

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380050

研究課題名(和文) 土壌環境下における放線菌有用機能の発現制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Study on the control of gene expression network in Streptomyces growing in the soil environment

研究代表者

藤井 毅 (FUJII, Takeshi)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・研究領域長

研究者番号：00354100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円、(間接経費) 3,450,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、土壌中で生育している放線菌が分解酵素を生産し栄養を獲得する一連のプロセスや抗生物質の生産プロセスを制御する遺伝子の発現制御ネットワークの解明を目指した。放線菌の栄養源としてキチンを添加した土壌から直接抽出したRNAを放線菌ゲノム遺伝子を網羅的に固定したマイクロアレイで解析した結果、キチン存在下土壌中で生育している放線菌では、キチン代謝関連遺伝子や解糖系・窒素代謝等の主要代謝系遺伝子群ばかりでなく、複数の抗生物質生産遺伝子群の発現が高レベルに誘導され、これら代謝遺伝子群の発現に転写制御因子DasRが重要な役割を演じていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To provide new insights into the cellular response to nutrients and regulation cascade of antibiotic production genes in global gene expression of Streptomyces in soil, genome-wide transcriptional analysis with microarray technology was performed using RNA extracted from the wild type and mutant strains of Streptomyces coelicolor grown in soil cultures. Microarray analyses revealed that expression of genes for secondary metabolism was induced by chitin together with primary metabolic genes in soil cultures of Streptomyces coelicolor. The data also indicated that a transcriptional factor, DasR, was involved in the regulation of gene expression for chitin catabolism, secondary metabolism and stress responses.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌生物 遺伝子発現 マイクロアレイ解析 放線菌 キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、代表的な土壌細菌であり、他の微生物と競合しながら自然界に存在する基質を分解し栄養源としている。そのため放線菌は、他の生物が利用しにくい高分子基質を効率よく分解する酵素群を分泌する一方で、他の微生物の成育を抑えるために抗生物質を生産すると考えられる。こうした放線菌の機能は、これまで医薬品の開発や有用酵素の生産という形で人類に多大な貢献をしてきた。放線菌のこうした有用機能の発現制御機構は、これまで主に実験室における培養系を用いて精力的に解析されてきている。

一方、自然環境中で放線菌が生育のために利用する栄養基質としては、カビの細胞壁や昆虫等の外骨格を形成するキチンが挙げられる。キチンはセルロースに次いで自然界に多量に存在するバイオマスであるが、堅固な高次構造を有することから、その分解は簡単ではない。放線菌は、キチン分解酵素、キチナーゼを生産する代用的な土壌微生物で、キチン分解能が放線菌同定の際の大きな指標にもなっている。我々は、いち早く放線菌キチナーゼに着目し、複数の放線菌キチナーゼ遺伝子をクローニングし、多くの放線菌が基質特異性の異なる構造的にも多様性に富んだ多数のキチナーゼ遺伝子を有することを明らかにした。また、放線菌のキチナーゼ遺伝子の発現制御機構を解析した結果、キチナーゼがキチンを分解することによって生じる N,N' -ジアセチルキトビオース (キトビオース) によって、その膜輸送系蛋白質遺伝子とキチナーゼ遺伝子群の発現が誘導されること、また、グルコース存在下でこれら遺伝子の発現が強く抑制される等、主に液体培養条件下での放線菌のキチン分解制御機構を明らかにしている。

放線菌における抗生物質の生産制御機構については、長年わたって膨大な量の研究が全世界で行われてきた。一般的に、放線菌の抗生物質生産は、孢子形成に至る一連の形態分化のプロセスや培地の栄養条件に大きく依存する。また、放線菌自身が生産するシグナル物質の生産から始まり抗生物質生産や形態分化に至る遺伝子発現カスケードに、多くの制御蛋白質が関与することも明らかにされている。我々も、抗生物質の生産制御蛋白質のプロモーターを特異的に認識するシグマ因子を明らかにしてきた。通常、キチナーゼが生産される液体培養では形態分化は誘導されず、これまで、キチナーゼ生産は形態分化とは全く無関係であると思われてきた。しかし、今年、キトビオースの取り込みに関与する ABC トランスポーターのキトビオース受容体の変異により、寒天培地上で放線菌の孢子形成に異常をきたすことが示され、放線菌のキチン代謝と形態分化が密接に関連していることが示唆された。また、キチンの構成単糖である N -アセチルグルコサミンの代謝調節蛋白質が、放線菌の形態分化と

抗生物質生産に関与することからも、自然環境下では、放線菌の栄養源となるキチンの代謝と抗生物質生産や孢子形成の開始が密接に関連して、これらの機能に関わる遺伝子群が一つの発現制御ネットワークで繋がっていることが予想される。自然界における放線菌のキチナーゼや抗生物質の生産制御機構を明らかにすることは、放線菌の自然環境適応戦略を明らかにする上で重要であるだけでなく、放線菌を利用した作物病原菌の防除技術やバイオマス廃棄物の除去技術等、放線菌を野外で利用する技術の開発に役立つことが期待される。

ところが、これまでの知見は実験室の培養実験から明らかにされたものであり、放線菌の有用機能の発現が、土壌中でどのように制御されているかについてはほとんど解明されていないのが現状である。これは、遺伝子発現を調べるために必須となる RNA を土壌から抽出することが困難だったことに起因している。最近我々は、土壌から直接抽出した DNA を用い亜酸化窒素発生関連微生物の群集構造解析を行うとともに、土壌から RNA を直接抽出する手法を開発し、基質誘導性酵素遺伝子の転写誘導を検出することに成功した。また、放線菌のゲノム情報は既に公開されており、マイクロアレイ等を用いて、ゲノムワイドな発現制御ネットワークを解析することも可能となってきている。こうした背景から本課題を提案することとした。

2. 研究の目的

土壌などの自然環境中で微生物がいかにその有用機能を発現するかについて、それに関わる遺伝子だけでなく、他の遺伝子の発現と共に総合的に解析した研究は極めて少ない。本研究では、土壌中で生育している放線菌が分解酵素を生産し栄養を獲得する一連のプロセスや抗生物質の生産プロセスを制御する遺伝子の発現制御ネットワークを解明し、放線菌の自然環境適応戦略を明らかにすることを目的とする。具体的には、様々な条件下、放線菌が生育している土壌から直接 RNA を抽出し、マイクロアレイ等を用いて分泌酵素や抗生物質等の生産に関わる遺伝子群の土壌における発現条件を明らかにする。その際、各種変異株を用いて、孢子形成に至る形態分化や蛋白合成、アミノ酸代謝など他の代謝系遺伝子群の発現条件と比較解析することにより、それぞれの関連性を調べる。また、土壌環境中で有用機能の発現を左右する遺伝子を特定し、遺伝子破壊株の解析等を通じてその機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株、培養条件、RNA 抽出

本研究では、放線菌でいち早くゲノム配列が明らかになった *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の野生株と、キチナーゼ生産及び抗生物質生産に変異をきたした *dasR* 遺伝子変

異株(YU1株)を供試菌として研究を行った。土壌における本菌の遺伝子発現を解析するため、オートクレーブ滅菌した畑土壌(最大含水量60%)に放線菌 *S. coelicolor* の胞子を最終 10^6 (CFU/g土)になるように接種後、0.2% (w/w) のコロイダルキチンを添加し、30℃で様々な時間培養した。各種遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で経時変化を測定する場合には、培養開始後24、48、60、72時間後にWang等が開発した方法を一部改変して2gの土壌から直接RNAを抽出した。また、ゲノム上の遺伝子の発現を、マイクロアレイで解析する際には、培養開始後48時間後に、16gのキチン添加土壌及び20グラムのキチン無添加土壌(対象区)からRNAを抽出し解析に供試した。

(2)放線菌の土壌中における生育把握

本研究では、放線菌が土壌中で栄養分を獲得し生育するプロセスと、抗生物質生産や形態分化のプロセスとの関連性を明らかにすることが目的であるため、放線菌の土壌中での生育をモニタリングすることが必須となる。そこで、土壌での放線菌の生育をモニタリングするため、放線菌の染色体DNAに着目した。すなわち、滅菌土壌に *S. coelicolor* A3(2)を接種し、時間を追って土壌からDNAを抽出、抽出されたDNAの量による土壌中での生育のモニタリングを行った。また、並行して *S. coelicolor* A3(2)が生育している際に常時発現していることが知られているいわゆるハウスキーピング遺伝子の一つである主要シグマ因子 (*hrdB*) を標的にした定量PCRによって発現している同遺伝子のコピー数で土壌中の放線菌の生育を評価した。

(3)遺伝子発現量の定量

キチンの分解と代謝のプロセスをモニターするため、*S. coelicolor* A3(2)のゲノム情報からキチナーゼや、キトオリゴ糖の取り込みに関与する蛋白質をコードしていると考えられる遺伝子について、定量PCRを行うためにそれぞれの遺伝子に特異的なプローブの設計を行った。また同様に、*S. coelicolor* A3(2)の抗生物質生産や形態分化を制御する制御蛋白質遺伝子、あるいは初発酵素遺伝子についても発現解析のための定量PCR用プローブの設計も行った。設計したプローブは、DNA断片や液体培養細胞から抽出したRNAを鋳型にしたモデル系でその定量性を検証し、各遺伝子それぞれについてその発現を定量的に解析するための遺伝発現解析系を確立した。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析

土壌中で *S. coelicolor* A3(2)がキチンを栄養源として生育しているときに、どのような遺伝子が発現するかを、マイクロアレイを用いて解析した。マイクロアレイは、*S. coelicolor* A3(2)のゲノムにコードされている各遺伝子を網羅的に固定したRoche NimbleGen社製のものを用い、ゲノム上に存在するそれぞれの遺伝子の発現解析は同社

の解析キットのマニュアルに従って行った。

4. 研究成果

これまで放線菌の土壌中での生育を正確に計る方法は開発されていなかったことから、土壌中で生育している放線菌の生育をモニタリングする手法の検討を行った。滅菌土壌に放線菌を接種し、時間を追って土壌からDNAを抽出、抽出されたDNA量による土壌中での放線菌の生育のモニタリングを行うと同時に、*hrdB*のコピー数で土壌中の放線菌の生育を評価した結果、両者の間に相関が見られ、これらの指標を用いることによって、土壌で生育する放線菌の生育をモニタリングできることが明らかとなった。また、放線菌ゲノム遺伝子の網羅的な発現解析に備えて、市販の核酸精製キットを組み合わせ、放線菌を接種した滅菌土壌から大量に高純度のRNAを抽出する条件を明らかにした。

土壌で生育している放線菌 *S. coelicolor* A3(2)株におけるキチン代謝プロセスを明らかにするため、キチンを添加した滅菌土壌に本菌を植菌し、経時的に土壌からRNAを抽出して本菌ゲノム上に存在する複数のキチナーゼ遺伝子やキチン代謝産物の取込みに関与するトランスポーターの遺伝子などの発現を定量PCRを用いて解析し、キチンを添加しない場合と比較した。その結果、土壌中でも液体培地と同様に、キチン存在下で放線菌が持つ複数のキチナーゼ遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。また、液体培養条件下で生育している場合と土壌環境条件下で生育している場合で、発現している各キチナーゼ遺伝子の相対発現量を比較した結果、これまで発現が確認されていなかったキチナーゼ遺伝子を複数見出し、液体培地では発現が低いにも関わらず、土壌中で発現量が特に高くなるキチナーゼ遺伝子が存在することなど新知見を得ることができた。また、近年放線菌のキチナーゼ遺伝子群の誘導ばかりでなく胞子形成にいたる形態変化や抗生物質生産に関与することが示唆されたN-アセチルグルコサミンの代謝調節蛋白質の遺伝子 *dasR* を標的に相同組換えを用いたノックアウト変異株を作成し野生株とそのキチナーゼ遺伝子発現パターンを比較した結果、この *dasR* 変異株が液体培地では野生株の4分の1程度にキチナーゼ活性が低下し、土壌環境条件下では一部のキチナーゼ遺伝子の発現が全く失われることが明らかとなり、この転写制御因子がキチナーゼ遺伝子の発現制御にも関与していることが明らかになった。滅菌していない畑土壌に供試菌、放線菌 *S. coelicolor* を植菌し、キチン存在下及び非存在下で生育させ、定量PCRを用いて供試菌の複数のキチナーゼ遺伝子及びトランスポーター遺伝子などの発現の検出を試みた結果、栄養源やニッチを共有する他の土壌微生物の存在下でもキチナーゼ遺伝子群や分解産物であるキトビオースの取込みに

関与するトランスポーター遺伝子群の発現を検出することができた。また、この様な非滅菌生土壌でも液体培地や滅菌土壌と同様にキチンの存在下でのみこれらキチン代謝関連遺伝子の転写が誘導されることが確認された。さらに、キチン存在下及び非存在下で生育した供試菌について、放線菌ゲノム遺伝子を固定したマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った結果、キチン代謝系遺伝子ばかりでなく、解糖系や窒素代謝などの主要一次代謝関連遺伝子群の発現もキチン存在下で活性化されることが明らかとなった。また興味深いことに、放線菌ゲノム上に存在する複数の抗生物質生産遺伝子群の発現がキチン存在下で誘導されるという新知見を得ることができた。

放線菌ゲノム・マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析で、土壌中で生育している放線菌において、キチンによる転写の誘導が認められた8つの抗生物質生産関連遺伝子群について、それぞれ複数の遺伝子の発現を検出するための特異プライマーを設計・合成し、土壌で生育している放線菌 *S. coelicolor* A3(2)株から RNA を抽出、得られた mRNA 中のこれら遺伝子の転写量を定量 RT-PCR を用いて測定した結果、土壌中で生育している A3(2)株でこれら遺伝子は例外なくキチンの添加によって発現が誘導されることが確認された。特に Cryptic polyketide 合成関連遺伝子群のポリケタイド合成遺伝子 *ckp1* は、キチンにより 100 数十倍もその発現量が増大することが明らかとなった。さらに、放線菌抗生物質のキチンによる生産量増大は、土壌抽出液を添加した寒天培地上でも確認され、キチンを含む寒天培地に土壌抽出液を入れた場合に、青色抗生物質であるアクチノロジンの生産の増加が認められ、土壌の可溶性各分に放線菌の抗生物質生産を誘発する物質が存在することが明らかとなった。

また、抗生物質生産を制御することが知られている転写因子 *DasR* の遺伝子破壊株と野生株をキチン存在下土壌中で生育させ、それぞれのゲノムにコードされている遺伝子の発現をマイクロアレイを用いて網羅的に比較解析した結果、*dasR* 遺伝子の破壊によって総計 690 個の遺伝子の発現が影響を受けることが明らかとなった。中でも土壌で生育中にキチンによって転写誘導がかかる抗生物質生産関連遺伝子群の発現が *dasR* 遺伝子破壊株で高まることから、*dasR* がこれら遺伝子群の発現を負に制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 23 件)

1) Nazari, B., Kobayashi, M., Saito, A., Hassaninasab, A., Miyashita, K. and Fujii, T., Chitin-induced gene expression in secondary metabolic pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* (査読有) 79: 707-713. (2013)
DOI: 10.1128/AEM.02217-12

2) Saito, A., Ebise, H., Orihara, Y., Murakami, S., Sano, Y., Sugiyama, Y., Ando, A., Fujii, T. and Miyashita, K., Enzymatic and genetic characterization of the DasD protein possessing N-acetyl- β -D- glucosaminidase activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *FEMS Microbiol. Lett.* (査読有) 340: 33-40. (2013)
DOI: 10.1111/1574-6968.12069)

3) 藤井毅、王勇、土壌からの RNA の抽出技術とその利用技術の開発、土壌微生物相の解明による土壌微生物性の解析技術の開発 (農林水産省研究成果) 査読無、494: 25-28、(2013)

4) 王勇、長岡和成、早津雅仁、酒井順子、多胡香奈子、藤井毅、これまで困難だった黒ボク土壌からの RNA 抽出法の開発、農業環境技術研究所研究成果情報、査読無、29:36-37、(2013)

5) ベナムナザリ、藤井毅、土壌環境下、放線菌の抗生物質生産遺伝子群の発現がキチンによって誘導される、農業環境技術研究所研究成果情報、査読無、29:38-39、(2013)

6) Wang, Y., Nagaoka, K., Hayatsu M., Sakai, Y., Tago K., Asakawa S., and Fujii, T., A novel method for RNA extraction from Andosols using casein and its application to *amoA* gene expression study in soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (査読有) 96(3): 793-802. (2012)
DOI: 10.1007/s00253-012-4342-3

7) Wang, Y., Hayatsu, M. and Fujii, T., Extraction of Bacterial RNA from Soil: Challenges and Solutions. *Microbes. Environ.* (査読有) 27(2): 111-121. (2012)
<http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME11304>

8) Iino, T., Wang, Y., Miyauchi, K., Kasai, D., Masai, E., Fujii, T., Ogawa, N. and Fukuda M., Specific gene responses of *Rhodococcus jostii* RHA1 during growth in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* (査読有) 78(19): 6954-6962. (2012)
DOI: 10.1128/AEM.00164-12)

9) Hirano K, Watanabe M, Seki K, Ando A, Saito A, Mitsutomi M. Classification of chitinase by hydrolytic specificities toward N1,N4-diacetylchitohexaose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 76: 1932-1937. (2012)
DOI: 10.1271/bbb.120408

10) Tashiro N, Manabe K, Saito A, Miyashita K. Identification of potato scab-causing *Streptomyces* sp. occurring in strongly acidic soils in Saga Prefecture in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* (査読有) 78:353-359. (2012)
DOI: 10.1007/s10327-012-0393-7

11) Kouzai Y, Mochizuki S, Saito A, Ando A, Minami E, Nishizawa Y. Expression of a

- bacterial chitosanase in rice plants improves disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Rep.* (査読有) 31:629-636. (2012)
DOI: 10.1007/s00299-011-1179-7
- 12) Amano K, Katayama H, Saito A, Nagata Y. *Aleuria aurantia* lectin exhibits antifungal activity against *Mucor racemosus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 76: 967-970. (2012)
DOI: 10.1271/bbb.110982
 - 13) Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N. and Fujii T. A survey of the cellular responses in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized soil by microarray analysis. *FEMS Microbiol Ecol.*(査読有)78: 220-232. (2011)
DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01143.x)
 - 14) Nazari, B., Kobayashi, M., Miyashita, K., Saito A, Wang, Y. and Fujii T. High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*(査読有)77: 623-635. (2011)
DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01143.x
 - 15) Kamijo, T., Saito A, Ema, S., You, I., Hayashi, H., Nagata, R., Nagata, Y., and Ando, A., Molecular and enzymatic characterization of a subfamily I.4 lipase from an edible oil degrader *Bacillus* sp. HH-01. *Anton. Leeuw. Int. J. G* (査読有) 99: 179-187. (2011)
DOI: 10.1007/s10482-010-9474-9
 - 16) Shibasaki, A., Kudo, T., Yaguchi, T., Saito A, Ando, A., Mikami, Y., and Gono, T. *Streptomyces coaveratus* sp. nov., isolated from the intestinal tract of *Armadillidium vulgare*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* (査読有) 61: 1073-1077. (2011)
DOI: ijs.0.019091-0v161/5/1073
 - 17) Ohno, M., Kataoka, S., Numata, S., Yamamoto-Tamura, K., Fujii T, Nakajima, M., Akutsu, K. and Hasebe, A., Biological control of Rhizoctonia damping-off of cucumber by a transformed *Pseudomonas putida* strain expressing a chitinase from a marine bacterium. *JARQ-Jpn. Agr. Res. Q.* (査読有) 45(1): 91-98. (2011)
<http://www.jircas.affrc.jp>
 - 18) Yamamoto-Tamura, K., Ohno M., Fujii T, Kataoka, S., Numata, S., Nakajima, M., Hasebe A. and Akutsu K. (2011) Assessment of the effects of genetically modified *Pseudomonas* spp. expressing chitinase on the soil microbial community in the cucumber rhizosphere. *JARQ-Jpn. Agr. Res. Q.*, (査読有) 45(4):377-383.
<http://www.jircas.affrc.jp>
 - 19) 森本晶、藤井毅、メタゲノムからの新規遺伝子探索、*土と微生物*、査読有、65：66-72、(2011)
 - 20) 齋藤政則、篠山浩文、齋藤明広、知久和寛、安藤昭一、スギ落葉から分離した *Pestalotiopsis* sp. 属糸状菌が生産するカテコール配糖化酵素の精製と諸性質、*食と緑の科学*、査読有、65: 75-80、(2011)
 - 21) 藤井毅、農耕地土壌におけるメタゲノム解析研究の動向、*化学と生物*、査読無、49:697-703
 - 22) Wang, Y. and Fujii T. Evaluation of methods for determining humic acids in the nucleic acids samples for molecular biological analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(2): 355-357. (2011)
DOI:10.1271/bbb.100597)
 - 23) Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., Ohmori, T., and Fujii T. An improved method to extract RNA from soil with efficient removal of humic acids. *J. Appl. Microbiol.* (査読有) 107: 1168-1177. (2009)
DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04298.x)
- [学会発表](計20件)
- 1) 藤井毅、土壌抽出 RNA から明らかになった抗生物質生産遺伝子の土壌における誘導発現、農業環境技術研究所 30 周年記念セミナー公開セミナー、2013 年 3 月 7 日、秋葉原コンベンションホール
 - 2) 齋藤明広、村上聡史、海老瀬広規、杉山裕多、安藤昭一、藤井毅、宮下清貴、N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ DasD の放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における機能の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、仙台・東北大学
 - 3) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii T, Microarray Analysis of the Transcriptional Responses of *Streptomyces coelicolor* to the Addition of Chitin into Soil Microcosm. International Conference Molecular Ecology, 2012 年 2 月 6 日、University of Veterinary Medicine、オーストリア
 - 4) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii T, The role of DasR in regulation of chitin metabolism of *Streptomyces coelicolor* grown in soil. 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学
 - 5) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii T, Genome-wide transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* grown in soil in response to the addition of chitin. 日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会, 2011 年 10 月 15 日, 東洋大学
 - 6) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii T, The unique chitinase gene expressions in *Streptomyces coelicolor* grown in soil, 第 84 回日本生化学大会, 2011 年 9 月 23 日, 国立京都国際会館
 - 7) Wang, Y., Nagaoka, K., Morimoto, S., Ogawa, N., Hayatsu, M., and Fujii T, Microbial gene expression analysis in

- soil using microarray technology. 第 27 回日本微生物生態学会大会, 2011 年 10 月 9 日, 京都大学
- 8) Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., Fujii T. and, Hayatsu, M., Microarray analysis revealed a highly responsive gene cluster to 3-chlorobenzoic acid in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized soil. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜
- 9) 海老瀬広規、村上聡史、佐藤守、安藤昭一、齋藤明広、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における MsiK - ABC 輸送系複合体の探索、第 8 回大腸菌研究会、2011 年 5 月 18 日、ホテル木曾路
- 10) 海老瀬広規、折原由香里、村上聡史、齋藤明広、安藤昭一、藤井毅、宮下清貴、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の *dasD* 遺伝子のキチン分解における機能の解明、日本土壌肥料学会 2011 年度大会
- 11) 折原由香里、海老瀬広規、村上聡史、齋藤明広、安藤昭一、藤井毅、宮下清貴、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の DasD タンパク質は細胞内局在型β-N-アセチルグルコサミニダーゼとして機能する、第 25 回キチン・キトサンシンポジウム、2011 年 8 月 30 日、奈良県新公会堂
- 13) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii, T., Detection of soil specific gene expression of a chitinase in *Streptomyces coelicolor*. 日本土壌微生物学会, 2010 年 5 月 21 日, 東京大学
- 14) 佐野コカリ、村上聡史、海老瀬広規、齋藤明広、新屋友規、出崎能丈、澁谷直人、安藤昭一、藤井毅、宮下清貴、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) のキチナーゼ生産における DasR の機能解析、第 24 回キチン・キトサンシンポジウム、2010 年 7 月 13 日、東京大学
- 15) 齋藤明広、飯沼千晴、新屋友規、出崎能丈、澁谷直人、安藤昭一、藤井毅、宮下清貴、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における 2 つの (GlcNAc)₂ 輸送系の役割、第 24 回キチン・キトサンシンポジウム、2010 年 7 月 13 日、東京大学
- 16) Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N. and Fujii, T., Detection of genome-wide gene expression in *Pseudomonas putida* KT-2440 growing in soil by microarray analysis, ISME 13, 2010 年 8 月 27 日, 米国、シアトル
- 17) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii, T., Purification and characterization of a soil specific chitinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), 日本放線菌学会, 2010 年 7 月 14 日, 東京
- 18) Saito, A., Fujii, T., Shinya, T., Shibuya, N., Ando, A., and Miyashita, K., Chitinase production and N,N'-diacetylchitobiose uptake in

Streptomyces coelicolor A3(2). The 11th International Conference on Chitin and Chitosan Symposium, 2010 年 9 月 8 日, 台湾、台湾理科大学

- 19) Nazari, B., Kobayashi, M., and Fujii, T., Soil specific chitinase gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 2010 年 9 月 29 日, 中国, 江南大学
- 20) Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., and Fujii, T., An improved method to extract RNA from soil with efficient removal of humic acids. BGECO 10, 2009 年 6 月 15 日, スウェーデン・ウプサラ

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Morimoto, S. and Fujii, T. Application of PCR-DGGE and metagenome walking to retrieve full-lengths functional genes from soil. In Molecular Microbial Ecology II, (2011) Ed. Bruijn, F. J. de, p.117-123, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey
- 2) 藤井毅、農耕地土壌の生物学的特性解明への挑戦、メタゲノム解析技術の最前線、(2010) p.200-208、シーエム出版、東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：抗生物質生産関連遺伝子のスクリーニング方法

発明者：藤井毅、ナザリベナム

権利者：独立行政法人農業環境技術研究所

種類：特許

番号：特願 2014-042420

出願年月日：平成 26 年 3 月 6 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.niaes.affrc.go.jp/researcher/fujii_t.html

<http://www.sist.ac.jp/col/teacher/search/detail/655>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 毅 (FUJII Takeshi)

独立行政法人農業環境技術研究所・生物生体機能研究領域・領域長

研究者番号：00354100

(2) 研究分担者

齋藤 明広 (SAITO Akihiro)

静岡理科大学・理工学部・准教授

研究者番号：50375614

(3) 連携研究者

なし