

カビによる新規な異化代謝の機能解明とその利用の可能性

Fungal Dissimilatory Mechanisms and Their Application

安部 剛史, 高谷 直樹

TSUYOSHI ABE and NAOKI TAKAYA*

筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-7191 茨城県つくば市天王台1-1-1

* TEL: 029-853-7191 FAX: 029-853-7191

* E-mail: ntakaya@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,

Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: 糸状菌, 脱窒, 硝酸呼吸, アンモニア発酵, 硫黄還元

Key words: Filamentous fungi, denitrification, nitrate respiration, ammonia fermentation, sulfur reduction

(原稿受付 2006年10月20日/原稿受理 2006年11月21日)

1. はじめに

自然環境中では、生物は常に酸素が存在する環境で生活するとは限らない。たとえば、海水や淡水中の堆積物の中や、生物の消化管や循環器内、呼吸器官を持たないワームなどの宿主の中といった比較的嫌気的な環境に生息する微生物が知られている³⁾。また、通常は酸素がある環境でも、酸素濃度の低下によって好気的なエネルギーの生成に十分な量の酸素が得られない場合もある。細菌は、このような環境下で多様な発酵経路や呼吸機構を発現させることによって、エネルギーを獲得するメカニズムをもつ。このメカニズムは多様であり、環境中に存在するおよそ全ての有機物と無機塩は細菌により変換される。このことは、細菌が環境中の物質循環に重要であることを意味する。一方、一般的な多くの真核生物は好気的な生物であり、その生育に酸素を要求すると考えられている。真核生物の生育に必要なエネルギーの多くはミトコンドリアで合成される。通常、ミトコンドリアでは酸素を利用した酸素呼吸によりエネルギーを獲得している。すなわち、細胞内での有機物の酸化により生じた NADH の還元当量がリンゴ酸やアスパラギン酸などの形でミトコンドリアへ運ばれる。これらは最終的にミトコンドリア内膜に局在化する呼吸鎖電子伝達系により酸化され、さらには酸素の還元反応に利用される。このとき生じるミトコンドリア内外での電気化学のポテンシャル差を駆動力とした酸化的リン酸化によりエネルギー (ATP) が生まれる。したがって、真核生物の生存にとって酸素は重要であり、酸素が欠乏すると細胞死が引き起こされることもある。

一方、生育のために十分なエネルギーを酸素を利用せずに獲得する真核生物の例も示されている。例えば、酵母などは、解糖により生じるホスホエノールピルビン酸などの高エネルギーリン酸化合物の加水分解と共役して ATP を合成する。この際に生じる還元当量 (NADH) はピルビン酸をエタノールや乳酸へと変換することによって消費される (基質レベルのリン酸化, 図1)。真核生物が基質レベルのリン酸化によりエネルギーを獲得するメカニズムのもうひとつの例として、ヒドロゲノソームによるものがあげられる。絶対嫌気的な環境で生育する ciliate などの原生生物⁴⁾ や chytridiomycete²⁷⁾ は、水素を生成するヒドロゲノソームとよばれるオルガネラをもち、このオルガネラ内でスクシニル CoA の加水分解と共役して ATP を生産する (図1)。ヒドロゲノソームについては、その代謝能や微細構造の類似性から、ミトコンドリアとの進化的な関連性が議論されている^{5,13)}。

これらの真核生物の嫌気的なエネルギー獲得機構は、本質的に基質レベルのリン酸化によるものであるのに対して、酸化的リン酸化によるものも知られている。1991年に、祥雲らの研究グループによって報告されたカビの脱窒はこの代表的な例のひとつである¹⁵⁾。一連の研究によれば、不完全菌に属するカビ *Fusarium oxysporum* は、低酸素条件下で硝酸塩 (NO₃⁻) を亜硝酸塩 (NO₂⁻)、一酸化窒素 (NO) へと順次還元し亜酸化窒素 (N₂O) を生成する。NO₃⁻ および NO₂⁻ の還元過程はミトコンドリアに局在化しており、それらの反応はミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系と共役して ATP を合成する。この発見は、真核生物も酸素以外の最終電子受容体を利用して電子伝達鎖を介したプロトンポンプにより ATP を獲得するこ

略語一覧 ACK: acetate kinase, ACS: acetyl-CoA synthetase, ADD: acetaldehyde dehydrogenase, ADH: alcohol dehydrogenase, C I: respiratory complex I, CSR: cytoplasmic sulfur reductase, FDH: formate dehydrogenase, fhb: fravo-hemoglobin, mSR: mitochondrial sulfur reductase, Nar: nitrate reductase, Nir: nitrite reductase, Nor: nitric oxide reductase, PFL: pyruvate formate lyase, SR: sulfur reductase

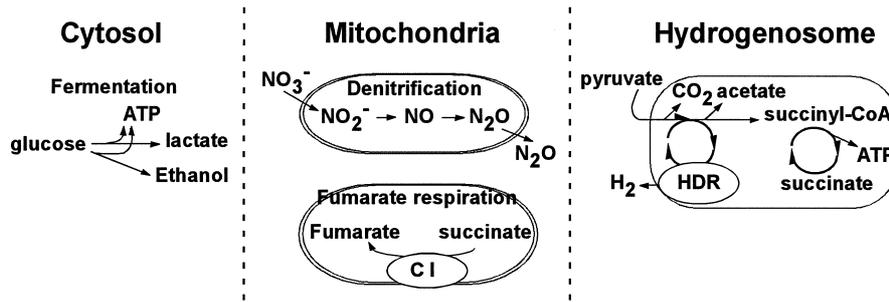


図1. 真核生物による嫌気条件下でのエネルギー獲得機構

真核生物には、嫌気条件下で細胞質やヒドロゲノソームなどでの基質レベルのリン酸化や、酸素以外の無機塩を利用した呼吸により生育するものが存在する。C I: respiratory complex I, HDR: hydrogenase

と(硝酸呼吸)が可能であることを示す点で重要である⁹⁾。なお、 N_2O は常温常圧ではガス状であり気相へと放出されることから、この過程は脱窒と呼ばれる(図1)^{2,15)}。真核生物による嫌気的な呼吸の例としては、他に、回虫が行うフマル酸呼吸が知られている(図1)²³⁾。一方、我々は、最近、*F. oxysporum* が嫌気条件下で単体硫黄(S^0)を還元し硫化水素(H_2S)を生成することを見出した。また、この反応が*F. oxysporum*の嫌気的な生育に寄与していることを見出した。これは、カビがこれまで考えられていた以上に多様な嫌気的なエネルギー獲得機構を持ち、環境中の酸素濃度などに適応していることを示唆するものである。本論文では、カビが行うこれらの新たな嫌気的なエネルギー代謝機構についてのこれまでの知見を概説するとともに、これらを利用した応用技術開発のための基盤研究と実用化の可能性について考察したい。

2. カビの硝酸呼吸

カビ *F. oxysporum* が行う硝酸呼吸系は脱窒細菌のそれ²⁹⁾と類似しており、 NO_3^- を順次還元し N_2O を生成する(図2)。これらの反応を触媒する酵素のうち、硝酸還元酵素(Nar)と亜硝酸還元酵素(Nir)の活性は、ミトコンドリアに局在化しており、膜内の複合体IおよびIIIに特異的な呼吸阻害剤に感受性である。これは、これらの反応が呼吸鎖電子伝達系を介する(すなわち、硝酸呼吸としての意義を持つ)ことを意味する⁹⁾。また、*F. oxysporum*の硝酸呼吸系は、これまで知られている脱窒細菌の行う脱窒系とは異なり、電子供与体としてギ酸を利用できる点が特徴的である^{2,24)}。ギ酸は、ユビキノ-ギ酸脱水素酵素により酸化され、ミトコンドリアの内膜のユビキノンを還元する。還元型のユビキノンはNarによる NO_3^- 還元反応に利用される。NarとNirの働きによって生じるNOはNO還元酵素(Nor)により N_2O に還元される(後述)。

Cylindrocarpum tonkinense は *F. oxysporum* と近縁なカビであり、*F. oxysporum* と同様の機構で NO_2^- を N_2O へ還元するが、 NO_3^- の還元反応のタイプは異なることが報告されている。当初、*C. tonkinense*は NO_3^- を基質とした脱窒を行わないと考えられてきた。しかし、培養方法を変えることによって、脱窒産物である N_2O を生成することが見出された²⁶⁾。 NO_3^- の還元反応の詳細についての生化学的な解析により、*C. tonkinense*は細胞質に局在化するNADH依存性のNar(NADH-Nar)

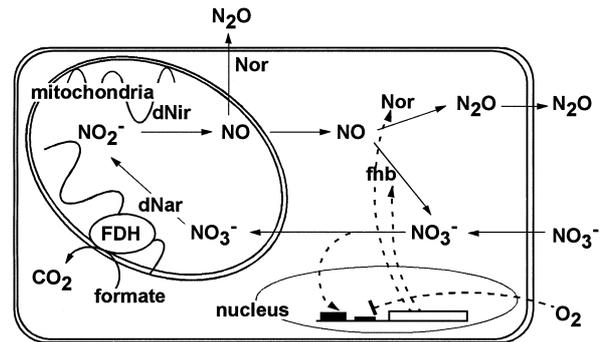


図2. *F. oxysporum*の硝酸呼吸のメカニズム

細胞内に取り込まれた NO_3^- は、多段階の反応により N_2O にまで還元される(実線部)。一酸化窒素還元酵素(Nor)とフラボヘモグロビン(fhb)の遺伝子の発現は酸素により負に、 NO_3^- により正に制御される(点線部)。Nar: nitrate reductase, Nir: nitrite reductase, Nor: nitric oxide reductase, FDH: formate dehydrogenase, fhb: flavo-hemoglobin.

により NO_3^- を還元することが示唆された。NADH-Narは、おそらく嫌気条件下で細胞内に余剰となるNADHの再酸化と還元当量の消費に寄与しているものと予想される。一方、本酵素は、細胞質に局在化するNADH-Narという点で、 NO_3^- を窒素源として利用(同化)するのに必要な同化型Narと似通っている。後述のアンモニア発酵の場合と同様に、*C. tonkinense*は、同化と異化における NO_3^- の還元系を共有している可能性が考えられている。

*F. oxysporum*のNorには2種のアイソザイムの存在が知られている。NorのN末端アミノ酸配列と β -galactosidaseの融合タンパク質をコードする $nor::lacZ$ 遺伝子をカビに導入して解析した結果、これらが同一の遺伝子から転写され、翻訳開始点の違いによりミトコンドリアあるいは細胞質にそれぞれ局在化することが明らかとされた²²⁾。Nor遺伝子の発現は、 NO_3^- により誘導され酸素により抑制される。我々は、これらの発現調節に関わるNor遺伝子プロモーター上のシス領域をレポーター解析により同定したところ、Nor遺伝子の転写は、カビでよく知られる NO_3^- による転写の正の制御因子NirAおよび*Saccharomyces cerevisiae*でよく知られる酸素による負の制御因子Rox1の結合コンセンサス配列を通して転写レベルで制御されていることを明らかとした(図2)²⁰⁾。*F. oxysporum*は、転写翻訳の制御を巧みに利用して硝酸呼吸しているといえる。

3. カビの NO 解毒機構

通常の脱窒細菌の Nor とは異なり、カビの Nor は可溶性のシトクロム P450 (P450nor) であり、NADH により直接還元される。したがって、呼吸鎖電子伝達系とは明らかに共役しておらず、硝酸呼吸に伴う ATP の生成に直接的に寄与しているとは考えにくい。また、P450nor 遺伝子の遺伝子破壊株は N_2O を生成せずに NO を蓄積することから、P450nor が脱窒に必須であることが示されたものの²²⁾、遺伝子破壊株はそれ以外には目立った表現型を示さなかったことから、P450nor の生理的な役割については非常に興味深かった。我々は、*F. oxysporum* が硝酸呼吸に際して P450nor とともに未知のヘムタンパク質を大量に誘導合成することを見出し、これを単離したところ、微生物界に広く分布する flavohemoglobin (fhb) であることが判明した²¹⁾。fhb および P450nor 遺伝子の変異株を作製・解析したところ、両者を欠損した変異株は硝酸呼吸条件下で NO を蓄積し、ミトコンドリアの形態異常、呼吸活性の低下、NO による鉄硫黄クラスターの破壊が起きていた。NO は広範囲の生物でさまざまな生理作用を示す調節因子として注目されているが、同時に活性酸素ラジカル的一种であり細胞にとっては非常に危険な分子である。これらのことから、fhb と P450nor の役割の一つは硝酸呼吸に伴って生じる NO の解毒であると考えている。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除去系を持つが⁹⁾、カビの硝酸呼吸（脱窒）においても副産物として生じる活性ラジカル種 (NO) を除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興味深い。近年、fhb が NO ジオキシゲナーゼ活性を示し、外因性の NO の解毒に寄与することが報告されたことは、fhb が呼吸に伴い生じる内因性の NO に対して機能するという仮説と矛盾しない。一方、微生物のゲノム解析の結果を参照すると、P450nor はカビにのみ見出され、細菌や酵母には見出されない。おそらく、カビは進化の過程で P450nor を獲得することによって硝酸呼吸条件に適応したと予想している。

4. アンモニア発酵

カビは低酸素条件下（完全な嫌気条件下ではない）で硝酸呼吸系を発現するが、もっと極端な嫌気条件下に曝されたときには硝酸呼吸せず、 NO_3^- をアンモニアに変換して生育することが明らかとなった。また、この反応は細胞質での NADH の酸化と ATP の生成とを伴うことから、アンモニア発酵としての生理的意義を持つことが明らかとなった（図 3）²⁰⁾。我々は、*Aspergillus nidulans* をモデルとして各種変異株を解析し、アンモニア発酵に必須な遺伝子の多くを同定した。その結果、アンモニア発酵における NO_3^- のアンモニアへの還元反応は、 NO_3^- の同化に必須である硝酸還元酵素 (NiaD) と亜硝酸還元酵素 (NiaA) の働きによって触媒されることが明らかとなった。これは、上述した *C. tonkinense* の硝酸呼吸と同様に、カビが NO_3^- の同化と異化のメカニズムを共有することを意味する。それまで、アンモニア発酵と類似の代謝は、絶対嫌気性細菌の *Clostridium* によ

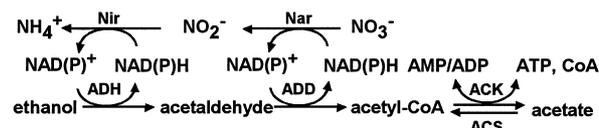


図 3. *A. nidulans* によるアンモニア発酵のメカニズム

カビは NO_3^- を利用して嫌氣的にアンモニア発酵を行い生育する。細胞内のピルビン酸は PFL によりギ酸へと変換されギ酸は脱窒系の電子供与体として働く。Nir: nitrite reductase, Nar nitrate reductase, Nor nitric oxide reductase, ADH: alcohol dehydrogenase, ALDH: acetaldehyde dehydrogenase, ADD: acetaldehyde dehydrogenase (acylating), ACS: acetyl-CoA synthetase, ACK: acetate kinase.

る硝酸発酵が知られているのみであり⁷⁾、本発見は真核生物の新たな嫌気代謝の例として重要である。

この代謝系の鍵酵素の一つは基質レベルのリン酸化により ATP を合成する acetate kinase (ACK) である。我々は、*A. nidulans* がアンモニア発酵に際して、生物界に広く分布する acetyl CoA synthetase (ACS) の逆反応によってこの反応を触媒することを示した¹⁸⁾。さらに、ACK と ACS の反応の方向性は ACS/ACK のリシン残基のアセチル化によって酵素レベルで制御されていること、即ち、嫌氣的なアンモニア発酵条件下では ACS はアセチル化され、通常とは反対方向の ACK 活性を触媒する酵素活性を示すことを見出した（図 3）¹⁸⁾。環境中の酸素濃度に応答して翻訳後修飾が調節され可逆酵素の反応の方向性を制御される例は、筆者の知る限り例がなく、興味深い現象であると考えている。

また、カビの硝酸同化系遺伝子の発現はアンモニアなどの利用されやすい窒素源によって転写レベルで抑制される（アンモニウム抑制）。これに対してアンモニア発酵はアンモニアによって抑制されない。我々は、*A. nidulans* の NiaD をコードする遺伝子 (*niaD*) プロモーターのレポーター解析から、嫌気条件下では *niaD* の発現がアンモニウム抑制を受けないことを見出した¹⁷⁾。この機構は、自らが生成するアンモニアによってアンモニア発酵系の酵素の発現が抑制されないために重要な機構であると考えられる。

5. ギ酸の利用

F. oxysporum の硝酸呼吸系は、Nor が P450nor であることとともに、電子供与体としてギ酸を利用できる点が特徴的である。ギ酸の酸化を触媒するギ酸脱水素酵素 (FDH) は、脱窒細菌の NO_3^- 還元系には見られず *Escherichia coli* などの腸内細菌などによく見出される。また、これらの細菌では、ギ酸は、ピルビン酸-ギ酸リアーゼ (PFL) の作用によりピルビン酸から生成される²⁾。硝酸呼吸条件下で培養した *F. oxysporum* のミトコンドリア画分には明瞭な FDH 活性が見出される。また、*F. oxysporum* を嫌氣的環境下でピルビン酸とともに保温するとギ酸が生成することが示されている。これは、*F. oxysporum* が PFL の働きによってピルビン酸をギ酸へと代謝できることを示唆する¹⁰⁾。この点で、カビと腸内細菌のギ酸の利用メカニズムは類似していると考えられる。

された。また、この ATP 生成はロテノンで阻害されたことから、 S^0 の還元反応と共役した酸化リン酸化が起きている可能性が示唆された。1 mol の S^0 の還元にともない合成される ATP は 0.95 mol であった (P/S^0 比 = 0.95)。これは、*F. oxysporum* が行う硝酸呼吸に伴って生成する ATP 量 ($ATP/NO_3^- = 0.88$)⁹⁾ と類似しており、 S^0 を還元するエネルギー獲得メカニズムにより *F. oxysporum* が嫌氣的に十分生育し得ることを意味すると思われる (図 4)。SR 活性を発現している *F. oxysporum* を透過型電子顕微鏡で観察したところ、硝酸呼吸やアンモニア発酵により生育している *F. oxysporum* のミトコンドリアと異なり²⁸⁾、ミトコンドリアの電子密度が高い状態で保たれていた。また、細胞内に占めるミトコンドリアの割合は、 S^0 を添加せず嫌氣的に培養した *F. oxysporum* の細胞と比べ有意に高かった。これは、低酸素条件にさらされた酵母では、萎縮したミトコンドリアが観察されるのとは対照的であり、カビがミトコンドリア内で S^0 を代謝していることを支持する (図 4)。

細胞内共生説¹²⁾によれば、真核生物の祖先は、真正細菌 (おそらく α プロテオバクテリア) を共生させることによってミトコンドリアを得たとされる。また、祥雲らは、*F. oxysporum* が硝酸呼吸能を有することなどから、ミトコンドリアの祖先が硝酸呼吸能を有する α プロテオバクテリアであり、カビのミトコンドリアの硝酸呼吸系が共生以前から現在まで引き継がれてきた可能性を提唱している³⁰⁾。では、*F. oxysporum* のミトコンドリアに見られる異化的硫黄還元系も過去に共生した細菌の遺物である可能性は考えられるだろうか。これに対する答えは、現在のところ得られていないが、 S^0 を還元する微生物のほとんどは γ プロテオバクテリアか古細菌であり、 α プロテオバクテリアは知られていないことから、*F. oxysporum* は、細胞内共生よりもっと遅いタイミングで、おそらく真核生物が生まれた後に、SR を γ プロテオバクテリアからの水平伝播により獲得した可能性が考えられる。

一方、近年、ミトコンドリアを持たない真核生物やヒドロゲノソームをもつ真核生物の代謝系の比較などから¹³⁾、始原ミトコンドリアの共生は α プロテオバクテリアによる 1 回のイベントではなく複数の細菌によるものであり、その結果、現在のミトコンドリアが誕生したとする考えも提唱されている^{5,25)}。この仮説に従えば、これらの細菌の中に S^0 を還元する能力を持ったものが含まれており、*F. oxysporum* は、現在までその代謝系を維持してきた可能性も考えられるのではないだろうか。いずれにしても、これまで細菌や古細菌でのみ知られている代謝が真核生物に存在することは、生物のエネルギー代謝系の進化となりたちを考える上で興味深い。今後、SR を単離し、その 1 次構造を細菌の SR と比較することによって、これに対する重要な答えが得られると期待される。

7. カビの異化代謝を利用した 新たな応用技術開発の試み

7.1. カビの *fhb* を利用した N_2O ガスの排出削減

N_2O ガスは二酸化炭素の数百倍という強い温室効果

を示すことから、 N_2O の排出削減は地球温暖化の防止のために重要であるといわれる。元来、 N_2O ガスは主に微生物の働きによって代謝され、土壌や水圏中での濃度の恒常性が保たれているが、窒素肥料の過剰な施肥、化学工業、排気ガスなどの人為的に発生する N_2O ガスのために、大気中の N_2O 濃度は年々増加し続けているといわれる。現在、多くの排水処理施設では活性汚泥を用いて NO_3^- やアンモニアなどの窒素化合物を除去しているが、このプロセスは通気に敏感であり、特に、脱窒プロセスが嫌気条件下に保たれないと N_2O が発生する。これは、活性汚泥中に生息する脱窒細菌の N_2O 還元酵素の活性が酸素に感受性であることや、その遺伝子発現が酸素によって抑制されるため、 N_2O の窒素ガスへの還元反応が阻害されることによる。したがって、脱窒細菌の N_2O の還元過程の改良は、排水処理施設からの N_2O の排出削減のために重要である。我々は、脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* に *F. oxysporum* の *fhb* の cDNA を導入し発現させたところ、野生株と比べて好気条件下での N_2O の生成が抑制され、 N_2 を顕著に生成することを見出した¹⁹⁾。現在のところ、 N_2O の生成が抑制される詳細な機構は明らかではないが、カビ由来のたった一つの遺伝子の導入により好気条件下で生じる N_2O の生成抑制できたことは、今後の、 N_2O 除去技術の開発にとって大きな意味をもつのではないだろうか。

7.2. 糸状菌の硫黄還元活性を利用した重金属の回収

現在、鉱物資源の可採年数は長いもので 200 年程度、特に銅、亜鉛、スズなどの重金属については 40 年以内に底をつくると予想されている。また、わが国の重金属資源の自給率はきわめて低く、その多くを輸入に頼っている。一方、工業的に利用された多くの重金属は適切な処理を行わないと工業排水として深刻な環境汚染を引き起こす。このような背景から、重金属資源の効率的な回収・リサイクル技術は持続的な社会の構築のための最重要課題の一つである。重金属排水は、めっき、半導体製造、電池製造などの工程で排出されるが、これらの多くは、アルカリ処理により水酸化物の沈殿として回収されている (水酸化物法) (図 5)。この方法は、反応の制御が容易である反面、得られる金属含有スラッジの含水率が高く、リサイクルに適していない。これに対して、金属を硫化物の沈殿として回収する方法 (硫化物法) を用いて得られる金属スラッジは水分が少なく鉱石と似た成分であることから、精錬可能な有価金属として有償で引き取られる。硫化物法は、金属の沈殿剤として有毒な硫化水素を利用するという欠点を持つという問題を持っていたが、最近、余剰の H_2S の発生を制御する技術が実用化され、従来法の代替技術として利用が期待される (図 5)。一方、本稿で述べたように、*F. oxysporum* は S^0 を還元して H_2S を生成する活性を示すことから、沈殿剤として菌体と S^0 を添加することにより硫化金属の沈殿を回収できると期待された。そこで、これを検討した。

F. oxysporum を S^0 を添加した培地中で 12 時間培養し S^0 還元活性を誘導させた。得られた *F. oxysporum* の菌体を回収し、エタノールを電子供与体として S^0 とニッケルイオン (Ni^{2+}) とともに保温したところ、速やかに硫化ニッケル (NiS) の沈殿が生成した ($16.2 \text{ ppm h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 、

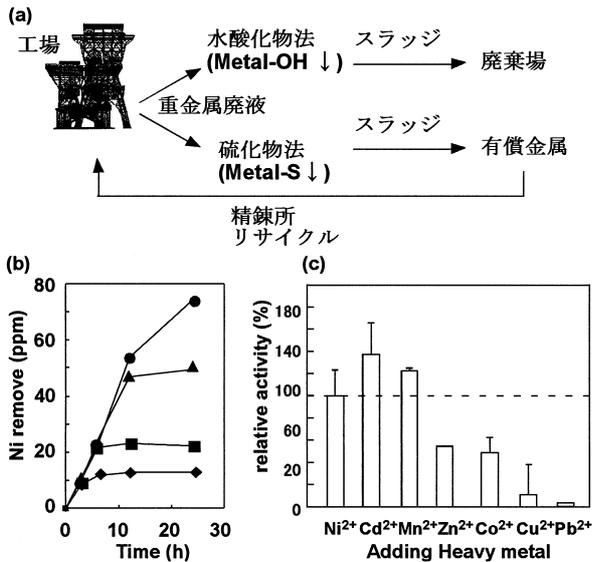


図5. *F. oxysporum* の硫黄還元反応を利用した重金属の回収
(a) 硫化物法と水酸化物法による重金属の回収の特徴。(b) 重金属回収に対する添加した重金属量の影響。*F. oxysporum* と S⁰ が存在する培地中に様々な濃度の Ni²⁺ を添加した。(●) 100 ppm, (▲) 50 ppm, (■) 25 ppm, (◆) 12.5 ppm。(c) 重金属の種類別の重金属の回収率へ及ぼす影響。

図5)。この間、系内に H₂S は蓄積せず、反応系中の全てのニッケルが沈殿した後に、H₂S が生成したことから、さらに高負荷の重金属を処理できると期待される。

F. oxysporum を用いたニッケルの回収効率を通気条件を変えて比較したところ、フラスコを振とうした場合には嫌気条件下で高い重金属の回収率が得られたものの、好気条件下では効率が低下した。一方、フラスコを静置した場合、好気条件を含まない通気条件下でも嫌気条件下と同程度の効率で NiS の沈殿が得られた。これは、フラスコ上層部の菌体が H₂S の生成を阻害する酸素を消費し、大部分の菌体が嫌気条件に保たれるためだと予想され、このシステムの利用に際して特に嫌気装置を用いる必要がないことが明らかとなった。また、処理の際に添加する電子供与体を検討した。その結果、エタノールだけでなくメタノールやギ酸を添加したときにも NiS を沈殿させることが可能であった。さらに、メタノールを用いた場合には、エタノールを用いた時よりも高い効率で NiS が回収できた。これは、本法を利用するにあたって比較的安価な C1 化合物を電子供与体として利用できる点で有利である。ニッケル以外の重金属を用いて硫化重金属の生成反応を検討したところ、沈殿の形成速度に差があるものの、Co²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺ の回収も可能であることが明らかとなった(図5)。*F. oxysporum* は脱窒性のカビとしても知られており、応用の際めっき排水などに含まれる硝酸体窒素の同時除去の可能性も期待される。今後、システムのスケールアップ、反応の持続(連続)性についての問題をクリアすることで、カビを用いた重金属回収システムを構築できるかもしれない。

文 献

- 1) Aguirre, J., M. Rios-momberg, D. Hewitt, and Q. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13: 111–118.
- 2) Breks, B.C., S.J. Ferguson, J.W.B. Moir, and D.J. Richardson. 1995. Enzymes and associated electron transport system that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxide and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* 1232: 97–173.
- 3) Dubilier, N., C. Mulders, T. Ferdelman, D. de Beer, A. Pernthaler, M. Klein, M. Wagner, C. Erseus, F. Thiermann, J. Krieger, O. Giere, and R. Amann. 2001. Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 410: 298–302.
- 4) Embley, T.M., B.J. Finlay, P.L. Dyal, R.P. Hirt, M. Wilkinson, and A.G. Williams. 1995. Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262: 87–93.
- 5) Embley T.M., and W. Martin. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623–630.
- 6) Faou, A.L., B.S. Rajagopal, L. Daniels, and G. Fauque, 1990. Thiosulfate, polysulfates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 351–382.
- 7) Fujinaga, K., Y. Taniguchi, Y. Sun, S. Katayama, J. Minami, O. Matsushita, and A. Okabe. 1999. Analysis of gene involved in nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. *Microbiology* 145: 3377–3387.
- 8) Hinsley, A.P., and B.C. Berks. 2002. Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enterica*. *Microbiology* 148: 3631–3638.
- 9) Kobayashi, M., Y. Matsuo, A. Takimoto, S. Suzuki, F. Maruo, and H. Shoun. 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271: 16263–16267.
- 10) Kuwasaki, S., N. Takaya, A. Nakamura, and H. Shoun. 2003. Formate-forming fungal catabolic pathway to supply electron to nitrate respiration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 937–939.
- 11) Ma, K., R. Weiss, and W.W. Adams. 2000. A characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *J. Bacteriol.* 182: 1864–1871.
- 12) Margulis, L. 1993. Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the archaean and proterozoic eons. 2nd. Ed., Freeman, New York.
- 13) Martin, W. 2005. The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends Microbiol.* 13: 457–459.
- 14) Marzluf, G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Ann. Rev. Microbiol.* 51: 73–96.
- 15) Shoun, H., and T. Tanimoto. 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* 266: 11078–11082.
- 16) Schauder, R., and A. Kroger. 1993. Bacterial sulphur respiration. *Arch. Microbiol.* 159: 491–497.
- 17) Takasaki, K., H. Shoun, A. Nakamura, T. Hoshino, and N. Takaya. 2004. Unusual transcription regulation of the *niaD* gene under anaerobic conditions supporting fungal ammonia fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 978–980.
- 18) Takasaki, K., H. Shoun, M. Yamaguchi, K. Takeo, A. Nakamura, T. Hoshino, and N. Takaya. 2004. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couple the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. *J. Biol. Chem.* 279: 12414–12420.
- 19) Takaya, N., and H. Shoun. 2002. Genetic engineering using fungal flavohemoglobin for constructing *Pseudomonas stutzeri* strain emitting less nitrous oxide. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 282–

- 284.
- 20) Takaya, N., H. Uchimura, Y. Lai, and H. Shoun. 2002. Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (CYP55) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1039–1045.
 - 21) Takaya, N., S. Suzuki, M. Matsuo, and H. Shoun. 1997. Purification and characterization of a flavohemoglobin from the denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.* 414: 545–548.
 - 22) Takaya, N., and H. Shoun. 2000. Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Mol. Gen. Genet.* 263: 342–348.
 - 23) Tsang, W.Y., and B.D. Lemire. 2003. The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Acta* 1638: 91–105.
 - 24) Uchimura, H., H. Enjoji, T. Seki, A. Taguchi, N. Takaya, and H. Shoun. 2002. Nitrate reductase-formate dehydrogenase couple involved in the fungal denitrification by *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.* 131: 579–586.
 - 25) Vellai, T., K. Takacs, and G. Vida. 1998. A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 46: 499–507.
 - 26) Watsuji, T., N. Takaya, A. Nakamura, and H. Shoun. 2003. Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1115–1120.
 - 27) Yarlett, N., C.G. Orpin, E.A. Munn, N.C. Yarlett, and C.A. Greenwood. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem. J.* 236: 729–739.
 - 28) Zhou, Z., N. Takaya, A. Nakamura, M. Yamaguchi, K. Takeo, and H. Shoun. 2002. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J. Biol. Chem.* 277: 1892–1896.
 - 29) Zumft, W. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533–616.
 - 30) 祥雲弘文. 2006. ミトコンドリア嫌気呼吸とカビの通性嫌気性. 蛋白質・核酸・酵素. 51: 419–429.