

氏 名 (本 籍)	うちむらひろまさ 内 村 浩 正 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2805 号
学位授与年月日	平成 14 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> の一酸化窒素還元酵素遺伝子 (CYP55) の発現制御機構の解析
主 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授 工学博士 松 村 正 利
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

*Fusarium oxysporum* は、土壌中などに広く見られるカビであるが、硝酸塩 ( $\text{NO}_3^-$ ) を  $\text{N}_2\text{O}$  にまで還元する脱窒能が見いだされた初めての例となる真核生物である。また、このカビの脱窒が、原核生物のそれと同様に、酸素制限条件下における嫌気呼吸 (硝酸呼吸) として機能し、ミトコンドリア内で起こる反応である。本研究では、脱窒系を構成する酵素遺伝子の中で、シトクロム P450nor (CYP55) 遺伝子についての解析を行った。

### 1. *F.oxysporum* のシトクロム P450nor の遺伝子発現制御機構の解析

CYP55 の発現は、硝酸または亜硝酸の存在及び酸素供給の制限された条件で転写レベルで誘導されることが分かっている。本研究では、*F.oxysporum* の CYP55 の発現に関して、*E.coli* の  $\beta$ -galactosidase をレポーター酵素とした系を利用した CYP55 プロモーター領域の解析を行い、CYP55 プロモーター内に硝酸による誘導に関与している領域および低酸素条件下での誘導に関与している領域を特定した。また、その領域内には、他のカビにおいて、硝酸同化系酵素遺伝子の発現を正に制御することが知られている転写因子 NirA の結合配列及び *Saccharomyces cerevisiae* において低酸素条件下で働く遺伝子の発現を好気条件下で抑制することが知られている Rox1p の結合配列と類似の配列が存在していた。

本研究では、さらに、硝酸同化能欠損変異株を用いた遺伝学的解析を行った。その結果、CYP55 の発現が、上述の転写因子 NirA により制御されること、さらに、上述の Rox1p の結合配列と類似の配列が CYP55 の転写に関与することがより強く証明された。以上の結果は、*F.oxysporum* がこれら 2 種の転写制御因子を用いて脱窒条件に適応していることを示唆する。一方、*Aspergillus nidulans* (及び *Neurospora crassa*) の解析により、硝酸同化系酵素遺伝子の硝酸依存性の誘導に NirA (Nit-4) と AreA (Nit-2) の両方が必要であることが示されている。*F.oxysporum* においても AreA が CYP55 の発現に関連している可能性があり、*F.oxysporum* の areA 遺伝子を単離し、その解析を行った。

### 2. シトクロム P450nor 遺伝子プロモーターを利用した応用研究

現状の廃水処理の脱窒過程では、前処理段階として好氣的なばっ気処理を行うため、不十分な嫌気条件により、脱窒中間産物である  $\text{N}_2\text{O}$  の発生が問題となっている。このような問題点を改善するためには、 $\text{N}_2\text{O}$  非生産性の脱窒

菌の育種と改良を行うことが解決策の1つとなると考え、以下の実験を行った。

P450norの発現制御機構について解析を行う債に、CYP55のプロモーター領域を用いたlacZ遺伝子を*F.oxysporum*内で発現させる異種遺伝子発現系を利用した。そこで、好氣的脱窒菌の育種、改良を目指し、脱窒産物として $N_2O$ を生成する*F.oxysporum*にこの異種遺伝子発現系を用いて $N_2$ までの完全な脱窒をさせる新規の脱窒系の構築を試みた。すなわち、代表的な脱窒細菌である*Pseudomonas stutzeri*由来の $N_2O$ 還元酵素遺伝子(*nosZ*)を*F.oxysporum*に導入し、そもそも好氣的脱窒菌である*F.oxysporum*に $N_2$ を生成させることによって、好気条件下で $N_2$ まで完全に脱窒を行う新規の脱窒系を構築することを試みた。その結果、*F.oxysporum*形質転換体細胞内で、活性型NosZは発現させることはできなかったが、異種遺伝子*nosZ*を脱窒誘導培養時に発現させ、ミトコンドリアへ移送させることに成功した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

カビによる脱窒は比較的近年発見された現象であるが、本研究は、その研究の中で、数少ない遺伝子レベルの研究として評価される。特に、取り扱いが困難なカビの遺伝子組み替え系を駆使したプロモーター解析は、既知のカビの遺伝子のプロモーター構造の解析の中でも、レベルが高いといえる。この研究により、以下のような応用研究が可能となったことは、この成果の役割が大きいことを示すものである。

また、本研究では、得られたプロモーター構造の知見とそれを利用した異種遺伝子発現系を用いることで、 $N_2O$ 非生産性脱窒菌を育種することを試みている。 $N_2O$ は温室ガスとして近年注目されており、その人為起源の排出を削減しようという研究が始まりつつある。特に、排水処理の脱窒過程で脱窒菌から生成される $N_2O$ は問題である。本研究で試みられた、 $N_2O$ 還元酵素をカビに導入することによって $N_2O$ 非生産性の脱窒菌を育種し、現行の脱窒処理システムを改良する研究は、こうした背景から高く評価される。

以上のように、本研究は、カビの脱窒の分子生物学にとって重要な結果をもたらしたといえる。従って、得られた成果の役割は大きいと判断する。

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。