



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Physiological Role of Lanthanide-dependent Methylotrophy in Plant Symbiotic Bacteria

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2020-07-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: WANG LUN メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79372

氏 名 (本 国 籍)	WANG LUN (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第730号
学 位 授 与 年 月 日	令和2年3月13日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Physiological Role of Lanthanide-dependent Methylo-trophy in Plant Symbiotic Bacteria (植物共生細菌におけるランタノイド依存型メタノール代謝系の生理的役割)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 岩 橋 均 副査 岐阜大学 教授 中 川 智 行 副査 静岡大学 准教授 徳 山 真 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

元素周期表の第3族の17元素のうち、スカンジウム (Sc) とイットリウム (Y) を除く15元素は「ランタノイド」と呼ばれ、自然界に広く分布する金属元素の一種である。ランタノイドは産業のビタミンとも言われるように、自動車産業、電子産業をはじめとした幅広い産業分野で利用されており、現在の先端技術開発には必要不可欠な金属元素として認識されている。

一方、近年、植物の葉面や根圏に棲息するメチロトローフ細菌や根粒菌などの植物共生細菌群が、ランタノイド依存的なメタノール代謝系をもつことが報告された。メタノールが、植物が蒸散する主要VOCの一つであることから、メタノールを利用する植物共生細菌群のランタノイド依存的なメタノール代謝系の植物共生における機能と役割が注目を集めているものの、その詳細は明らかでない。

申請者は、本研究課題において植物共生細菌のメタノール代謝の鍵酵素であるランタノイド依存型メタノール脱水素酵素 (XoxF) に焦点を絞り、その酵素化学的特徴や分子機能について詳細に解析し、これら細菌群におけるランタノイド依存的なメタノール代謝系の機能について解析を行った。

第1章では、植物葉上の主要共生細菌である *Methylobacterium* 属細菌のもつ XoxF の機能について詳細に解析をした。*Methylobacterium* 属細菌はメタノールを唯一の炭素源として生育できるメチロトローフ細菌の一種であり、生態系では植物葉上で放出されるメ

メタノールを資化し、一方で宿主に植物ホルモン様物質などを供給することで共生関係を結んでいるとされる。また、自然界では複数のランタノイドが共存するにもかかわらず、これまで La のみを用いた培養によって精製された La-XoxF の酵素科学的諸性質のみが中心に解析され、報告されてきた。申請者は、これら *Methylobacterium* 属細菌が自然界において共存するランタノイド種の中から特定のランタノイドを選抜できるのかというランタノイド特異性・選択性、さらには異なるランタノイドを補因子とした XoxF の酵素科学的諸性質や構造安定性について明らかにすることにした。その結果、AM1 株は 15 種のランタノイドのうち、La から Nd までの 4 種のランタノイドのみを利用し、メタノール生育ができることが明らかとなり、La で最も良いメタノール生育を示す一方で、Nd で最も低いメタノール生育を示すことを明らかにした。

xoxF1 にコードされる XoxF は 4 種のレアアースを補因子とすることで MDH 活性を発現することを示した。また、AM1 株は生育環境中のレアアース原子を選択的に利用することができ、La と Nd が共存する場合、AM1 株は La を識別することで、それを優先的にメタノール生育に利用することが明らかとなった。また、そのレアアース選択性は XoxF の補因子の選択性に依存することが分かった。

次に La-XoxF と Nd-XoxF の酵素科学的諸性質を示したところ、両酵素は同様のメタノールに対する K_m をもち、基質特異性は全く変わらないものの、 V_{max} は La-XoxF の方が大きい値を示した。つまり XoxF は補因子のレアアースにより酵素の性質が異なることが明らかとなった。さらには、La-XoxF と Nd-XoxF の熱安定性を観察したところ、La-XoxF の方は Nd-XoxF よりも高い熱安定性を保持していた。La-XoxF と Nd-XoxF では、ゼータ電位は変化しないものの、サーマルシフトアッセイでは異なる 2 つの T_i 値が観察された。一つ目の T_i 値はサブユニットの解離を示しており、La-XoxF と Nd-XoxF では同一の値を取った。一方、二つ目の T_i 値はサブユニットの変性を意味し、La-XoxF の方が Nd-XoxF よりも高い値をとった。つまり、La-XoxF と Nd-XoxF は保持するレアアースの種類により異なる立体構造を持ち、それによりサブユニットの変性が起こることが推測された。

第 2 章では、メチロトロフ細菌のみならず、もう一つの植物共生細菌である根粒菌に焦点を絞り、その XoxF の機能とその構造的特徴を明らかとした。これまで *Bradyrhizobium* 属や *Rhizobium* 属などの根粒菌にも *xoxF* 遺伝子は広く分布することが知られているものの、根粒菌由来 XoxF に関する知見は非常に少なく、その酵素科学的諸性質などはほとんど明らかとなっていない。そこで *B. diazoefficiens* USDA110 株を用いてそのメタノール/ランタノイド生育と XoxF の酵素学的特性を明らかにすることにした。USDA110 株は Ca では全くメタノール生育を示さないものの、AM1 株と同様に La から Nd のレアアース依存的にメタノールを利用でき、その細胞は十分な MDH 活性をもっていた。さらに、USDA110 株は La で最も良好なメタノール生育を示し、Nd によるメタノール生育は非常に弱いものであった。

そこで、メタノール/Ce に生育した USDA110 株から MDH を精製し、その酵素科学的諸性質を明らかにした。MDH は *blr6213* にコードされており、XoxF5 タイプの MDH

に属することが分かった。また精製 XoxF は酵素サブユニットあたり 0.58 個の Ce 原子を含んでおり、本酵素の最適温度は 35°C、至適 pH は 9.0、 V_{max} は 12.9 U/mg、メタノールに対する K_m は 0.067 mM であった。

また、本酵素の溶液中の立体構造を示すため、小角 X 線散乱 (SAXS) 解析を行ったところ、XoxF の回転半径 (R_g) と最大粒子寸法 (D_{max}) はそれぞれ 32.3Å と 96.8Å であり、XoxF が溶液中においてダイマー構造を保持していることが示唆された。

このように、申請者は *M. extorquens* AM1 株と *B. diazoefficiens* USDA110 株を用いて両株のレアアース依存的メタノール代謝の鍵酵素 XoxF の酵素科学的諸性質およびその構造的特性について詳細に解析した結果、両株ともランタノイドを選択・選別し、そのランタノイドを XoxF の活性発現に利用することで、植物葉上もしくは根圏でのメタノール代謝に活用していることを明らかにした。つまり植物共生細菌群は植物 VOC であるメタノールを積極的に活用するため、ランタノイドのうちで最も MDH 活性発現に有利な La を補因子として利用できるように XoxF を分子進化させてきたものと結論づけた。

審査結果の要旨

申請者 王 倫 (WANG LUN) は、植物共生細菌の宿主との共生関係のメカニズムの解明に関する研究を行い、植物葉上に生息するメタノール資化性細菌と根圏に共生する根粒菌に着目し、両細菌のランタノイド依存型メタノール生育、およびランタノイド依存型メタノール脱水素酵素 XoxF の酵素科学的諸性質およびその構造特性を明らかにした。

メタノール資化性細菌では、*Methylorubrum extorquens* AM1 株を用い、AM1 株のメタノール生育におけるランタノイド特異性・選択性、さらには異なるランタノイドを補因子とした XoxF の酵素科学的諸性質や構造安定性について明らかにした。AM1 株は 15 種のランタノイドのうち、La から Nd までの 4 種のランタノイドのみを利用し、ランタノイドが混在する際には、La を優先的に利用してメタノール生育を示すことを明らかとした。また、*xoxF1* にコードされる XoxF は 4 種のランタノイドを補因子とすることで MDH 活性を発現することを示した。XoxF は生育環境中のランタノイド原子を選択的に利用することができ、La と Nd が共存する場合、XoxF は La を識別することで、それを優先的に補因子として利用することを示し、その補因子の種類が XoxF の酵素科学的諸性質を変化させることを明らかにした。さらには、La-XoxF と Nd-XoxF の熱安定性の違いを示し、La-XoxF と Nd-XoxF は保持するランタノイドの種類により異なる立体構造を持ち、それによりサブユニットの変性が起こることを明らかにした。

一方、根粒菌である *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 株を用いた研究では、本株のメタノール/ランタノイド生育と XoxF の酵素学的特性を明らかにした。USDA110 株は La から Nd のランタノイドに依存的なメタノール生育を示すことを証明し、その細胞が十分な MDH 活性をもつことを明らかとした。さらにメタノール/Ce に生育した

USDA110 株から MDH を精製し、MDH は blr6213 にコードされており、XoxF5 タイプの MDH に属することおよびその酵素科学的諸性質を詳細に示した。また、本酵素の溶液中の立体構造を小角 X 線散乱 (SAXS) にて解析し、本酵素がダイマー構造を保持していることを示した。

これらの知見は、葉上および根圏に生息する植物共生細菌はともにランタノイドに依存して生育する能力を持つことを示しており、植物共生メカニズムにおいて両共生細菌のメタノール代謝が重要な役割を果たしている証拠を示したものと考えられる。これら知見は、今後、植物と細菌の共生関係の解明や植物生育促進技術に応用できるものと考えられる。

【基礎となる発表論文】

- 1) Wang, L., S. Suganuma, A. Hibino, R. Mitsui, A. Tani, T. Matsumoto, A. Ebihara, N.A. Fitriyanto, A. Pertiwinigrum, M. Shimada, T. Hayakawa, T. Nakagawa.: Lanthanide-dependent methanol dehydrogenase from the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium diazoefficiens* strain USDA110. *Enzyme and Microbial Technology*, 130, 109371. 2019.
- 2) Wang, L, A. Hibino, S. Suganuma, A. Ebihara, S. Iwamoto, R. Mitsui, A. Tani, M. Shimada, T. Hayakawa, T. Nakagawa: Preference for particular lanthanide species and thermal stability of XoxFs in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *Enzyme and Microbial Technology*, (in press).