

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	門岡 千尋
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
	副査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 琉球大学 教授 外山 博英
	副査 鹿児島大学 教授 高峯 和則
審査協力者	印
題 目	白麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> のクエン酸輸送体に関する研究 (Studies on citrate transporters in the white koji fungus, <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>)
<p>白麹菌 (<i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>) は焼酎製造に用いられる麹菌である。白麹菌は黒麹菌 (<i>Aspergillus luchuensis</i>) のアルビノ変異体であり、黒麹菌と同様に菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。クエン酸は、焼酎のもろみの pH を下げることで雑菌増殖を抑制し、温暖な九州における安定した焼酎製造を可能にしている。本研究では、白麹菌を特徴付けるこれらの性質について調べた。</p> <p>まず、白麹菌のアルビノの表現型の原因遺伝子を解析した。白麹菌と黒麹菌の比較ゲノム解析により、分生子のメラニン合成に関与する <i>pksP</i> 遺伝子の変異を同定した。そこで、白麹菌に正常な <i>pksP</i> 遺伝子を相補することにより、黒麹菌と同様の黒色分生子を形成することを確認した。また、正常な <i>pksP</i> の発現により、分生子の着生数が増加すること、酸化ストレス、紫外線、イオンビームに対する耐性が上昇することが明らかになった。</p> <p>次に、白麹菌のクエン酸分泌生産機構について解析した。クエン酸はミトコンドリアのトリカルボン酸 (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、ミトコンドリア局在型クエン酸輸送体遺伝子 <i>ctpA</i> と <i>yhma</i> を同定し、クエン酸高</p>	

生産との関連性を解析した。まず、精製酵素と ^{14}C 標識クエン酸を用いた活性測定より、CtpA と YhmA がクエン酸輸送体であることを示した。次に、*ctpA* および *yhmA* 遺伝子破壊株を構築し、表現型を観察した結果、CtpA と YhmA が菌糸伸長、分生子形成、およびクエン酸分泌生産に重要であることが明らかになった。また、*yhmA* 破壊株を宿主として *ctpA* のコンディショナル発現株を構築し、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊が合成致死になることを示した。本株は、*ctpA* の発現非誘導条件において細胞内のアセチル-CoA 濃度の減少をともなう顕著な生育遅延を示した。一方、アセチル-CoA を供給する酢酸の存在下では、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、菌体外に分泌されるだけでなく、アセチル-CoA 合成に重要であることが明らかになった。

さらに、白麴菌のクエン酸生産の制御機構について解析した。白麴菌において、推定メチルトランスフェラーゼをコードする *laeA* を破壊すると、クエン酸分泌生産能が顕著に低下することを見出した。LaeA は、糸状菌において形態分化や二次代謝のエピジェネティックな制御因子として知られている。そこで、*laeA* 破壊による遺伝子発現変動を Cap Analysis Gene Expression 法により解析した。その結果、*laeA* 破壊株において、推定細胞質膜局在型クエン酸輸送体をコードする *cexA* 遺伝子の発現が顕著に低下したことを明らかにした。*laeA* 破壊株において *cexA* を強制発現させた結果、クエン酸生産能がコントロールと同程度まで回復した。さらに、抗メチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降および定量PCRにより、LaeA は *cexA* プロモーター領域のユークロマチンとヘテロクロマチンの状態を制御することにより、クエン酸分泌生産を制御することが明らかになった。

本研究の成果は、白麴菌のクエン酸高分泌生産機構に必要とされるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体と細胞質局在型クエン酸を同定し、その生理機能と遺伝子発現制御機構を明らかにしたことである。これらの知見は、白麴菌および類縁菌のクエン酸生産を制御する技術の開発に寄与するものである。

以上のことから、本論文は博士（農学）の論文として十分に価値のあるものと判定した。