

(別紙 1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Yang Xi

本論文は、大腸菌 K-12 株における必須遺伝子と非必須遺伝子間における遺伝的相互作用解析を網羅的に行う系を開発するとともに、24 の必須遺伝子を対象として検証を行ったものである。

まず申請者は、解析対象とする遺伝子について、type II CRISPR を利用して発現抑制を行う手法の開発を進めた。CRISPRi として報告された DNA 二重鎖切断活性を失った変異型 dCas9 遺伝子がアンヒドロテトラサイクリン (ATc) により発現誘導されるプラスミド、及び Cas9 タンパク質の認識部位を決定するための gRNA scaffold 配列を構成的に発現するプラスミドを利用し、必須遺伝子の *dnaA* と *ftsN* を対象として発現抑制系の開発と解析条件の検討を行った。gRNA scaffold を形成するための gRNA 配列の設計と dCas9 遺伝子の発現誘導条件の最適化は、細胞の生育、細胞形態の変化、mRNA 量の減少を指標として行った。gRNA 配列の設計は、全大腸菌ゲノム配列を対象とし、両鎖に対して PAM 配列と名付けられた NGG 配列を探索し、その上流側 20 塩基を切り出したリストを作成し、対象とする遺伝子の位置から gRNA 配列の選択を行った。設計した 2 本の合成 DNA をアニールさせ二本鎖化した gRNA 配列を Gibson 法と呼ばれる相同組換えにより gRNA scaffold ベクターへクローン化した。最初に dCas9 発現プラスミド自身が宿主細胞の生育と形態に及ぼす影響について ATc 濃度依存性を調べた。その結果、ATc が 5 μ M までの濃度では dCas9 の発現による生育への影響はほとんどないことを確認した。次に、dCas9 単独での発現で影響の出ない条件下で、*dnaA* と *ftsN* の gRNA 配列をクローン化したプラスミドと dCas9 発現プラスミドを共存させ、gRNA 配列の違いと dCas9 発現のための ATc 濃度依存性を調べた。その結果、gRNA 設計位置に関しては、対象遺伝子による違いが存在すること、及び dCas9 の発現誘導は 0.2 μ M から 1 μ M の範囲が適切であることを確認した。

次に、この 2 種類のプラスミドを接合により欠失株ライブラリーに移動し、発現抑制と欠失の網羅的組合せによる遺伝的相互作用解析手法の開発を進めた。dCas9 発現プラスミドと gRNA scaffold 発現プラスミドに、F プラスミド由来の *oriT* 配列をクローン化し、プラスミドの高効率移動方法及び解析手法の最適化を図った。その結果、最初に dCas9 発現プラスミドを全欠失株ライブラリーに移動することで、ライブラリー化を図った後、再び接合により gRNA scaffold 発現プラスミドを移動させる方法の確実性が高いことを見出し、スタンプロボットを活用した接合方法の確立と、所属研究室で開発したコロニー画像解析法により、解析手法の最適化を行った。その後、*dnaA* と *ftsN* を含む 24 の必須遺伝子を対象とし、網羅的解析によって検証を行った。

最終的に本論文は、欠失株や変異株を取得することなく、接合により簡便に遺伝子の発現抑制と欠失を組合せた遺伝的相互作用解析を可能にした汎用性の高い高効率な手法の開発と検証を行ったものである。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yang Xi

当研究室では、一貫して大腸菌網羅的リソースを活用したシステムティックな解析技術開発及びその解析を進めてきている。2006年に大腸菌の全予測遺伝子欠失株ライブラリーを完成した後は、接合を用いた網羅的な遺伝的相互作用手法の開発と解析を精力的に進めてきているが、欠失株ライブラリーには栄養培地 37°C の条件で生育に必須な遺伝子の欠失株は存在しない。従って、必須遺伝子を含めて解析を可能にする手法の開発を進めており、過去にプラスミドより必須遺伝子産物の相補条件下で染色体上の必須遺伝子の欠失を行う方法の開発を行ったが、対象遺伝子によって相補条件下でも欠失が不可能なものも多い。そこで、CRISPRiによる knock-down 法を用いた解析手法について、必須遺伝子を対象に開発を行った。

申請者は、Harvard 大学の共同研究グループを訪問した際、CRISPRiによる手法の適用可能性を議論し、必須遺伝子の発現量を抑える手法の開発に関する共同研究を開始した。本博士論文においては、CRISPRiに必要な Cas9 変異体である dCas9 及び gRNA vector 等の材料の供給を受け、当研究室の強みである接合及びシステムティック解析手法を取り込んだ実験系を確立し、大腸菌全必須遺伝子 323 の中から選択した 24 遺伝子を用いて実験系の検証を行った。

申請者の成果は、1) 大腸菌全遺伝子を対象にした gRNA の設計、2) dCas9 及び gRNA のベクターに F プラスミド由来の *oriT* 配列を導入後、接合による可動化、3) dCas9 の *tet* プロモーターによる発現誘導システムの導入、4) Gibson 組換え法による gRNA 配列のクローン化手法の確立を行った。本手法を確立した後、2 種類の必須遺伝子 (*dnaA* 及び *ftsN*) を対象に、gRNA 配列のデザイン方法を検討し、開始コドンからの距離、コーディング鎖及び非コーディング鎖による knock-down 効率の違いについて検証を行った。dCas9 発現誘導剤の添加による生育への影響、細胞の形態変化、qRT-PCR 法による mRNA 量の変動等の検証を進め、CRISPRiによる手法の確立を行った。

また、本手法を用い、全非必須遺伝子の欠失株に接合により knock-down の CRISPRi の plasmid を移動し、必須遺伝子及び非必須遺伝子との網羅的遺伝的相互作用解析手法の確立を行うとともに、さらに 22 種類の必須遺伝子を選択し、網羅的遺伝的相互作用解析への可能性の検証を行なった。

本論文は CRISPRi と接合を活用した必須遺伝子と非必須遺伝子とのシステムティックな遺伝的相互作用の解析手法を確立したものである。多重遺伝子の相互作用解析への可能性を含め、学術上、応用上貢献するところが非常に大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。