

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19133

研究課題名（和文）メタノール資化性細菌の植物葉面での優占化にはメタノール走化性が関与するのか？

研究課題名（英文）Molecular mechanism of methanol chemotaxis in methylotrophic bacteria living on the plant leaves

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） 5,000,000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、C1細菌の葉面での優占化にはメタノール走化性が関与するのか？という「問い」に答えるため、我々がこれまでに見出したアカシソとMethylobacterium sp. OR01株との特異な関係をモデル系として、メタノール走化性に関わるタンパク質群の同定と機能解析を行い、葉面定着能との関連性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C1細菌のメタノール走化性に関与するタンパク質として、MCPタンパク質に加えて、Cheタンパク質群および、ペルリ毛を構成するフラジェリンをコードする遺伝子を同定し、それぞれの葉面定着能への重要性を明らかにすることができた。得られた研究成果は、自然界における植物-微生物間相互作用機構のさらなる理解につながるだけでなく、葉面定着能を高めたC1細菌による作物増収のための微生物製剤や新規栽培技術開発が期待できる。

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, we asked the question, "Is methanol chemotaxis involved in the dominance of C1 bacteria on leaves? To answer this question, we investigated the molecular mechanism of methanol-chemotaxis of Methylobacterium sp. strain OR01 as a model system. We identified several proteins involved in methanol chemotaxis and revealed their importance to phyllosphere colonization.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生物間相互作用 微生物生理 葉面微生物 作物増収 MCPタンパク質 Cheタンパク質

1. 研究開始当初の背景

地球上の植物の葉の表面積は、表裏あわせて地球の表面積の2倍に匹敵する 10^9 km^2 にも及び、葉面の総菌数は最大約 10^{26} cells という膨大な数に達するという試算がある。それにもかかわらず、葉面は微生物の棲息環境として永年看過され、植物病原菌に関する研究以外はほとんど着目されてこなかった。しかし、葉から直接メタノールが放出されていること（地球全体での放出量は年間約1億トンと見積られる）が報告され、さらに次世代シーケンサーやその他の解析技術の進歩も相まって、葉面微生物コミュニティの生理・生態の解明に関する研究が進められた結果、*Methylobacterium* 属細菌に代表されるメタノール細菌（C1細菌）が葉面微生物の優占種として棲息し、植物生長促進作用を示すことが明らかとなった。

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C1細菌は、植物が生産す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、特に、何故C1細菌は葉面で優占化するのか？すなわち「葉面C1細菌の優占化メカニズム」については、ほとんど理解されていなかった。

我々はこれまでに、葉面C1細菌の分布や、C1細菌が葉面環境に適応するための生存戦略機構について研究を進めるとともに、イネに対する生長促進効果をもつC1細菌の葉面散布による作物増収技術の開発を行ってきた。これらの研究の過程で、C1細菌の葉面定着能や生長促進能には、同じ *Methylobacterium* 属細菌でも菌株によって植物との間に種レベルでの特異性があることを見出し、この特異性を規定する要因の1つとして葉面C1細菌のメタノール走化性が関与するのではないかとこの着想に至った（図1）。

2. 研究の目的

本研究では、C1細菌の葉面での優占化機構やC1細菌と植物との種間特異性にはメタノール走化性の強弱が関与するのではないかと「問い」を設定し、これまで全く明らかにされてこなかったC1細菌のメタノール走化性の分子機構を解明して、葉面での優占化メカニズムにおけるメタノール走化性の関与の有無を明らかにすることを目的とした。

我々はこれまでに、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)。本研究は、このような「アカシソと *Methylobacterium* sp. OR01 株の特異な関係」をモデル系とし、C1細菌-植物共生系の共生原理を解明しようとするものである。

大腸菌などで明らかにされている走化性に関わるタンパク質群には、誘因物質の認識に関わるセンサータンパク質 (methyl-accepting protein, MCP) と MCP から鞭毛タンパク質へのシグナル伝達を担う Che タンパク質群が知られている (図2)。これまでに、OR01株ドラフトゲノム解析の結果、複数の MCP タンパク質をコードする遺伝子と、Che タンパク質群をコードする3つの候補遺伝子クラスターを見出した。さらに、蛍光タンパク質で標識したOR01株をアカシソに接種してその分布動態を観察する技術、走化性や葉面定着能を評価する手法も確立した。本研究ではこれらの準備状況を踏まえ、(1) OR01株のメタノール走化性に関わる Che タンパク質群の同定と機能解析を行い、(2) 野生株と走化性関連遺伝子破壊株との組合せで、葉面定着能を比較した。

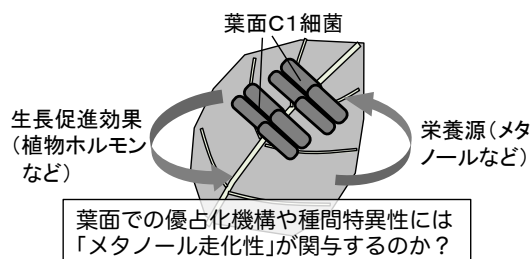


図1. C1細菌-植物共生系の共生原理解明

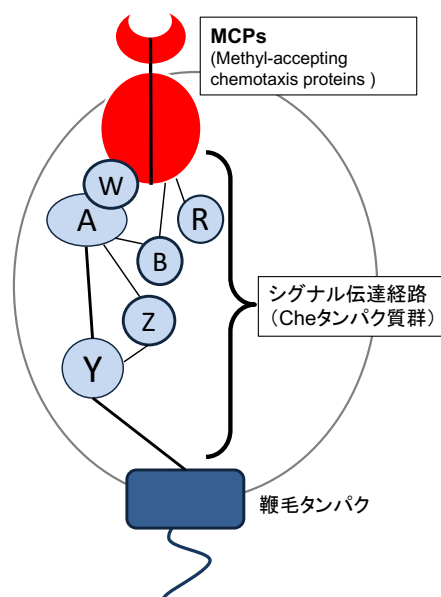


図2. 走化性に関わるタンパク質群とシグナル伝達経路

3. 研究の方法

(1) メタノール走化性に関わる Che タンパク質群の同定と機能解析

Methylobacterium sp. OR01 株のドラフトゲノムに見出した候補遺伝子の破壊株を構築し、メタノールを含む各種化合物に対する走化性を評価した。また、MCP タンパク質は膜結合型や細胞質型など複数のタイプがあるため、その細胞内局在について蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成して解析した。Che タンパク質群については、シグナル伝達経路において主要な役割を果たす CheA と CheW に着目し、候補遺伝子の破壊株を構築して走化性を評価するとともに、蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成して細胞内局在を観察した。さらに、本菌の走化性や運動性におけるべん毛の役割を調べるために、べん毛を構成するフラジェリンタンパク質をコードする遺伝子に着目し、遺伝子破壊株を構築した。

(2) 野生株と走化性関連遺伝子破壊株との競合接種時の葉面定着能比較

野生株と走化性関連遺伝子破壊株について、異なる蛍光タンパク質 (mCherry, GFP) で標識した両菌株を単独あるいは混合して種子に接種し、一定期間栽培後の葉について、平板培地へのスタンプ法や、蛍光顕微鏡観察により種子から葉面への分布動態を観察した。さらに、フローサイトメトリー解析を行い、アカシソ葉上への定着能を葉面の菌数を測定することによって評価した (図 3)。

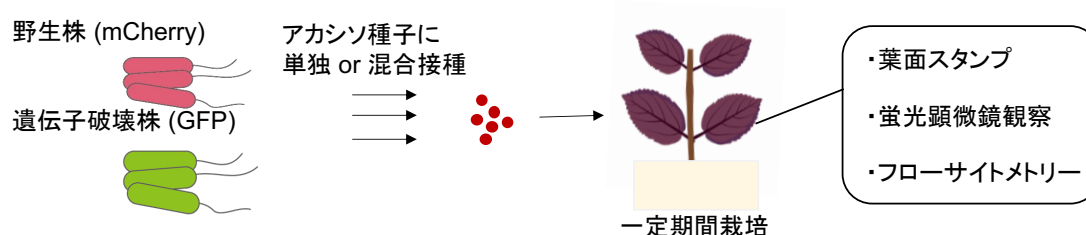


図3. 蛍光タンパク質で標識したC1細菌の葉面分布動態解析と葉面定着評価

4. 研究成果

(1) メタノール走化性に関わる Che タンパク質群の同定と機能解析

OR01 株のドラフトゲノム解析で見出した CheA および CheW の複数の候補遺伝子の破壊株を構築し、メタノール走化性を評価した。その結果、メタノール走化性に主要な役割を果たす CheA および CheW を同定することができ、OR01 株に存在する 3 つの Che 遺伝子クラスターのうちの 1 つが走化性に関与することを明らかにした。メタノール走化性に関わる MCP タンパク質とともに、Che タンパク質の細胞内局在を解析したところ、蛍光タンパク質 (GFP) を付加した MCP および Che タンパク質は、それぞれ細胞極近傍に局在した。さらに、GFP-MCP タンパク質を *cheA* 遺伝子破壊株で発現させたところ、細胞極近傍への局在性を示さなかったことから、両者が相互作用することが示唆された。さらに、ドラフトゲノムに見出した 3 つのフラジェリン遺伝子をすべて破壊することにより、細胞の運動性およびメタノール走化性が失われた。

(2) 野生株と走化性関連遺伝子破壊株との競合接種時の葉面定着能比較

OR01 株の野生株とメタノール走化性に関わる遺伝子の破壊株について、アカシソへの定着能を解析した結果、*cheA* 遺伝子破壊株では、単独接種と混合接種のどちらにおいても野生株と比較してアカシソ葉面の細胞数が有意に減少していた (図 4)。*cheW* 遺伝子破壊株についても同様の傾向が認められており、OR01 株のアカシソ葉面への定着には、Che タンパク質群が重要な役割を果たすことがわかった。以上の結果から、C1 細菌の葉面優占化過程には、メタノール走化性に関与することが強く示唆された。

本研究成果は、自然界における植物-微生物間相互作用機構のさらなる理解につながるだけでなく、葉面定着能を高めた C1 細菌による作物増収のための微生物製剤や新規栽培技術開発が期待できる。

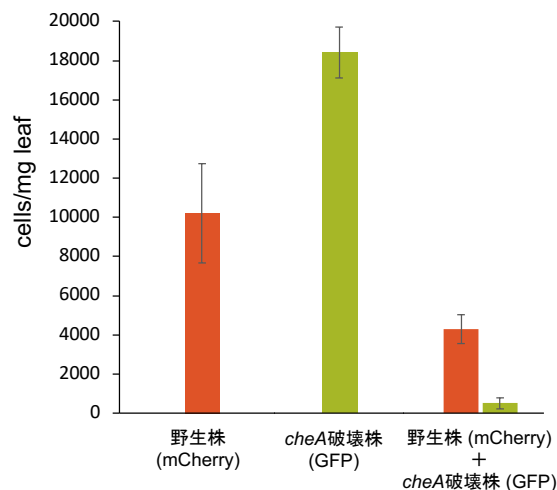


図4. 野生株と*cheA*遺伝子破壊株の葉面定着能比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tani Akio, Masuda Sachiko, Fujitani Yoshiko, Iga Toshiki, Haruna Yuuki, Kikuchi Shiho, Shuaile Wang, Lv Haoxin, Katayama Shiori, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi, Kato Junichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Metabolism-linked methylotaxis sensors responsible for plant colonization in Methylobacterium aquaticum strain 22A	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1258452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1258452	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 阪井康能、由里本博也	4. 巻 48
2. 論文標題 葉面における微生物 - 宿主植物相互作用とバイオスティミュラント機能の開発 -	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本農業学会誌	6. 最初と最後の頁 132-136
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 Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai	4. 巻 87
2. 論文標題 Interaction between C1-microorganisms and plants: contribution to the global carbon cycle and microbial survival strategies in the phyllosphere	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac176	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8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 循環型C1バイオエコノミーで活用するメチロトロフの代謝生理機能
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2023年度大会シンポジウム「炭素循環社会の実現に貢献する多様な微生物とその応用」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阪井康能、由里本博也
2. 発表標題 C1微生物炭素固定反応による炭素資源利用とバイオ生産への応用
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会シンポジウム「微生物炭素固定代謝の多様性に基づく合成生物学」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 植物共生メタノール資化性細菌を活用した作物増収技術の開発
3. 学会等名 微生物でみる農学研究の可能性 ~フードテック・機能性食品・グリーンプロダクツ(生物農業)で成長産業に挑む~ (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuyoshi Sakai, Kosuke Shiraishi, Hiroya Yurimoto
2. 発表標題 Distribution and survival strategy of methylotrophs in the phyllosphere
3. 学会等名 Phyllosphere 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由里本博也
2. 発表標題 メチロトロフ細菌由来バイオポリマーによる稲作収量の向上
3. 学会等名 C1ケムバイオエコノミーシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪井康能、由里本博也
2. 発表標題 葉圏C1微生物の生理・生態から明らかになる新たな炭素循環像とバイオスティミュラントとしての機能開発
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加地奏絵、片山志織、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 Methylobacterium sp. 0R01株のメタノール走化性に関わる CheA タンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山志織、加地奏絵、由里本博也、阪井康能
2. 発表標題 Methylobacterium sp. 0R01 株のアカシソ上での優占化におけるべん毛の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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