

## 学 位 論 文 の 要 旨

近年、様々な分野で遺伝子組換え生物の開発が盛んに進められている。遺伝子組換え生物は、食糧問題、環境問題、エネルギー問題、医療問題など人類の抱える課題を解決する重要な鍵の一つとして期待されている。事実、微生物による医薬品や酵素製剤の大量生産が可能となり、また農作物の生産効率の向上に役立てられている。しかし、その一方で遺伝子組換え生物が野外環境へ拡散した場合、生物多様性や生態系へ及ぼす影響が懸念されている。これにより、遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために環境への負担を配慮したバイオセーフティーの考え方が求められるようになった。そこで、遺伝子レベルでの拡散防止策として条件致死性質の付与が有効であると考えた。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 由来の pSR1 プラスミドに備わっている部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導するシステムの確立を目指した。まず、一倍体細胞と二倍体細胞で細胞死の誘導システムを検討した。さらに、細胞死の効率を向上させるために細胞死の誘導時に出現する生存細胞の生存原因を解析し、システムの改善を行った。

一倍体細胞における細胞死の誘導を検討するため、第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位 (RS) を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GALI* プロモーターの制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するプラスミドを導入し、ガラクトース培養により第 IV 番染色体のセントロメア DNA の切り出しが誘導される株を作製した。次に、この細胞をガラクトースプレートで培養した結

果、生存率は  $1.4 \times 10^{-5}$  と大幅に低下した。RS が挿入されていない株やリコンビナーゼが欠損している株では、生存率は低下しなかった。また、ガラクトース液体培地では増殖が抑制され、生存率は培養時間に伴い経時的に低下した。この培養時の細胞でセントロメア DNA の切り出しが起こっていることは、染色体 DNA のサザン解析によって確認した。したがって、一倍体細胞で染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死が起こることを証明した。また、二倍体細胞では、第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導することで細胞死を起こすことができた。しかし、二倍体細胞は、一倍体細胞と比べ生存率が高くなる傾向が示唆された。そこで、二倍体細胞において、第 IV 番相同染色体に加え、第 V 番相同染色体からもセントロメア DNA の切り出しを誘導した結果、生存率が一倍体と同程度まで低下し、二倍体細胞において、複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しが有効であることが示された。以上の結果より、一倍体細胞と二倍体細胞で、染色体からのセントロメア DNA の切り出しにより細胞死を誘導するシステムを確立することができた。

しかし、細胞死を誘導しても生存細胞が僅かに出現するため、生存細胞の生存原因を解析し、細胞死誘導システムの改善を検討した。一倍体細胞においてプレート培養で第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に出現した 51 株の生存細胞クローンについて染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動解析、セントロメア近傍 DNA の PCR 解析、およびレコンビナーゼ発現プラスミドの機能解析などにより生存原因を検討した。その結果、74.5%のクローンは 2 個の RS のうち片方が欠失しており、これが原因で切り出しが起こらなかったことが示唆された。この欠失は共通の配列間 (5'-TCGA-3'配列間) で生じており、同時に 2 個の RS が欠失したものは認められなかった。また、セントロメア DNA の切り出しが起こったクローンは 3 株 (5.9%) 存在しており、これらのクローンはさらに詳細な解析を行った。その結果、第 IV 番染色体上には、*CEN4* は存在しておらず、左腕のテロメア近傍の *PHO13* 遺伝子や右腕のテロメア近傍の

*HSP31* 遺伝子は存在することが判明した。これにより、他の染色体との融合の可能性は極めて低いと考えられた。また、ウェスタンブロット法によって *Cse4p* の発現量は生存細胞と野生株でほとんど同じでセントロメア様領域は生存原因に関与していないと考えられた。したがって、ネオセントロメアの形成や他の染色体のセントロメアが挿入された可能性が示唆された。これらの知見は、非常に興味深い事象であり、核型進化の研究分野においても大いに貢献できる。生存細胞の解析から、主な生存原因は、片方の *RS* が染色体から欠失することで細胞死が誘導されなかったことが明らかとなった。また、*RS* の欠失は *RS* の両端に存在する共通配列を介して生じている可能性が示唆されたので、共通配列を改変した結果、生存率は  $2.3 \times 10^{-6}$  まで低下し、滅菌における無菌保証水準 ( $10^{-6}$  以下) 程度まで下げることで細胞死の誘導効率を改善することができた。

以上、*S. cerevisiae* をモデル生物として、部位特異的組換え系を利用し、染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導する新規のシステムを確立することができた。さらに、生存細胞が出現する主な原因を明らかとし、その原因に基づき生存細胞の出現を抑制することでシステムの効率を改善できた。

学位論文の審査および試験結果の報告

氏名 学位申請者	宮本 昭弘	主 査	久富 泰資	副 主 査 松崎 浩明 菊田 安至 福長 将仁
種別 評価	学 位 論 文			
審 査 要 旨	<p><u>題 目</u> 出芽酵母における染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死の誘導システムの確立と効率改善</p> <p>近年、様々な分野で遺伝子組換え生物が開発され、利用されている。遺伝子組換え生物が野外で拡散した場合に環境に及ぼす影響が懸念され、拡散防止が重要な課題となっている。本研究では、拡散防止に条件致死性質の付与が有効であると考え、出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> をモデル生物として細胞死を誘導するシステムを確立し、さらにシステムの効率改善を目指した。まず、一倍体細胞と二倍体細胞で部位特異的組換えを利用して染色体からセントロメアDNAを切り出すことで細胞死を誘導でき、細胞死の誘導システムを確立できた。この時、わずかな数の生存細胞が出現し、二倍体細胞の生存率は一倍体細胞より高いことを明らかにした。複数の染色体からの切り出しにより二倍体の生存率を一倍体と同程度まで低下できた。さらに、生存細胞の主な出現原因は、染色体から組換え標的的部位が欠失して切り出しが起こらないことを明らかにし、組換え標的的部位の改変により生存細胞の出現が抑制され(生存率: <math>2.3 \times 10^{-6}</math>)、細胞死の効率を改善できた。また、生存細胞の解析からセントロメアDNAの切り出しによってネオセントロメアの形成または他の染色体のセントロメアDNAの挿入などの核型進化現象が起こる可能性を示唆した。</p> <p>本論文の成果を精査した結果、生存率を減菌における無菌保証水準 (<math>1 \times 10^{-6}</math>)程度まで下げることが可能な新規の細胞死誘導システムを構築でき、このシステムは遺伝子組換え生物の拡散防止への応用が期待できると考えられる。また、生存細胞の解析で得られた知見は、核型進化の研究に大いに貢献できると考えられる。</p> <p>よって、本論文は博士(工学)の学位を授与するに値すると判断される。</p>			
	<p>試験 験</p> <p>博士課程における取得単位(生物工学特別演習10単位及び染色体工学講義6単位)、本研究に関連した参考論文の発表実績及び学位論文を審査した結果、博士課程修了者としての十分な学力があると認められた。よって、合格とする。</p>			