

論文審査の要旨

|  |                |                  |       |
|--|----------------|------------------|-------|
| 博士の専攻分野の名称   | 博 士 ( 理 学 )    | 氏名               | 壺井 雄一 |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第①・2項該当 |                  |       |
| 論 文 題 目  |                |                  |       |
| <p>TALEN を用いた <i>Rhizopus</i> 属糸状菌における高効率遺伝子組換え技術の開発<br/>(Development of gene manipulation in the Mucorales fungus <i>Rhizopus</i> using TALENs)</p>   |                |                  |       |
| 論文審査担当者  |                |                  |       |
| 主 査  | 教 授            | 山 本 卓            |       |
| 審査委員   | 教 授            | 坂 本 敦            |       |
| 審査委員   | 教 授            | 林 利 憲            |       |
| 審査委員   | 准教授            | 坂 本 尚 昭          |       |
| 審査委員   | 准教授            | 佐 久 間 哲 史        |       |
| 審査委員   | 講 師            | 荒 添 貴 之 (東京理科大学) |       |
| 〔論文審査の要旨〕  |                |                  |       |
| <p>本論文では、第1章において「<i>Rhizopus</i> 属菌における TALEN の機能性の検証と遺伝子破壊技術の構築」、第2章において「<i>Rhizopus</i> 属菌における TALEN を用いた homology-directed repair を介した組換え技術の構築」に関する研究成果を記載し、総括において <i>Rhizopus</i> 属菌における本研究成果の重要性について述べている。</p> <p>第一章においては、ゲノム編集ツールの高活性型 TALEN を適用することを目的に <i>Rhizopus</i> 属糸状菌(<i>Rhizopus oryzae</i>)の宿主ベクター系を適用し、Platinum TALEN の効率的ベクター構築システムの開発を行った。<i>Rhizopus</i> 属糸状菌の RNA-seq 解析により、高発現システムに必要なプロモーターとして <i>ldhA</i> 及び <i>adh</i> プロモーターを同定し、TALEN 発現用プロモーターとして選択した。また、左右の TALEN 遺伝子を 2A 配列で連結した統合型ベクターのシステムを構築した。開発したシステムを用いて、トリプトファン合成遺伝子の一つである <i>trpC</i> 遺伝子座を標的とする Platinum TALEN 発現ベクターを作製した。さらに変異導入の効率化が報告されているエキソヌクレアーゼの共発現を行うため、<i>R. oryzae</i> の2種類のエキソヌクレアーゼオーソログ(<i>RoKem1</i> 及び <i>RoXrn1</i>)を同定した。Platinum TALEN とエキソヌクレアーゼの共発現によって、標的遺伝子座への中規模(数百 bp~700 bp)の欠失変異の導入が可能であることを証明した。また、これらの変異導入には DNA 二本鎖切断(DSB)修復経路のマイクロホモロジー媒介末端結合が関与することが示唆された。これら結果は、<i>Rhizopus</i> 属糸状菌においてゲノム編集技術を利用した欠失変異導入の世界で初めての報告である。</p> <p>第二章においては Platinum TALEN を用いた <i>Rhizopus</i> 属糸状菌での外来遺伝子のノックイン法の確立を目指した。本菌を用いた先行研究により、導入された二本鎖 DNA 断片は環状化・複製され、染色体外で比較的安定に保持されるため二本鎖 DNA ドナーを用いた相同組換えでのゲノム編集は困難であると予測された。そこで、Platinum TALEN による DSB の誘導と一本鎖ドナーDNAを用いたゲノム編集による遺伝子ノックインについて検討した。その結果、<i>Rhizopus delemar</i> において Platinum TALEN とエキソヌクレアーゼ、そして一本鎖ドナーDNAを用いることにより、通常用いられる二本鎖ドナーDNAで</p> |                |                  |       |

の環状化を有意に抑制し、遺伝子挿入株を取得することに成功した。さらに、*R. oryzae* においても同様の戦略で遺伝子挿入株を取得することに成功した。

本研究は、産業的に利用価値の高い *Rhizopus* 属糸状菌においてゲノム編集技術の適用を目指した研究であり、これまで既存の遺伝子組換え技術を用いても標的遺伝子の改変が困難であった *Rhizopus* 属糸状菌の問題を克服した重要な研究である。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学位論文評価基準を満たし、著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。