

# 変動環境下における葉面細菌のストレス対処と増殖に関する研究

京都先端科学大学 バイオ環境学部 井口博之

## 1. 背景

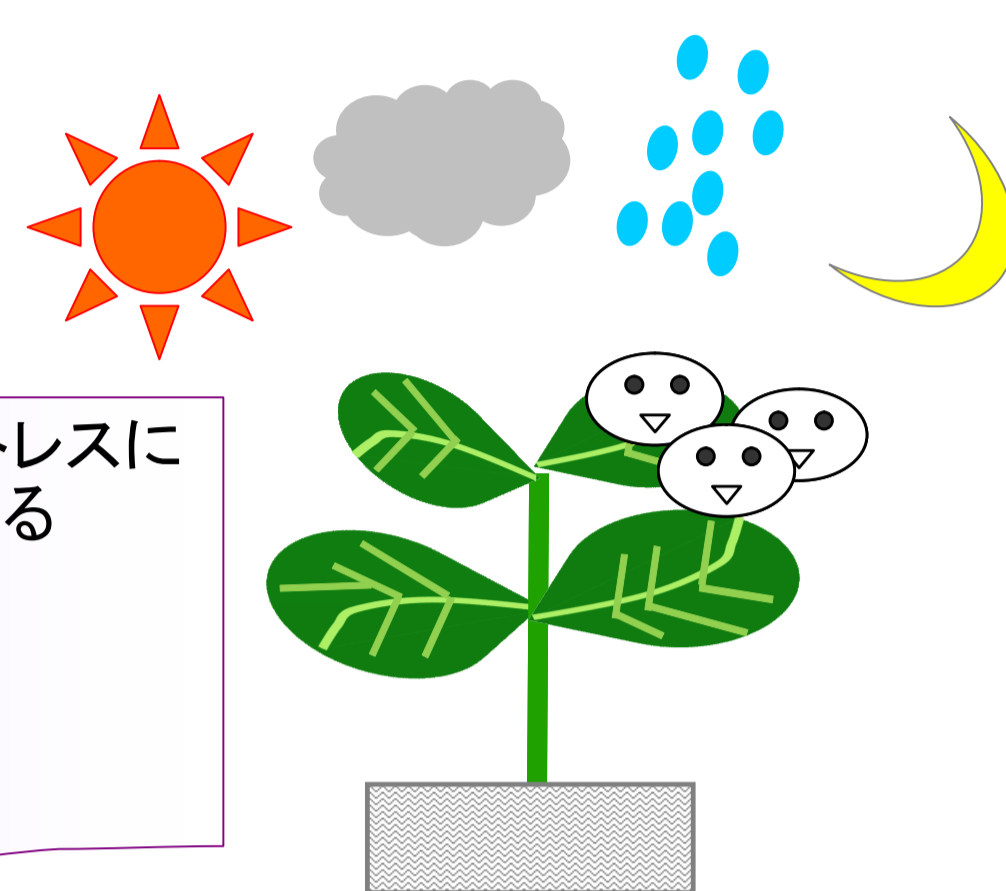
自然環境中では気象変動(陽・陰・風・雨)により、温度・光量・水分量などに関し生物の生息環境は絶えず変化している。変化は突然に起きるものもあれば、昼夜に応じてなど周期的に起きるものもある。また変化している時間も様々である。そして、植物葉面など特に表面に生息する微生物はその環境変化を即座に直接的に受け、生育に適さない環境時には細胞損傷もしていると考えられる。こういった繰返しの環境変動の下でストレス防御や細胞修復に追われる中、微生物はいかに増殖しているのか不明である。

*Methylobacterium*属細菌(近年の再分類により別属になった*Methylorubrum*属も含む)は、ピンク色をした通性メチロトロフ細菌で、植物葉面の主要な細菌である。基準株の文献情報によると、本属細菌は30°C程度が生育至適温度で、37°Cでは生育不可のものがある。37°Cといえば夏期には達する一般環境の温度であり、熱ストレス試験に用いられるいわゆる高温ではない。そこで本研究では、変動環境下での生理状態や変動環境への適応機構を明らかにするため、30°C/37°Cの間で周期的に変化させる温度変動環境の下で本属細菌の培養を行い、増殖・生理状態・転写・遺伝子機能などについて解析を行った。

太陽(昼)がもたらす変化は様々なストレスにつながり、曇・雨・夜はそれらを緩和する

- 温度 ↑
- 水分量 ↓
- 光(UV) ↑
- 植物の光合成 ↑

太陽光がもたらす変化



## 2. *Methylobacterium*属細菌の37°Cでの生育

50種超存在する*Methylobacterium*属菌種の基準株のうち、39株をメタノール液体培地での培養試験に供した。その結果、26株が37°Cで生育し、14株が37°Cで生育しなかった。つまり3割ほどは37°C環境で生育できないことが確認された。

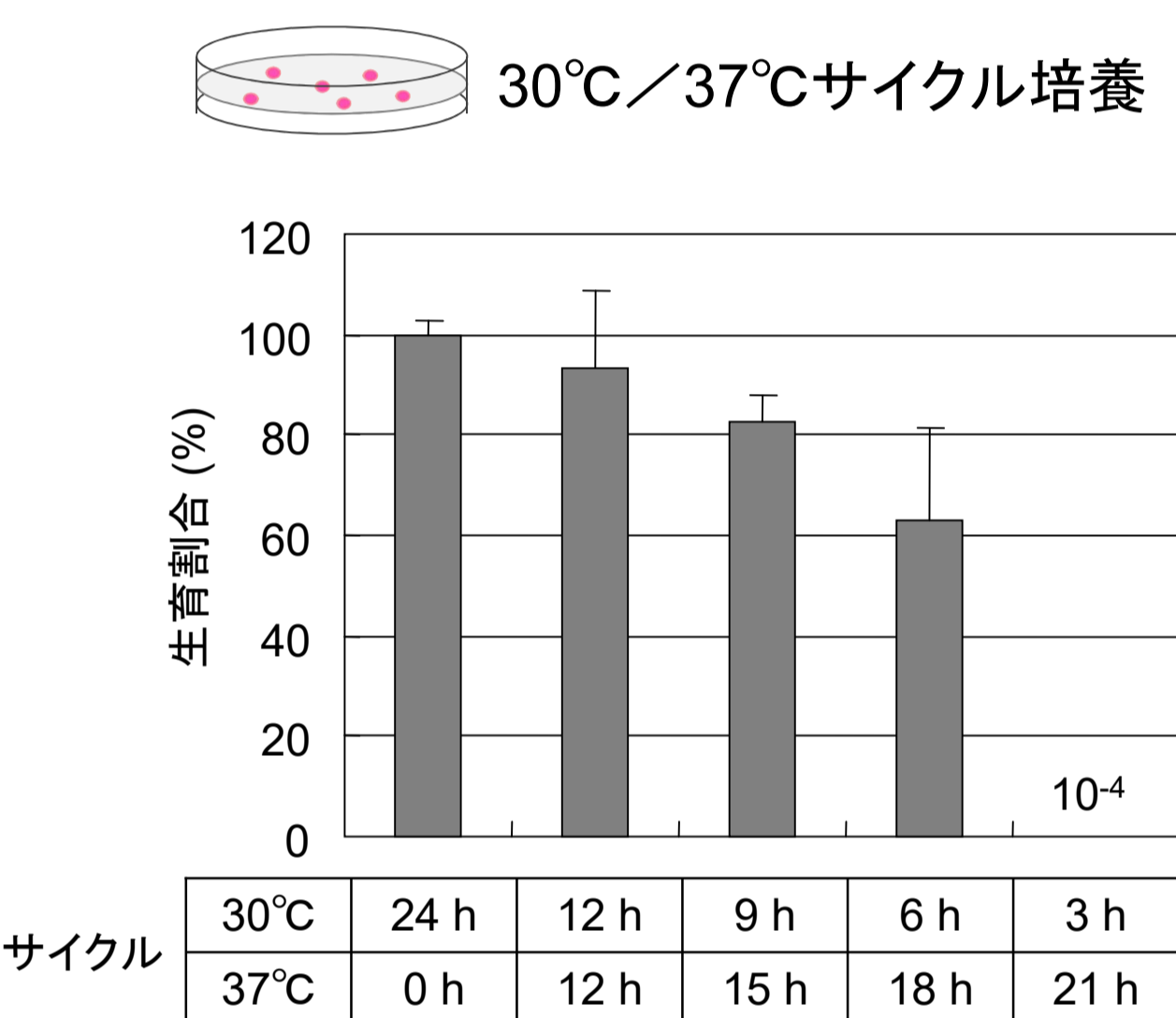
続く研究では、本属細菌のモデル株 *M. extorquens* AM1(37°Cで生育不可)を使用した。

Type Species	37°C	Type Species	37°C
<i>M. adhaesivum</i>	-	<i>M. marchantiae</i>	-
<i>M. aerolatum</i>	+	<i>M. mesophilicum</i>	-
<i>M. aminovorans</i>	+	<i>M. nodulans</i>	+
<i>M. aquaticum</i>	+	<i>M. organophilum</i>	+
<i>M. brachiatum</i>	+	<i>M. oryzae</i>	+
<i>M. brachythecii</i>	-	<i>M. oxalidis</i>	+
<i>M. bullatum</i>	-	<i>M. phyllosphaerae</i>	+
<i>M. chloromethanicum</i>	+	<i>M. platani</i>	+
<i>M. dankookense</i>	-	<i>M. podarium</i>	-
<i>M. dichloromethanicum</i>	+/-	<i>M. radiotolerans</i>	+
<i>M. extorquens</i>	+/-	<i>M. rhodesianum</i>	+/-
<i>M. fujiisawaense</i>	+	<i>M. rhodinum</i>	+
<i>M. gnaphalii</i>	+	<i>M. salsuginis</i>	+
<i>M. goesingense</i>	-	<i>M. soli</i>	-
<i>M. gossipicola</i>	-	<i>M. suomiense</i>	-
<i>M. gregans</i>	+	<i>M. thuringiense</i>	-
<i>M. hispanicum</i>	-	<i>M. trifolii</i>	-
<i>M. iners</i>	+	<i>M. tarhaniae</i>	+
<i>M. jeotgali</i>	+/-	<i>M. thiocyanatum</i>	+
<i>M. lusitanum</i>	+	<i>M. zatmanii</i>	+

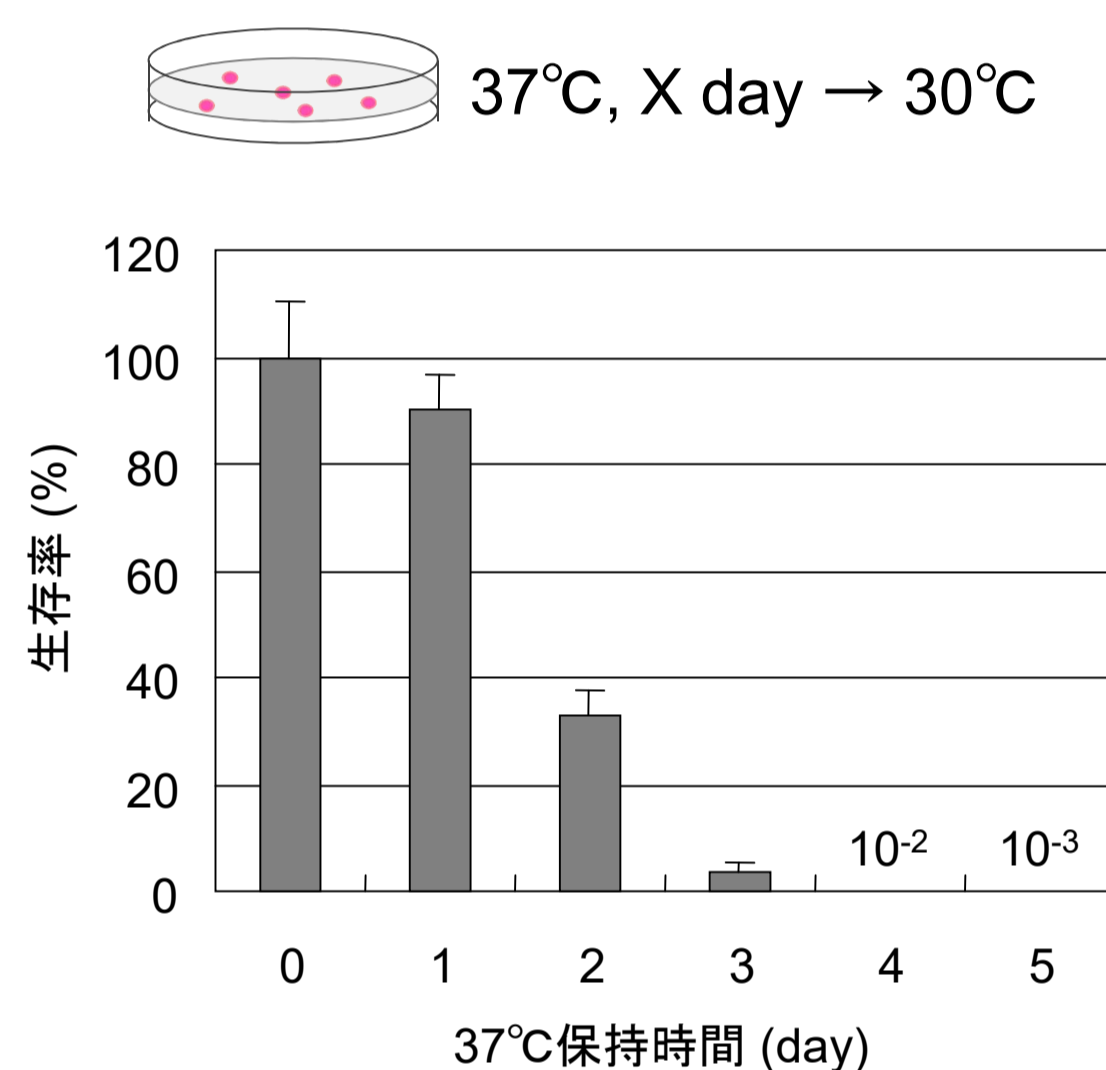
+、生育； +/-、弱い生育； -、生育せず

## 3. 温度変動環境での生育

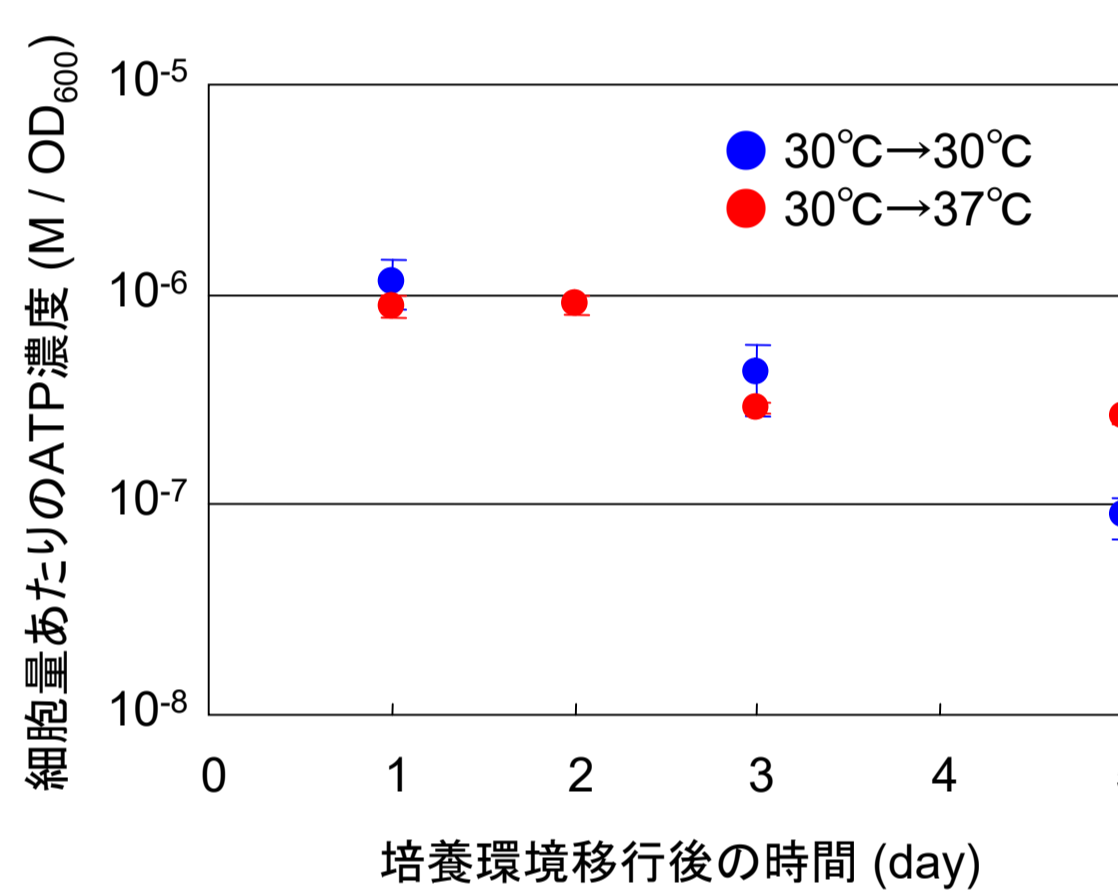
### 温度サイクル環境での生育割合



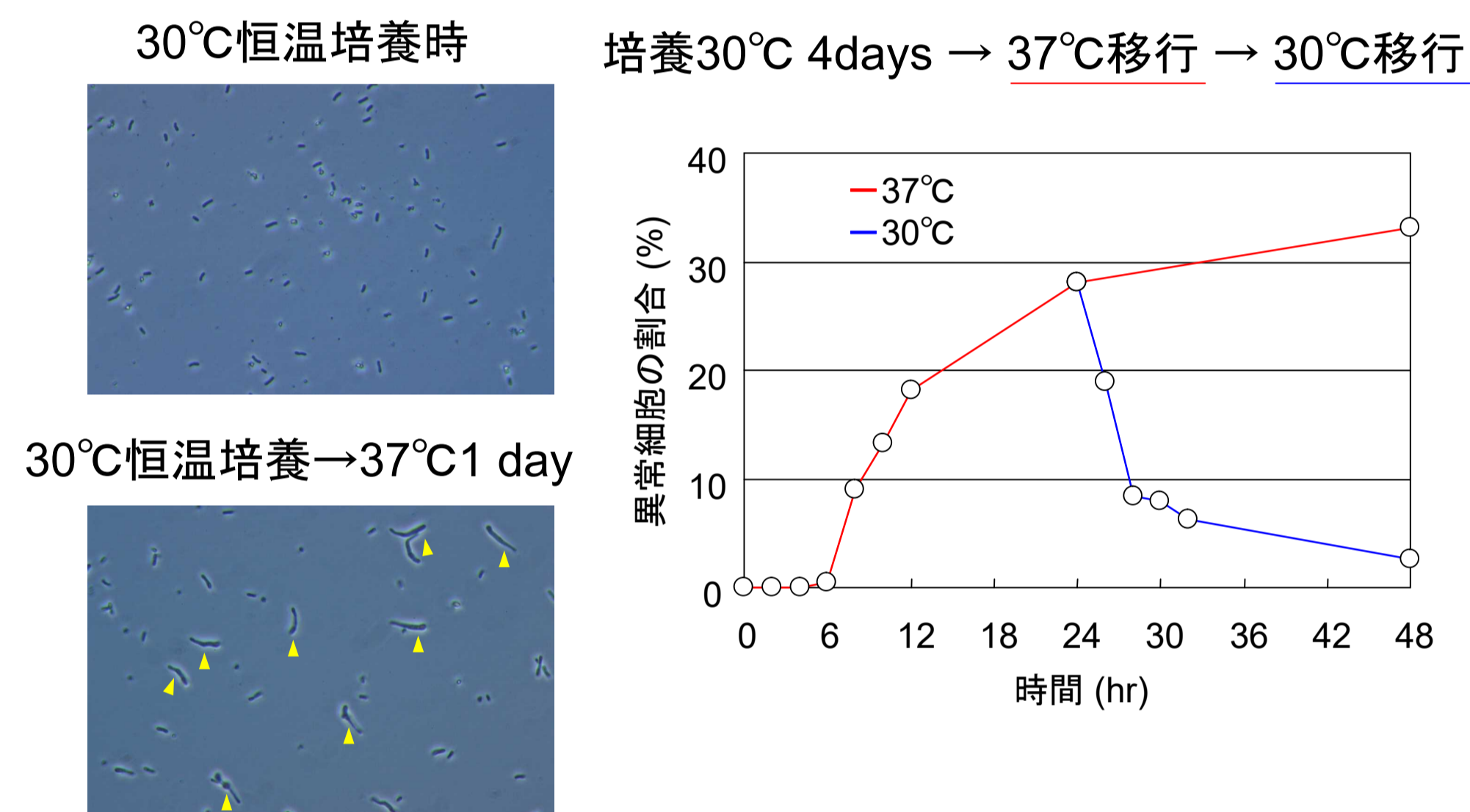
### 37°Cでの生存率



### 37°C保持時の細胞内ATP量



### 37°Cでの細胞形態異常



30°C/37°Cの周期的な温度サイクルの下、*M. extorquens* AM1をメタノール寒天培地で培養した結果、37°C時間の割合が伸びるにつれて生育する菌数(生育割合)が減少した。30°C時間が3 hrではほとんど生育できなかった。30°C恒温培養での対数増殖期の増殖速度を分析したところ、世代時間が3.57 hrと求められたため、30°Cでのこれ以上の時間の保持が生育に必要と考えられた。

また37°Cである時間保持してからの生育を調べた結果、1日保持では相当数の生育が見られたが、保持時間がのびるにつれて生育数が減少したことから、37°Cは本菌にとって亜致死温度であり、徐々に細胞が損傷していると考えられた。

37°C保持による生存率の減少が、細胞のエネルギー欠乏(エネルギー合成の不能)が原因であるか調べた。コロニーが視認できるまで30°Cで生育させた後(このときを0 day)、30°Cまたは37°Cで引き続き保持を行い、ルシフェリン発光によりATPを定量した。37°Cで特段のATP減少は見られず、エネルギー欠乏は主な原因ではないと考えられた。

37°C保持時の細胞を顕微鏡観察すると、桿状の細胞が異常に伸張していることが分かった。長径/短径の比が5以上を異常として存在割合を調べた結果、37°Cに移行すると6 hr頃から異常細胞が発生し、1 day保持すると30%程度まで増加、これを30°Cに移行すると2時間後にはその割合が減少していた。このことから、37°Cから30°Cに移行すると2時間以内の早期に増殖や細胞修復に向けた活動がはじまることが示唆された。

一方で、本菌をシロイヌナズナ上で生育させ(25°C)、これを37°Cに移行すると、36時間保持後の異常細胞は1.7%という低割合であった。寒天培地と植物葉上の栄養増殖の活発度の差を表していると考えた。

## 4. マイクロアレイ解析

機能(遺伝子)	Log <sub>2</sub> (Cycle 37°C時/ 30°C恒温)	Log <sub>2</sub> (Cycle 30°C時/ 30°C恒温)
heat shock chaperone (1p5005)	2.66	1.33
small heat shock protein (1p4658)	2.55	-0.464
cytoplasmic chaperone TorD (1p0301)	2.53	1.85
HxIR family transcriptional regulator (gene B)	2.35	1.10
Crp/Fnr family transcriptional regulator (gene E)	1.91	-0.558
flagellar basal-body rod modification protein (1p4484)	-3.54	0.277
flagellin (flaA-like; flaB-like) (1p0502)	-3.39	1.91
Flp/Fap pilin component (1p2442)	-3.37	1.30
response regulator receiver (gene A)	-3.36	1.54
flagellar hook protein flgE (1p0724)	-3.13	0.339
cell division protein (1p4424)	-2.56	1.17
cell division GTPase (1p3154)	-2.28	0.535
DNA replication initiator protein (1p0001)	-2.17	1.31
peroxidase, peroxiredoxin (1p4210)	1.31	3.12
Thioredoxin-related (1p1240)	0.00706	2.96
flagellar hook-basal body complex protein FlIE (1p2726)	0.882	2.71
flagellar flil protein (1p3261)	0.794	2.56
flagellar motor switch protein FlIM (1p3262)	-0.713	2.49
DNA strand exchange and recombination protein (1p2721)	0.994	2.27
hypothetical protein (gene D)	-1.73	2.26
hypothetical protein (1p0357)	0.971	2.25
response regulator receiver (1p0722)	-0.976	2.08
cell division protein (FtsQ-like) (1p3152)	-0.592	2.03
two component transcriptional regulator (gene C)	-1.29	1.95

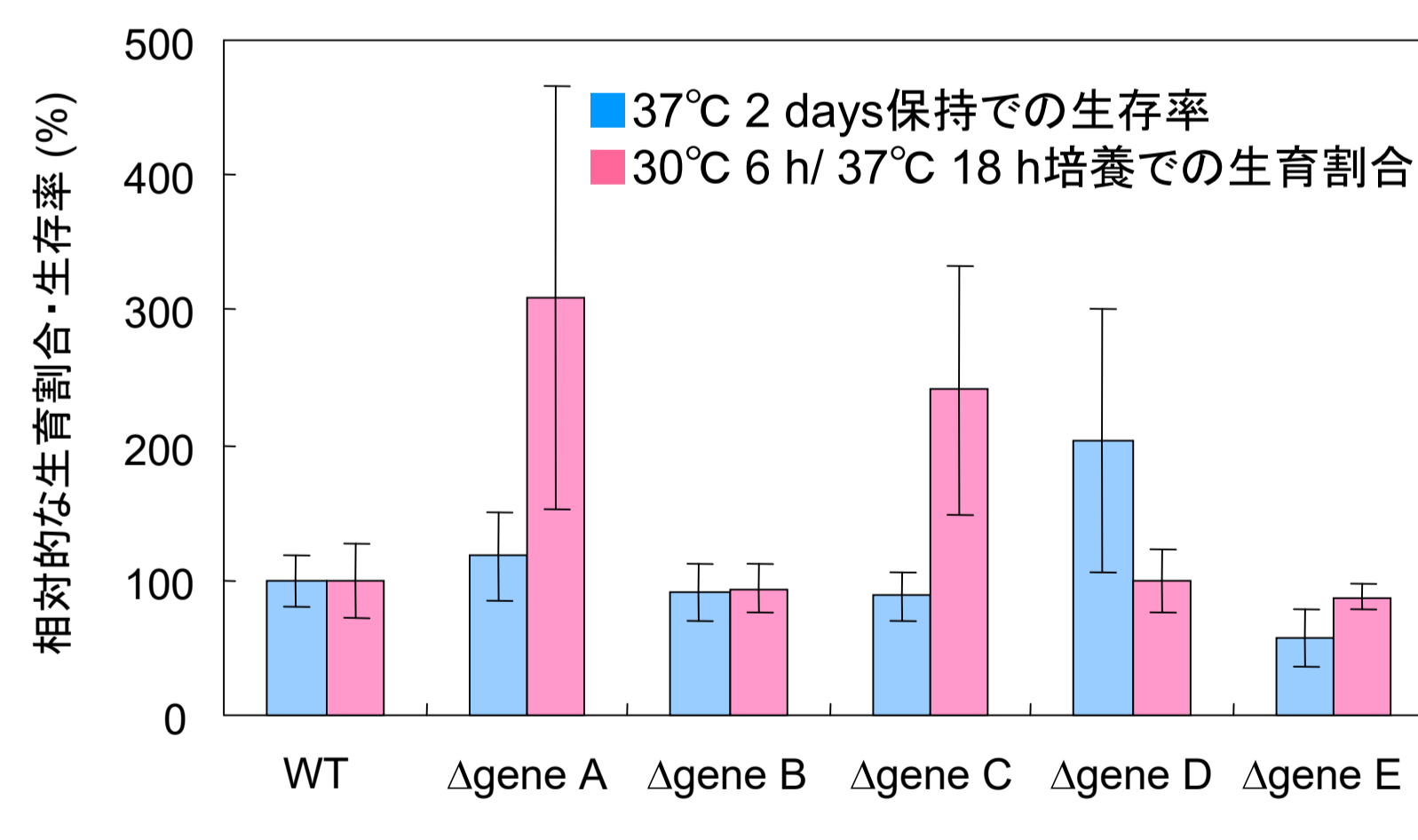
温度変動環境下での培養時に起きている細胞応答(30°C時の回復・増殖、37°C時のストレス防御)を調べるため、マイクロアレイ解析を行った。30°C恒温培養時に対する、温度変動環境培養の30°C時と37°C時の転写量を比較した。

30°C恒温時に比べて変動環境培養の37°C時には約8%の遺伝子の転写量が2倍以上に上昇し、約10%が半分以下に減少していた。変動環境培養の37°C時には、シャペロンや細胞分裂が誘導され鞭毛機能が抑制されており、変動環境培養の30°C時には鞭毛機能・細胞分裂・ROS防御機能が誘導されていた。

また本結果の転写変化量に基づき、温度変動環境への適応に関わっている可能性のある制御遺伝子(紫色文字)を5個抽出し、続いて機能解析を行っていくことにした。

## 5. 制御遺伝子の破壊株の解析

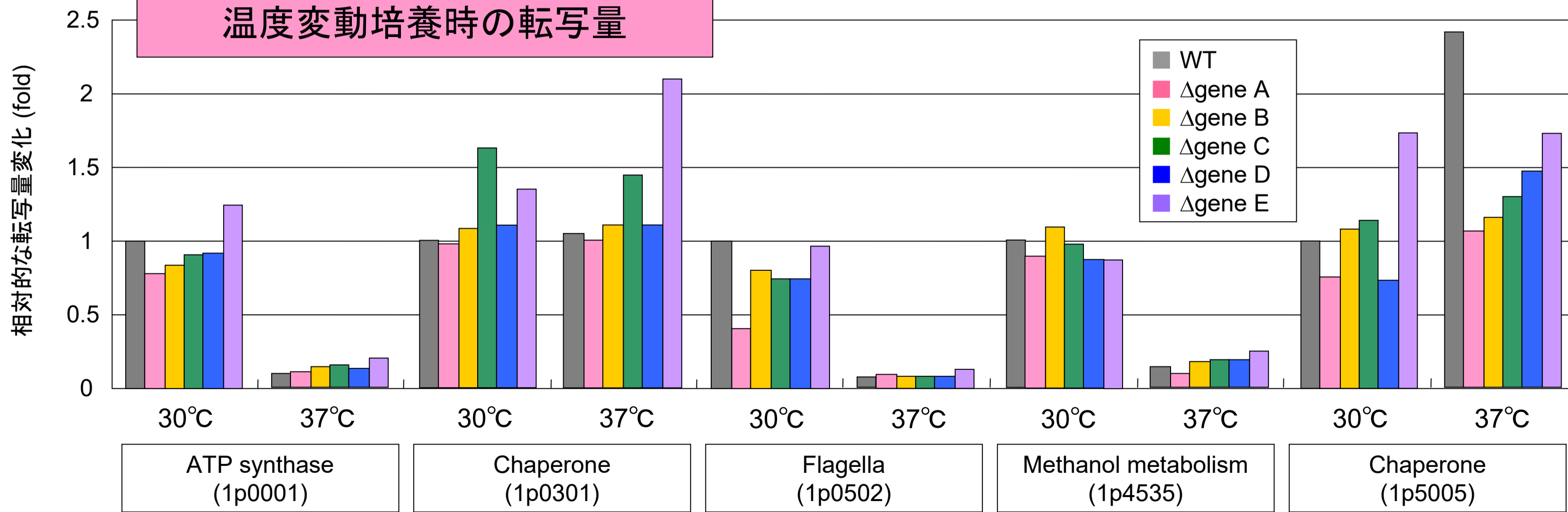
### 温度サイクル環境での生育割合、37°Cでの生存率



遺伝子破壊株を培養試験に供した結果、gene DとEは37°C耐性に、gene AとCは温度変動環境への適応に関与していることが示唆された。

マイクロアレイ解析から抽出された遺伝子の転写量を、各遺伝子破壊株について調べた結果、gene CとEはシャペロンの制御に関与していることが示唆された。またgene Aは鞭毛の制御に関与していることが示唆された。

### 温度変動培養時の転写量



※各遺伝子ともWTの30°C時を1としている

## 6. まとめ

葉面細菌*Methylobacterium*の温度変動環境下での生理状態や適応機構について研究を行った。本菌は37°Cで生育できないが、37°C保持すると日を過ごすに生存率が低下したことから、37°Cは徐々に細胞が損傷する亜致死温度であると考えられた。37°Cでは桿状の細胞が異常に伸張するが、30°Cに移行すると2 hr程で細胞形態の回復が見られはじめ、マイクロアレイ解析の結果もふまえると、37°Cでは細胞分裂の異常が生じていることが示唆された。また37°Cでは、鞭毛機能が抑制され、シャペロンが誘導されていた。37°Cでの耐性、温度変動環境での生育に関わる制御遺伝子をそれぞれ2個、2個見出した。gene Cはシャペロンを負に制御、gene Aは鞭毛を正に制御していることが示唆された。