2465.
- Yang et al. (2018) *Proc Natl Acad Sci USA* doi/10.1073/pnas.1804992115
- Yates (1972) *FEBS Lett* 27:63-67.
- Yoneda et al. (2012). *Int. J. Systematic Evol. Biol.* 62:1692-1697.
- Yuvaniyama et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:599-604.
- Zhang and Glaser (2002). *Trends Plant Sci* 7:14-21. 50

- Zhang et al. (2009). *Progress in Natural Science* 19:1197-1200.
- Zhang et al. (2016). *Biogeochemistry* 127, 189-198. doi: 10.1007/s10533-016-0188-6.
- Zhang and Wang (2013). *PLoS One* 8(7). doi:10.1371/journal.pone.0068491.
- Zheng et al. (1994)
- Zheng et al. (1997). *J. Bacteriol.* 179:5963-5966.
- Zheng et al. (2018). *Nature Microbiology*, 3:281-286. doi:10.1038/s41564-017-0091-5.

【図面】

【図 1】

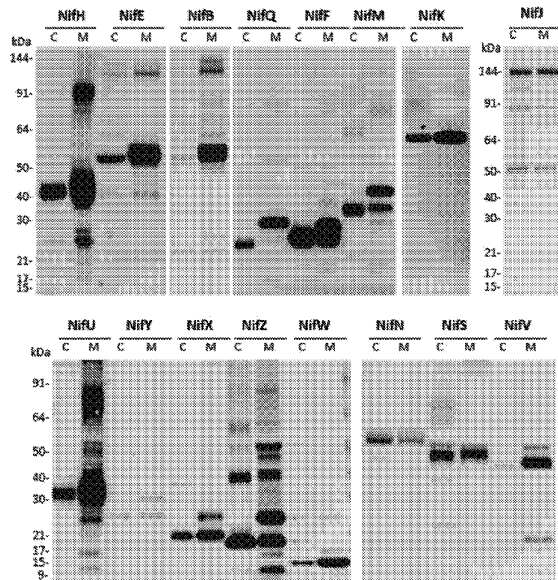


Figure 1

【図 2】

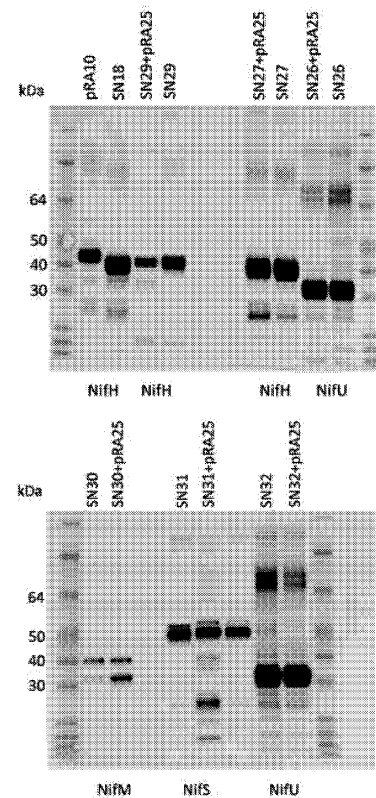


Figure 2

10

20

30

40

50

【図 3】

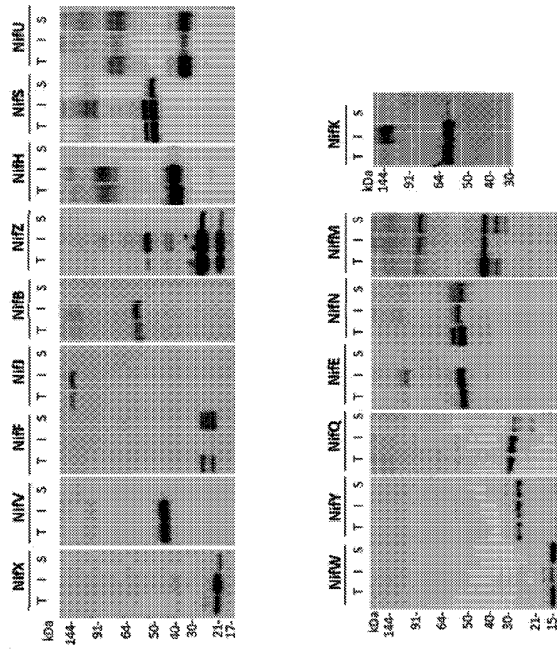


Figure 3

【図 4】

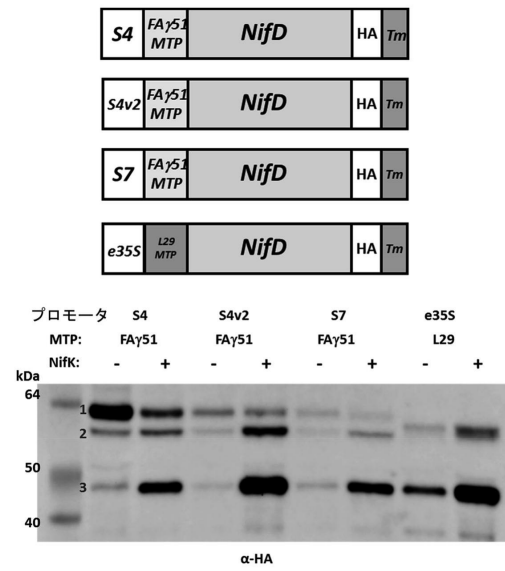


Figure 4

【図 5】

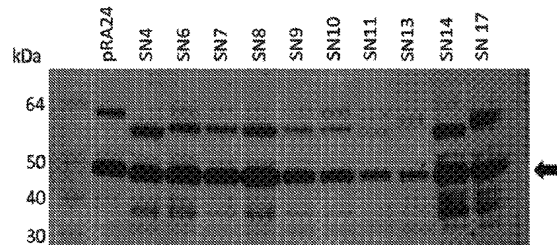


Figure 5

【図 6】

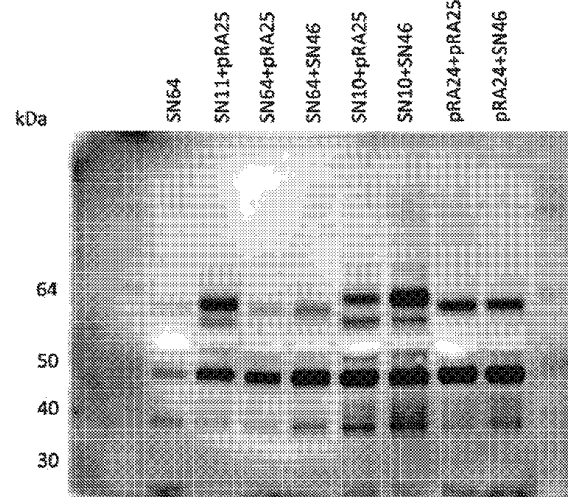


Figure 6

10

20

30

40

50

【図 7】

MMAMVFREGRLLPSIAARPIAAAAAASSDQEEGLAAAAAAAVVRNRGGWITNAT 60
MMAMVFREGRLLPSIAARPIAAIRSPSSDQEEGLGVRSISTQVVRNRGGWITNAT 60
***** ; ***** ; ***** ; ***** ; ***** ; *****

SN66
SN10
Figure 7

【図 8】

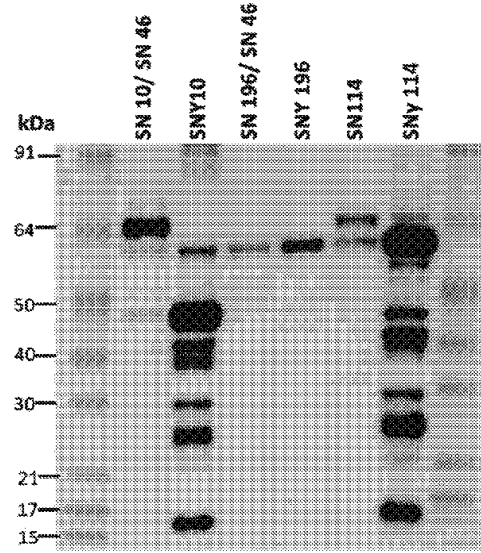


Figure 8

【図 9】

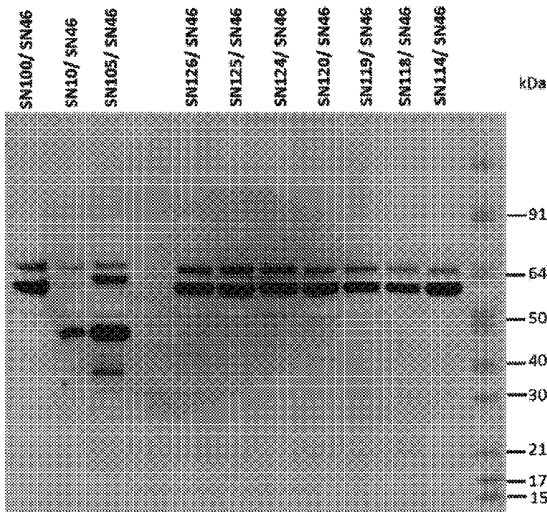


Figure 9

【図 10】

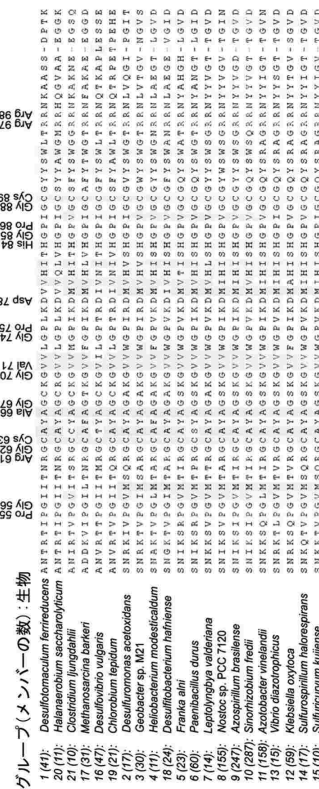


Figure 10

【図 1 1】

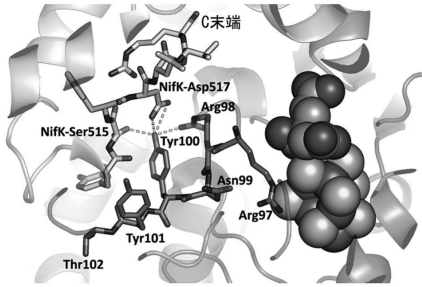


Figure 11

【図 1 2】

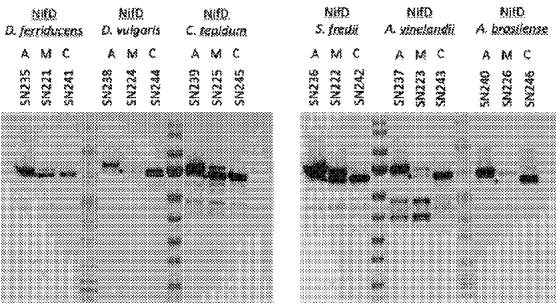


Figure 12

【図 1 3】

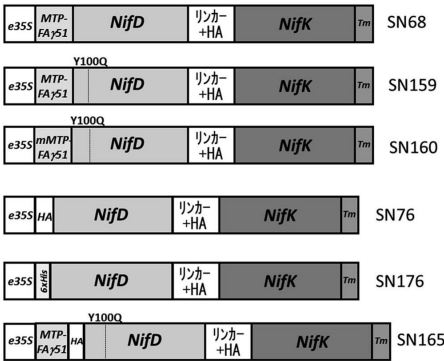


Figure 13

【図 1 4】

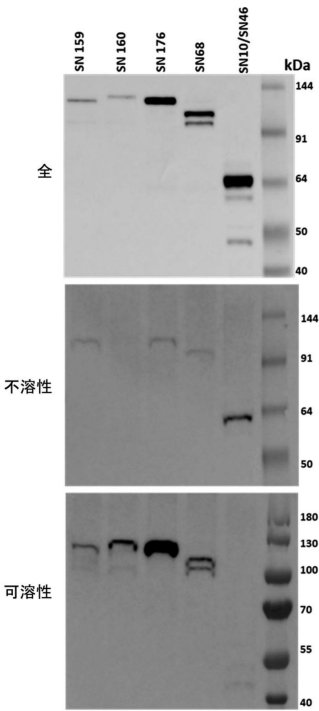


Figure 14

【図 1 5】

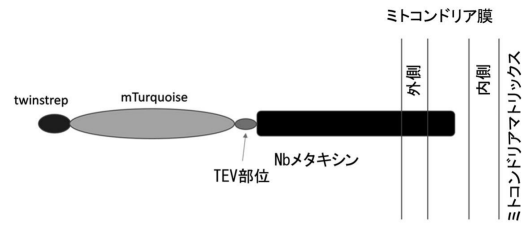


Figure 15

【図 1 6】

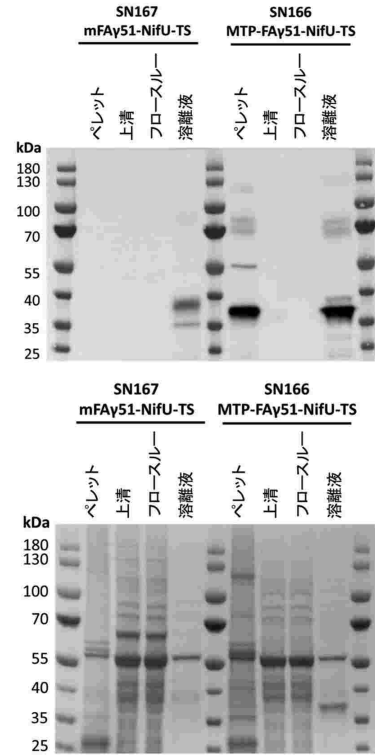


Figure 16

【図 1 7】

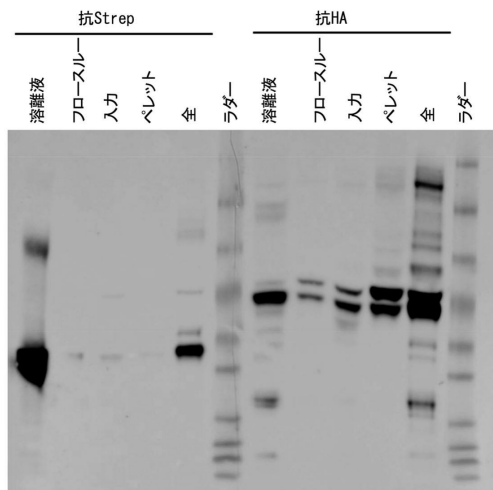


Figure 17

【図 1 8】

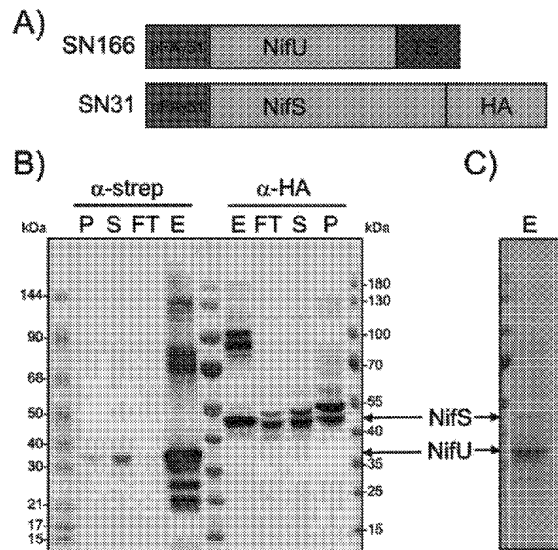


Figure 18

【図 19】

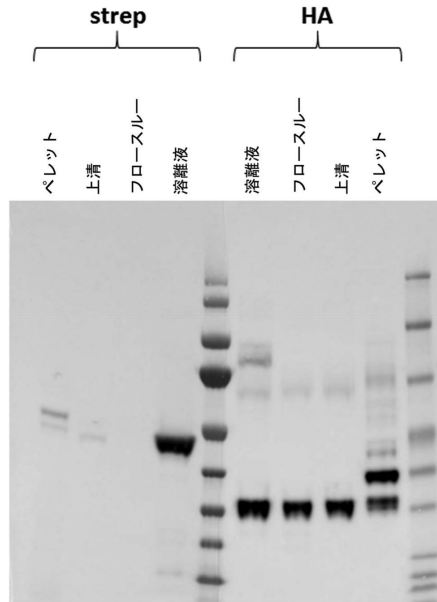


Figure 19

【図 20】

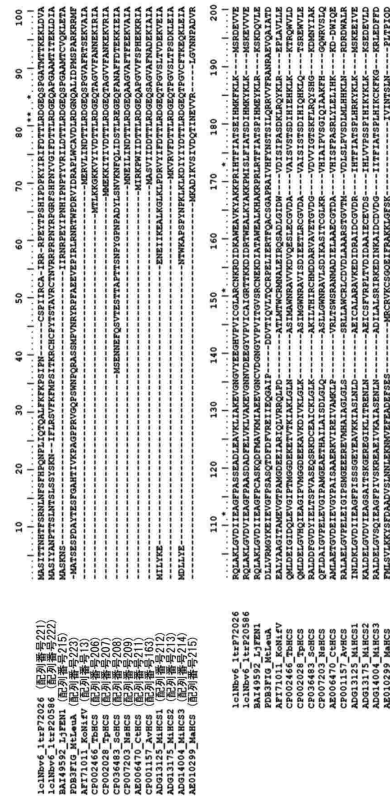


Figure 20

【図 20 - 1】

```
1c1Nb-v6_1trf72026 KARSWVAYARSIG--CEDVSPEDAGSDPEFLYHILGEVIRKAGATT--
1c1Nb-v6_1trf20586 KARSWVAYAKTL--CEDVFCVEDGASDRFLYILGEGIKVGATA--
BAI49592_L3FEN1 TARWVFAFASLG--CTDIQGAEDAASDKFLYQIFGEVIRKAGATT--
FDB3710_MtLauA GARKCQEAQKYPQTRFEYSPESYITSELEYAKQVCDAVGVEIAPTPE
AFI71011_KoN1.v RLAMFIHLAHTL--GLKVCIGCEDASASGQTLRAIAEVAQCAAR--
CP002466_TbHCS NMTEAVKFAKKE--GVYVSNAEDAASRTDMNFLIEFAKCAQAGADR--
CP002028_TpHCS NMVKAIVEFAKKE--GVYISVNAEDAASRDEFLIQFAAAKEAGADR--
CP007203_NaHCS SAVEVIEFVKSK--GIEIRFSSSDSFSDLVLDLNIYKTVDPKIGVNR--
ADG13125_MiHCS1 RLKDCISFAVDQ--GLWVAVGDESSRADPNFLLDVNALNAQEWGASR--
ADG13175_MiHCS2 QLHALVSKARER--FDVSVGGQDATSSDTFLQRFNLDAAEAGAKR--
ADG14004_MiHCS3 EVARLVGEARMA--GLEVCLGCEADASRADIEFVVQVGVQAAGARR--
ADG10299_MaHCS KAVNAIEYKHEH--GIKVEFSAEDATATEIDYLYKEVYKVAEAGADI--
LAVNAIEYAKDH--GLIVELSAEDATRAELNFKLKF-AGENLADR--
TIVECIEYAKSH--GLFVAFSAEDGTRTPLEDLIRVHKLAEAGADR--
MLEFVLQMACSN--DQEIYLSIDNALEFSIRDVETIYPLIPKYGIRK--
```

Figure 20 (continued)

【図 20 - 2】

```
1c1Nb-v6_1trf72026 ----LNIPDTVGTVTFSEFGKLIADIKANTPGIGDVIISTHCQNDLGLST
1c1Nb-v6_1trf20586 ----ICVADTVGSSLPTEFGRLIADIKANTPGIEDVVISVCHNDLGLAT
BAI49592_L3FEN1 ----LTIPTVGIAMPFEYKGLIADIKANTPGIENAINAHCHNDLGLAT
FDB3710_MtLauA RPIIFNLPATVEMTTFENVYADSIEMSRNLANRESVILSEPHNDRGTA
AFI71011_KoN1.v ----LRVADTVGLDPEFTAAQISALRD----VWSGIEIEMHNDLGNAT
CP002466_TbHCS ----LRFCDTVGFLDPFTYENIQTLK----AVDIDIEHNDHNDGNAT
CP002028_TpHCS ----IRYCDTIGLDPFTYENIQTLK----VVDIDIEHNDHNDGNAT
CP007203_NaHCS ----VGIADTVGCANPQVYELIRTLKS----VWSCDIECHFNHNDGCAL
ADG13125_MiHCS1 ----FRCDTVGVLPDFTYAKVQLVLS--ALSIPLEIHTHNDLGLAT
ADG13175_MiHCS2 ----FRIADTVGIATFVSVMALGAALRQ----SSSLEFHAHNDLGNAT
ADG14004_MiHCS3 ----LRFADTVGMPEFFGMLDRFRLSR--RIDMELEYHAHNDLGLAT
ADG10299_MaHCS ----INVPTVGMIPRATYLLISELRK----EIDN--LSVCHNDLGLAV
----VCVCDTVGLTPQKSEELFKRITS--EIKLP-VSVCHNDLGLAT
----VHVADTAGTATPQAMEFICKALTC--SANKARVGVCHNDLGLAV
----LILGDRSGKADPFTTYDKLGLFNG--TIQCPEYGVYNDYGTAT
```

Figure 20 (continued)

【 図 2 1 - 2 】

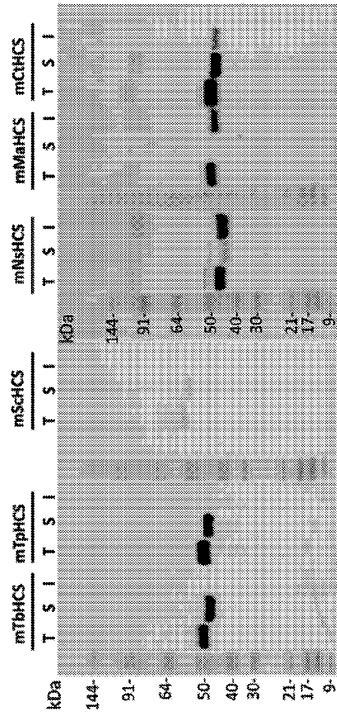


Figure 21 (continued)

【 図 2 2 - 1 】

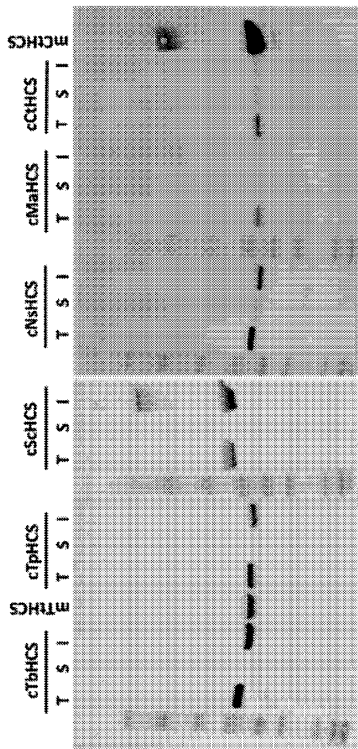


Figure 22

【 図 2 2 - 2 】

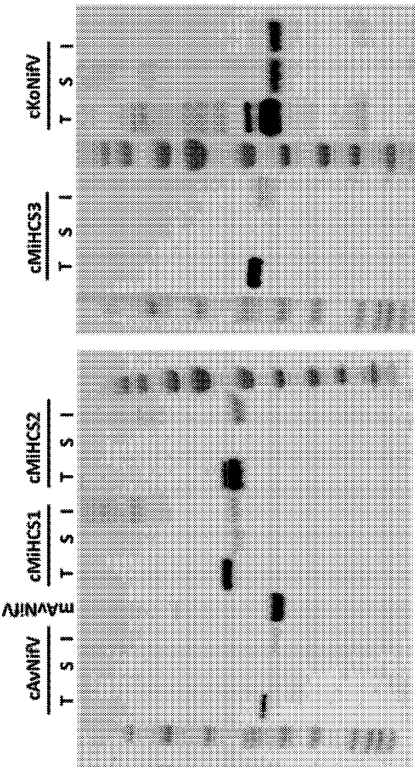


Figure 22 (continued)

【 図 2 3 】

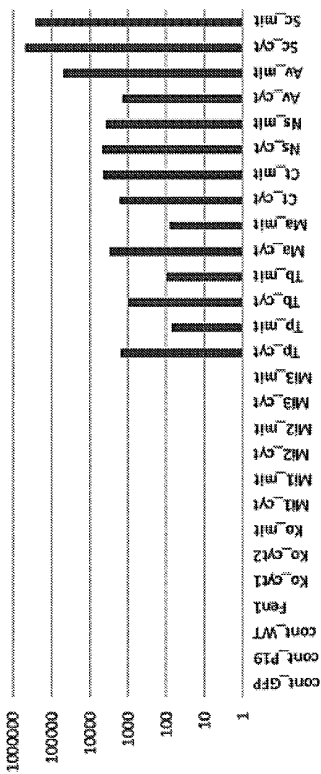


Figure 23

10

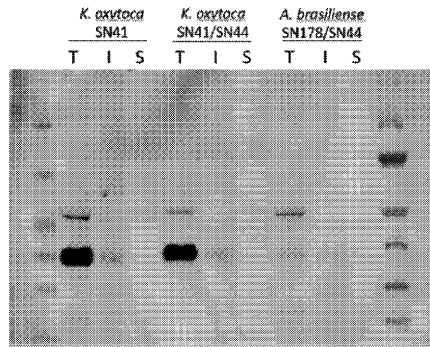
20

30

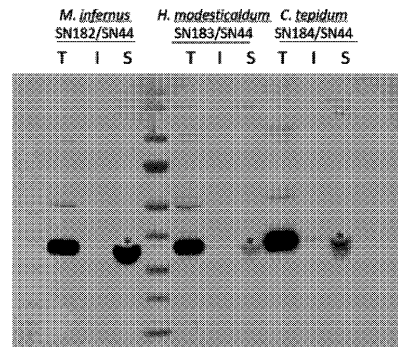
40

50

【図 24-1】



【図 24-2】



10

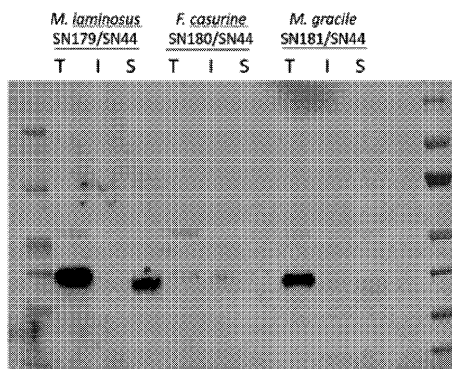


Figure 24

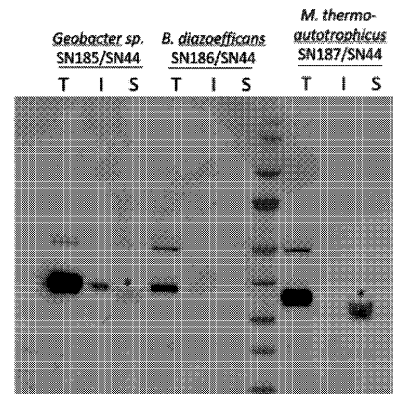


Figure 24 (continued)

20

【図 24-3】

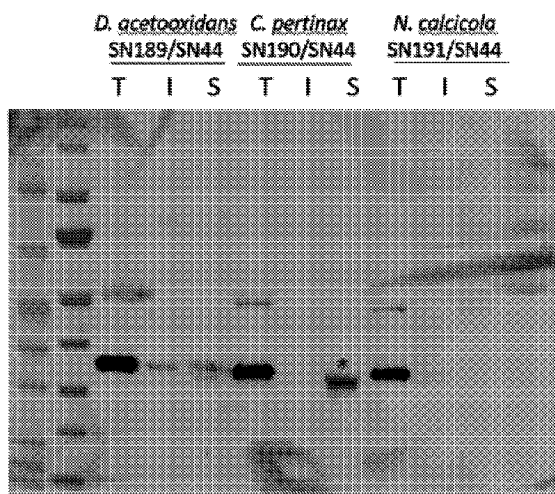


Figure 24 (continued)

【図 25】

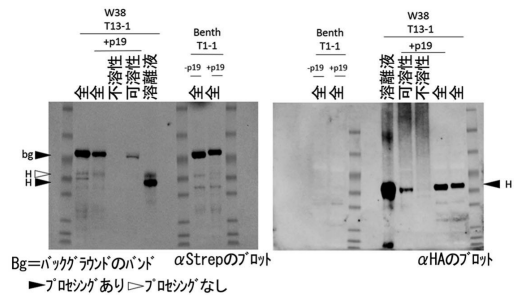


Figure 25

30

40

50

【図 26】

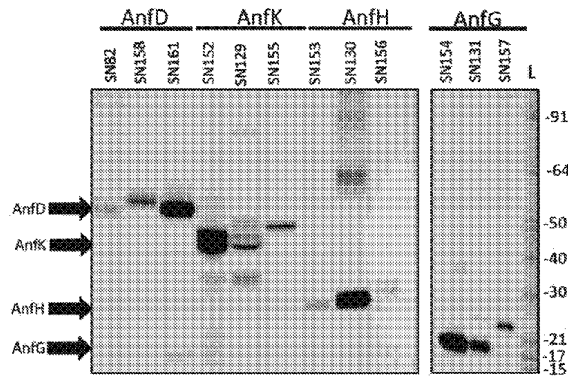


Figure 26

【図 27】

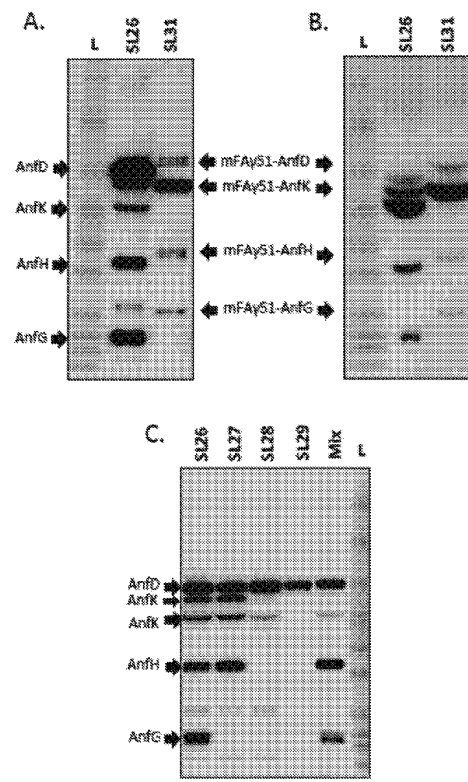


Figure 27

【図 28】

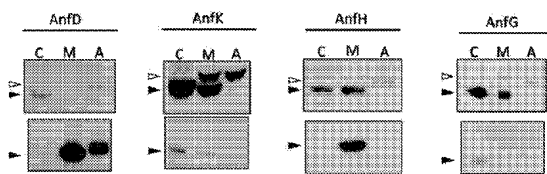


Figure 28

【図 29】

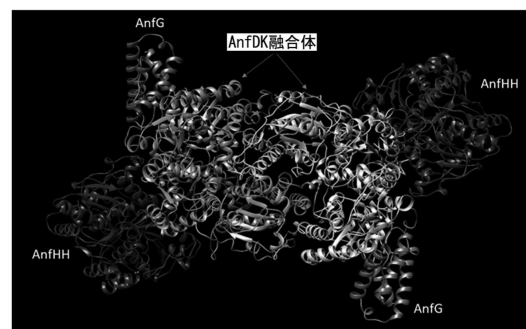


Figure 29

10

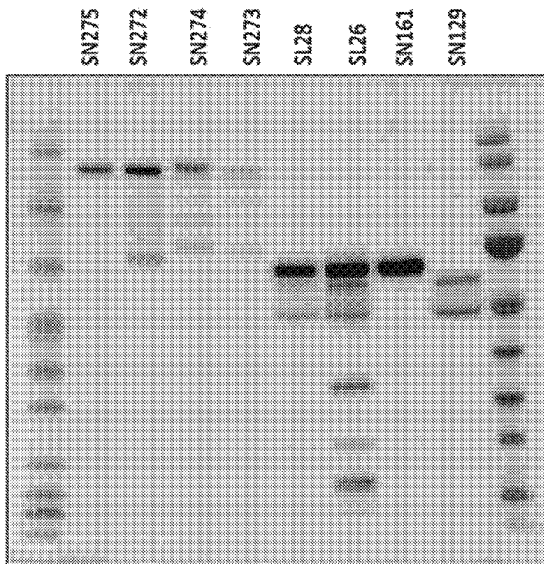
20

30

40

50

【図 30】



【図 3 1 A)】

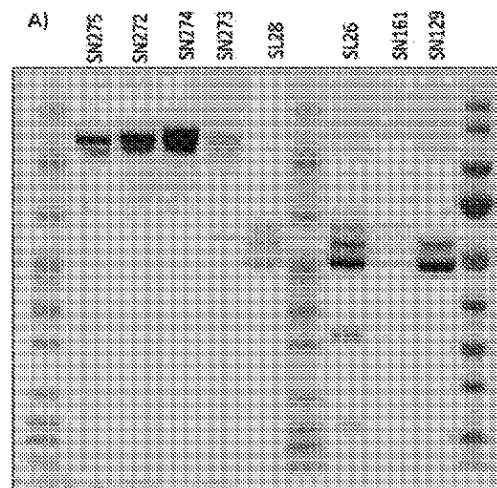
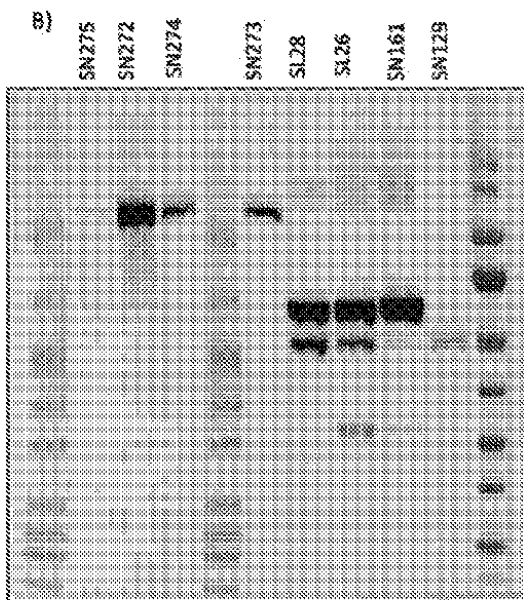
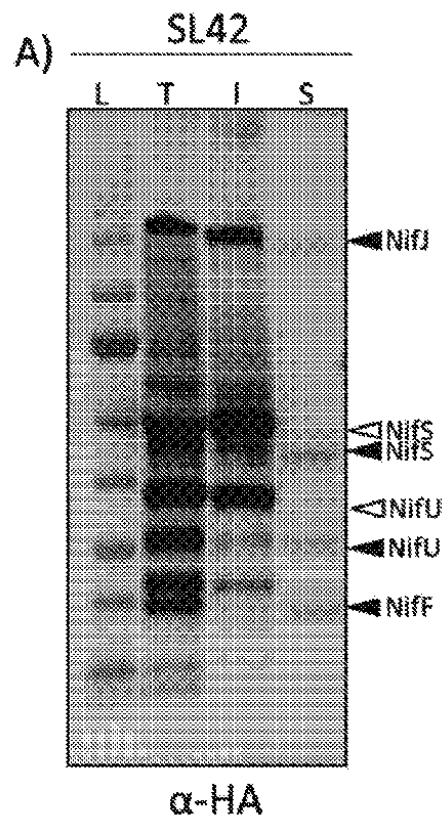


Figure 30

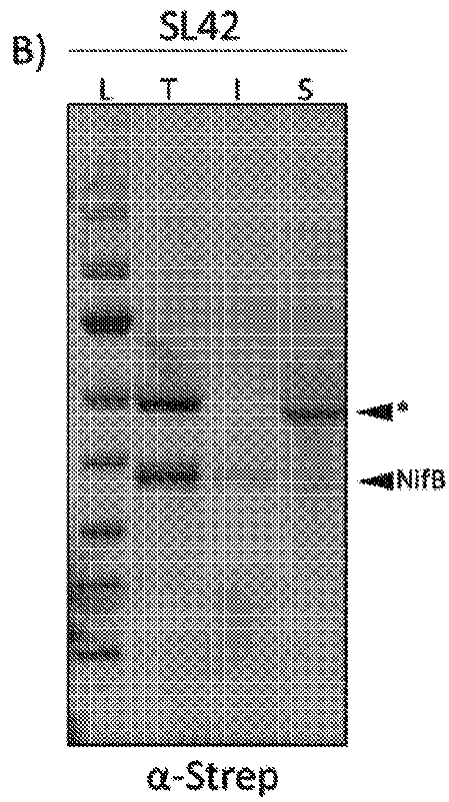
【図 3 1 B)】



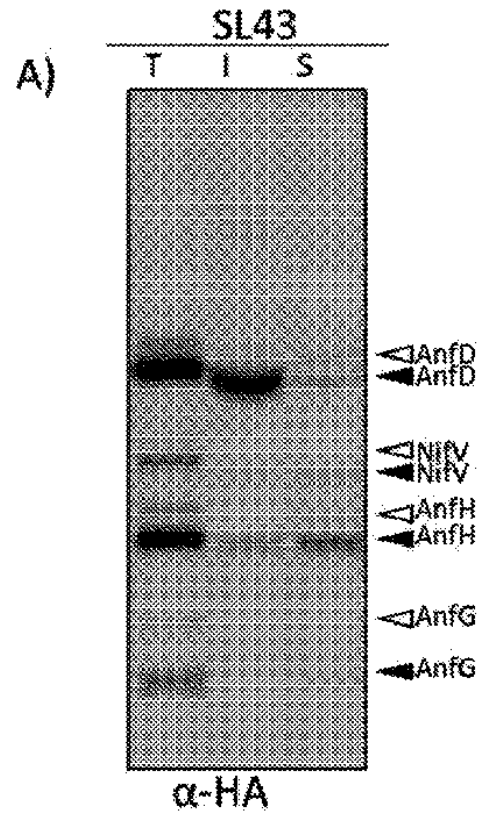
【図 3 2 A)】



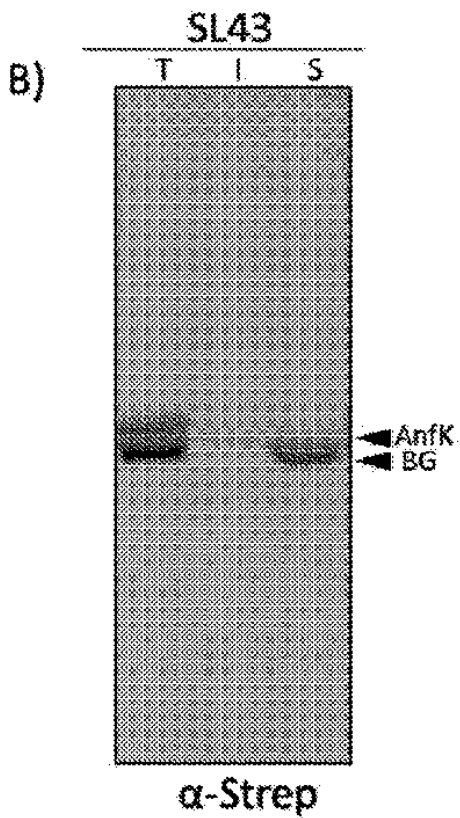
【図 3 2 B）】



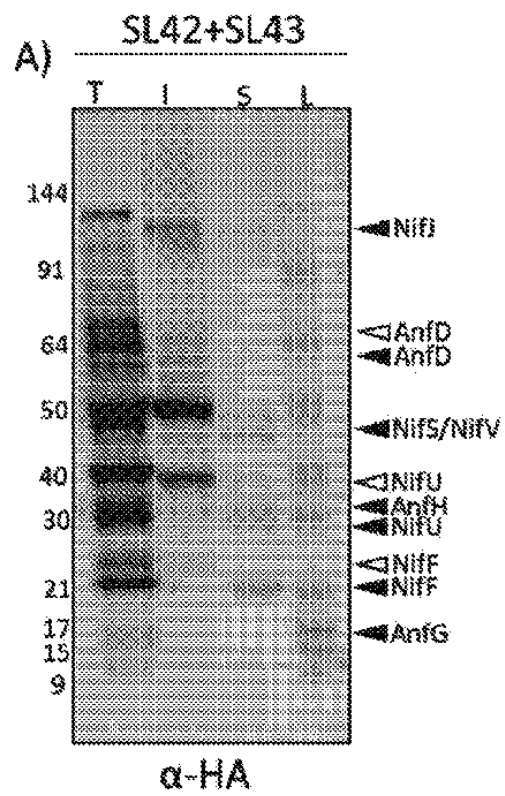
【図 3 3 A）】



【図 3 3 B）】



【図 3 4 A）】



10

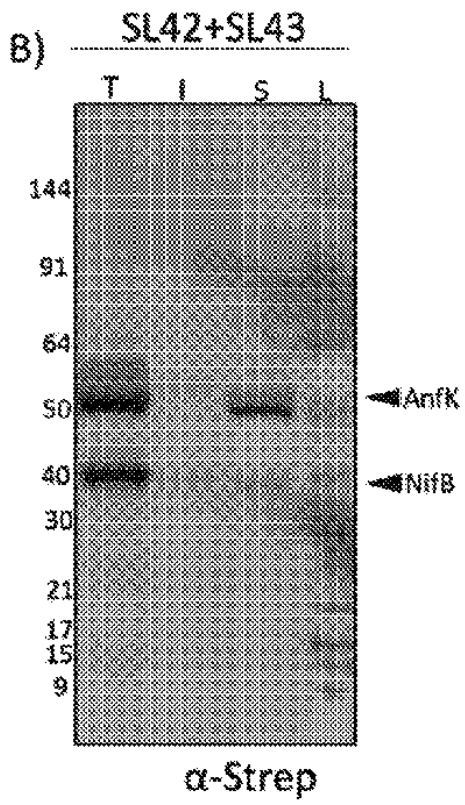
20

30

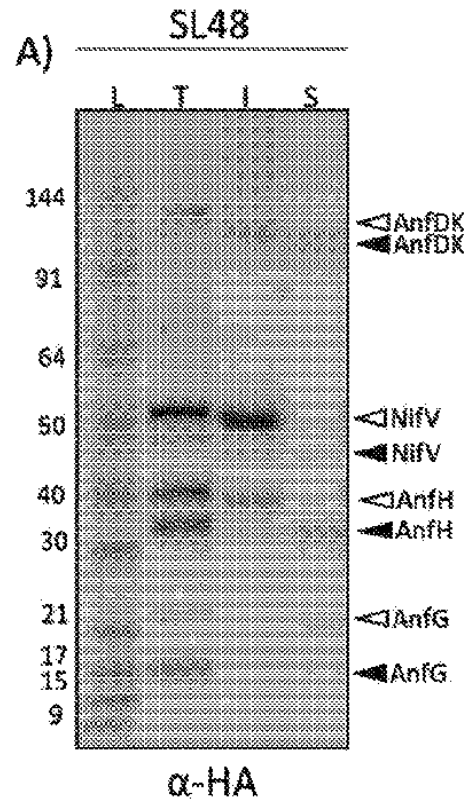
40

50

【図 3 4 B）】



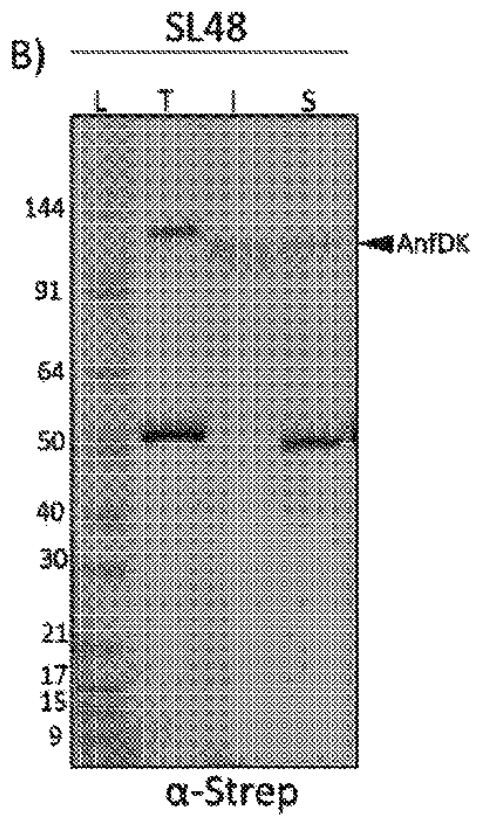
【図 3 5 A）】



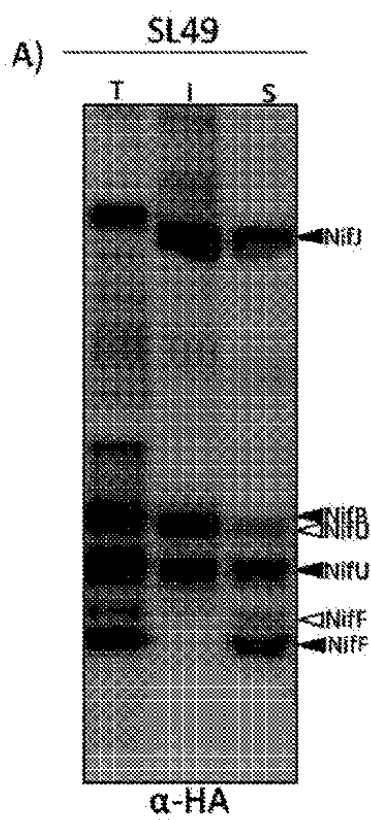
10

20

【図 3 5 B）】



【図 3 6 A）】

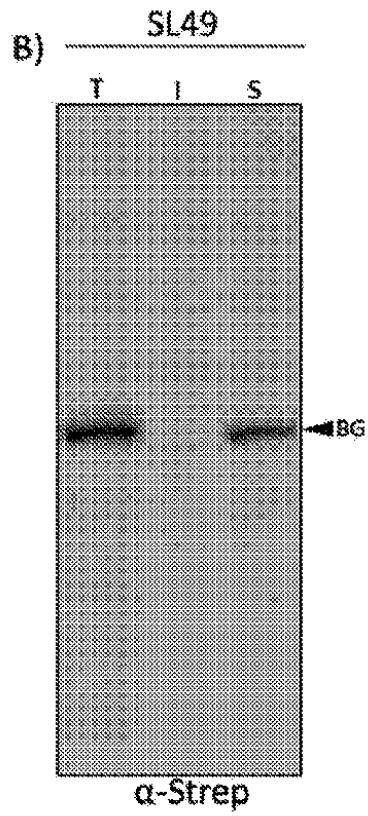


30

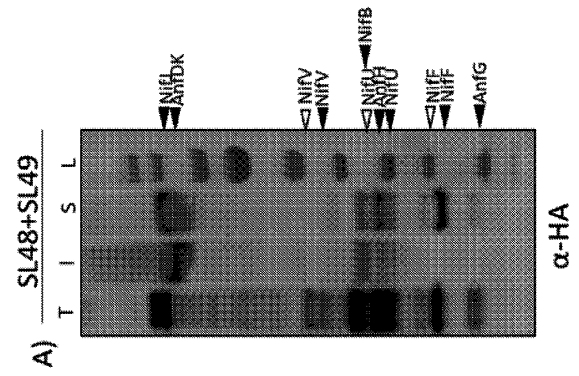
40

50

【図 3 6 B)】



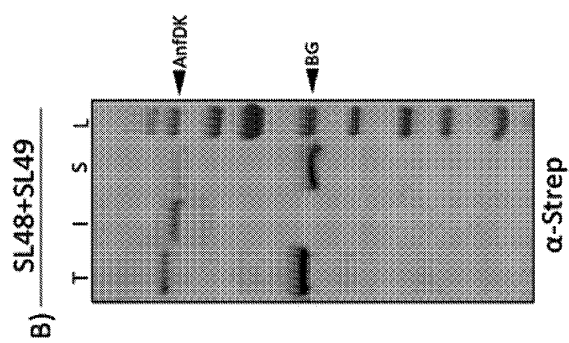
【図 3 7 A)】



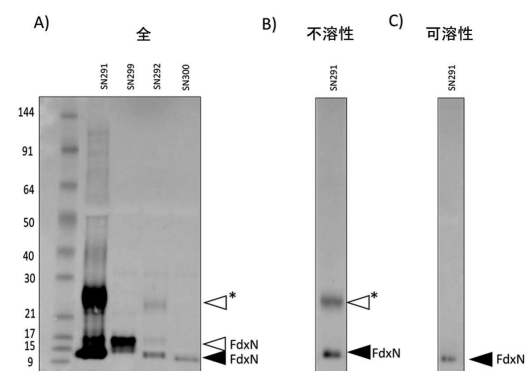
10

20

【図 3 7 B)】



【図 3 8】



30

Figure 38

40

50

【図 39】

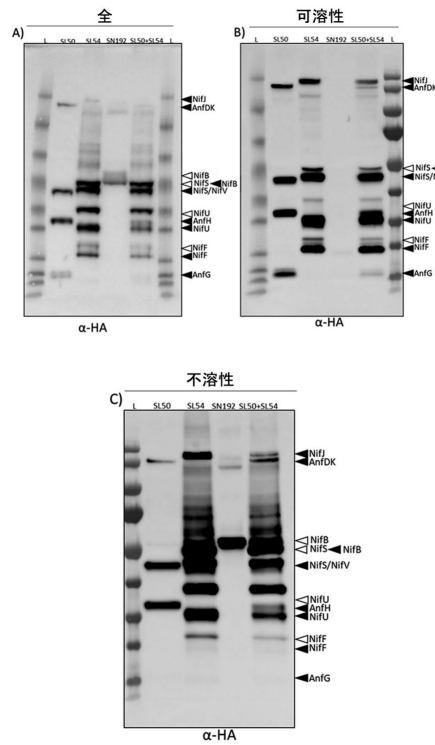


Figure 39

【図 40】

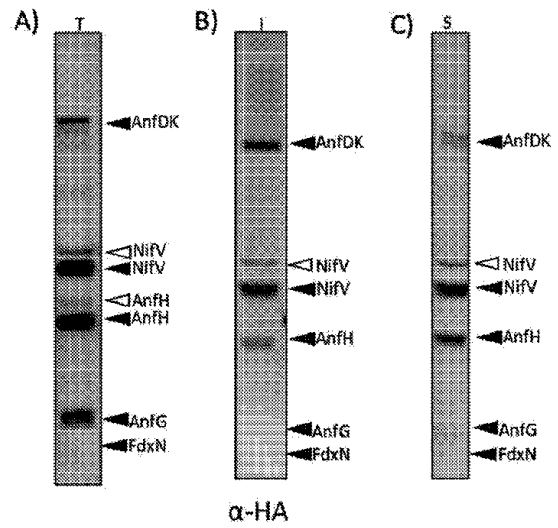


Figure 40

【図 41】

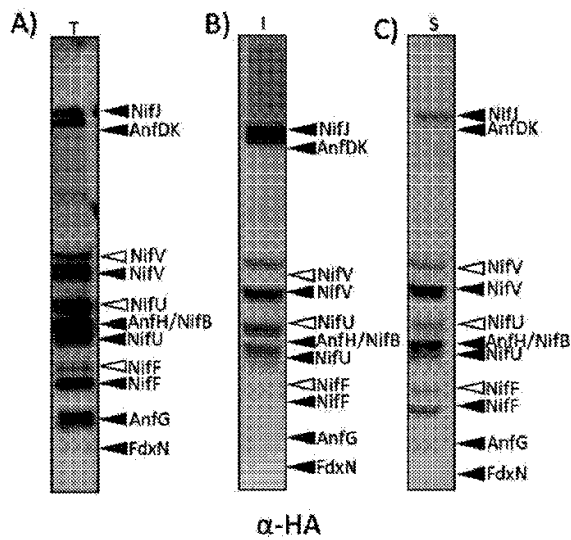


Figure 41

【図 42】

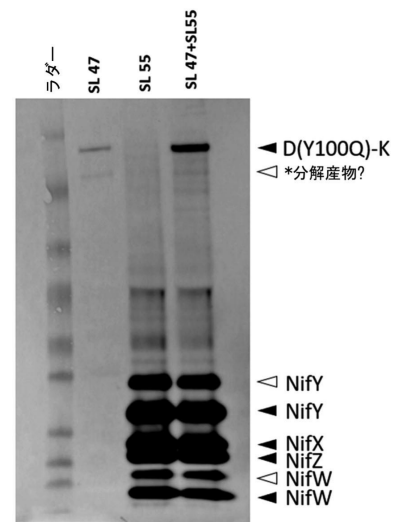


Figure 42

【配列表】

0007618570000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 2 3 K	10/30	(2016.01)	A 2 3 K	10/30	
C 1 2 N	15/82	(2006.01)	C 1 2 N	15/82	Z
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	15/53	(2006.01)	C 1 2 N	15/53	
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	
A 0 1 H	6/46	(2018.01)	A 0 1 H	6/46	
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

オーストラリア(AU)

(31)優先権主張番号 2020900689

(32)優先日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

オーストラリア(AU)

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ロバート サイラス アレン

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 2, ダウナー, パッドベリ
ー ストリート 5 9

(72)発明者 クリスティーナ マリア グレッグ

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 1, キャンベラ, シー／オ
ー シーエスアイアールオー ジーピーオー ボックス 1 7 0 0

(72)発明者 岡田 尚子

オーストラリア国, 2 6 0 1, キャンベラ, シー／オー シーエスアイアールオー ジーピーオー
ボックス 1 7 0 0

(72)発明者 アムラサ メノン

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 1, キャンベラ, シー／オ
ー シーエスアイアールオー ジーピーオー ボックス 1 7 0 0

(72)発明者 アンドリュー チャールズ ワーデン

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 1 3, アナウォール, メイナ
ード ストリート 5 4

(72)発明者 マシュー クレイグ テイラー

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 6, チフリー, ストップス
プレイス 3

(72)発明者 クレイグ クリストファー ウッド

オーストラリア国, オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 2, ディックソン, デュマ
レスク ストリート 3 3

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 8 / 1 4 1 0 3 0 (WO, A 2)

Frontiers in plant science, 2017年, Vol.8, Article 287, pp.1-14

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 0 1 H 1 / 0 0 - 1 7 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d