

氏名	羽城 周平		
学位の種類	博 士 (生物工学)		
学位記番号	博 甲 第 9483 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	コリネ型細菌を宿主とした組換えRNA分子の高生産基盤技術の開発		
主査	筑波大学准教授	博士 (工学)	平川 秀彦
副査	筑波大学教授	博士 (工学)	市川 創作
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	青柳 秀紀
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	宮前 友策

論 文 の 要 旨

本論文で著者は、RNAの機能性分子・材料として利用を現実的なものとするために、コリネ型細菌*Corynebacterium glutamicum*を宿主とした組換えRNAの高生産技術の確立を目的として行った一連の研究について述べている。

第1章において、著者は、研究背景および研究動向をまとめた上で、本論文全体の目的および意義について述べている。

第2章において、著者は、プラスミドの不和合性を選択圧として利用したスクリーニングによるpAM330由来高コピー数化プラスミドの取得について述べている。スクリーニングにより約10倍に高コピー数化した変異プラスミドが取得されており、コピー数の制御機構を明らかにすることにより、さらなる高コピー数化プラスミドを設計し、取得することにも成功している。

第3章において、著者は、抗生物質を選択圧として利用したスクリーニングによるpHM1519由来高コピー数化プラスミドの取得について述べている。スクリーニングにより10倍以上に高コピー数化したプラスミドが得られており、高コピー数化の要因についても明らかにされている。さらに、高コピー数化したプラスミドの利用は、組換えタンパク質生産の生産性を大きく向上させることも明らかにしている。

第4章において、著者は、RNA転写に適したプロモーターを発見することによりコピー数化プラスミドのRNA生産性を大きく向上させ、さらに*C. glutamicum*のRNase欠損株を利用することにより1本鎖RNAの高生産を実現したことについて述べている。

第5章において、著者は、第2章から第4章までに述べられている成果を利用することにより2本鎖RNA生産技術を開発し、その応用について述べている。本章で生産される2本鎖RNAは、RNA干渉減少により農作物の害虫として知られるニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctopunctata*) のアポトーシス阻害タンパク質の発現を抑制し、ニジュウヤホシテントウの生育抑制効果を発揮する。生産菌体の死活化およびRNA保護を目的とした処理を検討した結果、当該2本鎖RNA生産菌体は害虫生育抑制剤として利用できることを明らかにしている。

第6章においては、著者は、第2章から第5章までに研究成果を総括した上で、その社会的意

義および展望を述べている。

審 査 の 要 旨

pAM330由来プラスミドの高コピー数化においては、当該プラスミドにおけるコピー数制御機構を実験により明らかにした上で、変異による高コピー数化のメカニズムを明らかにしている。著者が発見した変異による高コピー数化およびそのメカニズムは新規な知見であるものの、コピー数制御機構自体は他のプラスミド系において既に明らかにされており、他のプラスミド系での適用について検討し、汎用性・普及性の高い研究へと展開することが期待される。pHM1519由来プラスミドに関しては、変異導入による複製開始因子Repのアミノ酸残基置換が高コピー数化を引き起こしたことが明らかにされている。さらに、二次構造予測によりRepのアミノ酸残基置換がDNAとの結合性に影響を与えたと推察されており、RepとDNAの相互作用について直接的に評価することにより確かな知見を得ることができれば、さらに高コピー数化したプラスミドの合理的な設計も期待できる。

著者は、コリネ型細菌に感染するバクテリオファージBFK20のDNAから、RNA転写に対して内在性プロモーターよりも強力なプロモーターを見出している。このプロモーターは組換えRNAだけでなく組換えタンパク質の生産性も大きく向上させると考えられ、*C. glutamicum*の物質生産用宿主の価値を大きく高めるものである。このプロモーターを導入した高コピー数化プラスミドは、2本鎖RNA特異的に分解するRNaseを欠損させた*C. glutamicum*株において高いRNA生産性を示しており、目的RNAの生産量は全RNA量の50%を超えることが明らかにされている。このように組換えRNAの生産性の向上には複数のアプローチを組み合わせることが有効であることを明らかにしており、培養条件の最適化などにより、さらなる生産性の向上も期待できる。

害虫特異的にRNA干渉現象を引き起こす2本鎖RNAを生産する*C. glutamicum*は、対象とする害虫に対して生育抑制効果を発揮することが明らかにされており、*C. glutamicum*を用いたRNA生産の農業分野における有用性が示されている。2本鎖RNAをより安全に実社会で利用するための検討事項を明確にするとともに適切な利用形態に関する検討を行うことにより、持続可能性を有する農業用薬剤や特定外来生物の駆除薬として実用化されることが望まれる。

令和2年1月16日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

上記の学位論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。