

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02105

研究課題名(和文)ランタノイド依存メタノール代謝系制御機構の分子間相互作用解析

研究課題名(英文)Molecular interactome on the regulation of lanthanide-dependent methylotrophy

研究代表者

谷 明生 (Tani, Akio)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00335621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：Methylobacterium属細菌はメタノール資化性で植物葉上の共生細菌である。本属細菌はカルシウム依存のMxaF、ランタノイド(Ln)依存のXoxFという二種類のメタノール脱水素酵素(MDH)を持つ。これらはLnの存在に依存して発現が切りかわる(Lnスイッチ)。本研究は、Lnスイッチの分子機構、Lnの取り込みに関わるシデロフォア及びLanmodulinの遺伝学的・生化学的解析、Lnに応答する細胞機能としてメタノール走化性についての遺伝学的機能解析と、本属細菌全ての種について比較ゲノム解析を行って、メタノール代謝経路を中心に遺伝子レパートリーとフェノタイプのリンクを探った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lnは生物学的には重要でないと考えられてきたが、メタノール資化性のグラム陰性細菌はほぼ全てLn依存のMDHを持っていることが分かってきた。Methylobacteriumは植物葉上の細菌であるためLn依存酵素だけでなくCa依存酵素を持っていると考えられる。これまで必須と考えられてきたCa依存MxaFは、ラボ環境のような特別な条件でしか必要ではなく、自然界ではLn依存XoxFが主に使われている。本属細菌ではそれが切りかわる現象があり、その分子メカニズムに迫ることを通じて、本研究では生物における新しい金属の機能と役割を明らかにしつつある。

研究成果の概要(英文)：Methylobacterium species are methylotrophic plant-symbiotic bacteria residing in the phyllosphere. They usually have Ca-dependent MxaF and Ln-dependent XoxF, both of which are methanol dehydrogenase. The expression of these genes is switched by the presence of Ln. In this study we investigated the molecular mechanism of the Ln switch, genetic and biochemistry of the siderophore and lanmodulin, genetic and phenotypic analysis on methanol-chemotaxis that is also dependent on Ln, and comparative genomics across all species in the genus to elucidate the core genomes of Methylobacterium.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Methanol Methylobacterium Lanthanide

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*Methylobacterium* 属細菌は植物が放出するメタノールを利用して植物葉上で優占化するメタノール資化性細菌(メチロトロフ)である。グラム陰性メチロトロフのモデル細菌として *M. extorquens* AM1 株(現在は *Methylorubrum* 属)について半世紀以上の研究の蓄積がなされてきた。カルシウム依存のメタノール脱水素酵素(MDH)である MxaFI でメタノールを酸化し、H<sub>4</sub>MPT 経路でホルムアルデヒドを酸化する。ギ酸は酸化されてエネルギー源となるか、H<sub>4</sub>F 経路を経由してセリン経路で異化される。これらの経路に関わる酵素・遺伝子については、ほぼ網羅的に遺伝学的・生化学的解析がなされ、理解されていた。AM1 株のゲノムには MxaF と 50%の相同性を持つ *xoxF* があることが分かっていたが、その発現量は低く、活性も検出されず、その機能は謎であった。2011 年、ランタノイド(Ln)存在下で生育が促進される菌株の一つに本属細菌が見つかった。Ln 存在下で培養した菌体は高い MDH 活性を持ち、精製された MDH は驚くべきことに XoxF であった。XoxF は Ln により誘導され、酵素が活性化し、活性中心に Ln が配位することが分かっていた。XoxF は初めて見つかった Ln 依存酵素である。

Ln は工業的にはレーザー、電池、ハードディスクなどのハイテク製品に多く使われており、産業のビタミンとも呼ばれ、現代の先端工業に不可欠なものとなっているが、生物学的には不要な元素と考えられてきた。XoxF は非メチロトロフとされていた根粒菌などの菌株にも存在し、Ln 存在下でのみメタノールを利用する新規細菌も見つかった。

私たちは AM1 株とは属レベルで異なる *M. aquaticum* 22A 株を用い、Ln 存在下でのトランスクリプトーム解析結果を初めて発表し、MDH の発現が Ln の有無で切り替わるだけでなく、その他の遺伝子も大きく発現変動することを見いだしている。XoxF の Ln 依存性が発見されてから急速に研究が進んでおり、以下の知見が得られている。

(1) Ln は天然には主に不溶性酸化物として存在するので、それを溶解する物質(ランタノフォア)の存在が示唆されていたが、その実体は不明であった。(2) 溶解した Ln は、TonB-dependent receptor と ABC transporter の一種により細胞内に取り込まれる。またこのシステムは *xoxF* 発現に必須である。*xoxF* 発現は Ln に依存しメタノールには依存しない。*mxoF* 欠失株は XoxF によって Ln 存在下でメタノールに生育できる。しかし *xoxF* 欠失株は Ca<sup>2+</sup>存在下でも *mxoF* が発現せず、メタノールに生育しない。つまり、*mxoF* が発現するには *xoxF* が必要である。二成分制御系 MxbD/M は *mxoF* の発現に必要であるが *xoxF* の発現には必要がない。これらのことから、MxbDM は *mxoF*, *xoxF* の発現を Ln に応じて切り替えるランタノイドスイッチの実体であると考えられている。MxbD のリガンドは Ln を結合していない XoxF であることが疑われているが証明されていなかった。(3) Ln で誘導されるペリプラズム局在性小タンパク質分子が発見され、Lanmodulin と名付けられ、Ln 結合により構造変化を起こすことが分かったが、その生体機能は未知であった。Ln に応答した MDH の発現切り替えや活性化、メタノール資化系全体の制御にはこのように多くのタンパク質の相互作用が想定されるが、以上のことは遺伝学的な知見に限られ、これら生体分子の各要素の相互作用についての知見は大きく欠落していた。

一方、(4) 本属細菌は 60 種程度が知られており、それらの分離源や生態機能は多様である。ほぼ全ての種がカロテノイドに由来するピンク色のコロニーを形成するが、色素のない種も存在する。Ln 非存在下ではメタノールに生育出来ない種や、マメ科植物に根粒を作る種なども存在する。以上のことから本属を本属たらしめる遺伝的要因がメタノール資化性や色素生産だけなのかという疑問が生じる。

さらに、(5) 本属細菌はメタノールに対して走化性を示す。細菌の走化性は MCP というセンサータンパク質に依存しているが、22A 株の MCP は 52 種類も存在し、多様な化合物への走化性を持つことを示唆する。これまでメタノール走化性に関与する MCP は発見されていない。

## 2. 研究の目的

以上のことから、本研究では *M. aquaticum* 22A 株をモデルとして、(1) Ln の溶解に関わる Lanthanophore の機能解析、(2) Ln スwitchの分子機構解析、(3) ペリプラズム局在性 Ln 結合タンパク質である Lanmodulin の機能解析、(4) 本属細菌の全ての種の比較ゲノム解析によるメタノール代謝に関わる遺伝子の保存性の解析、また(5) Ln に応答して利用する MCP が異なるメタノール走化性の分子機構を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Ln の溶解に関わる Lanthanophore の機能解析

22A 株ゲノムには staphyloferrin B 合成遺伝子(*sbn*)クラスターと考えられる遺伝子がシデロフォアの合成に関わると考えられた。 $\Delta$ *sbnCF*(CF 共に siderophore synthase)の表現系を中心に遺伝学的アプローチでシデロフォアの機能を解析した。

### (2) Ln スwitchの分子機構解析

22A 株の $\Delta$ *xoxF*,  $\Delta$ *mxoF*,  $\Delta$ *mxoDM*,  $\Delta$ *mxoCQ* (もう 1 セットの二成分制御系遺伝子)の表現系を中心に遺伝学的アプローチでこれらの機能を解析した。また大腸菌を用いて発現精製したタ

ンパク質の相互作用を BLItz(BioLayer-Interferometry 法)で解析した。

### (3) ペリプラズム局在性 Ln 結合タンパク質である Lanmodulin の機能解析

$\Delta lanM$ (Lanmodulin 遺伝子)を中心に遺伝学的にアプローチし、金属イオンの量は ICP-MS で測定した。

### (4) 本属細菌全種の比較ゲノム解析によるメタノール代謝に関わる遺伝子の保存性の解析

全 60 種のうち半数の種のゲノム情報がない株のゲノム DNA を精製し、ショートリードで DNA シーケンス、アセンブル、アノテーションし、60 種の比較ゲノム解析を行った。また炭素源の資化能、メタノールの資化能等のフェノタイピングを行った。

### (5) Ln に応答して利用する MCP が異なるメタノール走化性の分子機構の解析

全 52 個存在する MCP 遺伝子のうち、RNA-Seq 解析でメタノール生育時に発現量が増える遺伝子を順次欠失させた株を作製し、メタノールへの走化性をアッセイした。また MDH 遺伝子との多重遺伝子欠失株のフェノタイピングを行い MDH と MCP の活性の関係について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Ln の溶解に関わる Lanthanophore の機能解析

*sbnCf* は鉄制限下での生育に必須であり、クエン酸や野生株の培養液を加えると生育が回復した。 $\Delta sbnCf$  は酸化ストレス・バイオフィーム形成・重金属存在下での生育に影響した。ウキクサとの共存実験で  $\Delta sbnCf$  は鉄制限下において生育促進能を失い、むしろ阻害的に働き、細菌細胞の鉄含量が増加した。このことは細菌と植物との間で鉄の奪い合いが起こったことを示すと共に、シデロフォアが植物の鉄取り込みに関与することを意味した。クエン酸が存在すると Ln はキレートされる。またこのシデロフォアは Ln をキレートすることができ、その取り込みには TonB-dependent receptor (TonB\_Ln)が必要であることを示した。クエン酸鉄の取り込みに関与する TonB\_cit も同定した。

### (2) Ln スイッチの分子機構解析

*mxoF* の発現には *xoxF* が必要であることは既に分かっていた。 $\Delta xoxF$  の抑制変異株のゲノム解析から、*mxoD* または *mxoM* に変異が入ると *mxoF* の発現が起こることが分かった。次に *mxoDM* を欠失させると、やはり *mxoF* の発現が起こらずメタノールに生育出来ないが、再度抑制変異株が得られ、そのゲノム解析を行うと *mxoF* のプロモーター領域に変異が見つかった。*mxoM* を大腸菌で発現させ、MxoM タンパク質が *mxoF* プロモーターと相互作用することをゲルシフトアッセイで確認した。また MxoD のリガンド結合ドメインと XoxF との相互作用を検討中である。この相互作用が起こるのであれば、MxoD は XoxF を認識していることになる。

### (3) ペリプラズム局在性 Ln 結合タンパク質である Lanmodulin の機能解析

*lanM* 遺伝子は Ln 存在下で高発現する。大腸菌で発現、精製した LanM タンパク質は Ln 存在下で構造変化を起こしゲルろ過で見かけの分子量の低下を起こす。*lanM* は野生株及び  $\Delta xoxF$  株のメタノールでの生育には必要ではない。*mxoQE* の遺伝子を欠失させると *lanM* の発現量に変化が起こり、また  $\Delta lanM$  では、野生株では Ln に依存しない *mxoQE* の発現量が Ln 依存的になることから、*lanM* は間接的に *mxoF* の発現に関与していると考えられる。 $\Delta lanM$  は Ln に曝露すると細胞が凝集し、細胞膜の健全性が損なわれ、ペリプラズムでの Ln 蓄積が起こった。また  $\Delta lanM$  では細胞懸濁液上清での Ln 量の低下が早くなること、高発現株では逆に遅くなること等から、LanM は細胞への Ln 取り込みと排出に関与していると考えられた。

### (4) 本属細菌全種の比較ゲノム解析によるメタノール代謝に関わる遺伝子の保存性の解析

本属細菌約 60 種に加えて近縁の別属である *Microvirga* 属細菌と比較ゲノム解析をすることにより、本属細菌のコアゲノムとして重要であるのはメタノール資化性、硝酸の利用、非酸素発生型光合成であると考えられた。ゲノムの遺伝子構成と表現型はよく一致し、大きく 3 つのクレードに分けられることを示した。そのうち *Methylorubrum* 属とされたクレードは、別属であることを支持する程大きな違いがないことも示した。メタノール資化性に関与する遺伝子群の構成からメチルアミンの利用、グルタチオン依存ホルムアルデヒド酸化系、ギ酸酸化系の違いについてもクレードごとの違いが見られた。

### (5) Ln に応答して利用する MCP が異なるメタノール走化性の分子機構の解析

MCP 遺伝子を順次欠失させ、メタノール走化性に関わる MCP は 3 つ存在することを明らかにした。3 遺伝子欠失株は植物の根に対する走化性を失い、植物から放出されるメタノールとメタノール走化性が、本属細菌が植物の在処を見つけ共生を始めるために重要であることを示した。3 つの MCP はそれぞれ役割が異なる。Mtp1 は細胞質に存在してホルムアルデヒドを認識すると考えられる。Mtp2 は Ln 存在下で XoxF の活性に依存する。Mtp3 は Ln 非存在下で MxoF の活性に依存する。3 つともメタノールの走化性には関与するがメタノールそのものを認識しているのではなく、その代謝物あるいは代謝反応をモニターして走化性を発現していることを明らかにした。

。

#### 引用文献

Juma, O.P., Fujitani, Y., Alessa, O., Oyama, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Tani, A. Siderophore for lanthanide and iron uptake for methylotrophy and plant growth promotion in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *Front. Microbiol.* 13:921635 (2022) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.921635>

Fujitani, Y., Shibata, T., Tani, A. A periplasmic lanthanide mediator, lanmodulin, in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *Front. Microbiol.* 13:921636 (2022) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.921636>

Alessa O, Ogura Y, Fujitani Y, Takami H, Hayashi T, Sahin N, Tani A. Comprehensive comparative genomics and phenotyping of *Methylobacterium* species. *Front. Microbiol.* 2021 Oct 6;12:740610. doi: 10.3389/fmicb.2021.740610.

Tani, A., Masuda, S., Fujitani, Y., Iga, T., Haruna, Y., Kikuchi, S., Shuaile, W., Lv, H., Katayama, S., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, J. Metabolism-linked methylotaxis sensors responsible for plant colonization in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *Front. Microbiol.* 14:1258452. (2023) doi: 10.3389/fmicb.2023.1258452

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 3件）

1. 著者名 Fujitani Yoshiko, Shibata Takeshi, Tani Akio	4. 巻 13
2. 論文標題 A Periplasmic Lanthanide Mediator, Lanmodulin, in <i>Methylobacterium aquaticum</i> Strain 22A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 921636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.921636	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 Juma Patrick Otieno, Fujitani Yoshiko, Alessa Ola, Oyama Tokitaka, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Tani Akio	4. 巻 13
2. 論文標題 Siderophore for Lanthanide and Iron Uptake for Methylo-trophy and Plant Growth Promotion in <i>Methylobacterium aquaticum</i> Strain 22A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 921635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.921635	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 Alessa Ola, Ogura Yoshitoshi, Fujitani Yoshiko, Takami Hideto, Hayashi Tetsuya, Sahin Nurettin, Tani Akio	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive Comparative Genomics and Phenotyping of <i>Methylobacterium</i> Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 740610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.740610	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 methylo-trophy 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 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 Tani Akio, Masuda Sachiko, Fujitani Yoshiko, Iga Toshiki, Haruna Yuuki, Kikuchi Shiho, Shuaile Wang, Lv Haoxin, Katayama Shiori, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Kato Junichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolism-linked methylotaxis sensors responsible for plant colonization in <i>Methylobacterium aquaticum</i> strain 22A	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1258452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.1258452	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tani A., Iga T., Haruna Y., Kikuchi S., Masuda S., Fujitani Y., Kato J.
2. 発表標題 Metabolism-linked methanol chemotaxis in <i>Methylobacterium aquaticum</i> strain 22A.
3. 学会等名 International society of microbial ecology 18 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久田健司、野村颯人、根本侑知、水野洸介、三井亮司、谷明生、井口博之、清水将文、島田昌也、中川智行
2. 発表標題 ランタノイド依存型C1細菌の植物共生と生育促進技術への応用
3. 学会等名 2022 日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋莉史, 矢野嵩典, 谷明生, 中川智行, 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 のメタノールデヒドロゲナーゼアイソザイムの発現制御に関わる二成分制御系の解析
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Patrick Juma, Ola Alessa, Yoshiko Fujitani, Tokitaka Oyama, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Akio Tani
2. 発表標題 Functional analysis of siderophore in <i>Methylobacterium aquaticum</i> 22A.
3. 学会等名 Phyllosphere Fortnight 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Alessa O., Ogura Y., Fujitani Y., Hayashi T., Sahin N., Tani A.
2. 発表標題 Comparative genomics and phenotyping approach on <i>Methylobacterium</i> species.
3. 学会等名 Phyllosphere Fortnight 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷 明生
2. 発表標題 植物表層共生細菌の生態と応用
3. 学会等名 第2回生物刺激制御研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ola Alessa, Yoshitoshi Ogura, Yoshiko Fujitani, Hideto Takami, Tetsuya Hayashi, Akio Tani
2. 発表標題 Comparative genomic analysis of the pink pigmented facultative methylotrophs (PPFMs)
3. 学会等名 Galaxy online meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

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ーフ細菌Arthrobacter 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・関西支部合同大会 (第60回講演会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ola Alessa, Yoshitoshi Ogura, Yoshiko Fujitani, Hideto Takami, Tetsuya Hayashi, Nurettin Sahin, Akio Tani
2. 発表標題 Genomic insights into the PPFMs phylogeny and unique features
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会 (第60回講演会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池志保, 藤谷良子, 加藤純一, 谷明生
2. 発表標題 メチロバクテリウム属細菌におけるメタノール走化性の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会 (第60回講演会)
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Methylorubrum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 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加地奏絵、川端和弥、片山志織、谷明生、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 Methylobacterium sp. OR01株におけるメタノール走化性に関わるMCPタンパク質の同定
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Methylorubrum extorquens 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 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Arthrobacter 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 菊池 志保、藤谷 良子、加藤 純一、谷 明生
2. 発表標題 Methylobacterium aquaticum 22A株におけるメタノール走化性の分子機構の解明
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 井内敦子, 飯野隆夫, 朝比奈雅志, 谷明生, 成川(奈良)恵, 市橋泰範, 大熊盛也, 安部洋, 小林正智
2. 発表標題 メチロバクテリウムがシロイヌナズナの形質に及ぼす影響とその共生作用
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷良子, 柴田猛, 谷 明生
2. 発表標題 Methylobacterium aquaticum 22AにおけるLanmodulinの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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