

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03949

研究課題名(和文) C1微生物のレアアース依存型細胞機能を活用した新奇な作物生育促進技術の開発

研究課題名(英文) Analysis of the cell functions depending on rare earth elements in the C1 microorganisms and its application to plant growth promoting system

研究代表者

中川 智行 (Nakagawa, Tomoyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70318179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、植物共生細菌であるメチロトロフ細菌と根粒菌のREEによる細胞機能の活性化機構の解明とREEを介した植物成長促進作用の解明を目指した。まず、メチロトロフ細菌と根粒菌のもつREE依存型メタノール代謝の制御機構について、初段階酵素メタノール脱水素酵素の構造的特徴を示し、その発現制御機構、さらには細胞増殖の活性化機構を中心に証明した。また、根粒菌においてはMDHの構造とREEの細胞内取り込み機構の詳細を示すことができた。

また、REE依存型メチロトロフ細菌によるシロイヌナズナの成長促進作用を見出し、特に根の成長を促す能力をもつことを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、私たちが見出したREEを生命活動に利用する最初の事例であるREE依存型メタノール代謝系の生態系における機能と役割を解明するのみならず、その細胞機能を作物生育促進に活用するものである。REE依存型メタノール生育をする微生物は自然界に広く分布することが推測されており、その生態系での役割を知る以上にその細胞機能の新たな活用は大きな学術的・社会的意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to elucidate the mechanism of activation of cell functions and plant growth promoting functions by REE of phytosymbiotic bacteria, such as methylophilic bacteria and rhizobia. First, regarding the control mechanism of REE-dependent methanol metabolism of methylophilic bacteria and rhizobia, the structural characteristics of methanol dehydrogenase (MDH) was shown, and regulation mechanism of its expression and activation mechanism of cell proliferation are mainly demonstrated. In addition, it could be to show the details of the structure of MDH from rhizobia and the uptake mechanism of REE into the cell. In addition, we found the growth-promoting function of Arabidopsis thaliana by REE-dependent methylophilic bacteria, and were able to show that it has the ability to promote root growth in particular.

研究分野：応用微生物学

キーワード：レアアース メチロトロフ 根粒菌 植物成長促進技術

1. 研究開始当初の背景

農業生産は自然界の物質循環サイクル内で成立する産業であることから、生産環境での不適切な資材の利用や杜撰な生産管理は、過剰な環境負荷や二次的自然環境の劣化を招くことになる(参考文献 1)。つまり自然環境と調和のとれた持続可能な次世代の低環境負荷型農業生産系を構築するには、減肥料や減農薬環境下でも高収率が達成できる新たな作物生産技術の開発が必要不可欠である。

そのような中、低環境負荷型農業生産系の構築に向けて微生物の持つ植物生育促進能力を活用する技術が注視されている(参考文献 2, 3)。特に植物の主要共生微生物である C_1 微生物(メタノールを唯一の炭素源として生育可能な微生物群)は植物が葉や根圏で蒸散するメタノールを増殖に利用するかわりに、植物ホルモン様物質や抗酸化物質 PQQ などの植物生育促進因子を供給することで宿主の生育を促進していることが近年、明らかとなってきた(参考文献 4, 5)。

一方、申請者らは、これまで報告例が全くなかった「希少金属種レアアース(REE)を生育に要求する微生物群」を新たに見だし、それらが C_1 微生物(REE- C_1 微生物)であることを示してきた。REE- C_1 微生物は新奇な REE 依存型メタノール代謝系を持ち、ほとんどの根粒菌までもが REE- C_1 微生物に属していたことから、REE- C_1 微生物が自然環境、特に植物共生環境において普遍的に分布することを提唱してきた。

また、過剰の REE は作物の生育を阻害するが、適正な REE 施用は作物の成長を促進することが近年報告されたことから(参考文献 2)、申請者は REE による C_1 微生物の細胞機能の活性化に起因する未知の植物-REE- C_1 微生物間の共生環境生態系「REE エコシステム」が存在すると推測しており、REE- C_1 微生物の植物プロバイオティクス(植物生育促進微生物)としての機能を活用した新奇な作物生育促進技術の開発の可能性を強く確信している。

しかし、1) 作物共生環境での REE- C_1 微生物の生態、2) REE- C_1 微生物の植物共生の分子機構とその役割、3) REE- C_1 微生物の植物生育促進機構、4) REE- C_1 微生物共生に対する作物の応答など、農業生産への応用に向けての基盤的知見は皆無に等しい状態であった。

これら背景から、本研究課題ではシロイヌナズナの生育促進能を持つ REE- C_1 微生物のスクリーニングとその植物共生および植物生育促進の分子機構を解明し、その機能を実践的に活用した「REE- C_1 微生物による作物生育促進技術の開発」の可能性を探ることにした。

2. 研究の目的

本研究課題では、主要植物共生微生物「 C_1 微生物」および「根粒菌」の「レアアース(REE)による細胞機能の活性化」と「植物プロバイオティクスとしての能力」に着目し、その細胞機能の解明を目的とした。

さらには REE- C_1 微生物の細胞機能に着目し、REE 依存的に植物の生育促進能をもつ新奇な菌株のスクリーニングとその細胞機能を分子レベルで理解することを目指した。最終的にはこれら REE- C_1 微生物の細胞機能を最大限に活用した作物生育促進技術の開発の基盤構築を最終ゴールとした。

3. 研究の方法

a. REE 依存型メタノール脱水素酵素(XoxF)の解析

XoxF の解析は *Methylorubrum extorquens* AM1 株および *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 株をメタノール/REE 培地にて培養した。得られた菌体を用いて Wang らの方法を用いて XoxF を精製した(発表論文: Wang et al., 2020. *Enzyme Microb Technol*)。

X 線小角散乱法(SAXS)は Rigaku BioSAXS-1000 system (Rigaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) Differential scanning fluorimetry(DSF)解析は StepOnePlus™ Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ゼータポテンシャルは Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) Thermal shift 解析は Tycho NT.6 (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) を用いて解析した。

b. REE- C_1 微生物の REE の細胞内取り込み

REE の定量は Agilent 7500cx ICP-MS system(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。

c. REE- C_1 微生物の REE による細胞増殖の促進作用

REE-C₁ 微生物の REE による細胞増殖の促進作用の観察は日比らの方法を用いて観察した (参考文献 7)。

d. REE-C₁ 微生物によるシロイヌナズナの成長促進作用

REE-C₁ 微生物はメタノール/La 培地に生育できる菌株を選抜し、獲得した。菌株の同定は 16S rRNA 配列にて行った。

シロイヌナズナの成長促進は、培養した REE-C₁ 微生物を集菌し、様々な濃度の菌液を作成し、そこにシロイヌナズナの種子を浸し、乾燥後、シロイヌナズナをムラシゲスクーフ寒天培地にて生育させて成長を比較した。

4 . 研究成果

a. REE-C₁ 微生物の REE 依存型メタノール脱水素酵素 (XoxF) の構造と機能

M. extorquens AM1 株の XoxF1 の酵素化学的構造について解析を行った。XoxF1 は活性中心に REE をもつが、その REE の特異性は Nd よりもより原子番号が小さい La の方を優先的に利用することが明らかとなった。また、補因子の REE によりその構造的安定性が異なり、La を活性中心にもつ XoxF1 は Nd の場合よりも熱安定性が高い、つまり構造的により安定であることが明らかとなった (発表論文 : Wang *et al.*, 2020. *Enzyme Microb Technol*)。

一方、根粒菌 *B. diazoefficiens* USDA110 の XoxF に関してその立体構造を X 線小角散乱法 (SAXS) にて解析した。USDA110 株由来の XoxF はホモ 2 量体の構造であることを示すことができた (発表論文 : Wang *et al.*, 2019. *Enzyme Microb. Technol.*)。また、*Bradyrhizobium* sp. Ce-3 株の XoxF をコードする遺伝子の同定を行い、その *xox* オペロンの構造を示すことができた (発表論文 : Pastawan *et al.*, 2020. *J. Biosci. Bioeng.*)。

b. REE-C₁ 微生物の REE の細胞内取り込み機構

根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. Ce-3 株の細胞への REE 取り込みについて解析を行った。Ce-3 株は La、Ce、Pr、Nd を細胞内に取り込むことができ、その取り込みはメタノール/REE の両方が揃ったときに誘導されることが明らかとなった。また、その誘導は Ce で最も誘導されることが明らかとなった (発表論文 : Pastawan *et al.*, 2020. *J. Biosci. Bioeng.*, Pastawan *et al.*, 2020. *Rev. Agric. Sci.*)。

c. REE-C₁ 微生物の REE による細胞増殖の促進作用

REE 依存的にそのコロニー径が増大する菌株を見いだした。本株は REE 特異的に貧栄養培地上にてコロニーを大きくさせたことから、その細胞応答について観察をした。本株は、Sm にてコロニー径を大きくさせ、その仕組みは細胞の形態の変化ではなく、細胞数の増大に起因することを示した。本現象は富栄養培地では観察されないことから、Sm が貧栄養状態では REE-C₁ 微生物の細胞増殖を促進させることを明らかとした。

d. REE-C₁ 微生物によるシロイヌナズナの成長促進作用

自然界から、REE 依存的メタノール生育を示す菌株をスクリーニングし、それらの中でシロイヌナズナの成長を著しく促進させる菌株を選抜した。その結果、シロイヌナズナの生育を大きく促進する 2 株を獲得することができた。

両株はシロイヌナズナに植菌することで特に根組織の成長を著しく促進することを見出した。また、これら株のメタノール代謝について観察したところ、両株とも REE 依存的メタノール代謝経路を保持し、La など L-REE を XoxF の補因子として要求することが明らかとなった。

参考文献

- 1) Crowder *et al.* 2010. *Nature* 466: 109-112.
- 2) Souza *et al.* 2015. *Genet Mol Biol.* 38: 401-419.
- 3) Ma *et al.* 2016. *Front. Plant Sci.* 7:918.
- 4) Kwak *et al.* 2014. *PLoS One* 9: e106704.
- 5) Tani *et al.* 2015. *PLoS One* 10: e0129509.
- 6) Liu *et al.* 2013. *Plant Soil Environ.* 59:196-200.
- 7) 日比ら. 2011. 環境技術. 40: 108-114.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Wang Lun, Suganuma Soya, Hibino Ayumi, Mitsui Ryoji, Tani Akio, Matsumoto Takashi, Ebihara Akio, Fitriyanto Nanung Agus, Pertiwinigrum Ambar, Shimada Masaya, Hayakawa Takashi, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 130
2. 論文標題 Lanthanide-dependent methanol dehydrogenase from the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> strain USDA110	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109371 ~ 109371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2019.109371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wang Lun, Hibino Ayumi, Suganuma Souya, Ebihara Akio, Iwamoto Satoshi, Mitsui Ryoji, Tani Akio, Shimada Masaya, Hayakawa Takashi, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 136
2. 論文標題 Preference for particular lanthanide species and thermal stability of XoxFs in <i>Methylobacterium extorquens</i> strain AM1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109518 ~ 109518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2020.109518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Sachiko, Suzuki Yutaka, Fujitani Yoshiko, Mitsui Ryoji, Nakagawa Tomoyuki, Shintani Masaki, Tani Akio	4. 巻 3
2. 論文標題 Lanthanide-Dependent Regulation of Methylophony in <i>Methylobacterium aquaticum</i> Strain 22A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00462-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00462-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Pastawan Viagian, Suganuma Soya, Mizuno Kosuke, Wang Lun, Tani Akio, Mitsui Ryoji, Nakamura Kohei, Shimada Masaya, Hayakawa Takashi, Fitriyanto Nanung Agus, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 130
2. 論文標題 Regulation of lanthanide-dependent methanol oxidation pathway in the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium <i>Bradyrhizobium</i> sp. strain Ce-3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 582 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Lun, Hibino Ayumi, Suganuma Souya, Ebihara Akio, Iwamoto Satoshi, Mitsui Ryoji, Tani Akio, Shimada Masaya, Hayakawa Takashi, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 136
2. 論文標題 Preference for particular lanthanide species and thermal stability of XoxFs in Methylobacterium extorquens strain AM1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109518 ~ 109518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2020.109518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Pastawan Viagian, Agus Fitriyanto Nanung, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Biological Function of Lanthanide in Plant-Symbiotic Bacteria: Lanthanide-Dependent Methanol Oxidation System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reviews in Agricultural Science	6. 最初と最後の頁 186 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7831/ras.8.0_186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yanpirat Patcha, Nakatsuji Yukari, Hiraga Shota, Fujitani Yoshiko, Izumi Terumi, Masuda Sachiko, Mitsui Ryoji, Nakagawa Tomoyuki, Tani Akio	4. 巻 8
2. 論文標題 Lanthanide-Dependent Methanol and Formaldehyde Oxidation in Methylobacterium aquaticum Strain 22A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 822 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8060822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tani Akio, Mitsui Ryoji, Nakagawa Tomoyuki	4. 巻 650
2. 論文標題 Discovery of lanthanide-dependent methylotrophy and screening methods for lanthanide-dependent methylotrophs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2021.01.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野洸介, 原田雄斗, 岩本悟志, 島田昌也, 早川享志, 中川智行.
2. 発表標題 ランタノイドSmはMethylorubrum属細菌の低栄養環境下での生育を促進させる.
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang Lun, 繁原安美, 阪口由佳, 谷明生, 中野浩平, 島田昌也, 早川享志, 中川智行.
2. 発表標題 ハウレンソウのポストハーベストにおける菌叢変遷と鮮度劣化へのPPFMsの関与.
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川智行
2. 発表標題 植物共生細菌によるレアアース元素の利用 新奇なレアアース依存型メタノール代謝系
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 将文 (Shimizu Masafumi) (60378320)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------