

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660060

研究課題名(和文)植物表層常在菌と植物との相互認識機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of mutual recognition between plants and epiphytic bacteria

研究代表者

谷 明生(Tani, Akio)

岡山大学・その他部局等・准教授

研究者番号：00335621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉面に存在する常在菌であるSphingomonas属細菌とMethylobacterium属細菌は、それぞれ植物に何の悪影響ももたず生存可能である。さらに前者は病原性細菌の生育を抑える効果が知られている。本研究では植物がどのように前者を認識しているか、また、前者が病原性細菌の生育を抑える機構について検討した。まずSphingomonas属細菌の細胞、鞭毛タンパク質、植物が認識する鞭毛ペプチドはそれぞれ植物の免疫応答を引き起こすことを確認した。また病原性細菌の生育抑制には細胞外に分泌される何らかの物質、おそらく鉄の奪い合いに關与する物質が直接効果を持っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The epiphytic bacterial symbionts, Sphingomonas and Methylobacterium species inhabit in the phyllosphere without causing any harmful effect on plants. Sphingomonas species are known to protect plants against pathogenic bacteria. This study investigated how plants recognize Sphingomonas species, and the mechanism of antagonistic effect. Cells, flagella, and flagellin peptides from Sphingomonas species evoked immunity reactions in plants, suggesting the involvement of flagellin sensing in plants. It was also found that Sphingomonas species directly antagonize pathogenic bacteria by producing unknown substances that may be involved in iron acquisition.

研究分野：応用微生物学

キーワード：植物・微生物相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年のメタゲノム解析等の手法の発達により、植物に共生する微生物の属・種レベルの解析が進み、葉圏や根圏で優占化する微生物属が明らかになってきた。たとえばダイズの葉圏では、*Sphingomonas* 属細菌が約 30%、*Methylobacterium* 属細菌が約 10% を含む、 α プロテオバクテリアが優占化している。

通常植物は、病原細菌の存在を細菌に普遍的に存在する分子、例えば鞭毛タンパク質等の Pathogen-Associated Molecular Patterns(PAMPs)を認識し、PAMP-Triggered Immunity と呼ばれる防御反応を発動する。植物は病原性細菌に対しこのような応答機構を持っているのに対し、何故常在菌は同じように認識されて排除されないのだろうか？共生細菌と植物の間には病原細菌とは異なる相互作用の機構が存在しているのではないかと考えられる。申請者は、これを強く支持する結果を *Methylobacterium* 属細菌で既に得ている。

Methylobacterium 属細菌はペクチンに由来する植物の排出物としてのメタノールを葉上で利用していることが明らかになっている。このメタノールを酸化する酵素、メタノール脱水素酵素の補酵素である、ピロロキノリンキノンは強い抗酸化活性を持つ。興味深いことにこの補酵素は細胞外にも多く分泌される。また、植物がメタノールを放出するのは、その親水性により気孔であると考えられている。気孔は植物にとって光合成と水分調整など、ガス交換のために重要な器官であると同時に、葉面の病原性細菌が植物体内に侵入するための孔でもある。植物は病原性細菌の PAMP を認識して気孔を閉じるが、病原性細菌は気孔開閉の

シグナルを攪乱する物質を放出して気孔を開かせ、侵入することが知られている。また、この気孔開閉制御には活性酸素が深く関わっている。

Methylobacterium 属細菌に由来するピロロキノリンキノンの抗酸化活性は、この気孔閉口に重要な活性酸素を消去し、気孔を開くことを発見している。また病原性細菌の鞭毛タンパク質のペプチド flg22 による気孔閉口を阻害することを見だし、それもやはり活性酸素の消去が原因であることを確認した。これらのことは、植物が植物共生細菌としての *Methylobacterium* 属細菌に対して、病原性細菌に対する反応とは逆に、気孔を開くという“友好的な”反応を起こすことを示している。

このコンセプトや実験手法を基盤とし、*Methylobacterium* 属細菌よりも多く葉面に存在する *Sphingomonas* 属細菌（以下 Sph）に対する植物の応答を解明することを本研究の目的とする。また、Sph の存在により、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* DC3000（以下 Pst）の植物上での生育が抑えられ、結果的に植物が健常に生育することが報告されていることから、本属細菌は植物の病原性細菌に対する応答を強めていることが示唆され、プロバイオティック効果があることがうかがわれる。本研究ではそのメカニズムの解明も目的としている。

2. 研究の目的

(1) Sph の PAMPs 分子の探索

上記のように植物に多く共生する Sph についても、PAMPs と認識されるような分子が存在するのならば、植物の免疫機構が活性化されるはずである。PAMPs を分離精製するためには植物の何らかの応答がなければならな

い。そこで活性酸素の生成や気孔の応答を検討した。またこれまで PAMPs と知られているフラジェリンタンパク質ペプチドを利用して植物の応答を観察した。

(2) Sph の植物に対するプロバイオティック効果

この機構には二つの可能性が考えられた。上記のように Sph の鞭毛などが植物に認識され、免疫が活性化され気孔が閉じ、Pst が侵入できなくなるという、植物を介したプライミングとも呼べる現象の可能性と、もう一つは Sph が直接または間接的に Pst の生育を抑制する可能性である。そこで両者の可能性を検討した。

3 . 研究の方法

(1) Sph の PAMPs 分子の探索

まずシロイヌナズナをモデルとし、切り取り葉に Sph 属細菌の細胞、また培養菌体から超遠心分離で精製した鞭毛の画分、および鞭毛タンパク質の配列から予想される病原性細菌鞭毛ペプチド flg22 に相当する合成ペプチドで処理し、気孔の開度を測定した。また免疫応答として植物葉における活性酸素生成をルミノール法で測定した。

鞭毛の関与が明らかになったため、研究協力者が作成したフラジェリン遺伝子欠損株を用いて植物に接種し、Pst と共存させてプロバイオティック効果が起こるかどうかを病原性細菌のコロニーカウントにより測定した。

(2) Sph 属細菌の植物に対するプロバイオティック効果

上記のコロニーカウント実験により興味深い現象が見いだされたため、Sph と Pst を

寒天プレート上で対峙培養し、阻止円の形成を検討した。また Sph 培養液上清の LC-MS によるプロテオーム解析を行った。

4 . 研究成果

(1) Sph の PAMPs 分子の探索

Sph の細胞を用いた場合、気孔が有意に閉じた。また精製した鞭毛画分でも気孔が閉じた。さらに、flg22 相当ペプチドも気孔を閉じた。鞭毛を認識し気孔を閉じるレセプターである FLS2, BAK1 変異植物では気孔が閉じなかったため、Sph の鞭毛は病原性細菌のそれと同様に PAMPs として認識され、免疫応答が起きることが示唆された。

活性酸素の生成で見た場合も、病原性細菌のそれらよりは低いものの、細胞、鞭毛、ペプチドそれぞれのレベルで活性酸素の生成が見られ、Sph の鞭毛に関して免疫応答が起きることが分かった。

そこでフラジェリン遺伝子欠損株と野生株で Pst に対するプロバイオティック効果を検討したところ、ほとんど差はなかった。このことから、鞭毛は免疫応答を引き起こすものの、そのことが病原性細菌の抑制に直接関与していないことが分かった。

(2) Sph の植物に対するプロバイオティック効果

Sph と Pst の共存状態で植物の生育を観察していたところ奇妙なことに気がついた。Sph は無菌で生育している植物にスプレーで接種しているため、植物用の寒天培地に Sph のコロニーが形成される。Pst も同様にスプレーするが、コントロール実験の Sph 不在の場合は Pst のコロニーが形成されるのに対し、Sph が存在するとそのコロニーが形成されな

い。すなわち、植物が存在しなくても生育抑制が起こっていることを示唆している。

そこで、コハク酸を炭素源とした無機塩培地や LB 培地で対峙培養を行ったところ、Sph は Pst に対して阻止円を形成しなかったが、植物用の寒天培地（ムラシゲ・スクーグ）だと広範な阻止円を形成することを見いだした。つまり Sph は何らかの生育阻止物質を植物用寒天培地でのみ細胞外に作ることを示唆している。なお対峙培養を逆にすると、同じく Pst が Sph に対して生育阻止円を示した。植物用の培地を微生物培養に用いるという一見非常識な実験が興味深い現象を見いだすことにつながった。

そこで、Sph の培養液を濃縮し、タンパク質画分を SDS-PAGE 解析し、そのゲルをいくつかのフラクションに分画し、LC-MS によるプロテオーム解析に供したところ、最もバンド強度の高いものは機能不明のタンパク質であり、2 番目はフラジェリンであった。機能不明タンパク質のドメイン解析などを行った結果、トランスフェリン様の溶質結合タンパク質ドメインを含んでいた。

トランスフェリンは鉄イオンを結合することに関与していることが分かっている。興味深いことに、これまで Sph のトランスポゾンによる変異株を網羅的に検討して、Pst に対して生育抑制を示さなくなった変異株の多くは、シトクロム酸化酵素に関連があることが示されている。シトクロムは当然ながらヘム鉄を含むタンパク質である。これらに変異が起こると生育抑制が起こらないことと、細胞外にトランスフェリンを多く放出することには、鉄というファクターを通じて強い関連があることが予想される。

またこの対峙培養は *Methylobacterium* 属細菌でも同様に検討しており、この場合も同様に阻止円が観察される。異なるのはコハク

酸の培地でも阻止円が見られることであり、またシデロフォア合成酵素遺伝子破壊株にはその阻止円が見られなくなることを確認している。

以上のことから、Sph には鞭毛という PAMPs として働く分子が存在し、植物の免疫応答を引き起こすが、そのことと Pst の生育抑制はおそらく直接関連していない事が分かった。また Sph による Pst の生育阻害は、植物を介さないが鉄を介した相互作用があり、おそらく鉄の微生物同士の奪い合いによって阻害効果が起こっていることが示唆された。

現在トランスフェリン様遺伝子破壊株の作成とフェノタイプの確認、シトクロム破壊株と Pst の対峙培養の確認を行っており、これらによって上記の予想に対する実験的な証拠を示せると考えている。

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](計 6 件)

Mizuno M, Yurimoto H, Iguchi H, Tani A, Sakai Y: Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain OR01 on *Perilla* plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1533-1538 (2013) 査読あり

Mwajita RM, Murage H, Tani A, Kahangi ME: Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. *SpringerPlus* 2, 606 (2013) 査読あり

Koua HMF., Kimbara K., Tani A.: Bacterial-biota dynamics of eight bryophyte species from different ecosystems. *Saudi J Biological Sci* 22, 204-210 (2014) 査読あり

Ngamau CN., Matiru VN., Tani A., Muthuri CW.: Potential use of endophytic bacteria as biofertilizer for sustainable banana (*Musa* spp.) production. Afr. J Hort. Sci. 8, 1-11 (2014) 査読あり

Tani A., Ogura Y., Hayashi T., Kimbara K.: Complete genome sequence of *Methylobacterium aquaticum* strain 22A, isolated from *Racomitrium japonicum* moss. Genome Announc 3(2) e00266-15. (2015) 査読あり

中川智行、三井亮司、谷 明生、河合啓一
レアアースを必須因子として要求する新たな代謝系 -植物共生細菌達が持つレアアース依存型 C1 代謝- 化学と生物 (2015, in press) 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

Mitsui R., Masuda S., Tani A., Minamisawa K., Tanaka M. Rare earth elements-dependent methylotrophic autotrophy of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, Gordon Conference, Molecular basis of microbial one-carbon metabolism. Mount Holyoke College in South Hadley MA United States, 2014 年 8 月 10-15 日

増田幸子、中村由貴、森泉、新屋友規、藤谷 良子、岩本 靖子、谷 明生、*Methylobacterium* 属細菌が合成する PQQ による活性酸素発生抑制と気孔開閉に関する研究、環境微生物系学会合同大会 2014、浜松 2014 年 10 月 21-24 日

Akio Tani, Sachiko Masuda, Yoshiko Fujitani, Junichi Kato, and Nobuhiro Suzuki, Chemotaxis to methanol in *Methylobacterium* sp. JKUAT conference (JKUAT, Nairobi, Kenya) 2014 年 11 月 13 日

Sachiko Masuda, Yuki Nakamura, Izumi Mori and Akio Tani, A novel strategy for suppression of plant stomatal defense by *Methylobacterium* sp. JKUAT conference (JKUAT, Nairobi, Kenya) 2014 年 11 月 13 日

Akio TANI, Ecology and function of plant leaf-inhabiting *Methylobacterium* species. IPSR International Symposium and Symposium on Plant Stress Sciences (Kurashiki, Okayama) 2015 年 3 月 2 日

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 の熱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 岡山大学 2015 年 3 月 26-29 日

Kabir Md Alamgir, Sachiko Masuda, Akio Tani, Production of ergothioneine by methylotrophic bacteria, *Methylobacterium* species, 日本農芸化学会 2015 年度大会 岡山大学 2015 年 3 月 26-29 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〕なし

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・准教授

研究者番号: 0335621

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

Julia A. Vorholt

チューリッヒ工科大学（スイス連邦）・教授

研究者番号：なし