

氏 名	Patcha YANPIRAT
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第 6 2 7 7 号
学位授与の日付	2 0 2 0 年 9 月 2 5 日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	Lanthanide-dependent methylotrophic pathway in <i>Methylobacterium aquaticum</i> strain 22A (メチロバクテリウム・アクアティカム 22A 株のランタノイド依存メタノール資化経路)
論文審査委員	准教授 谷 明生 教授 鈴木 信弘 教授 ガリス イバン
<b>学位論文内容の要旨</b>	
<p><i>Methylobacterium</i> species is able to utilize methanol emitted from plants as a sole carbon and energy source. They are representative predominant methylotrophic bacteria in the phyllosphere. Methanol is oxidized to formaldehyde by methanol dehydrogenases (MDHs), encoded by <i>mxoF</i> and <i>xoxF</i>, which are calcium- and lanthanide (Ln<sup>3+</sup>)-dependent. The recent finding on the Ln<sup>3+</sup>-dependency of XoxF has increased our knowledge and also raised new questions on bacterial methylotrophy. <i>M. aquaticum</i> strain 22A has been used as a model in the laboratory. The strain has two MDHs that are regulated by the presence of Ln<sup>3+</sup>. The strain has two formaldehyde oxidation pathways, tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT)-dependent pathway and glutathione (GSH)-dependent pathway. The latter is not found in another model organism, <i>M. extorquens</i> strain AM1. In the presence of Ln<sup>3+</sup>, H<sub>4</sub>MPT and GSH pathways were downregulated but the strain retained high formaldehyde dehydrogenase activity, suggesting the involvement of Ln<sup>3+</sup>-dependent MDH in formaldehyde oxidation. The objective of this research is to genetically and biochemically determine the methylotrophic roles of XoxF, along with GSH and H<sub>4</sub>MPT pathways in the formaldehyde oxidation process.</p> <p>Gene deletion mutants for MDHs (<i>mxoF</i>, <i>xoxF1</i>, and <i>exoF</i>) and formaldehyde oxidation enzyme genes (<i>fae1</i>, <i>fae2</i>, <i>mch</i>, and <i>hgd</i>) were constructed. The mutants were grown on methanol and methanol plus succinate in the absence and presence of La<sup>3+</sup>. The former is to see metabolic capacity for methanol, and the latter is to see toxicity of accumulated formaldehyde.</p> <p>As results, these findings were achieved: (1) MxoF produces formaldehyde to a toxic level in the absence of the formaldehyde oxidation pathways. (2) XoxF1 and ExoF can oxidize formaldehyde to alleviate formaldehyde toxification <i>in vivo</i>. (3) GSH pathway is functional in strain 22A and has small contribution to the net formaldehyde oxidation. (4) H<sub>4</sub>MPT pathway has the primary importance for formaldehyde oxidation, but in particular MDH mutant (<math>\Delta</math><i>xoxF1</i>Sup), the pathway is indispensable and GSH pathway can replace it in rather inefficient way. (5) Mch is involved in the regulation of MDH, particularly MxoF. (6) Fae2 is partly involved in methylotrophy.</p> <p>Through this study, most of the coordinated roles of multiple and complex pathways for methanol and formaldehyde oxidation have been revealed. Such different but redundant pathways may enable the cells to change metabolic flux in the pathways, in response to the metal and growth substrate availability.</p>	

## 論文審査結果の要旨

植物が放出するメタノールは、植物に共生する微生物にとって重要な炭素源・エネルギー源となっている。また、土壌にはランタノイド元素が少なからず存在している。最近、メタン・メタノール資化性細菌のもつメタノール脱水素酵素にランタノイド依存の酵素XoxFが見つかり、それが微生物ゲノムに幅広く存在していることから、ランタノイドの生物学的な重要性が示唆されてきた。植物に共生するメタノール資化性細菌である *Methylobacterium* 属細菌のモデル株である *M. extorquens* AM1株について詳細な生化学的・遺伝学的研究がなされてきた。

本研究では、当研究室で植物から分離された、AM1株とは系統的に異なる *Methylobacterium aquaticum* 22A株について、そのランタノイド依存型の酵素はメタノールだけでなく酵素反応産物であるホルムアルデヒドへも活性を持つことを生化学・遺伝学的に明らかにした。次に、本株及び近縁のグループにのみ存在する、グルタチオン依存ホルムアルデヒド脱水素酵素(GSH)経路について検討を加えた。本属細菌に保存されているH<sub>4</sub>MPT経路が主要なホルムアルデヒド代謝経路ではあるが、それが遮断されたときにはGSH経路は機能的でありホルムアルデヒドの解毒に関わることを明らかにした。またH<sub>4</sub>MPT経路中のある酵素遺伝子はメタノール脱水素酵素の発現制御にも関わることを、また同経路中のFae2も少なからずメタノール代謝に関わっていること等を新しく示した。

本研究成果は *Microorganisms* に掲載された。複雑なメタノール代謝に関わる酵素遺伝子の欠失株を網羅的に作成し、丹念に生育や活性を調べた結果で、学術的に高く評価できる。また国内及び国際学会で研究成果を発表しており、学位発表も複雑なデータを簡潔にまとめて発表することが出来た。Patcha Yanpirat 女史は学位の授与に値する十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。