

氏名(本籍)	たか さき かず と 高崎一人(神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3536号
学位授与年月日	平成16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	<i>Aspergillus nidulans</i> のアンモニア発酵に関する分子遺伝学的研究

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	小林達彦
副査	筑波大学助教授	農学博士	中村 顕
副査	筑波大学教授	農学博士	酒井 慎 吾

### 論文の内容の要旨

糸状菌は従来、絶対好気性生物であると考えられていたが、近年の *Fusarium oxysporum* に関する研究より、微好気及び嫌気的な環境でもそれぞれ脱窒、アンモニア発酵により生育できることが明らかになってきた。アンモニア発酵は、嫌気的な環境でエタノールの酢酸への酸化に伴い硝酸をアンモニアに還元し生育する異化的な硝酸代謝経路であり、絶対嫌気性細菌の *Clostridium* 属など一部の細菌が類似の反応を行うことが知られているのみであった。本研究は糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用いて、糸状菌のアンモニア発酵について遺伝学的解析を試みたものである。

まず、*A. nidulans* がアンモニア発酵という代謝系を有しているか否かを検討した。*A. nidulans* をエタノールと硝酸を含む培地で嫌気的に培養したところ、明瞭な生育が観察されたことから、*A. nidulans* もアンモニア発酵を行うことが示唆された。その際の酢酸の生成量とアンモニアの生成量の化学量論比は、*F. oxysporum* で観察されたものと同一であった。また各種変異株や酵素阻害剤を用いた解析の結果から、アンモニア発酵における硝酸のアンモニアへの変換には硝酸同化系の nitrate reductase (Nar), nitrite reductase (Nir) が、エタノールの酢酸への変換にはエタノール資化系の acetyl-CoA synthetase (ACS) や aldehyde dehydrogenase (ALDH) がそれぞれ関与していることが強く示唆された。特にアンモニア発酵の鍵反応である、acetyl-CoA を酢酸へ変換する際に ATP を生成する反応 (ACK) は、逆反応の ACS とともに FacA タンパク質により担われているが、FacA の活性の方向性が通気により制御されていることを明らかにした。

次に FacA の持つ酵素活性の通気による制御を解析するために、FacA の N 末端に His-tag を付加した構築 (His-facA) を作製し、*A. nidulans* の facA 変異株に導入した。導入した His-facA 遺伝子は野生型と同様の機能を有していた。さらに、構築した株を好気並びに嫌気の条件で培養し His-FacA をそれぞれ精製したところ、細胞レベルで観察されたのと同様に、好気条件から精製した酵素は ACS 活性が高く、逆に嫌気条件から精製した酵素は ACK 活性が高いことが見出された。酵素学的な解析の結果からは、この活性の方向性の制御は基質である酢酸及び acetyl-CoA に対する親和性が変化することによってなされていることが示唆された。培養条件によって可逆酵素の基質に対する親和性が制御され、酵素反応の方向性が調節されるのは、酵素反応の制御としては全く新しい例である。一方最近になって、*Salmonella enterica* でリジン残基

のアセチル化 / 脱アセチル化により ACS 活性が制御されていることが明らかとなった。そこで *A. nidulans* の対応する酵素 (FacA) でも同様の修飾を受けている可能性を考え、精製酵素に対して抗アセチル化リジン抗体を用いて解析した。その結果、嫌気条件で培養した菌体から取得した His - FacA がリジンのアセチル化を受けていることが明らかとなった。

通常の微生物や植物の硝酸同化系では、硝酸はアンモニアへ還元された後に、生体成分へと同化されるが、周囲にアンモニアやアミノ酸などのより利用しやすい窒素源が存在するときには、硝酸体窒素を同化せずにこれらの窒素化合物を同化する。この際、硝酸同化系酵素の発現は、転写レベルでアンモニアやアミノ酸によって抑制されることが知られている (アンモニウム抑制)。一方、今回の研究で *A. nidulans* を硝酸とアンモニアの共存下、アンモニア発酵の条件で培養したところ、明確な生育が認められた。このことから、アンモニア発酵条件では硝酸のアンモニアへの変換に必要な硝酸同化系の遺伝子発現が、アンモニウム抑制を受けていないことが示唆された。このことは酵素活性レベルでも確認した。現在までにアンモニウム抑制がこのような制御を受ける例は知られておらず、微生物の窒素代謝の調節機構や硝酸の同化系と異化系の関連を考察する上で重要である。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、カビ *F. oxysporum* で見出されていた糸状菌によるアンモニア発酵を、遺伝学的解析が可能な糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用いて解析したものである。*A. nidulans* においてもアンモニア発酵の系が存在することを明らかにし、その代謝経路を遺伝学的・酵素学的レベルから明らかにしたことの意義は極めて大きい。また、可逆的酵素の反応の方向性の制御についても、全く新しい制御機構の存在を明らかにしたことも高く評価できる。

以上のように、本研究は、糸状菌のアンモニア発酵・窒素代謝系に関して重要な知見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。