

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	門岡 千尋
題 目	白麴菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> のクエン酸輸送体に関する研究
<p>白麴菌 (<i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>) は焼酎製造に用いられる麴菌である。白麴菌は黒麴菌 (<i>Aspergillus luchuensis</i>) のアルビノ変異体であり、これらの麴菌は菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する特徴をもつ。このクエン酸により、焼酎もろみの pH が下がることで比較的温暖な南九州地方において安定した焼酎製造が可能となる。</p> <p>本研究ではまず、白麴菌のアルビノ変異の原因遺伝子の同定を試みた。白麴菌において、分生子の melanin 合成に関与する <i>pksP</i> 遺伝子を相補することにより、黒色の分生子を形成することを明らかにした。また、正常な <i>pksP</i> の発現は菌糸伸長や分生子表面構造に影響を及ぼさなかったが、分生子数を増加させた。さらに、分生子の黒色化は分生子に酸化ストレス、紫外線、イオンビームに対する耐性を付与した。</p> <p>次に白麴菌のクエン酸輸送体の同定を試みた。クエン酸はミトコンドリアの TCA 回路の中間代謝物として合成され、菌体外へ排出される。そこで、麴造りにおけるクエン酸高生産条件で高発現する推定クエン酸輸送体遺伝子 <i>ctpA</i> と <i>yhmA</i> のクエン酸高生産との関連について検討した。まず、精製酵素の活性測定より、CtpA と YhmA はクエン酸輸送体であることが示された。次に各遺伝子破壊株を構築し、表現型を解析した結果、いずれの破壊株も菌糸伸長の遅延や分生子形成能の低下、および菌体外クエン酸生産量の低下が観察された。また、二重破壊株は構築できなかったため、Tet-On システムによる条件二重破壊株を構築した。この条件二重破壊株は、最小培地において細胞内アセチル-CoA 濃度の減少を伴う顕著な生育遅延を示した。一方、酢酸やリジンを添加した培地では細胞内アセチル-CoA 濃度と生育遅延は回復した。これらの結果から、CtpA と YhmA により細胞質へ排出されたクエン酸は細胞内アセチル-CoA 合成にも重要であることが示唆された。</p> <p>さらに、白麴菌のクエン酸高生産機構における推定メチルトランスフェラーゼ <i>LaeA</i> の役割について検討した。<i>LaeA</i> は糸状菌において形態分化や二次代謝の制御因子として知られている。白麴菌において、<i>laeA</i> を破壊した結果、クエン酸生産能を失った。次に <i>laeA</i> 破壊株における遺伝子発現変動について cap-analysis gene expression (CAGE) 解析を用いて解析した結果、推定細胞質膜局在クエン酸輸送体遺伝子 <i>cexA</i> の発現が顕著に低下していることを明らかにした。また <i>cexA</i> の強制発現は、<i>laeA</i> 破壊株のクエン酸生産能を回復させた。さらにメチル化ヒストン抗体を用いた ChIP-qPCR により、<i>LaeA</i> は <i>cexA</i> プロモーター領域のユークロマチン/ヘテロクロマチン比を制御することにより、クエン酸生産を制御することが示唆された。</p>	