

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660074

研究課題名(和文)メタノールをメディエータとした微生物と植物間の新しい相互作用モデルの確立

研究課題名(英文) Study of lanthanides-dependent methylotrophic growth of microbe-plant symbiosis in phyllosphere and rhizosphere.

研究代表者

三井 亮司 (Mitsui, Ryoji)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：60319936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生育に伴い放出されるメタノールが葉上・根圏の微生物群にとって重要な役割を持つことを明らかにしてきた。本研究課題では軽ランタノイド(ランタン・セリウム・プラセオジウム・ネオジウム)が土壌に広範に分布し、メタノール資化性細菌の初発酵素メタノールデヒドロゲナーゼの補欠因子となっていることに着目した。植物葉上優占種Methylobacterium属細菌や窒素固定マメ化植物根粒形成菌がランタノイドの存在下で植物から放出されるメタノールをメディエータとして利用し、植物との共生関係を構築していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)： This study, which focused on the large quantity of methanol produced by the demethylation of plant pectin present in the primary cell wall, showed that methanol is emitted as one of the plant root exudates. This methanol may contribute to the formation of specialized microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere. Methylotrophic bacterium Methylobacterium spp, which were detected at high frequencies on leaves, and nodule formation and nitrogen fixation bacterium, Bradyrhizobium spp., possess lanthanides-dependent methanol dehydrogenase. The results in this study suggested that lanthanide-dependent methanol dehydrogenase contributed not only to methylotrophic growth but to recognition of habitat environment for microbe-plant symbiosis.

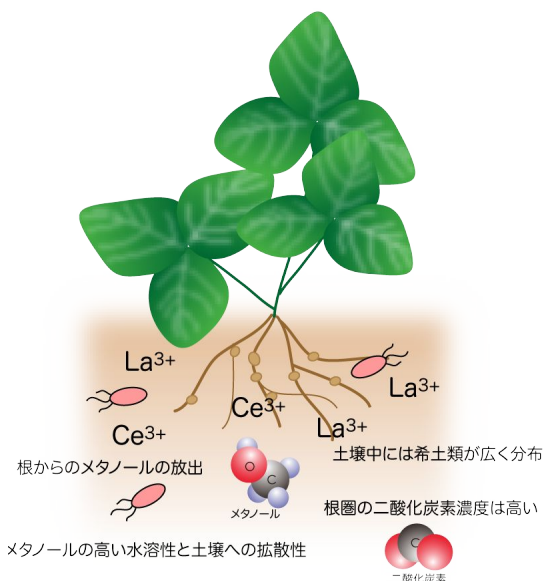
研究分野：応用微生物学

キーワード：methylotroph methanol plant symbiosis lanthanides carbon dioxide

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタノールなどの C_1 化合物を資化する微生物 (メチロトローフ) は古くから知られており、 C_1 化合物代謝系は詳細に解析されている。その一方で、自然界におけるメタノールの供給源は、これまではっきりとしていなかった。しかし、近年では、植物細胞の生長伸長に伴うペクチンメチルエステルの加水分解によりメタノールが放出され供給源となっていることが明らかになりつつあった。このことから植物とメチロトローフの相互作用が注目され、*Methylobacterium* 属細菌が、植物の葉上でメタノールを得て植物側には細胞伸長を促す植物ホルモンなどを供給する相利共生システムがあることを示唆する報告がなされていた。



自然界ではメタノールによる根圏微生物の集積が起きている?

図1 ランタノイドと植物共生細菌

2. 研究の目的

私たちは自然化における植物と微生物の新たな相利共生メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に細菌由来のタンパク質として植物葉上で頻度高く検出される機能未知であった XoxF に着目し、*M. extorquens* AM1 においてこの XoxF が La^{3+} (ランタン) Ce^{3+} (セリウム) ほか数種のレアアースと呼ばれるランタノイドを補欠分子とする新奇なメタノール酸化酵素であることを初めて見いだした。さらに従来、メチロトローフと考えられていなかった多くの菌株に XoxF のホモログ遺伝子が存在することを見いだした。これらの菌株は La^{3+} を加えることでメタノール酸化酵素が活性化

されることが考えられた。しかし、XoxF の機能が明らかになったことにより、より広範な植物周辺環境でメタノールを媒介物質 (メディエータ) とした新奇なメチロトローフ細菌が生育出来る環境が存在していることが考えられた。そこで本申請課題では自然界における植物根圏土壌を中心とした新奇なメチロトローフ細菌の生育モデルを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

共生を媒介する植物生理活性物質
メタノール資化性細菌は植物ホルモモンをはじめとする植物生理活性物質を生産することが知られており、植物の成長・分化を促す。植物葉上での生育環境を研究室内での培養条件に反映させることにより、メタノール資化性細菌が菌体外に放出する物質の分泌条件を物質レベル、および遺伝子レベルで検討し、植物-微生物間のクロストークに關与する物質である可能性を明らかにした。

植物共生土壌細菌とオートτροφイックメチロトローフ

植物共生型メタノール資化性細菌の生育におよぼす CO_2 の影響を明らかにするため、根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 をモデルとしたメチロトローフ型の独立栄養生育について検討した。また、生育に關与する代謝系を明らかにするため各種酵素の活性測定、及び遺伝子破壊株を使用した表現系解析を行った。

4. 研究成果

共生を媒介する植物生理活性物質

・PQQ

メタノールを単一炭素源とした培地に La を添加し *Methylobacterium* 細菌の培養を行いその培養液中に含まれる PQQ を HPLC により測定した。その結果、 La^{3+} の添加時と非添加時では PQQ の生産量に大きな差が見られた。また、RT-qPCR を行い PQQ 生合成遺伝子の発現量を確認したところ La 添加培養では PQQ 生合成遺伝子の発現量が少なく、 La^{3+} 非添加培養では発現量が多く確認できた。培養液中に放出される PQQ 量と同じ傾向を示したことから PQQ 生合成遺伝子は La^{3+} によって制御されている事が考えられた。PQQ の La^{3+} に依存した分泌調節の結果などより *Methylobacterium* 属は土壌中に存在する La^{3+} や Ce^{3+} 等のランタノイドを環境

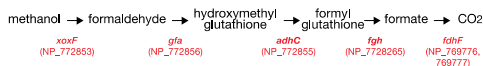
シグナルとして利用していると推測される。PQQ は *M. extorquens* AM1 を用いてメタノールを炭素源とし、葉上環境を意図する La³⁺非存在下で培養すると培養液中に分泌されるが、土壌環境を意図する La³⁺濃度が高い条件で培養を行った場合はほとんど菌体外に分泌されなかったと推定される。

・ポリアミン

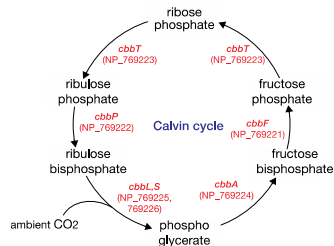
PQQ 同様にプトレシンなどのポリアミンが植物との共生に関与していることを推定し、*M. extorquens* AM1 のポリアミン分泌にかかわることが推定されるポリアミンパーミアゼ(PPase)に着目した。メタノールを炭素源として培養した菌体の PPase 遺伝子発現量を RT-qPCR を用いて測定し、コハク酸を用いて培養した菌体と比較した。この結果、PPase 遺伝子はメタノールにより誘導されていることが明らかになった。しかし PQQ 生合成系遺伝子とはことなり、La³⁺による分泌量の調節は見られなかった。ポリアミンが植物細胞の細胞分裂に対して促進活性があることなどから、土壌、葉上に限らず分泌していることが推定された。

植物共生土壌細菌とオートトロフィックメチロトロフ
大豆に共生する根粒菌である *B.*

Methanol oxidation



CO₂ fixation



C1 assimilation (incomplete)

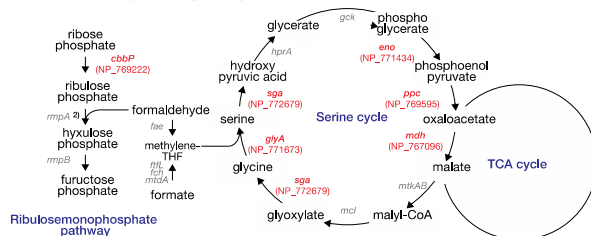


図2 ゲノム構造から予測される *B. diazoefficiens* USDA110 の代謝経路
赤字はゲノム上で見いだされたもの。グレーは欠損しているもの。
diazoefficiens USDA110 が La³⁺存在下でメタノールに生育可能であることを示した。

ゲノム情報からは一般的なメチロトロフ細菌の資化系(セリン経路またはリブロースマノリン酸経路)ではなく、メタノールをエネルギー源とするカルビンサイクルによる独立栄養生育を行っていると考えられた。そこでメタノール代謝の鍵となる酵素の活性測定法を確立し、メタノールによる誘導の有無を調べることにより、土壌中でメタノールに対する応答を明らかにすることができた。また、すでに構築している遺伝子破壊株を用いた生育に及ぼす影響を検討した結果、La³⁺存在下でメタノールをエネルギー源として二酸化炭素を炭素源とする独立栄養型の生育をしていることを明らかにした。一般に大気と比較して根圏では二酸化炭素濃度が高いので二酸化炭素濃度を利用して、植物根より放出されるメタノールをエネルギー源としていることが示唆された。

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)

中川智行, 三井亮司, 谷明生, 河合啓一, アースを必須因子として要求する新たな代謝系-植物共生細菌たちが持つレアアース依存型 C1 代謝-, 化学と生物(査読無), 53, 744-750, 2015

Ryoji Mitsui, Hiroko Katayama, Mitsuo Tanaka. Requirement of carbon dioxide for initial growth of facultative methylothrop, *Acidomonas methanolica* MB58, Journal of Bioscience and Bioengineering(査読有), 120, 1, 31-35 2015

Tomoyuki Nakagawa, Ryoji Mitsui, Akio Tani, Ayumi Hibino, Kentaro Sasa, Shinya Tashiro, Tomonori Iwama, Takashi Hayakawa, Keiichi Kawai. Physiological role of methanol dehydrogenase depending on rare earth elements in the methylothropic

bacterium, Proceeding of the 16th AAAP Animal Science(査読無), 2, 2703-2706, 2014

Novita Kurniawati, Ryoji Mitsui, Akio Tani, Nanung Agus Fitriyanto, Ambar Pertiwinigrum, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa, Keiichi Kawai. Symbiotic nitrogen-fixing soil bacterium has an ability of methanol utilization depending on rare earth elements. Proceeding of the 16th AAAP Animal Science(査読無), 2, 2699-2702, 2014

〔学会発表〕(計16件)

菅沼 宗矢, 王 倫, 日比野 歩美, 三井 亮司, 谷 明生, 海老原 章郎, 早川 享志, 中川 智行. 根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 由来レアース依存的メタノール脱水素酵素の酵素科学的性質, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 03 月, 京都女子大学

宇都宮大貴, 山本麻衣子, 三井亮司, 阿野嘉孝. *Acidomonas* 属酢酸菌のレアースに対する応答, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 03 月, 京都女子大学

林 謙一郎, 舩越 惇, 本瀬 宏康, 福井 康祐, 三井 亮司. 代謝活性化を利用したオーキシン応答の細胞選択的な制御システムの構築, 植物化学調節学会, 2016 年 10 月, 高知

菅沼 宗矢, 王 倫, 日比野 歩美, 三井 亮司, 谷 明生, 海老原 章郎, 早川 享志, 中川 智行. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 由来 REE 依存型メタノール脱水素酵素の酵素化学的諸性

質, 日本生物工学会 2016 年度大会, 2016 年 09 月, 富山国際会議場

田中 美知留, 矢野 裕之, 田中 三男, 三井 亮司. *Methylobacterium extorquens* AM1 による植物生理活性物質の分泌と植物共生, 日本生物工学会 2016 年度大会, 2016 年 09 月, 富山国際会議場

一小路 貴士, 矢野 裕之, 中川 智行, 谷 明生, 田中 三男, 三井 亮司. *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素のアイソザイムに関する研究, 日本生物工学会 2016 年度大会, 2016 年 09 月, 富山国際会議場

菅沼 宗矢, 日比野 歩美, 海老原 章郎, 岩本 悟志, 谷 明生, 三井 亮司, 早川 享志, 中川 智行. *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 のレアースに対する発現応答と性質 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 03 月, 札幌

三井 亮司, 矢野 裕之, 一小路 貴士, 田中 美知留, 田中 三男. *Methylobacterium* 属細菌の Ca を葉上シグナルとする PQQ 分泌機構の解析, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 03 月札幌

一小路 貴士, 峰松由季, 中川 智行, 谷 明生, 田中 三男, 三井 亮司. *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノールデヒドロゲナーゼアイソザイムが植物共生に果たす役割, 日本生物工学会 2015 年度大会, 日本生物工学会 2015 年 10 月, 鹿児島

矢野 裕之, 高濱絵里香, 田中三男, 三井 亮司. 植物葉上より分離した *Methylobacterium* spp. の系統解析とカル

シウム依存的 PQQ 分泌機構の解析, 日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会, 2015 年 09 月, 愛媛大学

奥田洋、矢野裕之、柴原浩誠、大戸信明、田中三男、三井亮司。植物由来 *Methylobacterium* 属のスクリーニングと PQQ 生産性の解析, 日本農芸化学会中四国支部例会, 2015 年 06 月, 鳥取大学

日比野歩美, 海老原章郎, 谷明生, 三井亮司, 早川享志, 中川智行, *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 の温度安定性は補因子であるレアアースの種類に依存する日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 03 月, 岡山大学

日比野歩美, 山浦瑞穂, 早川享志, 中川智行, 田中三男, 三井亮司, *Methylobacterium* 属細菌の REE 依存的メタノール代謝は自然界に広く分布している, 日本農芸化学会中部支部例会, 2014 年 09 月, 名古屋大学

日比野歩美、山浦瑞穂、早川享志、中川智行、田中三男、三井亮司、レアアース依存的メタノール代謝は *Methylobacterium* 属細菌に普遍的な能力か? 日本生物工学会 2014 年度大会 2014 年 09 月, 札幌コンベンションセンター

松本友希, 田中三男, 三井亮司。新規に分離した希土類依存型メタノール酸化性菌 *Arthrobacter* sp. YM1 株の生育と代謝関連酵素の研究, 日本生物工学会 2014 年度大会 2014 年 09 月, 札幌コンベンションセンター

Ryoji Mitsui, Sachiko Masuda, Akio Tani, Kiwamu Minamisawa, Mitsuo Tanaka.

Rare earth elements- dependent methylotrophic autotrophy of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, Gordon Research Conferences, 2014 年 08 月, 米マサチューセッツ州

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・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・応用生命科学部・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

南澤 究 (MINAMISAWA, Kiwamu)
東北大学・生命科学研究所・教授
研究者番号: 70167667