

氏 名(本 籍)	戸 村 大 助 (東京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,479 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 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	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	糸状菌 <i>Fusarium oxysporum</i> のチトクロム P 450 nor 遺伝子に関する研究
主 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 Ph. D. 多比良 和 誠
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行
副 査	筑波大学教授 理学博士 齋 藤 建 彦

論 文 の 要 旨

脱窒は長い間原核生物（細菌）に固有の能力であると信じられてきたが、近年 *Fusarium oxysporum* をはじめとする多くの真菌（糸状菌、カビ）に脱窒活性が発見された。チトクロム P 450 nor（以下、P 450 nor）はこれら糸状菌の脱窒系において、一酸化窒素（NO）還元酵素（Nor）として働く。細菌脱窒系では P 450 の関与は知られていない。P 450 nor の触媒する反応は、通常モノオキシゲナーゼとして働く他の P 450 に比べるときわめてユニークである。P 450 nor は NADH（または NADPH）の還元力を使って NO を N_2O に還元する。その際 NADH の 2 電子を P 450 が直接受け取るという、生体電子伝達のセントラルドグマに反する反応が起こる。この特異な反応機構から、P 450 nor は当該分野に於て世界的に注目されている。カビの脱窒系は細菌と同様、硝酸塩（または亜硝酸塩）存在下、低酸素分圧条件で誘導されることから、その誘導機構に関し細菌との比較に興味をもたれた。また P 450 nor の特異な反応機構解明のために、タンパク質工学的解析が一つの有力な手段となる。本論文は *F. oxysporum* の P 450 nor について遺伝子解析を行い、発現調節機構の解明、他宿主に於けるタンパク発現系の構築、タンパク質工学的解析系の開発、などについて検討したものである。

P 450 nor の誘導については、タンパクレベルでは詳しく調べられていた。本研究ではノーザン解析により、転写レベルでの発現調節について検討を加えた。その結果 P 450 nor は硝酸塩あるいは亜硝酸塩により誘導され、その誘導は転写レベルで調節されていることが明らかとなった。自身の基質である NO による誘導については、その毒性が強く、よく分からなかった。P 450 nor がその基質（NO）ではなく、脱窒系での上流酵素（硝酸塩還元酵素および亜硝酸塩還元酵素）の基質により誘導される点、興味深い。毒性の高い NO の発生に備えるという合目的性が窺える。次にこの発現調節機構をさらに詳しく検討するため、隣接領域を含む P 450 nor ゲノム DNA を取得し、解析を行った。その 5' 上流領域には TATA ボックスと共に、大腸菌など細菌の嫌気的生育に関わる FNR（Fumarate and Nitrate Reduction）結合部位と相同の逆方向繰り返し配列が見いだされた。さらに上流には、やはり大腸菌で見いだされた NarL の結合部位と似た配列も存在した。すなわち低酸素分圧（FNR）および硝酸/亜硝酸（NarL）の検知が、細菌と同じ調節機構で行われている可能性が示された。真核生物が原核生物と同じ遺伝子発現の機構をもつとすれば、生命進化を考える上で大変興味深く、今後の詳しい解析が期待される。

次に、タンパク質工学的解析を行うための発現系構築について検討した。T_{re} プロモーターをもつ発現ベクター pKK 233-2を用いて大腸菌での発現を試みた。その結果、宿主菌体の可溶性画分に明瞭な Nor 活性が検出

された。しかし精製するには量が少ないので発現量を上げるための様々な方法を試みたが、最高発現量は可溶性タンパクの0.017%に留まった。そこで酵母を用いた発現系も試みた。GAL1 プロモーターをもつ発現ベクター pYES2 により、可溶性タンパクの1.4%の発現率を得た。この発現系から組換え P 450 nor タンパクを精製し、その諸性質がもとのカビのタンパクと変わらないことを示した。以上の結果は、P 450 nor が真核生物で初めて可溶性 P 450であることを確認し、さらにその特異な反応を他のタンパク成分の助け無しに行うことを示す最終的な証明となった。次にこの酵母の発現系を用いるタンパク質工学的解析のモデルとして、殆ど全ての P 450 に保存されている I ヘリックス中の Thr 残基の変異体の作成を試みた。この残基を Ala に置換した変異体 T 243 A は酵母で安定に発現し、その部分精製標品の諸性質は野生型と大差無かった。従ってこの Thr 残基は本 P 450 の活性に必須では無いことが明らかとなった。以上の結果より、本酵母発現系が、種々のタンパク質工学的解析のための手段として有効であることが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

本論文は、生命科学における最重要酵素の一つである P 450 の分野で、その特異な反応機構から世界的に注目されている P 450 nor についておもに遺伝子の面から解析を行った。P 450 nor の誘導に関し、それが転写レベルでの調節を受けていることを明らかにし、さらにゲノム遺伝子の解析から、糸状菌脱窒系が大腸菌をはじめとする細菌の嫌気呼吸系と同様の転写調節因子により制御されている可能性を示した。生命進化の面からカビと細菌の脱窒系の相関関係に興味をもたれるが、硝酸塩還元酵素、亜硝酸塩還元酵素、アズリン、およびギ酸脱水素酵素など、P 450 以外のカビ脱窒系構成成分は細菌の系に酷似することが明らかとなってきた。従って両脱窒系がそれらの構成成分だけでなく、発現調節機構まで同じである可能性を示した本研究は、呼吸という普遍的生命現象の進化を考える上で重要発現となるべき成果である。さらに本論文では、P 450 nor の特異な反応機構を解明する上で不可欠であるタンパク質工学的解析を行う上で必要な、大量発現系の構築に成功した。この成果は、P 450 nor の構造と機能の相関解明をめざす研究の今後の進展に大きな貢献をなすことは疑いがない。

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。