

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第401号	氏名	梶 健太郎
審査委員	主査	九町 健一	
	副査	内海 俊樹	伊東 祐二
		笠井 聖仙	

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

## 審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等をもとに学位論文審査を実施した。本論文は共生窒素固定細菌*Frankia*の遺伝学的研究手法の確立について述べたもので、全文5章より構成されている。遺伝学的研究手法は、任意の生命現象に関わる遺伝子を同定・単離するための標準的な手法である。研究対象の生命現象に欠陥を示す突然変異株をスクリーニングし、その変異表現型の原因となる遺伝子を同定するという手順からなる。*Frankia*は窒素固定能を持つ放線菌で、樹木の根に共生してその生育を促進する。しかし遺伝学的解析に必要な研究手法が確立されておらず、共生や窒素固定に関わる遺伝子の多くが未知のままである。

第1章は序論である。窒素固定の原理や窒素固定細菌、*Frankia*の共生窒素固定などについて説明した。

第2章では*Frankia*の形質転換法の確立について述べている。形質転換は、突然変異株からその変異表現型の原因となる遺伝子を同定する際に必要とされる手法である。申請者は、ゲノムのGC含量が極端に高い*Frankia*では、一般的な細菌で用いられるようなマーカー遺伝子が発現しにくいと予測し、*Frankia*で高い活性を示すプロモーターや抗生物質耐性遺伝子を探索し、それらを連結した融合遺伝子を作製した。これらを用いることにより、抗生物質耐性を示す*Frankia*細胞を得ることに成功した。これは*Frankia*を形質転換した世界で初めての報告である。

第3章では、形質転換体の単離培養や突然変異体のスクリーニングに有効である、菌糸のプロトプラスト化による単細胞化について検討している。

第4章では、*Frankia*の突然変異体の単離法の開発について述べている。*Frankia*は多細胞の菌糸として生育するため、仮に菌糸に突然変異細胞が含まれたとしても、周辺の野生型細胞が示す優性な表現型に覆い隠されてしまい、それを単離することができなかった。申請者は、超音波による断片化とフィルターによるろ過を組み合わせることで、単一遺伝子型の変異細胞のみからなる菌糸を濃縮する新規な方法を開発した。この方法を用いて、実際に色素合成や窒素固定に関わる突然変異株を複数単離することに成功した。ゲノムシーケンスにより、変異表現型の原因である可能性のある遺伝子のリストアップも行った。

第5章は総括であり、開発した手法の応用により期待される今後の研究展開や、改善すべき問題点について述べている。

以上、本論文では*Frankia*において遺伝学的な研究を行うために必要な基盤技術を確立した。これらの手法を活用することで、*Frankia*の共生や窒素固定に関わる遺伝子を同定・単離することが可能となり、共生や窒素固定の分子機構の多様性や進化についての新しい知見を得る可能性を拓いた。よって、審査委員会は博士（理学）の学位論文として合格と判定する。