

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580122

研究課題名(和文)植物共生メタノール資化性細菌の葉上における生存戦略に関する研究

研究課題名(英文)Study of plant symbiotic methylotrophic bacteria

研究代表者

三井 亮司(MITSUI, Ryoji)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60319936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：メチロトロフと呼ばれるC1化合物資化性菌はメタノールなどのC1化合物を炭素源として生育するが、長く環境中でのメタノールの供給源ははっきりしていなかった。近年、植物から多量のメタノールが放出されていることが明らかになり、植物とメチロトロフとの関係が広く知られるようになってきた。本研究では植物葉上や根圏に生育するメタノール資化性細菌が互いに化学物質を介してコミュニケーションしており、これにより植物上で共生関係を築くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Methanol-utilizing bacteria, methylotroph, are distributed widely into environment, however the source of methanol in environment have been unclear for a long time. It was recently reported that the plants released a large amounts of methanol into the environment by hydrolyzing pectin methyl ester in around cell wall with growing. And that is utilized by methylotrophic bacteria for carbon or energy source. Furthermore, that is utilized as a mediator for symbiosis between plants and methylotroph. In this study, we tried to understand the symbiotic relationship between plants and methylotrophic bacteria. We studied some substances as symbiotic materials such as pyrroloquinoline quinone (PQQ), CO₂ and metal ions (especially calcium and rare earth elements) for exchange between plants and methylotrophic bacteria.

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：メチロトロフ細菌 Methylobacterium PQQ 希土類元素 共生 二酸化炭素 カルビンサイクル

1. 研究開始当初の背景

植物と微生物の関係は、古くより根圏でのマメ科に共生する根粒菌等が知られている、さらに近年、根粒菌だけに限らず、これら細菌群が分類されるプロテオバクテリアの多くが植物と深い関係にあることが徐々に明らかになりつつある。例えば植物葉上において大勢を占めることが報告されている *Methylobacterium* 属やその近縁のメタノール資化性細菌もプロテオバクテリアに属し、植物との共生に関する研究報告も見られるようになってきた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では植物と微生物の相互共生関係を媒介する物質に着目し、植物-微生物間の相互作用の解明を目的とした。メタノールに加えてピロロキノリンキノン(PQQ)や二酸化炭素に加え、新たにランタンやセリウムなどのレアアースが重要な役割を持つことが明らかになってきたことから菌株内で果たす役割を明らかにすることを試みた。

(1) 共生関係をつなぐ物質の検討

メタノール

メタノール資化性細菌にとっての植物共生のメリットは植物細胞が伸張・分裂する際に細胞壁構成成分であるペクチンが分解され、著量のメタノールが葉上より排出されることであると考えられる。植物から放出されるメタノールは地球上で1年間に1億トン以上と見積もられており、メタノール資化性細菌は、葉上に放出されるメタノールを炭素源としてしていると考えられる。このように、植物と微生物の共生関係は何らかの物質を介して行われると考えられる。例えばメタノール資化性細菌側からは、メタノール獲得戦略として、生育促進やメタノールの放出を促す物質を生産していることが推察される。本研究では上図に示すように、植物葉上でメタノール

ル資化性細菌がこれらの物質を利用して共生関係を構築している可能性を検討した。この関係を明らかにすることにより微生物側からの植物へ細胞伸長や分裂の誘導を促す物質の役割が明らかになり、メタノール資化性細菌を利用した植物の生育促進といった微生物肥料、農薬への応用が期待できる。

二酸化炭素

植物が放出するメタノールを有効に利用し、生育するために植物周辺で生育する菌株の中には独立栄養型の生育をするものが見られる。このことからメタノールをエネルギー源として二酸化炭素をリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ(RubisCO)により固定することが遺伝子構造から示唆される *Acidomonas methanolica* MB58 株について関連する酵素や遺伝子発現解析を行うことを目的とした。

(2) 共生菌のスクリーニングと応用

植物に微生物がアプローチする手段と考えられる種々の物質が同定されている。これらの応用面を考慮するため植物との共生関係を構築している多様なメタノール資化性細菌をスクリーニングし、分類することによりライブラリーを作成することを検討した。

3. 研究の方法

(1) 共生関係をつなぐ物質の検討

メタノール酸化系の解析

本研究においては *Methylobacterium* 属のモデル性物として多くの機関で使用されている *Methylobacterium extorquens* AM1 を用いた。 *M. extorquens* AM1 株の遺伝子破壊株を作製し、表現系に及ぼす影響などを確認した。

二酸化炭素(メチロトロフィックオートトロフィー)

二酸化炭素固定と植物由来メタノールの関係を明らかにするため *Acidomonas methanolica* MB58 株を用いた。この菌株はメ

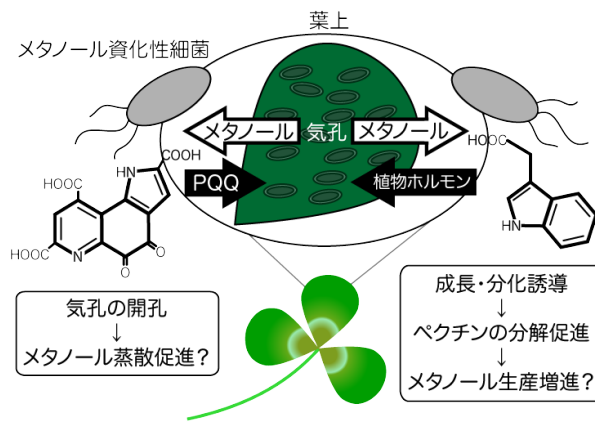


図1 メタノール酸化性菌の葉上での生存戦略

メタノール代謝系をコードする遺伝子の下流に RubisCO とそれに関与する遺伝子が局在しており、この菌株の生育や酵素の解析、及び遺伝子発現を調べることで二酸化炭素の固定とメタノール代謝との関係を明らかにすることを試みた。

(2) 共生菌のスクリーニングと応用

主に岡山理科大学キャンパスの植物サンプルを分離源として、メタノールに生育する *Methylobacterium* を分離し、菌の生育特性およびリボゾーム RNA 遺伝子をもとに分類した。本研究では土壌や葉上の希土類との関係が深いことが明らかになってきたことからランタンを加えた効果を生育から Growth Promotion Effect Value (GPE 値) として定義し、遺伝的分類と合わせて考察した。

4. 研究成果

(1) メタノール生育の多様性

系はすでに明らかにされており、様々な研究結果が報告されている。私たちはゲノム構造がすでに明らかにされている *Methylobacterium extorquens* AM1 を用いて植物から放出されるメタノールを獲得する手段を検討する上で AM1 株のゲノム中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 (MxaF) のホモログ (XoxF1, F2) が存在することに着目した。MxaF はカルシウムを補因子とするのに対して、このホモ

ログ遺伝子がランタン、セリウム、ネオジウム、プラセオジウムといった希土類元素を補因子として活性化する新規なメタノールデヒドロゲナーゼであることを見いだした。土壌中にはこれらの元素が高い濃度ではないものの広範に分布していることが知られており、*Methylobacterium* 属細菌が土壌から発芽に伴い葉上へ移行するための多様性を持っているのではないかと考えている。

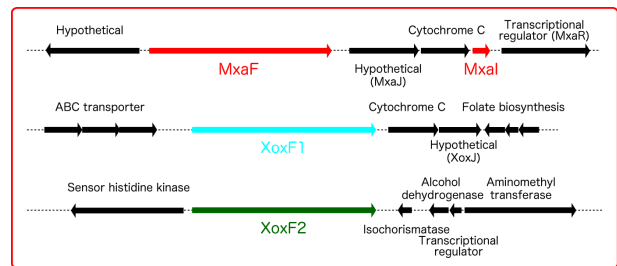


図2 ホモログ遺伝子の構造

(2) メチロトロフィックオートロフィー

土壌微生物にとって豊富な炭素源を土壌中より得ることは難しく、ある種の微生物は二酸化炭素を炭素源として独立栄養的に生育していることが知られている。これらの微生物は二酸化炭素を固定するために必要なエネルギーを水素や金属を酸化することにより得ていることが知られている。本研究において対象とした *Acidomonas methanolica* MB58 の C_1 代謝関連の遺伝子を明らかにしたところ、メタノール代謝に関係する遺伝子の下流に二酸化炭素を固定するためのカルビンサイクルの遺伝子群が局在していることが明らかになった。これらのメタノール代謝との役割を明らかにするため酵素活性や mRNA の発現を確認したところ、生育初期にメタノールをエネルギー源として二酸化炭素を固定して生育が始まり、その後 C_1 代謝系を活性化して生育することが明らかになった。メチロトロフィックオートロフィーと呼ばれるメタノールをエネルギー源として二酸化炭素を固定する菌株は他にも知られているが、このように二種の代謝を使い分ける経路が報告されるのは初めてであり、オート

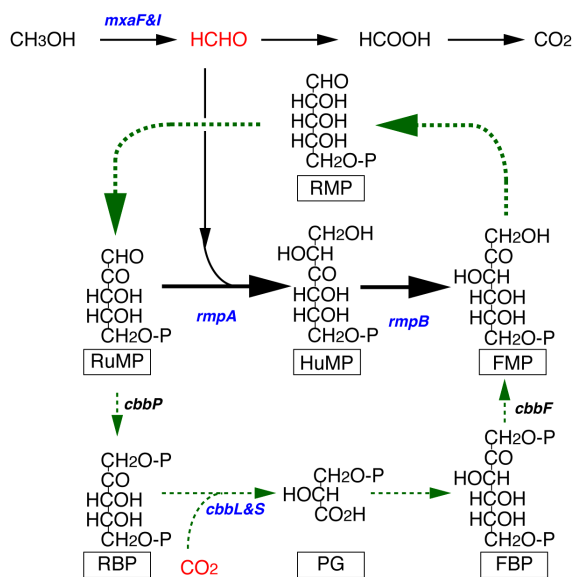


図 3 A. *methanolic* MB58 の代謝系

トローフがメタノールを資化する経路を獲得したものと推測される点で興味深いと考えられる。

(3) 希土類依存型生育を示す *Methylobacterium* 属のスクリーニングと分類。

先に述べたように *Methylobacterium extorquens* AM1 は、Ca 依存型メタノールデヒドロゲナーゼである MaxF を使用しメタノールを資化している。しかし、XoxF1 が、レアアース元素である La を添加することで MxaF と同様の効果を示し、MDH 活性が向上していることが明らかとなったことや *Methylobacterium* 属は植物葉上に多数生息しており、植物葉上にも土壌中と比べると低いものの約 200~1400 nmol/g-leaf (dry) 存在することが確認されている。そこで植物の葉からメタノールを生育炭素源とする細菌をスクリーニングし、約 50 株取得した。取得した菌株を、La を含むメタノールを炭素源とする培地で生育させたところ、La 添加時の生育が非添加時より上昇する菌株と、La を添加しても生育が変わらない菌株が確認できた。これらの生育の違いを示す方法として定常状態の生育濁度比を GPE (Growth Promotion Effect) 値として表した。さらに取得した菌

株の 16SrRNA 配列に基づき作成した系統樹を比較したところ、GPE 値の高い菌株が一つのクラスターになることが明らかとなった。今後、これらの菌株の希土類への応答機構が明らかになることを期待している。

自然界において植物と微生物の共生関係を構築する上で、メタノールに加えていくつかの物質が関与していることが示唆された。植物の生育を促進させるために微生物側から供給する PQQ や植物ホルモンに加え、土壌中や葉上に存在する希土類元素や二酸化炭素も重要な役割を果たしていると考えられる。今後メタノールを媒介物質とする植物と微生物の相互作用を土壌微生物も含めて検討することにより、農業分野への応用へつながることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Nakagawa, R. Mitsui, A. Tani, K. Sasa, S. Tashiro, T. Iwama, T. Hayakawa, K. Kawai, A Catalytic Role of XoxF1 As La³⁺-Dependent Methanol Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1, PLoS ONE(査読有), 7, 2012, e50480.

〔学会発表〕(計 16 件)

日比野歩美 三井亮司 谷明生 田代晋也 早川享志 中川智行
*Methylobacterium extorquens*のメタノール生育におけるレアアース要求性とその役割, 日本農芸化学会2014年03月29日 明治大学

三井亮司 峰松由季 桑原朋代 中川智行 谷明生 田中三男, メチロトローフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1の希土類に対するメタノールデヒドロゲナーゼ応答機構 日本農芸化学会, 2014年03月28日 明治大学

阿野嘉孝 大久保慎二 丸山雅史 三井亮司, メチロトローフ酢酸菌 *Acidomonas*

*methanolic*におけるジヒドロキシアセトン
生産, 日本農芸化学会, 2014年03月28日 明
治大学

関謙二郎 包智華 三井亮司 谷明生 増
田幸子 三井久幸 南沢究, 光合成
*Bradyrhizobium*属のメタノール依存的な生育
に及ぼす希土類元素の影響 微生物生態学会
2013年11月23日 鹿児島

Kiwamu Minamisawa, Zihua Bao, Kenji
Seki, Dongyan Liu, Susumu Asakawa, Haruko
Imaizumi-Anraku, Kazuhiro Sasaki, Seishi
Ikeda, Akio Tani, Sachiko Masuda, Ryoji
Mitsui, Takashi Okubo, Rice methanotrophic
diazotrophs as non-legume rhizobia, 18th
International Congress on Nitrogen
Fixation, 2013年11月17日 宮崎

Ryoji Mitsui, Masaki Adachi, Sachiko
Masuda, Akio Tani, Kiwamu Minamisawa,
Mitsuo Tanaka, Rare earth
elements-dependent methylotrophic
autotrophy of *Bradyrhizobium japonicum*
USDA11018th International Congress on
Nitrogen Fixation, 2013年11月16日 宮崎

日比野歩美, 三井亮司, 谷明生, 田代晋也,
早川享志, 中川智行, レアアースはメチロト
ローフ細菌のメタノール生育の鍵因子である,
日本農芸化学会, 2013年10月12日 名古屋大
学

日比野 歩美, 三井 亮司, 谷 明生, 田代
晋也, 早川 享志, 中川 智行
*Methylobacterium extorquens*のメタノール
代謝におけるレアアースの特異性と役割, 日
本生物工学会, 2013年9月18日 広島国際会議
場

三井亮司, 植物と共生するメタノール資化
性菌のC₁代謝, 東北大学セミナー(招待講演)

微生物のC₁代謝と化学独立栄養, 2013年8月5
日 東北大学生命化学研究科

山浦瑞穂 日比野歩美 桑原朋代 中川智行
田中三男 三井亮司, 植物由来
*Methylobacterium*属細菌のメタノールによる
生育に及ぼすレアアース元素の添加効
果, 日本農芸化学会, 2013年01月26日 高知
大学

高橋誠治 田中三男 三井亮司, *Paracoccus
denitrificans* NBRC13301の分子育種による
新規代謝系の構築と生育への影響, 日本農芸
化学会, 2013年01月26日 高知大学

Ryoji Mitsui, Hiroko Katayama, Mitsuo
Tanaka, Requirement of carbon dioxide for
initial growth in facultative methylotroph,
Acidomonas methanolica MB58, Gordon
Research Conference, 2012年8月5日, Bates
College (ME, USA)

三井亮司 松崎亮平 大谷由紀 田中三男,
Bradyrhizobium japonicum USDA110のLa³⁺依存
型のメタノール生育と根粒形成に関する研究,
日本農芸化学会, 2012年03月26日 東北大学

田代晋也, 三井亮司 谷明生 佐々健太郎 岩
間 智徳 早川享志 中川智行 河合啓一, メチ
ロトローフ細菌*Methylobacterium
extorquens*のレアアース依存的メタノール代
謝における*xoxF*の機能的役割, 日本農芸化学
会, 2012年3月25日 京都女子大学

三井亮司 河野和也 堀内功典 藤井正 福士
勝 田中三男, *Rhodospiridium paludigenum*
VMA4の生産するパニリルマンデル酸脱水素酵
素の解析と神経芽細胞腫スクリーニングへの
応用日本農芸化学会, 2012年3月24日 京都女
子大学

三井亮司 片山寛子 田中三男, 通性メチロ
トローフ細菌*Acidomonas methanolica* MB58
の生育に及ぼす二酸化炭素の影響, 日本生物
工学会, 2011年9月26日 東京農工大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 亮司 (MITSUI, Ryoji)
岡山理科大学・理学部・准教授
研究者番号: 60319936

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

田中 三男 (TANAKA, Mitsuo)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号: 40026571

(4) 研究協力者

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

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