

学 位 論 文 の 要 旨

氏 名

梶 健太郎

学位論文題目

共生窒素固定細菌*Frankia*の遺伝学的研究手法の確立

遺伝学的手法は、特定の生命現象に関わる遺伝子を同定するために広く用いられる強力な方法である。本論文では、共生窒素固定細菌*Frankia*において窒素固定や共生に関わる遺伝子の同定のため、遺伝学的研究手法の確立を目指した研究の成果をまとめた。

第一章は、序論と研究の概略である。窒素固定の原理と窒素固定細菌、共生窒素固定細菌および、*Frankia*の生態について記述した。窒素は生物に必須の元素である。大気中にはおよそ78%の窒素が含まれるが、それを同化するためにはアンモニアに変換しなくてはならない。この反応を窒素固定といい、真性細菌と古細菌に属する窒素固定細菌が行う。窒素固定細菌の中には他の生物と共生関係を築くものがあり、マメ科植物と共生する根粒菌がよく研究されている。*Frankia*はアクチノリザル植物と呼ばれる8科25属に及ぶ幅広い木本植物と共生する放線菌である。同じ共生窒素固定細菌でありながら、*Frankia*は根粒菌とは多くの相違点をもち、その共生の仕組みは興味深い研究課題である。しかし根粒菌とは異なり、*Frankia*の共生についての遺伝子レベルの知見は極めて少ない。本論文ではこの問題を解決すべく、*Frankia*の遺伝学的研究手法の確立に取り組んだ。

第二章では、*Frankia* sp. CcI3株の形質転換法の確立について記述した。CcI3株はゲノムサイズが小さく培養が比較的容易であることから、モデル株として用いられている。しかし、CcI3株ゲノムのGC含量は70.1%と非常に高く、プロモーター配列やコドン使用頻度の違いから一般的に用いられるマーカー遺伝子の発現が困難と予測された。

よって私は、フランキア自身の高発現遺伝子のプロモーターとフランキアにコドン使用頻度が近い抗生物質耐性遺伝子および蛍光・発光レポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を作製した。これらを含むコンストラクトDNAをエレクトロポレーション法によりCcI3株細胞に導入することにより、形質転換を試みた。導入DNAを維持するため、相同組換えやインテグラーゼを用いた染色体への組込み、*Frankia*の染色体の複製起点を含むプラスミド等を検討した。これらの試みにより、一過的ながら世界で初めて抗生物質耐性を示す形質転換細胞を得ることができた。しかし、それらを安定に維持することはできなかった。

第三章では、CcI3株のプロトプラスト化の試みについて記述した。*Frankia*は一般的な放線菌と同様に多細胞性の菌糸として生育する。形質転換体の単離のためには菌糸の単細胞化が有効だと考えた。放線菌において、グリシンを培地に用いることで細胞壁が分解されやすくなるという報告がある。そこでプロトプラスト化に用いるCcI3株の前培養に添加するグリシンの最適濃度を検討した。またリゾチーム、ラビアーゼ、アクロモペプチダーゼといった他の放線菌で実績のある様々な細胞壁溶解酵素を用いてCcI3株のプロトプラスト化を試みた。孔径5 μm のフィルターを用いて遠心ろ過することによりプロトプラストを精製した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いてDNAを染色することによりプロトプラストを観察した。

第四章では、*Frankia*の突然変異体の単離について記述した。*Frankia*の菌糸をそのままスクリーニングに用いた場合、機能欠失型の変異細胞が菌糸中に含まれていたとしても、その表現型は優性な野生型の表現型に隠されてしまうため、突然変異体の単離は困難だった。そこで私はこの問題を解決し、菌糸のままの*Frankia*を用いて突然変異体を単離する方法を開発した。*Frankia*は菌糸の先端の細胞が分裂して伸長する。変異原処理した菌糸を培養することにより、菌糸の先端に変異細胞が連なった状態にした。これらを超音波により断片化し、孔径5 μm のフィルターでろ過することで、同一遺伝子型の変異細胞からなる菌糸断片を濃縮した。ろ過後の菌糸断片から形成したコロニーのゲノム配列を次世代シーケンサーで解析したところ、

解析した全てのコロニーは単一の変異遺伝子型の細胞で構成されていることがわかった。この変異コロニー集団をスクリーニングし、窒素欠乏培地において増殖の遅い株を1株単離した。アセチレン還元法を用いて野生株と窒素固定活性を比較した結果、この株は窒素固定能が低下していることが分かった。さらに色素合成に異常を示す突然変異株も3株単離した。CcI3株は茶色の色素を産生するが、これらの変異株は色素を産生できず白色を呈した。以上の結果から、本研究で私が開発した方法は、機能欠失型変異体のスクリーニングに有用なことが分かった。

第五章では、第二章から第四章を総括した。突然変異体の単離法の開発には成功した。しかし安定な形質転換体を得る方法は確立できなかったことから、野生型遺伝子を用いた一般的な相補実験による変異原因遺伝子の同定は現状では困難である。しかし研究開始当初と異なり、現在は次世代シーケンサーにより容易にゲノム配列を解析できる。特定の変異形質（窒素固定能欠損など）を持つ*Frankia*の変異体と、それから得られた復帰変異体のゲノム配列を解析して比較することにより、変異原因遺伝子の特定が行えると期待される。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Establishment of Genetic Methods in a Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacterium *Frankia*

Name: Kentaro Kakoi

Genetic approach is a general procedure for identification of genes involved in particular biological phenomena. In this thesis, I attempted to establish methods to realize genetic approach in a symbiotic nitrogen (N₂)-fixing bacterium *Frankia*.

Chapter 1 comprises general introduction and overview of the research. N is an essential element for all living organisms. N₂ gas in the atmosphere is necessary to be converted to ammonium when assimilated by organisms. This process is called “N₂ fixation” and conducted by N₂-fixing bacteria belonging to eubacteria and archaea. Some N₂-fixing bacteria establish symbiosis with plants. *Frankia* is a N₂-fixing multicellular actinomycete which establishes root-nodule symbiosis with actinorhizal plants. *Frankia* exhibits many different features with rhizobia but *Frankia* genes involved in symbiotic N₂ fixation are not well-characterized. To solve this problem, I tried to establish genetic methods in *Frankia*.

In chapter 2, I described establishment of transformation method of *Frankia* sp. strain CcI3. I tried to transform CcI3 by electroporation using donor DNAs containing fluorescence-, luminescence-, and antibiotic-resistance marker genes whose codon usage pattern is similar to *Frankia*'s. The donor DNAs were tried to be integrated into chromosome by homologous recombination and integrase, or to be maintained as a plasmid containing replication origin of *Frankia* chromosome.

In chapter 3, I described generation of protoplast using various cell wall lysis enzymes. As *Frankia* is a multicellular actinomycete, I expected use of single cells is effective for isolation of transformants.

In chapter 4, I described isolation of mutants of *Frankia* using hyphae. Fragments of *Frankia* hyphae were mutagenized and cultivated to arrange cells with identical genotype at the tips of hyphae. These hyphae were fragmented again and short hyphae fragments expected to contain only cells with an identical genotype were enriched by filtration with 5-μm pores. Genomes of the colonies formed from the filtered hyphae were analyzed by next generation sequencer. In all of the colonies, substitution mutations were detected. I isolated mutants defective in N₂ fixation and pigment synthesis. These results demonstrated usefulness of our method for isolation of loss-of-function mutants.

In chapter 5, results of the chapter 2 to 4 were summarized. I succeeded in isolation of mutants. But stable transformants were not obtained. Therefore, it is difficult to identify genes responsible for mutant phenotype by complementation with wild-type genes. Nowadays, next generation sequencer, which can determine whole genome sequence easily, is available. I expect that such responsible mutations can be identified by comparing the genome sequences of a mutant and revertants.