

氏名	呂 好新		
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	5 7 6 0	号
学位授与の日付	平成30年 3月23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	Exploration of lanthanide-dependent methylotrophic bacteria (ランタノイド依存メタノール資化性細菌の探索)		
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>Plants release large amount of one-carbon compounds into the atmosphere as by-products of their metabolism, which can be utilized by methylotrophic bacteria, including methanotrophs. Gram-negative methylotrophs commonly contain methanol dehydrogenase (MDH) that is necessary to oxidize methanol. Besides MxaFI (a Ca<sup>2+</sup>-dependent MDH), XoxF-type MDH conserved in all gram-negative methylotrophic bacteria had been found to be dependent on lanthanides (Ln<sup>3+</sup>) in 2011. The surprising, unexpected role of Ln<sup>3+</sup> expands not only our knowledge on bacterial methylotrophy but also on unknown world of biology. Methylotrophic bacteria so far known have been obtained in Ln<sup>3+</sup> free condition. Therefore, the objectives of this study are to use Ln<sup>3+</sup> as an essential cofactor to isolate novel bacteria, and to characterize them. I characterized the phenotypes of a novel methylotroph, strain SM30<sup>T</sup> isolated from rice rhizosphere. Strain SM30<sup>T</sup> was most closely related to <i>Pleomorphomonas oryzae</i> DSM 16300<sup>T</sup>, with low 16S rRNA gene similarity of 94.17%. Based on its phenotype characterization, I proposed a new genus and new species, <i>Oharaeibacter diazotrophicus</i> gen. nov., sp. nov for strain SM30<sup>T</sup>. The genome of the strain determined with PacBio sequencer consists of one chromosome and two plasmids, comprising a total of 5,004,097 bp, and the GC content was 71.6 mol%. A total of 4497 protein-coding sequences (CDSs), 67 tRNA, and 9 rRNA were encoded. Typical alpha-proteobacterial methylotrophy genes were found in the genome. I also found that MxaF and XoxF1 were the dominant MDH in the absence or presence of La<sup>3+</sup>, respectively, through genetic and biochemical analyses. On the other hand, I also tried to isolate novel Ln<sup>3+</sup>-dependent methylotrophs by enrichment culture using methane as a sole carbon source in the presence of La<sup>3+</sup> or Ho<sup>3+</sup> as an essential growth factor. Among 300 isolates, I found two methanotrophs (Ho311 and Ho312) but their growth was independent of Ln<sup>3+</sup>. The growth of strain La2-4<sup>T</sup> (isolated from rice rhizosphere soil) on methanol was strictly Ln<sup>3+</sup>-dependent. Its 16S rRNA gene sequence showed only 93.4% identity to that of <i>Methylophilus luteus</i> Mim<sup>T</sup>, and the name <i>Novimethylophilus kurashikiensis</i> gen. nov. sp. nov. was proposed. Its draft genome (ca. 3.69 Mbp, G+C content 56.1 mol%) encodes 3579 putative CDSs and 84 tRNAs. I explored the function of its five <i>xoxF</i> genes and found that XoxF4 was the major MDH in the cells grown on methanol and methylamine. In addition, I also discovered the isolates of <i>Burkholderia ambifaria</i>, <i>Cupriavidus necator</i>, and <i>Dyadobacter endophyticus</i> as Ln<sup>3+</sup>-dependent methylotrophs. This study proved the existence of Ln<sup>3+</sup>-dependent methylotrophs in natural ecosystems for which Ln<sup>3+</sup> can be an essential cofactor to isolate.</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、その重要性が見直されている。

本研究ではイネの根圏からランタノイド依存的にメタノールを資化する微生物を幅広く求め、得られた新属細菌を*Novimethylophilus kurashikiensis*及び*Oharaeibacter diazotrophicus*と名付け、これらがこれまで知られているどの細菌とも似ていないことと、またそれらのゲノムにコードされるメタノール脱水素酵素のうち、各培養条件でどの酵素遺伝子が重要となるのかを生化学的・遺伝学的に証明している。前者はランタノイド依存の酵素遺伝子しか持たず、メタノールに生育するにはランタノイドを要求する。後者はランタノイドによりメタノールでの生育が促進され、ランタノイド依存の酵素に加えてカルシウム依存の酵素遺伝子を持っている。またこれらの遺伝子発現がランタノイドの存在と異なる生育基質アルコールの存在によって切り替わる。

これらの研究はそれぞれ *Environmental Microbiology* と *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* に掲載された。細菌分類学において新属細菌を見つけることは容易ではないこと、生育をランタノイドに依存する細菌が存在することを示したということ、複数のメタノール脱水素酵素遺伝子の基質・金属依存的発現切り替えを明らかにしたことが、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。Haixin Lv 女史は学位の授与に価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。