

# 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

阪井 康 能

京都大学農学研究科 応用生命科学専攻

## 1. はじめに

従来、微生物-植物宿主間の相互作用は、根粒菌や菌根菌など、植物地下部を対象とした研究が主なものであった。葉面など、植物地上部における微生物との相互作用については、植物病原菌の感染機構と植物免疫など、負の相互作用に関する知見は多くあるが、植物地上部に棲息する微生物の正の相互作用については殆ど知られていない。近年、メタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育する *Methylobacterium* 属細菌が、広く植物葉面に優先化して棲息し、植物と相利共生関係にあることが明らかになりつつある。また、二大温室効果ガスであるメタンと CO<sub>2</sub> 間の炭素循環はメタンサイクルと呼ばれ、メタン酸化菌とともにメタノール資化性細菌も重要な役割を果たしている。ここでは、*Methylobacterium* 属細菌の植物における優先的定着と垂直伝搬、ならびに本細菌のフィールド散布による酒造好適米の増収、という 2 つの生理現象の発見を、“帰納”や“演繹”のアプローチではなく、“創発”と捉えた農・生命科学研究から、SDGs について再考したい。

## 2. 葉面 C1 微生物の普遍的な棲息と次世代植物宿主への垂直伝搬

地上における植物の葉片面の推定総面積は  $5.1 \times 10^8 \text{ km}^2$  で、ほぼ地球の総表面積  $5.1 \times 10^8 \text{ km}^2$  に相当、総陸地面積  $1.47 \times 10^8 \text{ km}^2$  の 3 倍以上にも相当し、葉両面を合わせるとその 2 倍に達する。葉面に  $10^6\text{-}10^7/\text{cm}^2$  の細菌が棲息すると仮定するとその細胞数は  $10^{26}\text{-}10^{27}$ 、その 40%が *Methylobacterium* 属や *Sphingonomas* 属などの  $\alpha$  プロテオバクテリアである。

我々は植物を単離源として、多くのメタノールやメタンなどの C1 化合物を単一の炭素・エネルギー源として利用できる C1 微生物を単離してきた。その過程でどのような植物の地上部表層にもメタノール資化性 *Methylobacterium* 属細菌が棲息していた<sup>1)</sup>。一方、メタン酸化細菌は水生植物表層に多く棲息し、そのメタン消費量は陸上植物の約 500 倍以上にも達し、水生植物が重要なメタンシンクであることを見いだした<sup>2)</sup>。

*Methylobacterium* 属細菌はメタノール平板培地上でピンク色のコロニーを形成し、メタノール以外のコハク酸などを炭素源として利用できることから pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM)とも称される。多くの PPFM が植物より単離されてきたが、PPFM の種レベルでその宿主特異性について検討されたことはなかった。我々は、その環境がほぼ同等と考えられる約 100 m<sup>2</sup> の家庭菜園内で育てた各種の野菜から PPFM を単離し、LC-MS/MS を用いて同定、分類したところ、単離数と定着能に関し、野菜によって PPFM の種特異性が認められた<sup>1)</sup>。特にアカシソから単離した *Methylobacterium fujisawaense* の最近縁種 *Methylobacterium* sp. OR01 株のアカシソにおける定着能と優先性が高いことを見いだした<sup>1,3)</sup>。

*Methylobacterium extorquense* AM1 株は、最初のメタノール資化性細菌として報告されて以来、C1代謝・遺伝子の研究材料として用いられ、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* にも定着する。OR01 株と AM1 株の、それぞれに異なる抗生物質耐性 (OR01 株カナマイシン耐性; AM1 株テトラシクリン耐性) を付与した後、滅菌したアカシソ種子を両菌の懸濁液に加え 4h 放置、続いて種子を Hogland 寒天培地で約 2 週間シソを栽培して葉を採取、適切な抗生物質を含むメタノール平板培地に塗布して、両株の葉面への定着能を調べたところ、両株ともシソ葉に効率よく定着した。次に、両株 1:1 の菌体懸濁液にシソ種子を曝露して上と同様に栽培して葉への定着を調べる競合実験を行うと、シソ葉上からはカナマイシン耐性をもつ OR01 株のみが見られ、テトラシクリン耐性を示す AM1 株は検出できなかった。このように AM1 株、OR01 株ともに、アカシソの生長とともに種子から植物地上部の葉面に達して定着する能力をもち、PPFM 種間での競合は、各 PPFM 種の優先化と定着に大きく影響することがわかった<sup>3)</sup>。

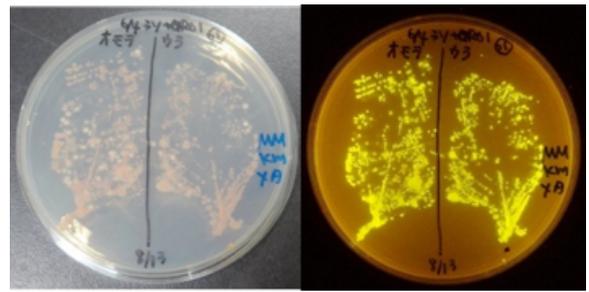


図 1 シソ種子から葉上(表・裏)に定着した *Methylobacterium* OR01 GFP-発現株

OR01 株も含め、様々な植物試料から分離した PPFM についてビタミン B 群要求性を調べたところ、植物表層に棲息している PPFM の多くがパントテン酸要求性であることを見出した<sup>4)</sup>。パントテン酸はパント酸と  $\beta$ -アラニンとの縮合反応によって生合成されるが OR01 株は  $\beta$ -アラニンを生合成できず、 $\beta$ -アラニンもしくはその前駆体により生育が回復した。*A. thaliana* 葉のパントテン酸前駆体の存在量を測定したところ、パントテン酸前駆体の中では  $\beta$ -アラニンが最も多く存在したことから、パントテン酸要求性株 PPFM は、主に葉面の  $\beta$ -アラニンを利用して棲息すると考えられる<sup>4)</sup>。

シソの場合と同様にパントテン酸要求性 OR01 株と非要求性 AM1 株の両株を *A. thaliana* 種子に混合接種し競合実験を行ったところ、パントテン酸およびその前駆体を含まない培地で 2 週間栽培した *A. thaliana* 葉においても OR01 株の優先的な定着が確認できた。このようにパントテン酸要求性 PPFM が葉面で優占化する理由として、パントテン酸要求性株である PPFM はパントテン酸合成前駆体を植物から獲得することでパントテン酸生合成に必要なエネルギーコストを節約し、環境適応能を向上させていると考えられる。葉面で棲息するパントテン酸要求性 PPFM は、パントテン酸生合成に必要な化合物を植物葉面から獲得しており、ヒトと腸内細菌の関係と同様、宿主がもたらす栄養環境とそこに棲息する葉面微生物生理の密接な関係は、これらの共進化にも大きな影響を与えてきたと考えられる<sup>4)</sup>。

我々の結果は、「PPFM は宿主特異性よりは、地理的影響、環境因子の影響が強く受ける水平伝搬により植物に広く定着する」とする Vorholt らの報告<sup>5, 6)</sup>と相反するものである。現在、GFP を発現する OR01 株を用いた解析により、種子から葉面、さらに花、種子へと OR01 株が定着、植物の世代を超えて垂直伝搬により次世代植物にも継承されることがわかりつつある (図 1 ; 未発表)。

### 3. 植物葉上環境におけるメタノールの日周変動と微生物の環境適応

メタノール資化性微生物は、メタノールを単一の炭素源とした集積培養を行うことにより容易に単離できる。長年、植物細胞壁ペクチンのメチルエステル基が加水分解して生成するメタノールが自然界におけるメタノールの主な発生源であり、炭素循環において、メタノール資化性微生物は、(死

んだ植物)バイオマスの分解者としての役割が主であると考えられてきた。

一方、生きた植物上に PPFM が棲息し、その宿主との相互作用について研究が進化したのは今世紀になってからで、ようやくメタノール資化性微生物が、葉上でメタノールを炭素源として棲息していることが明らかとなった。我々は細菌のみならず、メタノール資化性酵母も、*A. thaliana* 葉上でメタノールを主な炭素源として 7-10 日で 3-4 回の細胞分裂により増殖することを見いだしている<sup>7)</sup>。

通常の方法で、植物葉など、固体表面におけるメタノール濃度を直接、計測することは難しい。我々は、メタノール資化性酵母のメタノール誘導性プロモーターの支配下に蛍光タンパク質を発現させることで、近傍の局所的メタノール濃度を可視化できるメタノールセンサー酵母細胞を構築した<sup>7,8)</sup>。このメタノールセンサー細胞を、*A. thaliana* 葉上にスポットし、4h 後の蛍光強度を、蛍光顕微鏡より取得した画像デジタルデータの統計解析により、葉上メタノール濃度を推定することができる。*A. thaliana* は、16h 明期、8 h 暗期のサイクルで人工気象器内で栽培した。興味深いことに、生長中の若い葉のメタノール濃度は、昼夜で大きく日周変動し、夜間にメタノール濃度は約 30 mM と高く、朝方から昼にかけては殆ど検出できないレベルまで低くなった<sup>7)</sup>。このような、葉上におけるメタノール変動について植物における生理学的意義は不明である。植物細胞壁の構成成分であるペクチンは多くのメチルエステル基を持ち、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)により加水分解されるとカルボキシ基が生じ、Ca<sup>2+</sup> の保持と細胞壁の堅さに関係すると言われている。植物表層メタノールの変動は植物 PME による細胞壁ペクチンのメチルエステル化度合いの調節を反映しているのかもしれない。森林圏の大気中のメタノール濃度を計測すると、我々の結果とは逆に、昼間に大気中濃度が高く、夜間は低い。細胞センサーによって計測しているのは“葉表面”で、大気化学では“大気中”メタノールである。夜間、葉の気孔は閉じ、明期は開く。植物表層メタノールは、夜は植物葉の内部に閉じ込められ、葉面表層濃度は高くなるが、朝は気孔が開いてメタノールが放出される。細胞センサーにより得られた結果と大気化学からの結果との齟齬は、このことが原因かもしれない。

メタノール資化性酵母と同様、PPFM はメタノールに応答した誘導性遺伝子発現を示す。植物地上部に生存するメタノール資化性微生物にとって、昼夜繰り返されるメタノール濃度の変動、それに適応する“メタノール誘導性”は、葉上という栄養源が限られた環境において、共進化により生み出された生存戦略であると考えられる。メタノール資化性微生物が、メタノール濃度に応じて遺伝子発現することは古くより知られていたが、「植物葉上のメタノールの日周変動に適応するためである」というメタノール資化性微生物にとっての生理的意義が、今回、初めて明らかとなった<sup>7)</sup>。

植物地下部とは異なり、葉上に棲息する PPFM は、メタノール濃度のみならず、光・温度など、日周性環境要因の影響を強く受ける。シアノバクテリアで概日性遺伝子として知られている *kaiC* のホモログをコードする遺伝子 *kaiC1* および *kaiC2* を AM1 株ゲノムに見いだした<sup>9)</sup>。*kaiC1/kaiC2* 二重遺伝子破壊株の *A. thaliana* 葉上への定着率が野生株よりも減少しており、これら *kaiC* ホモログが *A. thaliana* 葉面での定着に寄与していた。*KaiC1* および *KaiC2* タンパク質の細胞レベルでの生理機能を解析した結果、環境温度により *KaiC* タンパク質のリン酸化と発現量が調節されており、生育温度に依存して UV 抵抗性を制御していた<sup>9)</sup>。

#### 4. 生長調整剤としての PPFM 葉面散布による酒造好適米の収量増加

日本酒輸出量の急激な増加により酒造好適米の需要が増しているが、酒造好適米は栽培が難しいため生産農家が減少し、2010 年代に入り供給不足である。各都道府県においても減反政策の

早期解除など、酒造好適米生産量の増産が推奨されている。我々は様々な植物試料から 100 株以上の PPFM を単離し、イネを中心にその生長に関して影響を与える PPFM の単離・同定を実験室・温室レベルの実験で進めてきた。同時にイネ品種についても PPFM による影響を受けやすいものをスクリーニングした結果、宿主として酒造好適米品種のいくつかがその候補に挙がった。2013 年から酒造企業と共同で契約農家(兵庫県多可町)でのフィールド試験を開始し、その散布法や散布時期などについて検討、現在では単離した PPFM 株に最適な基本技術を確立して、過去 4 年間にわたり 10-20%の増収に成功している。さらに本酒造好適米を用いた発酵試験も行い、醸造した日本酒の品質に問題がないことも確認した。本年度、さらに試験面積と酒造好適米品種を拡大したフィールド試験が進行中である。

### 5. 農に関わる生命現象は“創発”の宝庫：SGDs を超えた視点からのアプローチ

農に関わる生命科学研究は、コンピューターや自動車・機械など、人造物を相手にする工学研究とは異なる研究のアプローチが必要ではないだろうか。例えば、生化学による解糖系代謝の解明は、発酵という酵母の生理現象を出発点とし、分子レベルにまで解剖して素反応を解明するという“演繹”と、各酵素反応の試験管内再構成という“帰納”による実証の 2 つのアプローチにより進展した。分子生物学の台頭以降、近年では合成生物学など、分子という部品の組み立てによる帰納的なアプローチが脚光を浴び、演繹的アプローチは減少傾向にある。また“Sustainable Development Goals (SDGs)”はその名の通り目標が明確に設定されている。プロジェクト目標に向かって帰納的に設計されたシステム の構築による農・生命科学研究は、合理的な説明がしやすく、多大な研究費が投入されており、帰納的アプローチの研究を助長している。

農・生命科学研究は、DNA・タンパク質などの分子に始まる“帰納”と、農に関わる生命現象・表現型を起点とする“演繹”を繰り返しながら発展してきた(図 2)。“創発”は、20 世紀初頭に米国・哲学者 C.S.Pierce により「予測・計画・意図を超える科学にとって最も本質的な知の営み」として“帰納”と“演繹”に並列する概念として提唱された。例えば、数学のポアンカレ予想は、彼にとっては“帰納”あるいは“演繹”に依拠するものではなく突然に降ってわいたものであり、その後多くの数学者が“帰納”と“演繹”によりその証明が試みられることになる。「生命現象は創発の塊である」と言われるとおり、未だに“帰納”と“演繹”により説明できない現象が山ほどある。

科学を、基礎研究と応用研究とに分け、基礎から応用に向けた研究展開と方向性が一般的である。これは(工学である)核兵器開発の後の科学政策について第二次世界大戦中、V. Bush (MIT 副学長)が当時の米国大統領 F. Roosevelt に提言したことに始まるもので、農・生命科学研究においてこれに捕らわれることは危険であろう。(ボーア型)基礎科学研究と(エジソン型)応用科学研究は、1次元のベクトル上にあるのではなく、むしろこれらを座標軸で表したとき、X 軸と Y 軸の両値の高いところにあるパズル型研究が農・生命科学研究の目指すところではないだろうか？ここ

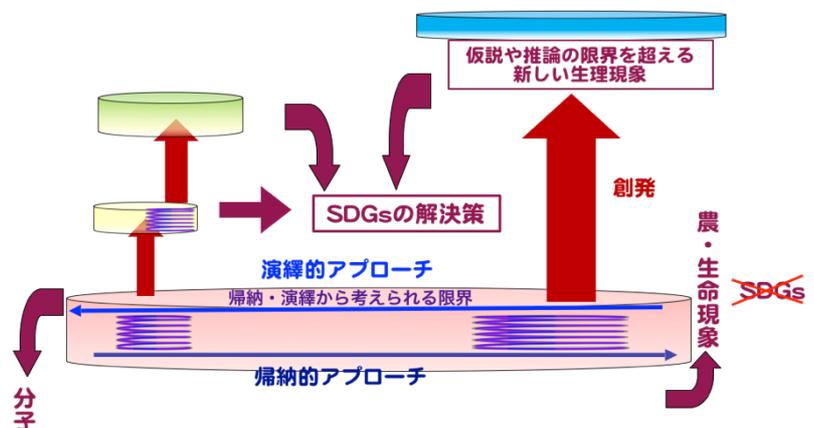


図 2 農・生命科学における“創発”から SDGs の解決策を考える

で紹介した「PPFM の植物葉面における棲息・定着と垂直伝搬」と「フィールド散布による酒造好適米の増収」は、分子機構も含めてまったく未知のもので、小さいながらも“創発”として捉え今後の研究を進めていくことはできないだろうか？

## 6. おわりに

“創発”という視点から、我々の研究に関して、SDGs 達成貢献への期待と展望、問題点について考えてみたい。

### 1) 微生物-植物間相互作用とその利用

微生物にとって、葉面を含む植物地上部は、地上部とは全く異なる環境で、光・温度・栄養源の日周変動、植物光合成、代謝物の影響がある。このような植物葉面環境を理解し、微生物とその宿主である植物について、個々の生理学研究を深め理解する必要がある。このような生物間相互作用研究を、農業上有効な微生物と、多様な作物を対象にすることで、新たな微生物生長調整剤の開発、育種・栽培法が生み出される可能性が高い。植物葉面菌を他の生長調節剤とともに、上空からドローンやヘリコプターにより散布する方法は、その作用点も植物地上部であり、作物が育ち土壌に調製剤が到達しにくくなった状況でも可能で、散布量や時期が、容易に制御できる新しい手段である。対象とする作物から採取した微生物の死菌体を利用すれば、環境への影響も最小限に留めることもできるであろう。

トマトやレタスは、グリーンハウスや植物工場における試験が可能のため、生長促進に関する多くの研究があるが、穀物の収量増加、あるいはそのメカニズムに関する研究については、長い実験期間が必要なため基礎・応用研究ともに進めることが難しい。特に、「饑餓をゼロに」にするための食糧増産については、今後の粘り強い研究と実施農家の理解、フィールド試験に関する人員と資金の確保と長期間の研究継続が必要である。

### 2) 植物-微生物共生系による新しい炭素循環サイクルと炭素・エネルギー資源問題

葉面におけるメタノール資化性菌の棲息は、バイオマスである植物から大量に大気中に放出されているメタノールの一部を、微生物が炭素源として捕捉して利用する (C1 炭素固定)。メタノール資化性菌による C1 炭素固定は、CO<sub>2</sub> よりエネルギーレベルの高いホルムアルデヒドが固定されるため、光合成とは異なりエネルギーは不要である。

従来、メタン酸化菌、メタノール資化性菌などの C1 微生物により駆動されている 2 大温室効果ガス間のメタンサイクルとグローバルな CO<sub>2</sub> 循環サイクルとは互いに独立して考えられてきた。メタノールやメタンの植物表層からの放出と植物表層における C1 微生物の普遍的な棲息は、メタンサイクルとグローバルな CO<sub>2</sub> 循環サイクルが共役していることを示している (図 3)。

葉面など、メタンとメタノールが共存する環境では、メタノールは、メタン資化性菌のメタン酸化酵素を阻害する。植物表層では、メタノール資化性細菌がメタノールを消費することにより初めてメタ

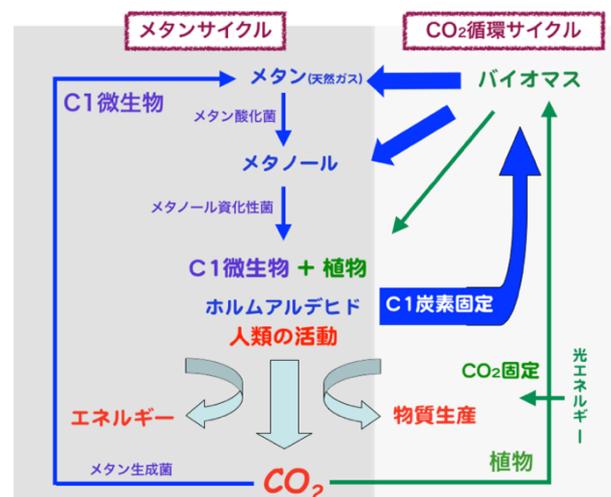


図 3 CO<sub>2</sub>循環サイクルと共役するメタンサイクル

ン資化性細菌はメタン酸化を行うことができるので、メタン削減にはメタノール資化性菌も重要な役割を担っている。メタン削減のためメタン資化性細菌を散布するのであればメタノール資化性菌の併用が必要である。

メタノールは天然ガスの主成分であるメタンから生産されて比較的安価な微生物炭素源である。BT 剤など、微生物製剤を産業化する場合、微生物の培養・生産コストが高い障壁となる。PPFM は、1970 年代 single cell protein 生産が工業スケールで検討され、メタノールを単一の炭素資源とした高密度培養ならびに連続培養が可能で、産業微生物の中でも突出した菌体生産性 (220 g dry cell weight/liter)を示す。PPFM 生長調整剤の生産を天然ガス由来のメタノールを原料として行うことで、従来、光エネルギーに頼っていた CO<sub>2</sub> 固定に加え、バイオマスへ C1 炭素固定することにより、天然ガスであるメタン由来の炭素原子をバイオマスとして保留するとともに、穀物の収量増加による CO<sub>2</sub> 削減にも寄与し、全く新しい形でのバイオマス炭素資源の確保と貯蔵が可能となる。天然ガスは、主にその燃焼によりエネルギー資源として利用されてきたが、このような“メタノール・バイオエコノミー”の確立による天然ガス資源のバイオマス化は、食糧生産性の向上、温室効果ガスの削減にもつながるであろう。

今回、“SDGs を超える”という趣旨での講演依頼を機に、どのようにこの問題を私自身が捉えていくか、再考する機会を得ることができた。私の研究嗜好もあるが、最初からゴールとして SDGs を目指すという論理性・合理性の高い研究を進めるより、まずは自分自身による“発見”についてアカデミアの立場で研究を進めることを第一とし、研究がある程度進んでから基礎・応用の区別なく、その時に何ができるか、さらに自分達にしかできない独創的な研究、その時になさねばならない研究を優先してきたつもりである。アカデミアでは SDGs には目を配り、大いに参考にはするが、過剰にとらわれすぎず、独創性の高い独自の農・生命科学研究をまずは進めることが肝要ではないかと、改めて感じている。

#### 参考・引用文献

- 1) Mizuno, M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 578-80 (2012).
- 2) Yoshida, N. *et al.*, *Front. Microbiol.* **5**: 30 (2014).
- 3) Mizuno, M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 1533-1538 (2013).
- 4) Yoshida, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**: 569-577 (2019).
- 5) Knief, C. *et al.*, *ISME J.* **4**: 719-728 (2010).
- 6) Vorholt, J.A. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 828-840 (2012).
- 7) Kawaguchi, K. *et al.*, *PloS ONE* **6**: e25257 (2011).
- 8) Takeya, T. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**: 7017-7027 (2018).
- 9) Iguchi, H. *et al.*, *Environ. Microbiol. Rep.* **10**: 634-643 (2018).