

氏名(本籍)	藤井達也(兵庫県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4674号		
学位授与年月日	平成20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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	糸状菌の嫌気的な窒素代謝に関する分子生物学的研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	星野貴行
副査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	中村顕
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	高谷直樹

論文の内容の要旨

原核生物には、酸素の代わりに硝酸塩や硫酸塩を利用して呼吸し嫌気的に生育するものが多く知られるが、近年、真核生物である糸状菌がこれを行うことが見出された。そこで、本研究では、特に窒素代謝に注目し、糸状菌の嫌気的なエネルギー代謝の分子機構について詳細な解析を行った。

F. oxysporum JCM11502株(FWT)は、硝酸を利用した呼吸に伴い、硝酸を亜酸化窒素へ還元し脱窒する。また、本菌の脱窒には、ミトコンドリアに局在化する異化型ユビキノール-硝酸還元酵素(NAR)が関与する。本研究では、これとは異なり硝酸の同化に関わるとされているNADH-NARが本菌の脱窒に寄与することを解明した。

本菌の類縁菌である*F. oxysporum* FOM24のNADH-NAR遺伝子(*niaD*)の配列をもとにFWTの*niaD*をコードする遺伝子を単離した。この遺伝子をNADH-NAR活性が顕著に低下したFWT由来の変異株*F. oxysporum* M10株(M10)に導入し、*F. oxysporum* T1株(T1)を得た。T1は、M10が生育できない硝酸を唯一の窒素源とした培地で生育可能であり、FWTと同程度の細胞内のNADH-NAR活性を示したことから、本菌の*niaD*遺伝子は、他の菌の*niaD*と同様に硝酸の同化に寄与することが示された。

また、*niaD*のプロモーター領域と β -ガラクトシダーゼ遺伝子を連結した遺伝子を用いたレポーター解析により、*niaD*の発現は培地中に硝酸が存在し、酸素濃度を制限した条件下(脱窒条件下)で上昇することを発見した。また、このとき、脱窒に関与するP450norおよびユビキノール-NARの発現も上昇し亜酸化窒素が生成(脱窒)した。一方、M10による脱窒産物の量はFWTのその20%であったが、これに*niaD*を導入したT1では、M10での脱窒能の低下が回復されることが示された。以上の結果から、*F. oxysporum*による硝酸の脱窒にNADH-NARが寄与していることが示された。

一方、*Aspergillus nidulans* A26株(AWT)が好気条件下に比べ嫌気条件下でグルタミン酸を多く生成することを見出した。このとき、グルタミン酸脱水素酵素(GLDH)が嫌気条件下においてタンパク質レベル、転写レベルで高発現していた。GLDH遺伝子(*gdhA*)をAWTに1コピー導入した株(2GL)と*gdhA*の遺伝子破壊株(DGL)を作製し同様の検討を行ったところ、各株によるグルタミン酸の蓄積量とGLDHの活性の強さに相関があることが示された。以上の結果から、本菌による嫌気条件下のグルタミン酸生成に、

GLDH が関与する可能性が考えられた。

また、AWT の細胞内の 2-オキシグルタル酸脱水素酵素 (OGDH) の活性は、嫌気条件下で培養した場合、好気条件下の 1/3 であった。また、AWT の細胞内の NADH/NAD⁺ 比は好気条件下よりも嫌気条件下で大きく、OGDH の活性は NAD/NAD⁺ の比が高いときに阻害された。これらの結果から、嫌気条件下では、細胞内の NADH/NAD⁺ 比の増大により OGDH 活性が低下すると考えられた。さらに、嫌気条件下では、GLDH の基質であるアンモニアの蓄積が好気条件下と比較して多かった。以上の結果から、本菌による嫌気条件下でのグルタミン酸の細胞外への蓄積は、GLDH が高発現すること、細胞内の OGDH 活性の低下により細胞内の代謝フラックスがグルタミン酸生成に傾くこと、細胞外にアンモニアが蓄積することなどが組み合わさって引き起こされると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物のエネルギー代謝に関しては、下等真核生物による硝酸呼吸、水素発酵、アンモニア発酵などが比較的最近発見され、関連学術研究でのトピックとなっている。本研究は、*F. oxysporum* の脱窒反応と NADH-NAR および *A. nidulans* の嫌気的なグルタミン酸生成反応と GLDH の新たな関連を見出した。本研究は、糸状菌の嫌気的な窒素代謝に関するこれまでの研究に、これらの新たな知見を加えた点で高く評価される。本研究では、NADH-NAR が *F. oxysporum* の脱窒に寄与することを示した。糸状菌の NADH-NAR は硝酸の同化だけでなく、糸状菌 *Cylindrocarpum tonkinense* による脱窒や糸状菌 *A. nidulans* によるアンモニア発酵に寄与することが知られている。本研究による発見は、糸状菌の NADH-NAR が硝酸の同化だけでなく異化にも利用される多機能な酵素であることを示す点で興味深い。嫌気的なエネルギー代謝は原核生物に固有であり進化的に古い代謝と考えられていたことから、本研究で得られた知見は、今後、真核生物の起源や進化の考察にとって大きな意義を持つものである。

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。