博士論文（要約）

植物 *Methylobacterium* 属細菌の群集構造とゲノムの比較

平成 27 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生態システム生命科学専攻

南　智之

背景・目的

植物と細菌の関係は、植物に有益な細菌、植物に害を与える細菌、植物に害も利益も与えない中立的な細菌が生息している。本論文ではこれらの植物体内外に生息する細菌を植物共生細菌とした。植物共生細菌は植物生育に影響を与え、地球上の物質循環に関わっている。植物共生細菌のうち植物根と土壌の界面全体である根圏(Rhizosphere)に生息する細菌の密度は、植物から分泌される有機物のために非根圏土壌よりも高く、100 年以上前から根圏細菌の多様性や機能の研究が行われてきた。

植物地上部は貧栄養な環境であり、太陽光などの自然環境からの刺激を直接受けるために細菌の多様性は低い。しかし、植物地上部に生息する細菌は植物病原細菌の防除や植物生育促進に役立つことがある。植物地上部における植物共生細菌の群集構造は宿主植物の種や遺伝型、植物の生息場所が影響を与えると報告されているが、基質供給などのその他の要因については分かっていない。ダイズなどの植物体地上部に生息する細菌のうち *Methylobacterium* 属細菌は大きな割合を占めることが報告されている。また、ダイズの根粒着生の形質によりダイズに生息する *Methylobacterium* 属細菌の相対存在量が変化することが報告されている。

本研究では、*Methylobacterium* 属細菌のゲノムデータベースや生化学的知見を駆使して、自然環境中の植物地上部に生息する *Methylobacterium* 属細菌の群集構造に影響を与える新規因子や機能を明らかにすることを目的とした。

方法と結果

東北大学生命科学研究科湛水実験施設（鹿島台）の圃場で栽培されたダイズを採取し、地上部の葉を取り除き茎から細菌細胞濃縮法により細菌細胞を抽出し細菌細胞から DNA を抽出し 454 FLX-Titanium を用いて DNA 配列を解読した。その後メタゲノムの系統学的な解析を MG-RAST を用いて行った。

次に、2015 年 11 月までにゲノム配列が決まっている *Methylobacterium* 属細菌の 16S rRNA 配列に基づいた系統樹を作成した。作成した系統樹のブートストラップ値や各クレードに含まれる植物由来の *Methylobacterium* 属細菌の数に基づき *Methylobacterium* 属細菌を系統学的に Group I、II、III の 3 つの Group に分けた。このグループ分けに基づき本研究で解読したダイズの植物共生細菌のメタゲノムと過去に解読されたイネの植物共生細菌のメタゲノム配列の MG-RAST による系統解析で出力されてきた *Methylobacterium* 属細菌のデータのグループ分けを行った。その結果、ダイズでは *Methylobacterium* 属と判定された配列のうち約 87 %を Group I が占めた。一方、イネでは Group I の割合は比較的小さく約 39 %であるのに対して、Group II、III はそれぞれ約 29 %と約 18 %を占めていた。

ダイズでは Group I の *Methylobacterium* 属細菌が圧倒的に多いことが分かったが、その生態や局在性は不明であった。そこで、Anda ら(2010)が過去にダイズより分離した Group I である *Methylobacterium* sp. AMS5 と対照として空気より分離された *M. extorquens* AM1 の *gusA*(beta-glucuronidase 遺伝子 *gusA*)標識株を作成し、ミヤコグサに接種し局在パターンを観察した。AMS5 のミヤコグサにおける局在は子葉、茎、根粒で観察されたのに対して AM1 の局在は茎や子葉で微弱に観察されただけであった。この結果より AMS5 が AM1 よりもミヤコグサにおいて広範囲に局在できることが明らかになった。また AMS5 が根ではなく根粒のみに局在するということは根粒が *Methylobacterium* の炭素源を分泌している可能性がある。

以後の *Methylobacterium* 属細菌の植物共生遺伝子と各 Group 特異的な遺伝子の探索のために、*Methylobacterium* sp. AMS5 の全ゲノム配列を決定した。AMS5 のゲノムは 1 つのクロモソームと 3 つのプラスミドからなっていた。クロモソームの DNA 配列は近縁な菌株のゲノムとの類似度が高かったがプラスミドの DNA 配列の近縁株との類似度は小さくプラスミドは AMS5 特異的であると考えられた。AMS5 はメタノール代謝やメチルアミン代謝を行う遺伝子を持っており、近縁菌と同様に *Methylobacterium* 属細菌の植物生育促進因子をコードしている遺伝子の種類は少なかった。

Methylobacterium 属細菌が植物の環境に適応するためにはメタノール代謝が重要であると考えられているが、その他の基質関連因子は分かっていない。さらに、ダイズの例でも分かるように、*Methylobacterium* 属内の各 Group における植物環境適応に重要な遺伝子の偏在の可能性も考えられた。そこで、次に Group I の植物由来株が持つ植物環境適応に重要な遺伝子の探索と各 Group が特異的に持つ遺伝子の探索を行った。具体的には、6 株の Group I の菌株の遺伝子のアミノ酸配列を CD-HIT によりクラスター分けし植物由来株が特異的または共通して持つ遺伝子を特定した。

次に、AMS5 を含めた全ゲノム配列が決定している 11 個の *Methylobacterium* 属細菌の遺伝子がコードしているアミノ酸配列を CD-HIT によりクラスター分けし、各 Group のみが特異的に持っているクラスターを特定した。その結果、Group I の植物由来株からは過去に植物環境適応に重要であると報告されている curli 線毛遺伝子や xylose isomerase 遺伝子や、*tonB* 遺伝子 *pilT* 遺伝子が見つかった。Group I はメチルアミン代謝を担う NMG (*N*-メチルグルタミン酸) 経路遺伝子や尿素代謝の Urea carboxylase 遺伝子を保有していた。Group II は微好気環境での呼吸に必要な cbb3-type cytochrome c oxidase 遺伝子を持っており、Group III は特異的なギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を持っていた。各 Group の菌株の NMG 経路の遺伝子の保有状況を調べたところ、Group I は NMG 経路遺伝子を全て持

っているのに対して Group II、III のほとんどの菌株は NMG 経路の最後の遺伝子 *mgd* 遺伝子を欠損していた。このことから、Group I はメチルアミンを代謝できるが Group II、III のほとんどは代謝できないと推定された。

ダイズでは Group I が圧倒的に多いので、ダイズに生息する *Methylobacterium* 属細菌はメチルアミンを代謝する NMG 経路の遺伝子を多数保有しているのではないかと考えられた。そこでメタノール代謝遺伝子群とメチルアミン代謝の NMG 経路遺伝子の DNA 配列をクエリーとし、上記のダイズ、イネの植物共生細菌のメタゲノム配列をデータベースとして tblastx 検索を行った。その結果、NMG 経路遺伝子の配列頻度はダイズでイネよりも多く、特に *mgdB* 遺伝子と *mgdD* 遺伝子のリードはイネ共生細菌群集からは検出されなかった。メタノール代謝遺伝子についてはダイズ、イネの間で大きな差はなかった。したがって、鹿島台で栽培されたダイズにはメチルアミン、メタノール両方を炭素源として利用できる *Methylobacterium* 属細菌が多く生息し、イネにはメチルアミンを利用できず、メタノールを炭素源として利用する *Methylobacterium* 属細菌が多く生息していることが考えられた。

以上の情報科学的解析から、Group I はメチルアミンを代謝可能で、ダイズにはメチルアミンを炭素源として利用できる *Methylobacterium* 属細菌が多く生息していると推定された。この推定を確かめるために、メチルアミン、メタノールを唯一の炭素源とする培地を用いてダイズから *Methylobacterium* 属細菌の分離を行いダイズの組織中の *Methylobacterium* 属細菌の colony forming unit (CFU) を計測した。その結果、メタノールまたはメチルアミンを炭素源とした培地でダイズ組織中の *Methylobacterium* 属細菌の CFU を計測しても炭素源による CFU の差はなかった。したがって、ダイズにはメタノール、メチルアミン両方を炭素源として利用できる *Methylobacterium* 属細菌が多く生息していると考えられた。また、Group I、III の標準株とダイズおよびイネから分離された *Methylobacterium* 属細菌株の生育を調べたところ、Group I の標準株とダイズ分離株はメチルアミン、メタノール両方を炭素源として生育できるのに対して、Group III の標準株、イネ分離株はメチルアミンを炭素源として生育せず、メタノールを炭素源として生育した。さらに、ダイズ分離株は全て Group I と判定されイネ分離株のほとんどは Group III と判定された。したがって、Group I はダイズに多く、メチルアミンとメタノール両方を炭素源として利用でき Group III はイネで多くメタノールを炭素源として利用できることが示唆された。

ゲノム解析より、*Methylobacterium* 属細菌は複数の尿素代謝系を重複して保有していたので、ダイズの固定窒素移行形態であるウレイド代謝も調べてみた。ダイズでは根粒菌が固定した窒素固定産物のアンモニアをウレイドに変換して地上部に輸送するために地上部ではウレイドが豊富である。各 Group の標準株

は全てアラントイン分解遺伝子群を持っており、全 Group がニッケルに依存するウレアーゼ遺伝子、ニッケルに依存しない尿素分解遺伝子（ウレアカルボキシラーゼ、ウレアアミドラーゼ）を保有していた。Group I はウレアーゼのコピー数が他の Group よりも多かった。

実際にアラントイン、尿素を窒素源として Group I、III の標準株、ダイズ分離株、イネ分離株がニッケル欠乏下で生育できるか調べたところ、すべての株がアラントインまたは尿素を窒素源として生育した。特にダイズ分離株の一部は他菌株よりもよく生育していた。アラントイン、尿素を窒素源として利用できることは全 Group に共通した特徴であるがダイズ分離株にはイネ分離株よりも効率よく尿素を利用できる株が生息している可能性があった。

考察

ダイズとイネに生息する *Methylobacterium* 属細菌中の Group I、III の割合が異なる理由の一つに植物が放出する C1 化合物の質と量の違いが考えられる。Group I はメチルアミンとメタノール両方を利用でき、Group III はメチルアミンを利用できない。メチルアミンが植物から放出される例としてサトイモ科の花から悪臭成分の一つとして放出されることが挙げられるが、メチルアミンの生合成や植物からの放出量については分かっていない。シロイヌナズナ、タバコではメチルアミン放出量が計測されているが、ダイズやイネでは計測されていない。しかし、ダイズは植物の中でも窒素含量が高いことで知られており、メチルアミンは窒素を含んで切るために、イネよりもダイズでメチルアミン含量が大きい可能性がある。また、メタノールについては植物ではペクチン代謝の副産物として生産されると考えられているが、イネでは水田で発生したメタンをメタン酸化細菌が参加しメタノールが発生することが知られている。このメタノールを一部の Methylotroph 細菌が利用している可能性が指摘されている。従って、ダイズではメチルアミンが豊富に存在するためにメチルアミンを利用できる Group I が多くなり、イネではメチルアミンはダイズよりも少なくメタノールが多いためにメタノールを利用できる Group III が増えたのではないかという仮説が立てられた。今後、ダイズ、イネの C1 化合物の放出量の計測や C1 化合物代謝遺伝子の変異体の接種実験等を行えばこの仮説の真偽が分かると考えられる。

Methylobacterium の窒素源の利用については本研究で Group I、III の *Methylobacterium* 属細菌とダイズ、イネ分離 *Methylobacterium* 属細菌がウレイドをニッケル欠乏下で窒素源として利用できることが明らかになった。また、Group I は他の Group と比較して豊富な尿素分解遺伝子を持っておりダイズから分離された Group I の一部は他の株よりもよく生育した。ダイズは植物の中で特

にウレイド含量が大きい植物で Group I の一部がウレイドを他の *Methylobacterium* 属細菌よりも効率よく利用し生育するために Group I がダイズで優占して生息している可能性が考えられた。

メタゲノム解析はデータが大量に得られるがその中から有用なデータを探しだすことが一般的に難しい。しかし、本研究のように過去の知見やゲノム情報が多く蓄積している細菌に絞って解析を行えば新規の生理機能や現象にアクセスすることが可能であることが示された。