

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18671

研究課題名(和文) 葉面細菌における光応答の役割と制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the light-responsive functions in the phyllosphere bacteria

研究代表者

井口 博之 (IGUCHI, Hiroyuki)

京都学園大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：30712020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：強い太陽光を浴びる植物葉上で生息する細菌(葉面細菌)の生理生態について明らかにするため、光照射下で培養した細菌の解析を行った。自然環境中の植物葉を対象にスクリーニングを行い、光に応答して黄色色素を生産する細菌を見つけた。代表的な葉面細菌であるMethylobacterium属においては、光受容体を介してストレス防御や植物定着の能力を調節していることが分かった。本属細菌はまた、ロドプシンを使って光を生体エネルギーに変換し、生育生存のために利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： This study analyzed the phyllosphere bacteria grown under light conditions, to reveal the bacterial ecology and physiology in the phyllosphere where the sun light intensely irradiates. From plant leaves in natural environments, the bacteria that produce the yellow pigments under light condition were found. In the Methylobacterium strain, it was revealed that the bacteria could modulate the abilities of stress resistances and plant colonization through the light receptor proteins. Some strains of Methylobacterium encode the rhodopsin protein. The rhodopsin was indicated to function as proton pump, thus possibly playing a role in production of biological energy from sun light for growth of the bacteria.

研究分野：応用微生物学、環境微生物学

キーワード：葉面細菌 光応答 光受容体 ロドプシン ストレス耐性 色素生産

1. 研究開始当初の背景

植物の表面や内部には多様な微生物(細菌、酵母、糸状菌)が生息し、植物の生長や健康に影響を与えている。そのような微生物には、植物の生長や免疫力を向上させる有益菌から植物を害する病原菌までである。また直接に植物に影響を与えない微生物も、栄養や生息場所を競合して病原菌・有益菌の植物定着に影響を与えることから、大事な役割を持つ。それ故に、植物上の微生物の管理は、安定的・効率的な植物栽培のために重要といえる。

微生物の生息場所として見ると、土壌に属する根圏と比べて、葉圏(植物の地上部)はいわば特殊な環境である。葉圏は空中に接しており、太陽光や風雨を受けて温度・水分量・光(紫外線)量の甚だしい変化に晒される。また、葉面細菌は、ほとんどの栄養を植物からの供給に依存する一方で、植物が生産する抗菌物質にも晒される。近年のメタゲノム解析により、このような厳しい環境にも関わらず、葉圏には Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門を主とする多様な微生物が生息することが明らかになってきている。また、しばしば *Methylobacterium* 属細菌が優占種として見つかかり、本菌は植物が放出するメタノールを利用して生育し、また植物生長促進作用を持つことが報告されている。しかし、葉圏の微生物の生理生態は根圏のそれと比べて知見が少なく、中でも、上述の葉圏特有の刺激(ストレス・シグナル)への微生物の対処能力についてはほとんど分かっていない。

光は、葉面環境および植物代謝に影響を与える主な因子である。また、微生物の生息環境の中でも、葉面は光を特に強く浴びる。光は微生物にとって、傷害・シグナル・エネルギーになりうる。しかし、これまでの微生物研究では、光合成細菌を除けば一般的に暗所で培養されるため、葉面細菌はもとより全般の微生物について、光に対する応答(表現型、制御システム)はほとんど明らかにされていない。ところが、細菌のゲノムを見ると、LOV、BLUF、Phytochrome といった光受容タンパク質が見つかるため、光を受けて何らかの応答をしていると推測できる。これまでに報告されている細菌の光受容体の機能には、運動性、バイオフィルム生産、色素生産、病原性の制御がある。これらは葉上での生存生育でも役割を持つものである。

近年では、細菌のロドプシンにも注目が集まっている。海洋細菌から見つかったロドプシンは、プロトンポンプの機能を持ち、光を生体エネルギーに変換して、自身の生育や生存に利用する。ロドプシンが生み出すエネルギーは小さいものの、海洋中は栄養が極めて乏しいため、その役割は重要と考えられている。つまり、プロトンポンプ型ロドプシンは、光を生体エネルギーに変換できる細菌のユニークなシステムである。光を受け、栄養が乏しいという点では、海洋と葉面の環境は類

似している。しかし、葉面での細菌の光エネルギー利用については知られていない。*Methylobacterium* 属細菌の一部の種のゲノム中に、ロドプシン遺伝子が存在し、プロトンポンプ型のアミノ酸配列の特徴を有しているため、本ロドプシンの葉面での機能に興味を持たれる。

2. 研究の目的

本研究では、植物葉圏での細菌の生理生態と、明所での細菌の機能発現の解明を目的とする。さらに、光を用いた細菌の制御技術の開発に資する基礎的知見も得る。

上の目的を達成するために、以下の項目を調べ明らかにする。光応答の表現型を持つ葉面細菌の環境分布と特徴 代表的な葉面細菌 *Methylobacterium* 属の明所での表現型とそれに関わる遺伝子発現制御 葉面細菌が持つロドプシンの機能と葉圏における役割。

3. 研究の方法

代表研究者がこれまでに培ってきた、葉面細菌の培養技術、遺伝子工学技術、表現型解析技術を駆使して研究を行った。光照射に際しては、白色蛍光灯(FL20SW)、青色蛍光灯(FL20SB)、緑色蛍光灯(FL20SG)、赤色蛍光灯(FL20SPk)を使用した。

(1) 光応答性の挙動を示す葉面細菌の探索

自然環境中から様々な植物の葉を採取し、滅菌したチューブに水と葉を入れ1時間ほど振とうした。溶液の一部を R2A 寒天培地に塗布し、30℃で培養した。今回、葉面細菌や貧栄養細菌の培養に適していると報告があることを理由に、R2A 培地を使用した。R2A 寒天培地に生育したコロニーを拾い、マスタープレートを作成した。光照射試験では、このプレートから取った菌を2枚の R2A 寒天培地に塗布し、白色蛍光灯と暗所の下で同時に培養した。目視により、両条件での細菌の形態・色・生育の表現型を比較した。

(2) 取得した葉面細菌の表現型解析

(1)の実験で明所/暗所の表現型の差異を認められた細菌について、詳細に表現型解析を行った。方法は(3)に含める。

(3) *Methylobacterium extorquens* の表現型解析

本菌の明所で誘導される表現型を明らかにするため、明所/暗所で比較して、以下に記す各種試験を行った。

生育

明所/暗所の液体培地での生育を調べた。

色素生産

明所/暗所の液体培養から、菌体を回収し、メタノール抽出した上清の吸光度を、分光光度計で測定した。

UV 耐性

明所/暗所の液体培養から回収した菌体

を、寒天培地に塗布し、そこにUVを照射し、生育したコロニー数から生存率を評価した。

熱耐性

明所 / 暗所の液体培養から回収した菌体を、50 で 30 分保温した。これを寒天培地に塗布し、生育したコロニー数から生存率を評価した。

過酸化水素耐性

暗所の液体培養を寒天培地に混ぜて固化し、シャーレの中央に過酸化水素を浸ませたディスク(ろ紙)をのせた。明所 / 暗所で培養し、形成した阻止円の直径を評価した。

浸透圧耐性

暗所の液体培養を、高濃度の NaCl を含んだ寒天培地にスポットし、明所 / 暗所で培養して生育度を比較した。

バイオフィーム形成

暗所の液体培養を、96-well plate に植菌して明所 / 暗所で培養した。培養液を捨て、well に付着したバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色し、エタノールで溶出した。この溶出液の 595 nm の吸光度を測定した。

植物定着能力

テトラサイクリン耐性 (Tc^r) の野生株と、カナマイシン耐性 (Km^r) の遺伝子破壊株とを等量混合した菌懸濁液に、滅菌したシロイヌナズナ種子を浸した後、この種子を MS 寒天培地に植えた。植物を人工気象器内 (明 14 h - 暗 10 h サイクル) で栽培し、生長した植物体の地上部を回収して滅菌水に懸濁した。この菌懸濁液を、Km 入り寒天培地と Tc 入り寒天培地それぞれに塗布し、生育したコロニー数の比較により、野生株 / 遺伝子破壊株の植部定着能力を評価した。

(4) *Methylobacterium aquaticum* のロドプシンの機能解析

ロドプシン遺伝子発現

明所 / 暗所の液体培養から回収した菌体から RNA を抽出・精製した。RNA を逆転写して cDNA を合成した後、定量 PCR によりロドプシン遺伝子の mRNA 量を評価した。

プロトンポンプ機能

レチナル添加培地の液体培養より回収した菌体を、測定バッファーに懸濁し、光照射の下で経時的に pH を測定した。

4. 研究成果

(1) 光応答性の挙動を示す葉面細菌の探索

まず葉面細菌を自然環境中の植物葉より採取した。2015 年度は 80 株、2016 年度は 302 株を得た。コロニー色を見ても、白、透明、黄、赤、橙、黒と非常に多様な細菌が得られた。これらを明所 (白色蛍光灯) と暗所とで比較して培養した結果、明所で色素を生産する株を各年 1 株ずつ見つけた。Kn16 株は、コリヤナギの葉から分離され、明所で黄色色素を生産し、16S rRNA 遺伝子配列より *Massilia* 属と推定された。ST22 株は、ヤマハゼの葉か

ら分離され、明所で黄色色素を生産し、*Telluria* 属と推定された。これら細菌は、Proteobacteria 門 Oxalobacteraceae 科に属し近縁である。植物根での生息も知られているが、光応答性の表現型の報告は今回が初めてである。

(2) 取得した葉面細菌の表現型解析

Kn16 株と ST22 株の黄色色素生産誘導をより詳細に解析した。各種波長の蛍光灯の下で培養した結果、青色波長で強く色素生産の誘導が認められた (図 1)。また、色素のメタノール抽出液の吸光波長を調べた結果、450 nm に極大吸収波長が見られ、本色素はカロテンあるいはその類縁化合物と推定された。

ST22 株については、明所 (青色光) / 暗所でのストレス耐性も評価した。過酸化水素耐性には差がなかったが、UV 耐性については明所培養細胞が暗所培養細胞と比べて 27% 上昇していた。カロテノイド色素は、紫外線ダメージや活性酸素に対する防御に働くとされている。今後、青色光照射による色素生産と UV 耐性上昇との直接的な因果関係を検証していく予定である。

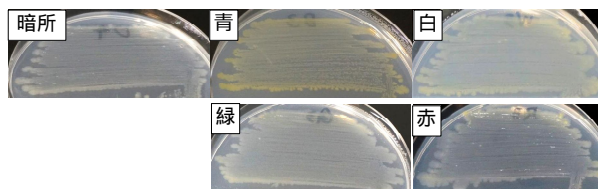


図 1. 各種蛍光灯の光照射下での ST22 株の色素生産

(3) *Methylobacterium extorquens* の表現型解析

本種の細菌は、しばしば植物葉に見つかることから、葉面細菌の代表として研究に用いた。本研究で用いる菌株は、ゲノム中に多様な光受容体遺伝子 (配列から推定; BLUF 2 個、LOV 6 個、PYP 1 個、Phytochrome 1 個) と Bacteriochlorophyll 生合成遺伝子を持つことから、多様な光応答を持つと期待される。

まず本菌の光応答性の表現型を明らかにするため、明所 (青・緑・赤の光) / 暗所で比較して各種培養試験を行った。液体培地での生育は、青色光照射下で少し上昇した (図 2)。液体培養の色素生産は、青色光照射下で上昇した。バイオフィーム形成は、逆に青色光照射下で減少した。過酸化水素耐性や NaCl 耐性は各培養条件で同等であった。一方、青色光照射下で培養した細胞は、UV 耐性と熱耐性が上昇していた。

以上まとめると、本菌は特に青色光への応答能力を有しており、その応答はストレス防御に関係していた。つまり、青色波長は紫外線に近いことから、青色光を危険シグナルとして感知し、防御に関わる遺伝子・能力を上昇させていると解釈できる。

Methylobacterium 属細菌は、水配管や家庭の水回りにバイオフィルムを形成して、汚れや詰まりの問題を起こす原因菌でもある。今回、青光によってバイオフィルム形成が抑制されたことから、本問題の対策に光を利用できる可能性も示唆された。

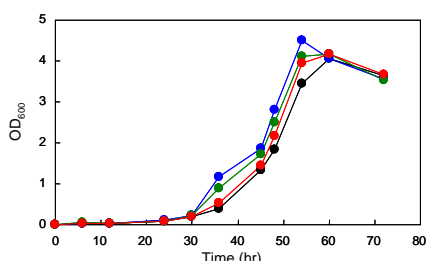


図2．各種蛍光灯の光照射下での *M. extorquens* の生育

次に、これら青色光誘導性の表現型に関わる光受容体を調べた。光受容体遺伝子の単一遺伝子破壊株（合計10株）を作製し、UV耐性とバイオフィルム形成の試験に供した。青色光によるUV耐性の誘導は、3種のLOV遺伝子破壊株で失われた。一方、青色光によるバイオフィルム形成の抑制は、いずれの遺伝子破壊株でも見られた。本結果より、複数のLOVタンパクが、UV耐性の誘導に関与していることが示唆された。バイオフィルム形成には、複数の光受容タンパクが複合的に関与するために、単一遺伝子破壊では表現型を示さなかったと考察した。

続いて、遺伝子破壊株の植物定着能を試験した。本試験では、遺伝子破壊株を野生株と競合させてシロイヌナズナに接種しており、野生株の定着能力との比を能力値とした。一部の光受容体遺伝子の破壊株について試験した結果であるが、PYP遺伝子破壊株は野生株より定着能が劣り、Phytochrome遺伝子破壊株は野生株より向上することが分かった。本結果より、光の感知は植物葉上での生育においても重要な役割を持つことが示された。

(4) *Methylobacterium aquaticum* のロドプシンの機能解析

細菌が持つロドプシンには、いくつかの機能が知られている。プロテオロドプシンやバクテリオロドプシンに代表されるH⁺ポンプの他に、Na⁺ポンプ、Cl⁻ポンプ、センサーがある。*M. aquaticum*が有するロドプシンは、H⁺ポンプに特徴的なアミノ酸配列を持つが、系統的には機能未解明のグループに属する。

まず、本菌のロドプシン遺伝子の発現を定量PCRにより確認した。明所培養、暗所培養とも転写が認められ、明所培養は暗所培養の約2倍の転写量であった。

次に、*M. aquaticum*のロドプシンのプロトンポンプとしての働きを調べた。本菌のゲノムを見ると、ロドプシンの機能に必要とされるレチナルの生合成遺伝子を欠いていた

ため、レチナルを外部添加して培養した。菌懸濁液に緑色光を照射したところ、ゆるやかなpHの減少が認められた。一方で、レチナル非添加培養については、pHは減少しなかった。本結果より、本菌のロドプシンはプロトンポンプ機能を有していることが示唆された。今後、ロドプシン遺伝子の破壊株を作製し、光照射下での本株のpH変化を調べると共に、植物上での生育を解析していく予定である。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

井口博之、葉上細菌 *Methylobacterium* 属の光応答性の挙動解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

井口博之、光受容体を介した *Methylobacterium* 属細菌の光応答の解析、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23～24日、横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市）

6．研究組織

(1) 研究代表者

井口 博之 (IGUCHI, Hiroyuki)

京都学園大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：30712020