

論文審査の結果の要旨

氏名 佃 美雪

本博士論文は、16S ribosomal RNA の置換変異を主体とした大腸菌リボソームの機能改変方法の確立を目指した研究であり、序章、第1章～第4章、終章により構成されている。

序章では、本論文の主題となるリボソームについての学術的背景、リボソーム改変技術の背景、さらにリボソーム改変に基づく微生物育種への可能性について述べられている。

第1章では、研究室内でプロトタイプとして開発されていた「大腸菌 16S rRNA 遺伝子置換技術」のハイスループット化に向けた種々の実験改良に関して記載してある。異種 16S rRNA 遺伝子を環境メタゲノムより効率的に抽出するための PCR プライマーの設計、カウンターセレクション操作の簡略化、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドの選択薬剤の変更など、「RINSPEX 法」として確立するまでの経緯について述べられている。

第2章では、大腸菌 16S rRNA を置換しうる異種 16S rRNA の進化系統的な限界を探索することを目的に、RINSPEX 法により大規模な 16S rRNA 遺伝子置換大腸菌株ライブラリーを構築した。構築したライブラリーをハイスループットにスクリーニングし、微生物系統分類上の「門」を超えたアシドバクテリア由来の機能性 16S rRNA を見出した。遺伝子の相同性は 78%程度であり、300 塩基以上の相違があっても大腸菌リボソームは許容することを示した。

第3章では、第2章で得たアシドバクテリア門由来の 16S rRNA 遺伝子の機能解析をドメインキメラ解析及び点変異解析により行った。その結果、アシドバクテリア門由来の 16S rRNA を含むリボソーム機能の低下は、3' マイナードメインの変化によるサブユニット間相互作用の低下に起因することを見出した。また 3' マイナードメイン内のわずか 2 塩基置換により、増殖倍化速度の点で大腸菌 16S rRNA を含む株と遜色ないレベルにまで復帰することを示した。このことは大腸菌 16S rRNA とアシドバクテリア門由来の 16S rRNA を分かつ 300 以上の塩基の大半が機能的にほぼ中立であることを示唆している。

第4章では、16S rRNA 遺伝子が置換された大腸菌変異株の表現型変化を、フェノタイプマイクロアレイ解析により検証した。大腸菌変異株の表現型が様々に変化すること、試験項目によっては、元株以上の活性を示すことが確認され、16S rRNA 遺伝子の置換が宿主株の改良につながり得ることが示された。

終章では、第1章から第4章までを通しての結果が総括され、新たな学術課題、技術課題について、今後の展望として述べられている。

上記の通り、本研究成果は、従来、保守的な分子の代表格として扱われてきたリボソームに対する見方を一変させた点、リボソームの機能とともに宿主機能の改変までの道筋をつけた点で高く評価される。

なお、本論文 第1章から第4章は宮崎健太郎との共同研究であり、第1章の一部（アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによるカウンターセクション法の開発）は、中島信孝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（科学）の学位を授与できると認める。

以上1336字