

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688012

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多様性と共生機構の解明

研究課題名(英文)Variety and symbiotic mechanism of methylotrophic bacteria in plants

研究代表者

谷 明生(TANI, AKIO)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：00335621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物に多く共生するMethylobacterium属細菌の系統分類に関しては四株について新種提唱を行った。生育促進に関わる植物ホルモンについて分析し、サイトカイニンが最も重要であることを示唆する結果を得た。メタノール脱水素酵素(MDH)の補酵素が気孔を開く活性を持っており、その作用機構として活性酸素の除去にあることを見いだしている。MDHのホモログの中に希土類元素を要求するものを見だし、機能解析を行った。イネをモデルとして本属細菌の種レベルでの同定を行い、イネの種子に含まれる本属細菌の種は、イネの遺伝型よりも栽培条件に影響されていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：This project, in regard to Methylobacterium species that is symbiotic to plants and capable of promoting plant growth, aims to classify the possible new species that we have isolated, and to clarify the molecular level mechanism of the promotion, and to clarify ecology of the species in the plants. We have proposed four new species in the genus. The bacterial plant hormones were quantified, and it was found that cytokinin is one of the most effective hormones. We also found that the cofactor of methanol dehydrogenase (MDH) is capable of inducing stomata opening, due to its scavenging activity towards reactive oxygen species. One homologue for MDH is found to be rare-earth element dependent, and functional analysis of MDHs were conducted. We isolated and identified the species from rice seeds, and found that the species is not restricted only plant genotype but also the cultivation environment of the plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：国際情報交換 Methylobacterium属細菌 methanol stomata

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

メタゲノム解析のレベルで、植物の地上部に共生する細菌のうち、約 10-20% が *Methylobacterium* 属細菌であることが明らかにされている。本属はメタノールを単一炭素源・エネルギー源として利用できる。植物はペクチンの分解産物として著量のメタノールを放出しており、これがメタノール資化性細菌の植物上での共生を可能にしていると考えられている。

本属細菌の接種により植物の生育が促進されることから、応用に向けた共生相互作用の解明が待たれている。植物の生育をコントロールする最大の要因は栄養と植物ホルモンであると考えられる。本属細菌が作る植物ホルモンの植物内在性ホルモンに対する量や効果がどれほどのものかは分かっていない。

また研究代表者はこれまで、多様な植物から本属細菌を分離し、質量分析を用いた新しい手法で分類する方法を確立した。その結果、新種の分離菌を多く見だし、新種提唱を行ってきており、まだ何株かの新種候補菌を保持している。

質量分析により種のレベルでスクリーニングが飛躍的に容易になったため、植物と本属細菌の共生相互作用に特異性があるかどうか検討してきた。その結果、多様な植物から分離される種と、コケなどからのみ分離されるユニークな種も存在した。また微生物の由来として、イネの種内にすでに本属細菌が存在することから、共生には植物の世代を通じた垂直伝播が起こるものと考えられる。

本属細菌の植物上での生育がメタノール代謝に依存することは、メタノール代謝酵素遺伝子の破壊株が野生株よりも植物上での生育において劣ることからも明らかである。メタノールはメタノール脱水素酵素(MDH)で

酸化される。本酵素はペリプラズム酵素で、補欠分子属としてカルシウムとピロロキノリンキノン(PQQ)を持つ。PQQ は細胞外に積極的に放出されている。微生物においては PQQ 依存酵素が PQQ 合成出来ない細菌に見いだされることから、PQQ は細菌間でやりとりされていると考えられる。では植物に対してはどのような効果を持つのか？PQQ は植物の生育を促進する効果があると報告されるが、その分子メカニズムは分かっていない。

上記の MDH に関しては、これまで良く研究されてきたカルシウム依存の酵素以外に、希土類元素依存的な MDH ホモログが見ついている。これら金属元素の要求性が異なる酵素の使い分け、メタノール生育におけるそれぞれの重要性などについても多くの謎が残っている。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では、(1)これまでに得られた新種候補株についての新種提唱、(2)生育促進効果の高い株をモデルとして、生育促進に関わる遺伝子の同定、(3)植物との共存における局在性、気孔を通じた相互作用についてその機構を探ることを目的としている。

3. 研究の方法と成果

すでに得られていた新種候補株のうち、数株について、新種提唱をするための生化学的解析を行い、論文発表している。その他数株について、外注で行っている生化学的解析の結果を待っている段階である。

モデルとした株ではオーキシンの定量は行っていたが、他の植物ホルモンについては未検討であったため、LC-MS を用いて全ての定量可能な植物ホルモンについて定量した。培養液には trace レベルのものも含めてほと

んどの植物ホルモンが検出された。しかし、その量が最も多いと考えられたのはサイトカイニンであった。植物にモデル株を接種し、植物体内のホルモンを定量したところ、やはりサイトカイニンのみが接種によって大幅に増加した。現在モデル株におけるサイトカイニン合成遺伝子の破壊株を構築中であり、さらにサイトカイニン合成変異植物を用いて接種実験を行う予定である。これによって微生物が作る植物ホルモンが内在性の植物ホルモンに対してどれだけ影響するかが分かってくると思われる。

また、MDH 遺伝子の多重破壊株も構築した。これらがメタノール生育に必須であることを示すと共に、それぞれカルシウム・希土類元素に対して選択性が高いこと、またどの遺伝子産物がどの金属元素を利用するかを明らかに出来た。モデル株では MDH ホモログは 6 つゲノムにコードされており、それぞれの基質特異性、金属要求性、誘導条件などを全て網羅的に調べる予定である。なお、ゲノム支援をいただいております、モデル菌の完全ゲノム決定に加えて、各種希土類元素存在下での RNA-Seq 解析が進行中である。

PQQ には生育促進効果があることに加え、活性酸素種の消去能力があることが分かっている。活性酸素の発生は植物孔辺細胞において気孔を閉じる重要なシグナル分子である。この活性酸素の消去能が気孔を開く活性に重要であることを確認した。この生物学的な意義を解明するため、気孔開口によるメタノール放出量の増加を PTR-MS を用いて調べたが増加は見られなかった。PQQ 合成変異株を構築して、諸性質の確認を行い、葉上での生育が野生株に対して落ちることを確認した。しかし増殖は見られるので、PQQ 合成は植物上での生育に必須ではない。つまり、メタノール以外にも利用できる炭素源が存

在することを示している。同時に植物体内・表層上の菌数測定も行ったところ、植物内部に移行する菌数は野生株に比べて減少していた。PQQ 遺伝子プロモーターのレポーター株を作成し、葉上での発現を確認する段階である。

また本属細菌の鞭毛にも機構を開く活性を持つことを見いだした。この現象は病原性細菌の鞭毛ペプチド *flg22* を認識する FLS2 タンパク質には非依存的であり、BAK1 には依存的であったことから、FLS2 とは異なるが似ている受容体が存在することを示している。鞭毛タンパク質は複数あり、メタノールで特異的に誘導されるタンパク質にその活性があるが、恒常的に発現するタンパク質には活性がない。なお、電子顕微鏡観察により本菌には鞭毛が二種類存在し、それぞれのタンパク質がそれぞれの鞭毛を構成することを見いだしている。現在鞭毛タンパク質の N 末端側に気孔開口活性があることを確認するところまで至っている。今後はマイクロアレイ解析などを通じて植物側の認識タンパク質を同定したいと考えている。

鞭毛遺伝子欠損株を各種作成し、細菌の運動性に関わることを確認した。加えてメタノールに対する走化性を見たところ、野生株はメタノールを含む C 1 化合物、各種の糖、アミノ酸などに対して走化性を示す。誘引物質を認識するセンサータンパク質は本菌ゲノムに 40 種類存在するため、その中でメタノールを認識すると考えられる候補について遺伝子破壊株を作成中である。メタノールセンサー変異株が作成できれば、葉上での運動、つまり気孔や植物体内への移行にそのセンサーが重要かどうかを検討できる。

植物との相互作用における種レベルでの特異性を調べるため、イネをモデルとして用い、ケニア・タイから得られたイネサンプル

も加えて各種イネ種子から本属細菌を分離し、質量分析により同定した。その結果、各イネから頻りに分離される種と、おそらく栽培条件によって特異的に検出される種が存在した。またイネによっては完全に単一種によって占められるものもあることから、イネの遺伝型よりは栽培場所や環境が支配的に種を限定していると考えられる。今後は栽培場所を同一として、遺伝型の異なるイネを用いた検討を行う予定である。

4. 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 7 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、DOI <http://dx.doi.org/10.1271/bbb/13027>

Tani A, Sahin N: *Methylobacterium haplocladii* sp. nov., and *Methylobacterium brachythecii* sp. nov. isolated from bryophytes. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3287-3292 (2013) 査読あり、doi: 10.1099/ijs.0.048215-0.

Nakagawa T, Mitsui R, Tani A, Sasa K, Tashiro S, Imawa T, Hayakawa T, Kawai K: A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS ONE*, 7, e50480 (2012) 査読あり、doi: 10.1371/journal.pone.0050480

Tani A, Sahin N, Matsuyama Y, Enomoto T, Nishimura N, Yokota A, Kimbara K: High-throughput identification and screening of novel *Methylobacterium* species using whole-cell MALDI-TOF/MS analysis. *PLoS ONE* 7(7): e40784 (2012) 査読あり、doi: 10.1371/journal.pone.0040784

Tani A, Takai Y, Suzukawa I, Akita M, Murase H, Kimbara K. Practical application of methanol-mediated mutualistic symbiosis between *Methylobacterium* species and a roof greening moss, *Racomitrium japonicum*. *PLoS ONE*, 7, e33800 (2012) 査読あり、doi: 10.1371/journal.pone.0033800

Tani A, Sahin N, Kimbara K.

Methylobacterium gnaphalii sp. nov., isolated from leaves of *Gnaphalium spicatum*. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2602-2607 (2012) 査読あり、doi: 10.1099/ijs.0.037713-0

Tani A, Sahin N, Kimbara K. *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1647-1652 (2012) 査読あり、doi: 10.1099/ijs.0.033019-0

〔学会発表〕(計 7 件)

日比野歩美, 三井亮司, 谷 明生, 田代晋也, 早川享志, 中川智行 *Methylobacterium extorquens* のメタノール生育におけるレアース要求性とその役割、2014年3月27-30日、日本農芸化学会 2014年度大会 東京、明治大学

三井 亮司、峰松 由季、桑原 朋代、中川 智行、谷 明生、田中 三男、メチロトロフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 の希土類に対するメタノールデヒドロゲナーゼの応答機構、2014年3月27-30日、日本農芸化学会 2014年度大会 東京、明治大学

関謙二郎、包智華、三井亮司、谷 明生、増田幸子、三井久幸、南澤究、光合成 *Bradyrhizobium* 属細菌のメタノール依存的な生育に及ぼす希土類元素の影響、第 29 回日本微生物生態学会大会 2013 年 11 月 23-25 日、鹿児島大学郡元キャンパス

Kiwamu Minamisawa, Zihua Bao, Kenji Seki, Dongyan Liu, Susumu Asakawa, Haruko Imaizumi-Anraku, Kazuhiro Sasaki, Seishi Ikeda, Akio Tani, Sachiko Masuda, Ryoji Mitsui, Takashi Okubo. Rice methanotrophic diazotrophs as non-legume rhizobia, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013 年 10 月 14-18 日 Miyazaki, Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan.

Ryoji Mitsui, Masaki Adachi, Sachiko Masuda, Akio Tani, Kiwamu Minamisawa, Mitsuo Tanaka. Rare earth elements-dependent methylotrophic autotrophy of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013 年 10 月 14-18 日 Miyazaki, Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan.

Akio Tani, Marie Okumura, Masahiko Maekawa, Jittima Charoenpanich, Hunja

Murage, Kazuhide Kimbara, *Methylobacterium* species inhabiting in rice seeds identified with whole-cell MALDI-TOF/MS analysis, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013年10月14-18日 Miyazaki, Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan.

Sachiko Masuda, Hans-Martin Fischer, Akio Tani, Hauke Hennecke, Regulators and cytochromes for chemolithoautotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum* using thiosulfate, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013年10月14-18日 Miyazaki, Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan.

日比野歩美、三井亮司、谷明生、田代晋也、早川享志、中川智行 *Methylobacterium extorquens* のメタノール代謝におけるレアースの特異性と役割、65回日本生物工学会大会 2013年9月18-20日広島国際会議場、広島

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計1件)

名称：スナゴケ及び種子植物の生育促進方法

発明者：谷 明生、秋田求

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：特許第5394269号

取得年月日：平成25年10月25日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等
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・助教

研究者番号：0335621

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中川智行 (NAKAGAWA TOMOYUKI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70318179

三井亮司 (MITSUI RYOJI)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60319936

(4)研究協力者

Nurettin Sahin

ムグラ大学(トルコ共和国)・教育学部・教授

研究者番号：なし