

論文審査の結果の要旨

氏名 岩瀬 忠行

本論文は本文5章と付録3章からなり、第1章は序論、第2章は動物実験に供試するための菌株の選定とその特性解析、第3章はマウス腸内における窒素固定細菌についての基礎的検討、第4章は窒素固定細菌定着マウスへの¹⁵N₂暴露実験 (*in vivo* 実験)、第5章は結論から構成されている。付録1は窒素固定細菌の全ゲノム解読、付録2は腸内細菌叢を構成する細菌群からのATP分泌細菌の分離と同定、付録3は窒素固定遺伝子欠損株におけるペリクル形成能の予備的検討からなる。

第1章では、現在まで知られている窒素固定細菌と動物との共生関係についての先行研究をレビューし、哺乳類における腸内での窒素固定の可能性を検証するために必要な菌株の選定条件や、実験系の構築について議論している。取扱いが容易な通性嫌気細菌であり、植物の内部や昆虫の腸内において窒素固定することが報告されており、さらにヒトを含む哺乳類の腸内からも分離される腸内細菌科に属する窒素固定細菌が候補として挙げられる。

第2章では、窒素固定細菌を用いた動物実験を行うための第一段階として、菌株の選定とその特性解析を行った。最初に、ヒト分離保存株について窒素固定遺伝子の保有に関する検討と遺伝的改変の可能性を示唆する薬剤耐性に関する検討を行った。また窒素固定酵素をコードする遺伝子を破壊した株（変異株）を作出し、窒素固定遺伝子保有株（野生株）の生物学的窒素固定能を水素ガス検出法で間接的に確認した。さらに、生物学的窒素固定能を確認した後、無窒素培地でこれらの菌を培養し、遺伝子破壊株では増殖が見られないのに対し、野生株では顕著な増殖があることを確認した。

第3章では、上記で選定した菌株を用いた動物実験を行った。第一に、マウス腸内へ菌が定着できるかどうかについて検討を行い、無菌マウスでは安定して腸内に固定することを見いだした。そしてマウス腸内で窒素固定遺伝子を発現するかどうかについて、腸内容物での窒素固定遺伝子 *nifH* の発現から確認した。さらに、上記の実験に引き続き、窒素固定細菌を含むマウス腸内容物に、分子状窒素を固定する能力について ¹⁵N₂ を用いた *ex vivo* 実験によって確認した。

第4章では、マウス腸内で窒素固定が起こるかどうか、そしてもし起こ

るのであれば、その固定された窒素がマウスに利用されるかどうかについて¹⁵N₂を用いた *in vivo* 実験によって検証した。新たに本研究で開発した閉鎖型かつ内部空気循環型の特型インキュベータシステムを用いて、¹⁵N₂ 雰囲気下において窒素固定細菌を定着させたマウスを飼育し、大気由来の¹⁵N が体組織に取り込まれるかどうかを検討した。その結果、¹⁵N₂ 暴露マウスでは、通常大気で同様に飼育されたマウスよりも肝臓、腸管、腸内容物では有意に高い窒素同位体比を示したが、体毛では有意差はみられなかった。体毛は固定されたケラチンが代謝されないため、有意差が見られなかったと推測される。また、肝臓からは窒素固定細菌は検出されなかった。このことは、腸内において窒素固定細菌が固定した大気中の窒素分子を宿主であるマウスが利用していることを強く示唆した。

なお本論文の第3章と第4章は石渡賢治氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析およ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できる。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1376 字