

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Oktay Gafarov
論文題目	Studies on methane oxidation and C1 metabolism in propane-utilizing bacteria <i>Gordonia</i> sp. strain TY-5 and <i>Mycolicibacterium</i> sp. strain TY-6 (プロパン資化性細菌 <i>Gordonia</i> sp. TY-5株および <i>Mycolicibacterium</i> sp. TY-6株におけるメタン酸化とC1代謝に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
The biological oxidation of methane to methanol is more energy-efficient and environmentally friendly than conventional chemical processes. However, the use of methanotrophs, which utilize methane as the sole carbon source, for the biological conversion of methane to useful compounds is limited because most methanotrophs must consume methanol produced from methane to support their growth. Consequently, there is a compelling need to investigate microorganisms capable of oxidizing methane to methanol while lacking one-carbon (C1) assimilation pathways. Methane oxidation has traditionally been studied in the context of methanotrophy, and reports of this activity in Actinomycetota are rare. Accordingly, methane oxidation in non-methanotrophic bacteria remains largely unexplored. In this thesis, the author studied methane oxidation and C1 metabolism in non-methanotrophic Gram-positive Actinomycetota, <i>Gordonia</i> sp. strain TY-5 and <i>Mycolicibacterium</i> sp. strain TY-6, which were originally isolated as propane utilizers. Chapter I is dedicated to the study of methane oxidation and C1 metabolism in <i>Gordonia</i> sp. strain TY-5. Previous studies revealed that methanol is produced as a metabolite of the propane metabolism via 2-propanol, acetone, and methyl acetate in strain TY-5. To investigate C1 metabolism in this strain, the author performed a comprehensive genome analysis using an in-house draft genome sequence. Besides the NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenases (Adhs), strain TY-5 was found to possess the <i>N,N</i>-dimethyl-4-nitrosoaniline (NDMA)-dependent methanol dehydrogenase (Mno). Strain TY-5 also possesses formaldehyde oxidation pathways but lacks a C1 assimilation pathway, indicating that methanol is not utilized as a carbon source but is used as an energy source. The author confirmed that strain TY-5 can oxidize methane. Draft genome analysis revealed that strain TY-5 possesses the <i>prmABCD</i> gene cluster encoding propane monooxygenase (Prm) but no other genes homologous to methane monooxygenase (MMO). The <i>ΔprmB</i> strain lost the methane oxidation activity, indicating that Prm is responsible for methane oxidation. Next, to identify the enzyme(s) responsible for methanol metabolism, Mno- and Adh2-encoding genes were disrupted. Methanol consumption assays revealed that both Adh2 and Mno are involved in methanol oxidation, with Mno contributing much more significantly than Adh2. The addition of methane or methanol to the medium significantly reduced the growth yield of the <i>Δmno</i> strain compared to the wild-type strain, suggesting that Mno plays a major role in the oxidation of methanol for			

energy generation. These findings provide new insights into the physiological significance of C1 and hydrocarbon metabolism to adapt to natural environment where methane and propane co-exist.

In Chapter II, the author identified the methane-oxidizing enzymes in *Mycolicibacterium* sp. strain TY-6. Draft genome analysis revealed that strain TY-6 possesses five MMO homologs but no C1 assimilation pathway. Genes for a Prm homolog, M-Prm, and a membrane-bound particulate MMO (pMMO) homolog, M-Pmo, were selected for disruption. Methane oxidation assays of the wild-type, $\Delta M\text{-}prmA$, and $\Delta M\text{-}pmoB$ strains revealed that M-Pmo is a major methane-oxidizing enzyme and M-Prm is partially responsible for methane oxidation activity. In addition, the $\Delta M\text{-}pmoB$ strain did not grow on propane, suggesting that M-Pmo is responsible not only for methane oxidation but also for propane oxidation. This is the first report that a pMMO homolog is responsible for methane and propane oxidation in non-methanotrophic bacteria.

Chapter III is dedicated to optimizing growth and reaction conditions for methanol production from methane and to elucidating alcohol metabolism in *Mycolicibacterium* sp. strain TY-6. Addition of 1-propanol to various culture media significantly increased biomass yield, and the highest growth was achieved in the rich medium containing 1-propanol. However, the addition of 1-propanol to either the culture medium or the reaction mixture reduced methanol production and accumulation from methane as the substrate. Next, the author investigated alcohol metabolism in strain TY-6. To identify the enzyme(s) responsible for methanol and 1-propanol oxidation, the author determined the relative transcript levels of *adh* and *mno* genes of strain TY-6. Among these genes, only the *mno* gene was constitutively expressed at high levels. This result suggests that Mno is mainly involved in methanol and 1-propanol oxidation in strain TY-6.

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)

非メタン資化性でありながらメタン酸化活性をもつプロパン資化性細菌 *Gordonia* sp. TY-5株および *Mycolicibacterium* sp. TY-6株において、メタン酸化酵素ならびにメタノール以降のC1代謝系は不明であった。本論文は、両株にけるメタン酸化酵素を同定し、メタノールデヒドロゲナーゼを含むC1化合物代謝系を解明したものである。非メタン資化性菌によるメタン酸化に膜結合型メタン酸化酵素が関与することを初めて示すとともに、未解明であったメタノール代謝とその生理的意義を明らかにした。評価すべき点として、以下の3点が挙げられる。

1. *Gordonia* sp. TY-5株では、プロパン酸化酵素 (Prm) がメタン酸化に関与することを見いだすとともに、本菌がメタノールからCO₂に至る酸化経路をもち、メタノールが炭素源としてではなくエネルギー源として利用されること、NDMA依存性アルコールデヒドロゲナーゼ (Mno) が主要なメタノール酸化酵素であることを明らかにした。
2. *Mycolicibacterium* sp. TY-6株では、膜結合型メタン酸化酵素 (pMMO) ホモログであるM-Pmoが主要なメタン酸化酵素であることを見いだすとともに、PrmではなくM-Pmoがプロパン代謝にも必須であることを明らかにした。非メタン資化性菌においてpMMO型酵素がメタン酸化だけでなくプロパン酸化にも関与することを初めて示した。
3. *Mycolicibacterium* sp. TY-6株によるメタンからのメタノール生成のための培養条件ならびに反応条件を最適化するとともに、複数のアルコールデヒドロゲナーゼのうち、主にMnoがメタノールおよび 1-プロパノールの代謝に寄与することを明らかにした。

以上のように、本論文は、プロパン資化性細菌におけるメタン酸化酵素およびメタノール代謝酵素を同定し、メタンやプロパンが共存する本菌の自然界での棲息環境に適応するためのC1代謝系の生理的意義について明らかにした。これらの成果は、非メタン資化性菌における炭化水素代謝系の解明やメタンからの有用物質生産系の開発に寄与するものであり、制御発酵学、応用微生物学、微生物生理学の発展に寄与するところが多い。

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、令和8年1月29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：令和8年6月23日以降（学位授与日から3ヶ月以内）