

真核微生物の低酸素下での生存戦略とそのゲノム研究

●高谷 直樹

筑波大学大学院生命環境科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

多くの真核生物は、一部の例外を除いて、完全に嫌気的な条件下では生育できない好気性生物であると考えられている。しかし、真菌（カビ）や放線菌に属する微生物には、硝酸呼吸や発酵といった嫌気的なエネルギー代謝を行うことによって、生育するものが意外と多いことが見出されつつある。本研究では、2種のカビ *Fusarium oxysporum* と *Aspergillus nidulans* をモデル菌株とした分子遺伝学的解析を通して、この代謝系の分子機構を明らかにすることを目的とする。また、これらの代謝調節の鍵となる可能性が高いことが示唆されている蛋白質のアセチル化などの翻訳後修飾の網羅的な解析を試みる。最終的には、カビが、環境中の酸素分圧の低下に伴い、種類の蛋白質の発現を制御することによって様々な嫌気的なエネルギー代謝を使い分けることによって生き残るといった仮説を検証したい。

＜研究開始時の研究計画＞

カビの活性窒素ラジカル（RNS）耐性メカニズム：本研究では、これに関する現在の研究を継続して行う。即ち、*F. oxysporum* のNO解毒酵素と考えられるNorとNODの欠損が細胞に与える様々な傷害を解明する。具体的には、硝酸呼吸系の構成成分といくつかの酵素の活性を詳細に検討する。また、遺伝学的解析が容易なモデルカビ *A. nidulans* のNorとNODの相同遺伝子を単離し同様の解析を行う。得られた遺伝子の遺伝子破壊株を作製するなどして、そのRNS感受性を検討した結果を、既に解析している *F. oxysporum* との比較検討し考察する。

A. nidulans のアンモニア発酵の分子機構の解明：*F. oxysporum* で見出されているアンモニア発酵能を *A. nidulans* にも見出している。各種変異株の入手や遺伝子破壊の容易な本菌を用いてアンモニア発酵に関わる遺伝子を同定する。

網羅的解析：全ゲノム配列が公表されている *A. nidulans* をモデル菌株として用い、低酸素条件下での生育時に特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイやプロテオームの手法により同定する。カビのエネルギー代謝と蛋白質の翻訳後修飾の関係を考察する。

＜研究期間の成果＞

アンモニア発酵1：これまで *Fusarium* において示されていた本代謝系を遺伝学的解析のモデルとして優れている *A. nidulans* を遺伝子レベルで解明した（図参照）。本代謝系における硝酸塩のアンモニウムへの還元反応に必須な遺伝子は、硝酸塩の資化に関わる遺伝子と同一であることが判明した。また、この過程の鍵酵素ACS/ACKは、特定のアミノ酸残基の翻訳後修飾によって、反応の方向性が入れ替わることを初めて発見し、酵素学的に非常に興味深い。

異化的硫黄還元反応：研究の過程で、予想外に、カビが元素状硫黄を硫化水素に変換することを発見した。そこで、生化学的手法を用いて、本代謝系が細胞質型の

NADH-sulfur reductase (SR)とミトコンドリア型のSRからなることを明らかとした。

網羅的解析：麹菌ESTマイクロアレイ解析を行い、上記の2つの嫌気代謝系の発現によって遺伝子発現がドラスティックに変化することを見いだした。また、*A. nidulans* のプロテオーム解析に取り掛かった。詳細は、現在も引き続き解析中である。

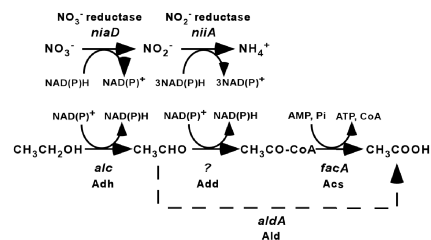


図 *A. nidulans* のアンモニア発酵の代謝マップ

＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究によって見いだされたカビの新たなエネルギー獲得機構はこれまで原核微生物のみに見出されてきたことから、本成果は真核生物のエネルギー獲得機構の多様性と進化を考察する上で重要な発見といえる。また、カビのゲノム・ポストゲノム研究は比較的最近始まったばかりであることから、本研究によって麹菌のマイクロアレイ解析を用いた網羅的解析ができたことは価値が高い。カビには、醸造・発酵産業や農作物や家畜、ヒトの病原菌が数多く知られていることから、本研究で得られた成果は、今後、これらに関連する応用研究の基盤技術の進展に貢献することを期待させる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

A. nidulans のNOD遺伝子をクローニングし、この遺伝子の遺伝子破壊株のRNS感受性を検討したが、*F. oxysporum* の場合と異なり、野生株と比較して明確なRNS感受性の差は見られないという予想外の結果が得られた。これは、同じカビに属する生物でもRNSに対する応答が異なる可能性を示唆する。

＜今後の課題＞

現在進行中の研究課題をさらに継続し完成させるのが重要である。また、アセチル化されたACS/ACKとされていないACS/ACKをそれぞれ大量精製する系を確立し、両酵素の酵素反応速度論的な解析を行う。Sir2様蛋白質などのアセチル化・脱アセチル化に関与すると期待される遺伝子を同定することも興味深い。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. 0601281300

Takasaki, K., Shoun, H., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N.: Unusual transcription regulation of the *niaD* gene under anaerobic conditions supporting fungal ammonia fermentation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 978-980 (2004)