

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02870

研究課題名(和文) in vitroとin naturaから理解するC1微生物葉上環境の生存戦略機構

研究課題名(英文) Understanding survival strategy of C1-microorganisms in the phyllosphere from in vitro and in natura experiments

研究代表者

阪井 康能 (SAKAI, Yasuyoshi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：60202082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育するメタノール資化性微生物(C1酵母・C1細菌)の葉上環境における生存戦略機構を明らかにすることを目的とした。従来のin vitro実験のみならず、自然環境(in natura)もしくはin naturaを模した環境適応実験を行い、C1酵母ではメタノールにより調節される細胞内制御機構を、C1細菌では宿主植物への種特異的優占化機構と変動する環境要因への応答機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C1酵母では、メタノール誘導制御機構やペキソファジー制御機構の解析から、メタノール濃度が日周変動する葉面環境での生存戦略として、メタノール濃度に応答したペルオキシソーム合成と分解の制御機構を明らかにした。C1細菌では、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて優占化過程を追跡することに成功するとともに、培養温度シフトや光応答時における時計遺伝子ホモログKaiCの生理機能に関する遺伝学的および生化学的特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Methylotrophic yeasts and bacteria, that can utilize methanol as the sole source of carbon and energy, colonize the plant leaf surface (phyllosphere). The aim of this study was to elucidate the mechanism for survival strategy of C1-microorganisms in the phyllosphere. We set up experimental conditions not only in vitro but also in natura, and investigated molecular mechanisms for methanol-induced gene expression and regulation of peroxisome biogenesis and degradation in response to methanol concentration. On the other hand, we successfully tracked dominant colonization of methylotrophic bacteria in the phyllosphere by using the fluorescent microscopy and flow cytometry. Genetic and biochemical properties of the clock gene homolog KaiC upon temperature or light change were also investigated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：C1微生物 C1酵母 C1細菌 メタノール誘導 脱抑制 ペルオキシソーム ペキソファジー

1. 研究開始当初の背景

天然ガス由来の化合物で食糧と競合しない安価なメタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育するメタノール資化性微生物 (C1 微生物) は、メタノールを原料にしたシングルセルプロテイン (SCP)、異種遺伝子発現、バイオプラスチック、キノコなど、有用物質生産菌として産業利用されてきた。一方、今世紀になって我々を含む国内外の研究グループにより、メタノール資化性細菌 (C1) 細菌が葉面などの植物地上部で優占化し植物成長促進効果をもたらすこと、我々によりメタノール資化性酵母 (C1 酵母) の植物葉上での増殖が見いだされ、葉面では光や温度などの環境因子のみならず、C1 微生物にとって葉上での主要な炭素源であるメタノールも昼夜で日周変動することが明らかにされた (PLoS One, 6:e25257, 2011)。しかし、このような葉面環境に適応するために C1 酵母や C1 細菌がもつ生存戦略機構については、未解明な点が多い。

メタノール濃度が日周変動する葉面環境において、C1 酵母は、メタノール代謝に必要な酵素群およびペルオキシソームの合成と分解を制御する必要がある。我々はこれまでに、メタノール誘導性プロモーターの誘導特性、*cis* 領域の同定、メタノール誘導性遺伝子の制御に関わる複数の転写因子、メタノール感知に関わる最上流分子として細胞表面センサー Wsc ファミリータンパク質 (Mol Microbiol, 104:349, 2017) の同定に成功した。これら各転写因子欠損株表現型の *in vitro* 実験結果を統合し、グルコース枯渇時の脱抑制とメタノール誘導によるメタノール誘導性遺伝子発現の 2 段階活性化モデルを提唱するに至っている (Curr Issues Mol Biol, 33:197, 2019)。また、葉面における C1 酵母の生存戦略機構としてのオートファジーの重要性については、ペルオキシソーム特異的オートファジー (ペキソファジー) や、窒素源利用に関わる酵素の選択的分解経路 (Cvt 経路) の関与を明らかにしてきた (PLoS One, 6:e25257, 2011; Sci Rep, 5:9719, 2015)。しかし、C1 酵母細胞がメタノール濃度情報をどのようにシグナル伝達し、ペルオキシソームの合成と分解を制御しているのかは不明であった。

一方 C1 細菌に関しては、我々はシアノバクテリア時計遺伝子 KaiC タンパク質ホモログが、C1 細菌 *Methylobacterium (Methylobacterium) extorquens* AM1 において種子から葉面への定着に重要であることを示すとともに、温度依存性 UV 抵抗性を制御していることを見だし (Environ Microbiol Rep, 10:634, 2018)、KaiC が温度・光など、複数の環境因子からの input を統合して様々な環境応答 output を制御しているキー分子であると想定した。

2. 研究の目的

本研究では、C1 酵母では、従来用いられてきた *in vitro* 実験 (グルコース培地からメタノール培地への培地シフトなど) のみならず、葉面環境 (*in natura*) もしくは *in natura* を模した環境適応実験を行い、メタノール濃度の増減に適応する生存戦略としてのメタノール誘導性遺伝子発現とペキソファジーの分子制御機構を明らかにすることを目的とした。一方、C1 細菌では、宿主植物への定着と種特異的優占化機構と C1 細菌時計遺伝子ホモログ KaiC の機能発現機構について解明し、C1 微生物の葉上環境における生存戦略機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メタノールにより調節される細胞内制御機構

メタノール誘導制御遺伝子発現の分子機構

in natura におけるメタノール日周変動を参考にした *in vitro* 実験系を用い、C1 酵母の各種転写因子破壊株をグルコース培地から様々な濃度のメタノール培地へシフトしてメタノール誘導性遺伝子の発現レベルを解析し、脱抑制およびメタノール濃度に応答する誘導に関わる因子の同定とその生理機能解析を行った。

ペキソファジー制御機構

メタノール濃度減少に伴うペキソファジーの制御機構など、これまで明らかにされてこなかったメタノール減少期における細胞適応とその分子機構を解析するため、Wsc ファミリータンパク質や下流の転写制御因子の遺伝子破壊株、シグナル伝達因子の活性型変異体発現株を構築し、ペルオキシソームタンパク質の分解やペキソファジーにおけるレセプター Atg30 のリン酸化動態を解析した。

(2) C1 細菌の種特異的優占化機構と生存戦略機構

植物葉面への優占化度の異なる *Methylobacterium* 属細菌を異なる蛍光タンパク質で標識し、アカシソ葉上での優占化プロセスやメタノール含有平板培地での増殖過程を蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて追跡した。さらに、KaiC タンパク質ホモログについて、様々な培養条件への適応時のタンパク質量やリン酸化動態の解析を進めた。

4. 研究成果

(1) メタノールにより調節される細胞内制御機構

メタノール誘導制御遺伝子発現の分子機構

C1 酵母のメタノール誘導性遺伝子の2段階活性化モデルにおいて、炭素源の無いときに起こる遺伝子発現（脱抑制）は、*in natura*では新たな炭素源探索のための遺伝子発現として捉えることができる。グルコース枯渇条件でのメタノール誘導性遺伝子発現レベルを定量 PCR やメタノールセンサー酵母によるフローサイトメトリー解析により精査し、真核生物において高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼがグルコース脱抑制の段階で重要な役割を果たすことがわかった。さらに、このキナーゼ複合体の構成因子について、遺伝子破壊株を構築してメタノール誘導性遺伝子発現における機能解析を進めた。これらの結果は、葉面における炭素源枯渇を模した実験条件の確立だけでなく、メタノール酵母のメタノール誘導制御機構の解明への基盤的知見となった。また、メタノール濃度に応答したメタノール誘導性遺伝子発現において重要な働きをもつ転写因子を同定し、Wsc ファミリータンパク質の下流のシグナル因子の関与について解析した。

ペキシファジー制御機構

炭素源変動環境での細胞適応とその分子機構についての解析を進め、メタノール濃度減少に伴うペキシファジーの制御機構に、メタノール感知に関わる Wsc1 とその下流の MAPK カスケードが関与することを明らかにした (J Cell Sci 134:jcs254714, 2021)。メタノール培養時のペキシファジーについて、ペルオキシソームタンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質の分解を指標に追跡したところ、Wsc1 破壊株では野生株よりも早い段階でペキシファジーが誘導されていた。さらに下流のシグナル伝達因子について遺伝子破壊株や MAP キナーゼ Mpk1 の活性型変異体発現株を用いた解析から、Wsc1 からのメタノールシグナルは、Rom2 から Mpk1 を経由し、その下流の転写因子 Rlm1 へと伝わり、Rlm1 により活性化される2種のプロテインホスファターゼ Ptp2A と Msg5 を介して Atg30 のリン酸化を抑制することで、ペキシファジーを負に制御していることがわかった (図 1)。以上から、葉面における増殖と生存に必要であるメタノール濃度の日周変動により調節されるペルオキシソーム合成と分解の制御機構を明らかにした (Front Plant Sci 13:867486, 2022; Front Cell Dev Biol 10:887806, 2022)。

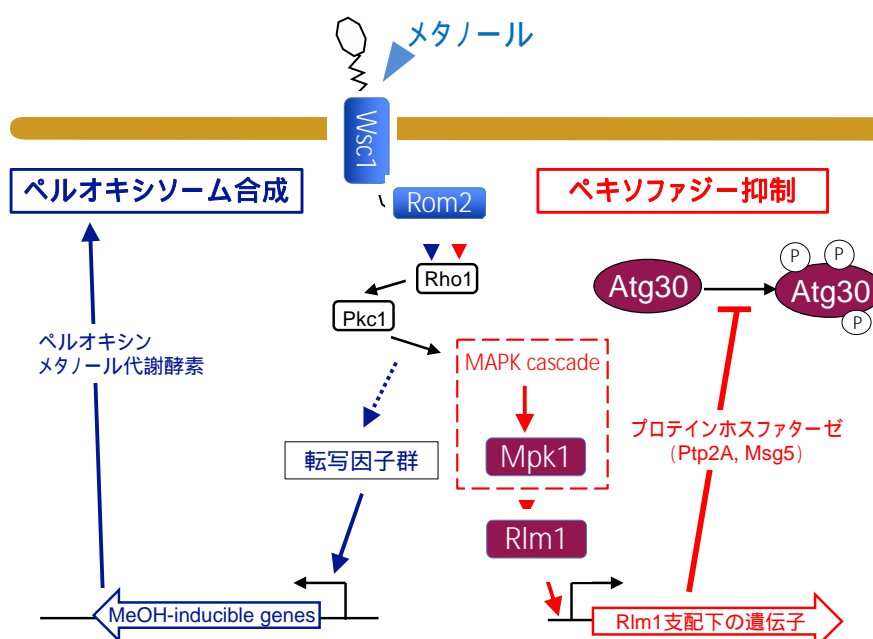


図 1. ペルオキシソーム合成とペキシファジー抑制に関わるメタノールシグナル経路

(2) C1 細菌の種特異的優占化機構と生存戦略機構

植物種子や葉面に接種した C1 細菌の葉面での分布動態を、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて解析する手法を確立し、アカシソに強い定着能を示す *Methylobacterium* sp. OR01 株のアカシソへの優占化過程の追跡に成功した。

一方、時計遺伝子 KaiC タンパク質ホモログについては、高温から常温あるいは低温への培養温度シフト時のリン酸化動態の解析、Kai タンパク質複合体の遺伝学および生化学的解析を進めるとともに、C1 細菌の光応答とその *kai* 遺伝子発現制御への影響について解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ohsawa Shin, Inoue Koichi, Isoda Takahiro, Oku Masahide, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Methanol sensor Wsc1 and MAP kinase suppress degradation of methanol-induced peroxisomes in methylotrophic yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs.254714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.254714	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 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 Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Methylotrophic Yeasts: Current Understanding of Their C1-Metabolism and its Regulation by Sensing Methanol for Survival on Plant Leaves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21775/cimb.033.197	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 Shinobu, Tsutsumi Noriko, Terui Yuji, Kong XiangYu, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Engineering the expression system for Komagataella phaffii (Pichia pastoris): an attempt to develop a methanol-free expression system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 foz059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsyr/foz059	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	4. 巻 91
2. 論文標題 ようやく明らかになりつつあるマイクロオートファジーの多様な分子機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 634-642
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 阪井康能	4. 巻 95
2. 論文標題 メタノール資化性葉面共生菌による "C1炭素固定" と農学への展開	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 27-32
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 奥 公秀、阪井康能	4. 巻 272
2. 論文標題 マイクロオートファジー研究の課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 856-860
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, Shiraishi Kosuke, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Physiology of Methyloprophs 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 Casaroli Viviane Carnier、Orita Izumi、Katayama Shiori、Yurimoto Hiroya、Sakai Yasuyoshi、Fukui Toshiaki	4. 巻 132
2. 論文標題 Methylo-trophic bacterium-based molecular sensor for the detection of low concentrations of methanol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 247 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.05.002	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 高木 忍、由里本 博也、阪井 康能	4. 巻 99
2. 論文標題 多様な炭素源を利用するメタノール資化性酵母の遺伝子発現系	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 516 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.10_516	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 白石晃将、阪井康能	4. 巻 60
2. 論文標題 オートファジーからひも解く植物葉面微生物の生存戦略 植物のライフサイクルに伴う棲息環境の変化へ適応するために	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 2-4
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 -

1. 著者名 Shiraishi Kosuke、Sakai Yasuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Autophagy as a Survival Strategy for Eukaryotic Microbes Living in the Phyllosphere	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 867486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.867486	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 Ohsawa Shin, Oku Masahide, Yurimoto Hiroya, Sakai Yasuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Peroxisome Homeostasis by Post-Translational Modification in the Methylophilic Yeast <i>Komagataella phaffii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 887806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.887806	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 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Sakai Yasuyoshi
2. 発表標題 Methanol-induced gene expression: molecular mechanism and application
3. 学会等名 Pichia 2021 (招待講演) (国際学会)
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酵母で拓くメタノールバイオエコノミー
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会シンポジウム「酵母研究の産業利用への展開; いま「Non-conventional yeasts」が新しい」(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 阪井康能
2. 発表標題 酵母メタノール誘導性遺伝子発現の生理および分子機構と異種タンパク質生産
3. 学会等名 東北大学発酵微生物学((公財)野田産業科学研究所)寄附講座開設記念シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阪井康能
2. 発表標題 メタノール資化性葉面共生菌による 'C1炭素固定' と農学への展開
3. 学会等名 2019年度日本農学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyoshi Sakai
2. 発表標題 The role of KaiC family proteins in phyllosphere microorganisms
3. 学会等名 5th Asian Forum on Chronobiology(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Shiraiishi, Masahide Oku, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai
2. 発表標題 Role of Autophagy in Adaptation to the Phyllosphere Environment in the Methanol-Utilizing Yeast <i>Candida boidinii</i>
3. 学会等名 Phyllosphere Fortnight 2021(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Inoue, Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai
2. 発表標題 Wsc1 and MAP kinase proteins suppress pexophagy in the methylotrophic yeast <i>Komagataella phaffii</i>
3. 学会等名 International Congress on Yeasts (ICY15) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪井康能
2. 発表標題 メタン・メタノールの生物資源化とプロテイン生産
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 阪井康能
2. 発表標題 温室効果ガスの炭素循環を担うC1微生物はどのようにして葉面で生きていくのか?
3. 学会等名 大隅基礎科学創成財団第5期第1回創発セミナー「地球環境を支える植物と微生物の共生」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪井康能
2. 発表標題 農芸化学会賞受賞講演「C1微生物の生存戦略における分子・細胞基盤の解明と機能開発」
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪井康能
2. 発表標題 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：はじめに(1)炭素循環
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 279
3. 書名 Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease	

〔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
研究協力者	由里本 博也 (YURIMOTO Hiroya)		
研究協力者	白石 晃将 (SHIRAISHI Kosuke)		
研究協力者	奥 公秀 (OKU Masahide)		

6. 研究組織（つづき）

	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	小山 時隆 (OYAMA Tokitaka)		

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