

平成23年5月16日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780074

研究課題名 (和文) メタノール資化性細菌のゲノム解析による植物生育促進作用の解明

研究課題名 (英文) The genes involved in plant-growth promotion by methylotrophic bacteria

研究代表者

谷 明生 (TANI AKIO)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：00335621

研究成果の概要 (和文)：様々な植物に高い生育促進効果を持つ *Methylobacterium* sp. 22A 株を選抜し、ゲノム解析を行った。これにより、コンティグ数 490、平均コンティグサイズ 16 kbp のドラフトゲノムデータが得られた。ゲノムサイズは 7.7 Mbp で、プラスミドは 6 つ存在した。植物との相互作用に重要と考えられるメタノール資化経路、窒素固定、ビタミン合成系などの遺伝子を同定した。現在重要な遺伝子の破壊株の作成中である。

研究成果の概要 (英文)：The genome of *Methylobacterium* sp. 22A that promotes the growth of various plants, was sequenced. The draft genome data is comprised of 490 contigs with average contig size 16 kbp. The genome size was estimated to be 7.7 Mbp, with 6 plasmids. The genes involved in the interaction with plants, i.e. methanol metabolism, nitrogen fixation, and vitamin synthesis were identified. The gene-disruption experiment is now under progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：6102

キーワード：*Methylobacterium* sp.、メタノール、植物微生物相互作用、ゲノム解析、メチロトローフ

1. 研究開始当初の背景

申請者はH18-19年度地域経済産業局の地域新生コンソーシアム開発事業「屋上・壁面緑化用多機能性バイオ苔のLED活用高効率生産技術」において、屋上緑化植物資材として有望視されているスナゴケの大量生産法の確立に、微生物研究者として参加し、微生物を用いたスナゴケの生育促進方法の開発を目的として研究を行った。本技術は通常用いられる栽培法とは全く異なり、陸上植物のスナゴケを液体培養して生育促進を図るという画期的な技術である。

スナゴケの培養液にはメタノール資化性細菌が多いことを非培養法によって発見した。またスナゴケがメタノールを放出していることを確認し、分離したメタノール資化性細菌(*Methylobacterium*属細菌)がスナゴケに対して顕著な生育・分化促進効果があること、また他の植物に対しても生育促進効果があることを見いだした。

続いて、自然界から本属細菌を網羅的に収集し、質量分析器を用いた最新手法で分類し、そのなかで重要な作物に対して効果の高い菌を選抜した。本手法は菌体の総タンパク質をサンプルとしてMALDI型の質量分析器により得られるスペクトルパターンをフィンガープリントと見なし、分類する技術であり、主に細胞内に多く存在するリボゾームタンパク質の質量パターンを比較することによる。

近年の研究で、植物が様々な揮発性有機化合物を放出していることが分かってきた。特

にメタノールは年間地球上で1億トンという膨大な量が放出されている。さらに植物表面のメタゲノム解析により、 α プロテオバクテリアが優占化していることが分かってきた。特に*Methylobacterium*属細菌が全ての細菌のうち10-20%を占めている。すなわち植物が放出するメタノールが本属細菌の植物表面上での生育を支持していると考えられている。しかし本属細菌の種と植物の種との相互作用の特異性があるかどうかはよく分かっていない。また本属細菌による植物生育促進作用の報告もあるが、植物種との特異性やその機構については多くの点が不明である。

2. 研究の目的

近年のゲノム解析機器の進歩はめざましく、また微生物のゲノムデータは今後の研究に計り知れないほど有用である。本研究課題の目的は上記スクリーニングで得られた、広い範囲の植物に効果の高い菌についてゲノム解析を行い、植物生育促進作用に関わっている遺伝子を同定することを目的とした。

また、上記のように植物種と微生物種との相互関係についてはほとんど分かっていないため、多様な植物から分離した本属細菌ライブラリについて、由来となった植物種との関係を解析した。

3. 研究の方法

選抜した菌*Methylobacterium* sp. 22Aのゲノム解析をRoche社シーケンサ454 GS FLXのシングルエンドシーケンスを用いて行った。

また多様な植物から分離した本属細菌の分類系を確立するため、質量分析器による分類法と従来の分類法との相関性を解析し、遺伝子解析を行わなくても種レベルまで同定可能な計算手法を確立し、本属細菌の分離源となる植物種との相関を解析した。

最終目的として本属細菌を利用して作物の生育促進につなげたいと考えている。そこで、特にイネに注目し、研究所内で栽培された栄養条件の異なるイネ、他国で栽培された品種の異なるイネを入手し、本属細菌を本法により分離・分類した。

4. 研究成果

ゲノム解析により、コンティグ数490、平均コンティグサイズ16 kbpの結果が得られた。本菌のゲノムは約7.7Mbpであり、すでに解析された本属細菌ゲノム(5.5-8.8Mbp)の中でも大きい方であることが分かった。プラスミドは6つ存在した。植物との相互作用で重要と考えられるメタノール酸化・異化経路、窒素固定、ビタミンB12合成、フラジェリン、各種補酵素合成遺伝子、植物ホルモン合成遺伝子、エチレン合成阻害遺伝子(ACCデアミナーゼ)などの遺伝子が存在することが分かった。

これらの遺伝子について、順次遺伝子破壊株を作成中である。しかし同様の機能を持つ遺伝子ホモログが多く存在し、それらの各種生育条件での発現パターンを確認することが必要である。特に植物上で高発現される遺伝子を同定することが必要である。また本株のDNA相同組換え効率が悪いことが分かり、形質転換の条件を検討している。*SacB*(レバンシュクラゼ遺伝子)を持つベクターを用い、効率を上げると共に、マーカー遺伝子を回収することにより多重変異株を構築できる系を構築しつつある。

本属細菌はこれまで5株のゲノムデータが明らかになっている。本株は其中でも大き

めのゲノムサイズを保持し、また多くの調節遺伝子を持っている。このような大きなゲノムは様々な環境での生育を保証するために必要であると考えられ、植物上あるいは土壌や水圏など、あらゆる場所から本属細菌が分離されることと関連していると考えられる。また多くのトランスポゾン存在も、ゲノムサイズを大きくすることに貢献してきたと考えられる。今後植物の生育に関与する遺伝子を同定し、そのメカニズムを解明することにより、環境に優しい微生物農薬として技術確立することが重要であり、それが本研究の最終目標でもある。

保持する*Methylobacterium*属細菌のライブラリの、分離源となった植物種との相関性を解析した。その中で、*M. extorquens*、*M. organophilum*に属する種は多様な植物から分離されることが分かった。またコケ植物には従来知られていない新種と考えられる種が多く分離されていた。イネ由来の分離菌について分類を行った結果、本属細菌の種はイネの栄養状態(施肥の有無)、植物の部位(葉、根、種子)によって異なることが分かった。また他国(タイ、ケニア)で栽培された品種の異なるイネでも同様に分離・分類を行った結果、全てのサンプルで共通して分離される種が存在しないことが分かった。このことも植物種・栄養状態・栽培条件によって本属細菌は種レベルで選択されていることを示している。今後新種菌の詳細な分類同定を行い、本属細菌と植物種との相関をさらに詳細に解析することにより、生育促進したい植物種に有用な本属細菌の種を絞り込むことが可能であると考えられる。

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〕 (1件)

①谷 明生、MALDI-TOF/MSを利用した新しい

菌株同定技術とその応用（迅速・簡単が魅力。従来の分類指標との相関は？）化学と生物 48, 598-601 (2010) (査読無し)

[学会発表] (計 7 件)

- ①奥村麻理絵、金原和秀、鈴木信弘、谷 明生、イネ種子内から分離した *Methylobacterium* 属細菌の MALDI-TOF/MS による分類、日本農芸化学会大会、2011 年 3 月 25 日 京都女子大
- ②谷 明生、*Methylobacterium* 属細菌と植物との相互作用 第 27 回岡山植物病理セミナー 2010 年 12 月 11 日 岡山大学資源植物科学研究所
- ③Tani A., and Kimbara K., MALDI-TOF/MS-based phylogenetic analysis of *Methylobacterium* species collected from various plants. Gordon Research Conference, Molecular basis of Microbial One-Carbon Metabolism, 2010 年 8 月 1-6 日 Bates College, Lewiston, ME USA
- ④谷 明生、品種の異なるオオムギに共生するメタノール資化性菌の網羅的ライブラリ作製と宿主生育促進効果の解析、日本農芸化学会大会、2010 年 3 月 27 日 東京大学
- ⑤谷 明生、金原和秀、コケ植物に共生する微生物群集構造とその役割、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会、2009 年 10 月 30 日、琉球大学
- ⑥Tani A., Kimbara K., MALDI-TOF/MS-based

phylogenetic analysis of *Methylobacterium* species collected from plant samples, Marco シンポジウム 2009 モンスーンアジアにおける農業環境問題と研究の課題、2009 年 10 月 5 日 筑波

- ⑦谷 明生、金原和秀 MALDI-TOF/MS による *Methylobacterium* 属細菌のタイピングと生化学的特徴、日本生物工学会、2009 年 9 月 23 日、名古屋大学

[図書]

該当無し

[産業財産権]

該当無し

[その他]

該当無し

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・助教

研究者番号：00335621

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

金原和秀 (KIMBARA KAZUHIDE)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

(H23 年 4 月から静岡大学工学部物質工学科教授)

研究者番号：30225122