

# かびの新規な異化的硝酸代謝機構の解明と応用

高谷 直樹

(筑波大学応用生物化学系)

## 1. 緒言

かびは発酵・醸造産業を始めとする多くの産業上で重要な微生物である。ところが、近年、多くのかびが低酸素条件に適応して新たな異化的な硝酸代謝系を誘導することが発見された。即ち、かびによる硝酸呼吸(脱窒)とアンモニア発酵の発見である。かびは長い間、好気的な生物と考えられていたが、これらの発見により、かびが通性嫌気的な生育をすることが示され、従来の常識は覆された。本研究では、このかびの新たな代謝系の構成成分を解明することを試みる。本研究によって得られるかびの新たな基礎(1次)代謝に関わる知見は、発酵・醸造産業における培養の基礎的知見や、医真菌の生育制御など、かびの微生物学の分野に広く応用されると期待される。

これまでの研究から、既に、かびが硝酸呼吸を行うことによりエネルギー生産し、亜酸化窒素( $N_2O$ )ガスを生成することを示されている。また、この過程に関与する2種の酵素(シトクロム P450nor と一酸化窒素( $NO$ )ジオキシゲナーゼ)が精製され、その遺伝子が単離された。現在までに、それらの酵素の硝酸および低酸素条件での発現誘導機構を転写レベルで解明している。一方、かびのアンモニア発酵は、硝酸のアンモニアへの還元を伴うエネルギー生産系であり、ごく最近発見された。この反応は、硝酸呼吸よりも低通気(嫌気)で誘導されることが示されているが、その反応構成成分は未知である。そこで、本研究ではこれまでに得られた2つ硝酸代謝系の全貌を明らかにし、かびの培養に関する基礎的知見を得るために、これらの代謝系構成成分を分子レベルで考察することを試みた。

## 2. 研究成果

### 2 - 1 かび *Fusarium oxysporum* による $NO$ 代謝の生理的意義の解明

通常脱窒細菌の  $NO$  還元酵素(Nor)とは異なり、かびの Nor は可溶性のシトクロム P450nor である点が特徴的である。また、かびの P450nor は NADH を直接の電子供与体として利用することから、電子伝達系による ATP 生産に直接的には関与していないと考えられることから、P450nor の生理的な役割とその  $NO$  還元機構については非常に興味深い。本研究では、第一に、P450nor の酵素学的解析を行い、その結果、P450nor と基質(NADH アナログ)との複合体を観察することに初めて成功した。さらに、P450nor と NAD(P)H の結合および NADH と NADPH の識別にかかわるアミノ酸残基をそれぞれ特定し、全く新規な NAD(P)H 結合・識別様式を見出した。第二に、かびの  $NO$  還元反応の生理的意義を考察した。*F. oxysporum* が脱窒に際して、P450nor

とともに flavohemoglobin (fhh)を誘導合成することを発見した。fhh および P450nor 遺伝子の変異株の作製とそれらの詳細な解析により、fhh と P450nor は脱窒に伴って生じる細胞傷害性ラジカルである NO を協調して解毒することを明らかとした。fhh は広範囲の微生物に分布するのに対して、P450nor はかびのみに見出される。かびは進化の過程で P450nor を獲得することによって、脱窒条件に適応したと推定される。通常の好気性生物は酸素呼吸の副産物として生じる活性酸素種の消去系を持つが、かびの脱窒においても副産物として生じる活性ラジカル種を消去する系を持つという共通性は、呼吸系の進化を考える上でも興味深い。

## 2 - 2 *Aspergillus nidulans* のアンモニア発酵系構成遺伝子の同定

かびのアンモニア発酵系は、*F. oxysporum* で初めて発見され、本菌を用いた生化学的解析が進んでいるが、その反応にかかわる遺伝子についての知見はほとんどない。そこで、本研究では、麹菌と類縁であり、遺伝子レベルでの解析が進んだモデル生物である *A. nidulans* に注目し、このアンモニア発酵に関与する遺伝子を同定した。申請者は既に、*A. nidulans* が完全なアンモニア発酵能を持つことを確認していたので、次に、*A. nidulans* の各種遺伝子の変異株のアンモニア発酵能を検討し、この代謝に関わる酵素遺伝子の特定を試みた。その結果、アンモニア発酵には硝酸の同化に関わる硝酸還元酵素遺伝子 (*niaD*) と亜硝酸還元酵素遺伝子 (*niiA*) および、エタノールの同化に関わるアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*aldA*)とアセチル CoA 合成酵素遺伝子 (*facA*) とが重要であることを示した。FacA 遺伝子産物(FacA)が acetyl-CoA の生合成といった広く知られている生理機能に関与するだけでなく、この逆反応(acetate kinase 反応)による嫌氣的 ATP 生成に必須であったことは興味深い結果であった。さらに、予想外に、好気条件下の細胞が発現する FacA は acetate に、嫌気条件でのそれは acetyl-CoA に高い親和性を示すことが精製 FacA を用いた実験により示された。また、FacA の酵素反応の方向性が培養の際の通気条件によって酵素レベルで制御されていることが明らかとなった。本酵素は、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例として重要である。

## 3 . まとめと展望

以上、これまでの研究により、かびは、外界の酸素濃度に応じて、従来知られていなかった複雑な硝酸代謝系を利用し生きのびることがわかってきた。即ち、低通気条件下では、硝酸はアンモニアや $N_2O$ に異化的に還元され、好気条件下では良好な窒素源として同化される。従来、好氣的生物と考えられていたかびが、このような多様な嫌気代謝を行うことが示されたことは非常に興味深い。今後は、得られた成果をもとにして、かびの新たな硝酸代謝のメカニズムがより深く理解されるであろう。かびは産業上重要であるにも関わらず、その1次代謝系についてはまだまだ未知な部分が多いといえる。本研究で得られる成果は、今後のかびの培養に関する基礎的データとして広く発酵化学産業に貢献するものと思われる。