

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	川口甲介
論文題目	Molecular and cellular physiology of microorganisms responsible for carbon cycle of plant biomass (植物バイオマスの炭素循環に関与する微生物の分子細胞生理学的研究)		
(論文内容の要旨)			
自然界での炭素循環において微生物と植物、並びに、それらの相互作用は、重要な役割を果たしている。植物はCO₂をバイオマスへと固定する一方で、メタノールやメタンなどのC1 化合物やテルペノイド系ならびに芳香族化合物など、多種の揮発性有機化合物を放出している。そして植物表層にはそれらの有機化合物を炭素源とする微生物が棲息している。植物がその一生を終えて枯れた後、その構成成分は微生物により低分子化合物へと分解され、次世代あるいは他の生物の栄養源として利用される。本論文ではまず最初に、メタノール資化性酵母 <i>Candida boidinii</i> が、生長中の植物の葉上で増殖することを見いだした。次に、<i>C. boidinii</i> が葉上で増殖するために、どのような細胞生理機能が必要かを遺伝子レベルで明らかにした。さらに、脱窒細菌による芳香族化合物の分解に関わる酵素と遺伝子構造を明らかにした。その主な内容は以下の通りである。			
1) メタノール濃度を定量することが可能な酵母セルセンサーを開発し、植物葉上のメタノール動態を直接追跡した。具体的にはメタノールで特異的に誘導される <i>C. boidinii</i> <i>DASI</i>プロモーター支配下で蛍光タンパク質Venusを発現する酵母細胞を構築した。本細胞は、培地中メタノール濃度に応答した蛍光強度を示したことから、メタノールセンサーとして利用できることがわかった。これを用いてモデル植物の <i>Arabidopsis thaliana</i> 葉上メタノール濃度の動態を追跡したところ、日周期に従って変動していることがわかった。老化あるいは枯れた植物の表層では、高濃度のメタノールが存在することを明らかにした。			
2) 植物葉上でのメタノール資化性酵母の増殖に対するメタノール代謝とオートファジーの重要性について検討した。各種プロモーター支配下でVenus を発現する <i>C. boidinii</i> を作製し、植物葉上でメタノール代謝系酵素遺伝子が実際に発現していることを示した。植物葉上の酵母菌体数を定量する手法を、定量PCR法を用いて開発し、種々の遺伝子破壊株と野生株の葉上における生育を比較した。その結果から、メタノール代謝の資化経路とペルオキシソーム合成が、植物葉上における酵母の増殖に必要なことを明らかにした。一方、ホルムアルデヒド酸化代謝と抗酸化代謝は、植物葉上での酵母の増殖には重要ではなかった。次にVenusまたはHAタグと、オートファジーのマーカータンパクであるCbAtg8を連結した融合タンパク質を <i>C. boidinii</i> で発現させ、植物葉上に接種し、可視化解析とともに生化学的にオートファジー動態を追跡した。その結果、オートファジーは明期・暗期を問わず常に誘導されていることがわかった。ATG遺伝子破壊株では、葉上での菌体数の増殖が阻害されていたことから、<i>C. boidinii</i>の葉上での増殖に、オートファジーが必要であることを示した。			

3) 植物細胞壁に大量に存在するペクチンメチルエステルのメタノール成分を効率よく利用する目的で、真菌由来ペクチンメチルエステラーゼ (PME) を *C. boidinii* で発現させた。*Aspergillus niger* 由来 PME 遺伝子の使用コドンをもとに *C. boidinii* に最適化して全合成し、活性型酵素として発現することに成功した。PME発現株ではペクチンを炭素源とした時の生育が野生株に比較して向上したことから、本発現株が、より効率的にペクチンメチルエステルを利用していることを示した。

4) 通性嫌気性脱窒細菌の芳香族化合物分解代謝経路について解析した。*Magnetospirillum* sp. TS-6 株の安息香酸分解の初発反応を触媒する安息香酸CoA リガーゼの精製と諸性質およびその発現について解析し、安息香酸分解の初発反応には、嫌気・好気両条件で同じ二量体酵素が機能していることを示した。

5) 通性嫌気性脱窒細菌 *Thauera* sp. DNT-1 株の好氣的トルエン分解に関わる遺伝子群の構造と発現について解析した。*Thauera* sp. DNT-1 株の好氣的トルエン分解に関わる *tod* 遺伝子群の全長14kb をクローン化し、その塩基配列を決定した。さらに *tod* 遺伝子群を構成する酵素を大腸菌内で発現させ、精製の後、その基質特異性を調べた結果、*tod* 遺伝子群がトルエン、ビフェニル両方の分解に関わっていることを明らかにした。

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)

植物は、メタノールやメタンなどのC1 化合物やテルペノイド系ならびに芳香族化合物など、多種の揮発性有機化合物を放出している。そして植物表層にはそれらの有機化合物を炭素源とする微生物が棲息している。本論文では、メタノール資化性酵母*Candida boidinii* が葉上で増殖すること、そのためにどのような細胞生理機能が必要かを明らかにした。さらに、脱窒細菌による芳香族化合物の分解に関わる酵素と遺伝子構造について明らかにした。評価すべき点は以下の6点である。

- 1) *DAS1*プロモーター支配下で、Venusを発現するメタノール資化性酵母*C. boidinii*を用いて、細胞を用いたメタノールのセンシング技術を開発した。
- 2) シロイヌナズナ葉上には*C. boidinii*が生育するのに十分な量のメタノールが存在し、その濃度は日周期に依存して変動することを明らかにした。
- 3) メタノール資化性酵母の植物葉上での増殖に、メタノール代謝の資化経路とペルオキシソーム合成、さらにオートファジーが必要であることを示した。
- 4) *C. boidinii*を宿主として糸状菌由来ペクチンメチルエステラーゼを異種発現することにより、ペクチンのメタノール成分を効率的に利用できることを示した。
- 5) 脱窒細菌*Magnetosprillum* sp. TS-6株の安息香酸分解の初発反応には、嫌気・好気両条件で同じ二量体酵素が機能していることを明らかとした。
- 6) 脱窒細菌*Thauera* sp. DNT-1株の*tod*遺伝子群が、トルエンおよびビフェニル両者の分解に関わっていることを明らかとした。

以上のように、本論文は、自然界における炭素循環という観点から、シロイヌナズナ葉上にメタノールが存在しかつ日周変動を示すこと、さらにこのような環境でのメタノール資化性酵母の増殖に特異的な生理機能と細胞内動態の変化が必要であることを、遺伝子レベルで初めて明らかとしたものであり、制御発酵学、応用微生物学、分子細胞生物学に貢献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24年 4月12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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降