

ダイズ根粒菌が生産するビタミンB12が
ダイズ栽培にもたらす影響の解析

東京農工大学大学院 GIR研究院

安田 美智子

【諸言】

多くの生物にとって、ビタミン類の摂取は正常な生体反応を保持する上で欠かせない。ビタミンの一種であるビタミン B12(コバラミン)は金属であるコバルト(Co)を中心に据えた分子量 1355.39 の複雑で巨大な複合体を形成しており(図 1)、一部の細菌や藻類のみが生合成し、その他の生物がそれを利用していることが知られている。植物はビタミン B12 を生産できないため、植物性食品のみを食べるビーガンはビタミン B12 不足になることから、どのようにビタミン B12 を補給するかが注目されている¹。ビタミン B12 の核となるコバルトは、植物の必須栄養素として定義されていないが、ダイズとダイズ根粒菌の共生関係において必須の微量元素として知られている²。ダイズ根粒菌の生育にコバルトが必須であり、コバルトがないと根粒菌のタンパク質合成が阻害される³。コバルト欠乏土壌では根粒の着生が悪いことから、このような土壌ではコバルトの土壌および葉面散布が認められているが、コバルトは 1~2 時間で土壌に吸着されてしまう。また、コバルトの過剰散布は植物の生育抑制、クロロシス、およびネクロシスを引き起こすことが知られているため注意が必要である。次世代シーケンサーを用いた細菌全ゲノム解析の結果、多くの植物共生細菌と同様に、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* もビタミン B12 生合成経路があることが見出されているが、ビタミン B12 の機能については明らかにされていない。そこで本研究では、どのような条件でダイズ根粒菌がビタミン B12 を生合成するのか、さまざまな条件で継続的に遺伝子発現解析を行う。さらに、ビタミン B12 生合成遺伝子を破壊した株を作成し、破壊株と野生株をダイズに接種した際のビタミン B12 生合成が植物の成長に及ぼす影響を解析し、ダイズと根粒菌の相互作用におけるビタミン B12 の重要性を明らかにする。

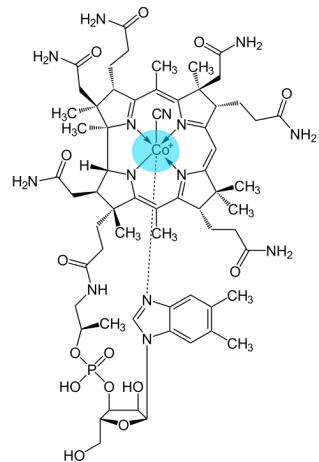


図 ビタミンB12の構造

【実験結果および考察】

ダイズ根粒菌のコバラミン生合成遺伝子の解析

これまでにダイズ根粒菌として知られている *Bradyrhizobium* 属細菌はアメリカ国立生物学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCB) に 187 株登録されている (2024 年 5 月現在)。ダイズが根粒菌を介してビタミン B12 を供給すると

仮定した場合、根粒菌のビタミン B12 生合成経路を明らかにすることが重要である。ビタミン B12 生合成には好気的生合成経路と嫌気的生合成経路が知られている（図 2）。また、riboswitch はビタミン B12 の生合成量を検知している⁴。そこで、NCBI の情報をもとにゲノム情報が明らかにされている代表的な 12 株のビタミン B12 生合成遺伝子を解析した。その結果、*Bradyrhizobium* 属細菌が *cob* 遺伝子群を用いた好気的ビタミン B12 生合成経路および L-Threonin からの生合成経路を有していることが明らかになった（表 1）。また、*cobT* および *cobS* はクラスター（図 3）から離れたところにも存在していることが明らかになった。

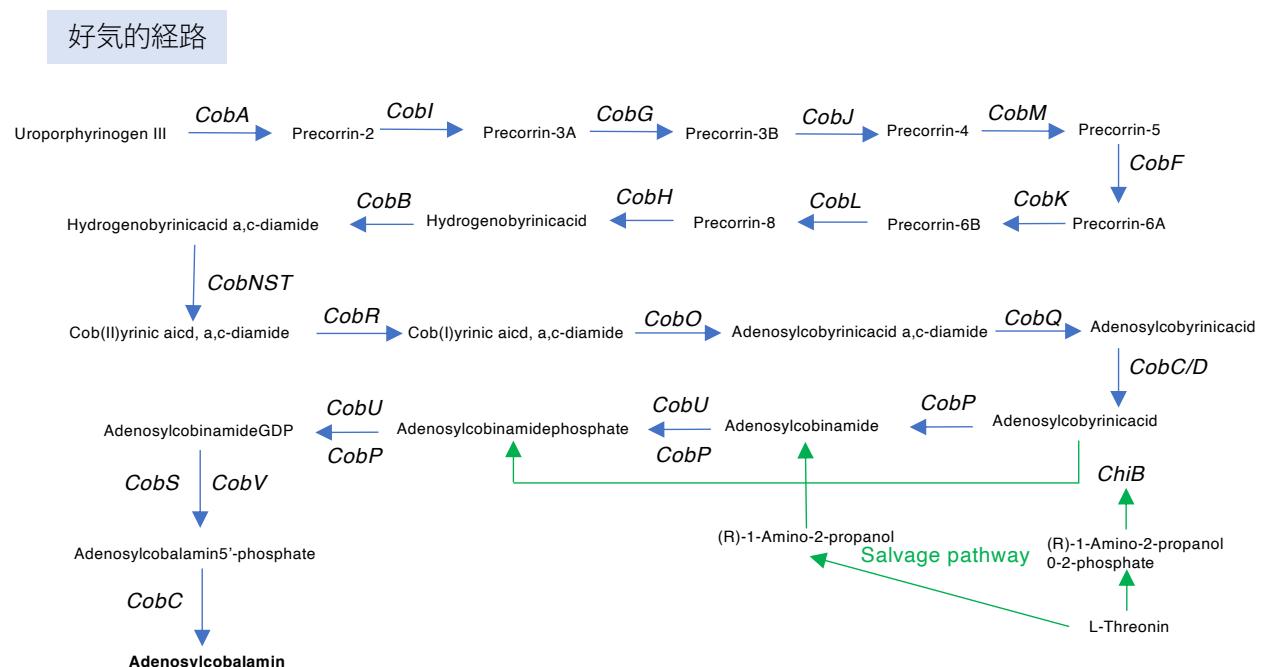


図2 *Bradyrhizobium*属細菌のビタミンB12生合成経路

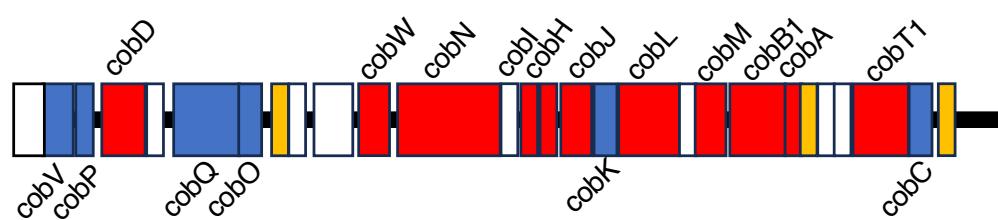


図3 *B. diazoefficiens* USDA110のビタミンB12生合成遺伝子クラスター（赤）positive（青）negative（白）hypothetical protein（黄）riboswitch

表 1 *Bradyrhizobium* 属細菌のビタミン B12 生合成遺伝子

	<i>cobS</i>	<i>cobT</i>	<i>cobU</i>	<i>cbiB</i>	<i>cobD</i>	<i>cobO</i>	<i>cobW</i>	<i>cobN</i>	<i>cobG</i>	<i>cobJ</i>	<i>cobM</i>	<i>cobA</i>	<i>cobF</i>	<i>cobI</i>
<i>B. liaoningense</i>	2	2	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. oligotrophicum</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. manausense</i>	2	2	1	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
<i>B. nitroreducens</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	-
<i>B. betae</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. ottawaense</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. symbiodeficiens</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. elkanii</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. japonicum</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. hereditatis</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>B. yuanmingense</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>B. pachyrhizi</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-

cobS, cobaltochelatase subunit CobS; *cobT*, cobaltochelatase subunit CobT; *cobU*, bifunctional adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase; *cbiB*, adenosylcobinamide-phosphate synthase CbiB; *cobD*, threonine-phosphate decarboxylase CobD; *cobO*, cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase; *cobW*, cobalamin biosynthesis protein CobW; *cobN*, cobaltochelatase subunit CobN; *cobG*, precorrin-3B synthase; *cobJ*, precorrin-3B C(17)-methyltransferase, *cobM*, precorrin-4 C(11)-methyltransferase, *cobA*, uroporphyrinogen-III C-methyltransferase

ビタミン B12 測定

ビタミン B12 の定量法として、ビタミン B12 要求株を用いた微生物法、ELIZA 法、LC-MS/MS 法などが挙げられるが、微生物法はシアノ化したビタミン B12 の総量、ELIZA 法も複数のビタミン B12 をそれぞれ識別して計測することは不可能である⁵。また、微生物法は菌株の維持、ELIZA 法は価格の問題で常時ビタミン B12 を測定するのは不可能であった。これらの中で生体内の複数のビタミン B12 を識別して計測できるのは LC-MS/MS 法である。そこで本研究では、LC-MS/MS を用いた *Bradyrhizobium* 属細菌およびダイズのビタミン B12 量の計測を行うため、予備試験として 3 種類のビタミン B12（アデノシルコバラミン、メチルコバラミン、シアノコバラミン）の測定を試みた。使用した LC-MS/MS は LTQ Orbitrap XL、カラムは Capcell core C18 (2.1mm x 75mm)を使用した。標準サンプルの測定を行った結果、一価のイオンの検出ではピークが弱く、二価イオンでの検量線の作成が可能であった（図 4）。

また、この LC-MS/MS 法では 1pg/ μ L が検出可能なレベルであった。土壤中のコバラミン類を微生物法で測定した値が 10pg/L であっため、サンプルをかなり濃縮する必要があることが判明

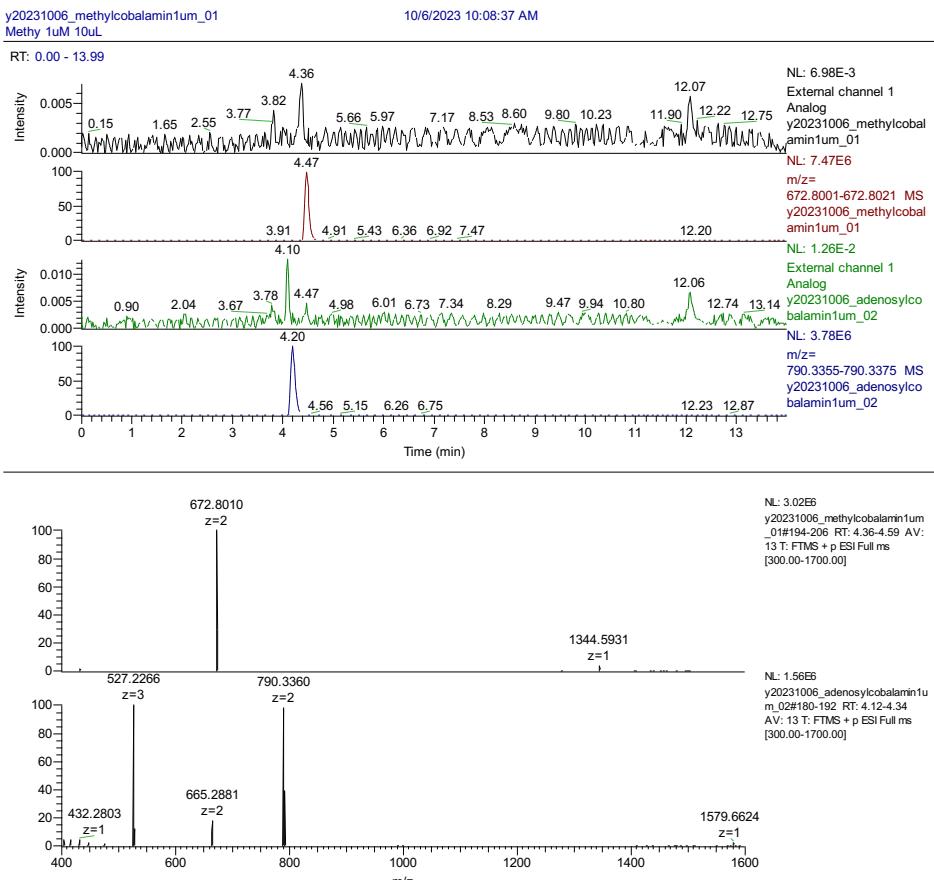


図 4 LC-MS/MSによるコバラミン類の測定

した⁶。3種類のコバラミンを別々のピークとして検出するメソッドを用いて、*Bradyrhizboium diazoefficiens* USDA110 の培養上清および菌体破碎液をメンブレンフィルターで精製したものを LC-MS/MS で測定を試みたところ、水溶液中にペプチドと思われる物質が多く、コバラミンのピークを検出することが出来なかった。現在、ペプチドの可能性を含め、不純物の除去の方法を検証している。

ビタミン B12 処理がダイズの生育に及ぼす影響

ビタミン B12 を処理すると植物の生育が促進されたという報告がある一方、生育には影響しないという結果が多く存在する^{7,8}。本研究ではダイズ (*Glycine max* cv. Enrei) の生育に及ぼすビタミン B12 の影響を解析した。まず、殺菌した種子にビタミン B12 水溶液を浸した濾紙の上で発芽させた。発芽率について検証した結果、無処理で 54% であったが、10 μM 処理で 37%、20 μM で 54% と発芽率にほとんど影響しないことが明らかになった。ビタミン B12 を処理した際に、ダイズの種皮表面にのみビタミン B12 の赤い色が移り、ダイズの胚乳には移行しないことが明らかになった（図 5）。また、ビタミン B12 を処理したダイズを温室内で 6 週間栽培したが、無処理の植物との差は認められなかった。これらの結果から、ビタミン B12 はダイズの生育には影響しないことが示された。



図5 ダイズの発芽に及ぼすビタミンB12の影響
(A) 発芽種子(B)発芽種子の断面

ビタミン B12 生合成遺伝子欠損 *Bradyrhizboium* の作成

Cob 遺伝子は *Bradyrhizobium* 属細菌のビタミン B12 生合成に関わる遺伝子である。この *cob* 遺伝子群のうち、*cobW* 遺伝子の欠損株の作成を試みた。遺伝子の欠損には pSUPUPCAK プラスミドを用い、*EcoRI*, *XbaI* で制限酵素処理したベクターに USDA110 の *cob* 遺伝子を In-fusion で挿入した。大腸菌に形質転換したものの中で配列確認をした結果、目的の *cobW* 遺伝子を含んだベク

ターが得られた。このベクターを保有した大腸菌を *B. diazoefficiens* USDA110 株に接合にて導入し、選択用培地での選択を行ったが、カナマイシン耐性コロニーは出現したが *cob* 遺伝子が欠損した形質転換体は得られなかった。その原因として、USDA110 株の形質転換効率が非常に悪いことが考えられたため、別の *Bradyrhizobium* 属細菌を使用した方が解析しやすいことが明らかになった。

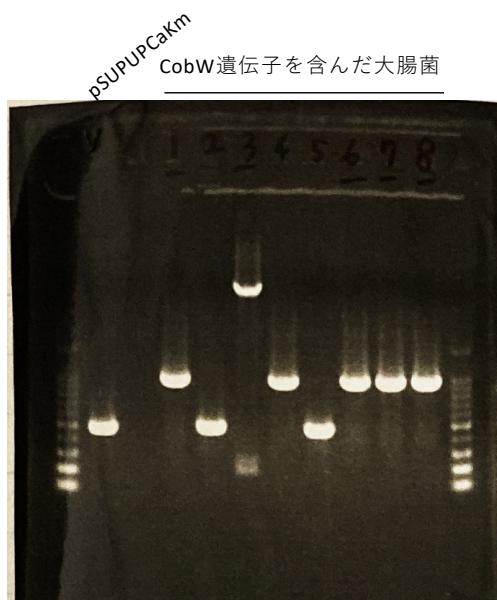


図6 pSupのプライマーを用いたインサート確認
1,4, 6,7,8レーンがcobWを含んだ大腸菌

【要約】

本研究は、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* 属細菌を介したダイズへのビタミン B12 供給およびそのメカニズムおよびについて明らかにすることを目的とした。まず、ダイズ根粒菌のビタミン B12 生合成経路について解析し、*Bradyrhizobium* 属細菌が好気性経路とサルベージ経路の両方を有していることを明らかにした。複数の *Bradyrhizobium* 属細菌が共通して同様の生合成経路を保有していたことから、本細菌が積極的にビタミン B12 生合成を行っていることが明らかになった。ダイズの栽培試験では、ダイズの種皮がビタミン B12 を取り込むが、中の胚乳にまでは浸透していなかったため、ダイズ自身がビタミン B12 の取り込みを積極的に行っているわけではない可能性が示唆されていた。また、その後のダイズの成長においても差が認められなかったことから、ビタミン B12 がダイズの成長に影響しないことが明らかになった。*Bradyrhizobium* 属細菌の中で代表的な *B. diazoefficiens* USDA110 株のビタミン B12 生合成遺伝子 *cobW* の欠損変異株の作成を試みたが、形質転換 USDA110 株の取得には至らなかった。

本研究の結果、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* 属細菌が普遍的にビタミン B12 生合成を行い、ダイズは種皮にビタミン B12 を蓄積することが明らかになった。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。また、LC-MS/MS 分析によるコバラミン類の測定において多大なご協力をいただきました東京農工大学スマートコアファシリティー推進機構 伊藤喜之特任准教授に感謝申し上げます。

【文献】

1. Watanabe, F. & Bito, T. Vitamin B₁₂ sources and microbial interaction. *Exp Biol Med (Maywood)* **243**, 148–158 (2018).
2. Hu, X., Wei, X., Ling, J. & Chen, J. Cobalt: An Essential Micronutrient for Plant Growth? *Front. Plant Sci.* **12**, 768523 (2021).
3. Richie H. Lowe, Harold J. Evans & Shaukat Ahmad. The effect of cobalt on the growth of Rhizobium japonicum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **3**, 675–678 (1960).
4. Kennedy, K. J. et al. Cobalamin Riboswitches Are Broadly Sensitive to Corrinoid Cofactors to Enable an Efficient Gene Regulatory Strategy. *mBio* **13**, e01121-22 (2022).
5. Ibrahim, L. & Usman, A. A simple and rapid RP-HPLC method for the assessment of cobalamin (vitamin B12) in tilapia and snoek fishes. *Turkish Journal of Chemistry* **46**, 320–329 (2022).
6. Akasaka, H., Ueki, K. & Ueki, A. Effects of Plant Residue Extract and Cobalamin on Growth and Propionate Production of Propionicimonas paludicola Isolated from Plant Residue in Irrigated Rice Field Soil. *Microb. Environ.* **19**, 112–119 (2004).
7. Mozafar, A. & Oertli, J. J. Uptake of a microbially-produced vitamin (B12) by soybean roots. *Plant Soil* **139**, 23–30 (1992).
8. Keshavarz, H. & Moghadam, R. S. G. Seed priming with cobalamin (vitamin B12) provides significant protection against salinity stress in the common bean. *Rhizosphere* **3**, 143–149 (2017).