

氏 名 (本籍)	^{ます} 榊 ^お 尾 ^{しゅん} 俊 ^{すけ} 介 (山 口 県)			
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	博 甲 第 5725 号			
学位授与年月日	平成 23 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	<i>Aspergillus nidulans</i> におけるピリジンヌクレオチドを介した新規な代謝制御機構			
主	査	筑波大学准教授	博士 (農学)	高 谷 直 樹
副	査	筑波大学教授	農学博士	星 野 貴 行
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 (工学)	野 村 暢 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

一部の例外を除き、ほとんどの真菌にとって、酸素は生育の維持に必要不可欠であり、生育環境中の酸素濃度の低下はストレスとなる。一方で、呼吸により消費される酸素の一部は活性酸素へと変換されることが知られるが、環境中の酸素濃度の上昇や呼吸系の異常などによりこれが過剰に生産されると酸化ストレスが引き起こされる。すなわち、酸素の有無により生じるこれらのストレスに適応することは、真核生物が生命活動が続いていく上で必要不可欠といえる。本研究では、*A. nidulans* の低酸素ストレスと酸化ストレスに対する適応機構についての解析を行った。

まず、低酸素ストレスに対する遺伝子発現応答を網羅的に解析した。本菌は低酸素条件下で解糖系、TCA サイクルおよび TCA サイクルのバイパス経路である γ -aminobutyrate (GABA) シャントを構成する遺伝子の発現を上昇させることが示された。さらなる解析により、本菌が低酸素条件下でエタノール発酵および乳酸発酵により NADH の再酸化およびエネルギーを獲得し、GABA シャントにより NADH の過剰な蓄積を回避していることが明らかとなった。一方で、細胞内の mRNA の合成を担う RNA polymerase II (Pol II) や Pol II 依存型の転写の開始に関わるタンパク質をコードする遺伝子の発現が低酸素条件下で低下していた。細胞内の全 mRNA 含量は、低酸素条件下で低下し再酸化により上昇したことから、*A. nidulans* は低酸素に応答して Pol II に依存した転写を抑制していることが示された。

次に、低酸素条件下での硝酸還元酵素遺伝子 *niaD* の発現制御機構について解析し、低酸素条件下で細胞内の *niaD* の発現が上昇し、これに窒素代謝系遺伝子の発現を制御する因子である NmrA および AreA が関与することを明らかとした。NmrA は NAD(P)H に比べ NAD(P)⁺ に高い親和性を示す転写抑制因子であり、転写誘導因子である AreA に結合することでその働きを阻害すると考えられている。両者の *in vitro* での結合が NADPH により抑制され、好気条件下に比べ、低酸素条件下では細胞内の NADPH/NADP⁺ の比が上昇していたことから、低酸素条件下では細胞内の NADPH が増加することにより NmrA の AreA への結合が抑制され *niaD* の発現が誘導されることが示唆された。一方で、これらの研究の過程で、*nmrA* 遺伝子破壊株の生育がメナジオン (MD) などの酸化ストレス誘導剤により阻害されることを見出した。そこで、次に、

NmrA を介した MD に対する生育の耐性化機構についての解析を行った。本菌の生育の MD 耐性には AreA ではなく、AreA と同様に GATA ドメインを持つ AreB が関与していることを見出した。NmrA と AreB が in vitro および in vivo で相互に結合することを示した。また、両者の in vitro での結合は NADP^+ により促進され、 NADPH により抑制された。MD 存在下、NmrA および AreB は glucose-6-phosphate dehydrogenase、6-phosphogluconate dehydrogenase および NADP^+ -dependent glycerol dehydrogenase といった NADPH の生産に関与する酵素をコードする遺伝子の発現を正に制御することを明らかとした。また、MD により細胞内の $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ の比が低下し、それは野生株に比べ *nmrA* および *areB* 遺伝子破壊株でより顕著であった。NmrA は MD により酸化的に生じる NADP^+ を感知し、AreB と相互作用することによって上記遺伝子の発現を制御し、細胞内の NADPH を増加させることで *A. nidulans* の MD ストレス応答と生育の耐性化に寄与していると考えられた。

本研究成果は、*A. nidulans* が NmrA を介して細胞内のピリジヌクレオチドの酸化還元状態を感知し、転写および代謝を制御することで外界の環境変化に適応する機構を持つことを示した初めての例である。また、本研究により、ピリジヌクレオチドの酸化還元状態から *A. nidulans* の細胞機能を理解することが可能になったという点で重要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、低酸素条件下では、*A. nidulans* の細胞内に NAD(P)H が蓄積すること、酸化ストレス条件下では、NmrA が NADP^+ を識別することによって生体機能を調節することを初めて見出した。また、本研究によって、ピリジヌクレオチドの酸化還元状態による *A. nidulans* の低酸素・酸化ストレスを理解することが可能となった。さらに、*A. nidulans* がピリジヌクレオチドの酸化還元状態を感知し、転写および代謝を制御することで外界の環境変化に適応する機構を持つことがはじめて示され、糸状菌の新たな代謝研究の礎を築いた点で高く評価できる。

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。