

氏 名（本籍）	こ ばやし ひで お 小 林 英 雄（東 京 都）
学 位 の 種 類	博 士（生命共存科学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 3997 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB27 株の分子育種システムの改良と利用
主 査	筑波大学教授 農学博士 星 野 貴 行
副 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学助教授 博士（農学） 中 村 顕
副 査	筑波大学講師 博士（農学） 高 谷 直 樹

論 文 の 内 容 の 要 旨

Thermus thermophilus HB27 株は、至適生育温度を 70-75℃ に持つ高度好熱性グラム陰性細菌であり、高い自然形質転換能を有しているため、現在最も高温で遺伝子操作が可能な微生物として捉えられる。*T. thermophilus* HB27 株の宿主・ベクター系は、好熱菌・超好熱菌由来遺伝子の発現や常温菌由来遺伝子の耐熱化変異の取得に用いられているが、一般的に用いられる大腸菌の宿主・ベクター系と比較して、外来遺伝子発現量が圧倒的に少ない点、制限修飾系により外来遺伝子導入効率が低下する点などの宿主の問題点、クローン化に用いるプラスミドベクターが低コピーであり、また分子量が大きいため取り扱いが不便な点、簡便な誘導型プロモーターがない点などのベクターの改良点が挙げられる。そこで本論文では、HB27 株を宿主とした外来遺伝子の効率的発現システムの構築を最終目標として、新規プラスミドベクターの開発、外来遺伝子高発現株の作製、誘導型プロモーターの探索、そして修飾酵素遺伝子を用いた効率的な形質転換系の開発を行った。

(1) 新規プラスミドベクターの開発

伊豆の温泉から分離した *Thermus sp.* TK10 株が保持していた低分子・高コピープラスミド pNHK101 の塩基配列を決定すると共に、同プラスミドに薬剤選択マーカーとして HTK 遺伝子を導入して、新規ベクター pKMH052 を開発した。またこのプラスミドが 70℃ では不安定になること、従来型ベクターの pTT8 と共存可能であり、共存時に安定化が起こることなどの性質を明らかにした。さらに pKMH052 に *T. thermophilus* の *crtB* 遺伝子を導入し、発現ベクターとしての利用を検討した。

(2) *PslpA* プロモーターを利用した外来遺伝子高発現株の作製

近縁の HB8 株では、HB27 株で外来遺伝子発現に利用している強力プロモーター *PslpA* に対する転写抑制因子として、SlrA が報告されている。そこで HB27 株のゲノムより該当遺伝子として TTC1363 を同定し、同遺伝子欠損株を作製して SlrA としての機能を有するかどうかを検討した。またこの株を宿主として超好熱性古細菌 *pyrococcus horikoshii* 遺伝子の発現を行い、従来株より約 2 倍の発現上昇が起きることを明らかにした。

(3) 糖添加により誘導されるプロモーターの探索

大腸菌では *lac system* のように、糖の添加によって簡便に外来遺伝子を誘導発現させる系が整備されている。そこで HB27 株の簡便な誘導発現システムの構築を目指して、HB27 株ゲノムからラクトース添加により発現誘導されるプロモーターを検索した。得られた TTC0659 プロモーターの性質について検討を行い、ラクトースにより約 2 倍の転写誘導が起こることを明らかにした。この誘導発現システムを利用することにより、今後 HB27 株における簡便な誘導発現システムの構築が期待される。

(4) 修飾酵素遺伝子を利用した効率的な形質転換系の開発

HB27 株の持つ制限修飾系は、外来遺伝子導入の効率を低下させることが明らかになっている。そこでより効率的な形質転換系の構築を目指して、HB27 株のゲノムより制限酵素遺伝子の探索を行うと共に、HB27 株修飾酵素を利用した *in vitro* 外来遺伝子修飾システムを開発した。このシステムの利用により異種遺伝子の形質転換効率が約 60 倍に上昇することを明らかにした。

以上のように本論文では、*T. thermophilus* HB27 株の宿主ならびにプラスミドベクターに関して改良を行い、より利用しやすく、外来遺伝子の効率的な発現が可能な分子育種システムへと改良することに成功した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、高度好熱菌 *T. thermophilus* の分子育種システムの改良に関して様々な検討を加えており、そのうちのいくつかは学術的に価値のある成果を含んでおり、高く評価できる。また得られた結果は、本菌株の宿主・ベクター系の利用という応用面でも非常に有用である。

よって、著者は博士（生命共存科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。