

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580075

研究課題名（和文）メチロトロフの増殖に希土類元素は必須か？

研究課題名（英文）Are rare earth elements essential for growth of methylotrophs？

研究代表者

河合 啓一（KAWAI KEIICHI）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00002064

研究成果の概要（和文）：

メチロトロフ細菌 *Methylobacterium* sp. MAFF211642 のメタノール脱水素酵素（MDH）がメタノール含有培地に 30 $\mu$ M La を添加すると MDH 活性が著しく上昇することを見出し、La により MDH が誘導されることを認めた。この La 添加による MDH 活性の誘導は *Methylobacterium* 属細菌に普遍的に認められた。また、メタノール酸化能力を有していることが指摘されている *Bradyrhizobium* 属細菌である *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645 の MDH が Ce により誘導されることを認めた。La や Ce はメチロトロフ細菌の MDH を誘導することを明らかにした。La 及び Ce により誘導された両 MDH の分子構造はともにホモ二量体で、従前より研究されてきた *Methylobacterium* 属細菌の MDH の構造（ヘテロ四量体）と異なっていた。さらに *Methylobacterium* 属細菌の La 誘導 MDH が *xoxF* 遺伝子の発現産物であること、*Bradyrhizobium* sp. MAFF211645 の MDH が *xoxF* 遺伝子と同義語である *mxoF* 遺伝子産物であることを実証し、*mxoF* 遺伝子産物である Ca 依存性 MDH と異なった遺伝子によりコードされていることを明らかにした。La 誘導 MDH に関するこれらの知見は生理生化学的、分子生物学的にもっとも研究が進んでいる *M. extorquens* AM1 株においても認められ、La や Ce が細菌の休眠遺伝子を覚醒させる作用があることを指摘した。

研究成果の概要（英文）：

Methanol dehydrogenase (MDH) of *Methylobacterium* sp. MAFF211642, a methylotrophic bacterium, was remarkably increased by addition of La to methanol medium, indicating that the MDH was induced by La. Induction of MDH by La was observed in *Methylobacterium* spp. MDH of *Bradyrhizobium* sp. MAFF 211645 was also induced by Ce. Thus, La or Ce can induce MDH in methylotrophic bacteria. Furthermore, molecular structure of both MDHs was homodimer that was different to the heterotetrameric structure of Ca-dependent MDH in *Methylobacterium* spp. In addition La-induced MDH in *Methylobacterium* spp. and Ce-induced MDH in *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645 were found to be encoded by *xoxF* and *mxoF*, respectively. These phenomena were also observed in well-studied *M. extorquens* AM1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：希土類元素，メチロトロフ，メタノール脱水素酵素，*Methylobacterium*，*Bradyrhizobium*，*xoxF*，*mxoF*，ランタン，セリウム

#### 1. 研究開始当初の背景

希土類元素は発光体や磁性体として、情報通信機器、家電製品などのほか、MRI や手術用レーザーなど広く用いられており、今日の工業化社会や高度医療を支えている重要な元素群である。希土類元素の生体影響に関する研究はほとんど行われていない。そこで、希土類元素の生体影響を明らかにする一端として、環境変化に敏感に反応する微生物と希土類元素との関わりに関する研究を進めてきた。その結果、希土類元素存在下で特異な増殖を示す微生物を分離することができた。分離微生物の中で、Eu 存在下でコロニー径が大きくなる *Methylobacterium* 属細菌及び Ce 存在下でコロニー周囲に粘性物質を著量生産する *Bradyrhizobium* 属細菌を分離することができた。これらの細菌が分離されたことは希土類元素が微生物の生理機能に重要な影響を及ぼしていることを示しており、極めて興味深い。

#### 2. 研究の目的

*Methylobacterium* 及び *Bradyrhizobium* の両属の細菌の生理機能に及ぼす希土類元素の影響を明らかにするとともに、希土類元素が関与している代謝系の特定とその代謝系の酵素に対する希土類元素の影響などについて研究を進める。さらに、酵素の特性と当該酵素をコードしている遺伝子を決定する。さらに、*M. extorquens* AM1 株に対する希土類元素の影響についても解析を進める。

#### 3. 研究の方法

分離菌株は菌学的特徴及び 16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析により同定した。粘性物質の構造は各種分析機器を使用して決定した。菌株の培養は 30  $\mu$ M La(Ce) 及び 0.5%メタノール含有 1/10 希釈肉汁培地に *Methylobacterium* 属と *Bradyrhizobium* 属の細菌を植菌、30°C にて振盪培養した。増殖は 600 nm における吸光度、またはコロニー形成単位にて追跡した。対数増殖期後期に遠心分離にて集菌後、緩衝液にて洗浄し、超音波破碎後の遠心上清を粗酵素液として用いた。MDH 活性は Day-Anthony 法にて測定した。酵素は各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製 MDH の純度検定及び分子量の測定には SDS-PAGE 及びゲルクロマトグラフィーを用いた。酵素タンパク中の La または Ce 含有量は ICP 法にて測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) *Methylobacterium* 属細菌

30  $\mu$ M Eu を添加した 1/100 希釈肉汁平板培地でコロニー径が大きくなる土壌細菌が分離された。本分離菌株は、菌学的特徴及び 16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹解析の結果から、*Methylobacterium* 属と同定された。そこで、0.5%メタノール含有及び非含有平板培地を用いて、増殖に及ぼす希土類元素の影響を精査した。その結果、メタノール非含有平板培地では Sm と Eu が増殖を促進したが、メタノール含有培地では Sm のみが増殖促進効果を示した。その他の希土類元素ではメタノールの有無に関わらずほぼ同様の増殖傾向を示し、増殖にほとんど影響しないか、阻害的に作用した。また、生体関連金属元素も増殖促進効果を示さなかった。Sm による増殖促進効果は液体培養でも観察され、メタノールと Sm 共存下では無添加時に比べ 10 倍ほど生菌数が増加していた。なお、本分離菌株は（独）農業生物資源研究所に寄託、登録番号 MAFF211642 が付与された。以上の結果から、Sm は生体必須金属元素の代替元素として機能しているのではないこと及び本菌株のメタノール代謝に密接に関わっていることが示唆された。

そこで、*Methylobacterium* 属細菌のメタノール代謝の初発酵素である MDH と Sm との関わりを調べた。その結果、Sm 及びメタノール存在下で増殖した菌体の MDH 活性が無添加時に比べ 5.4 倍ほど上昇していることを認めた。この活性の上昇がメタノール含有培地における増殖促進を引き起こしたものと推察した。粗酵素液に Sm を添加しても酵素の活性が上昇しなかったことから、Sm が MDH の転写、翻訳段階で関与していることが窺われた。

次に、MDH の発現に及ぼす希土類元素の影響について検討した。その結果、La や Ce の添加により MDH 活性が著しく上昇することを認めた。しかしながら、La や Ce は増殖促進効果を示さなかったため、La や Ce による MDH 活性の上昇は本菌株の増殖生理には関わっていないものと推察された。La 添加により誘導発現した MDH (La-MDH) を DP-10, Hitrap SP Sepharose HP 及び MonoS 5/50 を用いる一連のカラムクロマトグラフィーにて単一にまで精製し、その分子構造と N-末端アミノ酸配列を決定した。本酵素の分子量がゲル濾過及び SDS-PAGE によりそれぞれ 119 kDa 及び 60 kDa と推定されたため、本酵素はホモ二量体構造と推定され、従前より報告されている Ca 依存

性MDHのヘテロ四量体構造 ( $\alpha_2\beta_2$ ) と異なっていた。本酵素のN-末端アミノ酸配列が、*xoxF* 遺伝子の産物である *XoxF* 遺伝子 (methanol dehydrogenase large subunit-like protein,  $\alpha$  subunit) やPQQ-dependent dehydrogenaseと90%以上の高い相同性を示したことから、La-MDHが*xoxF* 遺伝子にコードされていることを明らかにした。

*Methylobacterium* 属細菌を新たに3菌株入手し、La添加によるMDHの誘導発現及び分子構造について検討した。比較のために、Ca存在下で生成されるMDH(Ca-MDH) についても検討を加えた。3菌株とも、La添加によりMDH活性が数倍上昇したが、Ca添加によっては活性の上昇は観察されなかった。そこで、La-MDH及びCa-MDHをそれぞれ単一にまで精製し、それらの分子構造を調べた。その結果、3菌株ともLa-MDHはホモ二量体であること、またCa-MDHはいずれもヘテロ四量体 ( $\alpha_2\beta_2$ ) であることを明らかにした。さらに、N-末端アミノ酸配列解析から、3菌株ともLa-MDHのsubunitは*xoxF*の遺伝子産物であること、またCa-MDHの $\alpha$  subunit及び $\beta$  subunitはそれぞれ*mxoA*及び*mxoB*遺伝子の産物であることを明らかにした。これらの結果は、Laが*xoxF* 遺伝子の誘導発現を調節していることを示している。さらに、MAFF211642株のLa-MDHのコード遺伝子の全ヌクレオチド配列の中に、Ca依存性MDH遺伝子に高度に保存されているアミノ酸残基が存在していることを指摘した。ICP分析の結果から、La-MDHは酵素1分子当たり1原子のLaを有しており、Caを含有していないことが分かった。

次に、生理生化学的、分子遺伝学的に最も研究の進んでおり、全ゲノムDNA配列が決定されている *Methylobacterium extorquens* AM1 株を用いて希土類元素との関わりについて研究を進めた。メタノール培地に各種希土類元素を添加しても本菌株の増殖は促進されなかったが、Laの添加によりメタノール脱水素酵素(La-MDH)活性が上昇した。Caの添加ではメタノール脱水素酵素(Ca-MDH)活性の上昇は認められなかった。メタノール及びLaあるいはCa存在下で培養した菌体の粗酵素液を出発物質として、La-MDH及びCa-MDHをPD-10, HiTrap SP Sepharose HP及びHPLCを用いるMonoSにて精製した。La-MDH精製標品はSDS-PAGEにて約60 kDaの単一バンドとして検出された。一方、Ca-LDHは約60 kDaと約10 kDaの2本のバンドとして検出された。未変性酵素の分子量はゲル濾過クロマトグラフィーにより、La-MDH及びCa-MDHはそれぞれ120 kDa及び119 kDaと推定された。これらの結果から、La-MDH及びCa-MDHの分子構造はそれぞれホモ二量体及びヘテロ四量体と推定された。さらに、La-MDHの60 kDaサブユニットのN-末端アミノ酸配列は

1-NESVLKGVANPAEQVLQTVTD-20と決定され、*xoxF* 遺伝子産物の想定N-末端アミノ酸配列のシグナルペプチド以後の配列と完全に一致した。この結果はLa添加により *M. extorquens* AM1株の*xoxF* 遺伝子が転写発現したことを示している。一方、Ca-MDHの60 kDaサブユニットのN-末端アミノ酸配列は1-NDKLVELSKSDDNWWLPGKN-20と決定され、AM1株の*mxoA*遺伝子産物のシグナルペプチド領域を除いたアミノ酸配列と95%の一致をみた。この結果は、Ca-MDHが従来より詳細な研究が行われてきたMDHであることを示している。さらに、ICP分析の結果、La-MDH1分子当たりLaを1原子含有していること、また、このLaはEDTA処理では除去できないことを認めた。これらの結果は、La-MDHの活性発現にLaが必須元素として機能していることを示唆している

## 2) *Bradyrhizobium* 属細菌

ガラス研磨剤、石油クラッキング触媒、ガラス・鋼鉄添加剤などに用いられているCeを対象に研究を進めた。30  $\mu$ M Ce存在下で特異な増殖挙動を示す微生物の探索が行われた結果、Ce存在下でコロニーの周りに粘性物質を生産するCe応答細菌が三重県伊勢市の土壌から単離された。本菌株の細胞サイズはCeの影響を受けなかった。さらに、液体培養においてその増殖をコロニー形成能で追跡したところ、Ceは増殖にまったく影響を及ぼさないことがわかった。これらの結果から、Ceが本菌株の粘性物質の生産を誘導していることが示唆された。このような挙動を示す細菌が自然界から単離されたことは、低濃度のCeが微生物の生理機能に影響を及ぼすことを初めて明らかにしたものとして極めて興味深い。この単離細菌は、好気性で運動性を有し孢子形成能を持たないグラム陰性の桿菌で、カタラーゼ及びオキシダーゼはともに陽性、グルコース及びマンニトール資化能を有していた。16S rDNA塩基配列を解析したところ、*Bradyrhizobium elkani* USDA76及び*B. jaconicum* USDA94の16SrDNA塩基配列とそれぞれ99.42%及び98.42%と高い相同性を示した。以上述べた菌学的特徴と16S rDNA塩基配列の解析から、本単離菌株を *Bradyrhizobium* sp. と同定、農業生物資源研究所に寄託し、登録番号としてMAFF211645を付与された。Ceに加えてLa, Pr, Ndも本菌株の粘性物質の生産を誘導した。Smも僅かながら粘性物質の生産を誘導した。EuからLuまでの希土類元素や生体関連金属元素(Na, Al, K, Ca, V, Cr, Co, Ni, St, Ba, Pb)では誘導しなかった。また、この粘性物質は1%マンニトール存在下でも生産された。Ce存在下で菌体外に生産された粘性物質はエキソポリサッカライド(EPS)の一種で、Sepharose CL-4Bクロマトグラフィーにより平均分子量は100

万程度と推定された。TLC分析にて主成分はラムノースで、アルジトールアセテイト誘導体のGLC分析から95%以上のラムノースからなるラムナンであることが分かった。さらに、FT-IRスペクトル解析からラムノース間は $\alpha$ 結合であり、またGC/MS分析の結果から、EPSが $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-ラムノピラノシル残基からなる主鎖から構成されていることが分かった。<sup>1</sup>H NMR及びFT-IRのスペクトル分析から1%マンニトール存在下で生産されたEPSも同様の構造を有するラムナンであることが示された。

*Bradyrhizobium* sp. MAFF211645 は弱いメタノール脱水素酵素 (MDH) 活性を示すが、30  $\mu$ M Ce と 0.5%メタノール存在下で培養するとMDH活性が著しく上昇することを見出した。この活性の上昇はLa添加でも認められたが、その他の希土類元素や金属元素では認められなかった。次に、Ce添加時に発現したMDHをPD-10, Hitrap SP Sepharose HP及びMonoS 5/50 GLを用いた一連のカラムクロマトグラフィーにより精製したところ23.6%の収率で比活性が22.4倍上昇した。精製MDHはSDS-PAGEにておよそ60 kDaの単一バンドとして検出された。本MDHの分子量はSuperdex 200 GLにて約108,000と推定されたので、本MDHは同一のサブユニットからなるホモ二量体と推定された。N-末端23アミノ酸残基の配列1-NDELHKMAQNPCKDWVMPA-GDYAN-23は*B. japonicum* USDA110の*mxoF*遺伝子がコードしているMDH large subunit-like proteinのそれと91.3%の高い相同性を示した。この情報及び*mxoF'*の塩基配列を基にPCRにてMDH large subunit-like proteinをコードしている遺伝子を増幅し、ABIヌクレオチドシーケンサにて全塩基配列を決定した。この遺伝子の想定アミノ酸配列からこの遺伝子は578アミノ酸残基からなる分子量62,918 Daのたんぱく質をコードしていることが分かった。さらに、そのアミノ酸配列の解析から、N-末端23アミノ酸残基からなるシグナルペプチド及び活性中心に2個の隣接したCys残基を有すること、並びにbacterial quinoprotein signature 1及び2が保存されていることを明らかにした。これらの結果は、Ce添加時に生成されるMDHが*Bradyrhizobium* sp. MAFF211645の*mxoF*遺伝子によりコードされており、メタノール代謝に機能していることを示している。

本MDHの最適pH及び温度はそれぞれ9.0及び35°Cであった。45°C及び50°Cで酵素を1時間処理するとそれぞれ90%以上及び80%以上の活性を維持していた。本MDHはメタノールの他、エタノール、1-プロパノール、1-ブタノール等の第一級アルコールに高い基質を示した。メタノールの対する*K<sub>m</sub>*値は2.9 mMと算出された。50 mM EGTAにて2時間処理す

ると本MDH活性が37.7%まで減少した。このEGTA処理酵素中のCe含量をICP-AESにて測定したところ、Ce含量が減少していたことから、Ceが本MDHの活性発現に関与していることが示唆された。

これら一連の研究は、希土類元素が微生物の生理活性の発現に関与していることを酵素及び遺伝子レベルで初めて明らかにしたもので、微生物生理学、微生物生態学、環境科学などの研究分野に貴重な情報を提供しているとともに、希土類元素が高等生物にも遺伝子発現などに影響を及ぼす可能性があることを示している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Nanung Agu Fitriyanto, T. Iwama, and K. Kawai: Molecular structure and gene analysis of Ce<sup>3+</sup>-induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. J. Biosci. Bioeng., (2011) (in press) 査読 有
2. Y. Hibi, H. Arafuka, M. Hamajima, T. Iwama and K. Kawai, La<sup>3+</sup>-induced methanol dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans*. J. Biosci. Bioeng., (2011). (in press) 査読 有
3. N. A. Fitriyanto, M. Nakamura, S. Muto, T. Iwama and K. Kawai: Ce<sup>3+</sup>-induced exopolysaccharide production by *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. J. Biosci. Bioeng., 111, 146-152 (2011). 査読 有
4. 日比慶久, 奥田雅代, 佐久間隆介, 岩間智徳, 河合啓一: *Methylobacterium* sp. に及ぼすEuとSmの影響 —増殖特性とメタノール脱水素酵素の発現—, 環境技術 40, 44-50 (2011). 査読 有

[学会発表] (計9件)

1. 成田千晴, 坂尻裕子, 岩間智徳, 河合啓一: スカンジウム存在下で*Fusarium solani* SC-2株により生産される色素. 2010年日本農芸化学会大会(東京大学), 2010年.
2. N. A. Fitriyanto, A. Pertiwinigrum, N. Kurniawati, M. Fushimi, T. Iwama, and K. Kawai: Analysis of the gene coding for methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. CE-3. 日本農芸化学会 2010年度大会(東京大学), 2010年.

3. 濱嶋真希子, 浅井健太郎, 足立真由美, 岩間智徳, 河合啓一: *Methylobacterium radiotolerans* NBRC15690 のメタノール脱水素酵素と希土類元素との関わり. 第 61 回大会 日本生物工学会大会 (名古屋), 2010 年.
4. N. A. Fitriyanto, A. Pertiwinigrum, N. Kurniawati, M. Fushimi, T. Iwama, and K. Kawai: Gene analysis of methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. CE-3. 第 61 回大会 日本生物工学会 (名古屋) 2009 年.
5. N. A. Fitriyanto, M. Fushimi, M. Matsunaga, T. Iwama, and K. Kawai: Methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. CE-3. 日本農芸化学会 2009 年度大会 (マリンメッセ福岡, 2009 年).
6. N. A. Fitriyanto, M. Fushimi, T. Iwama, and K. Kawai: Methanol metabolism of *Bradyrhizobium* sp. CE-3. 第 60 回日本生物工学会大会 (東北学院大学), 2008 年.
7. 奥田雅代, 浅井健太郎, 河合啓一, 岩間智徳, 鈴木徹: *Methylobacterium* sp. EU-1 のメタノール脱水素酵素に及ぼす希土類元素の影響. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋) 2008 年.
8. 松永美香, 小島弘照, 岩間智徳, 河合啓一: 希土類元素存在下における *Sphingomonas* sp. EU-3 の増殖挙動. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋) 2008 年.
9. 越智幸三, 河合啓一, 王国君, 岡本晋: 「希土類元素」による放線菌 2 次代謝の活性化と植物成長促進効果. 日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋), 2008 年.

[図書] (計 2 件)

1. 河合啓一: レアメタル便覧, 27 章, 丸善,

2011 年. 1800 ページ

2. 河合啓一: “希土類の農業への応用” 希土類の材料技術ハンドブック (足立吟也監修), 第 37 章, p 896-904, 2008 年.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 啓一 (KAWAI KEIICHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 00002064

(2) 研究分担者

岩間 智徳 (IWAMA TOMONORI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 60252128