

氏名(本籍)	宮坂篤
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博第516号
学位授与年月日	平成8年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農学専攻
学位論文題目	植物病原糸状菌 <i>Rhizoctonia solani</i> の プラスミドと新規タンパク質

論文審査委員(主査)	教授 江原 淑夫
	教授 日向 康吉
	教授 大瀧 保
	助教授 羽柴 輝良

論文内容要旨

植物病原菌の示す病原性は、宿主への侵入、宿主体内での寄生性の確立と増殖、病徴発現、さらには新たな宿主への伝搬といった諸能力が総合された結果はじめて発現される複合形質であると考えられている。植物病原細菌では、病原性を含む重要な遺伝形質が、プラスミドにコードされている場合が知られていることから、プラスミドを分子レベルで解析し、病原性発現機構を解明する試みがなされている。植物病原糸状菌においてもプラスミドの存在が明らかになり、現在までに20種以上の病原糸状菌でプラスミドが見いだされ、その大部分は線状でミトコンドリア内在性であることが明らかになっている。しかし、これらプラスミドの宿主細胞内における役割については、ほとんど明らかになっていない。

*Rhizoctonia solani*は広い宿主範囲を持つ土壌病原糸状菌で、菌糸融合の有無によって類別が行なわれる菌糸融合群(AG)で類別され、現在我が国では10群が知られている。ダイコン苗立枯病の発病が衰退した土壌から分離された菌糸融合第4群に属する生育異常株RI-64から2.7kbの線状プラスミド、pRS64が見いだされた。pRS64は同じ大きさのpRS64-1、-2、-3からなり、両末端がヘアピン・ループで連結したユニークな構造を持つプラスミドであることが明らかとなった。

本研究では、*R. solani*のプラスミドの機能および宿主細胞内における役割を解明し、病原性発現機構との関係を明らかにする一端として、我が国の野外から分離した*R. solani*の菌糸融合第1群から第6群までの菌株からプラスミドを検出し、プラスミドをDNA、RNAおよびタンパク質レベルから解析した。

1. 菌糸融合第1群から第6群までの菌株からのプラスミドの検出とその形態

菌糸融合第1群から第6群までの117菌株を供試して、プラスミドの検出を行った。検出されたプラスミドは、菌糸融合第1群では供試15菌株中から1菌株、第2-1群では供試6菌株中から0菌株、第2-2群では供試27菌株中から21菌株、第3群では供試17菌株中から10菌株、第4群では供試21菌株中から10菌株、第5群では供試16菌株中から4菌株、第6群では供試15菌株中から4菌株であった。プラスミドは1菌株から約2.2kbから6.6kbの大きさで、1種類から3種類検出され(Fig. 1)、各菌糸融合群で一定の大きさを有していた。

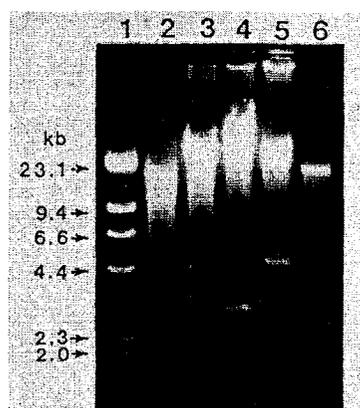


Fig. 1. Detection of plasmid DNAs. Total DNA from *R. solani* isolates (AG2-2 IV) was separated by electrophoresis and stained with ethidium bromide. Lane 1, λ DNA digested with *Hind*III; lane 2, isolate C-6; lane 3, C-100; lane 4, C-330; lane 5, H-16; lane 6, C-616.

Kleinschmidt法による電子顕微鏡観察から、検出されたプラスミドは線状であることが判明した(Fig. 2)。アルカリ変性による展開法で、pRS64の1本鎖環状分子が観察され、両末端にヘアピン・ループ構造を持つことが直接証明された。



Fig. 2. Electron micrograph of plasmid DNAs molecules from isolate of *R. solani*. Plasmid DNA molecules from isolate H-16 (AG2-2 IV). Bar indicates 1 μ m.

2. 菌糸融合第1群から第6群までのプラスミドの相同性

菌糸融合第1群から第6群までのプラスミドの相同性を各菌糸融合群のプラスミ

Table 1. Southern hybridization analysis of plasmid DNA from *R. solani* AG1 to 6 isolates probed with plasmid DNA from a representative isolate of each AG.

AG	ISG	Isolate	Size of plasmid (kb)	Source of probe:							
				C-527 (AG1)	C-94 (AG2-2 III B)	H-16 (AG2-2 IV)	P-7-1 (AG3)	RI-64 (AG4)	ST-8 (AG5)	HI-5-16 (AG6)	
1		C-527	4.5	[P] a)	-	-	-	-	-	-	-
2-2	III B	C-6	5.2	- b)	-	-	-	-	-	-	-
		C-94	3.2	-	[+]	-	-	-	-	-	-
		C-125	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-
			2.9	-	[P]	-	-	-	-	-	-
			2.2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C-328	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-
			2.9	-	[+]	-	-	-	-	-	-
			2.2	-	-	-	-	-	-	-	-
C-329	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2.9	-	[+]	-	-	-	-	-	-		
	4.7	-	-	-	-	-	-	-	-		
2-2	IV	A-14-1	2.9	-	[+]	-	-	-	-	-	
			4.8	-	-	[+]	-	-	-	-	
		BV-6	2.7	-	-	-	-	-	-	-	
			4.0	-	[+]	[+]	-	-	-	-	
			2.4	-	[+]	-	-	-	-	-	
		C-616	3.0	-	-	[+]	-	-	-	-	
			5.5	-	-	[+]	-	-	-	-	
		H-16	2.9	-	-	[+]	-	-	-	-	
			5.4	-	-	[+]	-	-	-	-	
			4.8	-	-	[P]	-	-	-	-	
2.7	-		-	-	-	-	-	-			
SH-17-24-1	4.8	-	-	[+]	-	-	-	-			
	4.2	-	-	[+]	-	-	-	-			
	2.7	-	-	[+]	-	-	-	-			
3	P-5	6.2	-	-	-	-	[+]	-	-		
		6.2	-	-	-	[P]	-	-			
		6.2	-	-	-	[+]	-	-			
4	GM-7	2.7	-	-	-	-	-	[+]	-		
		2.7	-	-	-	-	[+]	-			
		2.7	-	-	-	-	[P]	-			
5	RI-64	2.7	-	-	-	-	-	-	[+]		
		3.0	-	-	-	-	-	[P]	-		
		3.0	-	-	-	-	-	[+]	-		
		3.0	-	-	-	-	-	[+]	-		
501	501	3.0	-	-	-	-	-	-	[+]		
		3.0	-	-	-	-	-	[+]	-		
6		HI-5-16	5.2	-	-	-	-	-	-	[P]	

a) [P]: the entire length of a plasmid obtained from the representative isolates of one AG was used as the hybridization probe.

b) [+]: considerable sequence homology was observed; -: no sequence homology was observed.

ドをプローブにしてサザンハイブリダイゼーション法を用いて検討した。各プローブは、プローブが属する菌糸融合群のプラスミドとのみハイブリダイズし、プラスミドは菌株が属する各菌糸融合群内のプラスミドとのみ相同性を有することが明かとなった(Table 1)。このことより、*R. solani*のプラスミドは各菌糸融合群に固有な因子であることが示唆された。また菌糸融合第2-2群培養型ⅢBとⅣのプラスミドは相同性がなく、培養型ⅢBのプラスミドは分子量も相同性も異なるプラスミドが同一菌株に存在し、培養型Ⅳの菌株では分子量は異なるものの相同性を有するプラスミドが同一菌株に存在することが明かとなり、菌糸融合第2-2群のプラスミドは他の菌糸融合群に比べて複雑であることが考えられた。

3. 菌糸融合第1群から第6群までのプラスミドと全RNAとの相同性

プラスミドと相同な配列を持つRNA(相同RNA)の検出を各菌糸融合群のプラスミドをプローブとして、ノザンハイブリダイゼーション法を用いて検討した。プラスミドを保持している菌株の全RNAからプローブとハイブリダイズするバンドが検出され、相同RNAが存在することが明かとなった。相同RNAは、プラスミドDNAと同様に菌糸融合群毎に特徴的な分子量と相同性を有していた(Table 2)。菌糸融合第1群、第2-2群培養型Ⅳ、第3群、第5群、第6群の相同RNAは、プラスミドよりも大きかった。このことは、pRS64と相同性を有する領域が菌糸融合第4群のプラスミドを保持しない菌株の核ゲノム上に存在していることから、

Table 2. Northern hybridization analysis of total RNAs from *R. solani* AG1 to 6 isolates probed with the cloned fragment of plasmid DNA from a representative isolate of each AG.

AG	ISG	Isolate	Source of probe						
			C-527 (AG1)	C-330 (AG2-2)	H-16 (AG2-2)	R-468 (AG3)	RI-64 (AG4)	ST-8 (AG5)	HI-5-11 (AG6)
1		C-527	+ a)	-	-	-	-	-	-
		F3	-	-	-	-	-	-	-
2-2	MB	C-113	-	+	-	-	-	-	-
		C-125	-	+	-	-	-	-	-
		C-330	-	+	-	-	-	-	-
		C-155	-	-	-	-	-	-	-
2-2	IV	A-14-1	-	-	+	-	-	-	-
		H-16	-	-	+	-	-	-	-
		BV-3	-	-	-	-	-	-	-
		SH-17-24-1	-	-	+	-	-	-	-
3		C-564	-	-	-	-	-	-	-
		NR-3	-	-	-	+	-	-	-
		P-7-1	-	-	-	+	-	-	-
		R-468	-	-	-	+	-	-	-
		ST-9	-	-	-	+	-	-	-
4		GM-11	-	-	-	-	+	-	-
		R101	-	-	-	-	+	-	-
		RI-64	-	-	-	-	+	-	-
		RR5-2	-	-	-	-	+	-	-
		U-6	-	-	-	-	-	-	-
5		ST2-1	-	-	-	-	-	+	-
		ST-8	-	-	-	-	-	+	-
		W-3	-	-	-	-	-	+	-
		GM-1	-	-	-	-	-	-	-
6		HI-5-11	-	-	-	-	-	-	+
		NAT-3-1	-	-	-	-	-	-	-

a) +: considerable sequence homology was observed; -: no sequence homology was observed.

これらの相同RNAは核ゲノム由来であることも考えられる。一方、何らか特別な転写機構が存在している可能性も考えられた。

4. 菌糸融合第4群のプラスミド、pRS64と相同性を持つRNAの性状

相同RNAの性状解析を菌糸融合第4群のプラスミド、pRS64の0.5kbの相同RNAを用いて行った。相同RNAをpoly(A)⁻RNAとpoly(A)⁺RNAとに分画し、pRS64-2のクローン断片BE-3をプローブにしてノザンハイブリダイゼーションを行った。全RNAとpoly(A)⁻RNAがハイブリダイズし、相同RNAはpoly(A)⁻RNAであることが判明した(Fig. 3)。poly(A)鎖を持たないRNAとしては、ミトコンドリアゲノムのmRNAなどが知られ、相同RNAはユニークなタイプのRNAであると考えられた。

相同RNAのpRS64上における相同部位の推定をpRS64の種々のクローン断片を用いてノザンハイブリダイゼーションにより行ったところ、相同RNAのpRS64における相同部位は、pRS64-2の中央部EcoRIからXhoI部位(左末端から約1.2kbから1.7kb)までの領域であると推定した(Fig. 4)。相同RNAは、pRS64-1、-3を持つ菌株からも検出され、pRS64-1、-2、-3にそれぞれ相同RNAが存在すると考えられ、各pRS64は高い相同性を有することから、pRS64の相同RNAの相同部位は、同じ部位であることが推定された(Fig. 4)。



Fig. 3. Northern blot analysis of total RNA, poly(A)⁻RNA and poly(A)⁺RNA isolated from RI-64 using the cloned fragment of pRS64-2. Each RNA sample was denatured, separated by agarose gel electrophoresis and hybridized with the probe BE-3. Lane 1, total RNA; lane 2, poly(A)⁻RNA; lane 3, poly(A)⁺RNA; lane 4, cloned fragment BE-3.

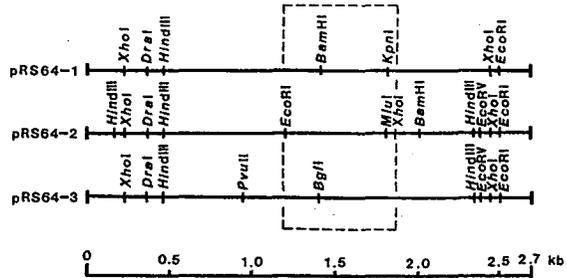


Fig. 4. Partial restriction maps of pRS64 and schematic representation of the plasmid-encoded transcript's region. The region is represented by the dotted box.

5. pRS64のORF解析

相同RNAからcDNAを合成し、塩基配列の決定を行い、pRS64にタンパク質がコードされているかを推定するためにORF解析を行った。塩基配列の決定は、poly(A)鎖を付加した後、オリゴ(dT)プライマーによるcDNAの合成から得られたクローンについて行った。決定した439ntの配列は、pRS64-1の塩基配列と完全に一致した。このことから、相同RNAはpRS64-1の転写物であることが示唆された。また、推定されたpRS64-1の転写開始部位の55nt上流には、大腸菌のプロモーター配列のコンセンサス配列および33nt上流には哺乳動物遺伝子におけるエンハンサーのコア配列が認められた(Fig. 5)。

```

961  ATTCAGCTTTGCTGAGTGTGCGGTGGCTCCTGAGGACACCCCAATAGTGGCAGTCCCTG  1003
1104 AGACTTTATCTCAGGGGCCCTATTGTGGGTGCTATTGACACCATTCAAGGGGGTAAIGG  1063
1064  AAGATCCGAGATAAAAGTGACTGCTTTATTTCATCTGAAAATAGTAAGAGATCCTCTCTC  1123
1124  GGATCCGCACTTCTATTAAACGAAGGATCATAGCCATTACCCCAACCGGTGACATTGTGT  1183
                                     M T L L
1184  CCAAAGGCTGGCGCCTTTACAACCGTCCAGACCGGAGGCTTCCGGGTGCAATAGTGT  1243
      P K A G A F T N R P D R R L P G V N S A
1244  TCAGGCCGTAGCTGGATGAAGCTGCCGTGCAAATCGGAAGCAATTGCCTCTCTATGCCG  1303
      S G R S W M K L P C K S E G N C L S M P
1304  TGAGGCATAGTCTAAGGAGTCACTCCCTTAGCGGCCCTAGACCGTCTACCTTTGGAACCC  1363
      W G I V L R S H S L S G L D R L P L E P
1364  CCAAAGGTAGCTAGTGGCCCTAGCATTTGAAAACCTAGGGCCACATATAGGCCCTGAGAT  1423
      P K V A *

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the functional region of pNH04 containing an open reading frame(ORF1-1). The presumed amino acid sequence encoded by ORF1-1 is shown from left to right below the nucleotide sequence. The consensus 'core enhancer' sequence, TGGAAAG, is located 33bp upstream of the start (▲). The consensus promoter sequence, TTGACA, is shown by a bold line. Numbers at the beginning indicate the portion of the sequence from the terminal XhoI site of the left side.

ORF解析は、pRS64がミトコンドリア内在性であることから、ミトコンドリアで使用されるコドン considering して行った。pRS64-1、-2、-3の同一の領域から、GTGを開始コドンとする68アミノ酸からなるORF1-1、ORF2-1、ORF3-1が推定された(Fig. 6)。各ORFから翻訳されると推定されるタンパク質は、分子量約7kDaで、アミノ酸配列の相同性は高く、それぞれ80%以上であった。これらのアミノ酸配列とデータバンク内の既知のタンパク質とはホモロジーは認められず、本ORFには新規タンパク質がコードされていることが示唆された。新規タンパク質のアミノ酸配列中に疎水性アミノ酸が多く存在していたが、典型的なシグナルペプチドの配列は認められなかった。新規タンパク質のC末端側に、protein-protein interactionおよびsignal transductionに関係するロイシン・リッチリピートのモチーフが認められた(Fig. 6)。

pMH04	M	T	L	L	P	K	A	G	A	F	T	N	R	P	D	R	R	L	P	G
pRS64-1	M	T	L	L	P	K	A	G	A	F	T	N	R	P	D	R	R	L	P	G
pRS64-2	M	T	L	L	P	K	A	G	G	F	T	N	R	P	D	R	R	L	P	G
pRS64-3	M	T	L	L	P	K	A	G	A	F	T	N	R	P	D	W	R	L	P	G

V	N	S	A	S	G	R	S	W	M	K	L	P	C	K	S	E	G	N	C
V	N	S	A	S	G	R	S	W	M	K	L	P	C	K	S	E	G	N	C
A	N	R	A	S	C	R	S	W	M	K	L	P	W	K	S	E	G	H	C
V	N	S	A	S	G	R	S	W	L	K	L	P	W	K	S	E	G	S	C

L	S	M	P	W	G	I	V	L	R	S	H	S	L	S	G	L	D	R	L
L	S	M	P	W	G	I	V	L	R	S	H	S	L	S	G	L	D	R	L
H	S	I	A	R	A	I	M	L	R	S	H	S	L	S	G	S	D	R	L
L	S	I	L	W	S	I	V	L	R	S	H	S	L	S	G	L	D	R	L

P	L	E	P	P	K	V	A	end
P	L	E	P	P	K	V	A	end
P	L	E	P	P	K	V	A	end
P	L	E	P	P	K	V	A	end

Fig. 6. Alignment of the amino acid sequences of pMH04, ORF1-1, ORF2-1, and ORF3-1. Matching amino acids are shown by boxes. Consensus sequence of leucine-rich repeat shown by bold type.

6. ORFから発現される新規タンパク質の検出

新規タンパク質の菌体中の存在について、本タンパク質に対する抗体を用いた免疫学的方法によって検討した。

抗体作製のための抗原を得るために、ORF1-1を発現ベクターpGEXを用いてグルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。ORF1-1は大腸菌内で正しく発現し、融合タンパク質のまま抗原として用いた。さらにより特異的に新規タンパク質を検出する抗体の抗原として、ORF1-1のアミノ酸配列に基づきN末端から35と33アミノ酸の2断片に分けてペプチドを化学合成した。各抗原を家兎に免疫し、抗体価の高い抗体を得た。作製した抗体は抗原に対して特異的に認識を行う抗体であった。

作製した抗体を用いて、新規タンパク質の検出をウエスタンブロッティング法を用いて行った。アルカリフォスファターゼ標識2次抗体を用いて検出(発色法)を行った結果、特異反応のバンドを明確に判断することはできなかった。このことから、発色法では新規タンパク質を検出することは困難であると考えられた。そこで、高感度で新規タンパク質を検出するために、抗ペプチド抗体(抗体N、C)をアフィニティ精製し、ECLウエスタンブロッティング法(発光法)を行った。pRS64を保持するR101、GM-11、RI-64菌株の全タンパク質から、抗体Nと反応する約12 kDaのバンドが検出された(Fig. 7)。抗体Cでは、R101菌株から12kDaのバンドが検

出された(Table 3)。このことから、pRS64のORFから新規タンパク質が発現し、実際に菌体内に存在していることが示唆された。このことから、植物病原糸状菌の線状プラスミドで初めて、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ以外の新規タンパク質が発現していることが示された。

GM-11、RI-64菌株では、抗体Cと反応するバンドが検出されなかった。このことは、抗体Cの反応性であると考えられ、両菌株では検出限界以下であると考えられた。

新規タンパク質の推定分子量は約7 kDaで、検出されたタンパク質は約12 kDaであった。このことは、新規タンパク質のアミノ酸配列中にトレオニン/セリンが多く存在していることより、糖鎖の付加が推定されたが、細胞内の何らかのファクターが結合しているとも考えられた。

まとめ

*R. solani*の線状プラスミドは、各菌糸融合群に固有な因子であることが明らかとなり、pRS64から新規タンパク質が発現していることが示唆された。プラスミドは菌糸融合群に固有の因子であることから、新規タンパク質は各菌糸融合群に存在する可能性が考えられた。菌糸融合群は、*R. solani*の宿主範囲と関連していることから、プラスミドがコードするタンパク質は、宿主認識など各菌糸融合群が保持する菌株の性質もしくは菌糸融合と何らかの関係を持っている可能性が示唆された。

本研究によって得られた知見は、今後のプラスミド研究に新たな方向、知見を与え、新しい感染制御の方策の確立に寄与するものと考えられる。

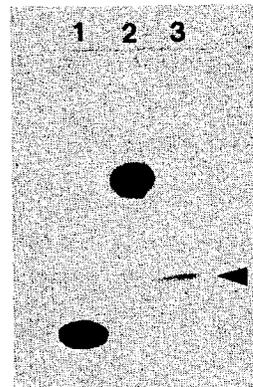


Fig. 7. Immunodetection of the ORF1-1 gene product. Total proteins extracted from isolate were electrophoresed and blotted onto PVDF membrane. Blot was probed using polyclonal antiserum raised against synthetic oligopeptide(35 amino acid residues from ORF1-1 N-terminal). Lane 1, N-terminal peptide; lane 2, GST-ORF 1-1 fusion protein; lane 3, proteins extracted from isolate R101. Arrow indicates the position of ORF1-1 gene product.

Table 3. Immunodetection of the ORF1-1 gene product.

Antibody	Isolate		
	R 1 0 1	GM-1 1	R I-6 4
N	+ ^{a)}	+	+
C	+	-	-

a) +: hybridization signal was observed;
-: no hybridization signal was observed.

論文審査の要旨

*Rhizoctonia solani*は広い宿主範囲をもつ土壌病原糸状菌で、菌糸融合の有無によって類別が行われる菌糸融合群で類別され、現在我が国では10群が知られている。ダイコン苗立枯病の発病が衰退した土壌から分離された菌糸融合第4群に属する生育異常株RI-64から2.7kbの線状プラスミド、pRS64が見いだされた。pRS64は同じ大きさのpRS64-1, -2, -3からなり、両末端がヘアピン・ループで連結したユニークな構造を持つプラスミドであることが明らかとなった。

本研究では、*R. solani*のプラスミドの機能及び菌体細胞内における役割を解明し、病原性発現機構との関係を明らかにする一端として、我が国の野外から分離した*R. solani*の菌糸融合第1群から第6群までの菌株からプラスミドを検出し、プラスミドをDNA, RNAおよびタンパク質レベルから解析した。

菌糸融合第1群から第6群までの117菌株を供試して、プラスミドの検出を行った。プラスミドは、1菌株から約2.2kbから6.6kbの大きさで、1種類から3種類検出され、各菌糸融合群で一定の大きさを有していた。Kleinschmidt法による電子顕微鏡観察から、プラスミドは線状であることが判明した。アルカリ変性による展開法で、pRS64の1本鎖環状分子が観察され、両末端にヘアピン・ループ構造を持つことが直接証明された。

菌糸融合第1群から第6群までのプラスミドの相同性を各菌糸融合群のプラスミドをプローブにしてサザンハイブリダイゼーション法を用いて検討した。その結果、プラスミドは各菌糸融合群内でのみ相同性を有することが明らかとなった。このことより、*R. solani*のプラスミドは各菌糸融合群に固有な因子であることが示唆された。

プラスミドと相同な配列を示すRNA（相同RNA）の検出を各菌糸融合群のプラスミドをプローブとして、ノザンハイブリダイゼーション法を用いて行った。検出した相同RNAは、各菌糸融合群毎に特徴的な分子量と相同性を有することが明らかになり、poly(A)⁻RNAであることが判明した。

相同RNAからcDNAを合成し、塩基配列を決定した。得られたクローンの塩基配列は、pRS64-1の塩基配列と完全に一致し、相同RNAはpRS64-1の転写物であることが示唆された。ORF解析から、pRS64-1, -2, -3の同一の領域から、68アミノ酸からなるORF1-1, ORF2-1, ORF3-1が推定された。各ORFから推定されるタンパク質は、分子量約7kDaで、アミノ酸配列の相同性は高く、データバンク内の既知のタンパク質とはホモロジーは認められず、新規タンパク質であることが示唆された。新規タンパク質には、protein-protein interactionおよびsignal transductionに関係するロイシン・リッチリピートのモチーフが認められた。

新規タンパク質の菌体中の存在について、本タンパク質に対する抗体を用いた免疫学的方法によって検討した。ORF1-1のアミノ酸配列に基づきN末端から35と33アミノ酸の2断片に分けてペプチドを化学合成し、家兎に免疫し、抗体価の高い抗体（抗体N, 抗体C）を得た。抗体はアフィニティ精製し、ECL法を用いたウエスタンブロッティングを行った。pRS64を保持するR101, GM-11, RI-64菌株の全タンパク質から、抗体N, 抗体Cと反応するバンドが検出され、新規タンパク質が菌体内に存在していることが示唆された。検出されたバンドの分子量は約12kDaであったことから、新規タンパク質には糖鎖もしくは細胞内の何らかのファクターが結合している可能性が考えられた。

*R. solani*の線状プラスミドは、各菌糸融合群に固有な因子であることが明らかとなり、pRS64から新規タンパク質が発現していることが示唆された。プラスミドは菌糸融合群に固有な因子であることから、新規タンパク質は各菌糸融合群に存在する可能性が考えられた。菌糸融合群は、*R. solani*の宿主範囲と関連していることから、プラスミドがコードするタンパク質は、宿主認識など各菌糸融合群が保持する菌株の性質もしくは菌糸融合と何らかの関係を持っている可能性が示唆された。

以上のように、本研究は*R. solani*のプラスミドの性状について多くの新知見を得たものであり、審査員一同は博士（農学）の学位に値する内容であると判定した。