




平成 28 年 8 月 30 日

豊橋技術科学大学長 殿

環境・生命工学 専攻
学位審査委員会
委員長 岩佐 精二

論文審査及び最終試験の結果報告

このことについて、学位審査会を実施し、下記の結果を得ましたので報告いたします。

学位申請者	長尾 信義		学籍番号	第093829号
申請学位	博士（工 学）	専攻名	大学院工学研究科博士後期課程 環境・生命工学 専攻	
博士学位 論文名	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> における細胞外核酸放出機構のゲノム規模による 解析とRNA生産への応用 (Genome-wide analysis of the extracellular nucleic acids excretion mechanism in <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> and its application to RNA production)			
論文審査の 期間	平成 28年 7月28日 ～ 平成 28年 8月 26日			
公開審査会 の日	平成28年 8月26日	最終試験の 実施日	平成28年8月26日	
論文審査の 結果※	合格	最終試験の 結果※	合格	
審査委員会(学位規程第6条)				
学位申請者にかかる博士学位論文について、論文審査、公開審査会及び最終試験を行い、別紙論文内容の要旨及び審査結果の要旨のとおり確認したので、学位審査委員会に報告します。				
委員長	平石 明 			
委員	浴 俊彦 		梅影 創 	

※論文審査の結果及び最終試験の結果は「合格」又は「不合格」の評語で記入すること。

論文内容の要旨

本論文は、細胞外に核酸を生産するユニークな性質を持つ海洋性の紅色光合成細菌である *Rhodovulum sulfidophilum* のゲノム解析と本菌を利用した人工 RNA の菌体外生産について述べたものである。本論文は 6 章から構成されており、まず、第 1 章では序論として本研究の背景と目的について述べられている。つづく第 2 章では、*Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374^T 株および DSM 2351 株について次世代シーケンサーによる完全ゲノム配列の決定とトランスクリプトーム解析の結果に基づいて、1374^T 株と 2351 株の表現型の違い（フロック形成、アルコール代謝、形質転換能力の有無など）を遺伝子レベルの知見として得た成果が示されている。第 3 章では、DSM 1374^T 株が細胞外に生産する gene transfer agent (GTA) について次世代シーケンサーおよび電子顕微鏡を用いた解析結果が示されており、GTA がファージ様粒子として細胞外に生産されること、GTA に内包されている DNA はゲノム DNA がランダムに断片化されたものであること、DSM 1374^T 株の細胞外核酸放出には GTA の生産が関与することが示唆されている。第 4 章では、細胞外への核酸放出能力が低下した変異株 SNK001 株を用いたゲノム解析とトランスクリプトーム解析の結果に基づいて、本菌が菌体外に核酸を放出するメカニズムは、プロファージ関連遺伝子の発現による溶菌であることが示されている。第 5 章では、本菌の解析結果の応用として、医薬品への応用が有力視されているショートヘアピン RNA の菌体外生産に成功したことが述べられている。これらの成果は最後の第 6 章で総括されており、*Rhodovulum sulfidophilum* のゲノム解析基盤が確立されたこと、および本菌を利用した菌体外 RNA 生産に関する指針が得られたことが示され、この技術の創薬開発への展望が述べられている。

審査結果の要旨

近年、遺伝子の発現抑制などの特定機能を有する機能性 RNA を医薬品として利用する研究が盛んである。RNA の医薬化は、現行法では有機合成による技法であるため製造コストが高く、そのため薬価の低価格化は RNA 医薬開発の大きな課題の一つとなっている。本論文は、菌体外に RNA を含む核酸を放出するという、*Rhodovulum sulfidophilum* のユニークな性質を応用した次世代型 RNA 医薬生産法の開発という観点から、本菌のゲノム解析、菌体外核酸放出機構の解明、および表現型の遺伝子レベルでの解析を行ない、RNA 医薬品生産可能性の検証を行ったものである。

本論文で述べられている特筆すべき研究成果として、まず、*Rhodovulum sulfidophilum* の完全ゲノム配列の決定とトランスクリプトーム解析が行われたこと、さらに本菌の菌体外核酸生産能が低下した変異株を用いたゲノム解析が行われたことが挙げられる（第 2 章）。*Rhodovulum* 属細菌は、高密度培養可能な菌株であり、RNA 医薬の菌体外生産以外にもカロテノイド生産や水素生産などへの応用が期待される菌であるが、全ゲノム配列はこれまで未解読であった。本論文では、基準株 2 株と変異株 1 株の合計 3 株のゲノム解析に成功している。この成果は、*Rhodovulum* 属細菌のゲノム研究だけでなく、本菌を利用した産業的応用研究への貢献など、本成果の持つ意義は極めて大きいと考えられる。次に、本菌を用いた菌体外 RNA 医薬の生産能向上を見据え、これまで未解明であった菌体外核酸放出メカニズムに関する特筆すべき知見を得ている（第 3 章、第 4 章）。すなわち、本菌の菌体外核酸生産が gene transfer agent 関連遺伝子群の発現によること、上記遺伝子群以外にプロファージ領域周辺の lysozyme 遺伝子発現によることが明らかにし、本菌の菌体外核酸生産メカニズムが複数の要因が組み合わさった現象であることを示した。これらの成果は、本菌の菌体外に核酸を生産する生理的意義の理解につながるだけでなく、本菌を利用した菌体外 RNA 生産法のための改善点を指摘するものとして大きな意義がある。最後に特記すべきこととして、実際にこれらの研究成果の応用として、本菌を用いた RNA 医薬品の候補としてのショートヘアピン RNA の菌体外生産に成功している（第 5 章）。ショートヘアピン型 RNA は構造的に DNA から転写されにくい構造のため、RNA 生産が困難と予想されていたが、本論文によって菌体外生産が可能であることが示され、本菌の産業的意義についても証明された。

上記のように、本論文においては、*Rhodovulum sulfidophilum* のゲノム解析から産業的応用可能性の検証まで精力的、かつ優れた研究が実施され、意義ある成果がまとめられている。今後、本菌および類縁菌の基礎研究および産業的利用において本研究成果がその基盤になることが期待される。

以上により、本論文は博士（工学）の学位論文に相当するものと判定した。