

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	吉田 裕介
論文題目	葉面メタノール資化性細菌の栄養要求性および競合的増殖特性と環境適応の分子機構		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>メタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育できるメタノール資化性細菌<i>Methylobacterium</i> spp.は、葉面微生物の優占種で、植物種ごとに特定の菌種が優占化することが知られている。葉面などの植物地上部は、光・温度など日周変動する環境要因の影響を大きく受ける場の一つであり、このような場に棲息する<i>Methylobacterium</i> spp.は、これらの環境刺激に対する適応能力を持つと考えられる。しかし、<i>Methylobacterium</i> spp.が多様な環境刺激に対応し葉面に定着するメカニズムや、特定の菌種が優占化する要因については不明な点が多い。</p> <p>本論文では、葉面に棲息する<i>Methylobacterium</i> spp.の多くがパントテン酸要求性であることを見出し、葉面に存在するパントテン酸、<math>\beta</math>-アラニンおよびその前駆体を利用して棲息していることを示した。また、<i>Methylobacterium</i> spp.の葉面での優占化には、メタノール資化能の有無のみならず、競合条件下におけるメタノールの代謝能力の程度も影響していた。シアノバクテリアにおいて概日性遺伝子として知られている<i>kaiC</i> のホモログを<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1株がもち、本<i>kaiC</i>が葉面定着能に貢献することを明らかにするとともに、KaiCタンパク質のリン酸化や発現量が生育温度により調節され、紫外線(UV)に対する環境適応を制御していることを示した。主な内容は、以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 様々な植物試料から分離した<i>Methylobacterium</i> spp.菌株について、メタノールを単一炭素源とする最少培地で生育時のビタミンB群要求性について調査したところ、植物表層に棲息している<i>Methylobacterium</i> spp.の多くがビタミンB<sub>5</sub> (パントテン酸) 要求性であることを見出した。アカシソ種子より単離した<i>Methylobacterium</i> sp. OR01株をパントテン酸要求性株の代表株として用い、最少培地に添加して際に生育を回復させる化合物を調べたところ、<math>\beta</math>-アラニンおよびその前駆体であるスペルミン、スペルミジン、5,6-ジヒドロウラシル、<i>N</i>-カルバモイル-<math>\beta</math>-アラニン、および3-ヒドロキシプロパン酸の添加により、生育が回復することを明らかにした。</li><li>2. シロイヌナズナ葉面におけるパントテン酸およびその前駆体化合物の存在量を測定したところ、パントテン酸、<math>\beta</math>-アラニン、スペルミジン、<i>N</i>-カルバモイル-<math>\beta</math>-アラニン、3-ヒドロキシプロパン酸が検出されたことから、パントテン酸要求性株がこれらの化合物を葉面において利用可能であることを明らかにした。</li></ol>			

3. *Methylobacterium* sp. OR01株とパントテン酸非要求性株 *M. extorquens* AM1株をシロイヌナズナ種子に混合接種し、パントテン酸およびその前駆体を含まない培地で2週間栽培すると、葉からはほとんどの場合で*Methylobacterium* sp. OR01株のみ検出されたことから、パントテン酸要求性株*Methylobacterium* sp. OR01株はパントテン酸非要求性 *M. extorquens* AM1株と比較してシロイヌナズナ葉面への定着能が高いことを示した。
4. 半透膜を介し培地を共有できる二層式フラスコを用いて*M. extorquens* AM1株と*Methylobacterium* sp. OR01株の競合培養を行った結果、コハク酸を単一の炭素源とした場合には*M. extorquens* AM1株の増殖が上回った一方で、メタノールを炭素源とした場合には*Methylobacterium* sp. OR01株の増殖能が上回った。また各株におけるメタノール消費速度を比較したところ、*Methylobacterium* sp. OR01株の方がメタノールをより早く消費することを明らかにした。この結果は、メタノールが、葉面での主要な炭素源であることを反映していると考えられる。また競合培養時には*Methylobacterium* sp. OR01株の増殖能が高かったことから、葉面での優占化にはメタノール資化能の有無のみならず、競合条件下におけるメタノールの代謝能力の程度も影響することを示した。
5. *M. extorquens* AM1株において、2つのKaiCタンパク質をコードする遺伝子 *kaiC1* および*kaiC2*の遺伝子破壊株、*kaiCkaiC2*二重遺伝子破壊株について、野生株と混合してシロイヌナズナ種子に接種した場合の葉面の生菌数比を調べたところ、各破壊株の生菌数が野生株よりも減少していたことから、これらの*kaiC*ホモログが葉面定着に貢献することを見出した。
6. *M. extorquens* AM1株の各*kaiC*破壊株について、UV耐性について調べた結果、*kaiC1*遺伝子破壊株のUV照射後での生存率は野生株と比べて減少し、*kaiC2*遺伝子破壊株の生存率は上昇した。許容生育温度下（24～32℃）におけるUV耐性について調べた結果、野生株では、培養温度の上昇に伴ってUV耐性が上昇した一方で、いずれの*kaiC*破壊株においても野生株とは異なる応答を示すことを見出した。またこれら2つのKaiCタンパク質の発現量・リン酸化と培養温度との関係を調べたところ、KaiC1タンパク質は培養温度の上昇に伴い発現量が減少し、KaiC2タンパク質は温度上昇とともに発現量は大きく変わらないものの、リン酸化レベルが低下していた。以上の結果から、KaiCタンパク質のリン酸化や発現量が生育温度により調節され、UVに対する環境適応を制御していることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。  
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、植物葉面に優占化する*Methylobacterium* spp.の栄養要求性および競合培養時における増殖特性を明らかにし、*Methylobacterium* spp.における概日性遺伝子ホモログ*kaiC*の分子生理的な機能を初めて明らかにしたものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 様々な植物試料から分離した*Methylobacterium* spp.菌株の多くがパントテン酸要求性であることを明らかにし、 $\beta$ -アラニンおよびその前駆体の添加により、生育が回復することを明らかにした。またパントテン酸要求性株 *Methylobacterium* sp. OR01株が、パントテン酸生合成に必要な化合物を葉面で獲得して棲息していることを示した。
2. パントテン酸要求性株である*Methylobacterium* sp. OR01株は、非要求性株である*M. extorquens* AM1株と比較して、シロイヌナズナ葉面への定着能、メタノール培地中での競合培養時の増殖能、およびメタノールの消費能の全てにおいて勝り、葉面での優占化にはメタノール資化能の有無のみならず、競合条件下におけるメタノールの代謝能力も影響することを示した。
3. *M. extorquens* AM1株の概日性遺伝子ホモログ*kaiC*が葉面定着能に寄与することを示すとともに、*KaiC*タンパク質の発現量やリン酸化が生育温度により調節され、UVに対する環境適応の制御に関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、葉面に優占化する*Methylobacterium* spp.の栄養要求性および競合培養時における増殖特性を明らかにし、また*M. extorquens* AM1株において、概日性遺伝子ホモログ*kaiC*の分子生理的な機能を初めて明らかにしたものである。これらの成果は、葉面微生物と植物の相互作用における新たな知見を提供するとともに、概日性遺伝子ホモログの新たな生理的意義と生物学的機能を明らかにすることで、時計遺伝子の進化における新たな知見を提供するものであり、制御発酵学、分子細胞生物学、応用微生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2019年6月25日以降（学位授与日から3ヶ月以内）