【27】

氏　名（本籍）	ベナム　ナザリ（イ ラ ン）
学 位 の 種 類	博　　士（生物工学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　5902　号
学位授与年月日	平成 23 年 7 月 25 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	**Studies on Gene Expression in *Streptomyces* Grown in Soil** （土壌中で生育するストレプトミセスにおける遺伝子発現に関する研究）

主　　査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副　　査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副　　査	筑波大学准教授	博士（農学）	高 谷 直 樹
副　　査	筑波大学准教授	博士（農学）	中 村　　顕

論 文 の 内 容 の 要 旨

代表的な土壌細菌である Streptomyces 属放線菌は、自然界で 2 番目に豊富なバイオマスであるキチンを分解できるキチナーゼを複数生産分泌する。構成元素として窒素と炭素の両方を含むキチンを分解できる酵素を持つことは、一般的に窒素源に乏しい土壌環境において放線菌が生き抜く上で大きな利点となっている。本研究では、放線菌の土壌環境下における生存戦略を明らかにするため、キチン存在下、土壌中で生育している放線菌において、各代謝系遺伝子の発現パターンとキチナーゼ遺伝子群の発現制御機構を解明した。

まず、遺伝子発現解析に必須となる活発に生育している細胞を得るために、ゲノム配列が決定されている *Streptomyces coelicolor* A3（2）株を供試菌として用い、滅菌土壌中で供試菌の生育をモニターすることで、供試菌の土壌中での生育条件を明らかにした。滅菌土壌に供試菌の胞子を植菌後、キチン存在下および非存在下で 48 時間培養し、対数増殖期後期に複数の精製純化行程からなる RNA 抽出法を用いてそれぞれの土壌から直接高純度の RNA を抽出した。調製された RNA は、本菌のゲノム遺伝子を固定化した DNA マイクロアレイを用いて、キチン存在下および非存在下で発現している遺伝子をゲノムワイドに比較した。得られたデータを統計解析した結果、キチナーゼを含むアミノ糖代謝や、解糖系から TCA サイクルに至る主要代謝系はもちろん、アミノ酸合成系酵素や窒素代謝および硫黄代謝系に関わる酵素の各遺伝子群の発現がキチン存在下で有意に上昇していることが明らかとなった。特にゲノム上に散在するキチナーゼ遺伝子群については、定量 PCR による発現量の確認も行い、*chiC* と *chiH* が特に高い発現誘導を示すこと、また、これまで発現が認められていなかった *chiG, H, I, J, M* などで初めて発現誘導を検出するなど、新しい知見が得られた。さらに定量 PCR を用いて液体培養と土壌培養でキチン添加による各キチナーゼ遺伝子の誘導発現量を比較した結果、土壌で特に *chiH* が高い発現を示すことが明らかとなった。また、この *chiH* の発現は、キチン代謝系の遺伝子や形態形成に関わる遺伝子など広範な遺伝子の発現を制御することが知られている GntR ファミリーの転写因子、DasR の遺伝子を破棄すると完全に消失することから、*chiH* は DasR によってその発現が制御されていることが明らかとなった。一方、その他のキチナーゼ遺伝子は、*dasR* 破壊によって誘導レベルは低下するもののその効果は限定的であり、キチナーゼ遺伝子群の発現を制御するその他の転写制御因

子の存在が示唆された。*chiH*はゲノム解析によって初めてキチナーゼホモログとして見いだされた遺伝子で、これまでその遺伝子産物がキチナーゼ活性を有することが確認されていなかったのが、大腸菌および放線菌でクローニングしその遺伝子産物を精製したところ、高いキチナーゼ活性が認められ、*chiH*が確かにキチナーゼをコードしていることが確認された。また、このキチナーゼは、他のキチナーゼとは異なり特に酸性領域で安定して高い活性を有することから、放線菌の酸性土壌における生存に重要であることが示唆された。

審査の結果の要旨

放線菌のキチナーゼについては、その酵素学的性質や遺伝子について数十年にわたって研究されてきているが、彼らの生育環境である土壌中でこれらの遺伝子の発現を解析した研究は世界的に見ても例がない。本研究で、土壌中で生育している細菌の網羅的な遺伝子発現解析に成功し、放線菌が土壌で生育していく際に栄養成分として土壌中のキチンを分解し細胞内で代謝してゆく過程が初めて明らかになった。また、土壌中で特に高い誘導発現能を示す新たなキチナーゼを世界に先駆け同定するとともに、本キチナーゼ遺伝子の発現が（広範囲な遺伝子の転写を制御する）DasR 転写因子の制御下にあることが初めて解明された。これら一連の知見は、微生物学研究にインパクトを与えるのみならず、酵素反応によって有用物質を生産する上で重要な成果である。

以上のように、本研究の成果は、土壌生態学領域のみならず応用酵素学領域においても大きく貢献するものと判定される。

平成 23 年 5 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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