

タバコ特化代謝産物を介した植物細菌叢相互作用に関する研究

島崎 智久

2021 年

序論

植物の根においては、多種多様な根圏細菌からなる根細菌叢が形成される。植物根細菌叢を形成する細菌種の構成は、上位分類ではどの植物種においても高く保存されている一方で、下位分類では植物種ごとに異なることから、個々の植物種がその進化の過程で自身の生育に適した根細菌叢を形成してきたと考えられる。

この植物種特異的な細菌叢の形成に関与する植物側の因子として、植物特化代謝産物が挙げられる。植物の特化代謝産物は、生存に必須ではないが、様々な環境へ適応するために植物がその生産能を獲得した代謝産物と定義され、捕食者や病原菌、強光や乾燥などの生物学的および非生物学的なストレスに対する化学防御物質として多様な生理的役割を担う。近年、特化代謝産物の生合成遺伝子を欠損させた変異体植物において、野生株とは異なる細菌叢が形成されることが明らかとなり、植物特化代謝産物が根細菌叢形成に深く関与することが示された。しかし、植物特化代謝産物に対する根細菌叢の応答や、植物と根細菌叢との相互作用に関与する細菌側の遺伝子に関しては依然多くが未解明である。さらに、単一植物種において生産される複数の特化代謝産物が、植物種特異的な根細菌叢の形成にどのように関与するかについても明らかではない。そこで本研究では、ナス科植物のタバコ (*Nicotiana tabacum*) が生産する、化学的性質や生合成経路の異なる2つの特化代謝産物(サントパインおよびニコチン) に注目し、これら代謝産物のタバコ根特異的な細菌叢形成における機能と、タバコとの相互作用に関与する細菌遺伝子機能を明らかにすることを目的とした。

第1章 タバコ特化代謝産物に応答する細菌種の探索と単離

タバコ根細菌叢形成に対するサントパインおよびニコチンの影響を明らかにすることを目的として、16S rRNA アンプリコンシーケンスによりポット栽培したタバコ根の細菌叢と、特化代謝産物標品を添加した土壌の細菌叢とを比較解析した。各処理区間の細菌叢構造を比較したところ、タバコ根内ではバルク土壌と比べ、特徴的な細菌叢が形成された。また、代謝産物添加土壌においては、添加濃度依存的にタバコ根内に近い細菌叢が形成されることが明らかになった。この細菌叢の変化に寄与する細菌種を明らかにするため、タバコ根および代謝物添加土壌において相対存在量が有意に増加した細菌種を調べたところ、全ての処理区に共通して増加する細菌種として、放線菌目に属する *Arthrobacter* 属細菌

菌を見出した (図 1)。 サントパインおよびニコチンのどちらも生産しない植物種 (ダイズ、トマト、ゴーヤ) の根内では *Arthrobacter* 属細菌の増加が認められなかったことから、タバコ根特異的な *Arthrobacter* 属細菌の増加に、これら 2 つの特化代謝産物が関与することが示唆された。

より詳細な *Arthrobacter* 属細菌の解析を進めるため、タバコ根および代謝物添加土壌から *Arthrobacter* 属細菌の単離を行った。各処理区から単離された *Arthrobacter* 属細菌の中から選択した 54 菌株を用いて 16S rRNA 遺伝子全長配列に基づく系統解析を行ったところ、代謝物添加土壌からは多系統の

Arthrobacter 属細菌が単離された一方、タバコ根由来の単離株はほぼ単一の系統で構成されていることが明らかになった。このことから、単一の代謝産物ではなく複合的な要因により、タバコ根に特徴的な *Arthrobacter* 属細菌が誘引されることが示唆された。

第 2 章 比較ゲノムによるタバコ由来 *Arthrobacter* 属細菌の特性解析

第 1 章において、タバコ根とタバコ特化代謝産物添加土壌から単離された *Arthrobacter* 属細菌が系統的に異なることから、タバコ根内に生息する *Arthrobacter* 属細菌には特徴的な機能がある可能性が示唆された。そこで、単離菌株の全ゲノム解析、およびそれらを用いた比較ゲノムによる *Arthrobacter* 属細菌の特性解析を行った。タバコ根および代謝物添加土壌由来の *Arthrobacter* 単離株のうち 20 菌株の全ゲノム解析を行ない、これらに公共データベースから取得した 79 菌株の *Arthrobacter* 属細菌ゲノムデータを加えた 99 菌株の *Arthrobacter* pan-genome を構築した。全ゲノムデータを用いた系統解析では、*Arthrobacter* 属細菌が適応環境の異なる 3 つの亜系統に種分化しており、そのうち亜系統 A および B が植物や土壌環境に適応したゲノム特性を有していることが示唆された。遺伝子機能プロファイルの比較では、3 つの亜系統がゲノムレベルで分化していることが明らかとなった。中でも亜系統 A および B は植物内生菌に特徴的な機能遺伝子を有していたことから、植物環境への適応が *Arthrobacter* 属細菌の系統分化に影響を与えたことが推察された。また、タバコ根由来の単離菌が属する亜系統 A は、他の亜系統と比較して糖やアミノ酸関連遺伝子を有しており、その中にはサントパイン分解に関与する遺伝子群も含まれた。このことから、亜系統 A が根分泌物に含まれる炭素源を効率的に取り込むことで、植物根にニッチを形成したと考えられた。

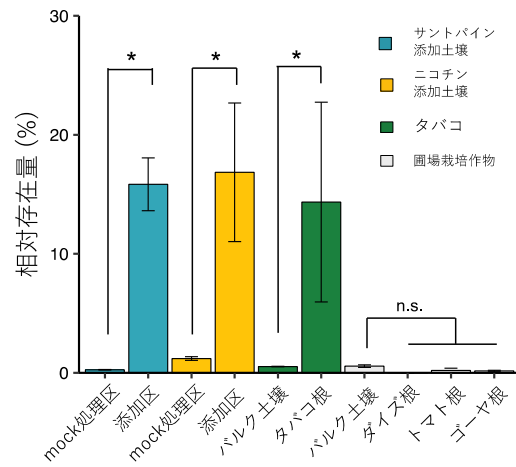


図 1. *Arthrobacter* 属細菌相対存在量 (* $P < 0.05$; negative binomial distribution)

タバコ由来の単離株は、亜系統 A 内においても単一系統を形成したことから、これらの細菌種がタバコ根への定着に寄与する別遺伝子を有することが示唆された。そこで、タバコに特徴的なニコチンを異化する遺伝子の有無を調べたところ、その系統内分布は *Arthrobacter* 属細菌の系統関係を反映せず、ニコチン類縁体が存在する環境から単離された細菌株においてのみニコチン異化遺伝子が同定された。このことから、*Arthrobacter* 属細菌がこれらの遺伝子を水平伝播により獲得したと考えられた。また、タバコ根由来の単離菌株においては、サントパインおよびニコチンの両化合物の代謝遺伝子が同定されたことから、これら 2 つの特化代謝物の代謝能がタバコ根への定着に重要な役割を担うことが示唆された。以上の結果から、タバコ根への *Arthrobacter* 属細菌の定着には、植物環境の適応に関する遺伝子群、サントパイン分解遺伝子を含む亜系統 A に特徴的な遺伝子群、ニコチン分解遺伝子群の 3 つの遺伝子セットが必要だと考えられた (図 2)。

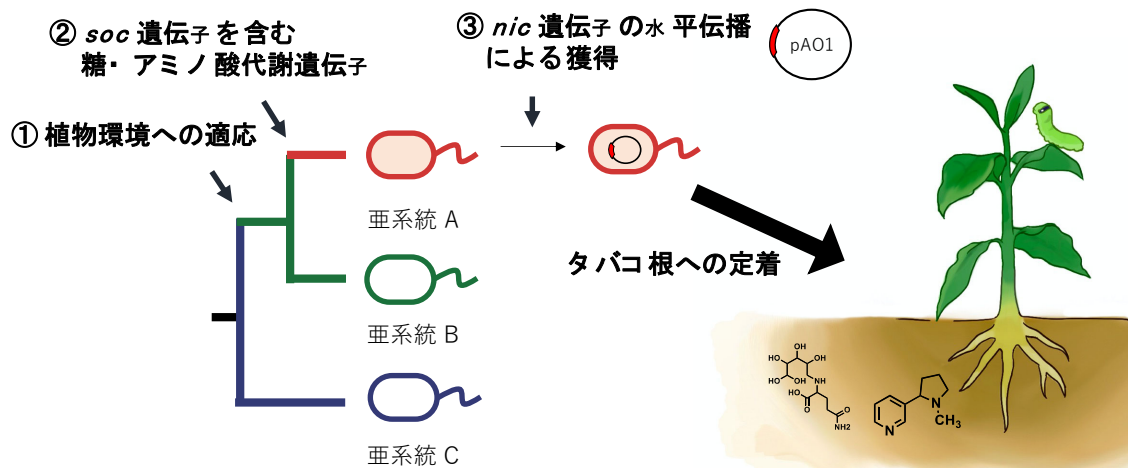


図 2. *Arthrobacter* 属細菌のタバコ根への定着に関与する遺伝子群

第 3 章 特化代謝産物を介したタバコ-*Arthrobacter* 相互作用の解析

Arthrobacter 属細菌のタバコ根への定着に対するサントパインとニコチンの複合効果を明らかにするため、両代謝産物の共添加実験を行った。代謝物添加土壌の細菌叢解析においては、これらの代謝産物の添加による *Arthrobacter* 属細菌の増加が再現された。また、共添加土壌から *Arthrobacter* 属細菌を単離したところ、その多くはタバコ根由来単離菌と近縁種であった。

そこで、タバコ根定着における *Arthrobacter* 属細菌のサントパインおよびニコチンの影響を生化学的に解析した。各単離菌株の特化代謝産物の分解試験を行ったところ、一部の細菌株で両代謝産物に対する分解活性が認められ、これらの株は全てそのゲノム上に代謝産物の分解遺伝子を有していた。そこで、タバコ根への定着により直接的に寄与すると考えられるニコチンの分解遺伝子を欠損した変異菌株を作出し、野生菌株とタバコに共接種

することで競合性を評価した。その結果、変異菌株では野生菌株と比較してタバコ根への定着性が有意に低下した。以上の結果から、タバコが生産する特徴的な特化代謝産物であるサントパインとニコチンが協奏的に根細菌叢に働きかけ、これらを分解する遺伝子を有する *Arthrobacter* 属細菌が誘引されることによって、タバコ特異的な細菌叢が形成されることが強く示唆された。

総括

本研究は、*Arthrobacter* 属の細菌種間の比較ゲノム解析により、特化代謝産物を介した植物との相互作用確立に関わる細菌側の適応進化機構に迫ったものである。この成果は、本研究領域において多用される 16S rRNA アンプリコンシーケンスの限界を提示し、ゲノムレベルでの細菌叢解析の重要性を実証したものであり、本領域における理解の深化と新しい研究展開に寄与するものと位置付けられる。

植物根細菌叢は、その宿主植物の健全な生育に及ぼす影響の大きさから、根細菌叢を制御しその機能を最大化させることで、化学肥料の使用を低減した持続的農業生産への応用が期待されている。本研究をモデルとし、今後、植物特化代謝産物に応答する細菌種、および細菌遺伝子が明らかになることで、細菌ゲノム情報から植物代謝改変による細菌叢の応答を予測し、新規な農業のあり方をデザインする植物根細菌叢の制御技術への応用が可能になると期待される。