

氏 名 (本 国 籍)	Viagian Pastawan (インドネシア共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第744号
学 位 授 与 年 月 日	令和2年9月18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	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)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 鈴木 徹 副査 岐阜大学 教授 中 川 智 行 副査 静岡大学 教授 小 川 直 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

「希土類元素」は、自然界に広く分布する金属元素の一種であり、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おり、産業のビタミンと言われている。

近年、植物の葉面や根圏に棲息するメチロトロフ細菌が希土類元素依存的なメタノール代謝系をもつことが報告された。また、希土類元素は本細菌のメタノール代謝における初段階酵素メタノール脱水素酵素 (MDH) の補因子であることが証明され、自然界において希土類元素がこれらメチロトロフ細菌において広く利用されていることが注目されている。

一方、植物共生細菌である根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. Ce-3 株と *B. diazoefficiens* USDA110 株もまた希土類元素依存的 MDH を持つことが報告されている。さらに、Ce-3 株では、希土類元素依存的に菌体外多糖 (EPS) を生産することも知られている。このようにメチロトロフ細菌のみならず、根粒菌まで希土類元素を利用した様々な代謝系が存在し、自然界に広く希土類元素を利用した生物機能が分布することがわかってきた。

しかし、根粒菌の希土類元素に対するメタノール代謝、細胞への希土類元素の取り込み、応答メカニズム、さらには EPS 生産の仕組みなど、根粒菌ではほとんど明らかにされていないのが現状であり、その詳細は明らかでない。

申請者は、本研究課題において根粒菌 *Bradyrhizobium* 属細菌のメタノール代謝と EPS 生産系に焦点を絞り、その分子機構を詳細に解析した。

まず、根粒菌 *Bradyrhizobium* 属細菌のメタノール代謝の分子メカニズムの解析では Ce-3 株のメタノール生育における希土類元素の要求性を明らかにした。Ce-3 株は軽希土類元素 (La、Ce、Pr、Nd) をメタノール生育に要求し、これら元素を細胞内に取り込む機構を持ち合わせていることが明らかとなった。また、それら取り込み機構は、メタノールと希土類で誘導されることから、メチロトロフ細菌で報告されている LutH と同様のトランスポーターが機能しているのではと推測した。

また、Ce-3 株は軽希土類元素依存的なメタノール代謝経路を同定するために、Ce-3 株のドラフトゲノム配列の決定を行った。Ce-3 株のドラフトゲノムは 27 コンティグ contigs (> 500 bp) からなり、65.07% の GC 含量の 7,587,981 bp であった。本ドラフトゲノム上の希土類元素依存的 MDH をコードする *xoxF* 遺伝子を同定したところ、本遺伝子は *xoxF* 以外に、XoxF の基質 chytochrome *c* をコードする *xoxG*、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 *gfaA*、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 *fldA* を含む *xox* 遺伝子クラスターを形成していた。そこで、これら遺伝子と酵素の発現誘導を観察したところ、これら遺伝子群とコードされる酵素群はメタノールと希土類元素によって誘導されることが明らかとなった。このように、申請者は、これまでほとんど明らかとされていなかった Ce-3 株のメタノール代謝に関与する因子をゲノム上で同定し、その誘導発現を示すことで、根粒菌の持つ希土類元素によるメタノール代謝経路の詳細を示した点で評価できるものと考えている。

次に、根粒菌で示されている希土類元素依存的 EPS 生産の分子メカニズムの解析を行っている。Ce-3 株では、すでに軽希土類元素依存的に多糖ラムナンを生産することが報告されている。申請者は、この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。ただ *rml* 遺伝子群は軽希土類元素依存的に発現を上昇させず、その機能解析には至らなかったものの、Ce-3 株におけるラムナン生産の手掛かりを示すことができた。

このように、申請者は根粒菌 *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の分子メカニズムの証明を試みた結果、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明らかとなった。つまり、メチロトロフ細菌群と根粒菌は、同じ軽希土類元素依存的 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、申請者の研究は、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。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者 ビアギアン パスタワン (Viagian Pastawan) は、根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. Ce-3 株を用いて、根粒菌ではほとんど明らかにされていない軽希土類元素に依存的な細胞機能の分子メカニズム、特に希土類依存的メタノール代謝系、さらには希土類依存的多糖類の生産系の解明を試みた。

まず、申請者は、両表現系の解析の前に、Ce-3 株のドラフトゲノム情報を示した。そのゲノム情報から、メタノール代謝に関与する *xox* 遺伝子クラスターを同定し、その遺伝子クラスターはメタノール酸化経路の酵素群をコードしていることを示した。これら遺伝子と酵素の発現誘導を観察したところ、これら遺伝子群とコードされる酵素群はメタノールと希土類元素の共存在によって誘導されることが明らかとなった。

一方、Ce-3 株では、すでに軽希土類元素依存的に多糖ラムナンを生産することが報告されているが、その希土類元素依存的な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* 遺伝子群は軽希土類元素依存的により発現が上昇しなかったものの、Ce-3 株の軽希土類元素依存的な EPS 生産のメカニズムを明らかにするための一つの大きな手がかりを得たものと考えている。

このように、申請者の研究は、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証拠を示し、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可能性を示した。

【基礎となる発表論文】

1) Pastawan V, Suganuma S, Mizuno K, Wang L, Tani A, Mitsui R, Nakamura K, Shimada M, Hayakawa T, Fitriyanto NA, and Nakagawa T. Regulation of lanthanide-dependent methanol oxidation pathway in the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain Ce-3. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020. in press.

2) Pastawan V, Fitriyanto NA, and Nakagawa T. Biological function of lanthanide in plant-symbiotic bacteria: lanthanide-dependent methanol oxidation system. Reviews in Agricultural Science, 2020. in press.