

氏名（本籍）	金澤 拓史
学位の種類	博 士（生命農学）
学位記番号	博 甲 第 10038 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査学術院	理工情報生命学術院
学位論文題目	リボフラビン分解に関わる微生物共生系の機能

主査	筑波大学教授	博士（農学）	高谷 直樹
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	中村 顕
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	竹下 典男
副査	筑波大学助教	博士（農学）	梶尾 俊介

## 論 文 の 要 旨

リボフラビンはフラビン補酵素の前駆体であり、細胞内の酸化還元酵素の反応に重要な化合物である。微生物はこの生合成能を有しており、現在は発酵法によってリボフラビンが生産されている。リボフラビンは、微生物と植物間の相互作用を媒介するシグナル分子として働くことや、病原菌に対する植物の防御応答を促進することが知られている。また、リボフラビンの分解産物であるルミクロムも根圏の微生物によって生産され、植物生長に関わる。こうした重要性にも関わらず、リボフラビンを分解する土壌細菌やそれらによるリボフラビンの分解機構には不明な点が多い。著者は、本研究において、土壌細菌によるリボフラビンの分解機構を解明し、土壌生態系におけるリボフラビンの恒常性や生理作用を解明することを目指した。

第1章で著者は、*Devosia riboflavina*と*Microbacterium*属細菌によるリボフラビン分解機構を解明した。*D. riboflavina*によるリボフラビンの分解活性はリボフラビン添加時に見出され、この時フラビン依存性モノオキシゲナーゼ（FMO）の発現が誘導された。組換えFMOは、組換えフラビン還元酵素とのカップリング反応によって、リボフラビンをルミクロムとD-リボースに分解した。FMOとフラビン還元酵素をコードする遺伝子は遺伝子クラスターを形成しており、リボフラビンはこれらの遺伝子の発現を誘導した。本研究によって単離されたリボフラビン分解菌には12株の*Microbacterium*属細菌が含まれ、*D. riboflavina*のリボフラビン分解遺伝子クラスターは*Microbacterium*属細菌にも広く見出された。以上の結果から、これらのリボフラビン分解菌は、リボフラビンをD-リボースとルミクロムに分解すること、生成するD-リボースを炭素源およびエネルギー源として利用し、ルミクロムを菌体外に放出することが示された。

第2章で著者は、*Nocardioides nitrophenolicus* L16 (L16) のルミクロム分解機構を解析した。L16の菌体とルミクロムの反応液の分析から、L16によるルミクロムの分解は多段階の反応によること、その初発反応がルミクロムのピリミジン骨格の開裂であることが予想された。L16の推定遺伝子の中からアミドヒドロラーゼをコードすると予想される遺伝子を探索したところ、ヒダントイナーゼ（HYD）遺伝子を含んだ遺伝子クラスターが見出された。組換えHYDは、ルミクロムを分子量260の化合物Xへと変換した。さらに、HYDはプリン塩基や他のフラビン化合物よりもルミクロムに高い反応性を示したことから、HYDがルミクロム分解の初発酵素であると考えられた。HYD遺伝子の下流に位置する推定遺伝子の組換え酵素は化合物Xへと分子量217の化合物へと変換した。以上の結果より、ルミクロムを分解するL16の新奇なピリミジン代謝系が発見された。

第3章で著者は、リボフラビン分解菌*M. paraoxydans* R16 (R16) とルミクロム分解菌L16の相利共生系を

発見し、その機構を解明した。リボフラビンを炭素源とする混合培養によってR16とL16の共生系が再現された。この時、R16のリボフラビン分解速度は単独培養時のそれよりも高かったことから、L16がR16のリボフラビン分解活性を促進することが示された。R16とL16の混合培養液から、R16のリボフラビン分解速度を増加させる画分を粗精製したところ、フラビン様の可視吸収スペクトルを示した。以上の結果から、この共生系では、L16が生産するリボフラビンあるいはルミクロムに由来する化合物がR16のリボフラビン分解酵素を活性化すると考えられた。これにより、R16とL16は、生育に必須なD-リボースとルミクロムをそれぞれ効率的に分解し、生育を促進させることが可能な相利共生の関係を構築すると考えられた。

本研究により *D. riboflavina* と L16 が複数の酵素を利用して、リボフラビンあるいはルミクロムをそれぞれ分解すること、R16 と L16 が活性化分子を介してリボフラビンの分解に関わる相利共生を行うことが明らかとなった。本研究はリボフラビンの分解に関わる複数の土壌細菌の機能を明らかとし、土壌中でのリボフラビンの恒常性の理解に貢献するものである。また、これらの発見は作物の生長促進のための土壌改良や、ルミクロムやその誘導体の発酵生産の技術の構築にも波及する点で応用的に重要である。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、環境常在細菌によるリボフラビンの生分解経路とそれに関わる遺伝子の機能解明の研究成果を得た点で学術的価値が高い。特に、フラビン依存性モノオキシゲナーゼがリボフラビンの分解に関与することの発見と、その反応機構に関する研究は酵素学の観点から優れたものである。また、ルミクロムの生分解に関与する複数の酵素遺伝子を見出し、新たな生分解の経路を世界で初めて提唱した点は独創的である。特に、ルミクロムの初発反応を担う2つの酵素の分解代謝への関与を示した点は大きな科学的意義を持つ発見といえる。これらの研究成果は、細菌の代謝の分子生物学的研究として関連分野の研究をリードするものである。本論文は、さらに、リボフラビンを生分解する複合生物系が2種の環境常在細菌から構成されることを発見し、この複合系が新たな共生系としての意義を持つことを提唱した。この学説は、環境常在細菌の新たな生理学的研究として優れたものである。本論文の研究成果によって見出された微生物の代謝に関する多くの現象は、環境中の微生物生態と地球上の化合物および物質の循環を理解するために大きく貢献するものである。

令和3年 1月21日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生命農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。