

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Genetic Analysis of Homologous Recombination-Mediated Gene Targeting in the Basidiomycota Yeast <i>Naganishia Liquefaciens</i>
著者(和文)	パルハットマルダン
Author(English)	Palihati Maierdan
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12140号, 授与年月日:2021年11月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,田中 寛,中戸川 仁,田口 英樹,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12140号, Conferred date:2021/11/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	Maierdan PALIHATI	
	氏 名	職 名	氏 名	職 名
論文審査員	主査 岩崎 博史	教授	藤田 尚信	准教授
	田中 寛	教授		
	中戸川 仁	准教授		
	田口 英樹	教授		

本論文は「Genetic Analysis of Homologous Recombination Mediated Gene Targeting in the Basidiomycota Yeast *Naganishia liquefaciens*」と題し、英文で記述され、8章より構成されている。

第一章「Introduction」では、分子遺伝学的解析における遺伝子ターゲティング法の重要性、遺伝子ターゲティングとDNA修復経路との関係、及び、担子菌類である*Naganishia liquefaciens*（ナガニシア酵母）について概説している。遺伝子ターゲティングは細胞のもつDNA二重鎖切断の修復能を利用する。そのため、真核生物で一般的に明らかになっているDNA二重鎖切断修復について、特に相同組換え経路と非相同末端結合経路や、両経路の主要遺伝子の機能を説明し、相同組換え経路が遺伝子ターゲティングに重要な役割をしていることを指摘している。さらに、従来の遺伝子ターゲティング法に加え、近年ゲノム編集技術として頻繁に用いられているCRISPR-Cas9法の原理を説明している。また、一般にモデル生物として多用されるパン酵母（出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*）や分裂酵母

（*Schizosaccharomyces pombe*）は子囊菌に属しており、これまでは担子菌に対する分子生物学的アプローチが極めて限定的であったことを指摘している。そのうえで、ナガニシア酵母をモデル生物として開発する重要性を主張し、そのためにナガニシア酵母の遺伝子ターゲティング確立とその遺伝学的基盤解析の必要性を指摘し本研究の目的を明示している。

第二章「Experimental Materials and Methods」では、本研究で用いた実験材料と実験手法の詳細を述べている。

第三章から第七章までは本研究で得られた結果について述べている。

第三章「Establishment of a genetic transformation system for *Naganishia yeast*」では、ナガニシア酵母では世界初となる形質転換法と遺伝子ターゲティング用ベクターを開発している。3種類の薬剤耐性マーカー遺伝子（*NAT*、*HYG*及び*NEO*）を用いて、4箇所の遺伝子座（*HIS3*、*ADE2*、*LEU2*、*TRP2*）を標的とし、マーカー遺伝子の両側に連結させる相同DNA鎖長を、それぞれの標的に対して80 bp、500 bp、1 kbの3種類用意し、遺伝子ターゲティングのモデル実験を行なっている。その結果、数%から20数%のターゲティング効率を示し、相同鎖の長いほうが高いターゲティング効率を示すと述べている。

第四章「Construction of a CRISPR-Cas9 system for genome editing in *Naganishia liquefaciens*」では、ナガニシア酵母細胞で機能するCRISPR-Cas9系を構築し、これを用いて上述の4座位に対して遺伝子ターゲティングを行っている。その結果、70~80数%までターゲティング効率が上昇することを示している。

第五章「Establishing gene complementation system for *Naganishia yeast*」では、ナガニシア酵母で相補性テストを可能とするための株の作成と、これを用いたパイロット実験を行っている。*RAD51*は組換え修復に重要な遺伝子であり、この欠損株は紫外線に高感受性を示すことが予想される。そこで、実際に確立した遺伝子ターゲティング法で*rad51*欠損株を作成しこの紫外線感受性を示したのちに、作成した相補性テスト系を用いて、野生型*RAD51*遺伝子によって紫外線感受性が相補されることを示している。

第六章「Genetic analysis for gene targeting in *Naganishia yeast*」では、遺伝子ターゲティングに影響を及ぼす遺伝子について解析した結果を示している。まず、非相同末端結合経路を*Ku*欠損変異によってブロックすると、従来法でもCRISPR-Cas9法でも、ターゲティングベクターの相同配列長に関係なく、ほぼ100%に近いターゲティング効率を示すことを発見している。さらに、相同組換えで特に重要な働きをする*RAD51*と*RAD52*遺伝子の影響を調べ、相同配列が短い場合*RAD52*の依存度が極めて高いこと、一方、*RAD51*は相同配列の長短に関わらずその欠損によるターゲティング効率の低下は軽度であること、また、*rad51rad52*二重変異株では長い相同配列でもターゲティングが全く検出されないこと、さらに、*Ku*欠損変異のバックグラウンドでターゲティング効率を上昇させた条件でも*RAD51*と*RAD52*の要求性の傾向は*Ku*⁺野生株と同様であることを示している。相同組換えとDNA修復は密接な関係がある

ため、これらの変異株の紫外線と電離放射線に対する感受性を調べ、2種類のDNA損傷処理に対して *rad52* 単独変異株ではほとんど感受性を示さないことを見出し、DNA修復における *RAD52* の要求性が子囊菌類酵母と全く異なり、脊椎動物の場合と類似していることを発見している。

第七章「Role of BRCA2 homolog, Brh2, in DNA repair of *Naganishia liquefaciens*」では、ナガニシア酵母においてヒト *BRCA2* ホモログ遺伝子 *BRH2* の発見し、そのDNA修復能について遺伝学的に解析して、*RAD51* と同じ修復経路で機能すると述べている。

第八章「Discussion」では、上記の実験結果を総括して、ナガニシア酵母のモデル生物としての可能性、開発したターゲッティング法、遺伝子ターゲッティングの分子機構について考察している。

以上を要するに、本論文は担子菌ナガニシア酵母の遺伝子ターゲッティングの方法論を確立するとともに、DNA二重鎖切断修復関連遺伝子のターゲッティングに対する影響を解析し、その遺伝学的基盤をあきらかにして担子菌の分子生物学の礎を開拓したものであり、理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。