

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	NGUYEN XUAN DONG
論文題目	Analyses of <i>cis</i> -elements for the fundamental transcription in basidiomycetes (担子菌類の基本的転写に関わるシスエレメントの解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>一般に、遺伝子の発現は転写レベルでの調節を受けるが、それらは転写の開始から終結までの間に、核酸配列上のシスエレメントとそれと相互作用するトランスに働くタンパク質因子によって賄われることが知られている。木材腐朽菌は、自然界における炭素循環の鍵を握る役割を果たしているが、これらの生物における転写調節の基本的な分子メカニズムは殆ど理解されてきていない。このことは、多くの木材腐朽菌が属している担子菌類では、適切な組換え遺伝子発現評価系が存在していなかったことに起因している。本研究では、担子菌類における基本的な転写に必要なとされるシスエレメントについて、一過性の形質転換および遺伝子ノックインを用いた評価法により、解析を行った。</p> <p>まず、第一章では選択的リグニン分解菌<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>を用いた一過性の導入遺伝子発現システムを用いて、典型的なTATA配列を有さないβ_1-<i>tubulin</i>遺伝子のプロモーターにおけるコア配列として、14 bpの特異的な配列（以降、β_1-<i>tubulin</i> core promoter element = BCEと呼ぶ）ならびにCT-richな配列が必須である事を同定した。続いて、データベース上に公開されている多数の担子菌類のβ_1-<i>tubulin</i>遺伝子のプロモーター領域の相同性検索を行ったところ、解析された14個の遺伝子すべてに、向きの違いは有っても必ずBCE配列と相同性が高い配列が存在し、そのやや下流にはCT-rich配列が存在している事が明らかになった。人工的にBCE配列を逆位挿入した組換えプロモーターを作成し、一過性の<i>hph</i>遺伝子の発現を試したところ、順向きの50%程度の頻度でハイグロマイシン耐性株を産生することが明らかにされた。さらに、染色体上での機能の確認を行う為、遺伝子ターゲティング系の確立しているヒラタケ<i>Pleurotus ostreatus</i>を用いて、ゲノム上の<i>fcyI</i>遺伝子の位置にルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに持つ試験配列を導入して、BCE配列の有無によるルシフェラーゼ活性の発現の比較を行ったところ、BCE配列を欠くノックイン株では、ルシフェラーゼ活性が検出されず、転写が完全に消失することが明らかとなった。以上のことから、担子菌類のβ_1-<i>tubulin</i>遺伝子では、BCE配列とそれに続くCT-rich配列がコアプロモーターエレメントとして保存されており、BCE配列は何らかのトランス因子と相互作用することで、TATA配列に替わり転写開始複合体を導入する機能を果たしていることが推察された。</p> <p>第二章では、<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>における転写開始後の調節プロセスに関わるターミネーターおよびイントロンの働きを調べる為、これらの配列を様々に組み合わせた組換えレポーター遺伝子を作成し、一過性の形質転換によって遺伝子発現を評価した。その結果、<i>gpd</i>遺伝子のターミネーターを持つコンストラクトは、高い組換え遺伝子発現をもたらした一方で、β_1-<i>tubulin</i>遺伝子のターミネーターをもつコンストラクトは、ターミネーターを欠くコンストラクトに比べ僅かに高いものの、比較的低い遺伝子発現をもたらすことが明らかとなった。続いてこれらのターミネーター内のポリアデニレーションサイトの散らばりについて3'RACEを用いて分析したところ、<i>gpd</i>ターミネーターでは、特定の箇所への重複とその上流の比較的狭い6 ntの領域内に集中していたが、β_1-<i>tubulin</i>ターミネーターでは、領域内の広い範囲に分散して広がっており、特定の箇所への集中は一切みられない事が明らかにされた。これらの結果は、<i>gpd</i>ターミネーター内には、ポリアデニレーションを効果的に指令するシスエレメントが存在しており、このことが効率的な3'末端プロセッシングとその結果として生じる高く安定した遺伝子発現を担っていることを示唆している。この<i>gpd</i>ター</p>			

ミネーター内のポリアデニレーションシグナルの構造について明らかにするため、欠失及び置換変異体を作成し、一過性の遺伝子発現を評価したところ、特定の8 ntからなるA-richな配列とそれに続くポリアデニレーションサイトが重要なことが示された。一方で、これらのサイトが無くても、弱い遺伝子発現はみられており、こうした典型的なポリアデニレーションシグナルが存在しなくても一定レベルでの遺伝子発現は達成されることが示された。さらに、イントロンの有無が遺伝子発現に与える影響について解析を行ったが、本研究で用いたコンストラクトでは、発現の有為な差は検出されなかった。

ここまでのシスエレメントの機能解析は、主に一過性の形質転換によるレポーター遺伝子の発現により評価を行ってきた。この系は、従来一般的に用いられてきた個別の安定形質転換体を用いた評価法の欠点である、導入遺伝子の染色体上の挿入位置やコピー数が異なることで遺伝子発現の比較評価が不正確になるという問題を解決する特徴を持つが、一方で染色体外のDNAの転写がどの程度実際のシスエレメントの機能を反映しているか不分明であるという懸念が存在している。そこで、第三章では染色体上での発現調節機構を評価するために、ヒラタケの非相同末端欠損株を用いた遺伝子ターゲティング系、およびヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* のCRISPR/Cas9系を用いて、染色体上での発現評価のためのレポーターシステムの開発を行った。具体的には、培地中のマンガニオンや結晶性セルロースの存在によって転写が誘導されるヒラタケの *mnp3* 遺伝子やヒトヨタケの *ce16A* 遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を接続したコンストラクトをレポーターとして染色体上にターゲティングし、基質誘導の有無によってルシフェラーゼの産生がコントロールされること、またTATA配列の欠失によって、これらの組換え遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。これらの結果は、担子菌類では初めて染色体上の本来の位置での遺伝子発現を評価するための系を開発したことを示している。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、生態系の炭素循環の鍵を握っている木材腐朽菌が属している担子菌類の基本的な遺伝子発現機構の理解を目指して、*C. subvermispora*、*P. ostreatus*、*C. cinerea*等の種を用いて基盤的な転写に必要なシスエレメントの解析を行ったものである。さらに、今後の遺伝子発現制御システムの解析を進めるための新たな遺伝子発現評価系の開発についても実施された。主な結果として以下の様な点が挙げられる。

- 1) TATA配列を持たないプロモーターの一例として β_1 -*tubulin*遺伝子のプロモーター領域の基本構造の解析を行い、担子菌類のみに保存される14 bpからなる特定の配列 (BCE) とそれに続くCT-richな配列が、転写開始に必要な事を変異解析により同定した。この結果は、担子菌類における基本的な転写開始に必要なコアプロモーターの構造を初めて明らかにしたものである。
- 2) ターミネーター内の変異解析により、効果的なポリアダニレーションを指令するために8 ntからなるA-richな配列とポリアダニル鎖付加部位が重要な役割を果たしていることを示し、他の生物における保存配列との比較の結果、担子菌独自の特徴があることを示した。
- 3) 担子菌類における組換え遺伝子の発現において、イントロンの存在が効率のよい発現に必ずしも必須ではないことを、一過性の形質転換による遺伝子発現を用いて実験的に明らかにした。この結果は、これまで定説とされてきたイントロンの必要性に一石を投じる結果である。
- 4) 染色体外に存在する外来DNAからの遺伝子発現によるものと考えられる一過性の遺伝子発現系を用いた実験結果を裏付けるために、非相同組換え欠損株やCRISPR/Cas9を用いて、個々の遺伝子のゲノム上での本来の位置において遺伝子発現制御システムを解析するためのレポーターシステムを備えた発現評価システムを担子菌で初めて開発することに成功した。

これらの結果は、担子菌類における基本的な遺伝子発現に重要なシスエレメントについて明らかにすると共に、今後のエピジェネティックな制御や基質誘導などのより複雑な遺伝子発現制御系の分子メカニズムの解明に道を拓くものである。

以上のように、本論文は森林生化学、微生物学、木材保存学、バイオマス変換学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2年 6月 11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）