【86】

氏名（本籍）	齋藤明広（千葉県）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博甲第 2,043 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ遺伝子の構造と発現制御に関する研究
主査	筑波大学併任教授（農業研究センター）　農学博士　米山忠克
副査	筑波大学教授　農学博士　臼井健二
副査	筑波大学教授　農学博士　祥雲弘文
副査	筑波大学教授　理学博士　白岩善博

論文の内容の要旨

N－アセチルグルコサミンがβ－1，4結合した直鎖状高分子化合物であるチキンは，セルロースに次いで自然界に最も大量に存在する高分子化合物であり，その分解は，生態系の炭素および窒素循環において重要である。本研究では，主要なキチン分解細菌である*Streptomyces*属放線菌のキチン分解機構を解明することを目的とした。まず，1株の*Streptomyces*属放線菌の有するキチナーゼ（キチン分解酵素）遺伝子の種類と数を明らかにするために，*S. coelicolor*の染色体整列コスミドライブラリーから，ハイブリダイゼーションによってキチナーゼ遺伝子をクローニングし，塩基配列の決定および大腸菌での発現解析を行った。その結果，ゲノムプロジェクトによって存在が示された1つのキチナーゼ遺伝子を加えると，本菌は，異なる7つのキチナーゼ遺伝子（*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiE*, *chiF*, *chiG*）を有することが明らかとなった。これら7つの遺伝子がコードするキチナーゼのうち，糖加水分解酵素の分類におけるファミリー18に属するものは5つ（chiA, chiB, chiC, chiD, chiE），ファミリー19に属するものは2つ（chiF, chiG）であった。これは，高等植物以外の生物で，両ファミリーに属するキチナーゼ遺伝子を有することが示された初めての例である。これらの遺伝子は，クラスターは形成していないものの，各ファミリーごとに，ある程度局在して，染色体上に位置していた。また，予想アミノ酸配列をもとに，これらの遺伝子のコードするキチナーゼの構造解析を行った結果，それらは多様なドメイン構造をとっていることが示された。これらの結果から，*S. coelicolor*は，他のキチン分解細菌と比較すると，極めて多様なキチナーゼ遺伝子を有することが明らかとなった。さらに，本菌の有する7つのキチナーゼ遺伝子について，他の*Streptomyces*属放線菌における分布をサザンハイブリダイゼーションによって調べた結果，それらのキチナーゼ遺伝子のほとんどのホモログが*Streptomyces*属放線菌に広く分布することが示唆された。

次に，*S. coelicolor*の有する7つのキチナーゼ遺伝子について，ノーザンハイブリダイゼーションによる転写レベルでの発現の解析を行った。その結果，7つのキチナーゼ遺伝子のうち，5つ（*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiF*）は，キチンの存在下で転写産物が検出され，これらの転写産物量は，いずれもキチンの添加後4時間で最大となり，12時間後には，ほとんど検出されなかった。さらに，放射菌キチナーゼによるキチンの主要な分解産物であり，キチナーゼ遺伝子の発現を誘導する最小単位の物質であるキトビオース（*N*－アセチルグルコサミンの二量体）の添加によっても，これら5つのキチナーゼ遺伝子は，転写が誘導された。残りの2つの遺伝子は，これらの条件では発現していないものと考えられる。

一方，*Streptomyces*属放線菌のキチナーゼ遺伝子の発現は，グルコースの存在下で抑制されるが，

そのメカニズムは明らかになっていない。このグルコース抑制のメカニズムを解明するため，紫外線照射により，*S. lividans* のキチナーゼ生産のグルコース抑制が完全に解除された変異株G015を取得した。G015株は，キチナーゼ遺伝子の転写のレベルでグルコース抑制が解除されていた。また，G015株は，親株と異なり，グルコース資化能が欠損していると同時に，グルコースのアナログである2-デオキシグルコースに耐性であったことから，グルコースキナーゼ遺伝子（*gℓkA*）の変異株であることが考えられた。そこで，*S. lividans* G015株に低コピー数のプラスミドベクターを用いて，*S. coelicolor* の*gℓkA* 遺伝子を導入し，その表現型を調べた。その結果，本変異株への*gℓkA* の導入によって，グルコース資化性，2-デオキシグルコース感受性，およびグルコースキナーゼ活性が相補され，G015株が*gℓkA* 変異株であることが示された。さらに，*gℓkA* によって，G015株におけるキチナーゼ生産のグルコース抑制が相補された。これらのことから，本菌のキチナーゼ生産におけるグルコース抑制には，*gℓkA* 遺伝子が関与することが示された。

審査の結果の要旨

本論文は，自然界に多量に存在する高分子化合物キチンの分解の担い手である*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ遺伝子に関する研究であり，従来異なる菌株で別々に報告されている５つのタイプのキチナーゼ遺伝子とその他の２つの新たなタイプの合計７つのキチナーゼ遺伝子を，１株の*Streptomyces* 属放線菌（*S. coelicolor*）が有していることを明確に示し，それらの遺伝子の発現誘導パターンを転写レベルで明らかにしている。また，従来不明とされていたキチナーゼ遺伝子発現のグルコース抑制にグルコースキナーゼ遺伝子が関与することを明らかにした。これらは新規性の高い研究として，２つの英文論文として発表されている。本研究は，散見していた*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ研究を，遺伝子の構造と発現制御について，分子生物学的手法を駆使して，統一的に大きく発展させたものとして高く評価される。また，本研究から，キチンやその分解産物であるキトビオースの認識からキチナーゼ遺伝子の発現誘導に至るシグナル伝達経路，キチナーゼ遺伝子発現のグルコース抑制機構，ならびに，多様な構造を持つキチナーゼのキチン伝達経路，キチナーゼ遺伝子発現のグルコース抑制機構，ならびに，多様な構造を持つキチナーゼのキチン分解におけるそれぞれの役割，といったこれまで未知とされてきた命題の解明への展開が期待できるようになり，今後の方向性を示すものとしても重要な貢献をしている。さらに，*Streptomyces* 属放線菌の生産するキチナーゼによる土壌中での植物病原性糸状菌のバイオコントロールへの応用にも重要な知見を示すものとなっている。論文は，研究目的，実験の設計と結果および考察が明確にまとめられており，大変優れたものである。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。