

氏名(本籍)	どいゆうき 土肥裕希(富山県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第5746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	<b><i>Achromobacter</i> sp. YD35 株の亜硝酸塩耐性化機構の解明</b>

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

亜硝酸塩は、生理的条件下で、変異原性や酸化力を有する活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species、RNS) を生じる。RNS は、活性酸素種と同じラジカル分子種であり、周囲の遺伝子やタンパク質を酸化し細胞傷害を誘引する。病原性細菌は、宿主の自然免疫が生じる一酸化窒素 (NO) により RNS ストレスを受けるとされている。従って、細菌の亜硝酸塩や RNS に対する防御機構を解明することにより、病原性細菌に対する新たな薬剤ターゲットを得るための重要な知見が得られると期待される。そこで、本研究では、亜硝酸塩が引き起こす RNS ストレスに対する細菌の応答および耐性化機構の解明を試みた。

高濃度の亜硝酸塩存在下でも生育が可能な高度亜硝酸塩耐性菌を検索・単離した。これらの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析により、51 株が *Ochrobactrum* 属、4 株が *Delftia* 属、1 株が *Achromobacter* 属と同定された。生理試験の結果、後者を *Achromobacter* sp. YD35 株 (YD35 株) と同定し、その遺伝子操作系の確立に成功した。

YD35 株の細胞内タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ、亜硝酸塩存在下では、各種のラジカル解毒系タンパク質と TCA 回路において NADH または NADPH の生産に関わる酵素群の発現の上昇が確認された。このことから、YD35 株は TCA 回路の酵素の発現量を上昇させ、ラジカル解毒系タンパク質に NADH または NADPH を供給することによって、亜硝酸塩により生じる酸化ストレスに適応すると考えられた。次に、YD35 株にトランスポゾンを用いてランダム変異を導入し、30 株の亜硝酸塩超感受性変異株を取得した。YD35 株のゲノム塩基配列のドラフト解析結果を利用し、このうち 26 株のトランスポゾン挿入部位を決定したところ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (Pdh) の E1 コンポーネント (Pdh E1) 遺伝子と相同性を示す遺伝子への挿入が多く見られた。Pdh E1 の周囲の遺伝子を単離したところ、その下流に Pdh の E2 および E3 コンポーネントと相同性を示す遺伝子が見いだされ、これら 3 つの遺伝子はオペロンを形成すると予測された。これらの組換えタンパク質を調製し混合することによって Pdh 活性を再構成することができたことから、これら 3 つの遺伝子が Pdh の各コンポーネントをコードすることが示されたことから、Pdh が YD35 株の生育の高度亜硝酸塩耐性に関わることが示された。

YD35 株がコードする 5 つのアコニターゼ (Acn) 遺伝子のうち、トランスポゾンによる挿入変異は *acnA3*

のみに見られた。組換え AcnA3 タンパク質の酵素活性は YD35 株の他の Acn の組換え酵素のそれと比べて亜硝酸塩や NO に対して高い安定性を示した。また、亜硝酸塩存在下で培養した *acnA3* 変異株では、Acn の基質であるクエン酸が細胞内に多く蓄積し、細胞内 NADH と ATP の濃度が低下した。以上の結果から、亜硝酸塩存在下では、AcnA3 が活性を維持することによって TCA 回路を回転させることと、それによって呼吸系に NADH を供給し効率的に ATP を産生させることにより生育が可能となることが示された。また、上述の Pdh も細胞内の NADH の供給に重要な酵素であるとされていることから、Pdh は AcnA3 と協調して NADH の生産を強化することで呼吸系の働きを助けられていると考えられる。また、この過程で産生された NADH または NADPH は、ラジカル解毒系酵素の解毒にも利用されると予想され、本研究により、細菌の RNS 応答における NADH 代謝の重要性が明らかとなった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

これまで、細菌の酸化および RNS ストレスへの応答については、ラジカル解毒系タンパク質の活性と発現によるものがよく知られていたが、本研究では、それらの機能の発現に必須な NADH または NADPH の産生が酸化および RNS ストレスへの耐性化に必須であることを初めて見出した。本研究は、細菌のストレス応答に新たな知見を与えた点で重要であるとともに、将来、細菌の生育の制御技術を開発する上で重要な基礎的知見となる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。