

(1024)

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Sittichoke Ketkaeo
審査委員	主査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 佐賀大学 准教授 木村 圭
	副査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 佐賀大学 教授 小林 元太
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
審査協力者	
実施年月日	令和4年7月15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4年7月15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。具体的には別紙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が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	Sittichoke Ketkaeo
[質問 1] 紅麹菌のゲノム編集において、CRISPR/Cas9 発現ベクタープラスミドを使用しているが、ゲノム上にプラスミド配列が残っているのではないか。プラスミド配列が紅麹菌染色体に残ると、食品分野で利用する際には問題となります。	
[回答 1] 導入したプラスミドは紅麹菌の染色体上に組み込まれません。このゲノム編集用プラスミドは、糸状菌での自律複製を可能にする AMA1 配列と選択マーカーとしてピリチアミン耐性遺伝子を有しており、非選択圧下でプラスミドは脱落します。	
[質問 2] 本研究では紅麹色素高生産株 KUPM5 を使って、モナコリン K(MK)の高生産株、シトリニン (CT) 低生産株を育種しようとしたが、紅麹色素をさらに高生産しようと考えなかったのか。	
[回答 2] 今回の紅麹菌株は実用株で既に十分量の色素を生産するので、研究目的としなかった。	
[質問 3] シンクロトロン光照射実験によって取得された MK 高生産株は、親株に比べ CT も高生産しているが、この菌株の CT 高生産機構について何か情報はありますか。また、CT 合成遺伝子についての発現量を確認していないか。	
[回答 3] この実験では MK 高生産に焦点を当てて研究したので、CT 合成遺伝子についての発現量の確認は行っておらず、CT 高生産機構についての情報はありません。	
[質問 4] MK 合成遺伝子 (<i>mok</i>) クラスターは、KUPM5 株では 3 つのスキップフォールドに分断されているが、ゲノム上の全 MK 遺伝子を調べましたか。	
[回答 4] はい。他の紅麹菌株の <i>mok</i> 遺伝子の全ての遺伝子について、BLAST で KUPM5 株ゲノムに対して検索を行いました。	
[質問 5] シンクロトロン光照射によって得られた MK 高生産株の <i>mok</i> 遺伝子の転写レベルについて調べましたか。	
[回答 5] はい。MK 高生産株 SC01、SC02、SC03 について RT-qPCR で調べました。親株に比べて、SC01、SC02 株では MK の高生産が始まる培養 4 日後にポリケチド合成酵素 <i>mokA</i> の発現量の増加が検出され、MK 生産量が最大となる培養 8 日目には <i>mokA</i> の発現量は同等となりました。また、SC03 株では、発現変動が異なっており、 <i>mokA</i> の発現量に親株との相違はありませんでした。	
[質問 6] ゲノム編集された CR02 株は CT を生産している。 <i>citS</i> 遺伝子が 1 塩基欠失してフレームシフト変異を生じているが、どのような理由で CT を生産していると考えますか。	
[回答 6] 別の研究グループによる <i>citS</i> 遺伝子破壊株の実験によると、HPLC 分析による CT のピークには別の化合物が混在していて、 <i>citS</i> 遺伝子を破壊しても HPLC で検出されません。このサンプルは、抗体による CT 定量検出キットでは、検出されません。従って、同様の CT キットによって CT の量を測定する予定です。また、今回取得できた CR02 株が、異核共有のヘテロカリオンの可能性もあります。シーケンスを確認する必要があります。	
[質問 7] ゲノム編集の効率が低いようですが、ベクタープラスミドによる紅麹菌の形質転換後、何度植え継ぎを行いましたか。	
[回答 7] ベクターを保持するためにピリチアミンによる選抜条件下で、3 回植え継ぎしました。	
[質問 8] ゲノム編集の <i>citS</i> の標的部位は、開始コドンのすぐ近くですが、その下流側に別の開始コドンが存在し、そこから短くなっているが活性をもつ CitS ポリケチド合成酵素 (PKS) が合成されている可能性はないですか。	
[回答 8] はい。確かにその可能性はあります。配列を確認いたします。	
[質問 9] 別のゲノム編集部位をデザインしていないですか。	
[回答 9] CitS PKS の活性ドメインの 1 つの活性中心のアミノ酸を標的に sgRNA 配列をデザインしたベクターは構築済みです。	

[質問 10] UV 照射によって、2つの CT 低生産株を取得しているが、それらの株を元菌として、シンクロトロン光照射によって、MK 高生産株をつくろうと研究計画を立てなかったのでしょうか。

[回答 10] UV 照射によって得られた株が CT を全く生産しない非生産株であったならば、そのようにしました。物質の生産量を向上するよりも低下させる方がゲノム編集で達成が容易と考えました。シンクロトロン光照射によって紅麹菌の CT の低生産化を意図せずに MK 高生産のみを目的として、まずは菌の育種を行いました。そして、得られた MK 高生産株をもとに、ゲノム編集で CT の非生産化を目指しました。