

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 尚完

---

従来、真核生物であるカビは好氣的生物であり、酸素のない嫌氣的な条件下では生育できないと考えられていた。しかるに近年「カビが脱窒する」ことが発見され、カビ脱窒系に関して当研究室を中心に、生化学的、分子生物学的解明が進められている。その結果、カビ脱窒系はミトコンドリアに局在し、細菌脱窒系と同様に嫌気呼吸として働いていることが明らかとなっている。脱窒とは硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) や亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) などを還元し、二原子窒素 ( $\text{N}_2$ ) や亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) のようなガス状の窒素化合物に変換する生物学的な反応であり、窒素固定や硝化と共に、地球上の窒素サイクルを維持する上で重要な位置を占めている。細菌の完全な脱窒系は  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{N}_2$  までの 4 段階の過程から成り (下式) 還元に必要な電子は呼吸鎖電子伝達系より供給される。カビ脱窒系は最後の過程を持たないようで、



最終産物は  $\text{N}_2\text{O}$  である。近年、カビの脱窒は国内外の土壌微生物学研究者も注目するところとなり、強力な温室効果ガスである  $\text{N}_2\text{O}$  発生源としての、自然界におけるカビ脱窒の寄与について関心が高まっている。カビ脱窒系に関するこれまでの成果の中で最も興味深いことは、ミトコンドリアにおける新たな嫌気呼吸系の存在を証明したことである。真核生物発生に関わる内部共生説はよく知られているが、ミトコンドリア脱窒 (嫌気呼吸) 系の発見はその説の有力な根拠の一つと成り得る。一方、カビ脱窒系構成成分のうち、これまでに遺伝子の単離されたものは一酸化窒素 (NO) 還元酵素である P450nor のみであるが、ミトコンドリアの起源と進化などの興味ある課題を解明する上で、より多くの関連遺伝子の単離が欠かせない。申請者は、カビの脱窒研究が一番進んでいる *Fusarium oxysporum* と *Cylindrocarpon tonkinense* を用いて、脱窒条件と非脱窒条件で培養したカビの cDNA を SSH (subtractive suppression hybridization) という方法で比較することによって、脱窒条件で特異的に発現する遺伝子をクローニングした。

いくつかの異なる条件における SSH により、脱窒条件で必ず発現するものとして、*F. oxysporum* からは、p450nor, 亜硝酸還元酵素 (Nir), フラボヘモグロビン (Fhb), アルコール脱水素酵素 (Adh), mitochondrial hypoxia responsible domain protein (Mhrdp) などのしかるべき、あるいはもっともらしいタンパク質遺伝子を確認した。また脱窒と類似の条件で発現するアンモニア醗酵に関与すると予想される遺伝子として、Adh および同化型硝酸還元酵素 (aNar) を確認した。一方、*C. tonkinense* からは p450nor1, Nir, Formate transport protein, Carboxylesterase などを単離した。これらより、p450nor1 と Nir のみが脱窒条件で 2 種のカビにおいて発現することが判明した。SSH によるこれらの解析から、脱窒系の重要な構成成分である Nir 遺伝子 (*NirK*) を単離することができた。*NirK* は細菌脱窒系に広く分布する銅含有型 Nir であり、カビの *NirK* はそのオルソログであることが判明した。

SSH 実験で確認した遺伝子の発現パターンをノーザン分析した結果、脱窒条件で強く発現することを確認した。興味深いことは、細菌から酵母、カビなど幅広い生物に存在している NO dioxygenase である Fhb の発現パターンが *F. oxysporum* と *C. tonkinense* で違うことである。*F. oxysporum* では *E. coli* に報告されている Fhb と同様に好気条件で発現した。脱窒条件でもさらに強く発現した。すなわち酸素と NO が誘導剤として作用したと考えられる。*C. tonkinense* の Fhb は好気条件では発現せず、脱窒条件でのみ発現した。すなわち酸素は発現に影響がなく、一酸化窒素のみ誘導剤として作用したと考えられる。

真核生物で初めて *nirK* 遺伝子のクローニングを行った結果、*F. oxysporum* と *C. tonkinense* はイントロンを一つ持ち、ミトコンドリアターゲティングシグナル配列、膜結合領域を持ち、活性中心が銅であるタイプの異化型 Nir ( NirK ) であることがわかった。大腸菌で活性型の酵素を得るため、ミトコンドリアターゲティングシグナル配列、膜結合領域を除き、His-tag を付加した sNirK ( *F. oxysporum* の sNirK:FS, *C. tonkinense* の sNirK:CS ) を大腸菌に生産させ、His-tag アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムにかけ、精製を行った。精製したサンプルを用いて Characterization を行った結果、この組換え体は Nir 活性を示し、 $K_m$  が FS:515  $\mu$ M、CS:429  $\mu$ M、 $V_{max}$  が FS:303 U/mg、CS:476 U/mg、至適 pH が 6.5、至適温度が FS:40、CS:35 のホモ 18 量体以上の構造を持つタンパク質であることがわかった。また、一部異なる点も見られたが、銅のキレーターで強く阻害されることもわかり、sNirK が既知の脱窒細菌の NirK と近い性質を持つことが示された。

以上本論文は、SSH という技術を駆使してカビの脱窒条件で特異的に発現する遺伝子の解析を行い、それら遺伝子をクローニングしただけでなく、真核生物で初めて、脱窒系の重要遺伝子 *nirK* を単離し、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。よって審査委員一同は本論文が博士 ( 農学 ) の学術論文として価値あるものと認めた。