

## 学位論文の要旨

氏名

山浦 真稔

学位論文題目

窒素固定細菌 *Frankia* とアクチノリザル植物との共生の分子遺伝学

土壌細菌フランキアは、モクマオウ、グミ、ヤシャブシなどのアクチノリザル植物と総称される植物と共生して窒素固定を行う。フランキアのゲノム解析が終了し、分子遺伝学的手法により窒素固定や共生に必要な遺伝子の同定やその機能解析を行う下地が整った。本論文では、フランキアの遺伝子発現の解析に新しい手法を取り入れ、窒素固定に関わる遺伝子についての新知見を得た。また、形質転換の宿主となる新規な栄養要求性変異株の作出に成功し、遺伝子の機能解析に必須である形質転換系の確立に向けて大きく前進した。

第1章では、一般的な生物窒素固定のメカニズムと窒素固定細菌の特徴および、フランキアとアクチノリザル植物との共生窒素固定について概説した。

第2章では、フランキアの単生での窒素固定機構についての研究結果を述べた。フランキアでは、窒素固定時に発現が上昇する遺伝子の報告は少なく、窒素固定能誘導の分子メカニズムについては不明な点が多かった。そこで、suppression subtractive hybridization (SSH) を用いて窒素固定時に誘導される遺伝子の同定を試みた。SSH法は元来、真核生物に適用される手法であり、原核生物での遺伝子発現解析に用いられた例はなかった。本論文では、total RNAから試験管内で真核生物様のmRNAを調製することで、原核生物であるフランキアにSSH法を応用することに成功した。

フランキアのSSHライブラリーから、単生窒素固定時に誘導される23遺伝子を同定した。その中には、エネルギー代謝、翻訳、金属イオンの取り込み、ニトロゲナーゼの生合成に関与する遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の窒素固定能誘導における機能について考察した。また、7つの機能未知の遺伝子が含まれており、フランキアに特異的な窒素固定機構の存在が示唆された。

第3章では、フランキアの形質転換系の確立について述べた。窒素固定時に発現変動する遺伝子が必ずしも窒素固定に関与するとは限らない。そのため、形質転換によりこれらの遺伝子の破壊株を作製し、窒素固定に及ぼす影響を調べる必要がある。しかし、フランキアの形質転換系は未だ確立されていない。そこで、これまでの報告を再検討して問題点を明らかにし、フランキアのウラシル栄養要求性変異株を宿主として、自身のピリミジン生合成系の遺伝子*pyrF*を選択マーカーとした形質転換を試みた。ウラシル要求性変異株を単離するため、フランキアCcI3株をethyl methanesulfonate (EMS) で変異処理し、5-fluoroorotic acid (5-FOA) を用いたポジティブスクリーニングを試みた結果、7株の5-FOA耐性株を単離した。そのうち3株は明瞭なウラシル要求性を示し、それらの*pyrF*には1塩基欠失によるフレームシフト変異が生じていた。次に、*pyrF*を選択マーカーとして相同組換えコンストラクトDNAを作製し、エレクトロポレーションにより*pyrF*変異株 (CcI3E21株) に導入した。最小培地にて形質転換体の選抜を試みたが、形質転換体を単離することはできなかった。しかしウラシル要求性変異株を利用すれば、形質転換体と復帰突然変異体とを簡単に区別できることが明らかとなった。形質転換体が得られなかった原因と、今後の展望についても考察した。

第4章は、本論文および参考論文で得られた知見をもとに、フランキアが単生および共生時に行う窒素固定の機構について、他の窒素固定細菌との比較を交えながら考察した。また、フランキアの窒素固定や、アクチノリザル植物との共生への関与が示唆される遺伝子について考察した。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第356号	氏名	山浦真稔
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	伊東 祐二	坂井 雅夫
		有馬 一成	
<p>学位論文題目 <b>Molecular genetics of <i>Frankia</i>-actinorhizal plants symbiosis</b></p> <p>(窒素固定細菌<i>Frankia</i>とアクチノリザル植物との共生の分子遺伝学)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文および論文目録等をもとに、学位論文審査を実施した。本論文では共生窒素固定細菌フランキアを実験対象として、窒素固定能の誘導に関与する候補遺伝子の同定と、それらの機能解析に必要な形質転換法の確立に取り組んだ。本論文は、4章から構成されている。</p> <p>第1章では、序論として生物窒素固定の基本的なメカニズムと窒素固定細菌の特徴および、フランキアとアクチノリザル植物との共生窒素固定について概説した。</p> <p>第2章では、元来真核生物に特化した手法だったsuppression subtractive hybridization (SSH) 法をバクテリアに応用する方法を確立し、窒素固定能を発揮する際に特異的に誘導される数十の遺伝子の同定に成功した。</p> <p>第3章では、形質転換の宿主としてフランキアのウラシル要求性変異株 (<i>pyrF</i>遺伝子変異株) を単離した。変異株に対し、野生型の<i>pyrF</i>遺伝子をマーカーとして形質転換を試みた。結果的には形質転換体の単離には至らなかったが、失敗の原因と改善すべき問題点を明らかにした。</p> <p>第4章では、フランキアが単生および共生時に行う窒素固定の機構について他の窒素固定細菌との比較を交えながら考察した。またフランキアの窒素固定や、アクチノリザル植物との共生への関与が示唆される遺伝子について考察した。</p> <p>SSH法は、特定の生理条件で誘導される遺伝子を同定できる簡便・安価な方法として広く知られているが、これまで原核生物には適用できなかった。本論文では、原核型のmRNAを試験管内で真核型に変換することにより、原核生物でもSSH法を利用可能にした。本法のインパクトは高く、論文出版の直後から次々と別刷りの依頼が来た。また、これを用いて同定された窒素固定細胞特異的な遺伝子は、これまで他の窒素固定細菌では見つかっていない新規なものも含み、フランキア特有の窒素固定制御機構の存在が示唆された。フランキアの形質転換は数十年来多くの研究者が試みてきたが、未だ成功していない。その原因として、フランキアの生育が極めて遅く抗生物質が失活してしまうこと、ゲノムのGC含量が極めて高く一般的なマーカー遺伝子が発現しないことなどが考えられた。本論文で試みた方法はこれらの問題点を解決するものであり、従来の抗生物質耐性遺伝子を用いる方法よりもより良い実験系である。残念ながら形質転換法の確立には至らなかったが、解決すべき問題点が明瞭となり、今後の研究の基盤としての価値がある。また、変異部位が明らかに変異株がフランキアで単離されたのは、本論文が世界で初めてのことであり、今後の研究の展開に大きく貢献することが期待できる。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。</p>			

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第356号	氏名	山浦真稔
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	伊東 祐二	坂井 雅夫
		有馬 一成	

2011年2月10日に行われた博士論文発表会において、審査委員を含む約30名の教員及び学生の前で、学位申請者 山浦真稔 氏による学位論文発表会が開催され、その内容及び関連事項について以下に示すような質疑応答が行われた。いずれについても的確な回答を得ることができた。

Q1. 同定された窒素固定状態のフランキアで誘導される遺伝子のうち、これまで他の窒素固定細菌で報告がないものはあったか？

回答：報告例がない新規遺伝子が含まれていた。その多くはhypothetical proteinだった。そのうちのひとつはフランキアに特有な遺伝子で、窒素固定時に1000倍以上の活性化を受けていた。何か重要な役割を担う可能性が高いと考えている。

Q2. 野生型 $pyrF$ 遺伝子の導入によりウラシル要求性が相補された形質転換体の選抜を試みたが、そのような株は得られず、全て復帰突然変異体だった。つまり、復帰頻度の高さが形質転換の成功を阻んでいるのではないか。復帰突然変異体の出現頻度を減らすようなアイデアはないのか？

回答：復帰の頻度を下げる、あるいは、殆どゼロにする方法はある。現在宿主として用いているウラシル要求性変異株は、 $pyrF$ 遺伝子に1塩基欠失の変異を持つ。もっと長い領域の欠失変異（できれば完全欠失）を持つ変異株を作ることができれば、復帰の頻度は殆どゼロになると考えられる。そのような変異株は、相同組換えによるターゲティングもしくはX線などの欠失変異を誘発する変異原の利用により単離できると期待される。

Q3. ウラシル要求性が相補された株は全て復帰突然変異体と判断していたが、多細胞生物ゆえに野生型の細胞が混入していた可能性は考えられないのか？

回答：野生型細胞が混入した可能性は考えられない。次世代シーケンサーにより、宿主株ゲノム中に $pyrF$ 遺伝子以外の変異部位をいくつか同定した。ウラシル要求性相補株について、それらの部位が変異型か野生型かを確認したところ、全て変異型だった。この結果は、野生型細胞の混入の可能性を完全に否定するものである。

以上のことから審査委員会は、申請者が大学院博士後期課程修了者としての学力並びに見識を有するものと認め、博士（理学）の学位を与えるに足りる資格を有するものと判定した。