

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04476

研究課題名(和文)ランタノイド依存メタノール脱水素酵素の多様性と制御機構の解明

研究課題名(英文)Variety and regulation of lanthanide-dependent methanol dehydrogenases

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Methylobacterium属細菌が持つ複数のメタノール脱水素酵素(MDH)の個々の役割を遺伝学的に調べ、カルシウム依存型MDHであるMxaFとランタノイド(Ln)型MDH、XoxF1がメタノール、エタノールでの生育に必須であること、他のADHがプロパノールなどのアルコールへの生育に関与することが分かった。またMxaF、XoxF1の発現切り替え機構に関わるMxbdタンパク質について遺伝学的解析を行い、MxbdがMxaFの発現に必要であること、XoxFの発現には必要無いこと、またMxbdのHAMPドメインにおける自然突然変異がMxaF発現のXoxF発現依存性を解除することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We genetically analyzed the function of multiple methanol dehydrogenase (MDH) -like genes in Methylobacterium species. It was found that Ca-dependent MDH, MxaF and Ln-dependent MDH, XoxF1 were necessary for the growth on methanol and ethanol. Another alcohol dehydrogenase is involved in propanol oxidation. In addition, genetic analysis on Mxbd that acts as lanthanide-switch for the expression of mxaF and xoxF has been done. Mxbd is necessary for mxaF expression but not for xoxF expression, and spontaneous mutation in HAMP domain in the protein releases the repression of mxaF expression by the presence of XoxF.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メタノール ランタノイド メチロトロフ

1. 研究開始当初の背景

植物は地球上で年間1億トンという莫大な量のメタノールを気孔を通じて排出している。*Methylobacterium* 属細菌はこのメタノールを利用して生育し、植物表面において総細菌中の10-20%を占める、重要な共生菌の一種である。植物の生育を促進する種も知られ、生育促進機構についても大きく注目されている。また植物上での生態のみならず、本属細菌は細菌によるメタノール代謝のモデル生物としても長年研究されてきたため、メタノールの代謝に関わる酵素・遺伝子群はほぼ網羅的に研究され尽くした感があった。ところが近年、これまでの生物学の常識を覆す酵素が本属細菌に見つかった。

本属細菌はメタノールをメタノール脱水素酵素【MDH】によって酸化する。MDHは補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)と、通常カルシウム【Ca】を補欠分子属として持っている。このMDHはMxaF遺伝子にコードされ、MxaF破壊株は当然ながらメタノールへの生育能を失う。一方、本属細菌ゲノムにはXoxF1、XoxF2という、MxaFと50%程度の相同性を持つMDHホモログが存在し、その機能は長らく謎であった。というのは、XoxF1遺伝子破壊株はメタノールに生育しないにもかかわらず、発現精製したXoxF1タンパク質に全くメタノール酸化酵素活性が見いだされていなかったからである。

近年私たちは、本属のモデル細菌である *M. extorquens* AM1株において、MxaFがCa依存の酵素であるのに対して、XoxF1はランタン【La】、セリウム【Ce】などのランタノイド【Ln】を利用する酵素であること、MxaF破壊株がLa存在下でXoxF1によってメタノールに生育することを、初めて証明した(PLoS One 7, e50480, 2012)。

Lnは、希土類元素またはレアアースに含まれ、その名によらず、天然にはある程度幅広く存在しており、決して「レア」な元素ではない。地殻中の含量は、生物が必要とするモリブデンや亜鉛、コバルトと同程度(数十ppb)含まれている。Lnは磁石などの物質の性質を微量で大きく変えることから産業のビタミンと呼ばれるなど、工業的には重要な元素である。しかし、生物学的な意義として、むしろCa依存酵素の阻害剤として用いられるなど、生物にとって重要な元素であると全く考えられて来なかった。本属細菌のLn依存MDHの研究は、新たな微生物機能、新たな金属の生物における機能を解き明かす上で初めてのモデルケースとして生物学的に

極めて重要である。

2. 研究の目的

Methylobacterium 属細菌はCaとLnの金属のavailabilityに応じてMxaFとXoxF1を使い分けられていると考えられる。その切り替え機構はどのようになっているのだろうか。MxaF遺伝子発現の制御は非常に複雑であり、MxaFタンパク質の成熟にも多くの因子が関与する。それに対してXoxF1遺伝子の近傍にはMxaFほどその成熟に関与しそうな遺伝子は存在しない。この切り替え機構を明らかにするためにはMxaF、XoxF1制御機構の詳細を明らかにする必要がある。

申請者はエゾスナゴケから分離した *M. aquaticum* 22A株を用いている。本株はコケだけでなく幅広い種子植物に生育促進効果を示しており(PloS One 8, e33800) 生育促進のモデル菌として扱っている。本株においてもMDHとしてMxaFとXoxF1,2の遺伝子の存在を確認し、それらの破壊株はAM1株と同様のフェノタイプを示すことを確認した。

興味深いことに、22A株にはMxaF、XoxF1,2以外にそれらのホモログがさらに3つ(計6つ)存在することが分かった(AM1株には計5つ)。これらは系統解析によって、PQQ依存エタノール脱水素酵素に属すると考えられた。これらのアミノ酸配列には、CaではなくLnを結合しうるXoxF1型のモチーフが保存されていた。すなわち、本属細菌はメタノール以外の基質を酸化するPQQ酵素として、XoxF1以外にもLn依存酵素を持つ可能性があった。その基質特異性や金属要求性は不明であり、MxaF、XoxF1,2との機能的冗長性や調節も全く分かっていない。もちろん、植物上での生育に重要なのかも分かっていない。

本研究の目的は *Methylobacterium* 属細菌におけるCa依存MxaF、Ln依存XoxF1遺伝子の切り替え機構、および、22A株に見いだした他のMDH様脱水素酵素の性質を明らかにすることとし、最終的には、何故いくつものMDHを持つのか、それらの金属要求性が異なるのは何故か、そしてそれらの環境における役割は何か、という疑問に答えを見いだす。また、XoxFはMxaFよりも多くの微生物ゲノムに存在することが分かっていることから、Ln依存的にメタノールを利用できる細菌の存在が示唆される。そこで、Lnを要求するメタンあるいはメタノール資化性細菌のスクリーニングも行った。

3. 研究の方法

(1) 6つのMDH様酵素遺伝子の役割

22A株において6つのMDH様酵素遺伝子について、それぞれの単独遺伝子欠失株、それぞれのみを残した単一遺伝子保持株を作製した。これらの株をメタノール、エタノール、プロパノール、グルコースにランタンの有無の条件で培養し、生育特性を調べた。

(2) XoxF表現型抑制変異株の解析

XoxF遺伝子欠失株はLn型MDHであり、かつCa型MDHであるMxaF遺伝子の発現に必要であることから、XoxF遺伝子欠失株はLnの有無に関わらずメタノールに生育しない。意外なことに本変異株からメタノールへの生育が回復した自然突然抑制変異株が分離できた。これらのゲノムを解析し、変異の原因を調べた。

(3) Ln依存メチロトロフの探索

XoxF遺伝子はMxaFよりも多くの微生物ゲノムにコードされていることから、Lnの存在に依存する微生物の存在が示唆された。そこでイネ根圏等からLn存在下でメタンに生育する細菌を集積培養し、Ln依存性細菌をスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) 6つのMDH様酵素遺伝子の役割

6つのMDH様酵素遺伝子の機能について、以下のことが明らかになった。MxaFはカルシウム依存のMDHであり、その発現はXox1Fの存在に依存する。XoxF1はLn依存のMDHであり、単独でも機能するがカルシウムは補因子としない。またこれらはエタノールでの生育にも必須である。またADH3遺伝子はエタノールでの生育に一部関与する。またXox1F遺伝子欠失株が野生株よりもプロパノールに良い生育を示すことからXoxF1遺伝子は他のアルコール脱水素酵素を抑制しているようであった。XoxF2遺伝子欠失株は全くフェノタイプを示さず、遺伝子構造からもPseudogeneであることが示唆された。他の酵素遺伝子についてもフェノタイプが観察されなかった。

(2) XoxF表現型抑制変異株の解析

複数の抑制変異株のゲノムリシーケンスによりMxaFの発現に必要とされていたMxbD遺伝子に共通して変異が見つかった。ゲノムの他の箇所にも変異が検出されたので、MxbD遺伝子の変異が重要であることを以下のよう証明した。XoxF1遺伝子欠失株のMxbD遺伝子を変異型に置き換えた株が、やはりメタ

ノール生育を回復したため、MxaFの発現にMxbDが関与していることが明らかとなった。またMxbD遺伝子欠失株はLn存在下では生育し、qPCRによりXoxF遺伝子の高発現が見られたことから、MxbDはXoxF遺伝子を負に制御していることが分かった。

(3) Ln依存メチロトロフの探索

Ln依存性のメタン資化性細菌は分離できなかったが、メタノール資化性細菌はいくつか分離できた。この中で新属と考えられる株の性質について調べ、*Novimethylophilus kurashikiensis*及び*Oharaeibacter diazotrophicus*と名付けた。また両者のゲノムシーケンスを行い、MDH様遺伝子についてLnへの応答をqPCRで解析した。また、後者に関しては遺伝子欠失株を作製して、MxaFとXoxF1を持ち、*Methylobacterium*属細菌と同様の制御機構がありそうであることと、エタノールやプロパノール酸化に関わると考えられるMDH様遺伝子を同定した。

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10件)

Ekimova GA, Fedorov DN, Tani A, Doronina NV, Trotsenko YA. Distribution of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and D-cysteine desulphydrase genes among type species of the genus *Methylobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (2018) doi: 10.1007/s10482-018-1061-5. 査読あり

Lv H, Sahin N, Tani A, Isolation and genomic characterization of *Novimethylophilus kurashikiensis* gen. nov. sp. nov., a new lanthanide-dependent methylotrophic species of *Methylophilaceae*. *Environ Microbiol* 20, 1204-1223 (2018) doi:10.1111/1462-2920.14062 査読あり

Masuda S, Suzuki Y, Fujitani Y, Mitsui R, Nakagawa T, Shintani M, Tani A, Lanthanide-dependent regulation of methylotrophy in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *mSphere* 3:e00462-17 (2018) DOI: 10.1128/mSphere.00462-17 査読あり

谷 明生 植物葉面に共生する *Methylobacterium* 属細菌の特性 バイオサイエンスとインダストリー 74, 135-137 (2016) 査読無し

Okumura M, Fujitani Y, Maekawa M, Charoenpanich J, Murage H, Kimbara K, Sahin N, Tani A: Cultivable *Methylobacterium* species diversity in rice seeds identified with whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis. J. Biosci. Bioeng. 123(2):190-196. (2016) doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.001 査読あり

Lv HX, Masuda S, Fujitani Y, Sahin N, Tani A, *Oharaeibacter diazotrophicus* gen. nov., sp. nov., a diazotrophic and facultatively methylotrophic bacterium, isolated from rice rhizosphere. Int J Syst Evol Microbiol 67, 576-582 (2016) doi: 10.1099/ijsem.0.001660 査読あり

〔学会発表〕(計 23 件)

春名優希、加藤純一、谷明生、*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの機能解析、日本農芸化学会 名古屋 名城大学 2018年3月16日

平賀翔大、藤谷良子、谷明生、*Methylobacterium aquaticum* strain 22A におけるメタノール脱水素酵素遺伝子のランタノイド依存的制御、日本農芸化学会 2018年度大会 名古屋 名城大学 2018年3月16日

Haoxin Lyu and Akio Tani, Draft genome and description of *Novimethylophilus kurashikiensis* gen. nov. sp. nov., a new lanthanide-dependent methylotrophic species of *Methylophilaceae*、日本農芸化学会 2018年度大会 名古屋 名城大学 2018年3月16日

伊賀俊貴、加藤純一、谷明生、*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの同定、日本農芸化学会 2017年度大会 京都 京都女子大 2017年3月17日

H. Lv, A. Tani, Genomic characterization of a new methylotroph, *Oharaeibacter diazotrophicus* SM30、日本農芸化学会 2017年度大会 京都 京都女子大 2017年3月17日

谷明生、植物共生メタノール資化性細菌 *Methylobacterium* 属細菌におけるエルゴチオネイン生産と役割、環境微生物系合同大会 公募シンポ6、東北大学、仙台、2017年8月30日

Lv HX, Sahin N, Tani A, *Methylophilus* sp.

La2-4, a lanthanide-dependent methanol-utilizing bacterium isolated from rice rhizosphere soil. IUMS2017, Singapore, 2017年7月17日

谷明生、植物共生 *Methylobacterium* 属細菌の生態、農芸化学会、中四国支部若手シンポジウム、岡山大学、岡山市、2016年5月20日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/appl.microb/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

三井 亮司 (MITSUI, Ryoji)

岡山理科大学理学部生物科学科・教授
研究者番号：60319936

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

(3) 研究協力者

呂 好新 (LV Haoxin)

岡山大学・資源植物科学研究所・博士後期課程学生