

氏名	外川 陽一郎
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	第 587 号
認定課程名	防衛大学校理工学研究科後期課程
学位授与年月日	平成 30 年 8 月 24 日
論文題目	Development of a Cre/lox-based multiple markerless gene disruption method for the extreme thermophile <i>Thermus thermophilus</i> (Cre/*lox*システムを用いた高度好熱菌 * <i>Thermus thermophilus</i> *のマーカレス多重遺伝子破壊法の開発)
審査担当専門委員	(主査) 東京工業大学 教授 中村 聡 東京大学 教授 一條 秀憲 大阪大学 教授 伊東 忍

### 審査の結果の要旨

*Thermus thermophilus* HB27 株は高度好熱菌のモデル生物として位置づけられる。しかしながら、高度好熱菌の生理学的研究は中温菌に比して遅れている。その要因として、遺伝子破壊に必要な不可欠な耐熱性の薬剤耐性選択マーカー遺伝子が少ないために、多重遺伝子破壊株の作製が困難なことがあげられる。解決策として、*T. thermophilus* でも染色体にマーカーを残さないマーカレス遺伝子破壊法がいくつか報告されているが、薬剤耐性によるカウンターセクションでマーカーを除去する過程で薬剤耐性菌が自然発生する、野生株は使用できない、等の問題点が指摘されていた。本研究では、高度好熱菌としては初となる Cre/lox 部位特異的組換えを応用したマーカレス遺伝子破壊法を確立した。

破壊対象の TTC1535 遺伝子に対して耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 *htk* を同方向の *loxP* 配列で挟んだ遺伝子破壊用カセットを挿入した DNA 断片を HB27 野生株に導入し、相同組換えにより *htk* マーカーを含む TTC1535 遺伝子破壊株を作製した。次いで、本研究で作製した *cre* 遺伝子発現型プラスミドを導入し、*loxP* 配列で挟んだ領域を Cre 酵素による部位特異的組換えで欠失することで、*htk* マーカーを除去した TTC1535 遺伝子破壊株を得た。さらに同様な手順により、TTC1535/TTC1576 遺伝子二重破壊株ならびに TTC1535/TTC1576/TTC1454 遺伝子三重破壊株を得た。その際、一部のクローンにおいては破壊遺伝子間領域の逆位・欠失が見られたが、この問題は変異 *lox* 配列を用いることで回避できることを明らかにした。

以上により、本研究で確立した遺伝子破壊法は野生株に使用可能であり、*htk* マーカーを除去したクローンを選択する際にカナマイシンに対する自然耐性菌は出現せず、カウンターセクションを利用した方法の問題点を克服しており、マーカーレス遺伝子破壊法の開発という研究目的を達成している。この結果は、*T. thermophiles* 研究の進展に寄与することが期待され、*T. thermophiles* の工学応用において大きな意義を有するものである。よって、学術的価値は高く、博士（工学）として合格と判断した。