

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07738

研究課題名(和文)植物に共生するメタノール資化性細菌のランタノイドを利用した生育環境認識機構の解明

研究課題名(英文)Lanthanides-dependent regulation of metabolic enzymes in the plant symbiosis methylotrophic bacteria.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物から放出されるメタノールは地球規模で見積もるとおよそ一億トン/年を超えると考えられている。メタノール資化性菌であるMethylobacterium属やMethylorubrum属細菌は、エネルギー源や炭素源としてこのメタノールを効率よく利用するため、様々なメカニズムを持っていると考えられる。本研究ではこれらの細菌が植物との共生において必要な、例えば植物成長とともに変化する環境認識のメカニズムや植物の生育を促し、効率よくメタノールをえる手段などを明らかにすることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と葉上で共生する細菌は植物から放出されるメタノールを利用して生育している。メタノールを利用するためには植物が旺盛に生育することが必要で、共生細菌はこれを補助するために様々なメカニズムを身につけている。このメカニズムを解明することで生態系におけるC1化合物の炭素循環への影響の理解、農業における作物生育促進、病原菌の防除などに利用できると考えられる。また、本研究の流れのいて見いだされた生物のランタノイド化合物利用は、これまでにない新しい知見をもたらすものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Methanol emissions from plant leaves are estimated to exceed about 100 million tonnes per year on a global basis. Methylotrophic bacteria belonging to the genera Methylobacterium and Methylorubrum have various mechanisms to efficiently utilize that of methanol from plants as an energy and carbon source.

In this study, we tried to clarify the bacterial mechanism of environmental recognition accompanied by plant growth, and the means of efficiently obtain methanol by promoting plant growth.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Methylotroph 植物共生 化学コミュニケーション ランタノイド メタノール脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

植物の一次細胞壁に充填されているペクチンは、細胞の生長に伴い分子内メチルエステルがペクチンメチルエステラーゼにより加水分解されてペクチン酸となる。これにより植物の生長点では細胞の伸展が容易になることが知られている。また、メチルエステルの加水分解に伴い生成するメタノールは、植物周辺環境に生息する微生物のエネルギー源、炭素源として利用される。このことから、メタノールを利用できるメタノール資化性(メチロトロフ)細菌が、植物周辺に優勢に存在できると考えられる。一方、メチロトロフ細菌は植物ホルモン(オーキシン、サイトカイニンなど)に加え、抗酸化活性物質(ピロロキノリンキノン(PQQ)など)を供給することで、植物の生長を促し、結果としてメタノールを得るという相利共生が成り立っていると考えられる(図1)。植物からは地上部、地下部を問わず、細胞の成長に伴いメタノールの放出が起こっているが、葉上と根圏では微生物の生育環境としては異なり、適応して生育するメチロトロフ細菌も異なることを明らかにしてきた。

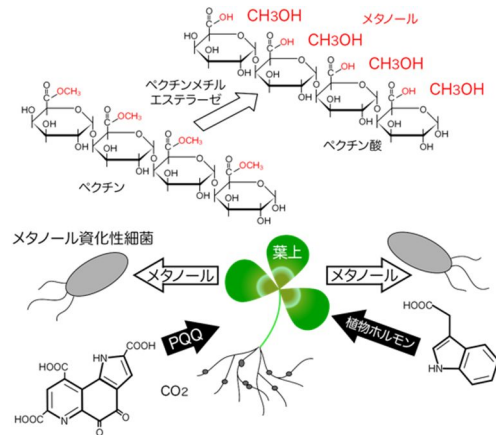


図1 植物由来のメタノールと微生物由来の生育

葉上優勢種のモデル菌株である *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール代謝では、初発酸化酵素のメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)がゲノム上に少なくとも3種類存在している。そのうち MxaF1 と名付けられた  $Ca^{2+}$  依存型のものが1コピー、残り2つの XoxF1 と XoxF2 と名付けられた MDH は、ランタノイドを補欠因子とする酵素であった。これらの MDH アイソザイムに関する知見は、生物の生命活動にランタノイドが利用されることを明らかにした初めての例となった。また、メタノールを利用した生育では、ランタノイドの中でも  $La^{3+}$ (ランタン)、 $Ce^{3+}$ (セリウム)、 $Pr^{3+}$ 、 $Nd^{3+}$ の軽ランタノイドが利用可能で、特に  $La^{3+}$  と  $Ce^{3+}$  が、最も高い活性を示した。ランタノイドは希少元素ともいわれるが、土壌中には 10~500 nmol/g dry-soil 程度の量が存在し、特に  $La^{3+}$  と  $Ce^{3+}$  の存在比が大きい。このことから今回、土壌のランタノイド組成とメタノール代謝の活性化に相関関係があることに気付いた。一方、植物根圏に目を向けると、こちらでも特殊なマイクロバイームが形成され、植物病原菌の阻害効果や、植物の生育を促進させる細菌(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)が集積されることが報告されている。

しかし、よく知られる根からの分泌物(アミノ酸や多糖など)によるものは、病原菌においても利用できるものであり、根圏マイクロバイーム形成による植物病原菌の阻害効果や PGPB の集積は説明ができなかった。私達は根圏マイクロバイームの構成菌でもある根粒菌のモデル株、*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 を解析し、この菌株のゲノム上にもランタノイド依存型 XoxF タイプの MDH が1コピー存在することを見いだした。さらに、XoxF1 を介してメタノールをエネルギー源として利用し、カルビンサイクルにより  $CO_2$  を固定するというランタノイド依存型メチロトロフィックオートトロフであることを初めて見いだした。また、類縁菌株でもメチロトロフィックオートトロフィーが確認できることから、この代謝は根粒菌やその類縁菌において普遍的な経路であろうと考えられる。しかし、*Bradyrhizobium* 属はメタノールを利用して生育するに

もかわらず、葉上からは検出されない。このことは、ランタノイド依存型の XoxF が、土壌型の MDH であるという考えを裏付けるものである。一方の葉上優勢種である *Methylobacterium* 属は、植物種子から発芽、生長という段階に伴い、土壌から葉上へと環境適応する。このことから *Methylobacterium* 属のゲノム上に存在する複数の MDH アイソザイムが重要な役割を果たしていると考えられた。

## 2 . 研究の目的

葉上の優勢種である *Methylobacterium* 属は、植物の生長に合わせて環境に代謝を適応させていく仕組みを有すると考えている。このことからランタノイド依存型 XoxF1, XoxF2 と非依存型 MxaF1 の 3 種類の MDH アイソザイムの発現調節機構を明らかにする。Ding らによると植物に吸収されたランタノイドの蓄積は下部葉から上部葉に行くほど少ないことが報告されている。*Methylobacterium* 側では地下から下部葉、さらには上部葉への適応のため、ランタノイド依存と非依存メタノール代謝をスイッチしていることを推定し、このメカニズム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

His-tag を付加した *xoxF1*, *xoxF2* を導入した株を作製し、野生型と同様に発現する tag 付きタンパク生産株を作製し、アフィニティークロマトを用いた精製を容易にした。さらに *M. extorquens* AM1 の *xoxF1* 及び *xoxF2* プロモーターにより制御されるレポータータンパク発現用プラスミドの作製を行った。レポーターとして赤色蛍光タンパクである DsRed2 を用いた。XoxF1 と XoxF2 の発現量や発現条件を比較するため、*xoxF1* 及び *xoxF2* の上流域とターミネーター領域の間に dsRed2 を挿入した *M. extorquens* AM1 において自立複製するプラスミドを作製した。このプラスミドを *M. extorquens* AM1 の野生株に接合伝達により形質転換を行なった。これを用いて培養条件を変化させ、レポーター遺伝子の発現を簡便に測定できる系を構築して発現誘導条件を検討した。

## 4 . 研究成果

### ・ XoxF1 及び XoxF2 における一次構造の比較

ランタノイド依存型の MDH である XoxF1 と XoxF2 のアミノ酸配列の違いについて比較を行なった。その結果、アミノ酸配列の相同性は 87 % と高かった。また、MDH としての活性を測定したところどちらにも活性が見られ、触媒機能も正しく保持していることが確認できた。このように、高い相同性を持ち、同様な触媒機能を持つにも関わらず、発現条件が異なっていることから単なる生体触媒としてだけでなく、環境認識に関わるなどの特有の役割を持つことが考えられることから、作製した組換え株を用いてより詳細な発現条件を検討した。

・ XoxF1 及び XoxF2 のレポーター  
一遺伝子を用いた発現

作製した組換え株を用いて *xoxF1* 及び *xoxF2* プロモーターの制御下での赤色蛍光タンパクの発現を確認するため、 $\text{La}^{3+}$ 濃度を  $30 \mu\text{M}$  として異なる炭素源で検

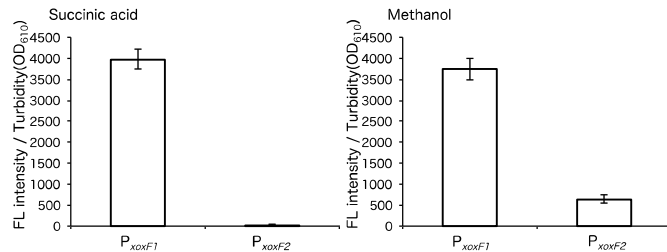


図 2 XoxF1 及び XoxF2 のレポーター遺伝子を用いた発現

討した(図 2)。その結果、XoxF1 は単一炭素源としてメタノールを用いてもコハク酸を用いても発現が確認できた。また、その発現量はメタノールよりもコハク酸を炭素源として用いた方が多いことも確認できた。一方、XoxF2 では、炭素源としてメタノールを用いた時のみ発現が見られた。また、XoxF1 と比較を行なったところ発現量が少ないことも確認できた。XoxF1 は炭素源としてコハク酸を用いた場合でも発現していることから、メタノールの酸化を触媒する酵素以外の役割を持つことが考えられた。

・ 生育に伴う XoxF1 及び XoxF2 のレポーター遺伝子を用いた発現

組換え株を用いて  $\text{La}^{3+}$ 濃度  $30 \mu\text{M}$  添加時の生育に伴う発現を検討した(図 3)。蛍光測定の結果、XoxF1 はコハク酸の方が蛍光強度は高く、時間経過とともに蛍光が増加していくことが確認できた。メタノールはコハク酸での培養と同様に 24 時間で蛍光が見られたが 72 時間で蛍光の減少が見られた。XoxF2 では、メタノールのみで発現が見られ、

一定量の発現を行うとそれ以上の発現は見られなかった。また、XoxF1 と比較を行なったところ発現が遅く 48 時間経過した後に発現が見られた。このことから、XoxF1 は生育の初期段階で、XoxF2 は後期に働くことが示唆された。

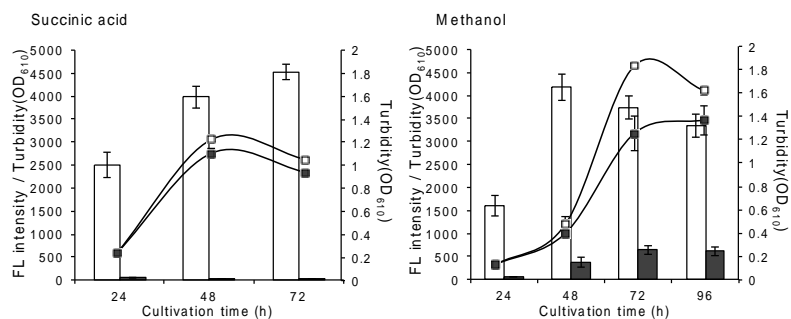


図 3 生育に伴う XoxF1 及び XoxF2 の発現 ;  $\square$ : *xoxF1*,  $\blacksquare$ : *xoxF2*

・ 異なる  $\text{La}^{3+}$ 濃度による XoxF1 及び XoxF2 のレポーター  
一遺伝子の発現

植物体内では、地上部か離れば離れるほどランタノイドの濃度が低下していくことが明らかとなっている。このことから、異なる  $\text{La}^{3+}$ 濃度での XoxF1 及び XoxF2 の発

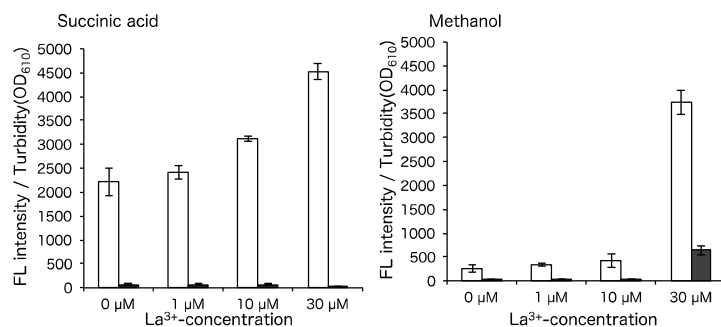


図 4 異なる  $\text{La}^{3+}$ 濃度での XoxF1 及び XoxF2 の発現  $\square$ :  $P_{xoxF1}$ ,  $\blacksquare$ :  $P_{xoxF2}$

現を比較することとした(図 4)。その結果、XoxF1 ではメタノールとコハク酸のどちらを単一炭素源として用いた場合でも、 $\text{La}^{3+}$ 濃度の増加に伴い蛍光強度も増していくことが確認できた。XoxF2 では、炭素源としてメタノールを用いた場合にのみ発現が確認できた。それに加え、 $\text{La}^{3+}$ 濃度ごとに発現の確認を行なったところ、 $\text{La}^{3+}$ 濃度  $30 \mu\text{M}$  の時のみでしか発現が確認できなかった。植物との共生関係を考えると少量のランタノイドでも反応を示す XoxF1 は、植物の各所でランタノイドの濃度勾配を利用して環境を認識

している可能性が考えられた。また、XoxF2 は高  $\text{La}^{3+}$ 濃度条件でメタノールが存在するときに発現すること、根圏などの環境が考えられるが、今後の検討課題である。

*M. extorquens* AM1 の *xoxF1* 及び *xoxF2* プロモーターに制御されるレポーター遺伝子発現系の構築した。組換え株を用いて MDH の発現比較を行なったところ、XoxF1 は、コハク酸でも発現していることからメタノールの酸化を触媒する酵素以外の役割を保持しており、植物の各所でランタノイドの濃度勾配を利用して環境を認識している可能性が考えられた。また、XoxF2 は、メタノール炭素源として高  $\text{La}^{3+}$ 濃度での条件時にのみ発現することが明らかとなった。ランタノイドは、一定の割合で土壤中に含まれていることは報告されている。このことから、今回 XoxF2 の発現が見られた  $30 \mu\text{M}$  は自然界において観察される環境条件であり、植物の根周辺で発現し、植物との共生に関与していることも考えられる。生育に伴う XoxF1 及び XoxF2 の発現比較を行なったところ、XoxF1 は *M. extorquens* AM1 の生育の初期段階、XoxF2 は対数増殖期に入る辺りから発現が見られた。以上のことから *M. extorquens* AM1 が生育に伴う環境変化に応じて MDH を使い分けている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masuda Sachiko, Suzuki Yutaka, Fujitani Yoshiko, Mitsui Ryoji, Nakagawa Tomoyuki, Shintani Masaki, Tani Akio	4. 巻 3
2. 論文標題 Lanthanide-Dependent Regulation of Methylobacterium aquaticum Strain 22A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00462 ~ 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00462-17	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 Lun Wanga, Soya Suganumab, Ayumi Hibinob, Ryoji Mitsuc, Akio Tanid, Takashi Matsumotoe, Akio Ebiharaa,b, Nanung Agus Fitriyantof, Ambar Pertiwinigrumf, Masaya Shimada, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa	4. 巻 130
2. 論文標題 Lanthanide-dependent methanol dehydrogenase from the legume symbiotic nitrogen-fixing bacterium Bradyrhizobium diazoefficiens strain USDA110	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.enzmictec.2019.109371	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉川友理, 北村純一, 矢野嵩典, 中川智行, 谷明生, 三井亮司
2. 発表標題 Methylobacterium extorquens AM1のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼの解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 倫, 菅沼宗矢, 日比野歩美, 谷明生, 三井亮司, 海老原章郎, 岩本悟志, 稲垣瑞穂, 島田昌也, 早川享志, 中川智行
2. 発表標題 ランタノイド依存型メタノール脱水素酵素XoxF1の酵素活性と安定性はランタノイド種に依存する
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井亮司
2. 発表標題 共生微生物の話 腸と葉と根と微生物
3. 学会等名 静岡大学 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川友理，一小路貴士，中川智行，谷明生，三井亮司
2. 発表標題 Methylobacterium extorquens AM1のランタノイド濃度に応答するメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターのレポーター遺伝子を用いた発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇都宮大貴、三井亮司、阿野嘉孝
2. 発表標題 Acidomonas属酢酸菌のランタノイド依存性メタノール酸化系の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向田 潤，西谷 洋輔，川上 秀昭，栗原 浩誠，三井 亮司
2. 発表標題 Lactobacillus plantarum 22A-3によるフェルラ酸からのジヒドロフェルラ酸生産
3. 学会等名 日本生物工学会第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 任家宜, 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Arthrobacter sp. YM1のランタノイド依存型C1代謝系の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019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 Methylobacterium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

〔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
研究協力者	中川 智行  (Nakagawa Tomoyuki)		
研究協力者	谷 明生  (Tani Akio)		