



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on Physiological and Functional Roles of Lanthanides in Genus Bradyrhizobium

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2021-06-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Viagian Pastawan メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79663

要 約	
氏 名 Name	Viagian Pastawan
題 目 Title of Dissertation	Studies on Physiological and Functional Roles of Lanthanides in Genus <i>Bradyrhizobium</i> (<i>Bradyrhizobium</i> 属細菌における希土類元素の生理学的 および機能的役割に関する研究)
希土類元素は自然界に広く分布し、私たち生物が常に接触している元素である。しかし、これまで希土類元素が関与する生物機能に関して、ほとんど報告がなかった。そのような中、近年、植物共生細菌であるメチロバクテリウム属細菌がそのメタノール代謝の初段会酵素メタノール脱水素酵素（MDH）が、希土類元素を補酵素として要求することが明らかとなり、その希土類依存型 MDH は <i>xoxF</i> にコードされる新規な MDH である XoxF であることが証明されてきた。 一方、ゲノム解析が進む中、様々な細菌群が <i>xoxF</i> のオーソログ遺伝子を持つことが明らかとなってきた。特に、根粒菌である <i>Bradyrhizobium</i> 属は <i>xoxF</i> のオーソログ遺伝子を持つのみならず、私たちのグループではすでに <i>Bradyrhizobium</i> 属細菌の <i>xoxF</i> のオーソログ遺伝子が MDH 活性を持つことを示し、その酵素化学的諸性質さらにはその立体構造を明らかにしてきた。 また、<i>Bradyrhizobium</i> 属細菌はメタノール代謝以外にも希土類元素により菌体外多糖類（EPS）を生産するなど、希土類元素に対するいくつかの生物機能が明らかとなっている。 しかし、XoxF の希土類依存型 MDH としての機能はある程度示してきたものの、<i>Bradyrhizobium</i> 属のメタノール代謝の全体像、さらには希土類元素の取り込みの仕組みおよび希土類元素に対する細胞応答、希土類元素 EPS の生産メカニズムなど、その希土類元素に対する生物機能の分子メカニズムはほとんど明らかになっていないのが現状である。 そこで、本論文では <i>Bradyrhizobium</i> 属細菌の様々な細胞機能に対する希土類元素の生理的・機能的役割に焦点を絞り、その希土類元素依存型メタノール代謝制御と希土類元素依存的 EPS 生産機構について解析した。	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ce-3 株における希土類依存型メタノール代謝系の解析	
まず、<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ce-3 株の希土類依存型メタノール生育について観察することにした。Ce-3 株は Ca^{2+} や Sm^{3+} ではメタノール生育を示さないものの、軽希土類元素（La^{3+}、Ce^{3+}、Pr^{3+}、Nd^{3+}）の場合は十分なメタノール生育を示すことを見出した。また、Ce-3 株はメタノールで生育した場合、コハク酸生育細胞よりも軽希土類元素を細胞内に取り込んだ。 次に、<i>xox</i> 遺伝子クラスターを同定するため、<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ce-3 株のドラフトゲノム配列の解読を試みた。Ce-3 株のドラフトゲノム配列は、27 個のコンティグ（> 500 bp : N_{50} 値 = 762,330 bp）、GC 含量 65.07%、全長 7,587,981 bp であった。このドラフトゲノム情報を用いて <i>xox</i> 遺伝子クラスターの同定を試みたところ、<i>xox</i> 遺伝子クラスターは <i>xoxF</i> 以外に、XoxF の基質 chytocrome <i>c</i> をコードする <i>xoxG</i>、メタノール酸化経路の酵素 S-ホルミル-GSH 合成酵素をコードする <i>gfaA</i>、グルタチオン依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素をコードする <i>fldA</i> を含んでおり、ギ酸脱水素酵素をコードする遺伝子を除くすべてのメタノール酸化経路の酵素群をコードする遺伝子から構成されていた。また、これまで報告されているすべての	

Bradyrhizobium 属細菌のゲノム上には、*xox* 遺伝子クラスターがコードされていた。

さらには、これら希土類元素依存型メタノール酸化経路の遺伝子発現を観察したところ、これら遺伝子群および酵素活性はメタノールおよび希土類元素によって誘導されることが明らかとなった。これら結果から、希土類元素依存型メタノール酸化経路は *Bradyrhizobium* 属細菌に広く分布し、これら菌株はメタノールおよび希土類元素に応答して希土類元素依存型メタノール酸化経路を誘導していることが明らかとなった。

***Bradyrhizobium* 属細菌における希土類依存型 EPS 生産系の解析**

これまで私たちのグループでは、*Bradyrhizobium* Ce-3 株が希土類元素依存的に EPS を生産することを報告しており、その多糖はラムナンであることが知られている。そこで、Ce-3 株のドラフトゲノム配列からラムナン生産に関与するであろう *rml* 遺伝子クラスターを同定した。*rml* 遺伝子クラスターは *rmlC*、*rmlD*、*ugdA*、*gtfA* 遺伝子からなり、一般的なラムナン合成系遺伝子クラスターから構成されていた。ただ、*rml* 遺伝子クラスターの遺伝子群は軽希土類元素依存的にその発現を上昇させず、その機能解析には至らなかった。

一方、*B. diazoefficiens* USDA110 株では希土類元素依存的 EPS 生産は報告されていなかったことから、まず、USDA110 株の希土類元素依存的 EPS 生産を観察した。その結果、USDA110 株もまた希土類元素依存的に EPS 生産を生産した。また、USDA110 株は希土類元素依存的に 2 つのタイプの EPS を生産した。そこで、USDA110 株に変異処理を施し、軽希土類元素依存的な EPS 生産を欠落した変異株 Npe1 株、Npe2 株、Npe3 株を取得し、Npe1 株のもつ変異点を解析することで、USDA110 株の軽希土類元素依存的な EPS 生産に関与する遺伝子の同定を試みた。その結果、Npe1 株はゲノム上に 104 カ所の SNP が存在し、特に多糖合成型糖転移酵素をコードする *blr4974* 遺伝子上に 2 カ所のミスセンス変異 (Ser484Asn と Gly491Asp) が見られた。本ミスセンス変異が EPS 生産に対する重大な変異であるかどうかの証明を行うことはできなかったが、USDA110 株の軽希土類元素依存的な EPS 生産のメカニズムを証明する一つの大きな手がかりを得たものと考えている。

結 論

本論文では、根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. Ce-3 株と *B. diazoefficiens* USDA110 株を用いて、根粒菌における軽希土類元素に依存的な細胞機能 (1) 希土類元素依存型メタノール代謝と (2) 希土類依存的 EPS 生産系の分子メカニズムの証明を試みた。その結果、Ce-3 株において *xox* 遺伝子クラスターを同定し、その遺伝子クラスターが根粒菌に広く普遍的に分布していることを明らかとした。つまり、軽希土類元素依存的メタノール代謝は、メチロトロフ細菌群とは異なり、メタノール酸化経路のみで成り立っていることが初めて証明された。よって、メチロトロフ細菌群と根粒菌は、同じ軽希土類元素依存型 MDH である XoxF を持ち合わせているものの、その役割は「メタノール資化」と「エネルギー (NADH) 生産系」と全く異なるものであることが推測された。

また、根粒菌は植物の根において根粒を形成する際、多糖を生産することが知られている。つまり、根粒菌の軽希土類元素に依存的に生産される EPS もまた根粒形成など特定の機能を持つことが推測される。

このように本研究では、植物根圏における根粒菌の細胞機能を軽希土類元素が活性化している可能性を示し、根粒菌は植物共生におけるステージにおいて希土類元素を積極的に活用しているものと結論づけた。