

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	渡 嘉 敷 直 杏
審査委員	主査 琉球大学 教授 外山博英
	副査 琉球大学 准教授 水谷治
	副査 鹿児島大学 准教授 二神泰基
	副査 佐賀大学 教授 後藤正利
	副査 琉球大学 教授 平良東紀
審査協力者	印
実施年月日	令和 3年 1月 22日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和3年1月22日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者 渡嘉敷直杏 が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力並びに識見を有すると認めた。</p> <p>[質問1] <math>\alpha</math>-1,3-グルカンの量を実際に測定しているか? プロトプラスト化との相関は?</p> <p>[回答1] 測定はしていないのでわからない。</p> <p>[質問2] <math>\alpha</math>-1,3-グルカンの生産量とプロトプラスト化のされ方が相関しているというほかの論文での報告はあるのか?</p> <p>[回答2] <i>A. nidulans</i> の <i>agsB</i> 遺伝子欠損で <math>\alpha</math> 1,3-グルカン量が減少するという報告があり、その遺伝子と最も相同性の高い <i>A. luchuensis</i> の <i>agsE</i> 遺伝子を欠損させたので、同様に <math>\alpha</math>-1,3-グルカン量が減少していると考えている。</p>	

学位申請者 氏名	渡嘉敷直杏
-------------	-------

渡嘉敷直杏

- [質問3]  $\alpha$ -1,3-グルカン量が減少することで他の細胞壁多糖の組成が変化するのはないか。
- [回答3] 他の細胞壁多糖の組成に影響が出るという報告はあるが、本研究では測定していない。
- [質問4] *itrA* がもともとの *cyp51A* 部位で組み変わることはないのか？
- [回答4] 黒麹菌でのランダムな挿入を試みた例では、今回確認に使ったプライマーでは質問のような組み換えが起こっていると、PCR産物は検出されないはずなので、薬剤耐性を示した形質転換株の中ではそのような組み換えは起こっていなかったと考えている。
- [質問5] *itrA* が多コピー挿入されると薬剤耐性が高くなることはないか？
- [回答5] 今回の形質転換法では通常1コピーだけ挿入されるので、多コピーのものはないと考えられるが、確かめてはいない。
- [質問6] 黒麹菌では Yatalase 単独でプロトプラスト化できないが、同じ *A. luchuensis* である白麹菌ではできる。この違いは何か？
- [回答6] 白麹菌でも黄麹菌に比べたらプロトプラスト化の程度は低いので、表層構造や、 $\alpha$ -1,3-グルカン量の微妙な差であるかもしれない。AgsE のアミノ酸配列には違いはなかった。
- [質問7] *itrA* が挿入された形質転換体がどの程度薬剤耐性が上昇するのか、固定した薬剤濃度でのみ調べるのではなく、IC50などの定量値で示す方がよいのではないか？
- [回答7] マーカー遺伝子のない親株から選抜できる濃度として濃度を設定したが、この濃度を高くしても、*itrA* が挿入された形質転換体の割合は高くならなかった。今後検討したい。
- [質問8] 耐性を示す *Cyp51A* 変異の中で、G54Rを選択した理由は何か？
- [回答8] 論文でMICの差が最も大きい変異だったので、選択した。また、変異のみで耐性を発揮するには十分でなく、プロモーターを高発現のものに変えることも必須であった。
- [質問9] 今後他の薬剤耐性マーカーの開発することを計画しているか？
- [回答9] 他の薬剤は今のところ考えていないが、*cre-loxP* の系を組み合わせることで、マーカーの回収・再利用ができるようにしたいと考えている。
- [質問10] 親株では静置培養で得られた菌糸の方がプロトプラスト化されやすいが、 $\Delta$ *agsE* 株では逆に振とう培養の方がされやすくなるのはなぜか？
- [回答10] 親株ではほとんどされない中で、菌糸の凝集状態が静置培養で低いために、溶解酵素が働きやすくなるので差が出る、また  $\Delta$ *agsE* 株では振とう培養でも菌糸が凝集しないから酵素が働きやすいためだと考えている。