



Title	Molecular mechanisms of rare earth element utilization by methane-oxidizing bacteria and protease-producing bacteria [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Xie, Ruoyun
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15674号
Issue Date	2023-12-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91211">http://hdl.handle.net/2115/91211</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	XIE_RUOYUN_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏名	Xie Ruoyun
審査担当者	主査	客員准教授	加藤 創一郎
	副査	教授	吹谷 智
	副査	客員教授	鎌形 洋一
	副査	客員准教授	北川 航

## 学位論文題名

### **Molecular mechanisms of rare earth element utilization by methane-oxidizing bacteria and protease-producing bacteria**

(メタン酸化細菌およびプロテアーゼ生産菌のレアアース元素利用機構)

本論文は英文 87 頁、図 26、表 8、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

レアアース (REEs) は 2 つの非ランタナイド元素 (Sc, Y) と 15 のランタナイド元素からなる 17 元素の総称である。長きにわたりレアアースの生物利用性は見過ごされてきた。メタン・メタノール酸化細菌の中心代謝経路の酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼ (Ca-MDHs) は Ca を活性中心近傍に配しているが、近年になり Ca ではなく REE 元素を配するタイプのメタノールデヒドロゲナーゼ (REE-MDHs) が発見された。多くのメタン・メタノール酸化細菌は 2 種の MDH を有し、その発現は利用可能な REE 濃度により制御されている (REE スイッチ)。本論文は、1) メタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 株を対象とした REE 利用性の解析、2) *M. capsulatus* の不溶性 REE 利用の解析、3) REE のプロテアーゼおよびその生産菌に与える影響の解析、の 3 つのテーマを通し、生物の REE 利用に関する知見を深めることを目的として実施された。

#### 1) *Methylococcus capsulatus* の REE スイッチ

REE 利用性の研究はメタノール酸化細菌で主に進められており、メタン酸化細菌での知見は限られている。本論文では  $\gamma$ -proteobacteria のメタン酸化細菌のモデル微生物である *M. capsulatus* Bath 株を対象とし REE 利用性を評価した。様々な REE 塩化物 (20  $\mu$ M) を添加した培地で *M. capsulatus* を培養し、Ca-MDH および REE-MDH の発現を定量 RT-PCR 法により解析した結果、他のメタン・メタノール酸化細菌と同様、軽いランタナイド元素 (La, Ce, Nd) で REE スイッチが観察された。異なる濃度の  $\text{CeCl}_3$  を添加した培地を用いその濃度依存性を調べた結果、0.01  $\mu$ M という極めて低濃度でも REE スイッチが観察され、*M. capsulatus* の REE 親和性が他のメタン・メタノール酸化細菌と比較し 1-2 桁高いことが明らかにされた。

#### 2) *Methylococcus capsulatus* の不溶性 REE 利用能

これまでの REE 利用性の研究では易溶性の REE 塩化物が使用されてきた。しかし REE は自然界においては不溶性の酸化物として存在し、一般的な水環境にお

いて REE は pM レベルでしか存在しない。そのため REE 利用微生物は不溶性の REE 酸化物を溶出する何らかの機構を有しているの仮定のもと研究が実施された。CeO<sub>2</sub> 粉末を培地に懸濁後、ICP-OES により液中の Ce 濃度を測定したところ検出限界以下であったが、*M. capsulatus* を CeO<sub>2</sub> 存在下で培養した後の上清からは約 15 nM の Ce が検出された。また *M. capsulatus* を REE 非存在下で培養し、その上清に CeO<sub>2</sub> を懸濁した場合、溶液からは約 25 nM の Ce が検出された。さらに比色法によりキレート物質の検出が可能な Chrome Azurol Sulfonate (CAS) アッセイにより、*M. capsulatus* が REE 欠乏条件 (CeCl<sub>3</sub> 0.03 μM 以下) でのみ REE キレート物質を放出していることが示された。REE 添加条件と欠乏条件で *M. capsulatus* を培養しトランスクリプトーム解析を実施した結果、欠乏条件で高発現する遺伝子として MCA\_1883 (non-ribosomal peptide synthetase) が検出された。構造予測から機能を推定する Phyre2 を用いた解析により、MCA\_1883 は鉄キレート物質であるエンテロバクチンの合成酵素との相関が推定され、REE キレート物質合成への寄与が考察されている。

### 3) REE のプロテアーゼおよびその生産菌への影響

REE 含有酵素として明確に証明がなされているのはこれまで MDH のみである。しかし MDH において REE が Ca の機能を代替していることから、Ca 含有酵素のなかに REE 含有酵素であるものが含まれているという仮定のもと研究が実施された。本論文では Ca 含有酵素であるプロテアーゼを対象とし、REE の効果を調べた。Ca もしくは REE (Sc, Ce, Dy) を添加したスキムミルク含有培地でプロテアーゼ生産菌を集積培養し、16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンシングによる菌叢解析を行った結果、REE の添加により菌叢が大幅に変化することが明らかにされた。集積物からプロテアーゼ生産能が高い微生物を単離した結果、*Stenotrophomonas* 属、*Chryseobacterium* 属に属する 5 株を単離した。カゼイン添加 SDS-PAGE により一部の単離株の生産するプロテアーゼを検出した。上清中のプロテアーゼ混合物に Ca もしくは REE を添加し活性を測定した結果、一部の REE 添加で活性の上昇が観察され、REE が酵素に含有されていると考察している。

以上、本論文ではメタン酸化細菌およびプロテアーゼ生産菌を対象とし REE の効果について研究された。温室効果ガスであるメタンの分解に大きく寄与しているメタン酸化細菌について初めて不溶性 REE 利用を実証したこと、同定にまでは至らなかったがそのメカニズム (キレート物質の生産) の一端を解き明かしたこと、また産業上の有用酵素であるプロテアーゼが REE を含有することで機能が変化する可能性を提示できたこと、は科学的小および応用的観点から大きな成果である。

よって審査員一同は、Xie Ruoyun が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。