

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05151

研究課題名（和文）葉圏細菌との超個体化による植物の気孔動態制御と環境適応

研究課題名（英文）Plant stomatal regulation and environmental adaptation via association with the leaf microbiota

研究代表者

峯 彰 (Mine, Akira)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80793819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物は、葉の表面に存在する気孔の開度を調節することで光合成に必要なガス交換と乾燥への適応を両立し、かつ、蒸散による全身的な物質転流の駆動力を生み出している。気孔の開閉を介した生長制御や環境応答はこれまで植物の個の力として捉えられてきた。本研究において、植物の気孔開閉を操作する共生細菌を複数発見した。加えて、共生細菌による気孔開閉誘導の仕組みの一端を明らかにした。また、気孔開閉を操作する共生細菌の中には、植物の生長を促進するものが存在することを見出した。本研究は、気孔を介した植物と細菌の新たな関係性を提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は、葉の表面に存在する気孔の開度を調節することで光合成に必要なガス交換と乾燥への適応を両立し、かつ、蒸散による全身的な物質転流の駆動力を生み出している。気孔の開閉を介した生長制御や環境応答はこれまで植物の個の力として捉えられてきた。本研究では、葉に共生する細菌が植物の気孔開閉を操作し、宿主植物の生長を促進するという新規な現象を発見した。その仕組みをより深く理解することで、気孔開閉を操作する共生細菌を利用した農業技術の開発へと繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Stomata are microscopic pores found in the plant leaf surface. Regulation of stomatal aperture is pivotal for plants to promote photosynthetic carbon dioxide uptake, to drive systemic transport of nutrients via transpiration, and to adapt to environmental changes such as desiccation. Textbook says plants alone control stomatal aperture according to the environment. In this research project, we found that a variety of leaf symbiotic bacteria have the ability to manipulate stomatal aperture and provided some mechanistic insights into the manipulation of stomatal aperture by these symbiotic bacteria. Further, we identified a stomata-manipulating bacterium that promotes host plant growth. This study opens a new avenue in research on plant-bacteria interactions via stomata.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：気孔 細菌 環境適応 超個体

### 1. 研究開始当初の背景

気孔は葉の表面に存在する 2 つの孔辺細胞に囲まれた自然開口部であり、植物の環境適応において中心的な役割を果たす。例えば、植物は気孔を開くことで光合成に必要な二酸化炭素を取り込むとともに、蒸散を介して全身的な物質転流の駆動力を生み出す。一方で、乾燥環境では気孔を閉じ、水分が失われるのを防ぐ。従来の研究では、環境に応じた気孔の開閉制御を植物の個の力として捉え、その分子機構を明らかにしてきた。

次世代シーケンサーを基盤とした技術革新により、健全な植物の葉には多様な細菌が棲息していることが明らかになってきた。これらの葉圏細菌叢に関する研究から、宿主植物の健全な生育を助ける共生細菌の存在が明らかにされ、農業応用への期待が高まってきている。しかし、これらは無数の共生細菌のごく一部であり、大部分については詳細な解析がなされていなかった。

研究代表者は、野外に生育する健全な植物の葉から単離した細菌の中に、気孔の開閉を操作する細菌を複数見出した。この発見に着想を得て、植物は葉圏細菌を拡張された自己として取り込んだ超個体として、葉圏細菌と協働して気孔開閉を調節することで、個の力だけでは発揮できない環境適応能力を覚醒させるという仮説を立証するための研究に着手した(図1)。

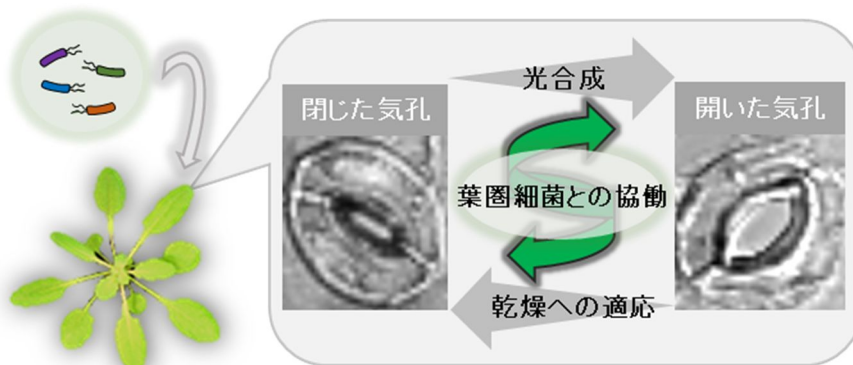


図1. 気孔開閉を操作する葉圏細菌との超個体化による植物の環境適応

### 2. 研究の目的

本研究は、学術変革領域研究(B)「植物と微生物の共創による超個体の覚醒」における計画研究として実施した。多様な微生物との超個体化を通じて覚醒される植物の環境適応能の解明を目指す本領域において、本研究は、葉圏細菌との超個体化を介した気孔開閉の仕組みと意義の解明を目的とし、(1) 気孔開度自動測定技術の開発、(2) 葉圏細菌による気孔開閉制御機構の解明、および、(3) 気孔開閉を制御する葉圏細菌が宿主植物の環境適応に与える影響の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 異なる光条件や化合物を処理することで様々な開度を示すシロイヌナズナの気孔を準備し、その顕微鏡画像を独自に取得した。これらの画像に対して、気孔の位置、開閉および開口領域に関する情報を注釈として付与し、トレーニング用、バリデーション用、テスト用データセットに分けた。次に、シロイヌナズナの気孔開度自動測定を実現するために、物体検出と領域分割から構成される二段階の深層学習アルゴリズムを構築した。物体検出モジュールには、気孔の座標情報を取得するとともに、開いた気孔と閉じた気孔を分類させた。You Only Look Once X (YOLOX) の様々なモデルを上述のトレーニング用データセットを用いて学習させ、バリデーション用データセットに対して高い精度と処理速度を示すモデル YOLOX-s を選択した。領域分割モジュールには、YOLOX-s によって「開いている」と判定された気孔画像から、気孔の開口部位を検出・計測させた。ここでは、バリデーション用データセットに対して、気孔の検出と開口部位の抽出において最も高いパフォーマンスを示した U-Net に基づくモデルを選択した。また、シロイヌナズナの葉を挟み込むことで「非破壊的に」気孔を撮影することが可能なデバイスを開発した。さらに、このデバイスを用いて取得した画像を用いてモデルの再学習を行った。

(2) 研究計画開始以前から保有していた葉圏細菌は海外由来であり、日本国内で研究展開するには様々な制約が生じると考えられた。そこで、日本の野外に自生するシロイヌナズナやアブラナ科植物の葉から細菌の単離を試みた。様々な栄養条件の培地を用いて培養できたコロニーから DNA を抽出し、16S リボソーム DNA の配列情報をもとに単離した細菌間の系統関係を整理した。構築した葉圏細菌コレクションから、シロイヌナズナに病気を引き起こさず共生する細菌を選抜した。その中から、シロイヌナズナの気孔開閉を操作する細菌を選抜した。さらに、気孔開口を誘導する葉圏共生細菌 *Pseudomonas paralactis* (Ppr) のゲノム配列を決定し、気孔開口を誘導することが知られている植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto) との比較解析を通じて、葉圏の病原細菌 / 共生細菌による気孔開口誘導に関与する細菌および植物の遺伝子の探索を行った。

(3) 緑色蛍光タンパク質を発現するように遺伝子操作した *Ppr* (*Ppr*-GFP) をシロイヌナズナへ接種し、共焦点顕微鏡を用いて観察することで、*Ppr* が葉のどこに生息するのかを調査した。また、恒常的に発光するように遺伝子操作した *Ppr* (*Ppr*-lux) を用いて、*Ppr* がどの程度植物に定着できるのかを調査した。*Ppr* を接種した植物の生長と気孔動態を経時的に観察することにより、*Ppr* との共生が宿主植物に与える影響を調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 葉の顕微鏡画像から気孔開度を自動測定する深層学習アルゴリズムの開発に成功した。開発した深層学習アルゴリズムは手動測定と比べて、わずか  $0.2 \mu\text{m} \pm 0.2 \mu\text{m}$  の誤差で気孔開度の自動測定が可能であることを示した。さらに、テスト用データセットを用いた詳細な比較解析から、本研究で開発した深層学習アルゴリズムは、手動測定と同等の正確さで、光や化合物に対する気孔開度の変化を捉えられることを証明した。

顕微鏡による気孔の観察は一般的に用いられる方法であるが、植物体から葉を切り取る際の傷害やそれに伴って産生される植物ホルモンがシグナルとなって、気孔開度に影響を与えうる。したがって、気孔応答を厳密に評価するためには、植物個体の葉をできる限り傷つけることなく気孔を観察する装置が必要になる。本研究では、シロイヌナズナの葉を挟み込むことで“非破壊的に”気孔を撮影することが可能なデバイスを開発した。本デバイスは、幅 5 cm x 奥行 20 cm x 高さ 6 cm と小型であり、その重量は 310 g と、携帯性にも優れている (図 2)。しかし、このポータブル気孔撮影装置を用いて取得した画像に対して、前述の深層学習アルゴリズムを用いた気孔開度の自動測定を試みたが、満足な結果が得られなかった。そこで、ポータブル気孔撮影装置を用いて取得した画像を用いて、モデルの再学習を行い、ポータブル気孔撮影装置の画像に対しても、高い精度で気孔を検出し、その開度を計測可能なモデルを構築した。ポータブル気孔撮影装置と深層学習アルゴリズムによる気孔開度自動推定を組み合わせ、植物個体から葉を切り離すことなく病原細菌 *Pto* に対する気孔応答を解析することに成功した。さらに、ポータブル気孔撮影装置と深層学習アルゴリズムを組み合わせ、ほぼリアルタイムで気孔開度の自動測定が可能な解析プラットフォームを構築した。



図2. ポータブル気孔撮影装置

(2) 植物は微生物を感知して気孔を閉じることで、その侵入を制限する。これに対して、*Pto* などの病原細菌は、気孔を再開させることが知られている。これまでに、*Pto* が産生する植物毒素コロナチンによる気孔開口に必要なシロイヌナズナの遺伝子を同定していた。コロナチンはこの遺伝子の発現を誘導するが、この遺伝子の発現誘導と気孔開口の因果関係は不明であった。本研究では、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、この遺伝子のプロモーター上に存在するコロナチンによる発現誘導に必要な塩基配列を突き止めた。さらに、当該塩基配列をゲノム編集により改変し、コロナチンによる発現誘導が起こらないシロイヌナズナ変異体の作出を試みたが、形質転換体は多数得られたものの、変異導入個体は得られなかった。そこで、シロイヌナズナとその近縁種が示すコロナチンによる気孔開口に対する感受性の違いに着目した研究を進めた。コロナチンはシロイヌナズナの気孔を開くが、その近縁種である *Eutrema salsugineum* の気孔を開くことができない。これらの植物種のプロモーター配列を交換する実験から、コロナチンによる当該遺伝子の発現誘導が気孔開口に必要であることを示した。

一方、気孔開閉操作能は病原細菌に限られたものであるのか、あるいは、葉圏細菌に広く存在するのかは不明であった。本研究では、日本に自生するシロイヌナズナやその他のアブラナ科植物から多数の葉圏細菌を単離し、シロイヌナズナに病原性を示さない 75 系統を選抜した。ポータブル気孔撮影装置や気孔開度自動測定アルゴリズムを利用しながら、気孔開閉操作能を有する 13 系統の葉圏細菌を発見した。その中で、シロイヌナズナに対して気孔開口を誘導する *Ppr* を中心に研究を進めた。*Ppr* のゲノム配列を決定し、*Pto* との比較ゲノム解析を行ったところ、*Ppr* は、*Pto* による気孔開口に必要なコロナチンの生合成遺伝子を持たないことが明らかとなった。さらに、コロナチンによる気孔開口に必要な遺伝子を欠損したシロイヌナズナ変異体においても、*Ppr* は気孔開口を誘導することを突き止めた。また、病原細菌による気孔開口では、III 型分泌装置によって分泌されるタンパク質が関与するという報告がある。比較ゲノム解析より、*Ppr* は III 型分泌装置の構成遺伝子の一部を有していることが明らかになった。しかし、III 型分泌装置の構成に必須の遺伝子を破壊した *Ppr* は依然として気孔開口を誘導した。以上より、*Ppr* は *Pto* を含む病原細菌とは異なるメカニズムで気孔開口を誘導すると考えられた。

(3) 宿主植物に対する *Ppr* の作用を明らかにするために、まず *Ppr* が宿主植物葉のどこに生息するのかを調査した。*Ppr*-GFP をシロイヌナズナ葉面にスプレー接種すると、葉の表面に散在し、時間の経過とともに増殖する様子が観察された。しかし、葉の内部への侵入は観察されなかった。同時点において、*Pto* の葉の内部への侵入が観察された。したがって、*Ppr* は *Pto* と同様

に気孔を開くが、この気孔開口を通じて葉の内部へ侵入するわけではないことが明らかとなった。次に、*Ppr-lux* を利用して、シロイヌナズナ葉にどれくらいの期間定着できるのかを調査した。その結果、*Ppr* はシロイヌナズナの葉面に3週間以上にわたって定着できることを突き止めた。さらに、*Ppr* を接種したシロイヌナズナは非接種の個体よりも生長が促進されることを発見した。光に対する気孔開口が速くなるシロイヌナズナ形質転換体は野生型よりも生長が促進されることが知られている。これに着想を得て、*Ppr* が定着したシロイヌナズナでは、光に対する気孔開口が速くなるのではないかと仮説を立てた。興味深いことに、*Ppr* による生長促進が見られる栽培条件において、*Ppr* が定着したシロイヌナズナは、非接种植物と比べて、光が当たり始める朝方に大きく気孔を開いていることを見出した。すなわち、*Ppr* は植物の葉面に定着し、宿主植物の気孔開口を助け、生長を促進する共生細菌であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirata Rikako, Takagi Momoko, Toda Yosuke, Mine Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Observation and Automated Measurement of Stomatal Responses to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/66112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Entila Frederickson, Han Xiaowei, Mine Akira, Schulze-Lefert Paul, Tsuda Kenichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Commensal lifestyle regulated by a negative feedback loop between <i>Arabidopsis</i> ROS and the bacterial T2SS	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-44724-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Kohji, Mine Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Sugar coordinates plant defense signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adk4131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Momoko, Hirata Rikako, Aihara Yusuke, Hayashi Yuki, Mizutani-Aihara Miya, Ando Eigo, Yoshimura-Kono Megumi, Tomiyama Masakazu, Kinoshita Toshinori, Mine Akira, Toda Yosuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Image-Based Quantification of <i>Arabidopsis thaliana</i> Stomatal Aperture from Leaf Images	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Momoko, Hotamori Kei, Naito Keigo, Matsukawa Sumire, Egusa Mayumi, Nishizawa Yoko, Kanno Yuri, Seo Mitsunori, Ifuku Shinsuke, Mine Akira, Kaminaka Hironori	4. 巻 13
2. 論文標題 Chitin-induced systemic disease resistance in rice requires both OsCERK1 and OsCEBiP and is mediated via perturbation of cell-wall biogenesis in leaves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1064628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihisa Ayaka, Yoshimura Satomi, Shimizu Motoki, Sato Sayaka, Matsuno Shogo, Mine Akira, Yamaguchi Koji, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 236
2. 論文標題 The rice OsERF101 transcription factor regulates the NLR Xa1 mediated immunity induced by perception of TAL effectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1441 ~ 1454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Samaradivakara Saroopa P., Chen Huan, Lu Yi Ju, Li Pai, Kim Yongsig, Tsuda Kenichi, Mine Akira, Day Brad	4. 巻 235
2. 論文標題 Overexpression of NDR1 leads to pathogen resistance at elevated temperatures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 峯彰
2. 発表標題 病原型・共生型の葉圍細菌による植物の気孔動態制御
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、峯彰
2. 発表標題 共生細菌 <i>Pseudomonas paralactis</i> による気孔開口と植物の生育促進の関係性について
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 画像解析によるシロイヌナズナ気孔・根の表現型定量技術 の実装と運用
2. 発表標題 高木 桃子、平田 梨佳子、相原 悠介、林 優紀、水谷 未耶、安藤 英伍、河野(吉村) 恵実、富山 将和、岡崎まなみ、Liu Xinpeng、晝間敬、大倉 史生、木下 俊則、峯 彰、戸田 陽介
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田(山下)美鈴、峯彰、山田晃嗣
2. 発表標題 糖シグナルを介した新規防御因子の同定
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂田悠夏、三瀬和之、高野義孝、峯彰
2. 発表標題 高湿度による植物免疫の抑制におけるTrihelix 転写因子の役割
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、峯彰
2. 発表標題 葉に棲息し気孔動態を制御する細菌が植物に与える有益な影響
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂田悠夏、三瀬和之、高野義孝、峯彰
2. 発表標題 高湿度による植物免疫の抑制におけるTrihelix 転写因子の役割
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山田晃嗣、峯彰
2. 発表標題 糖は植物免疫シグナルを増強させる
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 峯彰
2. 発表標題 時系列RNA-seqデータのネットワーク解析から紐解く変動環境下の植物 - 病原細菌相互作用
3. 学会等名 第35回微生物生態学会（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 山田晃嗣、峯彰
2. 発表標題 糖はプロテインキナーゼの活性化を介して防御応答を活性化させる
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木桃子、平田梨佳子、相原悠介、林優紀、相原(水谷)未耶、安藤英伍、河野(吉村)恵実、富山将和、木下俊則、峯彰、戸田陽介
2. 発表標題 ディーブラーニングを用いたシロイヌナズナの気孔開度自動定量技術の開発
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、峯彰
2. 発表標題 共生細菌 <i>Pseudomonas paralactis</i> による気孔動態制御メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 峯彰
2. 発表標題 遺伝子発現ダイナミクスから紐解く 変動環境下の植物-病原細菌相互作用
3. 学会等名 学術変革研究(B)「植物と微生物の共創による超個体の覚醒」ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田晃嗣、峯彰
2. 発表標題 糖吸収は防御応答を増強させる
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 峯彰、松本歩、石川真太郎、竹田篤史、三瀬和之、高野義孝
2. 発表標題 高温と高湿度は細菌の栄養獲得に関わる遺伝子発現に影響を与え病原性を高める
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会全国大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>イネが病原菌の感染力の源を検出して免疫を誘導する仕組みを解明 病気に強い植物の開発に期待  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-09-07-0">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-09-07-0</a>          気孔開度自動計測技術を活用した細菌に対する気孔応答の解析  <a href="https://www.kakusei-plant.com/report/p136/">https://www.kakusei-plant.com/report/p136/</a>          植物が病原細菌を手懐ける仕組みの一端を解明  <a href="https://www.kakusei-plant.com/report/p133/">https://www.kakusei-plant.com/report/p133/</a>          シロイヌナズナの気孔を簡便かつ高速に自動計測する技術の開発  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-04-27-2">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-04-27-2</a></p>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ミシガン州立大学			
中国	華中農業大学			
ドイツ	マックスプランク植物育種学研究所			