

葉面に棲息する C1 微生物：共生系による炭素循環と環境バイオへの利用

C1-Microorganisms in the Phyllosphere: Carbon Cycle by Symbiotic System and Its Application in Environmental Biotechnology

阪井 康能*, 由里本博也
YASUYOSHI SAKAI and HIROYA YURIMOTO

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

* TEL: 075-753-6385 FAX: 075-753-6454

* E-mail: ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

キーワード：メタン，メタノール，ホルムアルデヒド，バイオマス，温室効果ガス

Key words: methane, methanol, formaldehyde, biomass, greenhouse gas

(原稿受付 2013年10月30日/原稿受理 2013年11月6日)

1. はじめに

メタンやメタノールなどの還元型 C1 化合物を炭素源・エネルギー源として利用できる微生物 (C1 微生物) は、自然界に広く分布している。二大温室効果ガスであるメタンと CO₂ 間の地球規模での炭素循環 (メタンサイクル) では、メタンから CO₂ への酸化を担っているのが C1 微生物であり、地球環境の維持という点で極めて重要な役割を果たしている (図 1)。C1 化合物は、土壌、水圏の他、人為的環境も含めた地球上のあらゆる環境中に存在するが、近年、メタンとメタノールが植物表層、特に葉面などの地上部から直接放出されることが知られるようになり、植物圏も C1 微生物の棲息環境として重要視されるようになってきた¹⁻³⁾。しかし、植物葉上に常在する微生物としてメタノール酸化性細菌が注目されるきっかけとなった最初の報告は 2002 年のこと⁴⁾、C1 微生物-植物相互作用の実体と生態について解明すべき問題は山積している。従来、メタンサイクルにおける生物的炭素循環は、その大部分が C1 微生物によって駆動されていると考えられていたが、植物光合成による CO₂ 固定や植物からのメタン、メタノールの放出にも、C1 微生物-植物の相互作用が関与していることが明らかになってきた。

筆者らは、C1 微生物を主な対象に、植物表層における微生物コンソーシアム解析、遺伝子操作分子育種技術、一細胞可視化技術などを駆使して、植物表層環境における微生物生理と生物間相互作用の原理解明とともに、C1 微生物がもつ C1 固定経路と植物生長促進能を利用したバイオマス増産・環境修復技術の開発を行っている。本稿では、植物表層における C1 化合物の動態と C1 微生物の生存戦略、コンソーシアムや共生系の構

築・生物間相互作用の解明、ならびに、C1 微生物-植物共生系による作物の生育促進・増産、ホルムアルデヒドの除去技術など、食糧・資源・環境問題解決のために行ってきた筆者らの研究を紹介する。

2. C1 微生物の C1 化合物代謝

C1 微生物は、その炭素源の利用性から、メタンを利用するメタン酸化性菌 (メタン酸化菌) と、メタノールを利用するメタノール酸化性菌に大きく分けられる。メタン酸化性菌は細菌であり、その多くが偏性メタン酸化性細菌、すなわちメタン (あるいはメタノール) のみを炭素源・エネルギー源として利用できる。一方、メタノール酸化性菌には、細菌と酵母が存在し、C1 化合物以外の化合物も炭素源として利用する通性メタノール酸化性がほとんどである。

C1 微生物の C1 化合物代謝は、関与する酵素に多少

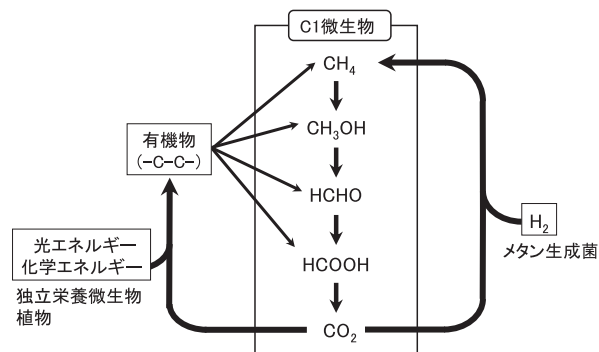


図 1. 生態系における炭素循環 (メタンサイクル)

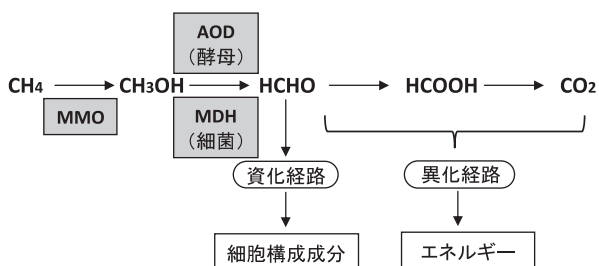


図2. C1微生物におけるC1化合物代謝の概要

MMO: メタンモノオキシゲナーゼ, AOD: アルコールオキシダーゼ, MDH: メタノール脱水素酵素

の違いはあるものの、基本的な代謝経路は共通している(図2)。メタン酸化性細菌はメタンからメタノールの酸化を担う酵素として、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)を持っている。続くメタノール代謝は、メタノールからホルムアルデヒドへの酸化であり、ホルムアルデヒドはエネルギーを得るための酸化経路(ギ酸を経てCO₂まで酸化される)と細胞構成成分を得るための酸化経路の分岐点に位置する重要な代謝中間体である。メタノール酸化は、細菌ではピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするメタノール脱水素酵素が主流であるのに対し、酵母では分子状酸素を要求し、過酸化水素を生成するアルコールオキシダーゼによって触媒される。また、ホルムアルデヒド酸化経路として、細菌ではセリン経路とリブローズモノリン酸経路、酵母ではキシロースモノリン酸経路が存在する。

3. 植物からのメタノール放出と葉面C1微生物

植物の細胞壁構成成分であるペクチンやリグニンには、メチルエステル基やメトキシ基が多量に存在する。これらに由来するC1化合物(メタン、メタノール、ホルムアルデヒドなど)が、植物の生長過程あるいは枯死後の微生物分解過程で生じると考えられる。植物細胞が伸張または分裂する際には、ペクチンがペクチンメチルエステラーゼにより加水分解されることにより、メタノールが生成する(図3)。メタノールが植物葉から直接放出されていることは、1995年に報告され¹⁾、その放出量は年間1億トン以上と見積もられ、植物から放出される揮発性有機化合物の中でもテルペンやイソプレンに匹敵する放出量となっている⁵⁾。

植物表層には、メタノール酸化性細菌が棲息し、植物から放出されるメタノールを利用し、植物に対しては生長促進効果を示すなど、植物と共生関係にあることが知られている(後述)。植物葉からのメタノールの放出量については、容器内に葉を密閉し、一定時間後の気相中のメタノール濃度を測定することで求められるが、微生物が棲息する植物表層には、どの程度の濃度で存在するのであろうか。筆者らは、葉面での局所的なメタノールを検出・定量できるメタノール酸化性酵母センサー細胞を開発した⁶⁾。

メタノール酸化性酵母もしばしば花や果皮などの植物体から分離される。また、メタノール酸化性酵母はペクチンおよびそのメチルエステル基から生じるメタノール

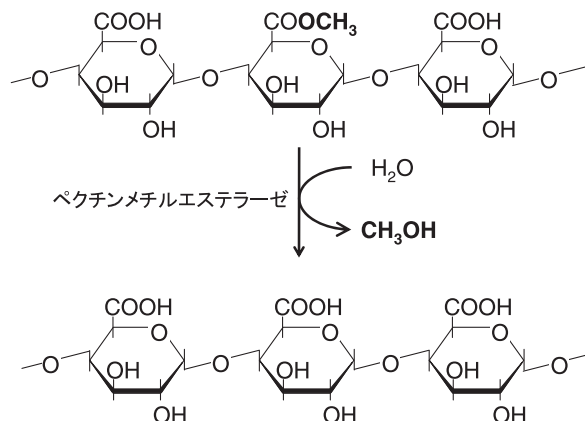


図3. ペクチンの加水分解によるメタノール生成

のそれぞれを利用して良好に生育することがわかった⁷⁾。メタノール酸化性酵母が植物表層(葉上)で本当に増殖可能なかは知られていなかったが、筆者らは蛍光蛋白質発現細胞を用いることでメタノール酸化性酵母 *Candida boidinii* が植物葉上で増殖することを見出した⁸⁾。同時にメタノール誘導性プロモーター支配下に、ペルオキシソーム輸送シグナルをもつ蛍光蛋白質を発現させた細胞を用いることで、植物葉上のメタノール濃度を、直接、計測する“細胞センサー”を構築した。これを用いて、生長しているシロイヌナズナ葉上のメタノール濃度を計測すると、0-35 mMの範囲で、メタノール濃度が昼夜変動していた(図4)。夜間、メタノール濃度は高く、昼間低い。このような環境において、メタノール酸化性酵母は10日で3-4回ぐらい分裂した。この時の代謝酵素遺伝子の発現とペルオキシソーム動態を調べると、メタノール濃度に応答して日周変動している。すなわち葉上での増殖時には、代謝やペルオキシソーム合成に必要な遺伝子は夜に発現し、朝にはオートファジーが起こりペルオキシソームが分解されていると考えられる。

一方、老化した葉や枯葉では、さらに高濃度(数百mM相当)のメタノールが、昼夜変動なく存在し、酵母内のペルオキシソームは大きく発達していた。これは栄養源の枯渇した葉上で動けない酵母が、植物体の枯死後、再び土に還った時まで生き延びるために、メタノールから合成したアミノ酸をタンパク質としてペルオキシソームに貯蔵していると考えられる(図4)。

4. 植物葉上でのメタノール酸化性細菌の生存戦略と植物生長促進

植物から放出されるメタノールが、どの程度メチロトロフに利用されているかは不明であるが、上述のように、葉上にはC1微生物の増殖に十分な量のメタノールが存在している。C1微生物は実際に植物表層に生育しており、植物との共生関係が注目されている。特に、pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) と呼ばれる *Methylobacterium* 属細菌に代表されるメタノール酸化性細菌については、植物圏からの菌株の分離、植物に対する生育促進効果、植物上での生育に必要な代謝機

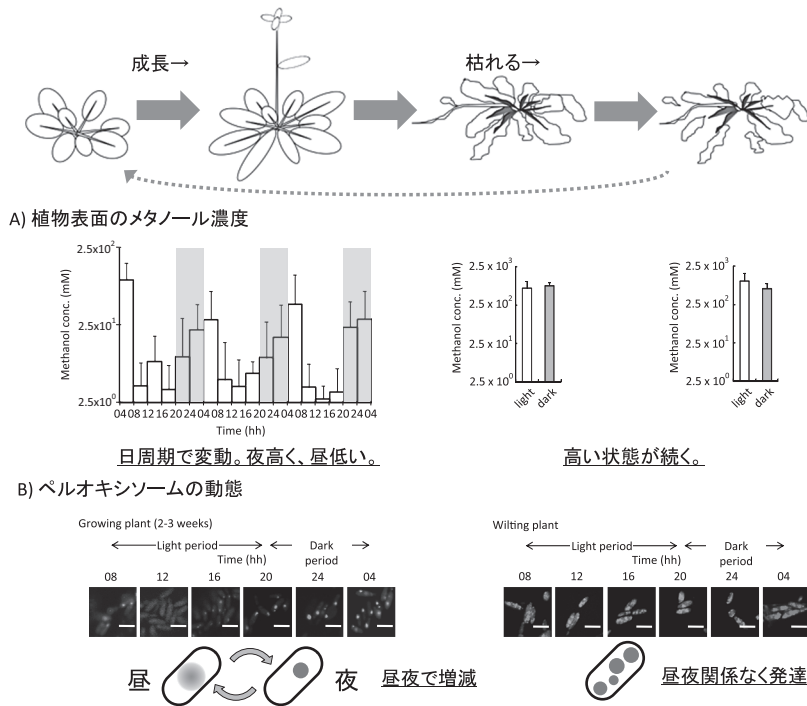


図4. 植物の一生とメタノール資化性酵母のライフスタイル

能などの研究が進められている。*Methylobacterium* 属細菌が植物表層からよく分離されることは以前より知られており⁸⁾, *Methylobacterium* 属細菌が植物ホルモンであるサイトカイニンやインドール酢酸を生産することで、植物に対して生育促進効果をもたらしていることも報告されている^{9,10)}。しかし、どのようなメカニズムで生長促進が起こるのか、メタノール資化性細菌と植物との相互作用の分子機構の詳細については、未解明な点が多い。

Methylobacterium 属細菌の中でモデル菌株として位置づけられている *M. extorquens* AM1 株を用いて、植物表層での生存に重要な遺伝子がいくつか同定されている。メタノール代謝に関しては、初発反応を触媒するメタノール脱水素酵素の遺伝子 (*mxoF*) 破壊株の植物上での生育を野生株と比較し、遺伝子破壊株の生育が弱まっていることが報告された¹¹⁾。このことは、AM1 株の植物表層での生育にメタノール資化能が関与しており、植物から放出されるメタノールが植物表層に生息する微生物に利用されていることを示すと同時に、生育は可能という事実から、メタノール以外の炭素源も同時に利用されていることも示している。*Methylobacterium* 属細菌は通性メタノール資化性菌であるので、植物表層ではメタノールを含む様々な炭素源を利用して生息し、かつ、植物に対する生育促進効果をもたらすことから、相利共生の関係にあることが明らかとなった。

AM1 株には *mxoF* と高い相同性を示す *soxFI* と呼ばれる遺伝子が存在しており、植物上での生育時に高い発現が認められること、その遺伝子破壊株は植物表層での生育能が野生株と比較して低下するが、*soxFI* 遺伝子産物はメタノール脱水素酵素活性をほとんど示さなかったことから、その機能は不明であった¹²⁾。*mxoF* がコードするメタノール脱水素酵素は Ca^{2+} 依存型であるが、最

近になって La^{3+} を始めとする希土類金属イオンを含む培地で生育させると *soxFI* 遺伝子産物がメタノール脱水素酵素活性を示すこと、*mxoF* 破壊株を同条件で培養するとメタノールに生育できることが示された¹³⁾。*soxFI* 遺伝子は、*Methylobacterium* 属細菌以外にも *Rhizobium* 属や *Shinorhizobium* 属などを含む α -プロテオバクテリアに広く存在しており、土壤中や植物表層にも La^{3+} は存在することから、植物から放出されるメタノールの利用に *soxFI* にコードされるメタノール脱水素酵素が重要な役割を果たしていることが示唆された。

植物表層、特に葉面は、微生物が棲息する環境としては、かなり過酷なものと考えられる。葉面に棲息する微生物は、昼夜あるいは日向と日陰との温度変化、紫外線、乾燥、浸透圧、活性酸素種、貧栄養あるいは栄養飢餓など様々な要因のストレスに曝されている。このような環境に適応するための機能の一つに、ストレス応答性の遺伝子発現機構があるが、AM1 を用いて行われた植物表層生育時に特異的に発現するタンパク質のプロテオーム解析と遺伝子破壊株と野生株との競合試験により、ストレス応答性の転写因子 (PhyR) が植物表層での生育に関わっていることが報告された¹⁴⁾。PhyR の制御下には熱ショック、紫外線、浸透圧など様々なストレス耐性に関与する遺伝子があり、葉面での生存に重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでに、培養法または非培養法により、様々な植物種から *Methylobacterium* 属細菌が分離または検出されており、植物表層細菌のメタゲノム解析、プロテオミクス解析によって、*Methylobacterium* 属細菌が優占種として存在することが明らかにされている^{15,16)}。しかし、植物表層における種レベルでの *Methylobacterium* 属細菌の分布や植物種との特異性に関してはあまりわ

かっていなかった。筆者らは、市販されている蔬菜類を対象に PPFM の分布について調査したところ、シソ葉において *M. fujisawaense* や *M. radiotolerance* が葉面微生物の約 15% に達するほど優占化していることを明らかにした¹⁷⁾。日本各地から取り寄せたアカシソ種子についても同種の PPFM が定着しており、垂直伝播により植物の生長とともに種子より地上部・葉上へと棲息範囲を広げて行くことがわかった¹⁸⁾。今後、植物と PPFM 間の種間特異性を規定する要因の同定や、ある植物に対して特異的に生長促進効果を示す PPFM の探索や、逆に多様な植物種に対して生長促進効果を示す万能 PPFM の探索・創成により、バイオマス増産や CO₂ 固定能増強への実用化に向けての研究開発が期待される。

5. 植物圏からのメタン放出と植物圏に棲息するメタン資化性細菌

植物圏からのメタン放出については、特に水田などでは土壌の深部の嫌気環境下でメタン生成菌によって生産されたメタンが、植物の維管束系を通過して放出されることが知られていたが、2006 年には、植物細胞壁に含まれるペクチンのメチルエステル基に由来とする考えられるメタンが植物から直接放出されており、その量は地球上の全放出量の 10~40% にあたる年間 6000 万トン~2 億 4000 万トンにもものぼると報告された²⁾。この膨大な放出量については議論の余地があるが、メタンは CO₂ に次ぐ温室効果ガスであるため、メタンの大気中濃度や大規模発生源からの放出量のモニタリングあるいは排出削減に関する研究が多方面で進められている。大気中に放出されたメタンの 80% 以上は、大気中の OH ラジカルにより分解されるが、その残りはメタン資化性細菌(メタン酸化菌)によって酸化される。植物からのメタン放出量は、土壌からのメタン放出量と同様に、メタン酸化菌による酸化を免れたものと考えられるが、植物上にメタン酸化菌が棲息するのか、植物からのメタン放出量にどの程度寄与しているのかは全くわかっていなかった。

筆者らは、様々な植物試料を材料に、メタンを単一炭素源とする微生物コンソーシアムをスクリーニングし、コンソーシアムに含まれる微生物を同定したところ、*Methylomonas* sp., *Methylobacter* sp., *Methylosinus* sp., *Methylocystis* sp. などの多様なメタン資化性細菌に加えて、*Methylobacterium* sp., *Methylophilus* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Methylovulus* sp. といったメタノール資化性細菌が、多数のサンプルから検出され、植物圏では、メタン資化性細菌とメタノール資化性細菌が共存していることがわかった¹⁹⁾。上述の通り、植物表層には多量のメタノールが存在しているが、メタン資化性細菌の中にはメタノールによる生育阻害を受けるものがあり、また、メタン酸化酵素はメタノールも基質とすることから、高濃度のメタノールが存在するとメタン酸化が阻害される。植物表層でメタン酸化菌とメタノール資化性細菌が共存しているという事実から、メタノール資化性細菌が植物表層の局所的なメタノール濃度を低下させ、メタン酸化菌のメタン消費を促進していることが推測された。メタン資化性細菌のメタン酸化促進効果につい

ては、筆者らが森林土壌から取得した新属メタン資化性細菌 *Methylovolum miyakonense* を含むメタン資化性微生物コンソーシアムに存在した根粒菌 *Shinorhizobium* 属細菌が、メタン酸化活性に対して正の効果を持ち、この菌が生産するメタン酸化促進物質の同定を進めたところ、コバラミン(ビタミン B₁₂) がメタン酸化促進に関与していることが判明した²⁰⁾。この様な根粒菌によるメタン酸化促進、ならびにメタン資化性細菌の生育促進は、植物試料から分離した他のいくつかのメタン資化性細菌でも観察された。これらの結果より、植物圏を含む自然環境中においてメタン酸化菌は、根粒菌などのコバラミン生産菌と共存することにより、メタン酸化を効率よく進めていると考えられる。

また筆者らは、メタン資化性細菌の葉上での生存戦略に関して、アシの葉から単離したメタン資化性細菌 *Methylosinus* sp. B4S 株に緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入し、シロイヌナズナ葉上に接種して、葉上での動態を観察した。その結果、葉面への接種後 10 日後でも蛍光が観察され、メタン資化性細菌が葉上に定着できることがわかった²¹⁾。さらに、メタノール資化性細菌の葉上での生存に必要なことが報告された *PhyR* に関して、B4S 株における *phyR* ホモログ遺伝子を取得し、様々な培養条件での遺伝子発現レベルや遺伝子破壊株のストレス感受性、シロイヌナズナ葉上への定着能を比較検討した²¹⁾。*phyR* 遺伝子の発現レベルは、検討したストレスのうち、熱ショック処理時に上昇し、遺伝子破壊株は熱ショックと紫外線に感受性を示したことから、これらのストレス応答に関与することがわかった。しかし、葉上への定着能については、*phyR* 遺伝子破壊株と野生株との間に顕著な差が観察されなかった。

実際の環境中におけるメタン放出量に及ぼすメタン資化性細菌の影響については、湿地帯や泥炭地、水田、湖といった水圏は地球上の大規模メタン発生源となっている環境中で、水生植物がメタン資化性細菌の重要な足場となっていることが明らかになってきた。例えば、泥炭地では、コケに棲息するメタン資化性細菌がメタンを利用し、生じた二酸化炭素がコケに利用されるという共生関係が報告されている²²⁾。筆者らは、浮遊性や沈水性の水草にメタン資化性細菌が棲息し、周辺の湖水に比べてはるかに高いメタン消費活性を持つ共生系として存在することを見出し(未発表)、現在、そこに含まれる微生物の解析を進めている。

6. ホルムアルデヒドからの炭素固定系：リブローズモノリン酸経路とその利用

Bacillus 属細菌(枯草菌)が稲わらなど枯れた植物の表層に分布することは、古くから知られている。一方、一部の C1 微生物が持っているホルムアルデヒド固定代謝経路であるリブローズモノリン酸(RuMP)経路は、C1 微生物に固有の代謝経路ではなく、C1 微生物以外の様々な原核微生物ゲノムに存在し、枯草菌にも存在する²³⁾。RuMP 経路では、ホルムアルデヒドはリブローズ 5-リン酸(Ru5P)とアルドール縮合して D-arabino-3-ヘキスロース 6-リン酸(Hu6P)を生成し、これが異性化されてフルクトース 6-リン酸(F6P)になる。この 2

段階の反応は、3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ (HPS) と 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ (PHI) によって触媒される (図5)。枯草菌では、HPS および PHI をコードする遺伝子は *hxlAB* オペロンを形成しており、ホルムアルデヒドに反応して発現誘導される。筆者らは、本オペロン上流に存在する *hxlR* 遺伝子が、ホルムアルデヒド応答性の転写活性化に働く転写制御因子であることを明らかにした²⁴⁾。枯草菌を初めとする多くの細菌が、RuMP 経路を持っている事実は、RuMP 経路が自然界に広く存在するホルムアルデヒドを解毒するのみならず、それを取り込み自らの生体成分として固定・資化していることを示すものである。

ホルムアルデヒドの解毒に働く酵素として、真核生物を含めてほとんどの生物がもつホルムアルデヒド脱水素酵素は、ホルムアルデヒド酸化反応を行うために、補酵素 NAD⁺ やホルムアルデヒドとの付加物となり一時的に毒性を減らすグルタチオンなどの低分子化合物が必要である。これに対し、RuMP 経路においてホルムアルデヒド固定を触媒する HPS の反応は、遊離のホルムアルデヒドを基質とし、補酵素類も必要としない。さらに、この反応は発エルゴン反応であることから、ATP などのエネルギー供給も不要である。またホルムアルデヒド固定の基質である Ru5P と生成物である F6P、これらの変換に必要な糖リン酸変換系は、ペントースリン酸経路やカルビン回路などの主要な代謝経路の代謝中間体として普遍的に存在する。RuMP 経路が以上のような特徴をもつことから、RuMP 経路を持たない生物に HPS, PHI を導入するだけで、新たな炭素固定反応を導入することが可能になり、ホルムアルデヒド資化能あるいは耐性を異種生物に付与することができる。多くの細菌では、HPS, PHI をコードする遺伝子はオペロンとして存在するが、一部のメタン資化性細菌やアーキアでは融合遺伝子として存在し、二機能性酵素として働くことを見出した²⁵⁾。そこで、メタノール資化性細菌 *Mycobacterium gastri* MB19 株由来の HPS, PHI 遺伝子を人工的に融合させた遺伝子を作成し、大腸菌内で発現させたところ、大腸菌へのホルムアルデヒドの耐性付与に成功し、さらに触媒効率も向上した²⁶⁾。

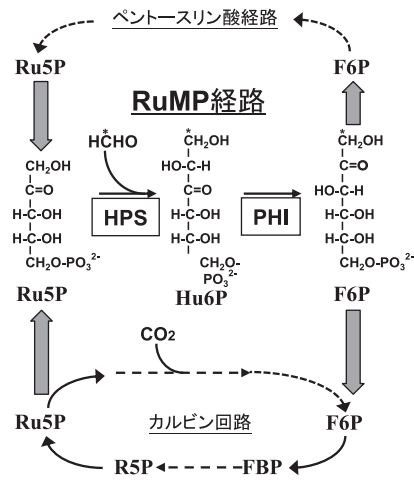


図5. RuMP 経路とペントースリン酸経路またはカルビン回路との融合

一方、RuMP 経路はカルビン回路とも多くの代謝中間体を共有することから、植物に HPS, PHI を導入し、カルビン回路をバイパスするようにホルムアルデヒドを固定する経路を構築した。タバコ、シロイヌナズナ、ゼラニウムの葉緑体に導入することで、気相中のホルムアルデヒドを直接、吸収・固定する植物体の開発に成功した。このような形質転換植物の創成は、シックハウスの原因となるホルムアルデヒドの室内環境中からの除去に有効な技術としても期待され、植物表層から放出される C1 化合物の固定や環境修復技術に応用できることを示した^{27,28)}。

7. おわりに

人類にとって、いかにして天然ガスやバイオマスなどの炭素資源を節約しながら有効利用し、かつ、少ないエネルギーで資源として再固定できるのかが、健全な炭素循環と資源・エネルギー問題解決のための鍵となる。従来、光合成による炭素固定の基質は CO₂ に限られてきたが、植物圏に生息する C1 微生物を植物表面に定着させ、植物バイオマスからの C1 化合物を利用して、光合成代謝産物の供給もしくは CO₂ へ酸化することができる。植物表層に存在するメタノールや、光合成の副反応として生成されるメタンの他、地下部のメタン生成菌によって嫌氣的に生成された後、維管束を通過して植物表層から放出されたメタンが、大気中に放出されず C1 微生物により再固定され、その生長促進効果により CO₂ 固定を促進している。これは、エネルギー準位の低い CO₂ まで酸化されず、よりエネルギー準位の高いホルムアルデヒドから炭素固定反応を行うことができる C1 微生物特有の代謝特性によるところが大きい (図6)。一方、フラスコ内でのメタノール培養とは異なり、植物葉上の PPFM の生育では、希土類金属 La³⁺ 依存性メタノール脱水素酵素が関与していることなど、C1 微生物と植物との相利共生関係とそのメカニズムには、これまで推測されていなかった新事実がまだまだ隠されている。今後、植物表層における微生物の C1 代謝動態、植物と植物表層に暮らす C1 微生物による炭素固定能の協調や生長促進効果の実体についても明らかにしていきたい。そ

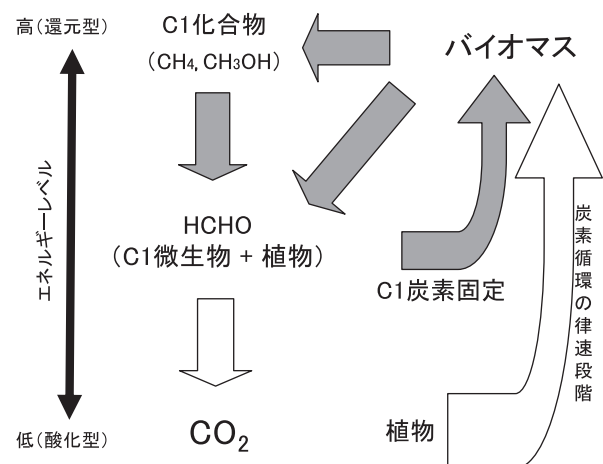


図6. C1 微生物-植物共生系による C1 炭素固定

こには環境バイオテクノロジーに利用可能な生命現象が潜んでいると考えている。

文 献

- 1) Nemecek-Marshall, M., R.C. MacDonald, J.J. Franzen, C.L. Wojciechowski, and R. Fall. 1995. Methanol emission from leaves. *Plant Physiol.* 108: 1359–1368.
- 2) Keppler, F., J.T.G. Hamilton, M. Brass, and T. Rockmann. 2006. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439: 187–191.
- 3) Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 828–840.
- 4) Lidstrom, M.E. and L. Chistoserdova. 2002. Plants in the pink: Cytokinin production by *Methylobacterium*. *J. Bacteriol.* 184: 1818.
- 5) Laothawornkitkul, J., J.E. Taylor, N.D. Paul, and C.N. Hewitt. 2009. Biogenic volatile organic compounds in the Earth system. *New Phytologist* 183: 27–51.
- 6) Kawaguchi, K., H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai. 2011. Yeast methylophagy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS ONE* 6: e25257.
- 7) Nakagawa, T., T. Miyaji, H. Yurimoto, Y. Sakai, N. Kato, and N. Tomizuka. 2000. A methylophagy pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4253–4257.
- 8) Corpe, W.A. and D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Dev. Indust. Microbiol.* 23: 483–493.
- 9) Koenig, R.L., R.O. Morris, and J.C. Polacco. 2002. tRNA is the source of low-level trans-Zeatin production in *Methylobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 184: 1832–1842.
- 10) Omer, Z.S., R. Tombolini, A. Broberg, and B. Gerhardsson. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylophagy bacteria. *Plant Growth Regul.* 43: 93–96.
- 11) Sy, A., A.C. Timmers, C. Knief, and J.A. Vorholt. 2005. Methylophagy metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7245–7252.
- 12) Schmidt, S., P. Christen, P. Kiefer, and J.A. Vorholt. 2010. Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein *XoxF* in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 156: 2575–2586.
- 13) Nakagawa, T., R. Mitsui, A. Tani, K. Sasa, S. Tashiro, T. Iwama, T. Hayakawa, and K. Kawai. 2012. A catalytic role of *XoxF1* as La^{3+} -dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS ONE* 11: e50480.
- 14) Gourion, B., M. Rossignol, and J.A. Vorholt. 2006. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13186–13191.
- 15) Knief, C., L. Frances, F. Cantet, and J.A. Vorholt. 2008. Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2218–2228.
- 16) Delmotte, N., C. Knief, S. Chaffron, G. Innerebner, B. Roschitzki, R. Schlapbach, C. von Mering, and J.A. Vorholt. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 16428–16433.
- 17) Mizuno, M., H. Yurimoto, N. Yoshida, H. Iguchi, and Y. Sakai. 2012. Distribution of pink-pigmented facultative methylophagy on leaves of vegetables. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 578–580.
- 18) Mizuno, M., H. Yurimoto, H. Iguchi, A. Tani, and Y. Sakai. 2013. Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain OR01 on perilla plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 1533–1538.
- 19) Iguchi, H., I. Sato, M. Sakakibara, H. Yurimoto, and Y. Sakai. 2012. Distribution of methanotrophs in the phyllosphere. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 1580–1583.
- 20) Iguchi, H., H. Yurimoto, and Y. Sakai. 2011. Stimulation of methanotrophic growth in co-cultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 8509–8515.
- 21) Iguchi, H., I. Sato, H. Yurimoto, and Y. Sakai. 2013. Stress resistance and C1 metabolism involved in plant colonization of a methanotroph *Methylosinus* sp. B4S. *Arch. Microbiol.* 195: 717–726.
- 22) Kip, N., J.F. van Winden, Y. Pan, L. Bodrossy, G. Reichart, A.J.P. Smolders, M.S.M. Jetten, J.S. Sinninghe Damste, H.J.M. Op den Camp. 2010. Global prevalence of methane oxidation by symbiotic bacteria in peat-moss ecosystems. *Nat. Geosci.* 3: 617–621.
- 23) Yurimoto, H., N. Kato, and Y. Sakai. 2009. Genomic organization and biochemistry of the ribulose monophosphate pathway and its application in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 407–416.
- 24) Yurimoto, H., R. Hirai, N. Matsuno, H. Yasueda, N. Kato, and Y. Sakai. 2005. HxlR, a member of the DUF24 protein family, is a DNA-binding protein that acts as a positive regulator of the formaldehyde-inducible *hxLAB* operon in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 57: 511–519.
- 25) Orita, I., H. Yurimoto, R. Hirai, Y. Kawarabayashi, Y. Sakai, and N. Kato. 2005. The archaeon *Pyrococcus horikoshii* possesses a bifunctional enzyme for formaldehyde fixation via the ribulose monophosphate pathway. *J. Bacteriol.* 187: 3636–3642.
- 26) Orita, I., N. Sakamoto, N. Kato, H. Yurimoto, and Y. Sakai. 2007. Bifunctional enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 439–445.
- 27) Chen, L.M., H. Yurimoto, K.Z. Li, I. Orita, M. Akita, N. Kato, Y. Sakai, and K. Izui. 2010. Assimilation of formaldehyde in transgenic plants due to the introduction of the bacterial ribulose monophosphate pathway genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 627–635.
- 28) Song, Z., I. Orita, F. Yin, H. Yurimoto, N. Kato, Y. Sakai, K. Izui, K. Li, and L. Chen. 2010. Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastri* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde. *Biotechnol. Lett.* 32: 1541–1548.