

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22307

研究課題名（和文）葉面C1細菌-植物間相互作用の分子機構解明と環境保全型農業への活用

研究課題名（英文）Molecular mechanism of interactions between phyllosphere C1-microbes and plants and its application in environmental conservation agriculture

研究代表者

由里本 博也（YURIMOTO, Hiroya）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：Methylobacterium属に代表されるメタノール資化性細菌（C1細菌）は葉面微生物の優占種であり、植物生長促進効果をもつことが知られている。本研究では、葉面C1細菌の植物定着能、葉面での優占化、種間特異性、植物生長促進効果などのC1細菌-植物間相互作用の分子機構を解明するとともに、その製造工程で多大なエネルギーを消費する化学肥料の使用量を低減しながらも作物増産を可能にする、葉面C1細菌を用いた環境保全型新規栽培技術への活用を目指し、菌株や接種方法の最適化や作物増収効果の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C1細菌-植物間相互作用の分子機構解明については、葉面C1細菌の植物上での動態追跡手法や、各種栄養源への走化性の評価方法を確立できた。これらの解析手法を用いて、C1細菌の生育特性や葉面定着能を評価できることがわかった。本研究で得られた成果は、自然界における植物-微生物相互作用機構のさらなる理解につながるだけでなく、葉面C1細菌を用いた新規栽培技術開発のための基盤的知見となるものである。

研究成果の概要（英文）：Among the C1-microbes which can utilize one-carbon compounds as the sole source of carbon and energy, methanol-utilizing bacteria such as Methylobacterium spp. are dominant colonizers at the plant leaf surface (phyllosphere). These bacteria are known to have the ability to promote plant growth. In this project, in order to develop novel culture techniques of environmental conservation agriculture, we investigated the molecular mechanism of interactions between Methylobacterium spp. and plants. We established experimental methods to observe distribution dynamics of Methylobacterium spp. at the phyllosphere and to evaluate chemotaxis to various nutrients of Methylobacterium spp. We also tested promotion of plant growth and crop yield by inoculation of Methylobacterium spp.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生物間相互作用 葉面微生物 作物増収 植物生長促進 環境保全型農業 C1細菌 Methylobacterium

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

農作物の生産性向上、安定生産のためには、窒素、リン酸、カリウムなどの養分を含む肥料の施用が不可欠であり、人類は化学肥料の施用量を増加させることにより、農作物の収量を飛躍的に向上させてきた。一方、化学肥料の製造工程には多大なエネルギーが投入されるため、施肥量の低減はCO₂排出削減に大きく貢献する。また、過度の施肥は農地における温室効果ガス排出や、地下水環境汚染等の問題もあり、有機肥料の利用、土壌診断等に基づき肥料を減らす栽培方法の確立や、最小限の施肥量で有効性の高い肥料の開発など、施肥量の減少・適正化に向けた栽培技術の開発・普及が進められている。

化学肥料の使用量を低減する栽培技術の一つに有機肥料の施用があるが、有機肥料は微生物によって植物が利用できる形態に分解される必要があり、その有効性には土壌微生物の働きが大きく影響する。微生物を含む土壌改良材については、根粒菌や菌根菌、枯草菌を利用する例があるが、効果を発揮する場所が土壌中(根圏)などに限定され、しかも大量に菌体を供給するための培養技術が確立されていない。最小限の資源投入量でバイオマス生産性を向上させるためには、施肥量を最少化した上で、植物光合成、炭素固定能そのものを向上させなければならない。一方、植物葉面に棲息する微生物の10-20%をも占める優占種であるメタノール資化性細菌(C1細菌) *Methylobacterium* は、植物から放出されるメタノールを葉面での生存のための炭素源としながら、植物ホルモンやその他の化合物を合成して植物生長促進効果をもたらす、C1細菌-植物共生系を構成して植物光合成、炭素固定能に多大な影響を与えている。しかしながら、生長促進を中心とするC1細菌と植物との相互作用の分子機構、C1細菌-植物共生系を制御する要因については未解明な点が多く残されている。

我々はこれまでに、様々な蔬菜葉面からC1細菌を分離し、蔬菜の種類によってその菌数や種が異なること、特にシソ植物には葉面総菌数の15%程度にまで優占化して棲息すること、アカシソ種子から単離した *Methylobacterium* sp. OR01株が強いアカシソへの定着能を有し、植物とC1細菌の共生関係に強い種間特異性があることを見出した (*Biosci Biochem Biotechnol* 76:578, 2012; *ibid* 77:1533, 2013)。このようなC1細菌-植物の共生原理を解明し、その機能を高度活用・最適化することで、施肥量の低減と植物バイオマス生産性の向上をもたらす、環境保全型新規栽培技術を確立することができる。また、C1細菌による植物生長促進に関して、我々はこれまでに、イネの苗の生長を短期間で評価する手法を確立し、イネに対する生長促進効果をもつ株として複数の *Methylobacterium* 菌株を単離した。さらに圃場レベルでも生長促進効果および増収効果をもたらすことを認めた (*Microb Biotechnol* 14:1385-1396, 2021)。

2. 研究の目的

本研究では、葉面C1細菌の植物定着能、葉面での優占化、種間特異性、植物生長促進効果などのC1細菌-植物間相互作用の分子機構解明を目的とするとともに、その製造工程で多大なエネルギーを消費する化学肥料の使用量を低減しながらも作物増産を可能にする、葉面C1細菌を用いた環境保全型新規栽培技術への活用を目指し、菌株や接種方法の最適化や作物増収効果の検証を行った(図1)。

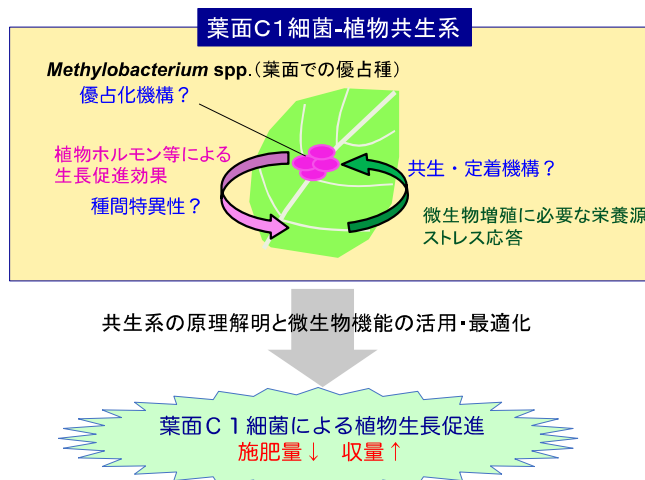


図1. 葉面C1細菌-植物共生系を活用した環境保全型新規栽培技術

3. 研究の方法

(1) C1 細菌-植物間相互作用の分子機構解明

アカシソと *Methylobacterium* sp. OR01 株の特異な関係をモデル系とし、葉面での優占化過程を追跡するために、蛍光タンパク質を発現する菌株を構築してこれをアカシソの種子や葉面に接種し、蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリーにより、アカシソ上での動態を追跡した。また、葉面 C1 細菌の植物定着能、葉面での優占化、種間特異性に関わる分子機構を解明するため、C1 細菌の葉面での主要な炭素源であるメタノールへの走化性に着目し、走化性の評価方法を確立するとともに、走化性に関わる遺伝子の破壊株を構築してその表現型を解析した。

(2) C1 細菌接種による減肥条件下での生長促進効果の検証

イネに対する増収効果については、商業圃場においての効果の検証を進めるとともに、試験圃場において慣行施肥条件と無施肥条件での検討をおこなった。また、コマツナを対象とする生長促進効果について、人工気象器内および温室内での栽培試験を行った。

4. 研究成果

(1) C1 細菌-植物間相互作用の分子機構解明

C1 細菌の葉面での動態解析

異なる蛍光タンパク質を発現させた *Methylobacterium* sp. OR01 株と別種の *Methylobacterium* 属細菌 X 株のアカシソ上での動態を解析した。OR01 株と X 株を単独または混合で種子に接種し、葉上の細胞数をフローサイトメトリーを用いて経時的に測定し、その推移を明らかにした。単独で接種した場合、OR01 株、X 株ともアカシソ葉上に長期間定着していたが、2 種を競合させると X 株はほとんど生存できず、常に OR01 株が優占していた。葉を培地に押し当て出現したコロニーのパターンを解析すると、OR01 株は葉全体に行き渡って分布していたが、X 株はコロニーが点在していた。この 2 種の菌株の各種栄養源に対する走化性を調べたところ、OR01 株のメタノールに対する走化性が X 株よりも強いことがわかった。これらの研究過程では、C1 細菌の葉面での動態観察手法を確立することができ、アカシソ葉面に優占化する OR01 株の葉面分布動態を明らかにすることができた。さらに本菌が示す各種栄養源への走化性の評価方法を確立することができた。

C1 細菌におけるメタノール走化性の分子機構

上述の通り、メタノールへの強い走化性を示した *Methylobacterium* sp. OR01 株のメタノール走化性の分子機構を明らかにするため、OR01 株のメタノール走化性に関わるセンサータンパク質 (methyl-accepting protein, MCP) の探索を行った。OR01 ゲノム配列に見出した複数の MCP 候補遺伝子について遺伝子破壊株を作成し、それぞれ蛍光タンパク質で標識した株を構築した。上記で確立した走化性評価系を用い、各遺伝子破壊株のメタノール走化性を評価した結果、遺伝子破壊によりメタノール走化性をほとんど示さなくなった遺伝子と、野生株よりも走化性が弱まった遺伝子を同定した。さらにこれらの遺伝子破壊株のアカシソ上での分布動態を野生株と比較して解析した。

(2) C1 細菌接種による減肥条件下での生長促進効果の検証

C1 細菌接種によるイネ増収効果の検証

イネに対する生長促進効果について、商業圃場における C1 細菌接種による増収効果の検証を行うとともに、これまでの結果をまとめて論文発表した (Microb Biotechnol 14:1385-1396, 2021)。複数のイネ品種を対象として、試験圃場において慣行施肥条件と無施肥条件での接種試験を行ったが、無施肥区では顕著な増収効果は認められなかった。また、C1 細菌接種前後のイネ葉面菌叢解析を行ったところ、サンプル採取時期によって優占化する細菌種が変化することがわかった。

C1 細菌接種によるコマツナ生長促進効果の評価

イネ以外にもいくつかの作物を候補として人工気象器内での栽培系を検討し、コマツナが評価対象作物として適していることがわかった。コマツナを対象として、C1 細菌接種による生長促進効果の検証を進め、コマツナから新たに単離した菌株を含む複数の C1 細菌菌株の中から、コマツナに対して顕著な生長促進効果を与える菌株を選抜した。さらに、温室内でのポット栽培試験を行い、C1 細菌接種による生長促進効果を認めた。さらに、菌株接種時期および回数や施肥条件による生長促進効果への影響も評価した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yurimoto Hiroya, Shiraishi Kosuke, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Physiology of Methylootrophs Living in the Phyllosphere	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 809 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9040809	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 由里本博也、阪井康能	4. 巻 79
2. 論文標題 メタノール細菌・細胞壁成分の出穂後葉面散布による酒米増収	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 298-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 由里本博也	4. 巻 101
2. 論文標題 菌は死んでも役に立つ 死菌体の出穂後1回散布で酒米の収量16%アップ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 現代農業	6. 最初と最後の頁 78-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yurimoto Hiroya, Iguchi Hiroyuki, Di Thien Do Thi, Tani Akio, Okumoto Yutaka, Ota Atsushi, Yamauchi Takahiro, Akashi Takahiro, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Methanol bioeconomy: promotion of rice crop yield in paddy fields with microbial cells prepared from natural gas derived C1 compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1385-1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1751-7915.13725	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 由里本博也	4. 巻 4
2. 論文標題 葉面メタノール細菌による作物増収技術の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1102-1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 由里本博也、阪井康能	4. 巻 82
2. 論文標題 メタノールバイオエコノミー：C1 微生物代謝生理の分子基盤を活用した資源循環型社会の構築	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 メタノールから生産する微生物製剤の葉面散布による作物増収
3. 学会等名 バイオインダストリー協会「C1バイオエコノミー勉強会 -新たな炭素循環像を基にしたC1炭素の循環的利用-」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 C1微生物-植物間相互作用による炭素循環と作物増収
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会シンポジウム「微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加地奏絵、片山志織、谷明生、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 Methylobacterium sp. OR01株におけるメタノール走化性に関わるMCPタンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 C1微生物の葉面での生存戦略機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会シンポジウム「分子レベルで紐解く植物-微生物間相互作用」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山志織、由里本博也、谷明生、阪井康能
2. 発表標題 蛍光タンパク質を発現させたMethylobacterium属細菌のアカシソ上での動態解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 C1酵母の葉面での生存戦略とメタノール感知機構
3. 学会等名 第18回新産業酵母研究会講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物やその細胞壁成分の葉面散布による酒米の増収に成功
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-12-11-0>

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
研究協力者	阪井 康能 (SAKAI Yasuyoshi)		
研究協力者	白石 晃将 (SHIRAIISHI Kosuke)		
研究協力者	谷 明生 (TANI Akio)		

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
---------	---------