

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05817

研究課題名（和文）植物と共生メチロトロフ細菌間の化学コミュニケーションの解析と共生の可視化

研究課題名（英文）Analysis of chemical communication for symbiosis between plants and methylotrophic bacteria.

研究代表者

三井 亮司（Mitsui, Ryoji）

岡山理科大学・生命科学部・教授

研究者番号：60319936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物葉上に共生する細菌Pink Pigmented Facultative Methylotrophs(PPFMs)は植物ホルモンやPQQ等の化合物を植物に供給して生育を促す。このことからPPFMsを利用した作物の増収効果などへの応用が期待される。本研究では植物が光合成により生成する活性酸素種の影響を、PPFMsがPQQを葉上特異的に分泌して消去することに着目した。PQQの葉面特異的分泌はMxbDMと呼ばれる二成分制御系が調節を担い、ランタノイドを指標とした植物と微生物の化学コミュニケーションが示唆された。この遺伝子の破壊は共生に関わる酵素や分泌物に大きな影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は地球の温暖化等をはじめとする環境の変化による食糧供給に資することが期待される。植物は根圏や葉圏で多くの微生物と共生関係を築き生育の促進効果や病原性微生物を防御するなどの共生関係を形成しているが、そのメカニズムは不明な点も多い。今回の研究ではPPFMsと呼ばれる微生物群が光合成を補助する役割をもつPQQを葉上特異的に分泌する新たなメカニズムの解明について幾つかの知見が得られた。光合成を補助するためには地上部特に葉面ではたらくことが必要であり、これに遷移金属元素のランタノイドが貢献していることは興味深い。このメカニズムの解明は微生物を用いた先端農業へ貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFMs), symbiotic bacteria that inhabit plant leaves, provide plants with compounds such as plant hormones and PQQ to promote their growth. This highlights the potential applications of PPFMs in increasing crop yields. In our study, we specifically focused on the ability of PPFMs to secrete PQQ on the leaves, reducing the impact of reactive oxygen species generated by plants during photosynthesis. The leaf-specific secretion of PQQ is regulated by a two-component regulatory system known as MxbDM, indicating chemical communication between plants and microorganisms, with lanthanides serving as indicators of the plant's position. Disruption of this gene was found to significantly affect enzymes and secretions involved in symbiosis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：植物共生微生物 メチロトロフ PQQ ランタノイド メタノールデヒドロゲナーゼ 二成分制御系
植物生育促進 Methylorubrum

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物から放出されるメタノールは、地球規模では年間に数千万トンとも見積もられている。メタノールを利用して生育する微生物(メチロトロフ)と、宿主となる植物の共生関係は地球環境の炭素循環に重要な役割を果たしている(図1)。植物からのメタノールの発生は、植物の一次細胞壁に含まれるペクチンのメチルエステルを植物自身が加水分解することによって由来する。この目的は植物の生長点における細胞の伸展を容易にするためであり、その後 Ca^{2+} が架橋化することでゲル化し、流動性が低下して堅くなる。このことから、植物生長点においてはメタノールが豊富に放出されることが知られている。植物周辺にはこのメタノールを炭

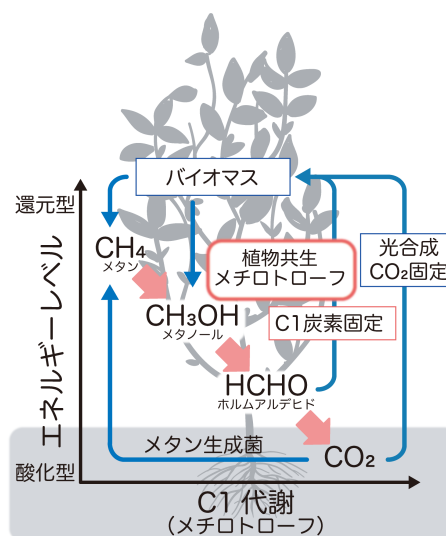


図1 植物共生細菌とC1炭素循環

素源やエネルギー源として利用するメチロトロフ細菌が共生している。メチロトロフ細菌はメタノールを得るため、植物に生育を促すための化合物の供給と、植物から得られるメタノールの中で化学コミュニケーションが成立している。使用される化合物としてピロロキノリンキノン(PQQ)や植物ホルモンなどが知られ、この化学コミュニケーションをメタノールの獲得戦略として、植物上で優勢に生育する相利共生を成立させている。メチロトロフ細菌のモデル菌株である *M. extorquens* AM1 はゲノム上にメタノール代謝の初発酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼを3コピー有している。古くから最もよく研究されているメタノールデヒドロゲナーゼは、 Ca^{2+} を活性中心にもち、PQQを補酵素として利用する MxaFI と呼ばれるタイプである。それ以外のホモログ遺伝子は発現しない不活性なものであると考えられてきた。しかし、私たちはこの *xoxF1*, *xoxF2* と呼ばれている2つのホモログ遺伝子が、 La^{3+} (ランタン)や Ce^{3+} (セリウム)などのランタノイドにより活性型として発現すること、活性中心に Ca^{2+} ではなく La^{3+} や Ce^{3+} をもつことを明らかにしてきた。このことはランタノイドが生物に利用されることを見いだした初めての例となったが、同時にアイソザイムを使い分け、かつ補欠因子をも使い分けるといったことが植物との共生にどのように関係するのか、突き詰めると植物共生にランタノイドが果たす役割とはなにかというところに着目して研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

Ding ら(Biol. Trace Element Res., 2005) によると植物体内では根圏から土壌周辺、さらに先端部にかけてランタノイド濃度の勾配が形成されていることが報告されており、私たちは植物と微生物の共生関係に果たすランタノイドの役割解明の糸口として着目した(図2)。植物に共生する *Methylorubrum* などのメチロトロフ細菌はメタノールで培養した際に植物生理活性物質を分泌し、それらを植物との化学コミュニケーションのツールとして利用している。環境においてメタン生成菌と並ぶC1化合物の発生源が植物であることが明らかになり、メチロトロフ細菌が炭素循環の重要な担い手であ

ること、メチロトロフ細菌のメタノール代謝においてランタノイドが重要な役割を持つことが明らかになったことから、本研究では微生物側だけでなく、植物と微生物の共生関係を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

植物と微生物の共生におけるランタノイドの役割は、植物体にランタノイド濃度勾配ができていることから推測しており、端的には微生物にとって濃度が濃いところが土壌付近、薄いところが葉上という認識メカニズムを有している。メタノールを炭素源としてランタノイド存在下でモデル菌株の *M. extorquens* AM1 を培養すると生育には差が見られないにもかかわらずPQQの菌体外への

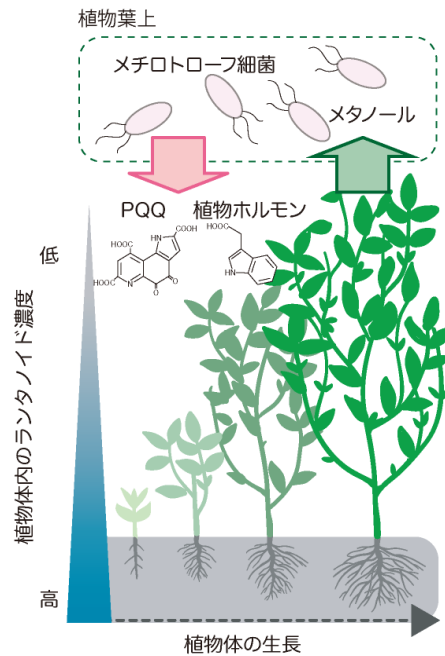


図2 植物内ランタノイドの分布とメチロトロフ細菌の共生モデル

分泌は明らかに低下する。PQQはメチロトロフ細菌にとって代謝酵素の補酵素でもある。これを取って分泌する目的は、PQQの強いヒドロキシラジカル消去活性を利用して、光合成により生じた植物体の酸化ストレスを効果的に低減させるためであると考えられた。このことからPQQを植物との化学コミュニケーションを理解するモデル化合物として検討した。植物体のランタノイド分布から考えると、ランタノイド濃度が高い根圏や土壌付近ではPQQの分泌を抑制し、濃度の低い葉上でのみ菌体外に分泌することを示唆する。このことから細菌における環境因子の検知・応答に関与するとされ *M. extorquens* AM1 においてはランタノイドスイッチと呼ばれるメタノールデヒドロゲナーゼの制御機構に関与が示唆されることが報告されている二成分制御系の MxbDM を欠損させ、MxbDM とランタノイドおよび PQQ 分泌の関連を解析することとした。また、メタノール資化との関連が示唆される MxbDM 以外の二成分制御系についても検討を行った。

4. 研究成果

① MxbDM の遺伝子破壊が生育に及ぼす影響

二成分制御系 MxbDM はランタノイドとの関連が深いことが明らかになっている。そこでこの遺伝子を破壊し、 La^{3+} 濃度による生育の違いを比較した(図3)。その結果、*mxbdm*破壊株は La^{3+} を含まない培地ではメタノールに対する生育能が失われたが、 La^{3+} を添加するとメタノールへの生育が相補されることが明らかになった。このことから、MxbDM が欠損しても La^{3+} の添加により *xoxF1* および *xoxF2* が発現して生育を相補できると考えられた。また、野生株は La^{3+} 非存在下では、*mxoFI* が発現することで La^{3+} に依存しない生育ができるが、*mxbdm*が破壊されたことで *mxoFI* が発現しなくなっ

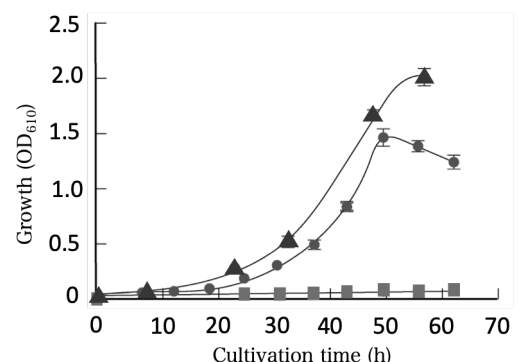


図3 *mxbdm*破壊株の La^{3+} 濃度に対する生育。メタノール 0.4%(w/v)培地を用いた。野生株 $\text{La}^{3+} 0 \mu\text{M}$ (▲)、 Δ *mxbdm*株 $\text{La}^{3+} 0 \mu\text{M}$ (■)、 $\text{La}^{3+} 10 \mu\text{M}$ (●)、

たため生育できなくなると考えられる。このことから、MxbDM は *mxoF1* の発現にも関与していることが明らかになった。

② MxbDM がメタノールデヒドロゲナーゼの発現に与える影響

生育比較より二成分制御系 MxbDM がメタノールデヒドロゲナーゼの発現に大きく影響を与えていることが明らかになったことから、*mxoDM*破壊株を作成して詳細に調べを試みた。この破壊株にランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼ XoxF1 と XoxF2 のプロモーター領域に赤色蛍光タンパク質をレポーターとしたプラスミドを形質転換して発現解析を行った(図 4)。レポーターが示す蛍光強度から、*mxoDM*破壊株では *xoxF1* が極端に過剰発現していることが明らかになった。このことから、MxbDM は *xoxF1* を抑制する形の発現調節を行っていると考えられた。さらに XoxF1 はランタノイド濃度に応答して発現量に変化が見られるが *mxoDM*破壊株では濃度に対する応答性も消失した。一方、XoxF2 発現に与える *mxoDM*破壊の影響は野生株と比較して低濃度のランタノイド存在下においてわずかに濃度依存性が消失していた。XoxF2 は高濃度のランタノイドと高濃度(0.8%)のメタノール共存下でのみ発現するという表現系は維持されたことから、MxbDM とは他の因子が制御していると考えられた。以上より MxbDM はランタノイドの有無を検知し、ランタノイドが非存在下では MxaFI を、存在下では XoxF1 を発現させるスイッチとして機能することが明らかになった。

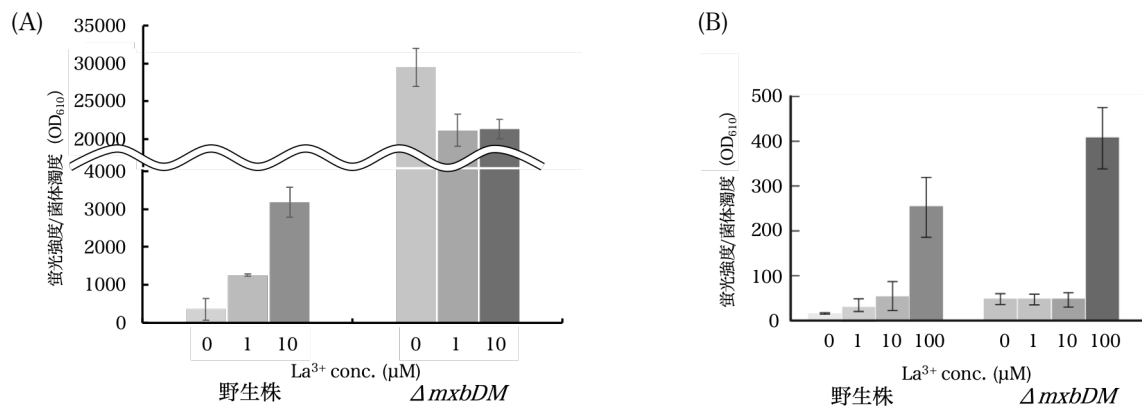


図 4 *mxoDM* 破壊による(A) *xoxF1*、(B) *xoxF2* の発現
(A)メタノール 0.4%(w/v)、(B)メタノール 0.8%(w/v)とした培地を用いた。
培養時間は野生株 96 時間、*mxoDM*破壊株 120 時間。エラーバーは標準偏差(n=3)

③ *mxoDM*及び *mxoF*破壊株の PQQ 分泌量変化

*mxoDM*変異株はメタノールに、 La^{3+} の添加なしには生育しないため、メタノールに加えてコハク酸追加し、 La^{3+} 非存在下の PQQ 分泌条件において生育を相補させて検討した。*mxoF*破壊株は野生株と同等の PQQ が分泌されていた。一方、*mxoDM*変異株では PQQ の分泌がほとんど見られなかった(図 5)。これらの結果から、MxbDM は PQQ の生産もしくは、菌体外分泌に関与することが考えられた。

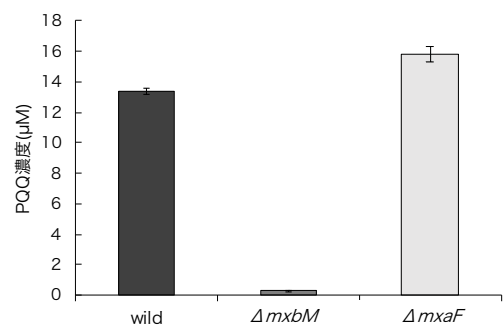


図 5 *mxoDM*変異株と *mxoF*破壊株の PQQ 分泌量
コハク酸 0.4 %(w/v)にメタノール 0.4 %(v/v)を加えた培地を用いた。培養時間は 96 時間。
エラーバーは標準偏差(n=3)。

④ *mxoDM*変異株の PQQ 生合成遺伝子と *mxoF*遺伝子の発現量

AMI のゲノム配列において、PQQ の菌体外への分泌に関連することを推定した PQQ トランスポーターの *pqqB* と生合成系の最終段階の酵素である *pqqC/D* について、RT-qPCR 法により発現量を確認した。その結果、*pqqB* 遺伝子、*pqqC/D* 遺伝子ともに発現がみられた(図 6A)。よって、MxbDM は PQQ の生産には関与しておらず、PQQ を菌体外へ分泌することに関わっていると推測された。しかし、PQQ 生合成遺伝子は他にも存在するため確認が必要である。*mxoF* 遺伝子は野生株では多く発現し、*mxoM* 変異株では発現量が低かった(図 6B)。このことから、MxoF は MxbDM によって正に調節されていることが確認された。

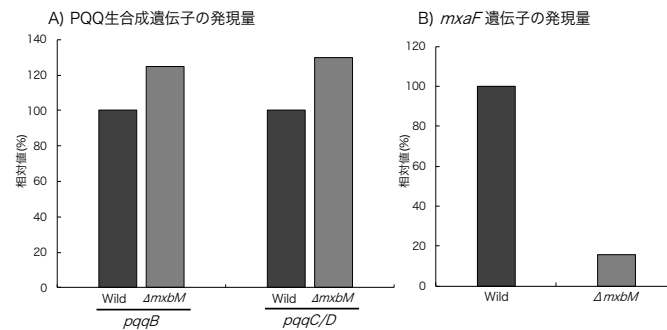


図 6 *mxoDM* 変異株の PQQ 生合成遺伝子と *mxoF* 遺伝子の発現
(A)は *pqqB*・*pqqC/D* の発現量、(B)は *mxoM* 変異株の *mxoF* の発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 三井亮司	4. 巻 58
2. 論文標題 メタノールとランタノイドがつなぐ微生物と植物間の共生	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 温古知新	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Viagian Pastawan, Soya Suganuma, Kosuke Mizuno, Lun Wang, Akio Tani, Ryoji Mitsui, Kohei Nakamura, Masaya Shimada, Takashi Hayakawa, Nanung Agus Fitriyanto, and Tomoyuki Nakagawa	4. 巻 130
2. 論文標題 Regulation of lanthanide-dependent methanol oxidation pathway in the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium Bradyrhizobium 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pacha Yanpirat, Yukari Nakatsuji, Shota Hiraga, Yoshiko Fujitani, Terumi Izumi, Sachiko Masuda, Ryoji Mitsui, Tomoyuki Nakagawa and Akio Tani	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
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 LunWang, AyumiHibino, SouyaSuganuma, AkioEbihara, SatoshiIwamoto, Ryoji Mitsui, Akio Tani, Masaya Shimada, Takashi Hayakawa, Tomoyuki, Nakagawa.	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
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田翔太, 任家宜, 谷明生, 中川智行, 阿野嘉孝, 矢野嵩典, 三井亮司
2. 発表標題 グラム陽性メチロトロフ細菌 <i>Arthrobacter</i> sp. YM1 の新規ランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼの精製と諸性質
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本侑知, 水野洸介, 原田雄斗, 岩本悟志, 谷明生, 三井亮司, 島田昌也, 早川享志, 中川智行
2. 発表標題 低栄養下における <i>Methylorubrum</i> 属細菌のランタノイドによる生育促進応答に関する研究
3. 学会等名 第73回日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 翔太, 八木 茜, 矢野 嵩典, 谷 明生, 中川 智行, 阿野 嘉孝, 三井 亮司
2. 発表標題 グラム陽性メチロトロフ細菌 <i>Arthrobacter</i> sp. YM1 のランタノイド依存的メタノール生育に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 莉史, 矢野 嵩典, 中川 智行, 谷 明生, 三井 亮司
2. 発表標題 植物共生メチロトロフ細菌 <i>Methylorubrum extorquens</i> AM1 のランタノイドに応答したメタノールデヒドロゲナーゼ XoxF1 の発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 洸介、原田 雄斗、岩本 悟志、谷 明生、三井 亮司、島田 昌也、早川 享志、中川 智行
2. 発表標題 Methylorubrum属細菌の低栄養環境下におけるランタノイド応答の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内赴登, 山下颯太, 谷 明生, 中川智行, 矢野嵩典, 三井亮司
2. 発表標題 植物葉上共生細菌 <i>Methylorubrum extorquens</i> AM1 のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼアイソザイム XoxF2 の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 三井亮司(分担)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)技術情報協会	5. 総ページ数 515
3. 書名 バイオリアクターのスケールアップと物質生産事例集	

1. 著者名 阪井康能、竹川薫、橋本渉、片山高嶺ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 186
3. 書名 遺伝子・細胞から見た応用微生物学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------