

葉面メタノール資化性細菌の栄養要求性および  
競合的増殖特性と環境適応の分子機構

吉田 裕介

2019年1月



## 目次

緒言	3
第1章 生きた植物から分離した <i>Methylobacterium</i> spp. のパントテン酸要求性	5
1.1 背景	5
1.2 実験手法	6
1.2.1 使用菌株及び培養	6
1.2.2 シロイヌナズナ葉面における PPFM 棲息数の測定	6
1.2.3 シロイヌナズナ葉面に存在する化合物の定量分析	7
1.3 結果	9
1.3.1 植物試料から単離された <i>Methylobacterium</i> spp. のパントテン酸要求性	9
1.3.2 <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株のパントテン酸代謝経路	9
1.3.3 シロイヌナズナ葉面における <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株の生育	11
1.3.4 シロイヌナズナ葉面におけるパントテン酸および前駆体	12
1.3.5 <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株におけるパントテン酸および $\beta$ -アラニンの利用能	13
1.4 考察	17
第2章 栄養競合的環境下における異なる <i>Methylobacterium</i> spp. 間の増殖特性比較	20
2.1 背景	20
2.2 実験方法	21
2.2.1 使用菌株及び培養	21
2.2.2 シロイヌナズナ葉面における PPFM 棲息数の測定	21
2.3 結果	23
2.3.1 シロイヌナズナ葉面における <i>Methylobacterium</i> spp. 生育数の推移	23
2.3.2 <i>M. extorquens</i> AM1 株と <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株の競合液体培養時の生育能	23

2.3.3	<i>M. extorquens</i> AM1 株と <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株のメタノール消費速度	23
2.3.4	<i>M. extorquens</i> AM1 株と <i>Methylobacterium</i> sp. OR01 株のメタノール消費速度	24
2.4	考察	27
<b>第3章 葉面定着能に寄与する <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 概日性遺伝子ホモログ <i>kaiC</i> の分子生理機能</b>		
3.1	背景	28
3.2	実験手法	30
3.2.1	使用菌株及び培養	30
3.2.2	プラスミドの作製と変異株の作製	30
3.2.3	シロイヌナズナ葉面での競合実験	30
3.2.4	KaiC タンパク質の検出	32
3.2.5	逆転写 PCR による遺伝子発現レベルの解析	32
3.2.6	ストレス耐性試験	33
3.2.7	統計解析	33
3.3	結果	35
3.3.1	<i>M. extorquens</i> AM1 株の KaiC1、KaiC2 およびこれらのリン酸化	35
3.3.2	シロイヌナズナ葉面の定着における KaiC の寄与	35
3.3.3	環境刺激に対する <i>kaiC1</i> および <i>kaiC2</i> の応答	37
3.3.4	KaiC による温度依存的な UV 耐性の制御	39
3.4	考察	44
	<b>結論</b>	<b>46</b>
	<b>参考文献</b>	<b>47</b>
	<b>謝辞</b>	<b>54</b>
	<b>業績リスト</b>	<b>55</b>

## 緒言

葉圏 (phyllosphere) とは、地上で生育する植物の葉、花、茎といった地上の部位を表しており、多くの葉面微生物が棲息している。葉圏には植物が生産する多くの栄養素や補酵素などの低分子化合物が存在しており、棲息する微生物はこれらを獲得していると考えられる。植物は様々な種類の揮発性有機化合物 (volatile organic compounds、VOCs) を放出しているが、中でもメタノールは年間 1 億トンも放出される主要な VOCs である [1, 2]。メタノールは、植物の細胞壁の構成成分であるペクチンのメチルエステル基が加水分解されることで生じる。メチロトロフ (Methylotrophs) と呼ばれる微生物群はメタノールを炭素源、エネルギー源として生育することができ、葉圏に棲息するメチロトロフはメタノールを利用している [3]。葉面におけるメタノール濃度をメタノール資化性酵母を用いたバイオセンサーで調べた研究によると、生長しているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 葉面のメタノール濃度は 0-0.2%(0-60mM) の範囲で日周変動している [4]。また葉面には糖類も存在し、葉面に棲息する微生物が消費していることも報告されている [5]。これらに加えて、硝酸塩 (nitrate)、メチルアミン (methylamine)、およびアミノ酸のような窒素源や、ビタミン類のような補酵素群もまた葉面に存在している [6, 7]。

葉面は多くの微生物が独特なコミュニティを形成する主要な場の一つである。微生物が棲息できる地球上の葉面の表面積は、合計で約  $6.4 \times 10^8 \text{ km}^2$  であると推定されており、葉面に棲息するバクテリアの数は  $10^6$  から  $10^7$  bacterial cells/cm<sup>2</sup> に及び、古細菌や真菌も数はバクテリアよりも少ない [8]。Delmotte らの報告によると、ダイズの葉面には  $\alpha$ -プロテオバクテリアが優占化しており、その割合は 40%を超える [9]。また、そのほとんどが *Sphingomonas* spp. と *Methylobacterium* spp. であった。*Methylobacterium* spp. は、メタノールを単一の炭素源、またエネルギー源として利用できるグラム陽性細菌であり、特徴的なピンク色のコロニーを形成することから PPFM (Pink-pigmented facultative methylotrophs) とも呼ばれる。*Methylobacterium* spp. は、オーキシン、サイトカイニンのような植物ホルモンを生産して植物の生長を促したり、病害を引き起こす病原微生物への植物の抵抗性を誘導することが知られている [10, 11, 12, 13, 14]。そのため、*Methylobacterium* spp. と植物の共生的な相互作用

や、それを応用した技術開発が注目されている。

*Methylobacterium* spp. が葉面にニッチを獲得できる理由の一つとして、メタノールを利用して増殖できることが挙げられる。代表的なモデル菌株である *Methylobacterium extorquens* AM1 株 [15] を用いた研究によると、メタノール資化能力と葉面への定着能力には関連があることが明らかになっている。*Methylobacterium extorquens* AM1 株は初め、メチルアミンを用いて空気中の塵から単離され、現在、このバクテリアの属名は *Methylobacterium extorquens* と改名されている [16]。*M. extorquens* AM1 の野生株と変異株との競合実験から、メタノールデヒドロゲナーゼ (methanol dehydrogenase, MDH) を構成するサブユニットをコードする *maxF* (カルシウム依存性メタノールデヒドロゲナーゼの大サブユニット) および *soxF* (ランタン依存性メタノールデヒドロゲナーゼの大サブユニット) を欠損した変異株は、野生株と比べて葉面の定着能力が劣ることが示された [17, 18]。これらの知見より、炭素源としてメタノールを利用できることが、葉面に棲息する上での *Methylobacterium* spp. の優位性であることを示していると考えられる。

しかしながら、異なる *Methylobacterium* spp. 間においても定着能力に差がある。これまでに多くの *Methylobacterium* spp. が生きた植物より単離されてきたが、[19, 20, 21, 22, 23]、アカシソ種子から単離された *Methylobacterium* sp. OR01 は、アカシソ葉面における競合実験から *M. extorquens* AM1 と比べて遥かに強い定着能力をもつことがわかっている [24]。このようにメタノール資化能の有無だけで定着能力を説明できないが、特定の株が優位化する他の要因についてはほとんどわかっていない。

第 1 章では、植物表層に棲息している多くの *Methylobacterium* spp. がビタミン B 群、中でも特に B<sub>5</sub> (パントテン酸) を生育に必要とすることを見出し、このパントテン酸要求性を詳細に解析することで葉面定着との関連を調べた。また第 2 章では、葉面定着能の異なる *Methylobacterium* spp. を競合培養した場合の増殖特性について解析した。葉圏は、光・温度など日周変動する外部環境からの刺激の影響を大きく受ける環境の一つであり、前述のように炭素源、エネルギー源として利用可能なメタノール濃度も日周変動している。このような環境に棲息する *Methylobacterium* spp. は、これらの環境刺激に対する適応能力を持つと考えられる。しかし、*Methylobacterium* spp. が環境刺激に対応し葉面に定着するメカニズムはわかっていない。第 3 章では、光合成細菌では概日性遺伝子として知られている *kaiC* の *M. extorquens* AM1 *kaiC* ホモログが葉面定着に寄与することを発見し、その生化学的機能解析を行った。

# 第1章 生きて植物から分離した *Methylobacterium* spp. の パントテン酸要求性

## 1.1 背景

これまで、生きて植物から多くの *Methylobacterium* spp. が単離されてきた [19, 20, 21, 22, 23]。従来、*Methylobacterium* spp. のスクリーニングや集積培養実験は、培地にビタミン B 群を加えることが多いが [25, 26, 27]、葉面に棲息する *Methylobacterium* spp. について、メタノール以外の栄養源、特にビタミンや補因子など微量因子の要求性に関する知見は、一部の *Methylobacterium* spp. がパントテン酸の添加により生育が促進されるという知見のみであり [28]、これらが植物表層環境と関連付けられた研究はない。

本章では、植物表層に棲息している多くの *Methylobacterium* spp. がビタミン B 群を、その中でも特に B<sub>5</sub> (パントテン酸) を生育に必要とすることを見出し、このパントテン酸要求性を詳細に解析することで葉面定着との関連を調べた。パントテン酸要求性を示す *Methylobacterium* sp. OR01 株のゲノム情報を参考に、パントテン酸代謝と栄養要求性の検討から、本菌株が植物表層に存在するパントテン酸もしくは  $\beta$ -アラニンなどの前駆体を獲得して植物表層で生存することを明らかにした。さらに、*M. extorquens* AM1 株と比較して、植物への強い定着能をもつ *Methylobacterium* sp. OR01 株の植物表層環境における適合性についてビタミン B 群要求性の観点から、議論した。

## 1.2 実験手法

### 1.2.1 使用菌株及び培養

*Methylobacterium* sp. OR01 株 [24]、*M. extorquens* AM1 株 [15] を親株とし、これらの抗生物質耐性株 Km<sup>r</sup> および Tet<sup>r</sup> を作製し本研究で使用した。また植物試料から単離した 12 株の *Methylobacterium* spp. を本研究で使用した (表 2)。

これらの菌株をグリセロールストックからとり、0.5%メタノールおよび後述するビタミン B 群全てを含む Hypho 最少寒天培地 [29] (MM 寒天培地) に画線し、4 日間、28 °C で培養した後、4 °C の冷蔵庫に保存した。本研究では、ビタミン B 群としてチアミン (Thiamine、ビタミン B<sub>1</sub>)、ニコチン酸 (nicotinic acid、ナイアシン、B<sub>3</sub>)、パントテン酸カルシウム (calcium pantothenate、B<sub>5</sub>)、ピリドキシン塩酸塩 (pyridoxine hydrochloride、B<sub>6</sub>)、ビオチン (biotin、B<sub>7</sub>)、コバラミン (cobalamin、B<sub>12</sub>)、イノシトール (inositol、B-h)、および *p*-アミノ安息香酸 (*p*-aminobenzoic acid、B-x) を用い、それぞれ終濃度が 4 μg/mL、4 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、20 ng/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、および 2 μg/mL になるように調製した。0.2% コハク酸二ナトリウム (disodium succinate) を含んだ MM 培地にプレート上のコロニーを植菌し、2 日間、28 °C で培養し、これを前培養とした。なお、このとき試験管を培養容器として用い、MM 培地の容量は 5 mL とした。前培養した菌体を 0.5%メタノールと種々のビタミン B 群を加えた MM 培地に OD<sub>600</sub>=0.001 になるよう植菌し、28 °C で培養した。

### 1.2.2 シロイヌナズナ葉面における PPFM 棲息数の測定

前培養した *Methylobacterium* sp. OR01 株および *M. extorquens* AM1 株を 0.5%メタノールおよび使用したビタミン B 群全てを含む MM 培地に OD<sub>600</sub>=0.002 になるよう植菌し、28 °C で 3 日間培養した。菌液を 15,000 × g、4 °C の条件で 2 分間遠心分離し、上清を捨て菌体を回収した。菌体から培地を洗い流すために、菌体を滅菌水に再懸濁し、再度同条件で遠心分離を行い菌体を回収した。この洗浄操作をもう一回繰り返した。洗浄後の菌体を OD<sub>600</sub>=0.1 になるように懸濁し、これを接種用の菌懸濁液とした。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0) の種子を 70%エタノールに 30 秒間浸し、スピンドアウンしてエタノールを取り除いた後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (アンチホルミン) に 15 分間浸し、種子表面を殺菌した。種子を滅菌水で 5 回洗浄した後、春化処理のため新しい滅菌水に浸して 4 °C で 1 晩静置した。上清を取り除き、種子を接種用の菌懸濁液に浸し、回転混和装置 (Rotator RT-5, Taitec, Saitama, Japan) を用いて 2 時間回転混和した。菌体を接種したシロイヌナズナ種子を、0.8% Difco agar (Difco Becton Dickinson, Franklin Lakes,



NJ, USA) を含む Murashige & Skoog 寒天培地 (Duchefa, Hearlem, Netherland) に 1.5 cm 間隔で配置し、パラフィルムを一重に巻いた後、人工気象機内 (Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan) において 25 °C で 14 日間生育させた (明条件 14 時間、暗条件 10 時間周期)。このとき、Murashige & Skoog 培地はパントテン酸およびその前駆体を含まないものを用いた。生育したシロイヌナズナの第 4 葉をハサミとピンセットを用いて切り取り、予め 1.5 mL チューブに用意しておいた 500  $\mu$ L の滅菌水中に移した。2 分間のボルテックス処理および 15 分間の超音波洗浄機 (UT205S, Sharp, Osaka, Japan) を用いた超音波処理により葉面から菌体を回収した。回収した菌体の細胞数を測定するために、回収した菌液を 0.5% メタノールおよび使用したビタミン B 群全てを含む MM 寒天培地に塗布し、28 °C で 4、5 日間培養した後、生じたコロニー数を計測した。生じたコロニー数と塗布した菌液量から、葉 1 枚あたりの菌体数を算出した。

### 1.2.3 シロイヌナズナ葉面に存在する化合物の定量分析

シロイヌナズナの種子をパントテン酸および前駆体を含まない Murashige & Skoog 寒天培地上に菌体を接種せずに植え、14 日間生育した後で葉を切り取って回収した。このとき、葉の切断面から細胞成分が流出することを防ぐために、瞬間接着剤 (Aron Alpha EXTRA, Toagosei, Tokyo, Japan) により切断面をコーティングした。これらの回収した葉を 500  $\mu$ L の滅菌水に 10 分間浸し、葉面の化合物を滅菌水に抽出して葉面化合物抽出液を得た。この葉面化合物抽出液中に存在するパントテン酸、 $\beta$ -アラニン ( $\beta$ -alanine)、及び  $\beta$ -アラニンの前駆体であるスペルミン (spermine)、スペルミジン (spermidine)、5,6-ジヒドロウラシル (5,6-dihydrouracil)、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン (*N*-carbamoyl- $\beta$ -alanine)、3-ヒドロキシプロパン酸 (3-hydroxypropanoate) を HPLC-MS/MS により定量した。

まず Hydrosphere C18 column (column size 2  $\times$  150 mm, YMC, Kyoto, Japan) を用いた UFLC HPLC System (Shimadzu, Kyoto, Japan) によりパントテン酸、スペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、3-ヒドロキシプロパン酸を分離した。移動相には 0.05% 酢酸水溶液 (溶媒 A) とメタノール (溶媒 B) を用いた。パントテン酸、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、3-ヒドロキシプロパン酸については、溶媒 B の割合を 0-6.0 min = 2%, 6.0-10.0 min = 2-80%, 10.0-12.0 min = 80, 2%, 12.0-20.0 min = 2% となるように時間とともに変化させ、スペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシルについては溶媒 B の割合を 0-10.0 min = 2% とした。流速は 0.1 mL/min とし、5  $\mu$ L のサンプルを注入した。

表 1. MS/MS の各種パラメータ

Compounds	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	GS1	GS2	CUR	TEM (°C)	IS (V)
pantothenate	217.844	87.900								
N-carbamoyl- $\beta$ -alanine	130.900	88.100	-40	-15	-9	30	80	40	400	-4500
3-hydroxypropanoate	88.900	58.900								
spermine	203.200	129.100								
spermidine	146.163	71.900	26	17	6	30	80	40	500	4500
5,6-dihydrouracil	115.200	69.900								
$\beta$ -alanine(derivatized)	210.000	121.000	60	29	10	70	70	10	600	5500

Q1, mass of precursor ion: Q3, mass of product ion: DP, declustering potential:

CE, collision energy: CXP, collision exit potential: GS1, ion source gas 1 (nebulizer gas):

GS2, ion source gas 2 (heater gas): CUR, curtain gas: TEM, temperature: IS, ion spray voltage

$\beta$ -アラニンに関しては、3-aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (APDS) 試薬 (Amino Acid Analysis Reagent, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) により誘導体化し、Wakopak Wakosil-II 3C8-100HG column (column size 2 x 100 mm, FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて分離操作を行った [30]。移動相には APDSTAG Wako Eluent (溶媒 A)(FUJIFILM Wako Pure Chemical) と 60%アセトニトリル水溶液 (溶媒 B) を用い、溶媒 B の割合を 0-1.25 min = 4%, 1.25-1.26 min = 4-15%, 1.26-5.0 min = 15-20%, 5.0-5.5 min = 20-50%, 5.5-6.5 min = 50-95%, 6.5-6.75 min = 95%, 6.75-6.76 min = 95-4%, 6.76-12.0 min = 4%となるよう時間とともに変化させた。流速は 0.3 mL/min とし、2  $\mu$ L のサンプルを注入した。

各化合物の検出には、TurboionSpray をイオン源とした 4000 QTrap LC/MS/MS System を用いた (AB Sciex, Framingham, MA, USA)。MS/MS の各種パラメータを表 1 に示す。得られたデータは Analyst software ver. 1.5 (AB Sciex) の Multiple Reaction Monitoring (MRM) method を用いて解析を行った。

## 1.3 結果

### 1.3.1 植物試料から単離された *Methylobacterium* spp. のパントテン酸要求性

異なる植物試料から単離した 13 株の *Methylobacterium* spp. について栄養要求性を調べたところ、10 株 (By、B2B、RS1、C06、C16、C17、In1、OR01、Sh、および Rst 株) が MM 培地にビタミン B 群混合物 (VB mix、チアミン 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ニコチン酸 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、パントテン酸カルシウム 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ピリドキシン塩酸塩 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ビオチン 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、コバラミン 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、イノシトール 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および *p*-アミノ安息香酸 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の水溶液。100 倍希釈して用いた。) を加えないと生育できず、のこりの 3 株 (C1、Dw、および Rfw 株) は加えずとも生育できることがわかった (表 2)。さらにビタミン B 群要求性の 10 株のうち 9 株 (By、B2B、RS1、C06、C16、C17、In1、OR01、および Sh 株) が生育にパントテン酸 (ビタミン B<sub>5</sub>) の添加を必要とした (表 2)。16S rDNA の塩基配列に基づく相同性検索によると、これらのパントテン酸要求性株は *M. radiotolerans* および *M. fujisawaense* の近縁種であることがわかった。また 1 株はパントテン酸要求性ではなかったが、ピリドキシン (ビタミン B<sub>6</sub>)、ビオチン (B<sub>7</sub>) の両方を添加しないと生育できなかった (Rst 株)。これらの結果から、植物上にはビタミン B 群要求性、特にパントテン酸要求性の *Methylobacterium* spp. が多く棲息していることを明らかにした。

### 1.3.2 *Methylobacterium* sp. OR01 株のパントテン酸代謝経路

パントテン酸要求性株はいずれも近縁種であったため、パントテン酸要求性株 OR01 株を代表として用い、パントテン酸代謝経路について調べた。*Methylobacterium* sp. OR01 株はアカシソの種子から単離された菌株であり、地理的特性を乗り越えてアカシソに優占化することが知られている [31]。またこの菌株のドラフトゲノム配列も明らかとなっている。

パントテン酸は、pantothenate synthetase (EC: 6.3.2.1) によるパント酸 (pantoate) と  $\beta$ -アラニンとの縮合反応によって生合成される [32] (図 1A)。まず、*Methylobacterium* sp. OR01 株どちらの前駆体を生合成できないのかを調べた。*Methylobacterium* sp. OR01 株は  $\beta$ -アラニンを加えた培地中では生育できたが、パント酸を加えた場合には生育しなかった (図 1B)。また  $\beta$ -アラニンを加えて培養した場合の最大 OD は、パントテン酸を加えた場合よりも小さくなった。したがって、*Methylobacterium* sp. OR01 株のパントテン酸要求性は、 $\beta$ -アラニンの生合成経路に原因があることがわかった。

バクテリアにおける  $\beta$ -アラニン合成経路には、複数の合成経路が存在する。*Methylobacterium* sp. OR01 株の  $\beta$ -アラニン生合成経路の欠損部分を特定するために、本菌株のドラフ

表 2. 植物から単離した *Methylobacterium* spp. におけるパントテン酸要求性

Strain	Source	Closely-related strain	16S rDNA identity (%)	Growth <sup>a</sup>		
				with VB mix <sup>b</sup>	without VB mix <sup>c</sup>	with pantothenate <sup>d</sup>
By	Yew leaf	<i>M. radiotolerans</i> strain: 91a	99.7	+	-	+
B2B	Rice leaf	<i>M. radiotolerans</i> strain: 91a	99.8	+	-	+
RS1	Rice seed	<i>M. fujisawaense</i> strain: JoN18	100	+	-	+
C06	Rice leaf	<i>M. fujisawaense</i> strain: JoN18	100	+	-	+
C16	Rice leaf	<i>M. fujisawaense</i> strain: JoN18	100	+	-	+
C17	Rice leaf	<i>M. fujisawaense</i> strain: JoN18	99.9	+	-	+
In1	Yew leaf	<i>M. radiotolerans</i> strain: 91a	100	+	-	+
OR01	Red perilla seeds	<i>M. fujisawaense</i> strain: JoN18	100	+	-	+
Sh	Camellia leaf	<i>M. radiotolerans</i> strain: 91a	99.9	+	-	+
C1	Clover leaf	<i>M. extorquens</i> AM1	99.9	+	+	+
Dw	Duck weed	<i>M. adhaesivum</i> strain: 45i	100	+	+	+
Rfw	Paddy water	<i>M. populi</i> strain BJ001	99.7	+	+	+
Rst	Rice stem	<i>M. platani</i> strain: JoF11	99.8	+	-	-
AM1	-	<i>M. extorquens</i> AM1	100	+	-	+

<sup>a</sup> +, growth; -, no growth.

<sup>b</sup> Each strain was cultured in MM with VB mix. VB mix contains thiamine (B<sub>1</sub>), niacin (B<sub>3</sub>), Ca-pantothenate (B<sub>5</sub>), pyridoxine HCl (B<sub>6</sub>), biotin (B<sub>7</sub>), cobalamin (B<sub>12</sub>), inositol (B-h), and p-amino benzoate (B-x). Their concentrations are described in Materials and Methods.

<sup>c</sup> Each strain was cultured in MM without VB mix.

<sup>d</sup> Each strain was cultured in MM with pantothenate.

トゲノムから  $\beta$ -アラニン生合成経路を推定した。アスパラギン酸 (L-aspartate)、プトレシン (putrescin)、ウラシル (uracil)、 $\alpha$ -アラニン ( $\alpha$ -alanine)、マロン酸 (malonic acid)、オキサロ酢酸 (oxaloacetic acid)、(R)-乳酸 ((R)-lactate) を出発物質として  $\beta$ -アラニンは合成されうる (図 2)[33, 34]。ウラシル、プトレシンを出発物質とする経路において合成酵素のホモログがゲノム上に存在した (図 2 の赤矢印)。特に、 $\beta$ -アラニンを合成できないにもかかわらず、ウラシルから 3-オキシプロパン酸 (3-oxopropanoic acid) を経由して  $\beta$ -アラニンを合成する経路においてはすべての合成酵素のホモログが存在した。

*Methylobacterium* sp. OR01 株のドラフトゲノムの情報から、部分的ではあるが、 $\beta$ -アラニン合成に関わる代謝系を持つことがわかった。経路内の  $\beta$ -アラニン前駆体のうち、*Methylobacterium* sp. OR01 株の生育を回復するものを特定するために、最少培地 (MM 培地) に 12 種の  $\beta$ -アラニン前駆体を添加して培養を行った。アスパラギン酸、スペルミン、スペルミジン、プトレシン、ウラシル、 $\alpha$ -アラニン、マロン酸、オキサロ酢酸、(R)-乳酸、5,6-ジヒドロウラシル、N-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、および 3-ヒドロキシプロパン酸をそれぞれ MM 培地に添加したところ、スペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、N-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、および 3-ヒドロキシプロパン酸の添加により生育が回復した (図 3)。ただしスペルミン、スペルミジンを加えた場合の生育は他の 3 種よりも遅くなった。一方でいずれの

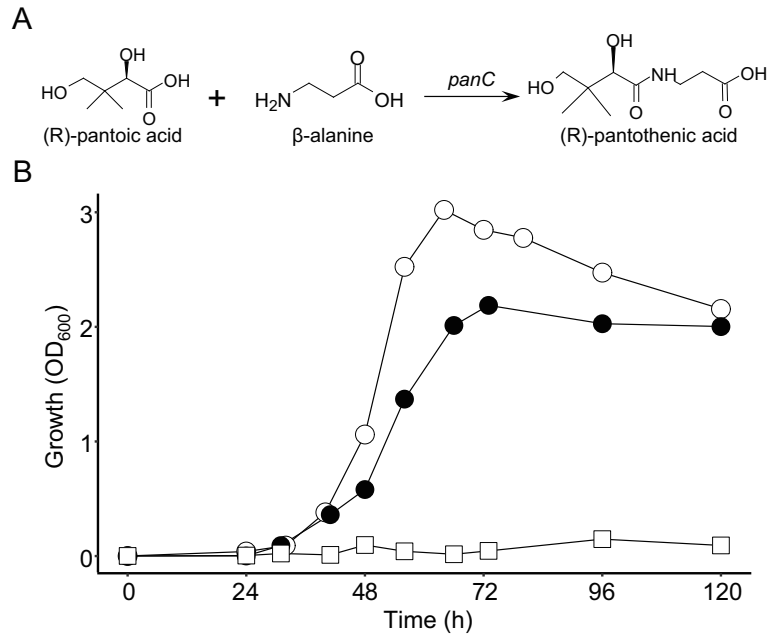


図 1: *Methylobacterium* sp. OR01 株の  $\beta$ -アラニン要求性

(A) パントテン酸合成: パントテン酸は *panC* 遺伝子産物である pantothenate synthetase (EC: 6.3.2.1) によるパント酸と  $\beta$ -アラニンとの縮合反応で生合成される。

(B) 各化合物添加時の *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育: パントテン酸 (○)、 $\beta$ -アラニン (●)、およびパント酸 (□) を 15  $\mu$ M になるよう MM 培地に添加し培養した

出発物質 (アスパラギン酸、プトレシン、ウラシル、 $\alpha$ -アラニン、マロン酸、オキサロ酢酸、(R)-乳酸) を加えても生育は回復しなかった (図 3 の赤矢印)。したがってパントテン酸要求性株 *Methylobacterium* sp. OR01 株は、 $\beta$ -アラニンに加えてスペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、および 3-ヒドロキシプロパン酸などをパントテン酸生合成の前駆体として利用して生育できることがわかった。

### 1.3.3 シロイヌナズナ葉面における *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育

*Methylobacterium* sp. OR01 株はアカシソ葉面に優占化する [24]。従って上記の結果は、*Methylobacterium* sp. OR01 株がパントテン酸やその前駆体を宿主である植物から獲得して生育していることを示している。実際に *Methylobacterium* sp. OR01 株が植物体上で増殖、定着できるかを調べるために、無菌処理したシロイヌナズナの種子に *Methylobacterium* sp. OR01 株を接種して葉面上の菌数を測定し、これをパントテン酸非要求性でありモデル菌株として研究が進んでいる *M. extorquens* AM1 株と比較した。このとき植物培地にはパントテン酸およびその前駆体を含まないものを使用した。*Methylobacterium* sp. OR01 株はシロイ

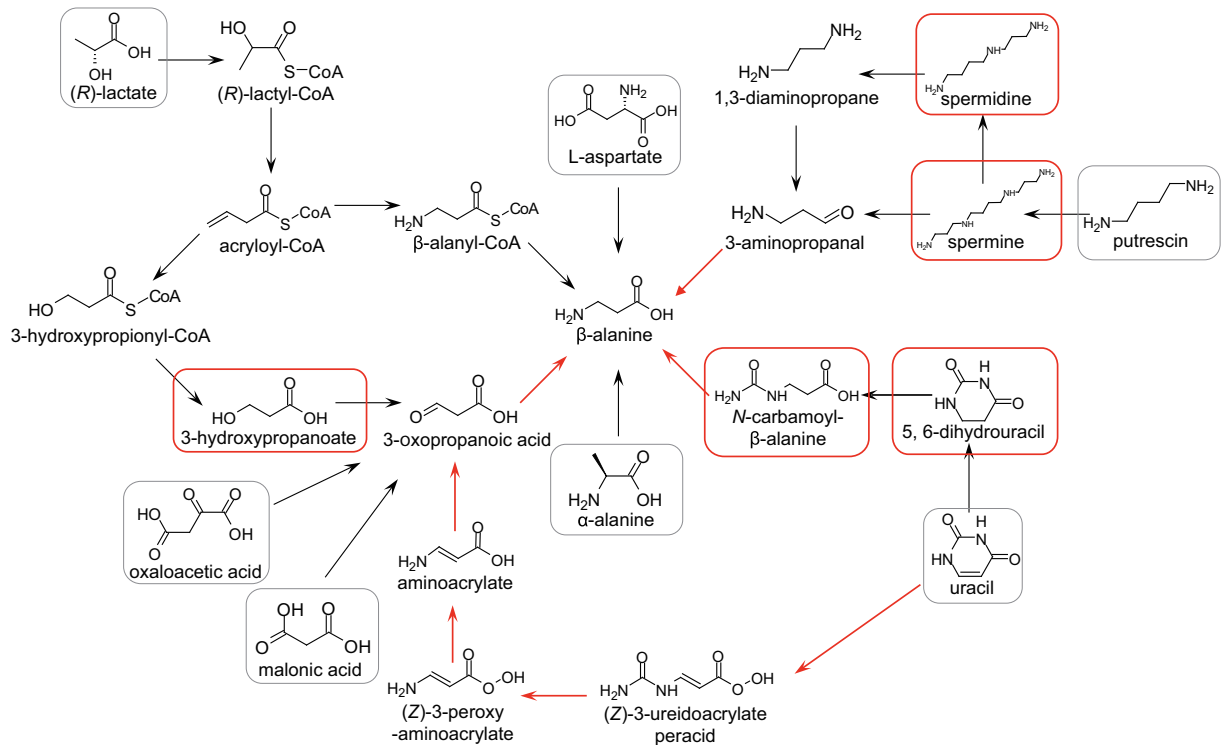


図 2: バクテリアにおける  $\beta$ -アラニン生成経路

赤で示した矢印は、*Methylobacterium* sp. OR01 株のドラフトゲノム上に対応する酵素のホモログが存在することを示す。枠で囲った化合物は培地に添加した化合物を示し、赤枠で囲ったものは添加により *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育を回復させ、黒枠で囲ったものは回復させなかったことを示す。

ヌナズナ葉面に  $7.9 \times 10^4$  ( $2.8 \times 10^4$ - $1.8 \times 10^5$ ) CFU/leaf 存在していた (中央値 (25%パーセンタイル-75%パーセンタイル))(図 4)。またパントテン酸非要求性である *M. extorquens* AM1 株の数は、 $2.7 \times 10^4$  ( $1.0 \times 10^4$ - $7.8 \times 10^4$ ) CFU/leaf であった。パントテン酸要求性を回復するのに必要な化合物を植物から得ていることが示唆された。

### 1.3.4 シロイヌナズナ葉面におけるパントテン酸および前駆体

実際に、植物葉面にパントテン酸要求性株の生育に必要な化合物が存在するのかどうか調べるために、葉面におけるスペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、および3-ヒドロキシプロパン酸をLC-MS/MSによって定量した。パントテン酸、 $\beta$ -アラニン、スペルミン、スペルミジン、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、3-ヒドロキシプロパン酸が試料から検出できた (表 3)。スペルミンおよび5,6-ジヒドロウラシルの濃度は検出限界を下回っていた。 $\beta$ -アラニン前駆体の量は $\beta$ -アラニンの量よりも顕著に少なかった。

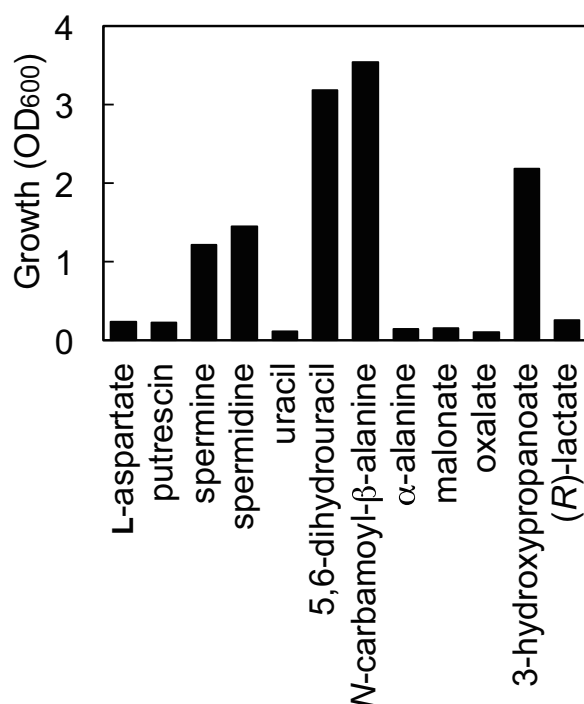


図 3:  $\beta$ -アラニン前駆体を加えた場合の *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育  
0.5%メタノールを含んだMM培地に各前駆体を  $60 \mu\text{M}$  になるように添加し、*Methylobacterium* sp. OR01 株を培養した。グラフの値は培養して 72 時間後の OD<sub>600</sub> の値。

た。葉面における  $\beta$ -アラニンの量の平均値 ( $1.1 \times 10^3 \text{ pmol/g fresh leaves}$ ) はパントテン酸 ( $1.5 \times 10^1 \text{ pmol/g fresh leaves}$ ) の約 100 倍であった。したがって葉面ではパントテン酸か  $\beta$ -アラニンを主にパントテン酸前駆体として利用し、増殖、生存していると考えられる。

### 1.3.5 *Methylobacterium* sp. OR01 株におけるパントテン酸および $\beta$ -アラニンの利用能

葉面でのパントテン酸要求性株の生育にとってパントテン酸と  $\beta$ -アラニンのどちらの寄与がより大きいか推測するために、*Methylobacterium* sp. OR01 株のパントテン酸及び  $\beta$ -アラニン利用能について調べた。*Methylobacterium* sp. OR01 株は、パントテン酸が  $1 \mu\text{M}$  存在すれば生育できるようになり、 $\beta$ -アラニンが  $5 \mu\text{M}$  存在すれば生育できるようになった (図 5)。また生育速度は、パントテン酸の場合  $5 \mu\text{M}$  存在すれば最大となり、 $\beta$ -アラニンの場合には  $45 \mu\text{M}$  存在すれば最大となった。このように *Methylobacterium* sp. OR01 株のパントテン酸要求性を相補するための濃度は、 $\beta$ -アラニンの場合より約 10 倍低いが、植物上に、 $\beta$ -アラニンはパントテン酸の約 100 倍存在するので、*Methylobacterium* sp. OR01 株は、パントテ

表 3. シロイヌナズナ葉面におけるパントテン酸および前駆体

Compounds	Concentration <sup>a</sup> (pmol/g fresh leaves)
pantothenate	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^1$
$\beta$ -alanine	$(1.1 \pm 0.7) \times 10^3$
spermine	n.d. <sup>b</sup>
spermidine	$(3.9 \pm 1.4) \times 10^1$
5,6-dihydrouracil	n.d.
N-carbamoyl- $\beta$ -alanine	$(7.8 \pm 4.3) \times 10^0$
3-hydroxypropanoate	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^1$

<sup>a</sup> The mean  $\pm$  standard deviation of the mean.  
( $\beta$ -alanine: n=3, other compounds: n=5)

<sup>b</sup> Not detected

ン酸もしくはその前駆体である  $\beta$  アラニンを利用して増殖していると考えられる。



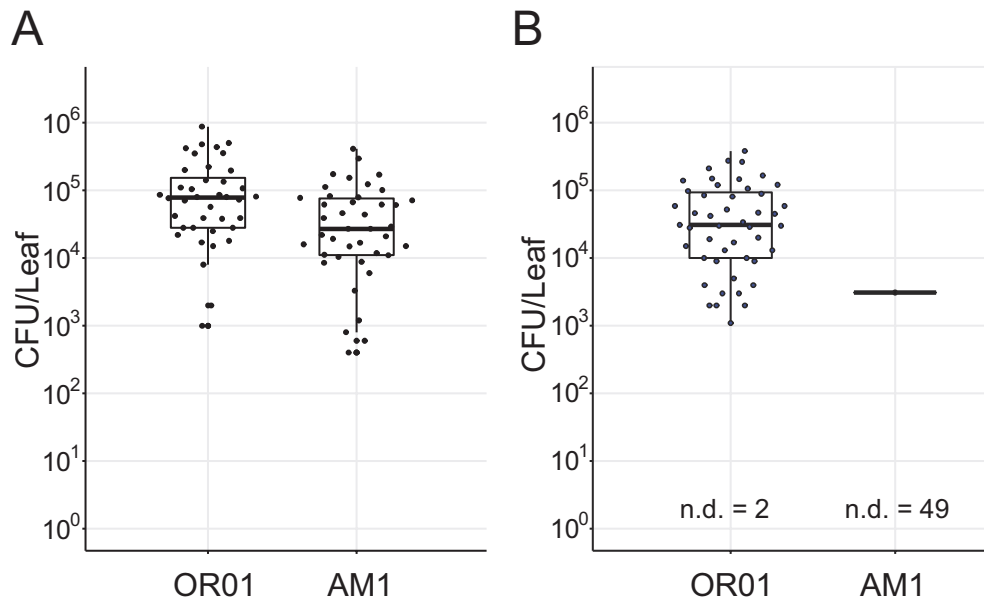


図 4: シロイヌナズナ葉面における *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育

(A) 殺菌したシロイヌナズナの種子に *Methylobacterium* sp. OR01 株と *M. extorquens* AM1 株をそれぞれ接種し、14 日間生育させた後、第 4 葉を切り取り菌体を滅菌水に懸濁した。懸濁液中の菌体を寒天培地にまき広げて培養し、生じたコロニー数から一枚あたりの CFU を算出した。箱ひげ図内部のバーは CFU/leaf の中央値を表しており、箱の下端上端はそれぞれ 25%パーセンタイルと 75%パーセンタイルを表している。また箱ひげ図から上方下方に伸びるバーはデータの最大値、最小値を表している。ただし、最大値の値が  $(75\% \text{パーセンタイル} + 1.5 \times (75\% \text{パーセンタイル} - 25\% \text{パーセンタイル}))$  よりも大きい場合、バーは  $(75\% \text{パーセンタイル} + 1.5 \times (75\% \text{パーセンタイル} - 25\% \text{パーセンタイル}))$  を表し、最小値の値が  $(25\% \text{パーセンタイル} + 1.5 \times (75\% \text{パーセンタイル} - 25\% \text{パーセンタイル}))$  よりも小さい場合、バーは  $(25\% \text{パーセンタイル} + 1.5 \times (75\% \text{パーセンタイル} - 25\% \text{パーセンタイル}))$  を表す。ドットプロットは全てのデータを示す。データ数は *Methylobacterium* sp. OR01 株、*M. extorquens* AM1 株それぞれ  $n=40$ 、 $n=42$  である。

(B) 殺菌したシロイヌナズナの種子に *Methylobacterium* sp. OR01 株 ( $\text{Tet}^r$ ) と *M. extorquens* AM1 株 ( $\text{Km}^r$ ) を 1:1 で接種し、14 日間生育させた後、第 4 葉を切り取り菌体を滅菌水に懸濁した。テトラサイクリン ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) またはカナマイシン ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含む MM 寒天培地に塗布後培養し、生じた抗生物質耐性株のコロニー数を計測した。データ数は  $n=50$  であり、n.d. は検出できなかったデータを示す。

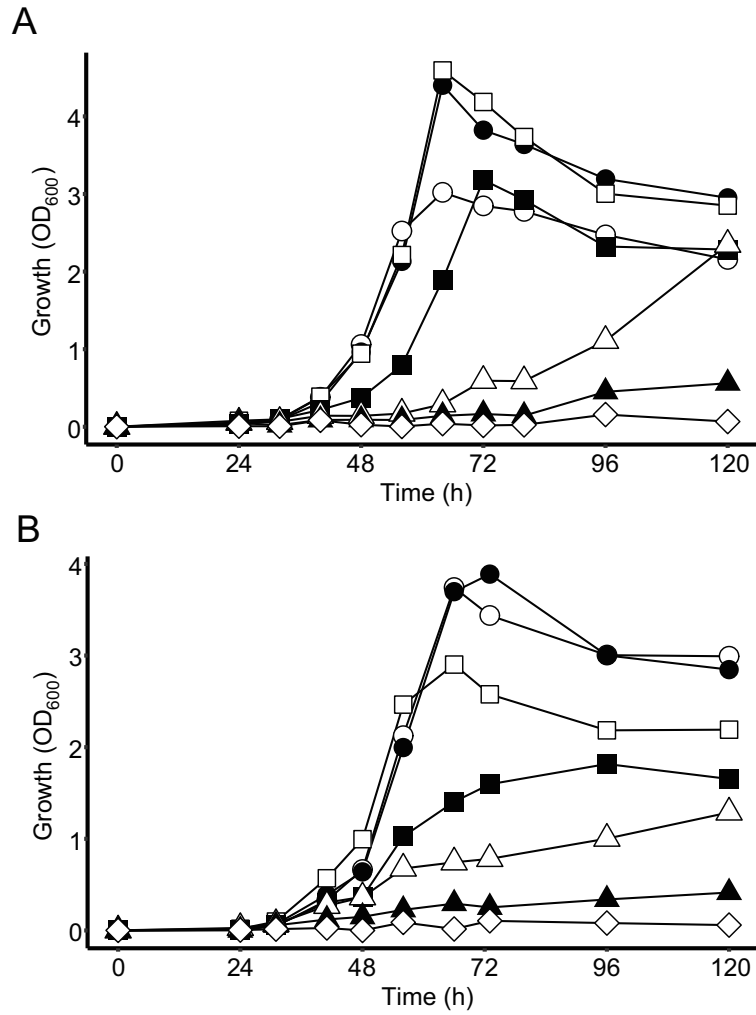


図 5: *Methylobacterium* OR01 株におけるパントテン酸および  $\beta$ -アラニンの利用能  
 0.5%メタノールを含んだ MM 培地にパントテン酸 (A) および  $\beta$ -アラニン (B) を種々の濃度  
 になるように添加し、*Methylobacterium* sp. OR01 株を培養した。(A) パントテン酸濃度は  
 15  $\mu$ M(○)、10  $\mu$ M(●)、5  $\mu$ M(□)、2.5  $\mu$ M(■)、1  $\mu$ M(△)、0.5  $\mu$ M(▲)、0  $\mu$ M(◇)。(B) $\beta$ -  
 アラニン濃度は 60  $\mu$ M(○)、45  $\mu$ M(●)、30  $\mu$ M(□)、10  $\mu$ M(■)、5  $\mu$ M(△)、1  $\mu$ M(▲)、0  
 $\mu$ M(◇)。

## 1.4 考察

植物葉面には糖類やメタノールなどの炭素源、メチルアミンや硝酸塩などの窒素源が存在しており、葉面に棲息する微生物はこれらを栄養源として生育すると考えられる [3, 5, 6, 35]。しかしビタミンのような補因子として働く低分子化合物を葉面で微生物が利用するという知見は知られていない。本研究では葉面に優占化することが知られている *Methylobacterium* spp. のビタミン B 群要求性に着目し、植物に棲息する多くの *Methylobacterium* spp. がビタミン B 群、特にパントテン酸を生育に必要とすることを明らかにした。

KEGG pathway database(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)によると、多くの植物は自身でパントテン酸合成を行うことができる。シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トマト、ジャガイモのゲノム上には、ketopantoate からパント酸を合成するための酵素である ketopantoate reductase を除いた全てのパントテン酸合成関連酵素が揃っており [36]、また ketopantoate からパント酸への合成は ketopantoate reductase ではなく、ilvC によりコードされる acetohydroxy acid isomeroeductase が担っていると推定される [37]。実際にセイヨウニワトコ (*Sambucus nigra*) の植物葉にはパントテン酸に加えチアミン、ピリドキシンといったビタミン B 群が存在することも報告されている [37]。よって葉面に棲息する微生物は、植物内で合成されるビタミン B 群を利用することができると考えられる。実際に本章では、パントテン酸などのビタミン B 群を生育に必要な微生物が植物に広く棲息し、葉面表層環境からビタミンもしくはその前駆体を獲得していることを示した (図 4、図 3)。

パントテン酸要求性 *Methylobacterium* sp. OR01 株は、パントテン酸前駆体の一つである  $\beta$ -アラニンの添加によっても生育が回復する (図 1B)。推定される  $\beta$ -アラニンの生合成経路は *Methylobacterium* sp. OR01 ゲノム上には幾つか存在するが (図 2)、スペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、*N*-カルバモイル- $\beta$ -アラニン、3-ヒドロキシプロパン酸の添加により生育が回復したことから、 $\beta$ -アラニンの合成に複数の経路が機能しうると考えられる (図 3)。パントテン酸要求性株は  $\beta$ -アラニンを合成するために一つの化合物だけを必要とするのではなく、複数の化合物から合成できるようにすることで多様な植物といったさまざまな環境に適応しているのかもしれない。

パントテン酸やその前駆体を含まない培地で育てたシロイヌナズナ葉面に *Methylobacterium* sp. OR01 株が棲息できること (図 4)、そしてシロイヌナズナ葉面にパントテン酸、 $\beta$ -アラニン、およびその前駆体を検出できた (表 3)。これらの結果は、*Methylobacterium* sp. OR01 株がシロイヌナズナ葉面からパントテン酸、 $\beta$ -アラニン、およびその前駆体を獲得して生育でき

ることを示している。シロイヌナズナ葉面における  $\beta$ -アラニンの存在量はパントテン酸や  $\beta$ -アラニン前駆体の量の約 100 倍であった一方 (表 3)、最少培地での培養時、*Methylobacterium* sp. OR01 株の生育に必要なパントテン酸と  $\beta$ -アラニンの最低濃度に大きな差はなかった (図 5)。実際に葉面での生育において必要なパントテン酸、 $\beta$ -アラニン、およびその前駆体の量は表 3 からは推定できないが、葉面からはこれらの化合物が持続的に十分量供給されていると考えられる。

バクテリアにおけるパントテン酸の取り込みを担う輸送体として panT[38] と panF[39] が知られている。しかし *Methylobacterium* sp. OR01 株のドラフトゲノム配列にはこれらの輸送体のホモログと思われる配列は確認できなかった。一方で、*E. coli* における  $\beta$ -アラニンの輸送体である CycA[40] と 43% の相同性を持つ配列が存在した。よってこの遺伝子産物が  $\beta$ -アラニンの取り込みに関与している可能性がある。

Mizuno らは、アカシソの種子から単離されたパントテン酸要求性である *Methylobacterium* sp. OR01 株のアカシソ葉面への定着能力を調べるために、PPFM のモデル生物として研究が進んでいる *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株をアカシソ種子に単独接種および共接種し、生育後の葉面における生存を比較した [24]。すると単独で接種した場合にはどちらの株も葉面に生育できるにもかかわらず、共接種すると *Methylobacterium* sp. OR01 株のみが生育した。さらに今回、シロイヌナズナについても同様の実験を行ったところ、共接種した場合には *Methylobacterium* sp. OR01 株のみが葉面から検出された (図 4)。*M. extorquens* AM1 株はビタミン B 群に対する要求性を示さないが、*Methylobacterium* sp. OR01 株はパントテン酸要求性を示す。すなわち、*Methylobacterium* sp. OR01 株は栄養要求性を持つにもかかわらず、葉面において栄養非要求性株よりも優占化できることが示された。

パントテン酸合成において、パント酸の合成には 2 分子の NADPH が必要であり、 $\beta$ -アラニンとパント酸の縮合反応には 1 分子の ATP が必要である。ウラシルを出発物質とする場合、1 分子の  $\beta$ -アラニンの合成には 1 分子の NADH が必要となる。またパントテン酸以外のビタミン B 要求性株として、ピリドキシンとビオチンの両方を必要とする *Methylobacterium* sp. Rst 株を見出した (表 2)。ピリドキシンはグリセロール (glycerol) から合成され、ビオチンはピメリン酸 (pimelic acid) から 2 分子の ATP をつかって合成される。このように要求性株が必要とする化合物の合成にはエネルギーが必要となる。

葉面微生物にとって栄養要求性株が非要求性株と比べて有利である点として挙げられるのは、合成のためのエネルギーコストを支払わずに済むという点である。腸内細菌には多くの栄養要求性を持つ微生物が知られており、乳酸菌の 1 種である *Leuconostoc citrovorum* は多数の

アミノ酸、塩基、およびビタミンを生育に必要とする [41]。D' Souza らは、特定のアミノ酸、塩基、ビタミンに対して要求性をもつように改変した *E. coli* を用いて、人工的に作製した栄養要求性株と野生株とを共培養し、共培養後の各株の CFU を測定して、それぞれの株の比増殖速度 (Malthusian parameter、 $M$ 、 $M = \ln(N_f - N_i) / \Delta t$ 、 $N_i$  = 培養開始時の CFUs、 $N_f$  = 培養 24 時間後の CFUs、 $\Delta t = 24$  時間) を求めた [42]。両株間の  $M$  の比を相対適応度 (relative fitness)、すなわち、環境への適応度の指標とした。その結果、必要とする化合物が環境中に十分量存在する場合、野生株よりも栄養要求株の方が適応度が増加していることを示した。腸内細菌における腸内での栄養環境と同様、植物表層で垂直伝搬する *Methylobacterium* sp. OR01 株は、植物上に常に存在するパントテン酸や  $\beta$ -アラニンについて、これらを植物表層環境から獲得することでパントテン酸合成に必要な合成コストを節約し、それにより葉面での適応度を増加させている可能性がある。

## 第2章 栄養競合的環境下における異なる *Methylobacterium* spp. 間の増殖特性比較

### 2.1 背景

*Methylobacterium* spp. が植物葉面に優占化する要因の一つとしては、本属細菌がメタノールデヒドロゲナーゼを初めとする C1 代謝系を持っており、植物細胞壁成分であるペクチン加水分解により生じるメタノールを資化できることが考えられる。*M. extorquens* AM1 株メタノール代謝酵素を欠損させると葉面定着能が低下することから、メタノール代謝能の有無と葉面定着能が関連していることがわかっている [17, 18]。しかしながら異なる *Methylobacterium* spp. 間においても定着能力に差がある。これまでに多くの *Methylobacterium* spp. が生きた植物より単離されてきたが、[19, 20, 21, 22, 23]、アカシソ種子から単離された *Methylobacterium* sp. OR01 は、アカシソ葉面における競合実験から *M. extorquens* AM1 と比べて遥かに強い定着能力をもつことがわかっている [24]。このようにメタノール資化能の有無だけで定着能力を説明できないが、特定の株が優占化する他の要因についてはほとんどわかっていない。また、葉面での *Methylobacterium* spp. 同士の競合実験を行った研究はあるが [43]、液体培地中で競合培養した実験はなく、両者の比較も行われていない。

本章では、葉面定着能の異なる *Methylobacterium* spp. を栄養源が競合する条件下で競合培養した場合の増殖特性について解析した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 使用菌株及び培養

*Methylobacterium* sp. OR01 株 [24]、*M. extorquens* AM1 株 [15] を親株とし、これらの抗生物質耐性株  $Km^r$  および  $Tet^r$  を作製し本研究で使用した。これらの菌株をグリセロールストックからとり、0.5%メタノールおよびビタミン B 群混合物 (VB mix、チアミン 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ニコチン酸 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、パントテン酸カルシウム 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ピリドキシン塩酸塩 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ビオチン 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、コバラミン 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、イノシトール 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および *p*-アミノ安息香酸 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の水溶液。100 倍希釈して用いた。) を含む MM 寒天培地に画線し、4 日間、28  $^{\circ}\text{C}$  で培養した後、4  $^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫に保存した。0.2%コハク酸二ナトリウム (disodium succinate) およびビタミン B 群混合物を含んだ MM 培地にプレート上のコロニーを植菌し、2 日間、28  $^{\circ}\text{C}$  で培養し、これを前培養とした。なお、このとき試験管を培養容器として用い、MM 培地の容量は 5 mL とした。前培養した菌体を 0.5%メタノールとビタミン B 群混合物を加えた MM 培地に  $\text{OD}_{600}=0.001$  になるよう植菌し、28  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。競合培養時には、半透膜を介し培地を共有できる二層式フラスコ (別府フラスコ) を用い、菌株を分離した状態で培養した。

### 2.2.2 シロイヌナズナ葉面における PPFM 棲息数の測定

前培養した *Methylobacterium* sp. OR01 株 ( $Tet^r$ ) および *M. extorquens* AM1 株 ( $Km^r$ ) を 0.5%メタノールおよびビタミン B 群混合物を含む MM 培地に  $\text{OD}_{600}=0.001$  になるよう植菌し、28  $^{\circ}\text{C}$  で 3 日間培養した。菌液を 15,000  $\times g$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  の条件で 2 分間遠心分離し、上清を捨て菌体を回収した。菌体から培地を洗い流すために、菌体を滅菌水に再懸濁し、再度同条件で遠心分離を行い菌体を回収した。この洗浄操作をもう一回繰り返した。洗浄後の菌体をそれぞれ  $\text{OD}_{600}=0.1$  になるように混合して懸濁し、これを接種用の菌懸濁液とした。

シロイヌナズナの種子を 70%エタノールに 30 秒間浸し、スピンドウンしてエタノールを取り除いた後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (アンチホルミン) に 15 分間浸し、種子表面を殺菌した。種子を滅菌水で 5 回洗浄した後、春化处理のため新しい滅菌水に浸して 4  $^{\circ}\text{C}$  で 1 晩静置した。上清を取り除き、種子を接種用の菌懸濁液に浸し、回転混和装置 (Rotator RT-5, Taitec, Saitama, Japan) を用いて 2 時間回転混和した。菌体を接種したシロイヌナズナ種子を、0.8% Difco agar (Difco Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を含む Murashige & Skoog 寒天培地 (Duchefa, Haarlem, Netherland) に 1.5 cm 間隔で配置し、パラフィルムを一重に巻いた後、人工気象機内 (Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan) において 25  $^{\circ}\text{C}$  で 14 日間生育させた (明条件 14 時間、暗条件 10 時間周期)。このとき、Murashige

& Skoog 培地はパントテン酸およびその前駆体を含まないものを用いた。菌を接種した直後のシロイヌナズナ種子および生育したシロイヌナズナ地上部をハサミとピンセットを用いて切り取り、予め 1.5 mL チューブに用意しておいた 500  $\mu$ L の滅菌水中に移した。2 分間のボルテックス処理および 15 分間の超音波洗浄機 (UT205S, Sharp, Osaka, Japan) を用いた超音波処理により葉面から菌体を回収した。回収した菌体の細胞数を測定するために、回収した菌液を 0.5%メタノール、ビタミン B 群混合物およびカナマイシン (10  $\mu$ g/mL) またはテトラサイクリン (10  $\mu$ g/mL) を含む MM 寒天培地に塗布し、28  $^{\circ}$ C で 4、5 日間培養した後、生じた抗生物質耐性株のコロニー数を計測した。生じたコロニー数と塗布した菌液量から、シロイヌナズナ 1 株あたりの菌体数を算出した。



## 2.3 結果

### 2.3.1 シロイヌナズナ葉面における *Methylobacterium* spp. 生育数の推移

*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を 1:1 で混合してシロイヌナズナ種子に接種した場合の葉面への定着能を調べた (図 6)。異なる抗生物質耐性で標識した *M. extorquens* AM1 株同士を接種した場合、検出された生菌数比は 50%程度であったのに対し、*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を混合して接種した場合には、およそ 3 日で *Methylobacterium* sp. OR01 株が優占化し、1 週間後には *M. extorquens* AM1 株がほとんど検出されなくなった (図 7)。この結果より、*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株とをシロイヌナズナ葉面に競合させると、*Methylobacterium* sp. OR01 株が優占化し、*Methylobacterium* sp. OR01 株の方が *M. extorquens* AM1 株よりも定着能が高いことがわかった。

### 2.3.2 *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株の競合液体培養時の生育能

半透膜を介し培地を共有できる二層式フラスコを用いて *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を競合液体培養した場合の各株の生育能を調べた。*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株をそれぞれ単独でメタノール培地で培養した場合、両者の生育に大きな差は生じなかった (図 7A)。一方、二層式フラスコを用いた競合液体培養では、コハク酸を単一の炭素源とした場合には *M. extorquens* AM1 株の生育能が上回ったのに対し、メタノールを炭素源とした場合には *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育能が上回った (図 7B,C)。よって、*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株の液体競合培養では炭素源の違いによって生育能に大きな差が生じることがわかった。

### 2.3.3 *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株のメタノール消費速度

*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を非競合液体培養、競合液体培養した場合のメタノール消費速度を比較した。非競合培養時の *Methylobacterium* sp. OR01 株のメタノール消費速度と競合培養時のメタノール消費速度がほぼ同等であった (図 7D)。非競合培養時の *M. extorquens* AM1 株のメタノール消費速度は *Methylobacterium* sp. OR01 株のメタノール消費速度よりも遅かった (図 7D)。したがって、*Methylobacterium* sp. OR01 株の方がメタノールをより早く消費することを明らかにした。

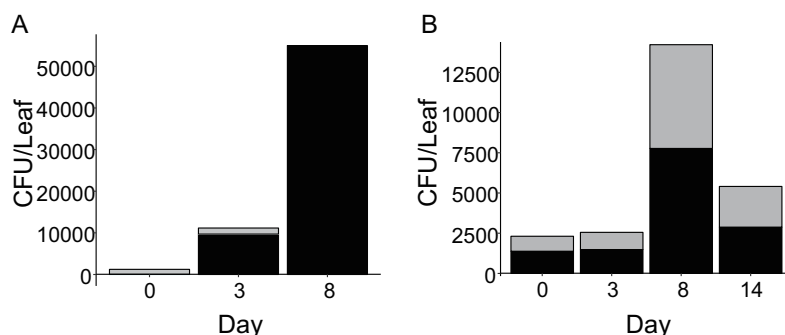


図 6: シロイヌナズナ葉面の *Methylobacterium* spp. 生育数の推移

(A) *M. extorquens* AM1 株 ( $Km^r$ 、グレーで表示) と *Methylobacterium* sp. OR01 株 ( $Tet^r$ 、黒で表示) を混合接種した場合。

(B) *M. extorquens* AM1AM1 株 ( $Km^r$ 、グレーで表示) と *M. extorquens* AM1 株 ( $Tet^r$ 、黒で表示) を混合接種した場合。バーは平均値を表す (N=5)

#### 2.3.4 *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株のメタノール消費速度

*M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株以外のいくつかの菌株についても生育能を調べた (図 8)。 *M. extorquens* AM1 株、 *Methylobacterium* sp. OR01 株、 *M. aquaticum* 22A 株、 *M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T から 2 株を液体競合培養した結果、炭素源によって生育能の優劣が変化するのは *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株の組み合わせのみであることがわかった ((図 7)、図 8)。 *M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T は *Methylobacterium* sp. OR01 株の近縁種であるにもかかわらず、コハク酸培養時に *M. extorquens* AM1 株と比べて生育能が高かった。メタノール培養時、 *M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T の生育能は *M. extorquens* AM1 株と比べて顕著に高かった。 *M. aquaticum* 22A 株は、すべての株に対し、炭素源にかかわらず増殖能が上回った (図 8)。

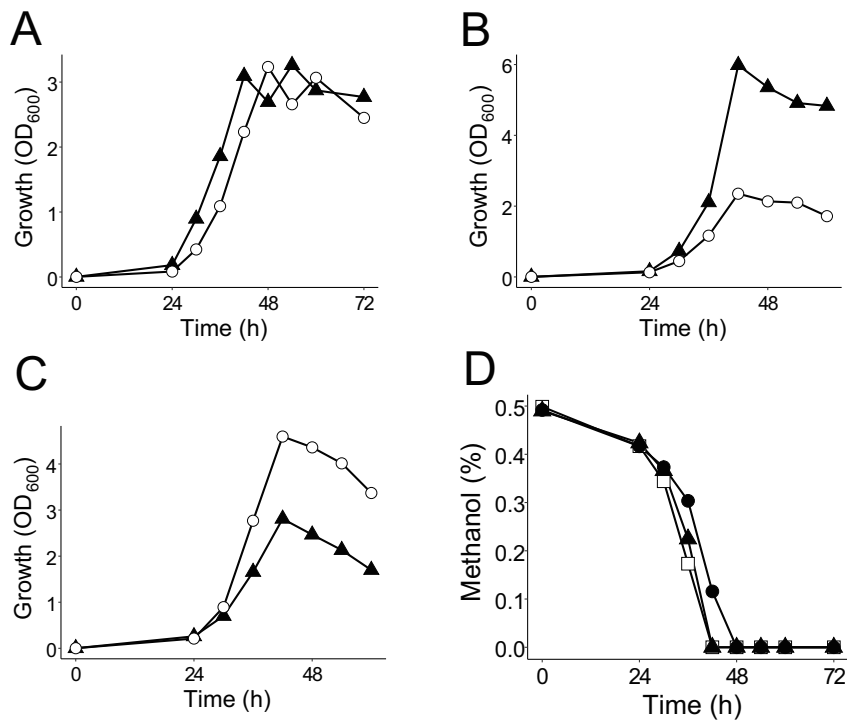


図 7: 競合培養時、非競合培養時の *M. extorquens* AM1 株および *Methylobacterium* sp. OR01 株の生育

半透膜を介し培地を共有できる二層式フラスコを用いて *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株の競合培養を行った。(A) 非競合培養時、メタノール培地での *M. extorquens* AM1 株 (●) および *Methylobacterium* sp. OR01 株 (△) の生育

(B) 競合培養時、メタノール培地での *M. extorquens* AM1 株 (●) および *Methylobacterium* sp. OR01 株 (△) の生育

(C) 競合培養時、コハク酸培養での *M. extorquens* AM1 株 (●) および *Methylobacterium* sp. OR01 株 (△) の生育

(D) 各培養時における培地中のメタノール濃度の推移。非競合培養時の *M. extorquens* AM1 株 (●)、非競合培養時の *Methylobacterium* sp. OR01 株 (△) および競合培養時 (□) の培地中の濃度)

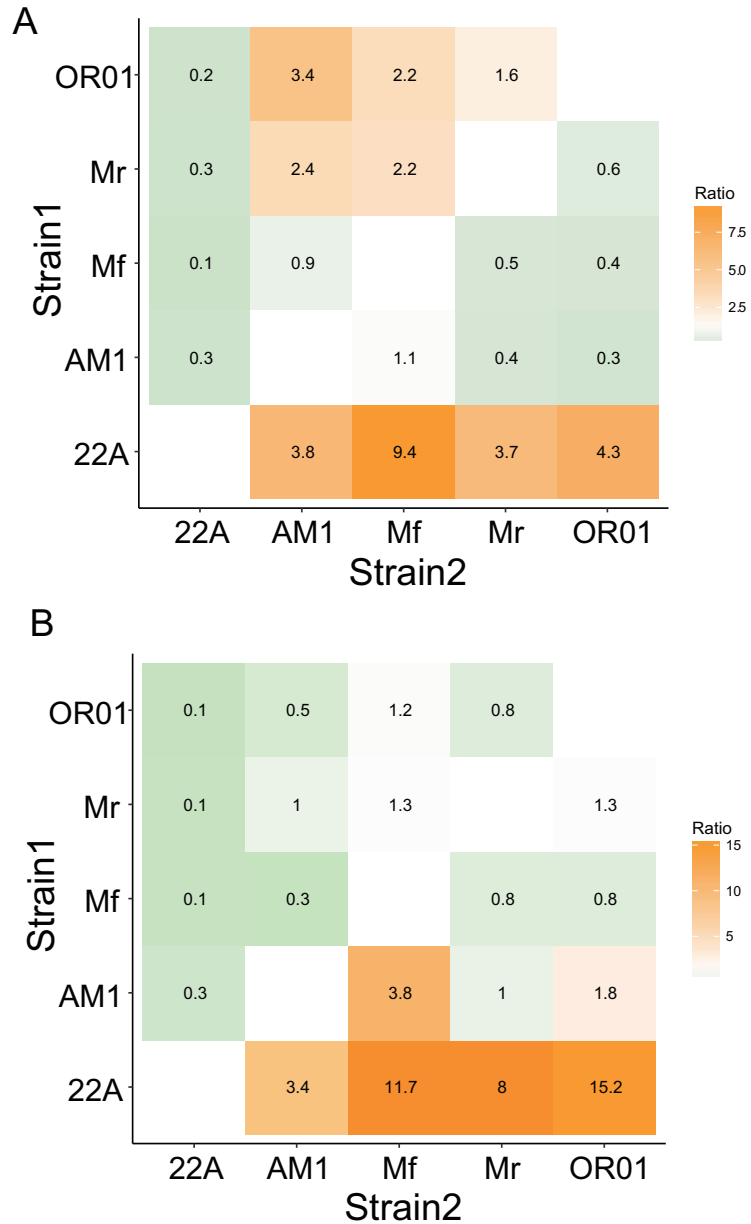


図 8: 競合培養時の *Methylobacterium* spp. の生育比

半透膜を介し培地を共有できる二層式フラスコを用いて、各株同士の生育を比較した。図中の値は、Strain1 の Strain2 に対する最大 OD<sub>600</sub> の比率を表す。使用した菌株は *M. aquaticum* 22A、*M. extorquens* AM1、*M. fujisawaensis* DSM5696T (Mf)、*M. radiotolerans* JCM28431T (Mr)、*Methylobacterium* sp. OR01 である。(A) メタノール培養時 (B) コハク酸培養時

## 2.4 考察

シロイヌナズナ葉面で *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を競合させると、*Methylobacterium* sp. OR01 株の方が定着能が高く、*M. extorquens* AM1 株がほとんど生育できないことがわかった (図 6)。一方で *M. extorquens* AM1 株と *Methylobacterium* sp. OR01 株を競合液体培養すると、炭素源によって増殖能に変化が見られ、コハク酸培養時には *M. extorquens* AM1 株が上回り、メタノール培養時には *Methylobacterium* sp. OR01 株が上回った (図 7)。葉面での主要な炭素源と考えられるメタノールを炭素源とした時の競合培養時には *Methylobacterium* sp. OR01 株の増殖能が高かったことから、葉面での優占化にはメタノール資化能の有無のみならず、競合条件下におけるメタノールの代謝能力も影響することを示した。

*M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T は *Methylobacterium* sp. OR01 株の近縁種であるにもかかわらず、コハク酸培養時に *M. extorquens* AM1 株と比べて生育能が高かった (図 8)。またメタノール培養時、*M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T の生育能は *M. extorquens* AM1 株と比べて顕著に高かった (図 8)。シロイヌナズナ葉面において *M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T と *M. extorquens* AM1 株を競合させると、*M. fujisawaensis* DSM5696T 株および *M. radiotolerans* JCM28431T が優占化することが報告されている [43]。このことからメタノールの代謝能力が葉面での優占化に影響することが示唆される。*M. aquaticum* 22A 株は、すべての株に対し、炭素源にかかわらず増殖能が上回った (図 8)。*M. aquaticum* 22A 株は、ビタミン要求性であり、ピリドキシンとビオチンの両方が生育に必要である。葉面にこれらのビタミンがあれば *M. aquaticum* 22A 株もそれを利用して生育できると考えらる。

### 第3章 葉面定着能に寄与する *Methylobacterium extorquens* AM1 概日性遺伝子ホモログ *kaiC* の分子生理機能

#### 3.1 背景

微生物は自然界での生存において様々なストレスや環境変化に曝されており、これらに適応しながら生存している。葉面における *Methylobacterium* spp. の主要な炭素源であるメタノールの存在量は、葉面上で日周変動しており、夜間に濃度が高まり、昼間に濃度が低くなることが報告されている [4]。加えて植物の光合成活性も日周変動し、それに伴い葉面では水分量や活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の量も変動しており、微生物の環境に影響を及ぼしている [44]。 *Methylobacterium* spp. がこのように日周変動する葉面に生育するためには、メタノール代謝酵素に加えて PhyR と呼ばれる様々なストレス耐性を誘導するレギュレーターが必要であることも報告されている [17, 45]。

概日リズムとは外界からの刺激に関係なく、生体内で約 24 時間周期のリズムを刻む現象を指す。光合成細菌 *Synechococcus elongatus* PCC7942 において、KaiA、KaiB、KaiC の 3 つのタンパク質が概日リズムを生じていることが知られている [46, 47]。この中心となるタンパク質が KaiC であり、自己キナーゼ能および自己リン酸化能を持っている。KaiA は KaiC のリン酸化を促進し、KaiB は KaiA を抑制する。これらの働きにより、KaiC のリン酸化状態が約 24 時間周期で変化することで概日リズムを生じている。 *Synechococcus elongatus* の KaiC には温度補償性と呼ばれる、温度により活性が変わらない性質があり、これにより外界の温度によらず 24 時間の周期を刻むことが可能となっている [48, 46]。そしてこの KaiC のリン酸化リズムが下流の遺伝子発現に伝わることで細胞に 24 時間のリズムが生まれる。

*Haloferax volcanii*、 *Sulfolobus islandicus* のような古細菌や *Legionella pneumophila* のような真正細菌でも KaiC のホモログが報告されている [49, 50, 51]。これらの研究によると、KaiC が UV ストレス、酸化ストレス、そして光依存的な遺伝子発現に関係していることが示唆されている。近年、 *Rhodospseudomonas palustris* において、KaiC が規則的なリズムを刻む能力よりもむしろ、周期的に変化する環境への定着促進に関係していることが報告されている [52]。 *Synechococcus elongatus* の KaiC が生じる概日リズムの研究はよく研究されて

いるのに対し、*Synechococcus elongatus* 以外の微生物の持つ KaiC の機能については研究が進んでいない [47]。さらに、*Synechococcus elongatus* 以外の微生物においても KaiC のリン酸化部位が高度に保存されており、リン酸化が機能の制御を司っていると考えられるが [50]、*Synechococcus elongatus* 以外の微生物における KaiC のリン酸化がどのような機能を果たしているかは明らかになっていない [49, 50, 51, 52]。

本章では、光合成細菌では概日性遺伝子として知られている *kaiC* の *M. extorquens* AM1 *kaiC* ホモログが葉面定着に寄与することを発見し、その生化学的機能解析を行った。

## 3.2 実験手法

### 3.2.1 使用菌株及び培養

*M. extorquens* AM1 株 [15] を親株として、種々の *kaiC* 遺伝子破壊株、*kaiC* 改変株を作製し、本研究で使用した (表 4)。これらの菌株をグリセロールストックからとり、0.5%メタノールを含む MM 寒天培地に画線し、4 日間、28 °C で培養した後、4 °C の冷蔵庫に保存した。0.2%コハク酸二ナトリウムを含んだ MM 培地にプレート上のコロニーを植菌し、2 日間、28 °C で培養し、これを前培養とした。なお、このとき試験管を培養容器として用い、MM 培地の容量は 5 mL とした。前培養した菌体を 0.5%メタノールと種々のビタミン B 群を加えた MM 培地に OD<sub>600</sub>=0.002 になるよう植菌し、28 °C で培養した。また必要に応じて抗生物質としてカナマイシン (kanamycin, Km, 10 µg/mL)、テトラサイクリン (tetracycline, Tet, 10 µg/mL)、およびアンピシリン (ampicillin, Amp, 50 µg/mL) を加えた。

### 3.2.2 プラスミドの作製と変異株の作製

遺伝子破壊株の作製には pCM184 に標的遺伝子上流下流の領域を組み込んだベクターを使用し、標的遺伝子と抗生物質耐性遺伝子とを入れ替えることで作製した。遺伝子発現株の作製には pCM168, pCM1682, pCM1683 を用い、目的遺伝子を染色体に導入した。抗生物質耐性マーカの再利用にあたっては、pCM157 または pCM158 を用い、*cre-loxP* システムにより抗生物質耐性遺伝子を取り除いた。使用したプラスミドを表 4 に示す。

2 つの遺伝子を導入する場合には、まず pCM1682 により 1 つ目の遺伝子を導入したのち、pCM1683 を用いて 2 つ目の遺伝子を導入した。pCM1683 は目的遺伝子を遺伝子座 4135512 の領域に組み込むよう pCM168 を改変したプラスミドである。pCM1682 はカナマイシン耐性遺伝子、pCM1683 はテトラサイクリン耐性遺伝子を持つため、両方の耐性を示したものをスクリーニングすることで目的の変異株を取得できる。

### 3.2.3 シロイヌナズナ葉面での競合実験

競合実験には *M. extorquens* AM1 株のカナマイシン耐性株とテトラサイクリン耐性株を用いた。前培養した各株を 0.5%メタノールを含む MM 培地に OD<sub>600</sub>=0.002 になるよう植菌し、28 °C で 3 日間培養した。菌液を 15,000 × g、4 °C の条件で 2 分間遠心分離し、上清を捨て菌体を回収した。菌体から培地を洗い流すために、菌体を滅菌水に再懸濁し、再度同条件で遠心分離を行い菌体を回収した。この洗浄操作をもう一回繰り返した。洗浄後の菌体を、各株の OD<sub>600</sub> がそれぞれ 0.05 になるように懸濁し、これを接種用の菌懸濁液とした。



表 4. 使用した菌株およびプラスミド一覧

Strain or plasmid	Characteristics	Reference or source
Strains: <i>Methylobacterium extorquens</i>		
AM1	Wild-type	
$\Delta kaiC1$	AM1 $\Delta kaiC1$	This study
$\Delta kaiC2$	AM1 $\Delta kaiC2$	This study
$\Delta kaiC1 \Delta kaiC2$	AM1 $\Delta kaiC1 \Delta kaiC2$	This study
$\Delta labA$	AM1 $\Delta labA :: Km^r$	This study
$kaiC2/\Delta kaiC2$	$\Delta kaiC2$ locus 4135512:: $kaiC2$	This study
Use for competition assay		
WT-tet	AM1 $kaiA::Tet^r$	This study
WT-km	AM1 $kaiA::Km^r$	This study
$\Delta kaiC1$ -km	$\Delta kaiC1 kaiA::Km^r$	This study
$\Delta kaiC2$ -km	$\Delta kaiC2 kaiA::Km^r$	This study
$kaiC1$ -km/ $\Delta kaiC1$	$\Delta kaiC1 /kaiC1 kaiA::Km^r$	This study
$kaiC2$ -km/ $\Delta kaiC2$	$\Delta kaiC2 /kaiC2 kaiA::Km^r$	This study
$kaiC2m$ -km/ $\Delta kaiC2$	$\Delta kaiC2 /kaiC2m kaiA::Km^r$	This study
Use for western blot analysis		
$kaiC1$ -FLAG	AM1 locus 4135512:: $(P_{kaiC1}-kaiC1-5xFLAG, Tet^r)$	This study
$kaiC2$ -FLAG	AM1 locus 4135512:: $(P_{kaiC2}-kaiC2-5xFLAG, Tet^r)$	This study
$kaiC1m$ -FLAG	AM1 locus 4135512:: $[P_{kaiC1}-kaiC1(S432A, S433A)-5xFLAG, Tet^r]$	This study
$kaiC2m$ -FLAG	AM1 locus 4135512:: $[P_{kaiC2}-kaiC2(S426A)-5xFLAG, Tet^r]$	This study
Plasmids		
pUC19	Cloning vector	Takara Bio Inc.
pBluescriptII SK+	Cloning vector	Stratagene Inc.
pCM168	Allelic exchange vector with $kaiA::Tet^r$ between $loxP$ sites	[53]
pCM184	Allelic exchange vector with $Km^r$ between $loxP$ sites	[54]
pCM1682	Allelic exchange vector with $kaiA::Km^r$	This study
pCM1683	Allelic exchange vector with (1p4043-4049 locus):: $Tet^r$ between $loxP$ sites	This study
pCM157	cre expression vector with $Tet^r$	[54]
pCM158	cre expression vector with $Km^r$	[54]

シロイヌナズナの種子を 70%エタノールに 30 秒間浸し、スピンドウンしてエタノールを取り除いた後、0.3% Tween20 を含む 0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (アンチホルミン) に 15 分間浸し、種子表面を殺菌した。種子を滅菌水で 5 回洗浄した後、春化処理のため新しい滅菌水に浸して 4 °C で 1 晩静置した。上清を取り除き、種子を接種用の菌懸濁液に浸し、回転混和装置 (Rotator RT-5, Taitec, Saitama, Japan) を用いて 2 時間回転混和した。菌体を接種したシロイヌナズナ種子を、0.8% Difco agar (Difco Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) および 1% スクロースを含む Murashige & Skoog 寒天培地 (Duchefa, Hearlem, Netherland) に播種し、パラフィルムを一重に巻いた後、人工気象機内 (Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan) において 25 °C で 14 日間生育させた (明条件 14 時間、暗条件 10 時間周期)。生育したシロイヌナズナの地上部をハサミとピンセットを用いて切り

取り、予め 1.5 mL チューブに用意しておいた 1 mL の滅菌水中に移した。2 時間振盪し、葉面から菌体を回収した。回収した菌体の細胞数を測定するために、回収した菌液を 0.5%メタノールおよびカナマイシンまたはテトラサイクリンを含む MM 寒天培地に塗布し、28 °C で 4、5 日間培養した後、生じたコロニー数を計測した。生じたコロニー数と塗布した菌液量から、葉 1 枚あたりの菌体数を算出した。

#### 3.2.4 KaiC タンパク質の検出

*M. extorquens* AM1 株を対数増殖期中期 ( $OD_{600}=1.0-1.5$ ) まで 0.5%メタノールを含む MM 培地で培養した。回収した細胞を 0.25 M 水酸化ナトリウム (sodium hydroxide) と 1% 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) を含む lysis buffer に懸濁したのち、トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid) を加え混和した。遠心分離後、ペレットを冷アセトンで洗浄し、50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) に懸濁した。TaKaRa Bradford Protein Assay Kit を用いて懸濁液のタンパク質を定量したのち、50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) で希釈してサンプル溶液を作製した。

サンプル溶液をタンパク質 10 *μg* 含む量だけ SDS-PAGE ゲルにのせ、300 mV、25 mA で電気泳動を行った。このとき SDS-PAGE ゲルには 5  $\mu$ M Phos-tag acrylamide(Wako, Osaka, Japan) および 10  $\mu$ M  $MnCl_2$  (KaiC1 分離時) または 10  $\mu$ M  $ZnCl_2$  (KaiC2 分離時) を含むように調整した。KaiC タンパク質の検出は、Coomassie Brilliant Blue G-250(CBB) 染色および 1 次抗体に Flag ペプチド (wako)、2 次抗体にマウスモノクローナル抗体 (wako) を使用したイムノブロットング法を用いた。

#### 3.2.5 逆転写 PCR による遺伝子発現レベルの解析

*M. extorquens* AM1 株を対数増殖期中期まで 28 °C で培養した。培養した細胞に光照射、0.5 mM 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 処理、200 mM 塩化ナトリウム ( $NaCl$ ) 処理、50 mM 塩化マグネシウム ( $MgCl_2$ ) 処理、200 mM スクロース (Sucrose) 処理、40 °C のヒートショックをそれぞれ 1 時間ほど行った。光照射に関しては、UV ランプ (Toshiba, Tokyo, Japan) または LED ランプ (TAITEC, Saitama, Japan) で 1 時間照射した (UV 254 nm、青色光 (blue light) 360-500 nm、赤色光 (red light) 580-630 nm、白色光 (white LED) 430-650 nm)。全 RNA は TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて抽出、精製を行った。逆転写反応は、Superscript Reverse Transcriptase(Invitrogen) および random primer (Promega, Madison, CA) を用いて行った。定量 PCR は LightCycler system (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) および SYBR Premix ExTaq (Takara Bio, Shiga, Japan) を使用して行った。使用したプライマーを表 5 に

示す。

### 3.2.6 ストレス耐性試験

*M. extorquens* AM1 株を対数増殖期中期まで 0.5%メタノールを含む MM 培地で培養した。菌体を MM 培地で洗浄し、MM 培地で  $OD_{600}=1$  になるように調整して、後述する試験に供した。特別な指示がない限り、培養温度は 28 °C とする。熱耐性に関しては以下の方法で調べた。細胞懸濁液を 1.5 mL チューブに 400  $\mu$ L 移し、50 °C で 30 分間インキュベートした。その後速やかに氷冷し、MM 寒天培地にまき広げて培養し、生じたコロニー数を計測した。UV 耐性に関しては以下の方法で調べた。細胞懸濁液を約 500 細胞含む量だけ MM 培地 (メタノール含む) にスポットし、UV (10.5 a.u.、UV radiometer UVR-254 を用いて測定) を 12 秒間照射した。その後培養し、生じたコロニー数を計測した。

### 3.2.7 統計解析

統計解析には統計分析フリーソフト「R」を用いた。有意差検定には multcomp パッケージ (glht function) の Dunnett 検定および Tukey 検定を用いた。

表 5. 使用したプライマー一覧

Use	Primer name (locus)	Oligonucleotide sequence
Vector construction		
pCM1682	pCM184-kan-Fw(1071)	CGggtaccTATACGAAGTTATCTAGACC
	pCM184-kan-Re(2060)	GgaattcAGTGTTCACAACCAATTAACC
	pCM168-Fw (491)	GaagcttCTAGAATTTCGAGC
	pCM168-Re (5410)	AActgcagTTATGCGGCGCCATACATG
	pCM168-ori-Fw(1510)	TCGGCCACGTGCCTGCCAAG
pCM1683	pCM168-ori-Re(4470)	GCGGTGAGCGAATTTATGGT
	pCM168-MCS-Fw(5401)	GGCCGCATAACTTCGTATAG
	pCM168-MCS-Re(880)	GAGGCGATATCGTCCATTCC
	AM1-Fw (4134556)	CCGGTCAATTTTCTTGTGAC
	AM1-Re (4136604)	GGCAGTACTGGACACGTTGG
Gene deletion		
$\Delta kaiC1$	DkaiC1-up-Fw(4608620)	CgagctcGTCCATCGAGCCCGGCATGT
	DkaiC1-up-Re(4607921)	CgagctcGGAGCGCTCTTCAAGCGTC
	DkaiC1-down-Fw(4606320)	GGggtaccATGCGCGAGGCGATGCTGAC
	DkaiC1-down-Re(4605501)	GgaattcGCCTGCGCTTCGTCCAAAGC
$\Delta kaiC2$	DkaiC2-up-Fw(23680)	CgagctcAAGCATCTGTTCAGCATTTC
	DkaiC2-up-Re(22917)	CgagctcCGGCTCGGACGCCGCTCCTG
	DkaiC2-down-Fw(21430)	GGggtaccAGATGCTGAAGGGGCCGAGT
	DkaiC2-down-Re(20711)	GgaattcTCGTCGACGACATGGGCCAG
$\Delta labA$	AM1-labA-up-Fw(41000)	ATCGaccggtGCTACTACCTGACCGTCAGG
	AM1-labA-up-Re(40301)	AATGaccggtGTCCGTGCCGATGGATTCTT
	AM1-labA-down-Fw(39770)	ACGGggtaccGTGTCGACGATCCAGACGCA
	AM1-labA-down-Re(39051)	ACCGgaattcCGATCTTCTCGCGCAGCATC
RT-qPCR		
<i>kaiC1</i>	kaiC1q-Fw(4607892)	GACGGCTTCGATACCATCAC
	kaiC1q-Re(4607734)	CTCCTCGAAGCTCATGAACA
<i>kaiC2</i>	kaiC2q-Fw (22509)	CGAACGCGTGGTGTTCGACA
	kaiC2q-Re (22381)	TCGAGCATCAACACGGTGCA
<i>labA</i>	labAq-Fw (40138)	ACCTCTACAGCACGACCAAG
	labAq-Re (39979)	TAGTCGAGCCAGTCCAGGAG
<i>phaA</i>	phaAq-Fw(3846357)	CAGGAATCGATGTCGCTCAG
	phaAq-Re(3846545)	GAACTGGTCTGCTGTTCCG
Expression of mutant kaiC		
KaiC1(S432A, S433A)	PkaiC1-Fw (4608500)	GGggtaccCTCCAGCATATCGACGCCA
	kaiC1- -Re(4606255)	GgaattcTCATCGCGTGCCTCCCCGGC
	kaiC1m-Fw(4606692)	GTCGCCGCGCTGATGGATGCCCTGGA
	kaiC1m-Re(4606681)	TCAGCGCGGCGACGCCGATATTGCTG
KaiC2(S426A)	PkaiC2-Fw (23300)	GGggtaccATCACCTTCATTTCGATCGTT
	kaiC2-Re (21390)	GgaattcTCAAGCGCCGTCCTCCCCGGT
	kaiC2m-Fw (21644)	CTGGCCTACCTCAGCGACTGCATCTCTG
	kaiC2m-Re (21633)	GAGGTAGGCCAGGTCGATGTCGGT
Expression of tagged proteins		
5xFLAG	FLAG-Fw	CGggtaccATGATCCCCGGTTAATTAATC
	FLAG-Re	GC tctaga gaattcTCATAAATCATAAGAAATTC
$P_{kaiC1}$ - <i>kaiC1</i>	PkaiC1-Fw2(4608500)	GGggtaccCTCCAGCATATCGACGCCA
	kaiC1-Re2(4606258)	CGggtaccTCGCGTGCCTCCCCGGCGG
PP $_{kaiC2}$ - <i>kaiC2</i>	PkaiC2-Fw2(23300)	GGggtaccATCACCTTCATTTCGATCGTT
	kaiC2-Re2 (21393)	CGggtaccAGCGCCGTCCTCCCCGGTCTCAC
Luciferase reporter		
<i>luxAB</i>	luxAB-Fw	GGggtaccATGAAATTTGAAACTTCCTTCTCAC
	luxAB-Re	GAagatctTTACGAGTGGTATTTGACGATG
<i>kaiC1</i> promoter	PkaiC1-Fw(4608500)	CCCaaagcttCTCCAGCATATCGACGCCA
	PkaiC1-Re(4607983)	GGggtaccGGCAGGTCTCCAGGACGATT
<i>kaiC2</i> promoter	PkaiC2-Fw (23300)	CCCaaagcttATCACCTTCATTTCGATCGTT
	PkaiC2-Re (22917)	GGggtaccCGGCTCGGACGCCGCTCCTG
<i>labA</i> promoter	PlabA-Fw (40620)	CCCaaagcttAGCGTCTCAGGATCCTGGC
	PlabA-Re (40179)	GGggtaccTCTCTTCTCCTGCGACCCG
<i>phaA</i> promoter	PphaA-Fw(3845604)	CCCaaagcttGAGGTGCCGGTGTGATAGAG
	PphaA-Re(3846136)	GGggtaccGCGCGCTCCAGTGCGGCCTT

### 3.3 結果

#### 3.3.1 *M. extorquens* AM1 株の KaiC1、KaiC2 およびこれらのリン酸化

シアノバクテリアにおいて概日リズムを司る KaiC ファミリータンパク質は、多くの真正細菌や古細菌にも保存されており、*Methylobacterium* spp. の全てにおいても保存されている (図 9)。*M. nodulans* を除く 17 種のゲノム上には複数の異なる Kai ホモログが認められた (表 10)。*M. extorquens* AM1 株には *kaiC1* を含むクラスタ (*kaiC1-kaiB2-kaiB1-kaiR1*) と *kaiC2* を含むクラスタ (*kaiC2-kaiR2*) の 2 つ *kai* 遺伝子クラスタが存在している。シアノバクテリア *kaiC1* との相同性は、*M. extorquens* AM1 株の *kaiC1* が *kaiC2* より高かった。*M. extorquens* AM1 株において *kaiC* は染色体上に存在しているのに対し、シアノバクテリアにおいてシグナルを下流へと伝えるレギュレーターである *labA*[55] ホモログはメガプラスミド上に存在していた。

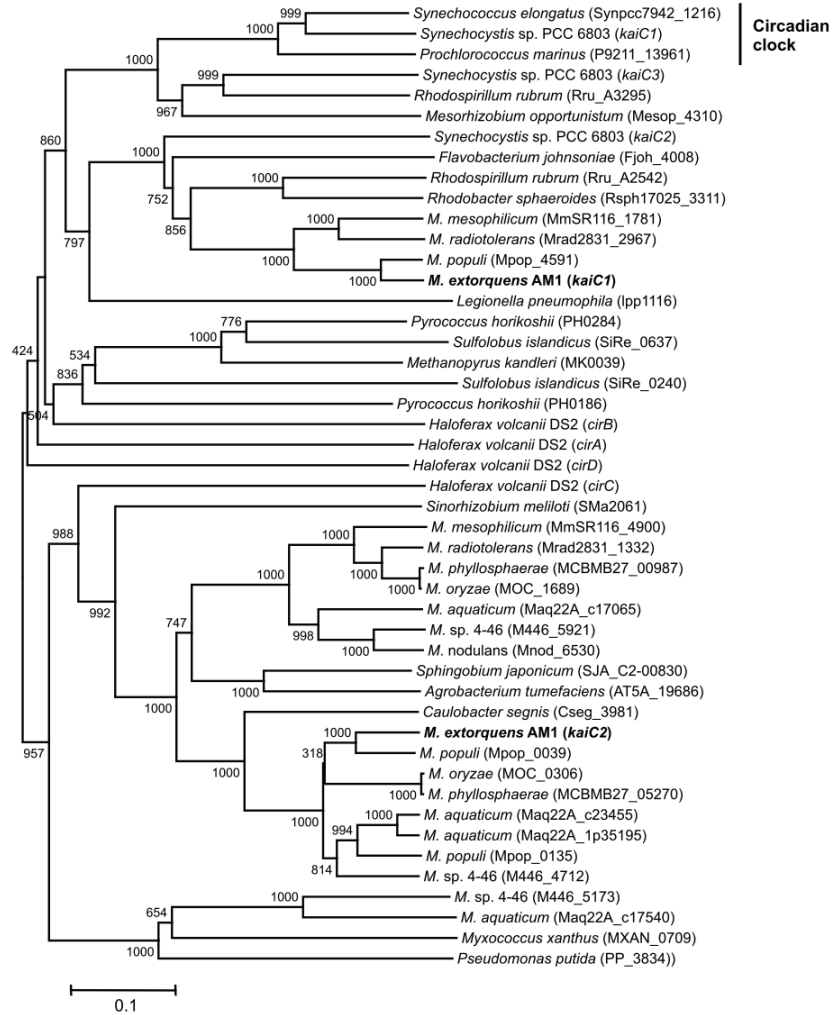
KaiC タンパク質のアミノ酸配列が高い多様性を持つにもかかわらず、KaiC のリン酸化部位は種を超えて高度に保存されている [46, 56, 47]。*M. extorquens* AM1 株の KaiC1 と KaiC2 の相同性は 31% に過ぎないが、シアノバクテリアのリン酸化部位に対応するセリン残基は KaiC1、KaiC2 ともに保存されていた (KaiC1:S432 と S433、KaiC2:S426)(図 11)。KaiC1 と KaiC2 のリン酸化部位をイムノプロット法により確認するために、KaiC1、KaiC2 およびこれらのリン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニン置換した KaiC1m (S432、S433)、KaiC2m (S426) の C 末端に Flag タグを融合した変異株を作製した。24 °C で培養し、Phos-tag を含んだ SGS-PAGE ゲルにより分離したところ、KaiC1、KaiC2 では複数のバンドが検出された一方で、KaiC1m、KaiC2m ではバンドの数が減少したことから、置換したセリン残基がリン酸化されていることを明らかにした (図 11)。

#### 3.3.2 シロイヌナズナ葉面の定着における KaiC の寄与

*M. extorquens* AM1 株における 2 つの *kaiC* と *labA* によるシロイヌナズナ葉面の定着への影響を調べるために、それぞれの遺伝子を欠損させた株を作製した ( $\Delta$ *kaiC1* 株、 $\Delta$ *kaiC2* 株、 $\Delta$ *kaiC1* $\Delta$ *kaiC2* 株、 $\Delta$ *labA* 株)。MM 培地にて 28 °C で各変異株を培養した場合、いずれの変異株の生育も野生株と差がなかった (図 12A)。よって KaiC1、KaiC2、LabA はメタノールでの生育には必須ではないことが示唆された。

次に、シロイヌナズナ種子に野生株 (Tet<sup>r</sup>) と各変異株 (Km<sup>r</sup>) を混合 (1:1) して接種した場合の葉面における割合を調べた (図 12B)。 $\Delta$ *kaiC2* 株、 $\Delta$ *kaiC1* $\Delta$ *kaiC2* 株、および  $\Delta$ *labA* 株の割合は野生株と比べて顕著に低く、特に  $\Delta$ *labA* 株は 10-15% しか検出できなかった。これ

A



B

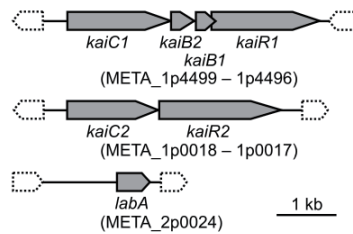


図 9: KaiC タンパク質の系統樹および *M. extorquens* AM1 株の *kai* 遺伝子構成  
 (A) KaiC タンパク質アミノ酸配列の系統樹。GONNET プログラムを用いて作製  
 (B) *M. extorquens* AM1 株の持つ複数の遺伝子の構成

Organism	<i>kaiC</i> locus organization
<i>M. extorquens</i> AM1	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>
<i>M. extorquens</i> PA1	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>
<i>M. extorquens</i> DM4	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>
<i>M. extorquens</i> CM4	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>
<i>M. extorquens</i> PSBB040	<i>kaiCBBR, kaiCR, kaiCR</i>
<i>M. extorquens</i> TK 0001	<i>kaiCBBR, kaiCR, kaiKCR</i>
<i>M. zatmanii</i> PSBB041	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>
<i>M. populi</i> BJ001	<i>kaiCBBR, kaiCR, kaiCR</i>
<i>M. radiotolerans</i> JCM 2831	<i>kaiCBBR, kaiCK</i>
<i>M. mesophilicum</i> SR1.6/6	<i>kaiCBBR, kaiCK</i>
<i>M. aquaticum</i> MA-22A	<i>kaiCR, kaiCR, kaiCK, kaiCK</i>
<i>M. oryzae</i> CBMB20	<i>kaiCR, kaiCK</i>
<i>M. phyllosphaerae</i> CBMB27	<i>kaiCR, kaiCK</i>
<i>M. nodulans</i> ORS 2060	<i>kaiCK</i>
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	<i>kaiCR, kaiCK, kaiKCR</i>
<i>Methylobacterium</i> sp. GXF4	<i>kaiCR</i>
<i>Methylobacterium</i> sp. AMS5	<i>kaiCBBR, kaiCR</i>

*C*, *kaiC* gene; *B*, *kaiB* gene; *R*, *kaiR* gene encoding kinase and response regulator domains; *K*, *kaiK* gene encoding kinase domain.

図 10: *Methylobacterium* spp. の *kai* 遺伝子群

らの結果から、シロイヌナズナ葉面での生育に KaiC2 と LabA が重要であることを明らかにした。

さらにシロイヌナズナ葉面への定着における KaiC2 のリン酸化の影響を同様の実験により調べた。Δ*kaiC2* 株に *kaiC2* を相補した株の割合は野生株と比べて有意な差はみられなかったが、リン酸化部位をアラニンに置換した変異体 *kaiC2m* 株 (S426A) の割合は野生株と比べて有意に低かった (図 12B)。これらの結果から、KaiC2 の 426 番目のセリン残基のリン酸化がシロイヌナズナ葉面での生育において重要であることを明らかにした。

### 3.3.3 環境刺激に対する *kaiC1* および *kaiC2* の応答

環境刺激を受けた際の *kaiC1* および *kaiC2* の遺伝子発現レベルの変化を調べた。UV または青色光により *kaiC1* の発現レベルが 3.5 倍に上昇した一方で、赤色光と白色光を照射しても変化はなかった (図 14A)。しかし Δ*kaiC2* 株および Δ*labA* 株では、UV による発現レベルの上昇が抑えられた (図 14B)。40 °C への高温シフトや高塩濃度処理 (200 mM 塩化ナトリウム、50 mM 塩化マグネシウム) により *kaiC2* の発現レベルが 3-4 倍に上昇したが (図 14A)、Δ*kaiC1* 株および Δ*labA* 株では、40 °C への高温シフトによる発現レベルの上昇が抑えられた (図 14B)。活性酸素種 (0.5 mM 過酸化水素) や高浸透圧処理 (200 mM スクロース) では *kaiC1*

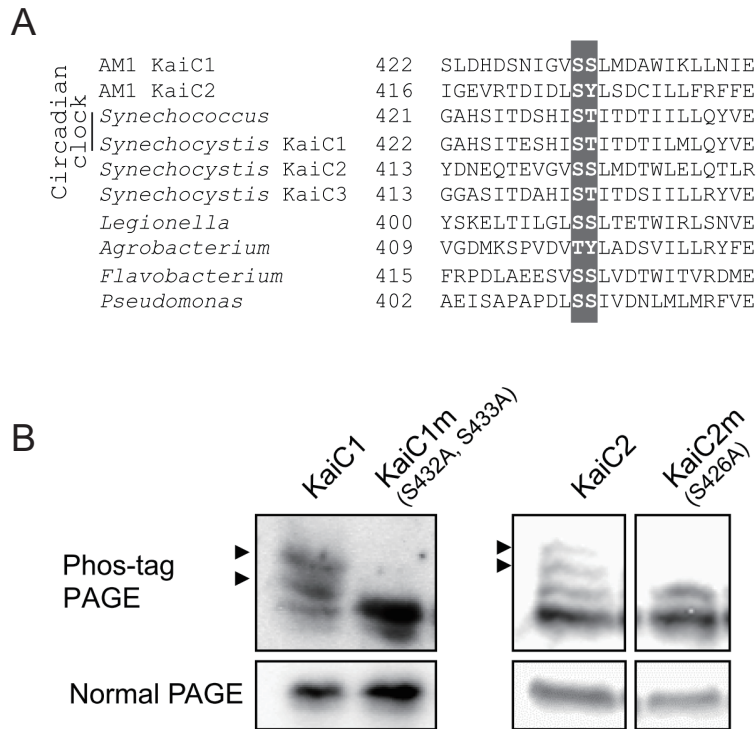


図 11: *M. extorquens* AM1 株の KaiC リン酸化

(A) 様々な微生物における KaiC 配列 (B) KaiC タンパク質の Normal および Phos-tag-PAGE によるウェスタンブロッティング結果

および *kaiC2* の発現レベルは変化しなかった (図 14A)。これらの結果から、LabA は環境刺激に対する *kaiC1* および *kaiC2* の発現制御にとって重要であることが示唆される。

続いて、種々の変異株における種々のストレスに対する耐性を調べた (図 15、図 13)。 $\Delta$ *kaiC1* 株は野生株と比べて UV に対する感受性が向上した (図 15A)。よって KaiC1 は UV 刺激に適応する上での正の制御因子として働くことを明らかにした。 $\Delta$ *kaiC1* 株が野生株と比べて UV に対する感受性が向上した一方で、 $\Delta$ *kaiC2* 株は  $\Delta$ *labA* 株は野生株と比べて UV および熱ストレスに対する抵抗性が向上した (図 15A)。したがって、KaiC1 と KaiC2 は正反対の制御機能をもつことを明らかにした。

$\Delta$ *kaiC2* 株に *kaiC2* を相補した株の UV ストレスに対する感受性は野生株と同程度であった一方で、リン酸化部位変異株  $\Delta$ *kaiC2m* 株の感受性は野生株と比べて向上した (図 15A)。したがって、KaiC2 のリン酸化は UV ストレスに適応する上での負の制御因子として働くことがわかった。



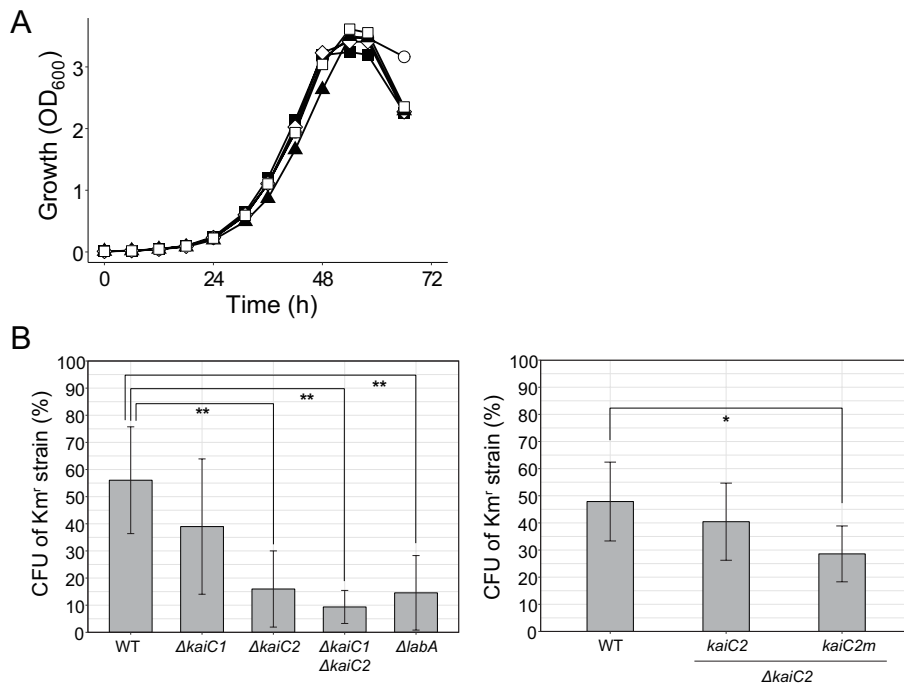


図 12: *M. extorquens* AM1 株のシロイヌナズナ葉面における生育  
 (A)0.5%を含むメタノール MM 培地にて 28 °C で生育した場合の各株 (WT(●)、 $\Delta kaiC1$ (▲)、 $\Delta kaiC2$ (■)、 $\Delta kaiC1 \Delta kaiC2$ (○)、 $\Delta labA$ (△)) の生育。(B) シロイヌナズナに野生株 (Tet<sup>r</sup>) とともに接種した場合の、葉面における野生株に対する各株 (Km<sup>r</sup>) の割合。バーはデータの平均値、エラーバーは標準偏差を示す。Dunnnett 検定により有意差検定を行った (P<0.01 ならば\*\*、P <0.05 ならば\*)。

### 3.3.4 KaiC による温度依存的な UV 耐性の制御

$\Delta kaiC1$  株、 $\Delta kaiC2$  株、 $\Delta kaiC1 \Delta kaiC2$  株、および  $\Delta labA$  株について異なる培養温度での UV 耐性を調べた。UV 処理後の野生株の生存率は、培養温度が上がるとともに高くなることわかった (図 16)。 $\Delta kaiC1$  株はいずれの温度においても、同じ温度の野生株と比較して生存率が低下した (図 16)。 $\Delta kaiC2$  株は、24 °C、28 °C で培養した場合には野生株と比べて UV 処理後の生存率が上昇したが (24 °C の場合、P=0.0767)、32 °C で培養した場合には野生株の生存率と差が生じなかった (図 16)。よって、KaiC2 の負の制御因子としての機能は温度依存的であることが示された。 $\Delta kaiC1 \Delta kaiC2$  株は  $\Delta kaiC1$  株と  $\Delta kaiC2$  株の中間的な表現型を示した。

続いて、異なる温度における KaiC1 と KaiC2 のタンパク質レベルを調べた。32 °C で培養した際の KaiC1 の発現レベルは、24 °C、28 °C のときと比べて顕著に低下した (図 17)。 $kaiC2$  の遺伝子発現レベルが高温ストレス条件下では上昇した一方で (図 15B)、KaiC2 タンパク質

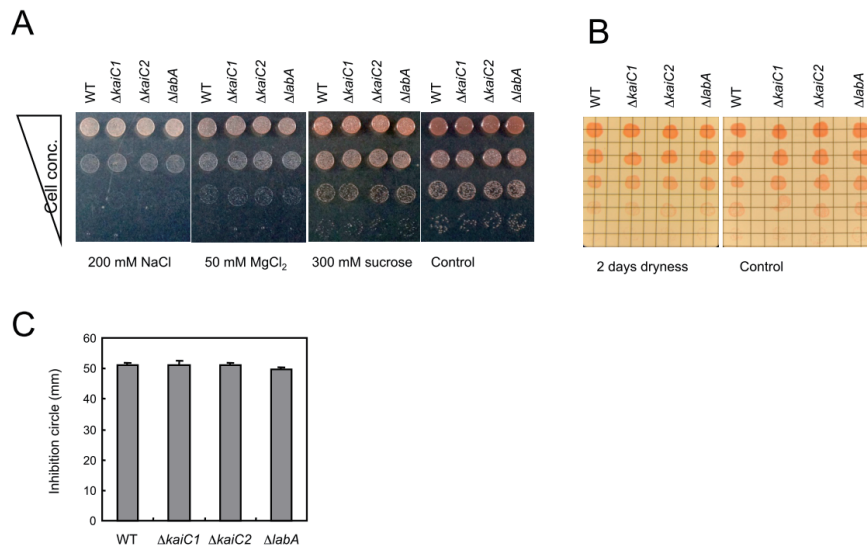


図 13: *kaiC* 関連遺伝子の環境刺激に対する応答

(A) 高濃度塩ストレスに対する応答。種々の化合物を含んだ寒天培地に各破壊株をスポットした。

(B) 乾燥ストレスに対する応答。フィルターに菌株をスポットしたのち、滅菌した空気下で2日間乾燥させ、培地上に設置した。その後3日間培養した。

(C) 酸化ストレスに対する応答。過酸化水素を含む円形ろ紙により生じた阻止円の大きさにより評価した (N=5)。

レベルは温度によって差がなかった (図 17)。KaiC2 のリン酸化レベルは温度の上昇とともに低下することがわかった (図 17)。これらの結果から KaiC1 のタンパク質レベルと KaiC2 のリン酸化レベルが環境温度に従って UV 耐性を制御していることを明らかにした。

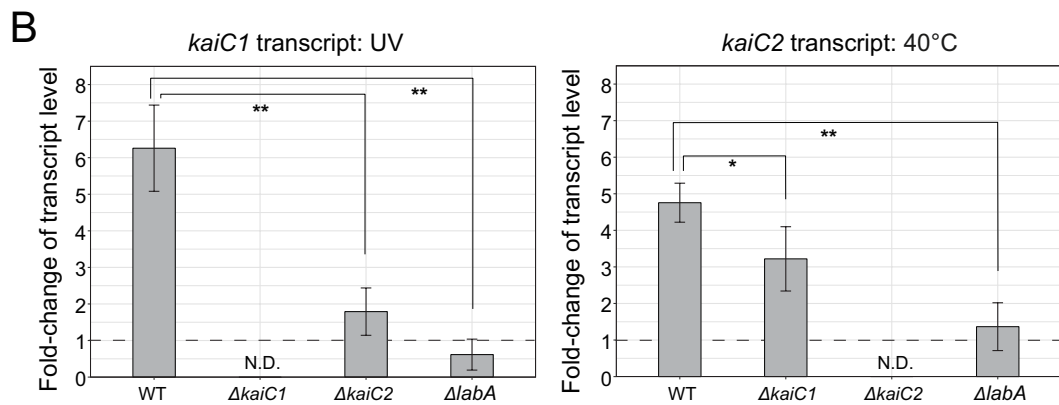
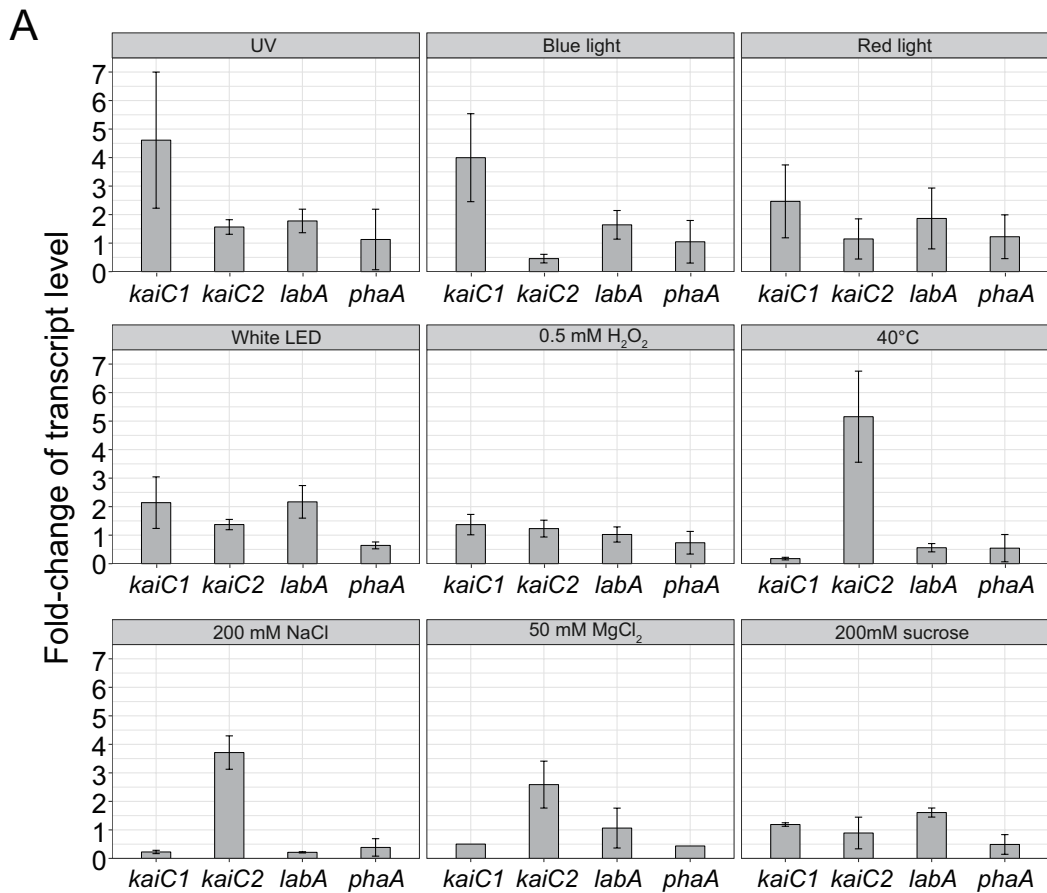


図 14: *kaiC* 関連遺伝子の環境刺激に対する応答  
 (A) 様々な刺激に対する *kaiC* 関連遺伝子の応答。(B) *kaiC1* と *kaiC2* の野生株および種々の変異株における環境刺激に対する応答。バーはデータの平均値、エラーバーは標準偏差を示す。Dunnett 検定により有意差検定を行った ( $P < 0.01$  ならば\*\*,  $P < 0.05$  ならば\*).

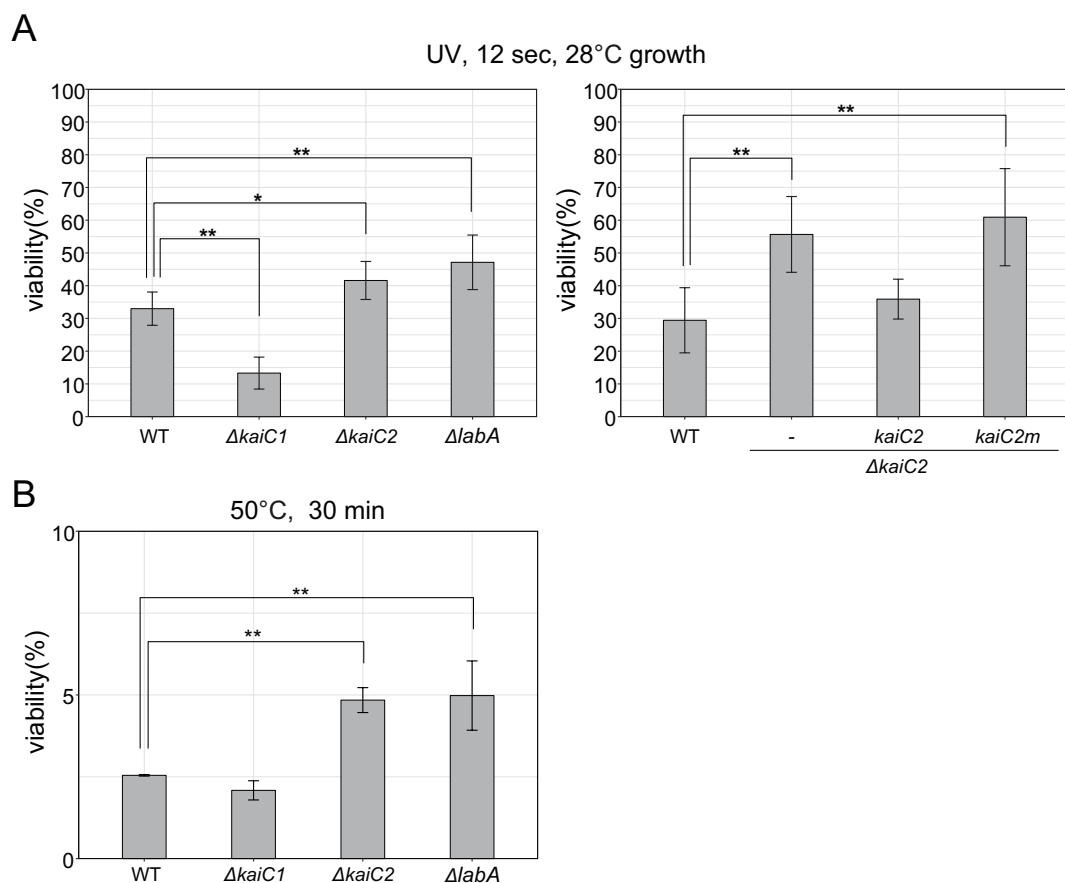


図 15: *kaiC* 関連遺伝子破壊株の環境刺激に対する耐性  
 (A) UV ストレスを 12 秒間かけた場合の *kaiC* 関連遺伝子破壊株とその相補株の生存率。(B) 熱ストレス (50 °C) を 30 分間かけた場合の *kaiC* 関連遺伝子破壊株とその相補株の生存率。バーはデータの平均値、エラーバーは標準偏差を示す。Dunnett 検定により有意差検定を行った (P<0.01 ならば\*\*, P<0.05 ならば\*)。

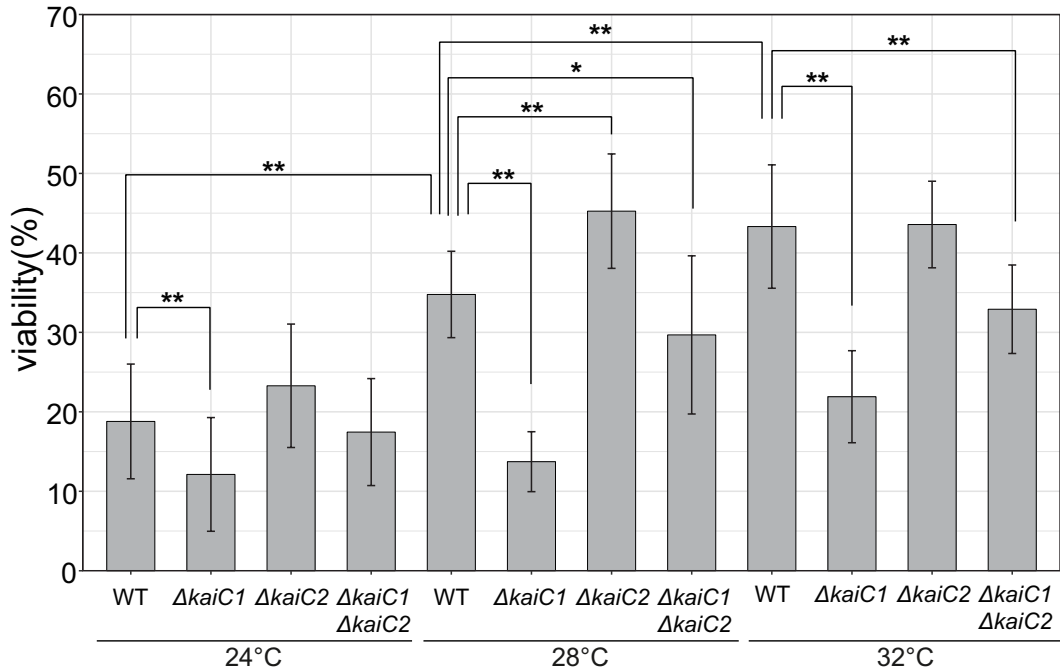


図 16: *kaiC* 関連遺伝子破壊株における温度依存的な UV 耐性  
 バーはデータの平均値、エラーバーは標準偏差を示す。データ数は 7-34 である。Dunnett 検定および Tukey 検定により有意差検定を行った ( $P < 0.01$  ならば\*\*,  $P < 0.05$  ならば\*)。

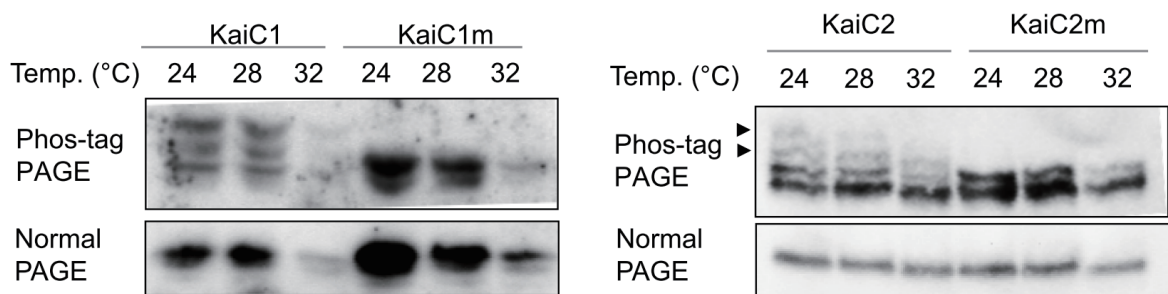


図 17: 温度依存的な KaiC タンパク質のリン酸化レベルおよびタンパク質量

### 3.4 考察

*M. extorquens* AM1 株の KaiC1 および KaiC2 はどちらもリン酸化されており (図 11)、KaiC2 のリン酸化部位をアラニン置換した *KaiC2m* 株の温度依存的 UV 耐性や葉面定着は、 $\Delta kaiC2$  株と同程度であったことから、温度依存的 UV 耐性がリン酸化と強く関連していることが示唆された (図 12、図 16)。さらに培養温度の低下に伴いリン酸化される KaiC は、UV 耐性を誘導する経路を抑制していた (図 17)。KaiC2m 株および  $\Delta kaiC1\Delta kaiC2$  株は野生株と比べ定着能力が低下した (図 12)。温度や UV のような環境刺激への適応の制御は、環境中での特定の刺激に対する細胞の過剰応答を避けるのに重要であり、*M. extorquens* AM1 株においては KaiC システムによる制御が葉面定着を有利にしている可能性がある。一方で、 $\Delta kaiC1\Delta kaiC2$  株の UV 耐性は、24 °C、28 °C では野生株よりも高かったことから (図 17)、KaiC2 が UV 耐性を抑制し、また他の環境適応を制御している可能性がある。よって、*kaiC* 遺伝子は葉面への定着において、温度や光だけでなく、塩濃度のような他の環境刺激に対しても応答していると推測した。

*M. extorquens* AM1 株において KaiC タンパク質が温度依存的な UV 耐性を制御しており、このように KaiC システムは環境刺激情報を統合し、温度や UV に対する適切な細胞応答を行っている と推測した (図 18)。本論文の結果からは、*M. extorquens* AM1 株の KaiC タンパク質が概日時計としての機能をもつかどうかは明らかではない。にもかかわらず、*M. extorquens* AM1 株の KaiC システムとシアノバクテリアの KaiC システムには主に 5 つの共通点がある (図 18)。(1) KaiC が共通したタンパク質の祖先を持つ [57]。(2) KaiC が特定の表現系を制御する、高度に保存されたリン酸化部位を持つ。(3) どちらの KaiC も光に応答し、*M. extorquens* AM1 株では KaiC が UV および可視光により誘導され (図 14)、シアノバクテリアでは光により概日リズムのタイミングが調整される。(4) 概日リズムを下流の遺伝子に伝えるレギュレーターである LabA が *M. extorquens* AM1 株の KaiC システムにも関係している。(5) どちらの KaiC システムも光や温度に応答して、ゲノムワイドな遺伝子発現を制御している。

KaiC は RecA 様ドメインを持ち、トポイソメラーゼ 1 とジャイレースの活性を調製する DNA 結合タンパク質として機能することが報告されている [58]。したがって、UV により損傷した DNA の回復が最も原始的な KaiC システムの機能であった可能性がある [59, 49]。UV や温度への適応は日周変動に対応して生じるため、原始的な KaiC システムは光だけでなく、リン酸化制御を通して温度に応答する能力を得ていた可能性がある。実際に、RecA は温度依存的な応答をすることが報告されている [60]。この原始的な KaiC システムが、*Methylobacterium*

spp. とシアノバクテリアに共通した祖先である可能性がある。進化の過程で、シアノバクテリアの KaiC システムは自発的な発振機能と温度補償性を獲得し、概日時計として振る舞うようになったのかもしれない。原始的な KaiC は外界刺激情報を統合し、応答を制御することで、様々な刺激が存在する環境への適応度を高めていると推測される [52]。 *M. extorquens* AM1 株が持つ、2つの異なる働きを持つ KaiC タンパク質は、温度依存的な UV 耐性において KaiC1 が正の制御因子として、KaiC2 が負の制御因子として協調的に働く能力を獲得した (図 19)。さらなる研究で、さまざまな環境で生存するための制御メカニズムを明らかにし、KaiC の生理的な意義と進化過程の理解へとつなげたい。

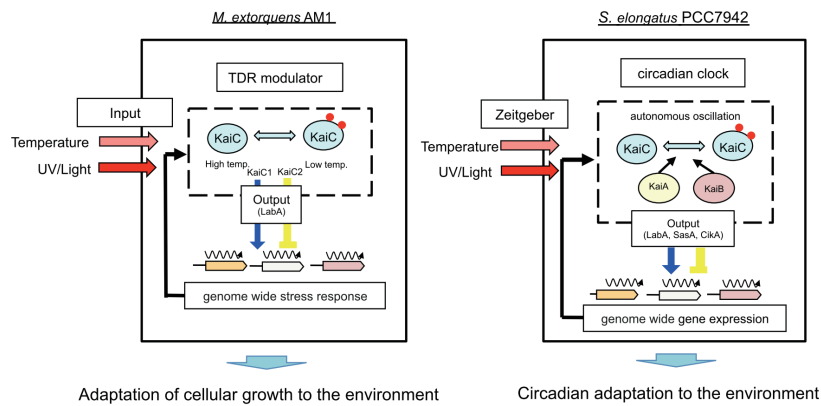


図 18: KaiC の環境適応における分子制御機構の共通性

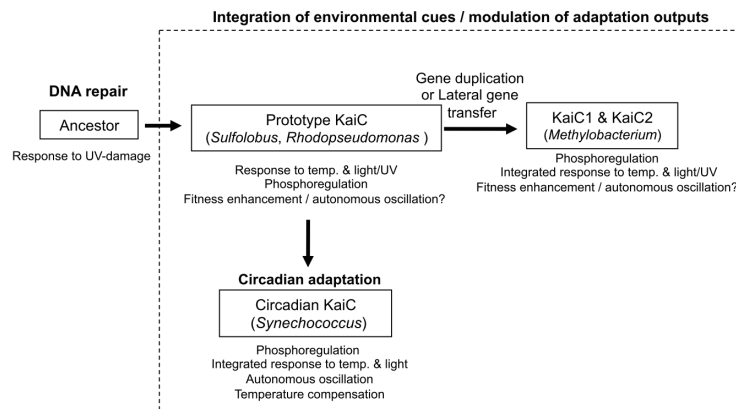


図 19: KaiC ファミリータンパク質の進化モデル

## 結論

本論文1章では、葉面に棲息する *Methylobacterium* spp. の多くがパントテン酸要求性であることを見出し、葉面に存在するパントテン酸、 $\beta$ -アラニンおよびその前駆体等を獲得して棲息していることを示した。パントテン酸要求性株 *Methylobacterium* sp. OR01 株は、植物上に常に存在するパントテン酸や  $\beta$ -アラニンについて、これらを植物表層環境から獲得することでパントテン酸合成に必要な合成コストを節約し、それにより葉面での適応度を増加させている可能性がある。

加えて本論文2章では、*Methylobacterium* spp. の葉面での優占化には、メタノール資化能の有無のみならず、競合条件下におけるメタノールの代謝能力も影響することを示した。

本論文3章では、*M. extorquens* AM1 株の概日性遺伝子ホモログ *kaiC* が葉面定着能に寄与することを明らかにするとともに、KaiC タンパク質のリン酸化や発現量が生育温度により調節され、UV に対する環境適応を制御していることを示した。KaiC は、シアノバクテリアにおいてリン酸化・脱リン酸化サイクルにより概日リズムの中核を担うタンパク質である。*M. extorquens* AM1 株の KaiC システムはシアノバクテリアと異なり概日リズムを示さないが、ともに LabA が重要な役割を果たしていたり、光や温度に応答していたりと共通項も多く、同一の遺伝子を起源として進化してきたと考えられる。



## 参考文献

- [1] R. Seco, J. Penuelas, and I. Filella. Short-chain oxygenated vocs: Emission and uptake by plants and atmospheric sources, sinks, and concentrations. *Atmospheric Environment*, 41(12):2477–2499, 2007.
- [2] E. Pichersky, J. P. Noel, and N. Dudareva. Biosynthesis of plant volatiles: nature’s diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762):808–811, 2006.
- [3] IE Galbally and W Kirstine. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J Atmos Chem*, 43(3):195–229, 2002.
- [4] K. Kawaguchi, H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai. Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS One*, 6(9):e25257, 2011.
- [5] J. Mercier and S. E. Lindow. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol*, 66(1):369–374, 2000.
- [6] K. Shiraishi, M. Oku, K. Kawaguchi, D. Uchida, H. Yurimoto, and Y. Sakai. Yeast nitrogen utilization in the phyllosphere during plant lifespan under regulation of autophagy. *Sci Rep*, 5:9719, 2015.
- [7] A. Gargallo-Garriga, J. Sardans, M. Perez-Trujillo, A. Guenther, J. Llusia, L. Rico, J. Terradas, G. Farre-Armengol, I. Filella, T. Parella, and J. Penuelas. Shifts in plant foliar and floral metabolomes in response to the suppression of the associated microbiota. *BMC Plant Biol*, 16:78, 2016.
- [8] S. E. Lindow and M. T. Brandl. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 69(4):1875–1883, 2003.
- [9] N. Delmotte, C. Knief, S. Chaffron, G. Innerebner, B. Roschitzki, R. Schlapbach, C. von Mering, and J. A. Vorholt. Community proteogenomics reveals insights into

- the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(38):16428–16433, 2009.
- [10] M. Senthilkumar, M. Madhaiyan, S. Sundaram, and S. Kannaiyan. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* l. cv co-43). *Microbiol Res*, 164(1):92–104, 2009.
- [11] M. Hornschuh, R. Grotha, and U. Kutschera. Moss-associated *Methylobacteria* as phytosymbionts: an experimental study. *Naturwissenschaften*, 93(10):480–486, 2006.
- [12] M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, J. Ryu, and T. Sa. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta*, 224(2):268–278, 2006.
- [13] R. L. Koenig, R. O. Morris, and J. C. Polacco. trna is the source of low-level transzeatin production in *Methylobacterium* spp. *J Bacteriol*, 184(7):1832–1842, 2002.
- [14] P. Ardanov, A. Sessitsch, H. Haggman, N. Kozyrovska, and A. M. Pirttila. *Methylobacterium*-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. *PLoS One*, 7(10):e46802, 2012.
- [15] D. Peel and J. R. Quayle. Microbial growth on c1 compounds. i. isolation and characterization of *Pseudomonas* am1. *Biochem J*, 81:465–469, 1961.
- [16] P. N. Green and J. K. Ardley. Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68(9):2727–2748, 2018.
- [17] A. Sy, A. CJ. Timmers, C. Knief, and J. A. Vorholt. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of medicago truncatula under competitive conditions. *Appl Environ Microbiol*, 71(11):7245–7252, 2005.
- [18] S. Schmidt, P. Christen, P. Kiefer, and J. A. Vorholt. Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein xoxf in *Methylobacterium extorquens* am1. *Microbiology*, 156(Pt 8):2575–2586, 2010.

- [19] B. Van Aken, C. M. Peres, S. L. Doty, and J. L. Yoon, J. M. and Schnoor. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* dn34). *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(4):1191–1196, 2004.
- [20] M. Madhaiyan, B. Y. Kim, S. Poonguzhali, S. W. Kwon, M. H. Song, J. H. Ryu, S. J. Go, B. S. Koo, and T. M. Sa. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 2):326–331, 2007.
- [21] S. Schauer and U. Kutschera. A novel growth-promoting microbe, *Methylobacterium funariae* sp. nov., isolated from the leaf surface of a common moss. *Plant Signal Behav*, 6(4):510–515, 2011.
- [22] A. Sy, E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. De Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, and C. Boivin-Masson. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol*, 183(1):214–220, 2001.
- [23] P. Raja, D. Balachandar, and S. P. Sundaram. Genetic diversity and phylogeny of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria isolated from the phyllosphere of tropical crop plants. *Biol Fertil Soils*, 45(1):45–53, 2008.
- [24] M. Mizuno, H. Yurimoto, H. Iguchi, A. Tani, and Y. Sakai. Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain or01 on perilla plants. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(7):1533–1538, 2013.
- [25] A. Tani, N. Sahin, and K. Kimbara. *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt 7):1647–1652, 2012.
- [26] P. H. Shen and B. Wu. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. mb200 enhances glyoxylate accumulation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34(10):657–663, 2007.
- [27] Akio Tani, Nurettin Sahin, Yumiko Matsuyama, Takashi Enomoto, Naoki Nishimura, Akira Yokota, and Kazuhide Kimbara. High-throughput identification and screening

- of novel methylobacterium species using whole-cell maldi-tof/ms analysis. *PLoS One*, 7(7):e40784, 2012.
- [28] T. Urakami, H. Araki, K. Suzuki, and K. Komagata. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 43(3):504–513, 1993.
- [29] N. F. Delaney, M. E. Kaczmarek, L. M. Ward, P. K. Swanson, M. C. Lee, and C. J. Marx. Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. *PLoS One*, 8(4):e62957, 2013.
- [30] K. Shimbo, T. Oonuki, A. Yahashi, K. Hirayama, and H. Miyano. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23(10):1483–1492, 2009.
- [31] M. Mizuno, H. Yurimoto, N. Yoshida, H. Iguchi, and Y. Sakai. Distribution of pink-pigmented facultative methylotrophs on leaves of vegetables. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(3):578–580, 2012.
- [32] K. Miyatake, Y. Nakano, and S. Kitaoka. Pantothenate synthetase from *Escherichia coli* [d-pantoate: beta-alanine ligase (amp-forming), ec 6.3.2.1]. *Methods Enzymol*, 62:215–219, 1979.
- [33] G. Herrmann, T. Selmer, H. J. Jessen, R. R. Gokarn, O. Selifonova, S. J. Gort, and W. Buckel. Two beta- alanyl- coa: ammonia lyases in *Clostridium propionicum*. *The FEBS journal*, 272(3):813–821, 2005.
- [34] Y. Wang, H. Xu, and R. H. White.  $\beta$ -alanine biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *J Bacteriol*, pages JB. 01784–14, 2014.
- [35] C. Gruffaz, E. E. Muller, Y. Louhichi-Jelail, Y. R. Nelli, G. Guichard, and F. Bringel. Genes of the *N*-methylglutamate pathway are essential for growth of *Methylobacterium extorquens* dm4 with monomethylamine. *Appl Environ Microbiol*, 80(11):3541–3550, 2014.

- [36] K. M. Coxon, E. Chakauya, H. H. Ottenhof, H. M. Whitney, T. L. Blundell, C. Abell, and A. G. Smith. Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4):743–746, 2005.
- [37] D. A. Primerano and R. O. Burns. Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pantothenic acid in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 153(1):259–269, 1983.
- [38] D. A. Rodionov, P. Hebbeln, A. Eudes, J. ter Beek, I. A. Rodionova, G. B. Erkens, D. J. Slotboom, M. S. Gelfand, A. L. Osterman, A. D. Hanson, and T. Eitinger. A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol*, 191(1):42–51, 2009.
- [39] D. S. Vallari and C. O. Rock. Isolation and characterization of *Escherichia coli* pantothenate permease (panf) mutants. *J Bacteriol*, 164(1):136–142, 1985.
- [40] F. Schneider, R. Krmer, and A. Burkovski. Identification and characterization of the main  $\beta$ -alanine uptake system in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5):576–582, 2004.
- [41] H. E. Sauberlich and C. A. Baumann. A factor required for the growth of *Leuconostoc citrovorum*. *J Biol Chem*, 176:165–173, 1948.
- [42] G. D’Souza, S. Waschina, S. Pande, K. Bohl, C. Kaleta, and C. Kost. Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. *Evolution*, 68(9):2559–2570, 2014.
- [43] C. Knief, L. Frances, and J. A. Vorholt. Competitiveness of diverse *Methylobacterium* strains in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and identification of representative models, including *M. extorquens* pa1. *Microb Ecol*, 60(2):440–452, 2010.
- [44] J. A. Vorholt. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews: Microbiology*, 10(12):828–840, 2012.
- [45] B. Gourion, M. Rossignol, and J. A. Vorholt. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc Natl Acad Sci USA of the United States of America*, 103(35):13186–13191, 2006.

- [46] C. H. Johnson, T. Mori, and Y. Xu. A cyanobacterial circadian clockwork. *Current Biology*, 18(17):R816–R825, 2008.
- [47] C. H. Johnson, C. Zhao, Y. Xu, and T. Mori. Timing the day: what makes bacterial clocks tick? *Nat Rev Microbiol*, 15(4):232–242, 2017.
- [48] M. Ishiura, S. Kutsuna, S. Aoki, H. Iwasaki, C. R. Andersson, A. Tanabe, S. S. Golden, C. H. Johnson, and T. Kondo. Expression of a gene cluster *kaiabc* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 281(5382):1519–1523, 1998.
- [49] P. J. Liang, W. Y. Han, Q. H. Huang, Y. Z. Li, J. F. Ni, Q. X. She, and Y. L. Shen. Knockouts of *reca*-like proteins *radc1* and *radc2* have distinct responses to dna damage agents in *Sulfolobus islandicus*. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(10):533–542, 2013.
- [50] M. Loza-Correa, T. Sahr, M. Rolando, C. Daniels, P. Petit, T. Skarina, L. Gomez Valero, D. Dervins-Ravault, N. Honore, A. Savchenko, and C. Buchrieser. The *Legionella pneumophila* *kai* operon is implicated in stress response and confers fitness in competitive environments. *Environmental Microbiology*, 16(2):359–381, 2014.
- [51] M. Maniscalco, J. Nannen, V. Sodi, G. Silver, P. L. Lowrey, and K. A. Bidle. Light-dependent expression of four cryptic archaeal circadian gene homologs. *Frontiers in Microbiology*, 5:79, 2014.
- [52] P. Ma, T. Mori, C. Zhao, T. Thiel, and C. H. Johnson. Evolution of *kaic*-dependent timekeepers: A proto-circadian timing mechanism confers adaptive fitness in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *PLoS Genet*, 12(3):e1005922, 2016.
- [53] C. J. Marx and M. E. Lidstrom. Development of an insertional expression vector system for *Methylobacterium extorquens* *am1* and generation of null mutants lacking *mtda* and/or *fch*. *Microbiology*, 150(Pt 1):9–19, 2004.
- [54] C. J. Marx and M. E. Lidstrom. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques*, 33(5):1062–1067, 2002.

- [55] Y. Taniguchi, M. Katayama, R. Ito, N. Takai, T. Kondo, and T. Oyama. *laba*: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein *kaic*. *Genes & Development*, 21(1):60–70, 2007.
- [56] M. Loza-Correa, L. Gomez-Valero, and C. Buchrieser. Circadian clock proteins in prokaryotes: hidden rhythms? *Frontiers in Microbiology*, 1:130, 2010.
- [57] D. D. Leipe, L. Aravind, N. V. Grishin, and E. V. Koonin. The bacterial replicative helicase *dnab* evolved from a *reca* duplication. *Genome Res*, 10(1):5–16, 2000.
- [58] M. A. Woelfle, Y. Xu, X. Qin, and C. H. Johnson. Circadian rhythms of superhelical status of *dna* in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA of the United States of America*, 104(47):18819–18824, 2007.
- [59] M. L. Rolfsmeier, M. F. Laughery, and C. A. Haseltine. Repair of *dna* double-strand breaks induced by ionizing radiation damage correlates with upregulation of homologous recombination genes in *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology*, 414(4):485–498, 2011.
- [60] A. K. Ganesan, J Hunt, and P. C. Hanawalt. Temperature dependent survival of uv-irradiated *Escherichia coli* k12. *Mol Gen Genet*, 214:198–203, 1988.

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始熱心なご指導ご鞭撻を頂きました、京都大学農学研究科 応用生命科学専攻 阪井 康能 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって、適切な助言を賜り、丁寧に指導して下さいました同専攻 由里本 博也 准教授に心より感謝申し上げます。

様々な有益なご意見、ご助言を頂きました、同専攻 奥 公秀 助教、京都学園大学 寶関 淳 准教授に深く感謝いたします。

京都学園大学 井口 博之 講師には、研究を進めるにあたり、終始多くのご助力を賜り、実験方法など丁寧に指導して頂きました。ここに感謝いたします。

片山 志織氏、福永 啓太氏、川端 和弥氏とは共同で研究を進め、様々な刺激や示唆を得ることができると同時に、研究室生活においても多くのご支援を頂きました。ここに感謝の意を評します。

研究生活を送るにあたって、多くの実験のご指導、ご助言を頂きました大澤 普氏、白石 晃 将氏、藤澤 健人氏、また大変刺激的な議論をを通じて研究をともに深めていって下さった奥 勇紀氏、竹谷 友之氏に感謝申し上げます。

研究室生活全般において温かいご支援、ご協力を頂きました京都大学農学研究科応用生命科学専攻 制御発酵学研究室の皆様感謝いたします。

最後に、京都大学での研究生活を精神面、物質面から多くの形で支えて下さった家族や友人に感謝いたします。



## 業績リスト

1. Yoshida Y, Iguchi H, Sakai Y and Yurimoto H.  
“ Pantothenate auxotrophy of *Methylobacterium* spp. isolated from living plants ”  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press (2018).  
DOI:10.1080/09168451.2018.1549935
2. Yoshida Y, Fukunaga K, Sakai Y and Yurimoto H.  
”Comparison of growth characteristics between two *Methylobacterium* spp. under nutrient-competitive conditions”  
Manuscript in preparation.
3. Iguchi H\*, Yoshida Y\*, Fujisawa K, Taga H, Yurimoto H, Oyama T, Sakai Y.  
“ KaiC family proteins integratively control temperature-dependent UV resistance in *Methylobacterium extorquens* AM1 ”  
*Environmental Microbiology Reports*, **10**, 634-643 (2018).  
DOI: 10.1111/1758-2229.12662  
\*These authors contributed equally to this work as the first co-author.