

白麴菌

Aspergillus luchuensis mut. *kawachii*

のクエン酸輸送体に関する研究

Studies on citrate transporters in the white koji fungus,

Aspergillus luchuensis mut. *kawachii*.

鹿児島大学大学院連合農学研究科

応用生命科学専攻

門岡 千尋

2020 年

目次

第1章 序論	2
第2章 白麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> NBRC 4308 の アルビノ表現型の 原因遺伝子の解析	
2.1 緒言	7
2.2 実験材料および方法	7
2.3 結果	13
2.4 考察	20
2.5 小括	20
第3章 白麹菌におけるミトコンドリア局在クエン酸輸送体 CtpA と YhmA の機能解明	
3.1 緒言	21
3.2 実験材料および方法	21
3.3 結果	37
3.4 考察	55
3.5 小括	60
第4章 白麹菌における推定メチルトランスフェラーゼ LaeA によるクエン酸生産 制御機構の解析	
4.1 緒言	61
4.2 実験材料および方法	61
4.3 結果	70
4.4 考察	87
4.5 小括	88
第5章 総括	89
謝辞	92
引用文献	93

第1章 序論

1.1 はじめに

黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) および、白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) は焼酎製造に用いられる麹菌である^{1,2)}。清酒や味噌、醤油の製造に使用される黄麹菌 (*Aspergillus oryzae* および、*Aspergillus sojae*) と同様に、原料となる米や大麦、サツマイモのデンプンを単糖レベルまで分解するための糖質加水分解酵素 (α -アミラーゼやグルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ等) を分泌生産する性質をもっており、これにより、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるエタノール発酵が可能となる³⁾。また、黒麹菌および白麹菌は上記の性質に加えて、菌体外に多量のクエン酸を生産する特徴をもっている。このクエン酸は焼酎製造時において、もろみの pH を下げ、雑菌汚染を防ぐ上で重要であり、比較的温暖な南九州地方における安定した焼酎製造を可能にしている。黒麹菌と白麹菌は、2006 年に公益財団法人日本醸造学会において黄麹菌とともに日本を代表する菌として「国菌」に認定されている⁴⁾。

1.2 白麹菌が白色化した原因遺伝子

白麹菌は河内源一郎によって、黒麹の中から黒色の分生子を形成しない株 (アルビノ変異体) として分離された。1947 年に北原らによって形態および生化学的諸性質に基づいて黒麹菌の変異体として認められ、また発見者に因んで *Aspergillus kawachii* と命名された⁵⁾。その後、北原は白麹菌の学名を黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の変異体として *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* と訂正した⁶⁾。白麹菌の学名については、黒麹菌を含む黒アスペルギルスの分類と共に議論されてきたが、分子系統解析の結果に基づいて *A. kawachii* は *A. luchuensis* と同種であることが明らかにされ、*A. kawachii* は *A. luchuensis* の synonym とされ

た^{7,8)}。しかし、産業上重要な白麹菌の学名が黒麹菌と同一であると混乱を招くことから、白麹菌を特定する名称として *A. luchuensis* mut. *kawachii* の使用が提案された⁹⁾。

糸状菌において、分生子の色調は分類の指標として重要であるため、それに関わる遺伝子の解析が進んでいる。ヒトなどの動植物における肺アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* では黒色色素である dihydroxynaphthalene (DHN) -melanin の骨格合成を担うポリケチド合成酵素をコードする *alb1/pksP* が同定された¹⁰⁾。このような色素合成に関与する遺伝子の破壊株は、見た目でも容易に判別できることから、遺伝子破壊の効率を評価するための標的として利用されてきた。*A. luchuensis* RIB2604 において、高効率な遺伝子ターゲティング技術が開発された際に、その効率を評価するために *alb1* のオルソログとして *pksP* が使用された¹¹⁾。その結果、RIB2604 の *pksP* 破壊株は *A. luchuensis* mut. *kawachii* と同様の白色分生子を形成したことから、*pksP* は白色化の原因遺伝子であると推測された。

また、*A. luchuensis* と同じ黒アスペルギルスである *Aspergillus niger* において色彩変異株の表現型を支配する原因遺伝子の探索がなされ、分生子の色素生産に関与する遺伝子として *fwnA/pksP/albA*、*pptA*、*olvA*、および *brnA* が報告された¹²⁾。さらに、*A. luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 と *A. niger* CBS 513.88 において、これら 4 遺伝子 (*fwnA/pksP/albA*、*pptA*、*olvA*、*brnA*) のオルソログが比較され、NBRC 4308 は *pksP* に 1 塩基欠損によるフレームシフト突然変異が生じており、本来よりも上流に終止コドンが出現していることが指摘された¹³⁾。この変異により白麹菌の PksP は、それを構成する β -ketoacyl synthase domain、Acyltransferase domain、Polyketide synthase dehydratase domain、Phosphopantetheine attachment site、および Thioesterase domain のうち、C 末端の Thioesterase domain を欠損するため、白色化の原因として推定された。しかし、これまでに白麹菌が白色化した原因遺伝子が *pksP* であるかどうかについて検証はなされていなかった。そのため、白麹菌が真にアルビノ変異体であるか、およびその原因が *pksP* にあるかどうかについては不明のままとなっている。

1.3 白麹菌のクエン酸高生産機構およびクエン酸排出経路

クエン酸の高生産機構の研究については、白麹菌の類縁菌であり、クエン酸の工業発酵生産に用いられる *A. niger* において精力的に進められ、クエン酸の生産経路のモデルの予測や、その関連代謝系の解析が行われた¹⁴⁻¹⁶⁾。まず、グルコースやスクロースなどの炭素源は解糖系を経てピルビン酸に変換され、その後、ミトコンドリアにおける TCA 回路の中間代謝物としてクエン酸が合成される。合成されたクエン酸はミトコンドリアから細胞質へ、さらに菌体外へと排出されると推定されている。また、実際に *A. niger* において、ミトコンドリア画分からクエン酸合成酵素活性が検出されている¹⁷⁾。しかしながら、そのクエン酸合成酵素をコードする *citA* 遺伝子を過剰発現させても、クエン酸生産量の上昇はみられなかったことから、クエン酸合成酵素の活性はクエン酸高生産の代謝フラックスにおいて、律速ではないことが示されている¹⁸⁾。一方、数理モデルに基づいたクエン酸高生産モデルにより、クエン酸高生産において代謝物の輸送プロセス（炭素源の取り込みやクエン酸の排出）が重要である可能性が指摘されている¹⁹⁻²¹⁾。

ミトコンドリアのクエン酸輸送体については、出芽酵母と哺乳類において同定され、詳細な機能について解析されている。生化学的な解析により、ラットの肝臓由来のクエン酸輸送体 (CTP) はクエン酸やイソクエン酸、*cis*-アコニット酸などのトリカルボン酸と、リンゴ酸やコハク酸、ホスホエノールピルビン酸などのジカルボン酸を対向輸送することが示されており²²⁻²⁴⁾、また出芽酵母のホモログである Ctp1 はより厳密な基質特異性を示すことが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。哺乳類においては、細胞質に排出されたクエン酸は脂肪酸やステロールの合成に重要なアセチルコエンザイム A (アセチル-CoA) の合成の基質となると考えられている²⁸⁻³⁰⁾。一方、出芽酵母における *ctp1* 破壊株は表現型の変化を示さず³¹⁾、出芽酵母においてはコハク酸-フマル酸交換輸送体 (Acr1) などのミトコンドリアの別の輸送体が細胞質アセチル-CoA の合成に関与すると推測されている³²⁻³⁴⁾。また最近、*A. niger* におけるホモログである *ctpA* 遺伝子のクエン酸生産との関連性が解析されたが、*ctpA* 破壊株は

培養初期のクエン酸生産量は低下したものの、培養後期には野生株と同様のクエン酸生産量を示したことから、CtpA は *A. niger* においてミトコンドリアから細胞質へクエン酸を排出に関与する主要な輸送体ではないことが示されている³⁵⁾。そのため、クエン酸排出に関与する主要なクエン酸輸送体については、未解明のままとなっている。

1.4 エピジェネティック制御を介した白麹菌のクエン酸生産制御機構

伝統的な焼酎の麹造りにおいて、発酵熱によって 40°C 付近まで上昇した温度を 34°C 付近まで下げる工程がある。本製麹工程において、高温条件は糖質加水分解酵素の高分泌生産に重要であり、低温条件はクエン酸高生産に重要である³⁶⁾。先行研究において、白麹製造時のこの温度変化による遺伝子発現変動が解析された³⁷⁾。高温条件においては、解糖系や TCA 回路の酵素の遺伝子発現が低下し、一方でトレハロース合成系やペントース-リン酸経路に関連する酵素の遺伝子発現が増加することが明らかとなっている。これらのことから、高温条件ではクエン酸生産に関連する代謝系へのカーボンフローが抑制され、クエン酸を高生産できないと推察されている。一方で、高温条件におけるクエン酸生産量は低温条件時の約 50% 程度ほどしか低下しないため、温度変化に依存しないクエン酸生産の制御因子も存在することが考えられた。

最近、*A. niger* において、クエン酸生産能を失った変異株の解析から、その変異遺伝子が推定メチルトランスフェラーゼをコードする *laeA* であることが報告された³⁸⁾。LaeA はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、ステリグマトシスチン生産遺伝子クラスターの転写制御因子である *aflR* の発現に重要な因子 (loss of *aflR* expression) として同定された³⁹⁾。*laeA* 遺伝子は子囊菌門に属する真菌の中でも *S. cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* などには保存されておらず、*Aspergillus* 属などの糸状菌にのみ保存されている⁴⁰⁾。その後、LaeA は *A. fumigatus* などの病原性糸状菌におけるカビ毒生産や形態分化の制御因子としても報告されている⁴¹⁾。また、黄麹菌においても *laeA* の破壊により、ペニシリンやコウジ酸

生産が劇的に低下することが報告されている^{42,43)}。そのため、*A. niger*においてもクエン酸生産に関連する何らかの遺伝子の発現を制御することで、クエン酸生産を制御することが推測される。しかしながら、*LaeA* がクエン酸高生産機構において、どのような役割をもつのかについては明らかとなっていない。

1.5 研究目的および本論文の構成

本研究では、白麹菌のアルビノ変異原因遺伝子の同定、クエン酸高生産機構に關与するクエン酸輸送体の生理機能および、その遺伝子発現制御機構の解明を目的とした。これらの研究成果は白麹菌に特徴的な性質を理解する上で重要な知見となり、さらにクエン酸をはじめとする有用物質の生産性向上に貢献することが期待できる。

本論文の構成は、以下の通りである。第2章では白麹菌のアルビノ変異遺伝子として *pksP* を同定し、変異を相補することで白麹菌の分生子が黒色を呈することを明らかにした。また、黒色分生子は白色分生子と比較して、UV や酸化ストレス、重イオンビーム耐性が高いことを明らかにした。第3章では、製麹時のクエン酸高生産条件で発現上昇する2つの推定輸送体遺伝子 (*ctpA* と *yhmA*) を見出し、生化学的、分子生物学的解析から、これらがミトコンドリア局在クエン酸輸送体であることを明らかにし、クエン酸高生産に重要であることを明らかにした。また、ミトコンドリアから細胞質へ排出されたクエン酸はアセチル-CoA 合成に重要であることを明らかにした。第4章では、白麹菌の推定メチルトランスフェラーゼ *LaeA* がクエン酸高生産に重要であることを明らかにした。さらに、*LaeA* はクエン酸生産条件において、推定細胞膜局在クエン酸輸送体遺伝子 *cexA* のプロモーター周辺領域のクロマチン構造を開閉することにより、クエン酸生産を正に制御することを示した。

第2章 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 の

アルビノ表現型の原因遺伝子の解析

2.1 緒言

白麹菌が白色の分生子を形成する原因は DHN-melanin の骨格合成を担うポリケチド合成酵素遺伝子 *pksP* の変異である可能性が指摘されているが^{11,13)}、*pksP* がアルビノ変異の直接の原因遺伝子であるかは証明されていない。そこで、白麹菌 NBRC4308 株に正常な *pksP* 遺伝子を相補することで黒色分生子が着生するかどうかを検討した。

本章では、白麹菌に黒麹菌 RIB2601 株由来の *pksP* を導入することで、黒色分生子を着生すること、さらに白色分生子と黒色分生子の各種ストレス耐性の違いについて述べる。

2.2 材料および実験方法

(1) 使用菌株

A. luchuensis mut. *kawachii* NBRC 4308 および *A. luchuensis* RIB2601 を、野生株として使用した。また、形質転換の親株として NBRC 4308 に由来する *A. luchuensis* mut. *kawachii* SO2 を使用した^{44,45)}。形質転換体およびコントロール株について、Table 2.1 に示した。コントロール株は、比較対象の菌株と同じ栄養要求性を示す株と定義した。すなわち、Table 2.1 に示す *CpksP* のコントロール株は $\Delta ligD \Delta sC$ であり、*OEpkpP* のコントロール株は $\Delta ligD \Delta argB$ である。

(2) 培養条件

菌株の培養は全て 30°Cで行い、Potato Dextrose Broth (PD 液体培地) (BD Difco™)、Potato Dextrose Agar (PD 寒天培地) (BD Difco™)、および最少培地 (1% [wt/vol] glucose, 0.6% [wt/vol] NaNO₃, 0.052% [wt/vol] KCl, 0.052% [wt/vol] MgSO₄·7H₂O, 0.152% [wt/vol] KH₂PO₄, Hutner's trace elements [pH 6.5])⁴⁶⁾を使用した。最少培地には、必要に応じて 0.8 M NaCl, 1.5% (wt/vol) 寒天、0.211% (wt/vol) arginine、あるいは 0.02% (wt/vol) methionine を添加した。

(3) *pksP* 相補株 (*CpksP*) の構築

A. luchuensis RIB2601 のゲノム DNA 情報より、NBRC 4308 における *pksP* の変異点周辺の約 2.3 kb を PCR により増幅した。なお、RIB2601 の *pksP* の塩基配列は *A. luchuensis* RIB2604¹¹⁾ と同一であることをシーケンス解析により確認した (data not shown)。形質転換用の選択マーカーとして *Aspergillus nidulans* 由来の *argB* 遺伝子 (約 1.8 kb)、および相同領域として *pksP* の 3' -UTR (約 2.0 kbp) を PCR により増幅した。各断片を増幅するためのプライマーセットは、それぞれ *pksP*-FC/*pksP*-R1, *pksP*-F2/*pksP*-R2, および *pksP*-F3/*pksP*-RC を用いた (Table 2.2)。また、プラスミド pDC1⁴⁷⁾、および RIB2601 のゲノム DNA をそれぞれの PCR の鋳型に使用した。Fusion PCR により各増幅断片を連結した後、*pksP*-F1/*pksP*-R3 を用いて増幅した相補カセットで SO₂ をプロトプラスト-PEG 法により形質転換し、*CpksP* とした (Table 2.1、Table 2.2、Fig. 2.1A)。形質転換体は、arginine を含有しない最少培地により選択した。また、形質転換体の確認を、*pksP*-FC/*pksP*-RC を用いたコロニーPCR による増幅サイズ (Fig. 2.1B) およびコロニーPCR のアンプリコンに対する DNA シーケンスにより確認した。DNA シーケンスはプライマー *pksP*-seq-F により行った (Table 2.2)。

Table 2.1. Strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or Reference
<i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>		
NBRC 4308 ^T	wild-type	IFO
$\Delta ligD \Delta argB$	<i>ligD::ptrA argB::hph</i>	44
$\Delta ligD \Delta sC$	<i>ligD::ptrA sC</i>	This study
SO2	<i>ligD argB::hph sC</i>	45
<i>CpksP</i>	<i>ligD argB::hph AKpksP::ALpksP-argB sC</i>	This study
<i>OEpkpP</i>	<i>ligD argB::hph sC pGS-PgpdA-ALpksP</i>	This study
<i>Aspergillus luchuensis</i>		
RIB2601	wild-type	NRIB

Abbreviations: IFO, Institute for Fermentation, Osaka; NRIB, National Research Institute of Brewing.

(4) *pksP* 過剰発現株 (*OEpkpP*) の構築

A. luchuensis mut. *kawachii* NBRC 4308 に由来する *gpdA* プロモーター、および選択マーカーとして *sC* 遺伝子をもつ pGS-PgpdA プラスミド⁴⁸⁾を *pksP* の過剰発現株の構築に使用した。*A. luchuensis* RIB2601 のゲノム DNA から *pksP* をプライマーセット pGSG-pksP-inf-F/pGSG-pksP-inf-R を用いて増幅し (Table 2.2)、Sal I で切断した pGS-PgpdA に In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて連結し、pGS-PgpdA-ALpksP とした (Fig. 2.1C)。SO2 を pGS-PgpdA-ALpksP で形質転換し、*OEpkpP* とした (Table 2.1)。形質転換体は、methionine を含有しない最少培地により選択した。

(5) Real time RT-PCR

PD 液体培地 100 ml に NBRC 4308、*CpksP* あるいは *OEpkpP* の分生子 (2.0×10^7) を接種し、30°C、180 rpm で 24 時間培養した。菌体を回収した後、PD 寒天培地に移し、30°C で 24 時間培養することで分生子の形成を誘導した。PD 液体培地から取得した菌体と、さらに PD 寒天培地で培養した菌体それぞれを液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。RNA の抽出は RNAsiso plus (Takara Bio) を用いて行った。cDNA の合成は PrimeScript™ Perfect

real-time reagent kit (Takara Bio)、real time RT-PCR は Thermal Cycler Dice® real-time system MRQ (Takara Bio) と TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いた。プライマーセットは、*pksP* の測定に pksP-RT-F/ pksP-RT-R を、*actA* の測定に actA-RT-F/actA-RT-R15)を用いた (Table 2.2)。

Table 2.2. Primers used in this study.

Name	Sequence (5'-3')	Source or Reference
pksP-FC	CAGATCTATTTCAGTCACTGCAGAAG	This study
pksP-F1	GCTGAGGCGGAGTGGAACG	This study
pksP-R1	GCATGCAAGCTTTCGCGAGCCTAATTGGCCATGGCGTTACCAAT	This study
pksP-F2	ATTGGTAACGCCATGGCCAATTAGGCTCGCGAAAGCTTGCATGC	This study
pksP-R2	GGAAGGCGCAATGCATAACAATAATTCGAGCTCGGTACCCGG	This study
pksP-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTATTGTTATGCATTGCGCCTTCC	This study
pksP-R3	CGGGAGCATGACCGTCTCAC	This study
pksP-RC	ACACGGACCAGAGACTTCCAC	This study
pksP-seq-F	CCTTTCGCTTACTGTGCTTG	This study
pGSG-pksP-inf-F	CCGCCGAACAGTCGAACACATCTACACAATGGAGGGTCCATCTCGTGTG	This study
pGSG-pksP-inf-R	CTCCCATATGGTCGACTAATTGGCCATGGCGTTACCAAT	This study
pksP-RT-F	CAGCTGGTCACCCGCTATTC	This study
pksP-RT-R	CAAGAGTGGTTTGTGCCGGTC	This study
actA-RT-F	GGTATGGGTCAGAAGGACTC	37
actA-RT-R	CTCCATGTCATCCAGTTCG	37

(6) 麴における分生子形成量の試験

シャーレ法による製麴を行った。蒸米 45 g あたり 4.5×10^7 /mL の濃度に調整した分生子の懸濁液 1 mL を接種した。なお、分生子懸濁液には 0.8% (wt/vol) arginine、および 0.4% (wt/vol) methionine を添加した。種付けした蒸米をガラスシャーレに移し、これを恒温恒湿器に入れて 35°C の設定温度で培養を開始し、培養 20 時間後と 25 時間後に手入れを行い、43 時間後に出麴とした。また、設定温度を培養開始 15 時間後に 38°C、25 時間後に 34°C に

変更した。麴 2 g あたり 5 mL の 0.1 (vol/vol) % Triton X-100 溶液に懸濁して分生子を回収し、血球計算盤により分生子の数を測定し、分生子形成量を算出した。

(7) 分生子表面の電子顕微鏡観察

各菌株の分生子 (5.0×10^6) を PD 寒天培地にスポットし、 30°C で 7 日間培養した。分生子の成熟部位 (約 5 mm 四方) を切り出して、マグネトロンスパッタ装置 (真空デバイス MSP-10) により白金をコーティングし、走査型電子顕微鏡 (FEI Quanta 400) の低真空モードを用いて分生子表面構造を観察した。

(8) 分生子の紫外線 (UV) 耐性試験

各菌株の分生子 (1.0×10^5) を PD 寒天培地にスポットし、 30°C で 5 日間培養し、分生子懸濁液を調整した。PD 寒天培地に約 100 個の分生子を塗布した後、クリーンベンチ内において UV ランプから 30 cm の距離で UV を照射した。その後、 30°C で 3 日間培養し、出現したコロニー数を計数した。同様の操作で、UV を照射しない試料を調整し、出現したコロニー数を分母として生存率 (%) を算出した。

(9) 分生子の酸化ストレス耐性試験

各菌株の分生子懸濁液は、上述した UV 耐性試験に用いたものと同じものを使用した。各菌株の分生子を 100 mM あるいは 200 mM の H_2O_2 で、室温で 15 分間処理した。その後、PD 寒天地に約 100 個の分生子を塗布し、 30°C で 3 日間培養し、出現したコロニー数を計数した。同様の操作で、 H_2O_2 で未処理の試料を調整し、出現したコロニー数を分母として生存率 (%) を算出した。

(10) 分生子の重イオンビーム耐性試験

各菌株の分生子 5.0×10^6 個を PD 寒天培地に塗布し、30°C で 7 日間培養した。プレート をカプトン膜（東レ・デュポン）で覆い、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構高 崎量子応用研究所において、220 MeV の炭素イオンビームを 50, あるいは 100 Gy 照射した。 滅菌水で分生子を回収し、PD 寒天培地に約 100 個の分生子を塗布し、30°C で 3 日間培養し、 出現したコロニー数から生存率（%）を算出した。

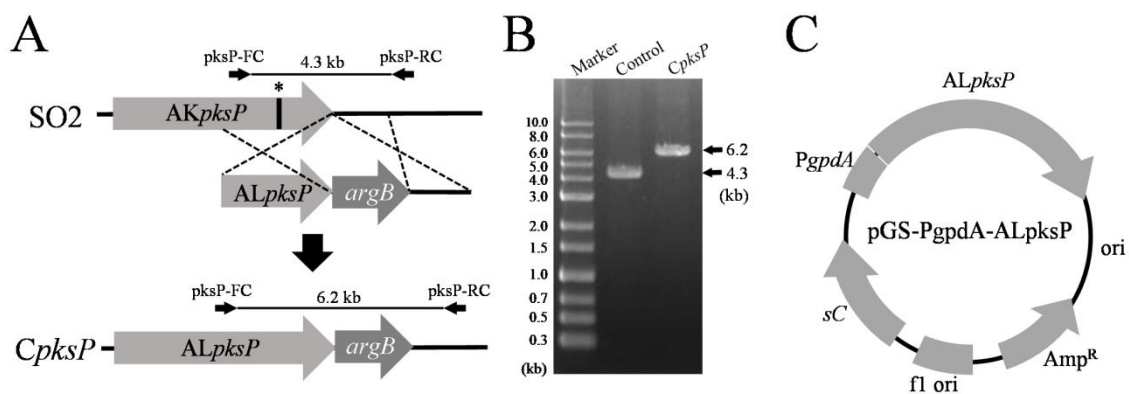


Fig. 2.1 Construction of the *A. luchuensis mut. kawachii pksP*-complemented strain (A). *, position of 1 bp deletion in *pksP*. Results of electrophoretic analyses of the PCR products (B). Plasmid map for pGS-PgpdA-ALpksP (C).

2.3 結果

(1) NBRC 4308、*pksP* 相補株および過剰発現株における *pksP* の転写量

A. luchuensis mut. *kawachii* NBRC 4308 が白色化した原因遺伝子が *pksP* であるかどうかを検証するために *pksP* 相補株 (*CpksP*) と *pksP* 過剰発現株 (*OEpkpP*) を構築し、NBRC 4308 と共に *pksP* の転写量を確認した (Fig. 2.2)。NBRC 4308 と *CpksP* において、*pksP* は PD 液体培地ではほとんど転写されなかったが、分生子形成を誘導する PD 寒天培地では転写が確認された。この結果から、ネイティブプロモーターによる *pksP* の転写は分生子形成時に誘導されることが示唆された。一方、*OEpkpP* では、PD 液体培地において NBRC 4308 と比べて約 95 倍高い転写量が認められ、分生子形成誘導条件においても約 2.6 倍高い転写量であった。なお、*OEpkpP* において測定される *pksP* の転写量には、ネイティブプロモーターによる 1 塩基欠損型 *pksP* の転写量も含まれる。しかし、NBRC 4308 における *pksP* の転写量を差し引いたとしても *OEpkpP* における *pksP* の転写レベルは高いことから、*OEpkpP* では、菌糸伸長時と分生子形成時の両方において *pksP* が過剰発現していることが示唆された。

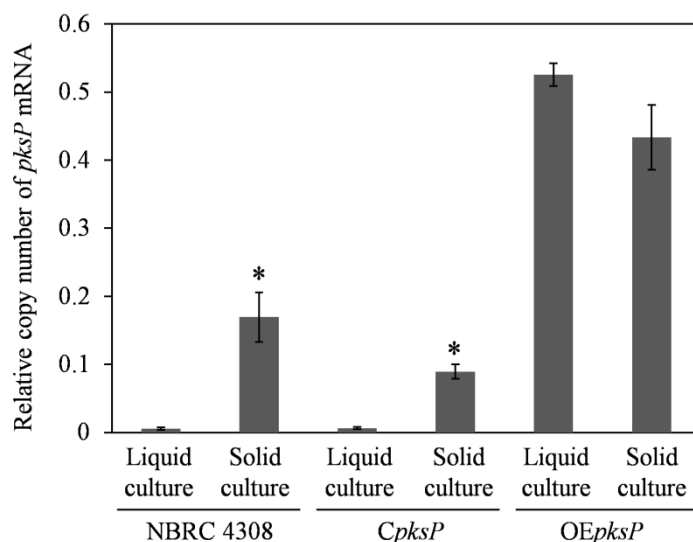


Fig. 2.2 Comparison of relative expression levels of *pksP* in liquid and solid cultures in *CpksP* and *OEpkpP* strains. All results were normalized to the expression level of the actin encoding *actA* gene. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) between liquid and solid culture conditions.

(2) *pksP* 相補株および過剰発現株の表現型

A. luchuensis mut. *kawachii* NBRC 4308 の表現型に正常な *pksP* の発現が及ぼす影響を解析するために、*CpksP* と *OEpkpP* のコロニー形態を、PD 寒天培地を用いて NBRC 4308、*A. luchuensis* RIB2601 およびそれぞれのコントロール株と比較した (Fig. 2.3A)。*CpksP* は RIB2601 と同様の黒色の分生子を形成した (Fig. 2.3A の top) ことから、NBRC 4308 がアルビノとなった原因は、*pksP* の 1 塩基欠損¹¹⁾であることが実証された。また、*OEpkpP* も RIB2601 と同様の黒色の分生子を形成し、*CpksP* と比較して分生子の黒色の度合いに大きな差はなかった (Fig. 2.3A の top)。*OEpkpP* はコロニー裏面に、暗黄色の着色が認められた (Fig. 2.3A の bottom)。

また、培養日数ごとにコロニー直径を測定した結果、*CpksP*、*OEpkpP* とそれぞれのコントロール株の間に、大きな違いは認められなかったことから、*pksP* の発現は菌糸伸長に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 2.3B)。しかし、培養 5 日目のコロニー単位面積当たりの分生子着生量を比較した結果、*CpksP* はコントロール株と比べて 1.5 倍、*OEpkpP* は 2.4 倍の分生子を形成した (Fig. 2.3C)。この結果から、黒色色素の生産は分生子の形成効率を高めることが示唆された。そこで、分生子の着生量について麴で同じ傾向が見られるかどうかを調べた。その結果、*CpksP* と *OEpkpP* はそれぞれのコントロール株と比べて 1.3 倍の分生子を形成したことから (Fig. 2.4)、黒色色素の生産は麴においても分生子の形成効率を高めることが示唆された。

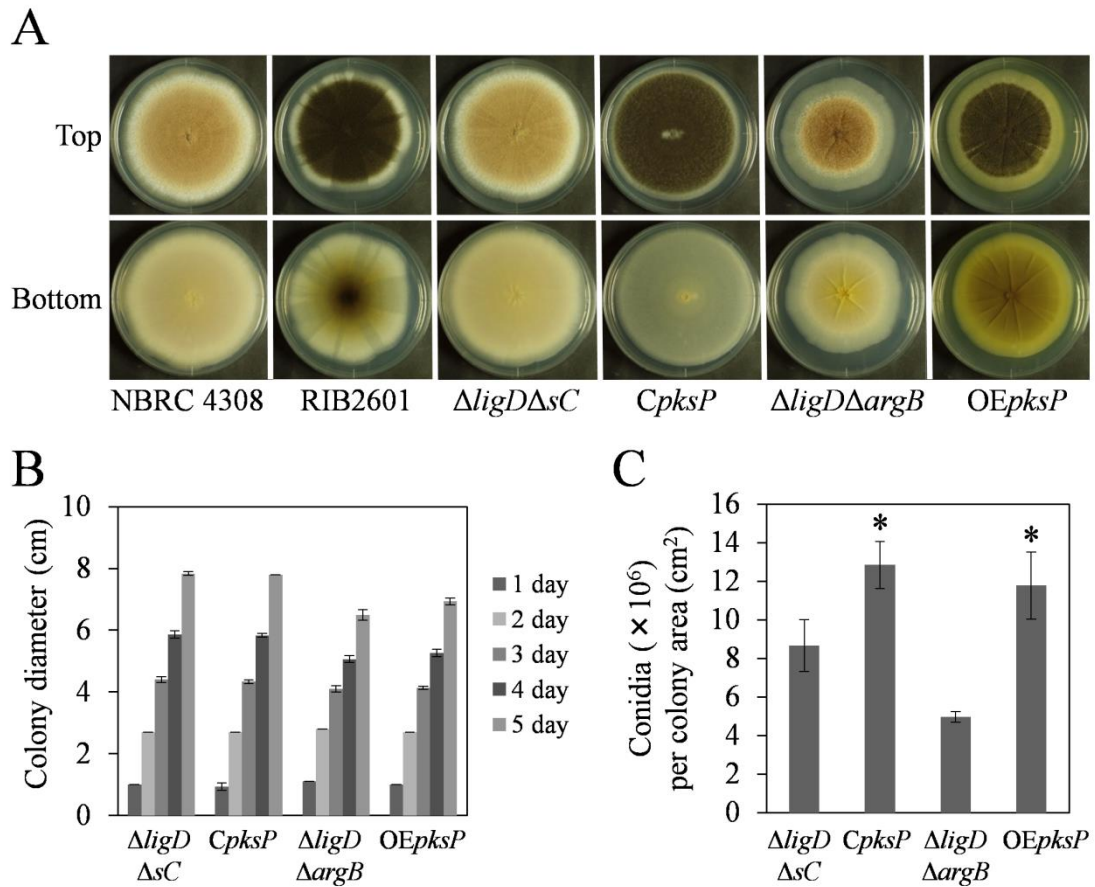


Fig. 2.3 Colony of *A. luchuensis* mut. *kawachii* and *A. luchuensis* strains (A). Conidia (1×10^5) were inoculated onto a PDA medium and incubated for 5 days. Colony diameters were measured at each time point (at 1 to 5 days) (B). Conidia formation per colony area was measured after 5 days cultivation (C). The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) relative to results of each control strain.

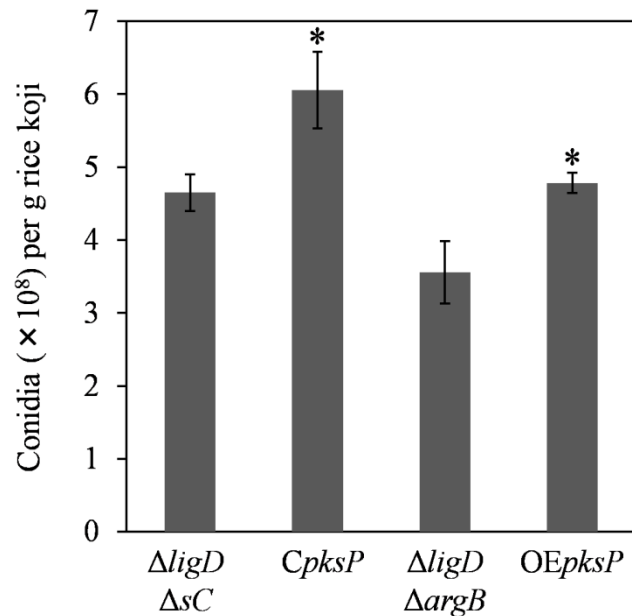


Fig. 2.4 Conidia number of rice koji made using *A. luchuensis* mut. *kawachii* strains. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) relative to the results of each control strain.

(3) 分生子表面構造の観察

A. fumigatus において、分生子表面は棘状の凹凸をもつ構造をとっており、*alb1/pksP* の変異によって棘様の構造が消失することが報告されている^{10,49)}。そこで、野生株である *A. luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 および *A. luchuensis* RIB2601 の分生子表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果、棘様の構造は認められなかった (Fig. 2.5A と B)。これは、*A. niger* などの黒カビの分生子には棘状の突起が認められるが、黒麹菌の分生子には観察されない点で、黒カビと黒麹菌を判定できるという報告と一致した⁵⁰⁾。また、*CpksP* と *OEpkpP* の分生子表面においても棘状の突起は観察されなかった (Fig. 2.5C と D)。以上のことから、*A. luchuensis* において棘様の構造は観察されず、*pksP* の相補および過剰発現によっても棘状の構造体は形成されないことが明らかになった。

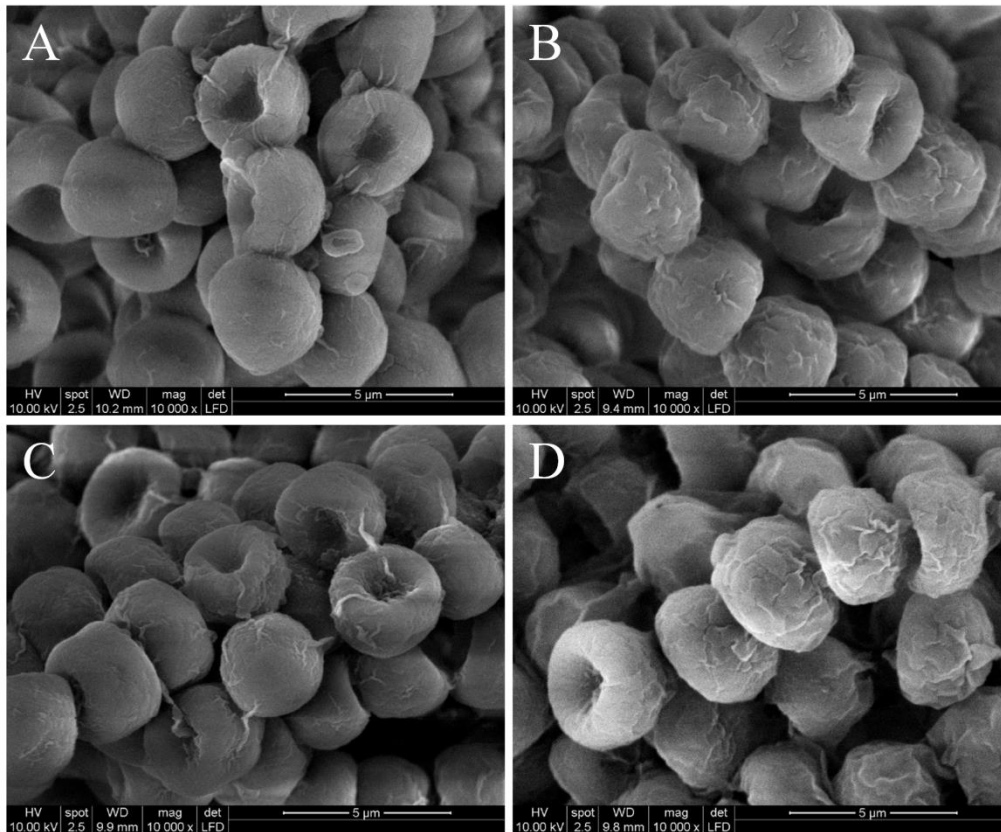


Fig. 2.5 Conidial surface structure observed by a scanning electron microscope for strains NBRC 4308 (A), RIB2601 (B), *CpksP* (C), and *OEpkpP* (D).

(4) 黒色化による分生子へのストレス耐性の付与

多くの真菌において、melanin は UV 等の DNA 損傷ストレスへの耐性に重要な役割をもつ⁵¹⁾。 *A. fumigatus* においては、DHN-melanin が UV や活性酸素種 (ROS) に対する耐性獲得に重要であることが報告されている^{49,52)}。また、*A. niger* においても、melanin がパルス光および UV-C (254 nm) への耐性に重要であることが報告されている⁵³⁾。

そこで、*A. luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 の黒色化が分生子の UV や ROS への耐性に及ぼす影響を評価した。まず、UV 照射 45 秒と 60 秒において、*CpksP* の分生子はコントロール株の分生子と比べてそれぞれ約 1.6 倍と約 2.3 倍高い生存率を示した (Fig. 2.6A)。また、*OEpkpsP* の分生子もコントロール株の分生子よりそれぞれ約 2.4 倍と約 3.3 倍高い生存率を示した。次に、ROS を産生し酸化ストレスを引き起こす H_2O_2 に対する耐性について解析した結果、100 mM および 200 mM の H_2O_2 曝露に対して、コントロール株の分生子と比較して、*CpksP* の分生子はいずれも約 1.2 倍、*OEpkpsP* の分生子はそれぞれ約 1.2 倍および約 1.3 倍の高い耐性を示した (Fig. 2.6B)。さらに、突然変異育種の変異源として利用されるイオンビーム⁵⁴⁾に対する耐性を比較した (Fig. 2.6C)。*CpksP* の分生子は 50 Gy および 100 Gy の炭素イオンビームに対して、コントロールの分生子と比較して、それぞれ約 1.5 倍および約 1.8 倍耐性が増加した。また、*OEpkpsP* の分生子では 50 Gy のイオンビームに対して約 2.8 倍耐性が増加した。*OEpkpsP* の分生子は 100 Gy のイオンビームに対しては約 1.5 倍耐性が増加したが、有意差は認められなかった。

以上の結果より、黒色色素は分生子の UV やイオンビーム等の DNA 損傷ストレス耐性、および H_2O_2 等の酸化ストレス耐性に関与しており、*pkpsP* の相補、あるいは過剰発現によってこれらのストレス耐性が上昇することが示唆された。

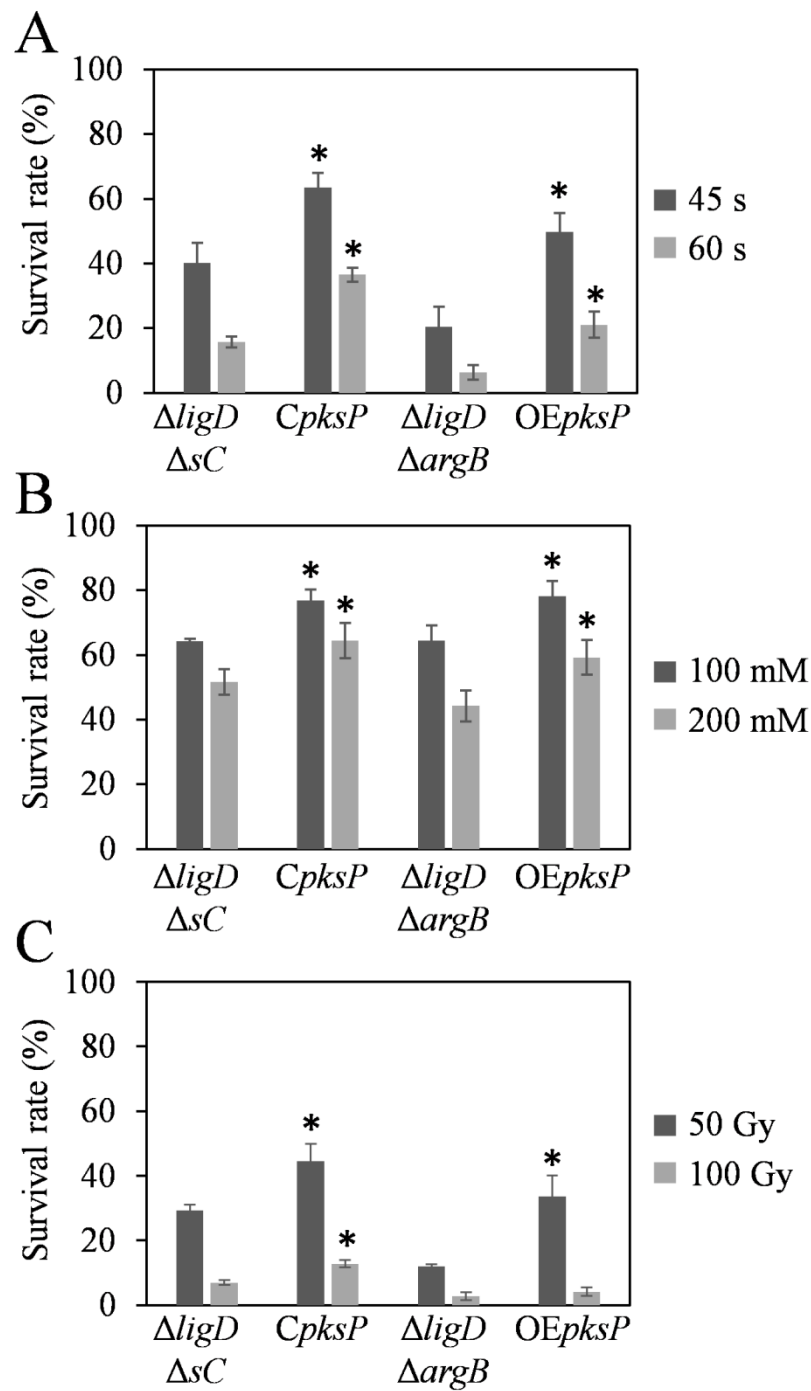


Fig. 2.6 The survival rates (%) of conidia after UV irradiation (UV lamp irradiation for 45 sec or 60 sec) (A), oxidative stress (100 mM or 200 mM H₂O₂ for 15 min) (B), or ion beam irradiation (50 Gy or 100 Gy) (C). The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent experiments. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) relative to results for the control strain.

2.4 考察

本研究では、白麴菌のアルビノ変異の原因を探索し、その原因が *pksP* 遺伝子の 1 塩基欠損による C 末端の Thioesterase domain を欠損であることを明らかにした。*pksP* の転写量の解析から、白麴菌の *pksP* は固体培養条件で発現誘導されていることから、*pksP* のプロモーターは正常に機能していることが示唆された。また、*pksP* の過剰発現は菌糸面への暗黄色の色素沈着を促進し、これは *gpdA* プロモーターの制御下で *pksP* が栄養増殖中の菌糸においても高発現したことによると考えられた (Fig. 2.2) *A. niger* および *Aspergillus awamori* (現在、*A. awamori* は *A. luchuensis* の doubtful synonym とされている⁹⁾) からは、主要な黄色色素として aurasperon B が報告されている⁵⁵⁻⁵⁷⁾。Aurasperon 類の合成に関与する遺伝子群の全容は解明されていないが、*A. niger* において *fwnA/pksP/albA* の破壊により aurasperon B を含む naphtho- γ -pyrone を生産しなくなることから^{12,58)}、*A. luchuensis* においても PksP は aurasperon 類の合成に関与すると推測される。これらのことから、OE*pksP* の菌糸では *pksP* の高発現により DHN-melanin やその前駆体、あるいは aurasperon 類が蓄積した可能性があるかと推察される。さらに、白麴菌へ正常な *pksP* の相補することにより、分生子を黒色化させるだけでなく、分生子形成効率を増加させ、UV や、 H_2O_2 、イオンビームに対する耐性を強化することが示唆された。これらの結果から、白麴菌においても PksP によるメラニンの合成は分生子の成熟化や、保護に重要であることが示唆された。

2.5 小括

白麴菌はアルビノ変異体であり、その原因は *pksP* 遺伝子の 1 塩基欠損であった。また、*pksP* の過剰発現により、菌糸面においても暗黄色の色素を生産した。*pksP* の相補または、過剰発現は白麴菌の分生子形成率を促進し、その分生子に UV および、 H_2O_2 、イオンビーム耐性を付与することが明らかとなった。

第3章 白麴菌におけるミトコンドリア局在クエン酸輸送体

CtpA と YhmA の機能解明

3.1 緒言

白麴菌のクエン酸高生産機構に関与するクエン酸輸送体は長年未同定のままとなっていた。そこで、製麴時においてクエン酸生産を促進する温度低下時に高発現する遺伝子として *ctpA*、および *yhmA* を見出し³⁷⁾、解析を行った。*CtpA* は出芽酵母におけるクエン酸-リンゴ酸交換輸送体 *Ctp1* のホモログであり、*YhmA* はクエン酸-オキシグルタル酸交換輸送体 *Yhm2* のホモログである。

本章では、*CtpA* と *YhmA* のクエン酸輸送活性、各遺伝子破壊株の表現型、および生理的意義について述べる。

3.2 材料および実験方法

(1) 使用菌株および、培養条件

A. luchuensis mut. *kawachii* SO2 株⁴⁵⁾、および *S. cerevisiae* W303-1A⁵⁹⁾を形質転換の親株として使用した (Table 3.1)。コントロール株は比較対象の株と同じ栄養要求性を示す株と定義した。

白麴菌の培養は最少培地 (1% [wt/vol] glucose, 0.6% [wt/vol] NaNO₃, 0.052% [wt/vol] KCl, 0.052% [wt/vol] MgSO₄·7H₂O, 0.152% [wt/vol] KH₂PO₄, Hutner's trace elements [pH 6.5])⁴⁶⁾ またはクエン酸生産 (CAP) 培地 (10% [wt/vol] glucose, 0.3% [wt/vol] (NH₄)₂SO₄, 0.001% [wt/vol] KH₂PO₄, 0.05% [wt/vol] MgSO₄·7H₂O, 0.000005% [wt/vol] FeSO₄·7H₂O, 0.00025% [wt/vol] ZnSO₄·5H₂O, 0.00006% [wt/vol] CuSO₄·5H₂O [pH 4.0]) を使用した。なお、CAP 培地は有機酸生産を促すため、高濃度の炭素源 (10% Glucose) を含有し、金属イオンを制限し

た培地である^{14,15,16}。最少培地には、必要に応じて 0.8 M NaCl、1.5% (wt/vol) 寒天、0.211% (wt/vol) arginine、あるいは 0.02% (wt/vol) methionine を添加した。

出芽酵母の培養には、YPD 培地、合成完全 (SC) 培地、最少培地として SD 培地 (炭素源として 2% [wt/vol] glucose を添加) または SA 培地 (炭素源として 1% [wt/vol] sodium acetate を添加) を使用した⁶⁰。

Table 3.1. *Aspergillus kawachii* and *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
<i>Aspergillus kawachii</i>		
SO2	<i>ligD⁻ argB::hph sC</i>	45
control strain	<i>ligD⁻ argB::hph::argB sC::sC⁺</i>	This study
Δ <i>ctpA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph ctpA::argB sC::sC⁺</i>	This study
Δ <i>yhmA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph yhmA::argB sC::sC⁺</i>	This study
Δ <i>ctpA</i> + <i>ctpA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph ctpA::argB sC ctpA-sC</i>	This study
Δ <i>yhmA</i> + <i>yhmA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph yhmA::argB sC yhmA-sC</i>	This study
<i>ctpA-gfp</i>	<i>ligD⁻ argB::hph ctpA::argB sC pGS-ctpA-gfp</i>	This study
<i>yhmA-gfp</i>	<i>ligD⁻ argB::hph yhmA::argB sC pGS-yhmA-gfp</i>	This study
Ptet- <i>ctpA-S</i>	<i>ligD⁻ argB::hph ctpA::argB sC pVG2.2ANsC-ctpA-S</i>	This study
Ptet- <i>yhmA-S</i>	<i>ligD⁻ argB::hph yhmA::argB sC pVG2.2ANsC-yhmA-S</i>	This study
Ptet- <i>ctpA-S</i> Δ <i>yhmA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph ctpA::argB sC pVG2.2ANsC-ctpA-S yhmA::bar</i>	This study
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	59
control strain	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 YCplac22</i>	This study
Δ <i>yhm2</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>yhm2::kanMX YCplac22</i>	This study
Δ <i>yhm2</i> + <i>YHM2</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>yhm2::kanMX YCplac22-YHM2</i>	This study
Δ <i>yhm2</i> + <i>yhmA</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>yhm2::kanMX YCplac22-yhmA</i>	This study

(2) *ctpA* および *yhmA* 破壊株の構築

ctpA および *yhmA* の破壊はマーカー遺伝子である *argB* の挿入によって行った。相同領域として 5'-UTR と 3'-UTR (それぞれ 2 kbp) および、マーカー遺伝子として *A. nidulans* 由来 *argB* (1.8 kbp) を PCR によって増幅した。PCR に用いたプライマーセットはそれぞれ AKxxxx-FC/AKxxxx-del-R1、AKxxxx-F2/AKxxxx-R2、AKxxxx-del-F3/AKxxxx-RC を用いた (xxxx は *ctpA* および *yhmA* に相当) (Table 3.2)。相同領域には *A. lucuensis* mut. *kawachii* NBRC4308 のゲノム DNA を、*argB* にはプラスミド pDC I⁴⁷) を鋳型として使用した。Fusion PCR により各断片を連結後、AKxxxx-F1/AKxxxx-del-R3 により増幅した破壊カセットを用いて、SO₂ をプロトプラスト-PEG 法により形質転換し、 Δ *ctpA*、 Δ *yhmA* とした。形質転換体は、arginine を含有しない最少培地により選択した。また、形質転換体の確認を、AKxxxx-FC/AKxxxx-RC を用いたコロニーPCRによる増幅サイズと増幅断片の Sal I 切断パターンにより確認した (Fig. 3.1AB)。遺伝子破壊の確認後、栄養要求性を揃えるため、sC 遺伝子の相補を行った。プライマーセット sC-comp-F/sC-comp-R と鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA を用いて sC 遺伝子を増幅し、形質転換後、methionine を含有しない最少培地により選択した。

Table 3.2. PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Source
AKyhmA-FC	CCTCCTCCAGTACTACGGCC	This study
AKyhmA-F1	GGCCAACTACTACACCGTCC	This study
AKyhmA-del-R1	GCATGCAAGCTTTTCGCGAGCATCTGACCTTGGGAGCGCTG	This study
AKyhmA-del-F2	CAGCGCTCCCAAGGTCAGATGCTCGCGAAAGCTTGCATGC	This study
AKyhmA-del-R2	GAGAGGGGAAAGTTTGTTCACAATTTCGAGCTCGGTACCCGG	This study
AKyhmA-del-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTGTGGAACAAACTTTCCCCTCTC	This study
AKyhmA-R3	AAGCTCAGCTGGCCGATAGG	This study
AKyhmA-RC	CCCGACACACTCCGATACAC	This study
AKctpA-FC	GAAGTCTGAGATCCAGCCAATTCC	This study
AKctpA-F1	ATGTCTATGATTCACCGGACAC	This study
AKctpA-del-R1	GCATGCAAGCTTTTCGCGAGCTGCCAGGGTATCTGCTGCAAG	This study
AKctpA-del-F2	CTTGCAGCAGATAACCCTGGCAGCTCGCGAAAGCTTGCATGC	This study
AKctpA-del-R2	CCTACTGGCCAAAGTGCTCCAATTTCGAGCTCGGTACCCGG	This study
AKctpA-del-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTGGAGCACTTTGGCCAGTAGG	This study
AKctpA-R3	GTAAGTCAGGACGTATGGTCAG	This study
AKctpA-RC	AGCAGGATTAAGTTATGGCGC	This study
sC-comp-F	CAATCACGCAAGCCGAGCTG	This study
sC-comp-R	CTCACCGATGTAGGTCATG	This study
AKyhmA-comp-R1	TGCTGCTGGGACACCATGACAACGGCTCGACTCTGTTCTTCCTCGG	This study
sC-argB-F2	CCGTTGTCATGGTGTCCCAGCAGCA	This study
sC-argB-R2	AATTCGAGCTCGGTACCCGG	This study
AKctpA-comp-R1	TGCTGCTGGGACACCATGACAACGGCCTACTGGCCAAAGTGCTCC	This study
pGS-yhmA-gfp-inf-F1	CCGCCTGCAGGTTCGAGATCCTCCCATGATCGTGGTT	This study
pGS-yhmA-gfp-inf-R1	GTGCTTAGCGGTGACTTTGT	This study
pGS-yhmA-gfp-inf-F2	GTCACCGCTAAGCACGGAGCTGGTGCAGGCGC	This study
pGS-yhmA-gfp-inf-R2	CTCCCATATGGTCGATGAAGAGCATTGTTGAGGC	This study
pGS-ctpA-gfp-inf-F1	CCGCCTGCAGGTTCGAGCACCTTGGCTCAGTCATGAC	This study
pGS-ctpA-gfp-inf-R1	AATGTATCGCCTTTCTGGATCG	This study
pGS-ctpA-gfp-inf-F2	GAAAGGCGATACATTGGAGCTGGTGCAGGCGC	This study
pGS-ctpA-gfp-inf-R2	CTCCCATATGGTCGATGAAGAGCATTGTTGAGGC	This study
pVG2.2-ANsC-inf-FC	GCACTCTTAACCGAAGATCCCCG	This study
pVG2.2-ANsC-inf-F1	CGGCCGCAAGGCGCGATCTACAGACGCTCAAAGTAGCC	This study
pVG2.2-ANsC-inf-R1	CACTCTGTACACCTCGGGAGTTGCGTGTGGCCTACCAGTA	This study
pVG2.2-ANsC-inf-F2	TACTGGTAGGCCACACGCAACTCCCCGAGGTGTACAGAGTG	This study

Table 3.2. (continued).

Primer name	Sequence (5'-3')	Source
pVG2.2-ANsC-inf-R2	CTCCACGCGGGCGCGGAGAGGTGCCTCACAGATCG	This study
pVG2.2-ANsC-inf-RC	CCATCCTTCCTCGGCAGAGA	This study
pVG2.2ANsC-ctpA-S-inf-F	CAGACATCACCGTTTAAACACCATGGCAACCTCTGAGAACGA	This study
pVG2.2ANsC-ctpA-S-inf-R	CGGCATCTACTGTTTAGCTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAATTTA GCAGCAGCGGTTTCTTTGGCTCCAGCGCCTGCACCAATGTATC GCCTTTCTGGAT	This study
AKyhmA-bar-R1	TGTTCCCTTTAGTGAGGGGTATCTGACCTTGGGAGCGCTG	This study
AKyhmA-bar-F2	CAGCGCTCCCAAGGTCAGATACCCCTCACTAAAGGGAACA	This study
AKyhmA-bar-R2	GAGAGGGGAAAGTTTGTTCACGAGAGTTGAACCTGGACGCC	This study
AKyhmA-bar-F3	GGCGTCCAGGTTCAACTCTCGTGGAACAACTTTCCCCTCTC	This study
SCyhm2-del-F	CTTTTGTACAAATAAAGCTAGGAAAAGCCCGACGTCATTATAG CTCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
SCyhm2-del-R	GTACAATACACGCTAATGTTTGGCAACTGGGGTTTCACCAGTC ATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	This study
SCyhm2-comf-F	GAAGCTGCCACCTCAAGTC	This study
SCyhm2-comf-R	CAAATAGGAAGCACCCCAGC	This study
YCplac22-yhm2-inf-F	ATGCCTGCAGGTCGAGCCCTGTAATGAAGCTGCGTG	This study
YCplac22-yhm2-inf-R	ATCCTCTAGAGTCGACAAATAGGAAGCACCCCAGC	This study
YCplac22-yhmA-inf-R1	AGCTATAATGACGTCGGGCT	This study
YCplac22-yhmA-inf-F2	GACGTCATTATAGCTATGTCTACCGCTACTGCCGC	This study
YCplac22-yhmA-inf-R2	ATCCTCTAGAGTCGACTAGTGCTTAGCGGTGACTTTG	This study
AKyhmA-RT-F	GGATTGAGGCCTCCACTAAG	This study
AKyhmA-RT-R	GCAATACCACCGACCATAACC	This study
AKctpA-RT-F	GGTTCGTCGCCTTCGATTGG	This study
AKctpA-RT-R	GCTCTCAAATGGAGTAACGGC	This study
AKwetA-RT-F	ACTCCAGTGTGGATGGCAAC	This study
AKwetA-RT-R	CACAGTCGCTGGACAATGAC	This study
AKactA-RT-F	GGTATGGGTCAGAAGGACTC	37
AKactA-RT-R	CTCCATGTCATCCCAGTTTCG	37

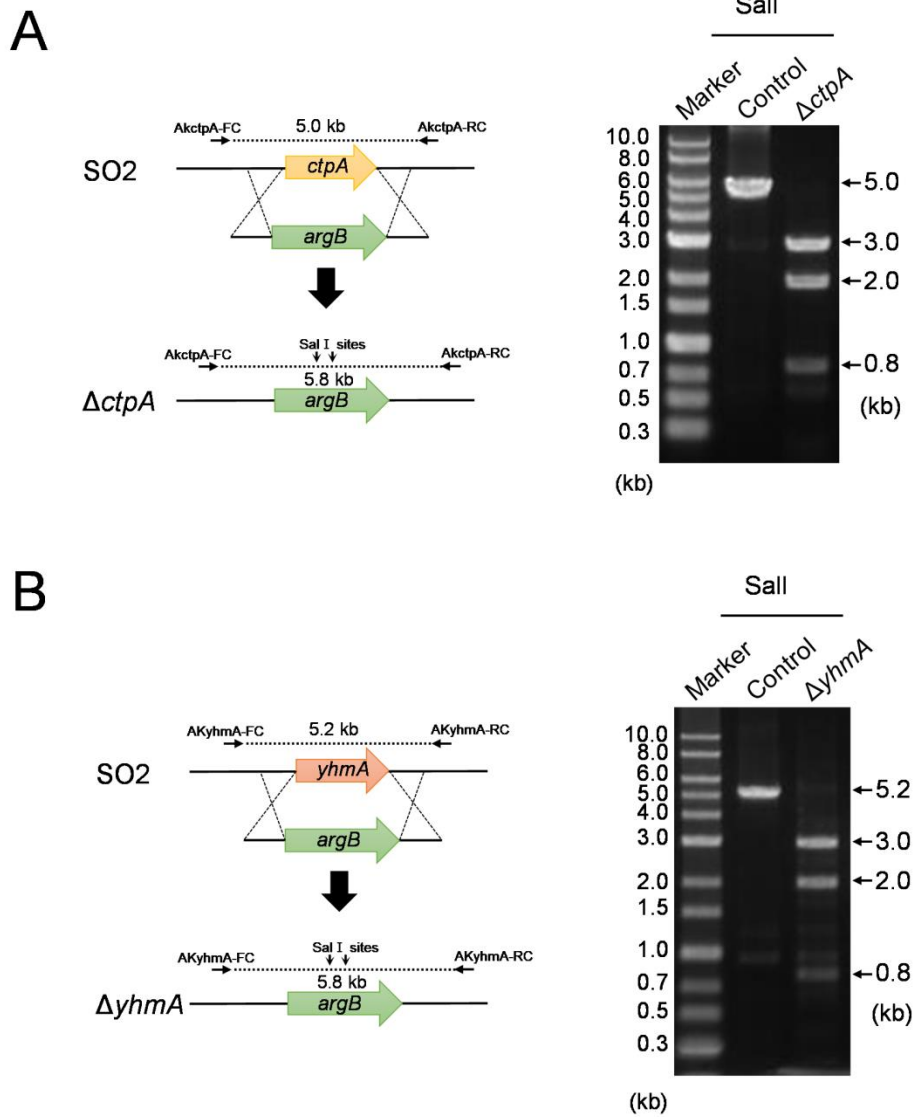
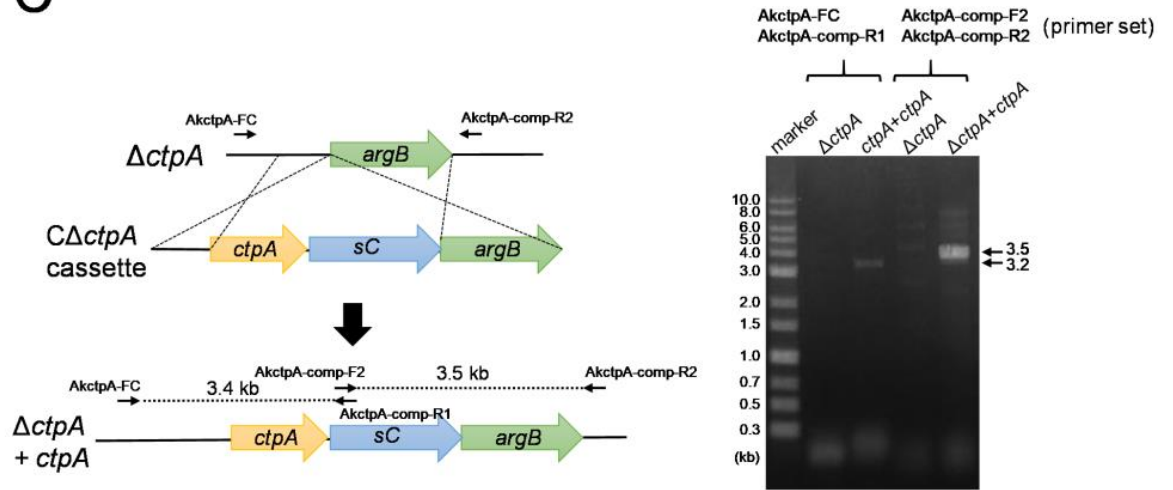
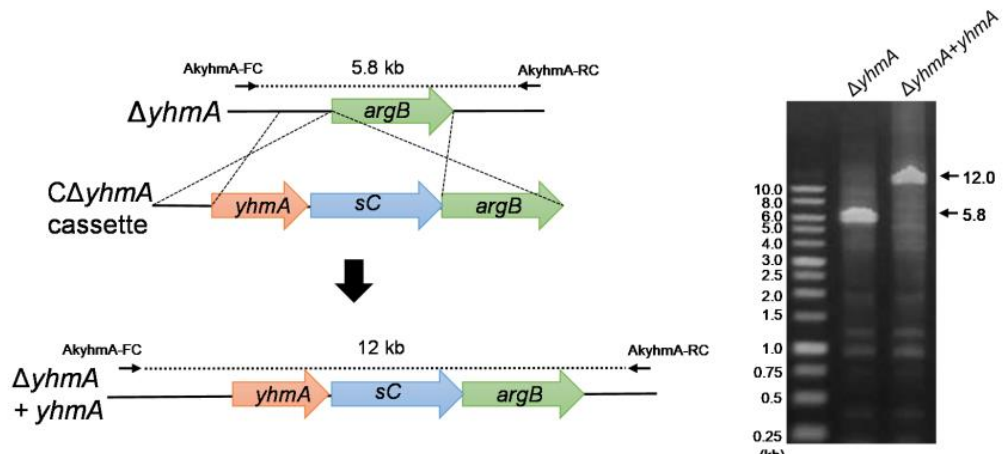


Figure 3.1. Construction of *A. kawachii* strains used in this study. Disruption of *ctpA* (A) and *yhmA* (B), complementation of *ctpA* (C) and *yhmA* (D), and disruption of *yhmA* (E). Results of electrophoretic analyses of the PCR products are shown in the panels to the right (A-E).

C



D



E

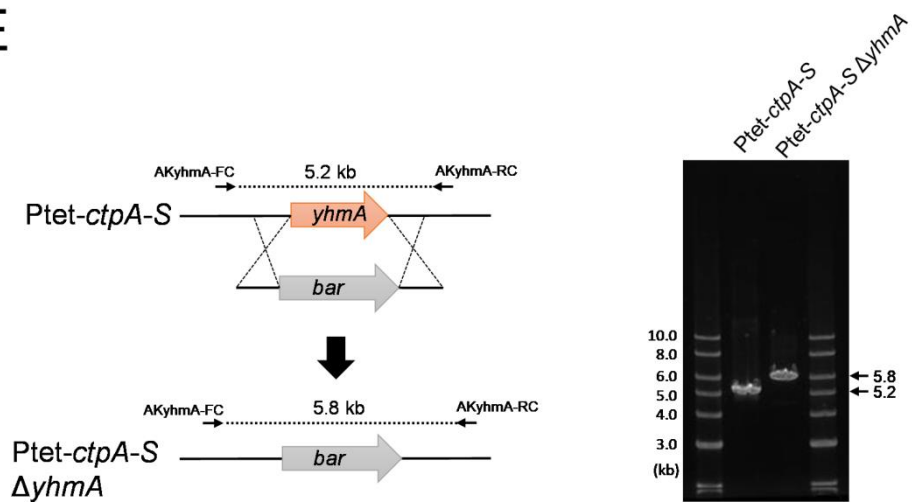


Figure 3.1 (continued).

(3) *ctpA* および *yhmA* 相補株の構築

ctpA および *yhmA* の 5'-UTR (2 kbp) から ORF (1.4 kbp) とマーカー遺伝子 *sC* (4.2 kbp) および破壊株における 3'末端の相同領域である *argB* (1.8 kbp) を PCR により増幅した。プライマーセットは AKxxxx-FC/AKxxxx-comp-R1 および AKxxxx-comp-F2/AKxxxx-comp-R2 (xxx は *ctpA* および *yhmA* に相当)、鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA および、*sC-argB* をクローニングしたプラスミドを用いた。Fusion PCR により、各断片を連結後、AKxxxx-F1/AKxxxx-comp-R2 を用いて増幅した相補カセットを破壊株に導入した。形質転換体は methionine を含有しない最少培地により選択した。また、形質転換体の確認を、AkctpA-FC/AkctpA-comp-R2, AkctpA-comp-F2/AkctpA-RC および、AkyhmA-FC/AkyhmA-RC を用いたコロニーPCR による増幅サイズを確認した (Fig. 3.1CD)。

(4) CtpA-S および YhmA-S 発現株の構築

Tet-On プロモーターを含む pVG2.2⁶¹)を発現ベクターに使用した。まず、pVG2.2 の *pyrG* 遺伝子を Asc I 処理により除去し、*A. nidulans* 由来 *sC* 遺伝子に置換した。また、相同領域として AKAW_01302 と AKAW_01303 の遺伝子間領域をベクターに組み込んだ。*sC* および、AKAW_01302 と AKAW_01303 の遺伝子間領域の増幅には、それぞれプライマーセット pVG2.2ANsC-inf-F1/ pVG2.2ANsC-inf-R1 と pVG2.2ANsC-inf-F2/ pVG2.2ANsC-inf-R2、PCR の鋳型として *A. nidulans* のゲノム DNA と NBRC4308 のゲノム DNA を使用した。各増幅断片を Asc I 処理した pVG2.2 に In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いてクローニングし、pVG2.2ANsC ベクターを作成した。

次に、pVg2.2ANsC を Pme I 処理により線状化し、*ctpA-S* および *yhmA-S* をクローニングした。PCR にはプライマーセット pVG2.2ANsC-ctpA-S-inf-F/pVG2.2ANsC-ctpA-S-inf-R および、pVG2.2ANsC-yhmA-S-inf-F/pVG2.2ANsC-yhmA-S-inf-R を用いた。

最後に、作成した pVG2.2AnsC-ctpA-S および、pVG2.2AnsC-yhmA-S を Δ ctpA、 Δ yhmA に導入し、Ptet-ctpA-S および Ptet-yhmA-S 株を構築した。形質転換体は methionine を含有しない最少培地により選択した。また、ドキシサイクリン (Dox) 添加による CtpA-S および、YhmA-S の条件発現の確認は抗 S-tag 抗体 (Medical and Biological Laboratories) を用いて行った (Fig. 3.2)。

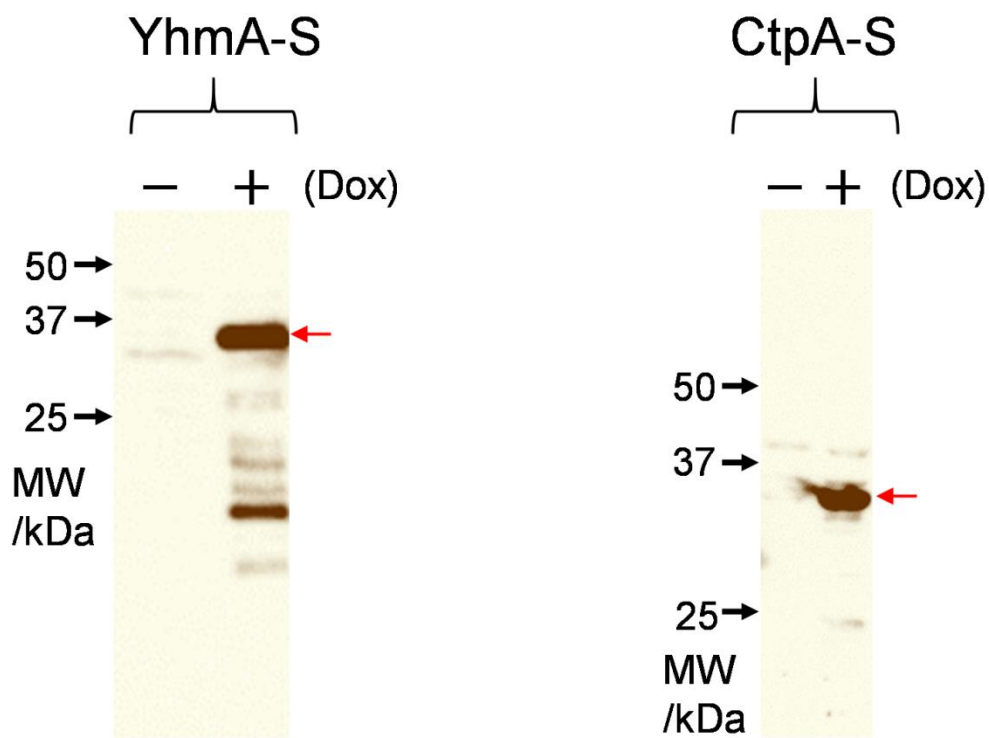


Figure 3.2. Immunoblot analysis to assess the expression levels of CtpA-S and YhmA-S under control of the Tet-On promoter. The Ptet-ctpA-S and Ptet-yhmA-S strains were cultivated in M medium with or without 20 μ g/ml doxycycline (Dox). Protein concentrations were determined using the Bradford Protein Assay kit (Bio-Rad). A total of 10 μ g of each crude cell extract was subjected to SDS-PAGE on a 10% acrylamide separating gel and then blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for immunoblot analysis. CtpA-S and YhmA-S were detected using an anti-S-tag antibody (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) and Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Bands of the predicted molecular weights of CtpA-S and YhmA-S are indicated by red arrows. The apparent molecular masses were 36 kDa (YhmA-S) and 34.5 kDa (CtpA-S). The results confirmed that the expression levels of CtpA-S and YhmA-S in M medium were significantly higher with Dox than without Dox.

(5) Ptet-*ctpA*-S Δ *yhmA* 株の構築

Δ *yhmA* において、*ctpA* を発現制御できる株を構築するため、Ptet-*ctpA*-S 株において *yhmA* を破壊した。相同領域として *yhmA* の 5'-UTR と 3'-UTR（それぞれ 2 kbp）および、マーカー遺伝子として *bar*（1.8 kbp）を PCR により増幅した。プライマーセットは AKyhmA-FC/AKyhmA-bar-R1、AKyhmA-bar-F2/AKyhmA-bar-R2、および AKyhmA-bar-F3/AKyhmA-RC、鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA、*bar* 遺伝子を含むプラスミド（メルボルン大学 Michael J. Hynes 博士より提供）を用いた。Fusion PCR により各断片を連結した後、AKyhmA-F1/AkyhmA-R3 を用いて破壊カセットを増幅し、形質転換を行った。形質転換体は除草剤のバスタ（Bayer Crop Science）より精製したグルホシネートを含む最少培地により選択した。また、形質転換体の確認は、AKyhmA-FC/AkyhmA-RC を用いたコロニーPCR の増幅サイズにより確認した（Fig. 3.1E）。

(6) CtpA-GFP および YhmA-GFP 発現株の構築

白麴菌由来の *sC* 遺伝子を含むプラスミド pGS⁴⁵) を発現ベクターとして使用した。*ctpA* および *yhmA* のプロモーターを含む ORF 領域（終止コドンを除く）と *gfp* をプライマーセット pGS-xxxx-*gfp*-inf-F1/pGS-xxxx-*gfp*-inf-R1 と pGS-xxxx-*gfp*-inf-F2/pGS-*gfp*-inf-R および、鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA および、プラスミド pFNO3⁶²) を用いて増幅した。pGS を Sal I で処理し、各断片を In-Fusion HD cloning kit（Takara Bio）を用いてクローニングした。

(7) 蛍光顕微鏡観察

CtpA-GFP および、YhmA-GFP 株を最少培地または CAP 培地でそれぞれ 12 h または 14～20 h 培養した後、MitoTracker red CMXRos（Thermo Fisher Scientific）を終濃度 500 nM で添加し、40 min 培養した。最少培地または CAP 培地で 3 回洗浄した後、DMI6000B inverted-type fluorescence microscope（Leica Microsystems）を用いて観察した。画像解析には LAS AF Lite software, version 2.3.0, build 5131（Leica Microsystems）を用いた。

(8) 出芽酵母 *yhm2* 破壊株の構築

出芽酵母における *yhm2* の破壊は *kanMX* の挿入によって行った。相同領域として *yhm2* 遺伝子の 5'-UTR および 3'-UTR をそれぞれ 45 bp 付加したプライマーセット SCyhm2-del-F/SCyhm2-del-R および、鋳型としてプラスミド pUG6⁶³⁾ を使用して破壊カセットを増幅し、形質転換を行った。形質転換体は 200 µg/ml の G418 (ナカライテスク) を含有する YPD 培地において選択した。

(9) 出芽酵母における *yhm2* および *yhmA* 相補株の構築

TRP1 遺伝子を含むプラスミド YCplac22⁶⁴⁾ を相補プラスミドとして使用した。まず、*YHM2* の 5'-UTR (0.6 kbp)、OFR (0.9 kbp)、3'-UTR (0.1 kbp) をプライマーセット YCplac22-*yhm2*-inf-F/YCplac22-*yhm2*-inf-R を用いて増幅し、Sal I で処理した YCplac22 に In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いてクローニングした。

次に、*YHM2* の 5'-UTR (0.6 kbp) と *yhmA* をプライマーセット YCplac22-*yhm2*-inf-F/YCplac22-*yhmA*-inf-R1、YCplac22-*yhmA*-inf-F2/YCplac22-*yhmA*-inf-R2 を用いて増幅した。*yhmA* の鋳型には NBRC4308 の cDNA を使用した。cDNA の調整には、RNA の抽出に RNAiso plus (Takara Bio) を使用し、逆転写に SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。各増幅断片を Sal I で処理した YCplac22 に In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いてクローニングした。その後、YCplac22-*YHM2* および、YCplac22-*yhmA* を $\Delta yhm2$ 株に導入した。形質転換体は tryptophan を含有しない SC 培地によって選択した。

(10) CtpA-S および YhmA-S の精製

S-tag/S-protein アフィニティーによるシングルステップ精製法⁶⁵⁾ を用いて、白麹菌より CtpA-S と YhmA-S を精製した。20 µg/ml の Dox を含む最少培地で Ptet-*ctpA*-S および Ptet-*yhmA*-S 株を 163 rpm、30°C で 36 h 培養し、集菌後、液体窒素存在下で乳鉢と乳棒を用いて菌体を破碎した。1 g の菌体に対し 13 ml の extraction buffer (25 mM HEPES [pH 6.8], 300

mM NaCl, 0.5% NP-40, 250 μ g/ml of phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], cOmplete [EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche, Basel, Switzerland]) を加え、ボルテックスを行った。不溶性画分を 1,000 \times g、5 min、4°C で除去し、その後上清を 18,800 \times g、15 min、4°C で遠心分離を行った。さらに上清を 4°C で 2 h スターラーバーを用いて攪拌した。その後上清に S-protein agarose (Merck Millipore) を加え、回転盤を用いて 4°C で 1 h 緩やかに混合した。500 \times g、5 min で S-protein agarose を回収し、extraction buffer (0.2% NP-40 and 50 μ g/ml PMSF を含有) で 1 回洗浄し、その後 wash buffer (25 mM HEPES [pH 6.8], 300 mM NaCl, 20 μ g/ml PMSF, cOmplete [Roche]) で 5 回洗浄した。さらに、elution buffer (25 mM HEPES [pH 6.8], 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 3 M MgCl₂·7H₂O) を加えて、37°C、10 min インキュベートした。溶出した酵素液を Vivacon 500 ultrafiltration units (Sartorius) を用いて、脱塩・濃縮し、その後、Qubit protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。さらに、精製の度合いを SDS-PAGE および銀染色により解析した (Fig. 3.3)。

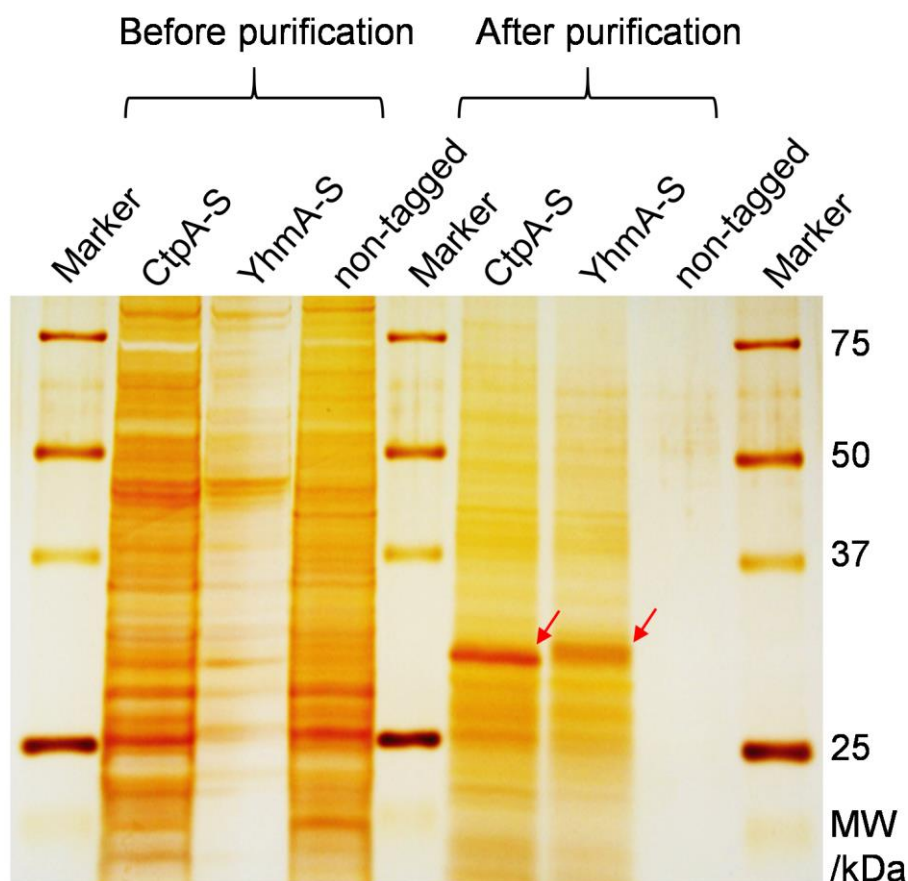


Figure 3.3. SDS-PAGE of CtpA-S and YhmA-S proteins from *Aspergillus kawachii* before and after purification. A Silver Stain Mass Spectrometry kit (Wako, Osaka, Japan) was used to detect proteins. After purification, the predicted molecular weights of the proteins were confirmed (indicated by red arrows). The apparent molecular masses were 36 kDa (YhmA-S) and 34.5 kDa (CtpA-S). Successful purification of target proteins was also confirmed by LC-MS/MS analysis. Bands were excised from the gel and analyzed on an EASY-nLC system equipped with an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The data were analyzed using Proteome Discoverer software, version 1.3 (Thermo Fisher Scientific).

(11) 輸送活性測定

CtpA-S および YhmA-S の各種有機酸を内包したプロテオリポソームを Freeze-thaw sonication 法により調整した⁶⁶⁾。100 mg の L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (ナカライテスク) を buffer G [10 mM PIPES, 50 mM NaCl, and 1 mM organic acids (oxaloacetate, succinate, *cis*-aconitate, citrate, 2-oxoglutarate, or malate)] により懸濁し、プローブ式のソニケーター Sonifier 250A (Branson Ultrasonics) により超音波処理し、リポソームを調整した。その後、500 μ l のリポソームに 500 ng の CtpA-S または YhmA-S を加え、直ちに液体窒素で凍結し、再融解して、超音波処理を行うことでプロテオリポソームを調整した。その後、リポソーム外の基質を Bio Spin 6 columns (Bio-Rad) を用いて除去した。酵素反応は、1 mM [1,5-¹⁴C]citrate (18.5 kBq; PerkinElmer) を添加後、37°C で 30 min 行い、反応終了後、リポソーム外の基質を Bio Spin 6 columns (Bio-Rad) を用いて除去した。Ultima Gold scintillation cocktail (PerkinElmer) を混合し、Tri-Carb 3180TR/SL liquid scintillation analyzer (PerkinElmer) を用いてリポソーム内部の放射活性を測定した。

(12) 細胞外・細胞内の有機酸濃度の測定

100 ml の最少培地に白麴菌の分生子 2.0×10^7 を接種し、180 rpm、30°C、36 h 培養した (Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は 1 μ g/ml の Dox を添加して培養した)。その後、菌体を 50 ml の CAP 培地に移し、163 rpm、30°C、48 h 培養した。培養上清は 0.2- μ m-pore-size PTFE filter (東洋濾紙) に通し、細胞外画分とした。菌体は集菌後、液体窒素存在下で乳鉢乳棒を用いて破碎した。菌体 1 g に対し 10 ml の熱水 (80°C) を加え、ボルテックスを行い、138,000 \times g、4°C、30 min で遠心分離を行った。上清を回収し、0.2- μ m-pore-size PTFE filter に通し、細胞内画分とした。

有機酸濃度は Prominence HPLC system (Shimadzu) と CDD-10AVP conductivity detector (Shimadzu) により定量した。有機酸の分離は 50°C でタンデムに連結した Shim-pack SCR-102H columns (300 by 8mm [inside diameter]; Shimadzu) を用いた。移動層として 4 mM

p-toluenesulfonic acid monohydrate を、反応液として postcolumn reaction solution (4 mM *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, 16 mM bis-Tris, and 80 μM EDTA) を流速 0.8 ml/min の条件で行った。

(13) 細胞内アミノ酸濃度の測定

アミノ酸濃度は Prominence HPLC system (Shimadzu) と fluorescence detector (RF-10AXL, Shimadzu) を用いた蛍光法で行った。アミノ酸の分離は 60°C で Shim-pack Amino-Na column (100 by 6.0mm [inside diameter]; Shimadzu) で行った。移動層として amino acid mobile phase kit, Na type (Shimadzu) を流速 0.6 ml/min の条件で行った。この時 amino acid reaction kit (Shimadzu) を流速 0.2 ml/min の条件で流し、分離したアミノ酸と反応させた。アミノ酸は蛍光波長 350 または 450 nm で検出した。

(14) 細胞内アセチル-CoA 濃度の測定

クエン酸生産条件のサンプルは上記と同様の条件で培養したものをを用いた。Ptet-*ctpA*-S $\Delta yhmA$ 株は 1 μg/ml の Dox を添加した最少培地で前培養 (180 rpm, 30°C, 36 h) した後、最少培地または最少培地に 1 μg/ml の Dox、0.5% の lysine、または Sodium Acetate を添加した培地で 12~48 h 培養した。集菌した後、破碎し、100 mg の菌体に対し氷冷した 1 M の過塩素酸を添加した。ボルテックスした後、遠心 (10,000×g, 15 min, 4°C) し、上清を回収した。上清に 2 N KOH を加え、pH を 7 に調整した後、PicoProbe acetyl-CoA assay kit (Fluorometric) (Abcam) のプロトコルに従ってサンプルを調整した。蛍光強度は Infinite M200 FA (Tecan) を用いて測定し、アセチル-CoA 濃度を定量した。

(15) Real time RT-PCR

菌体からの RNA 抽出のため、100 ml の最少培地に白麴菌の分生子 (2.0×10^7) を接種し、180 rpm でそれぞれ 24, 30, 36, 48, 60, 72 h 培養した。分生子からの RNA 抽出には、分生子 (2.0×10^5) を最少寒天培地に塗布し、30°C で 5 日間培養した後に回収した分生子を用いた。菌体および、分生子を液体窒素の存在下で破碎し、RNAiso plus を用いて RNA を調整した。

NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA の濃度および純度を測定した後、PrimeScript Perfect real-time reagent kit (TaKaRa Bio) を用いて cDNA を調整した。Real time RT-PCR は Thermal Cycler Dice real-time system MRQ (TaKaRa Bio) および、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio) を用いて行った。プライマーセットは *yhmA* の測定に AKyhmA-RT-F/AKyhmA-RT-R を、*ctpA* の測定に AKctpA-RT-F/AKctpA-RT-R を、*wetA* の測定に AKwetA-RT-F/AKwetA-RT-R を、*actA* の測定に AKactA-RT-F/AKactA-RT-R を用いた。

3.3 結果

(1) CtpA と YhmA のアミノ酸配列

白麴菌の CtpA と YhmA はそれぞれ 296、299 のアミノ酸からなるタンパク質である。いずれも 6 回膜貫通ドメインと、ミトコンドリアキャリアタンパク質の共通配列である 3 つの P-X-(D/E)-X-X-(R/K)配列を有していた^{67,68,69)} (Fig. 3.4)。

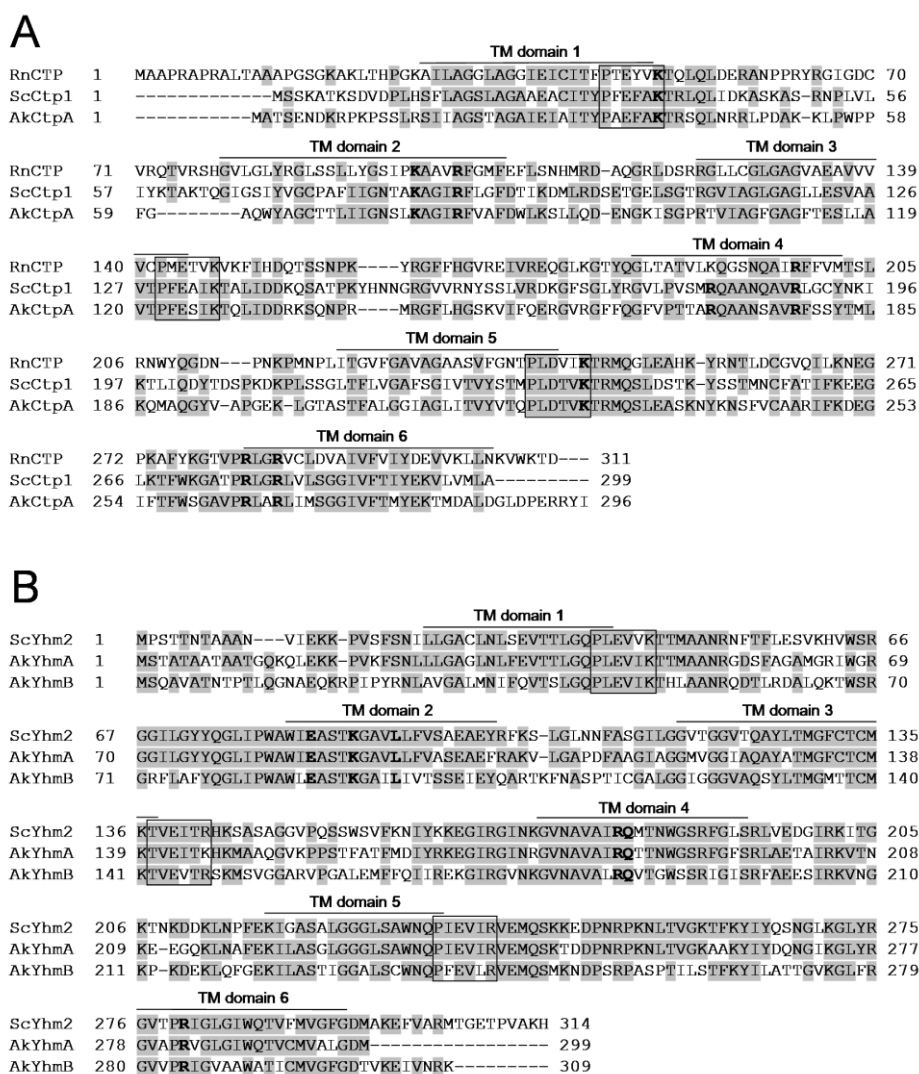


Figure 3.4. Aligned amino acid sequences of citrate transporters prepared with the ClustalW program using the BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Sequences of rat (*Rattus norvegicus*) CTP, *Saccharomyces cerevisiae* Ctp1, and *Aspergillus kawachii* CtpA (A) and *S. cerevisiae* Yhm2 and *A. kawachii* YhmA and YhmB (B). Putative transmembrane (TM) domains are indicated by lines. The P-X-(D/E)-X-X-(R/K) sequences conserved among mitochondrial carrier proteins (1) are shown in boxes. Amino acids related to citrate binding are indicated in bold font.

白麴菌の CtpA と出芽酵母の Ctp1、白麴菌の CtpA とラットの CTP、および白麴菌の YhmA と出芽酵母 Yhm2 のアミノ酸配列の identity はそれぞれ 47、37、71%であった。出芽酵母の Ctp1 におけるクエン酸結合ドメイン (site I [K83, R87, and R189] and site II [K37, R181, K239, R276, and R279]) は白麴菌の CtpA にも保存されていた^{70,71)}。また出芽酵母の Yhm2 における基質結合ドメインである (site I [E83, K87, and L91], site II [R181 and Q182], and site III [R279]) も白麴菌の YhmA において保存されていた^{69,72)} (Fig. 3.4)。

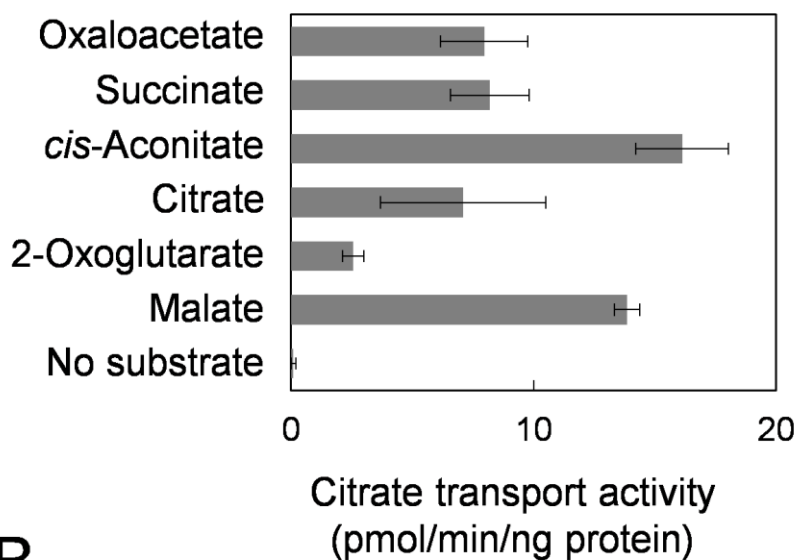
白麴菌のゲノム上には *yhmA* の他にもう一つの *yhm2* ホモログと推定される *yhmB* (AKAW_02589) が保存されていた。YhmB は 309 アミノ酸からなるタンパク質で、出芽酵母の Yhm2 とのアミノ酸配列の identity も 53%であった。また、基質結合ドメインである site I および、site II も保存されていたため、ミトコンドリアキャリアタンパク質としての機能を持つことが推測された。しかしながら、*yhmB* は製麴工程中において発現が確認されず³⁷⁾、また、破壊株も表現型がみられなかったため (data not shown)、本研究の解析対象から除いた。

(2) CtpA と YhmA のクエン酸輸送活性

白麴菌の Ptet-*ctpA-S* 株および Ptet-*yhmA-S* 株より、それぞれ CtpA-S と YhmA-S を精製した。なお、これらの株において Tet-On プロモーターの制御下で CtpA-S と YhmA-S を発現制御できることを確認した (Fig. 3.2)。精製した CtpA-S および YhmA-S をリボソームに再構成し、単輸送 (対向基質無し) および、対向輸送 (oxaloacetate, succinate, *cis*-aconitate, citrate, 2-oxoglutarate, or malate) 時における ¹⁴C citrate の輸送活性を測定した (Fig. 3.5)。その結果、CtpA-S および YhmA-S は単輸送の条件においては、輸送活性を検出できなかった。また、対向輸送条件では、CtpA-S は oxaloacetate、succinate、citrate、2-oxoglutarate と比較して、malate および、*cis*-aconitate に対して高い基質特異性を示した。加えて、CtpA-S は 2-oxoglutarate に対する輸送活性が最も低いことが示唆された。一方、YhmA-S は

2-oxoglutarate、malate、citrate、*cis*-aconitate、succinate の基質に対して幅広い基質特異性を示したが、その中でも oxaloacetate に対する輸送活性が最も低いことが示唆された。

A



B

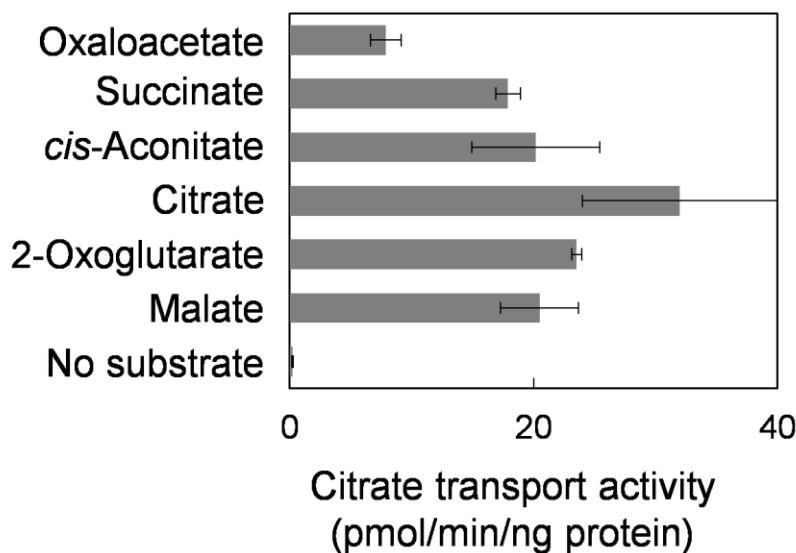


Figure 3.5. Citrate transport activity of (A) CtpA-S and (B) YhmA-S. CtpA-S or YhmA-S reconstituted proteoliposomes were preloaded with or without 1 mM internal substrate (oxaloacetate, succinate, *cis*-aconitate, citrate, 2-oxoglutarate, or malate). The exchange assay was initiated by adding 1 mM [¹⁴C]-citrate (18.5 kBq) to the exterior of the proteoliposomes and terminated after 30 min. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent measurements.

(3) *ctpA* および *yhmA* 破壊株の表現型

CtpA と *YhmA* の生理的役割を解析するため、各破壊株を構築した。 $\Delta ctpA$ 株は 25、30°C の条件で生育遅延を示した (Fig. 3.6A)。この表現型は 37、42°C の条件で回復傾向がみられた。この表現型は *A. niger* における $\Delta ctpA$ 株が低温感受性を示すという知見と一致した³⁵⁾。一方で、 $\Delta yhmA$ 株は全ての温度帯においてコントロール株と比較して生育遅延を示した (Fig. 3.6A)。

次に、各株の分生子形成能について比較した (Fig. 3.6B)。最少培地において 4 日間培養後、分生子懸濁液を調整し、コロニー面積あたりの分生子数を比較した。その結果、 $\Delta ctpA$ 株および $\Delta yhmA$ 株の分生子数はコントロール株の約 30% 程度であったため、*CtpA* と *YhmA* は分生子形成において重要な役割をもつことが示唆された。なお、これらの表現型は各遺伝子の相補により回復した。

次に、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊株の構築を試みたが、破壊株は全てヘテロカリオン体であった (data not shown)。そこで、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊株が合成致死となる可能性が考えられたため、 $\Delta yhmA$ 株において、Tet-On システムを用いた *ctpA* のコンディショナル発現株 (Ptet-*ctpA*-S $\Delta yhmA$ 株) を構築した。Ptet-*ctpA*-S $\Delta yhmA$ は Dox の添加条件ではコロニーを形成できるものの、未添加条件では深刻な生育遅延を示したため、白麹菌において最少培地上における *ctpA* と *yhmA* の二重破壊は合成致死となることが示唆された (Fig. 3.6C)。

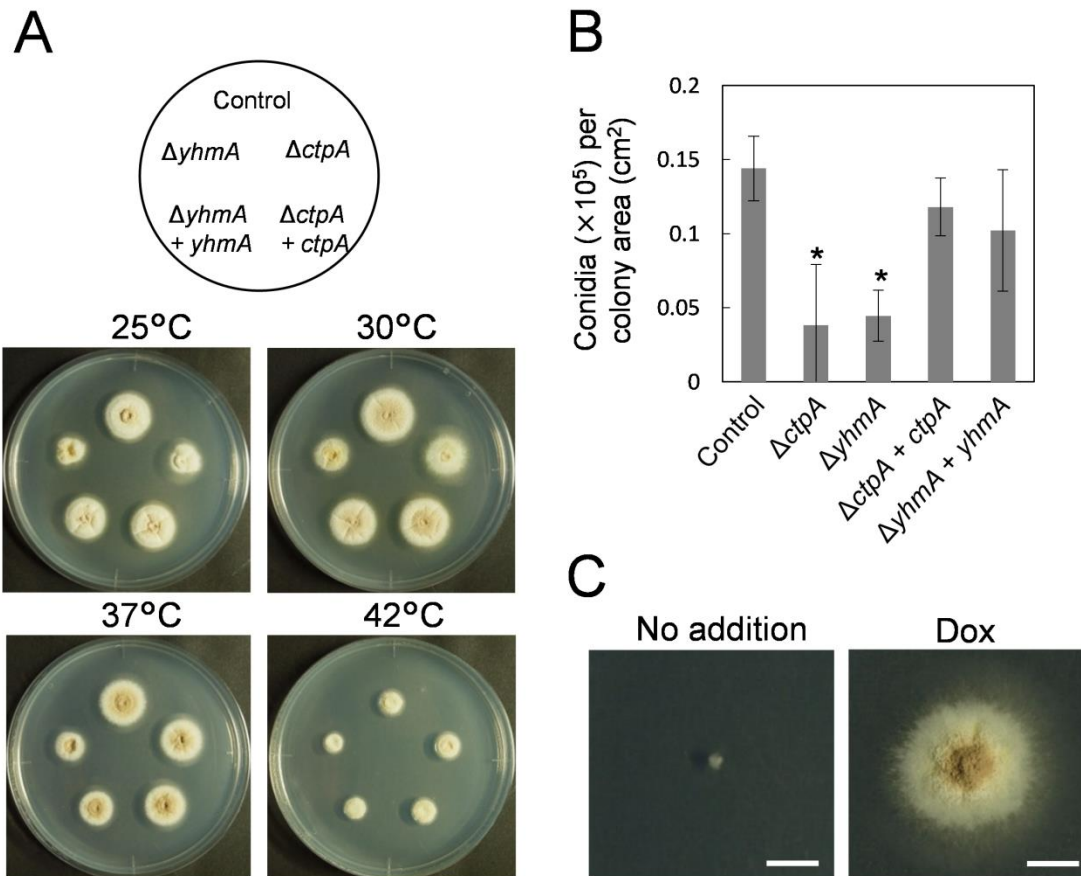


Figure 3.6. (A) Morphology of *A. kawachii* colonies. Conidia (10^4) were inoculated onto M agar medium and incubated for 4 days. (B) Conidia formation on M agar medium. Conidia (10^4) were inoculated onto M agar medium. After 5 days of incubation at 30°C, newly formed conidia were suspended in 0.01% (wt/vol) Tween 20 solution and counted using a hemocytometer. The mean and standard deviation of the number of conidia formed were determined from the results of 3 independently prepared agar plates. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's *t*-test) relative to the result for the control strain. (C) Colony formation of the *A. kawachii* Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ strain. Conidia (10^4) were inoculated onto M agar medium with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox and incubated at 30°C for 5 days. Scale bars indicate 1 cm.

(4) 各株における細胞外・細胞内の有機酸濃度の比較

クエン酸高生産における CtpA と YhmA の役割を明らかにするため、各株を最少培地で前培養した後、CAP 培地で 48 h 培養し、有機酸の生産性を評価した。なお、Ptet-*ctpA*-S Δ *yhmA* 株は最少培地において生育できないため、まず Dox を添加した最少培地で前培養した後、Dox を添加していない CAP 培地で培養した。

HPLC 解析により、細胞外の有機酸として、主要な有機酸であるクエン酸の他に、リンゴ酸、2-オキシグルタル酸を定量した (Fig. 3.7A)。 Δ *ctpA* 株はコントロール株と比較して、約 3.3 倍の 2-オキシグルタル酸を生産した。一方、 Δ *yhmA* 株はクエン酸生産量が 0.24 倍に低下し、2-オキシグルタル酸生産量が 1.6 倍に増加した。また、Ptet-*ctpA*-S Δ *yhmA* 株はクエン酸生産量が 0.06 倍に低下し、リンゴ酸生産が 2.9 倍に増加、2-オキシグルタル酸生産量が 20 倍に増加した。

細胞内画分においても同様に、クエン酸、リンゴ酸、2-オキシグルタル酸を定量した (Fig. 3.7B)。 Δ *ctpA* 株と Δ *yhmA* 株において、細胞内クエン酸濃度に有意な変化はみられなかった。しかし、 Δ *ctpA* 株はコントロール株と比較してリンゴ酸濃度が 0.58 倍に低下し、 Δ *yhmA* 株ではリンゴ酸濃度が 0.46 倍、2-オキシグルタル酸濃度が 0.5 倍に低下した。さらに、Ptet-*ctpA*-S Δ *yhmA* 株では、クエン酸濃度が 0.18 倍、リンゴ酸濃度が 0.35 倍、2-オキシグルタル酸が 0.18 倍に減少した。

以上の結果から、CtpA と YhmA は細胞内外の有機酸生産において重要な役割があることが示唆された。また、細胞外クエン酸生産量はリンゴ酸、2-オキシグルタル酸生産量と負の相関がある傾向がみられた。*ctpA* と *yhmA* の二重破壊条件により、細胞外・細胞内のクエン酸のクエン酸濃度がさらに低下したことから、クエン酸生産における CtpA と YhmA の機能には冗長性があることが示唆された。

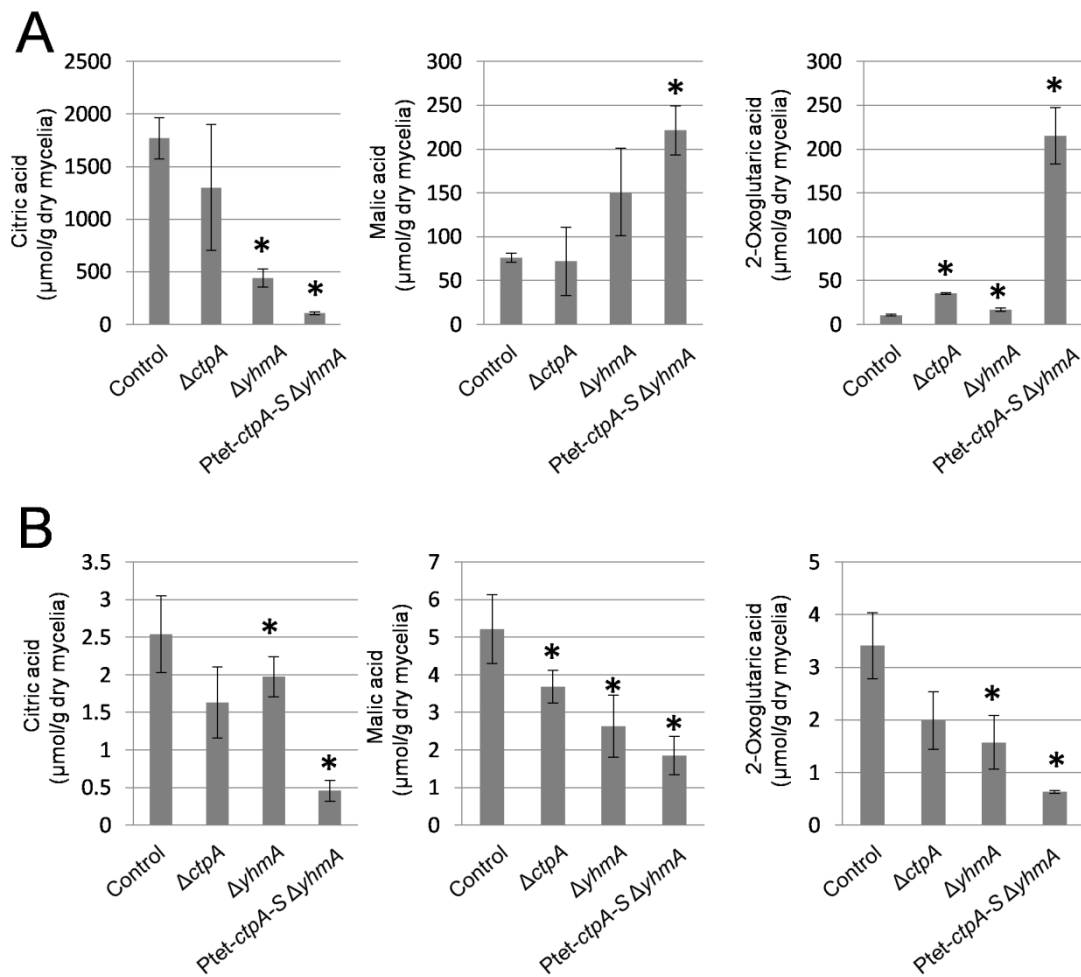


Figure 3.7. (A) Extracellular and (B) intracellular organic acid production by *A. kawachii* strains. The control, $\Delta ctpA$, $\Delta yhmA$, and Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ strains were pre-cultured in M medium for 36 h, then transferred to CAP medium and further cultivated for 48 h. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's *t*-test) relative to the result for the control strain.

(5) *ctpA* と *yhmA* の転写レベルの比較

生育過程における *ctpA* と *yhmA* の転写レベルを調べるため、各 growth phase における RNA を抽出し、real time RT-PCR により定量した。まず、液体最少培地を用いた各培養時間における凍結乾燥重量を測定した (Fig. 3.8A)。菌体重量に基づいて、24 h が lag phase、24~30 h が early log phase、30~36 h が later log phase、36~60 h が stationary phase であることが示唆された。また、分生子からの RNA 抽出について、分生子において特異的に発現する *wetA* 遺伝子⁷³⁾を定量することで評価した。分生子の *wetA* の転写量は菌体と比較して 13 倍高く、分生子から RNA を抽出できていることが確認された (Fig. 3.8B)。

次に、各 growth phase と分生子における *ctpA* と *yhmA* の転写量について比較した (Fig. 3.8C)。最少培地における *ctpA* の転写量は各 growth phase において一定であったが、分生子において顕著に転写量が増加することが示唆された。また、*yhmA* は 48~60 h の stationary phase において転写が促進されることが示唆された。一方、分生子における *yhmA* の転写量は菌体における lag、log phase と同レベルであった。

また、最少培地と CAP 培地における転写量の比較を行った (Fig. 3.8D)。その結果、*ctpA* と *yhmA* はいずれも、最少培地と比較して CAP 培地において転写量が高いことが示唆された。

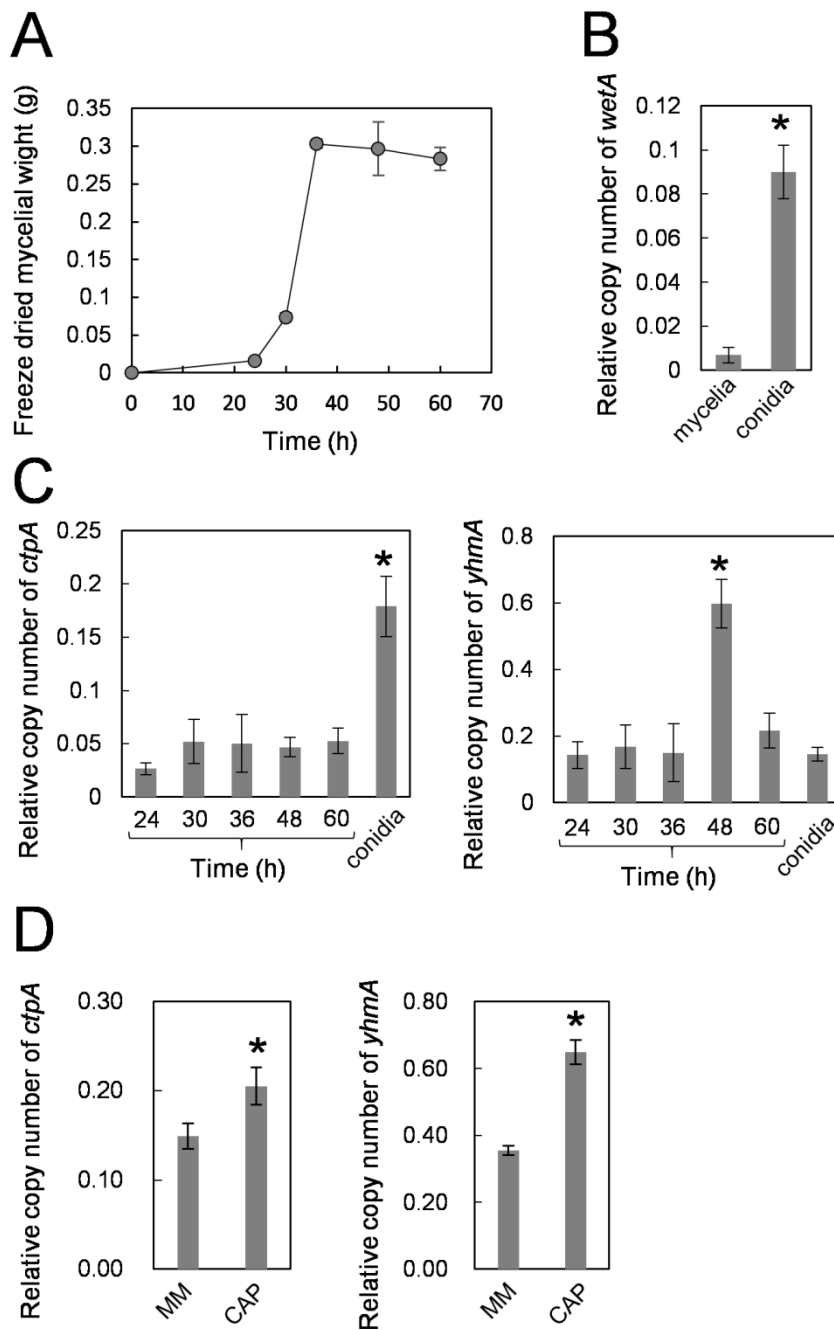


Figure 3.8. (A) Growth curve of *A. kawachii* in M liquid medium at 30°C. (B) Comparison of relative expression level of *wetA* in mycelia (stationary phase at 36 h) and conidia. (C) Comparison of relative expression levels of *ctpA* and *yhmA* in mycelia and conidia. (D) Comparison of relative expression levels of *ctpA* and *yhmA* in M medium and CAP medium. All results were normalized to the expression level of the actin-encoding gene, *actA*. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's *t*-test) relative to results obtained under other conditions.

(6) CtpA-GFP と YhmA-GFP の細胞内局在性

C 末端に GFP を融合させた CtpA-GFP および、YhmA-GFP を各破壊株で発現させ、細胞内局在を観察した。表現型観察の結果、CtpA-GFP および、YhmA-GFP は各破壊株の表現型を相補することが示唆された (Fig. 3.9A)。まず、最少培地における局在観察を行ったところ、YhmA-GFP 由来の緑色蛍光は MitoTracker red CMXRos 由来の赤色蛍光と重なったことから、YhmA-GFP はミトコンドリアに局在することが示唆された (Fig. 3.9B) 一方、CtpA-GFP の緑色蛍光は最少培地上において検出できなかった (data not shown)。*ctpA* と *yhmA* の転写量は CAP 培地で増加したことから (Fig. 3.8D)、次に CAP 培地での局在観察を行った。CAP 培地においては CtpA-GFP と YhmA-GFP のいずれも蛍光を検出でき、MitoTracker red CMXRos のシグナルと大部分が重なった (Fig. 3.9CD)。これらの結果から、CtpA-GFP と YhmA-GFP はミトコンドリアに局在することが示唆された。なお、抗 GFP 抗体を用いた YhmA-GFP のウエスタンブロットによって、細胞質画分にも YhmA-GFP の分解物と推定されるバンドが検出されていたことから (Fig. 3.10)、完全には重ならなかった原因は、分解物の蛍光シグナルによる可能性が考えられた。

抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、CtpA-GFP と YhmA-GFP はそれぞれ推定分子量 58.8 kDa と 61.1 kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 3.11)。また、どちらのタンパク質も最少培地と比較して CAP 培地においてより強い強度のバンドが検出されたため、クエン酸生産条件において、CtpA と YhmA はタンパク質レベルでも高発現することが確認された。

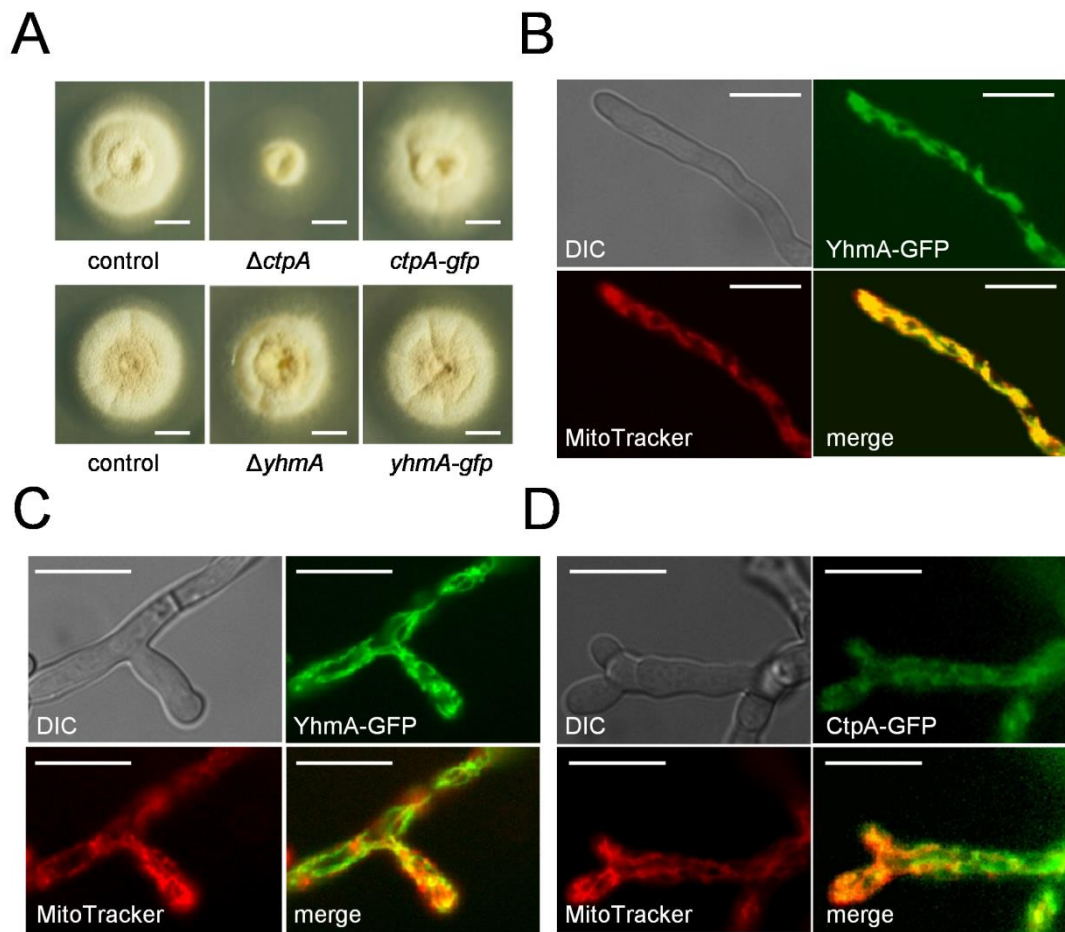


Figure 3.9. (A) Expression of CtpA-GFP and YhmA-GFP complement the phenotypes of the *A. kawachii* $\Delta ctpA$ and $\Delta yhmA$ strains, respectively. Control, $\Delta ctpA$, and $ctpA-gfp$ strains were grown on M agar medium at 25° C, whereas the control, $\Delta yhmA$, and $yhmA-gfp$ strains were grown on M agar medium at 30°C. Scale bars indicate 1 cm. Fluorescence microscopic observation of (B) YhmA-GFP in M medium and (C) in CAP medium and (D) CtpA-GFP in CAP medium. Scale bars indicate 10 μ m.

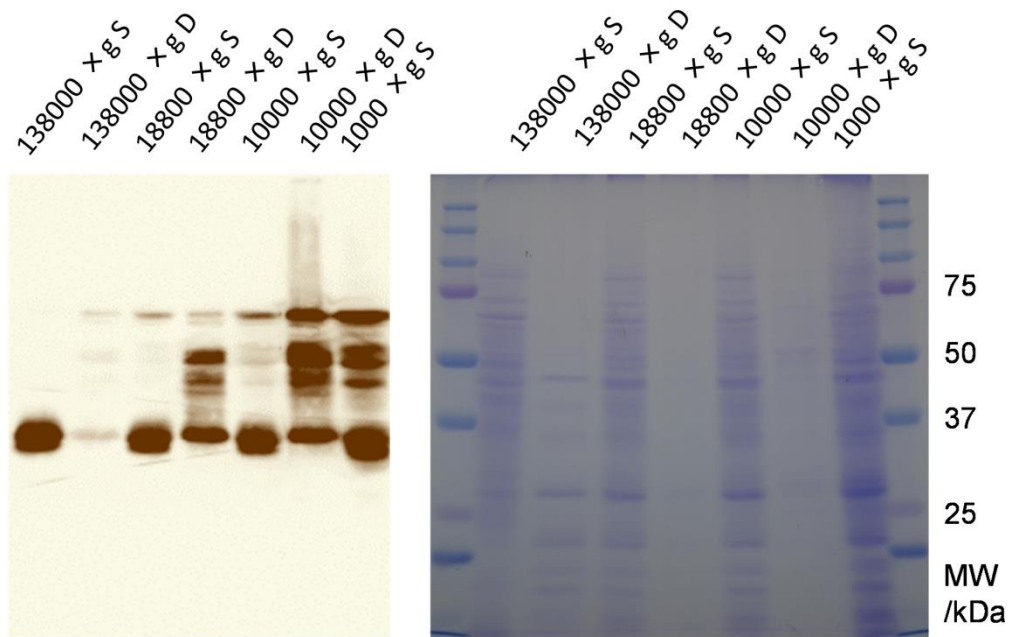


Figure 3.10. Immunoblot analysis separated organelle and cytosol fraction of *yhmA-gfp* strain. The *yhmA-gfp* strains were cultivated in M medium. Protein concentrations were not determined. A total of 10 μ l of each crude cell extract was subjected to SDS-PAGE on a 10% acrylamide separating gel and then blotted onto PVDF membranes for immunoblot analysis. YhmA-GFP was detected using an anti-GFP antibody (Roche, Basel, Switzerland) and Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). D and S mean debris and supernatant, respectively.

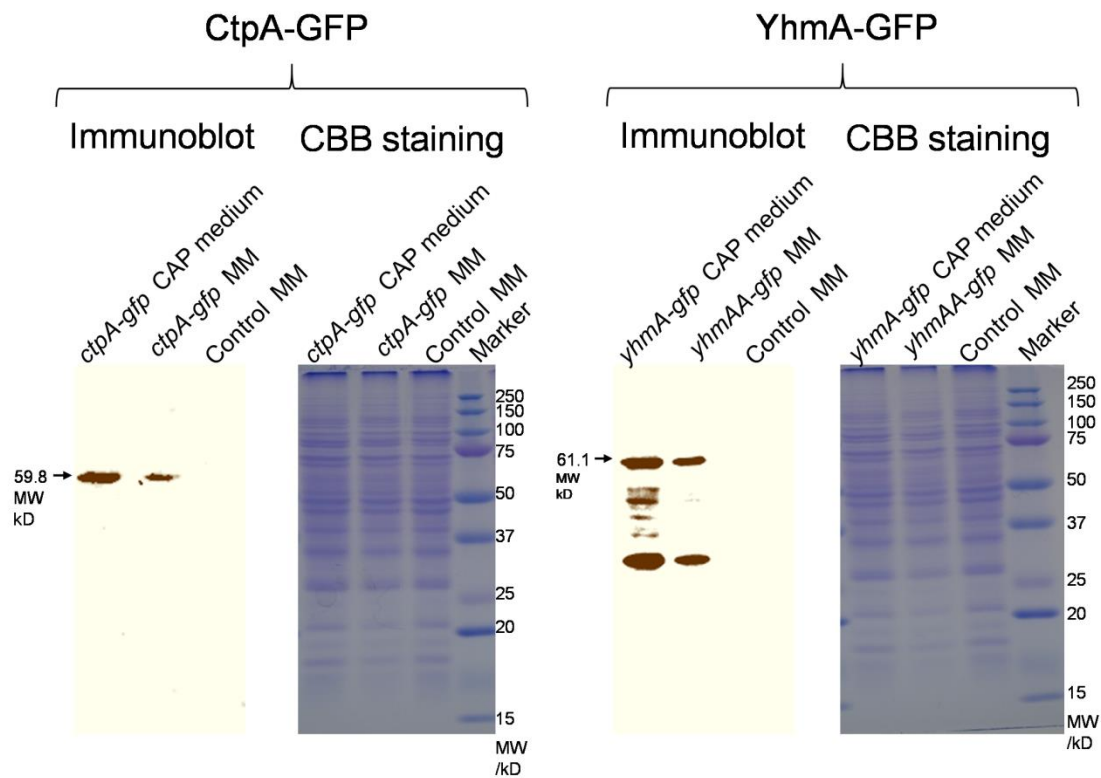


Figure 3.11. Immunoblot analysis to assess expression levels of CtpA-GFP and YhmA-GFP. The control, *ctpA-gfp*, and *yhmA-gfp* strains were cultivated in M medium or CAP medium. Protein concentrations were determined using the Bradford Protein Assay kit (Bio-Rad). A total of 10 μ g of each crude cell extract was subjected to SDS-PAGE on a 10% acrylamide separating gel and then blotted onto PVDF membranes for immunoblot analysis. CtpA-GFP and YhmA-GFP were detected using an anti-GFP antibody (Roche, Basel, Switzerland) and Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Bands of the predicted molecular weights of CtpA-GFP and YhmA-GFP are indicated by arrows. The results confirmed that the expression levels of CtpA and YhmA-GFP were higher in CAP medium than M medium.

(7) 出芽酵母における *ctp1* 破壊株、*yhm2* 破壊株の相補実験

ctpA と *yhmA* が出芽酵母 $\Delta ctp1$ および、 $\Delta yhm2$ 株の表現型を相補するかどうかを検討した。まず、先行研究により、*ctp1* の破壊は表現型に影響を与えないことが報告されていたため³¹⁾、 $\Delta ctp1$ 株の表現型を解析した。低温ストレス (15°C)、細胞壁ストレス (congo red や clcofluor white)、各種の炭素源 (グルコースや酢酸、グリセロール) における生育試験を行ったが、 $\Delta ctp1$ 株に特徴的な表現型を見出すことをできなかったため、 $\Delta ctp1$ 株における白麴菌の *ctpA* の相補実験は行わなかった。

次に、 $\Delta yhm2$ 株における *yhmA* の相補実験を行った。 $\Delta yhm2$ 株は酢酸を炭素源とする最少培地 (SA) において、生育遅延を示すことが報告されている (Fig. 3.12)⁷²⁾。 $\Delta yhm2$ 株における *yhmA* の発現は、*yhm2* の相補と同様に $\Delta yhm2$ 株の生育を回復させたことから、白麴菌の *yhmA* は出芽酵母の *yhm2* の機能を相補できることが示唆された。

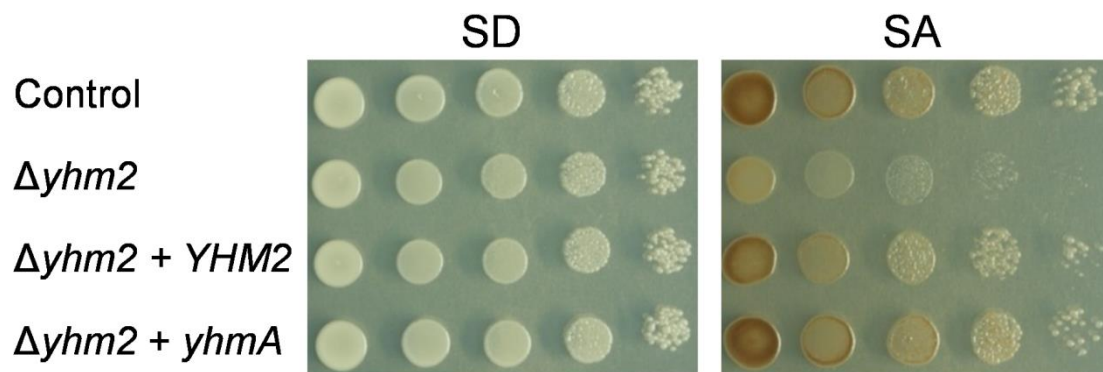


Figure 3.12. Expression of *yhmA* complements the *S. cerevisiae* $\Delta yhm2$ phenotype. Ten-fold serial dilutions of 10^7 cells of control strain, $\Delta yhm2$, $\Delta yhm2 + yhm2$, and $\Delta yhm2 + yhmA$ cells (all strains pre-cultured for 24 h in SC medium without tryptophan) were inoculated onto SD (glucose) or SA (acetate) medium and incubated at 30°C for 3 days.

(8) 細胞内アミノ酸濃度とアセチル-CoA 濃度

真核生物において、TCA 回路の中間代謝物の多くはアミノ酸合成の基点となることが知られている⁷⁴⁾。また、*A. nidulans* や *A. niger* において細胞質のクエン酸がアセチル-CoA の供給源となることが報告されている^{75,76)}。そこで、各遺伝子破壊が細胞内のアミノ酸、アセチル-CoA 合成に及ぼす影響について調査した。培養条件は有機酸濃度の測定と同様に行った。

その結果、 $\Delta ctpA$ 株と $\Delta yhmA$ 株において、細胞内リジン濃度がそれぞれ、0.29 倍、0.4 倍に低下した (Table 3.3)。また、Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株ではアスパラギン酸やグルタミン酸、グリシン、リジン、アラニンの濃度がそれぞれ 0.53、0.53、0.43、0.28、0.31 倍に低下していた。さらに、細胞内アセチル-CoA 濃度を測定した結果、Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株は、コントロール株と比較して 0.42 倍に低下していた (Fig. 3.13)。

Table 3.3. Intracellular amino acid concentrations of *Aspergillus kawachii* strains.

Amino acids ($\mu\text{mol/g}$ wet mycelia)	Strains			
	Control	$\Delta ctpA$	$\Delta yhmA$	Ptet- <i>ctpA-S</i> $\Delta yhmA$
Asp	9.06 \pm 1.90	5.53 \pm 0.76	7.00 \pm 0.67	4.85 \pm 0.47*
Ser	9.39 \pm 2.69	6.74 \pm 0.60	9.65 \pm 2.02	6.44 \pm 0.43
Glu	23.93 \pm 3.02	18.90 \pm 1.81	27.12 \pm 0.55	12.76 \pm 2.36*
Gly	14.60 \pm 4.02	13.16 \pm 1.56	17.54 \pm 2.07	6.31 \pm 0.34*
Ala	128.39 \pm 31.24	118.05 \pm 4.47	153.34 \pm 4.57	39.81 \pm 4.18*
Ile	5.47 \pm 3.37	3.19 \pm 0.30	1.12 \pm 0.076	3.06 \pm 0.20
Leu	17.09 \pm 9.33	8.44 \pm 2.28	10.32 \pm 1.28	6.76 \pm 1.67
Tyr	9.97 \pm 2.65	6.90 \pm 0.83	8.28 \pm 0.45	6.97 \pm 0.46
Phe	12.32 \pm 2.85	8.92 \pm 1.35	10.46 \pm 0.70	9.05 \pm 0.52
His	23.05 \pm 4.20	14.03 \pm 1.48	17.07 \pm 0.99	14.57 \pm 0.77
Lys	36.81 \pm 8.00	10.52 \pm 3.41*	15.92 \pm 1.80*	10.19 \pm 2.67*
Arg	102.74 \pm 28.55	56.88 \pm 7.02	52.24 \pm 2.18	46.85 \pm 2.97
Met	2.30 \pm 1.10	1.33 \pm 0.36	1.37 \pm 0.26	1.22 \pm 0.66
Val	8.54 \pm 2.42	5.75 \pm 1.08	5.85 \pm 1.04	3.48 \pm 1.47

* Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) relative to the result of control strain.

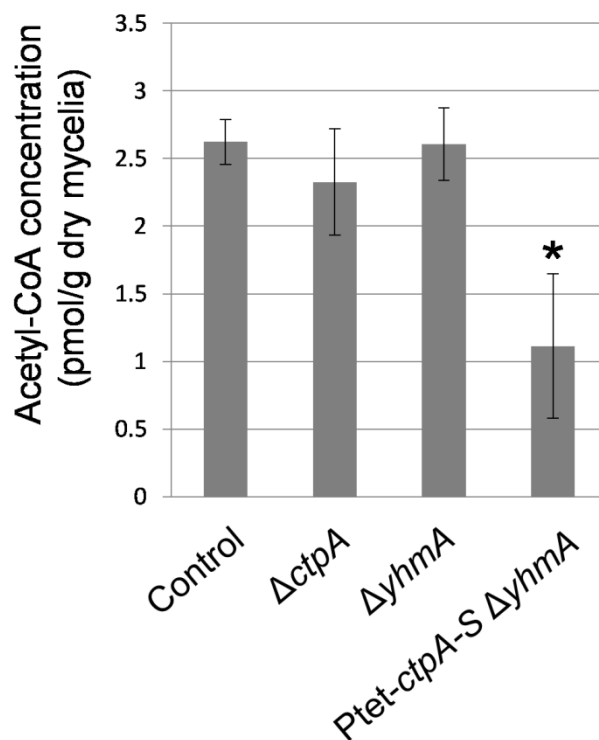


Figure 3.13. Intracellular acetyl-CoA concentration in *A. kawachii* strains. The control, $\Delta ctpA$, $\Delta yhmA$, and Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ strains were precultured in M medium for 36 h, then transferred to CAP medium, and further cultivated for 48 h. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, statistically significant difference ($P < 0.05$, Welch's t test) from the result for the control strain.

(9) Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の生育におけるアミノ酸、酢酸添加の影響

Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株においてアミノ酸やアセチル-CoA 濃度の低下がみられたため、生育遅延との関連について調査した。Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株を最少寒天培地に Dox、各種のアミノ酸、あるいは酢酸ナトリウムを添加した培地で培養した (Fig. 3.14A)。Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の生育はプロリンとヒスチジン添加によっては改善されなかったが、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、アルギニンの添加により回復傾向にあり、リジンあるいは酢酸塩の添加により顕著に改善された。また、液体培地においても同様に実験を行った

ところ、酢酸ナトリウムあるいはリジンの添加により、Dox の添加時と同等以上に生育が改善されることが示唆された (Fig. 3.14B)。しかし、寒天培地での結果と異なり、液体培地においてはアルギニン添加時においても酢酸ナトリウムやリジン添加と同等の生育改善効果を示した。この寒天培地と液体培地における異なる現象については、今後さらなる追加実験が必要である。

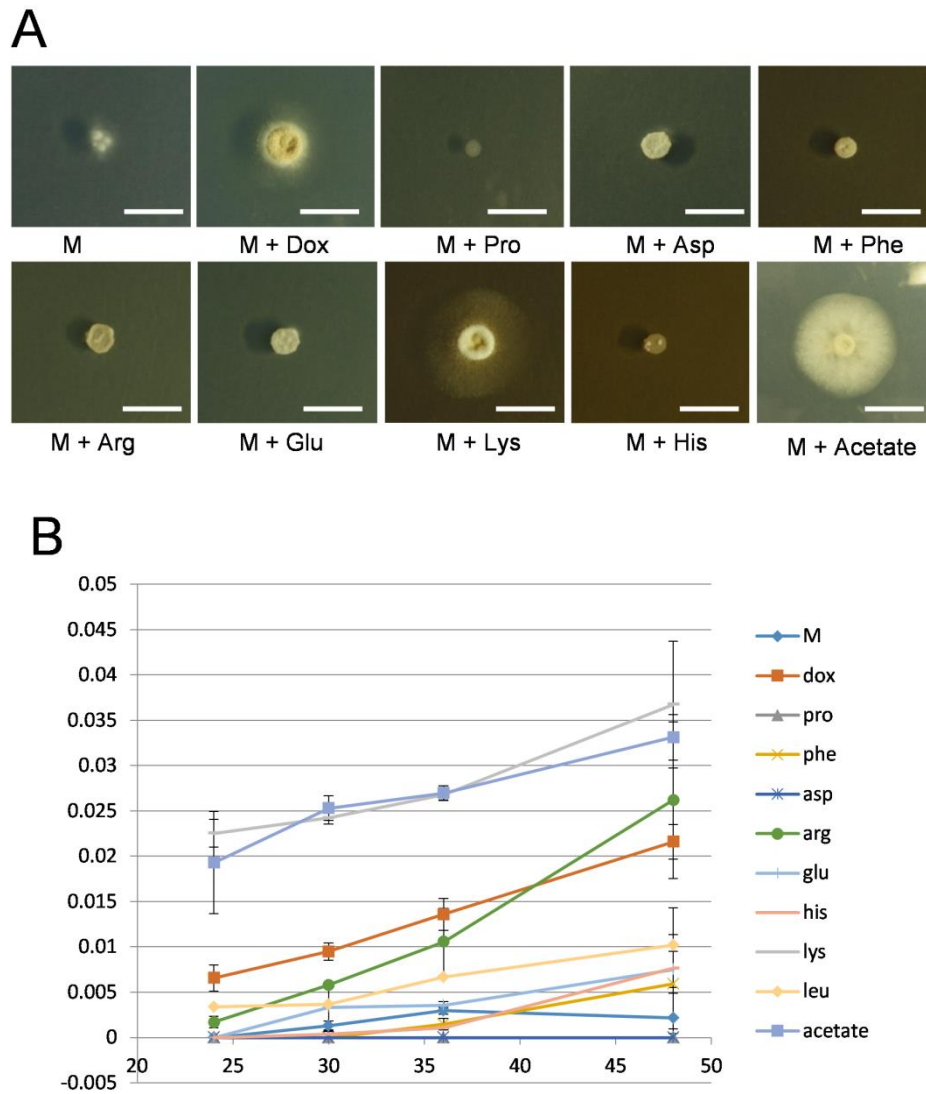


Figure 3.14. Effect of amino acids on colony formation of the *Ptet-ctpA-S ΔyhmA* strain. (A) Conidia (10^4) of the *Ptet-ctpA-S ΔyhmA* strain were inoculated onto M agar medium with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox and with 0.5% (wt/vol) various amino acids. Scale bars indicate 1 cm. (B) Growth curve of *A. kawachii* in M liquid medium with or without Dox and supplemented with proline, phenylalanine, asparatate, arginine, glutarate, histidine, lysine, leusine and acetate at 30°C

(10) 酢酸ナトリウムおよびリジン添加時のアセチル-CoA 濃度

酢酸ナトリウムあるいはリジンの添加により、*Ptet-ctpA-S ΔyhmA* 株の生育が顕著に改善されたことから、酢酸ナトリウムやリジンの添加はアセチル-CoA 濃度を改善する可能性が考えられた。そこで、酢酸ナトリウム並びにリジンが細胞内のアセチル-CoA 濃度に及ぼす影響について調査した (Fig. 3.15)。まず、*Ptet-ctpA-S ΔyhmA* 株を Dox を添加した最少培地において 36 h 前培養した後、菌体を最少培地、および最少培地に Dox、酢酸ナトリウム、あるいはリジンを添加した培地に移して、さらに 12、24、48 h 培養した。その後、細胞内アセチル-CoA 濃度を測定した。なお、前培養終了後の菌体を 0 h として同様にアセチル-CoA 濃度を測定した。

最少培地における *Ptet-ctpA-S ΔyhmA* 株の細胞内アセチル-CoA 濃度は、12、24、48 h 後にそれぞれ、0.47、0.41、0.36 倍と経時的に低下する傾向がみられた (Fig. 3.15)。一方、Dox、酢酸ナトリウム、リジンを添加した条件では、48 h 培養時に Dox とリジン添加時において、それぞれ 0.52 倍、0.28 倍に減少するものの、12~24 h 培養時において、アセチル-CoA 濃度の改善が認められた。

以上の結果より、CtpA と YhmA は細胞質のアセチル-CoA 合成に重要であり、*Ptet-ctpA-S ΔyhmA* 株の生育遅延は細胞内アセチル-CoA の不足が原因であることが示唆された。また、白麴菌がリジンをアセチル-CoA の供給源として利用可能であることが示唆された。

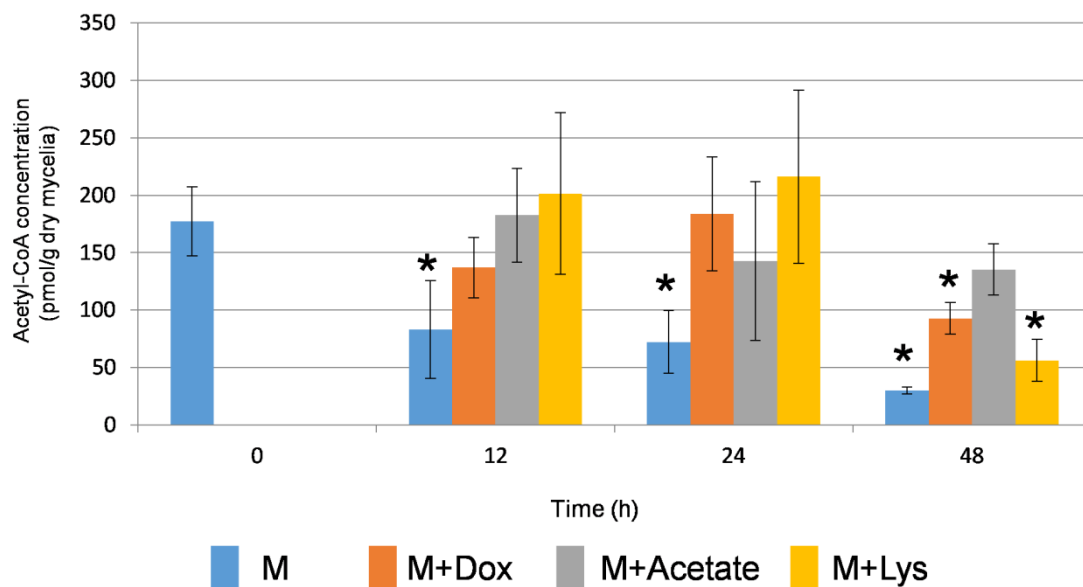


Figure 3.15. Intracellular acetyl-CoA concentration in *A. kawachii* Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* strain. The Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* strain was precultured in M medium supplemented with 1 μ g/ml of Dox for 36 h, then transferred to M medium with or without Dox or with acetate or lysine at a concentration of 0.5% (wt/vol), and further cultured for 12, 24, and 48 h. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. *, statistically significant difference ($P < 0.05$, Welch's t test) from the result obtained at 0 h (preculture for 36 h).

Table. 3.4 Coding sequences upstream and downstream of the yhm2 homologous gene in eukaryotic microorganisms.

Genus/species	-3	-1	+1	+2	-1	-2	-3
<i>Agaricus bisporus</i> FC-438	homocysteine synthase CysD (AKAW_0627, GA488163.1)	RNA binding protein Nrd1 (AKAW_0628, GA488164.1)	diene synthase (DIA) (AKAW_0629, GA488165.1)	mitochondrial DNA replication protein (AKAW_0630, GA488166.1)	ubiquitin-cyclosome C reductase complex core protein 2 (AKAW_0631, GA488167.1)	DNA directed RNA polymerase II subunit Rpo2 (AKAW_0632, GA488168.1)	HLI transcription factor (AKAW_0633, GA488169.1)
<i>Agaricus eryzae</i> 33-40	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822776.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822774.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822775.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822773.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822771.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822770.1)	unannoted protein product (AU0901200623, XP_001822778.1)
<i>Agaricus foveus</i> NREL 3397	homocysteine synthase CysD (AFLA_00940, XP_02382902.1)	RNA binding protein Nrd1 (AFLA_00938, XP_02382901.1)	diene synthase (DIA) (AFLA_00939, XP_02382900.1)	mitochondrial DNA replication protein (Yhm2) (AFLA_00940, XP_02382901.1)	ubiquitin-cyclosome C reductase complex core protein 2 (AFLA_00940, XP_02382901.1)	DNA directed RNA polymerase II subunit Rpo2 (AFLA_06980, XP_04283096.1)	HLI transcription factor (AFLA_06980, XP_04283096.1)
<i>Agaricus fungus</i> A.093	homocysteine synthase CysD (AFLA_50420, XP_747918.1)	RNA binding protein Nrd1 (AFLA_50420, XP_747919.1)	diene synthase (DIA) (AFLA_50420, XP_747920.1)	mitochondrial DNA replication protein (Yhm2) (AFLA_50420, XP_747921.1)	ubiquitin-cyclosome C reductase complex core protein 2 (AFLA_50420, XP_747921.1)	DNA directed RNA polymerase II subunit Rpo2 (AFLA_50420, XP_747921.1)	HLI transcription factor (AFLA_50420, XP_747921.1)
<i>Agaricus niger</i> CBS 113.88	O-acetyltransferase (fmh)-lyase (ANI_1_57684, XP_001939862.2)	RNA binding protein Nrd1 (ANI_1_57684, XP_001939863.1)	diene synthase (ANI_1_57684, XP_001939864.1)	DNA replication protein YHM2 (ANI_1_57684, XP_001939865.1)	ubiquitin-cyclosome C reductase complex core protein 2 (ANI_1_57684, XP_001939866.1)	DNA directed RNA polymerase II subunit Rpo2 (ANI_1_57684, XP_001939867.1)	HLI transcription factor (ANI_1_57684, XP_001939868.1)
<i>Agaricus urvus</i> NREL24	O-acetyltransferase (ATEB_0788, XP_00216669.1)	hypothetical protein (ATEB_0789, XP_00216670.1)	diene synthase (ATEB_0790, XP_00216671.1)	mitochondrial DNA replication protein YHM2 (ATEB_0791, XP_00216672.1)	conserved hypothetical protein (ATEB_0792, XP_00216673.1)	hypothetical protein (ATEB_0793, XP_00216674.1)	hypothetical protein (ATEB_0794, XP_00216675.1)
<i>Mercospora canis</i> CBS11340	hypothetical protein (MCTG_0835, XP_02384487.1)	hypothetical protein (MCTG_0836, XP_02384488.1)	diene synthase (MCTG_0837, XP_02384489.1)	conserved hypothetical protein (MCTG_0838, XP_02384490.1)	mitochondrial DNA replication protein YHM2 (MCTG_0839, XP_02384491.1)	RNA polymerase III subunit Rpo2 (MCTG_0840, XP_02384492.1)	hypothetical protein (MCTG_0841, XP_02384493.1)
<i>Coccidioides immitis</i> 35	hypothetical protein (CIMG_0623, XP_00124297.2)	protein Nrd1 (CIMG_0624, XP_00124298.1)	diene synthase (CIMG_0625, XP_00124299.1)	mitochondrial DNA replication protein YHM2 (CIMG_0626, XP_00124300.1)	process elongating protein (CIMG_0627, XP_00124301.1)	hypothetical protein (CIMG_0628, XP_00124302.1)	hypothetical protein (CIMG_0629, XP_00124303.1)
<i>Trichoderma reesei</i> CBS 431.97	hypothetical protein (M44DRAFT_44937, XP_04759608.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44938, XP_04759609.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44939, XP_04759610.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44940, XP_04759611.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44941, XP_04759612.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44942, XP_04759613.1)	hypothetical protein (M44DRAFT_44943, XP_04759614.1)
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	predicted protein (TRUEDRAFT_10821, XP_00666153.1)	hypothetical protein (TRUEDRAFT_10822, XP_00666154.1)	diene synthase (TRUEDRAFT_10823, XP_00666155.1)	hypothetical protein (TRUEDRAFT_10824, XP_00666156.1)	predicted protein (TRUEDRAFT_10825, XP_00666157.1)	predicted protein (TRUEDRAFT_10826, XP_00666158.1)	predicted protein (TRUEDRAFT_10827, XP_00666159.1)
<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	hypothetical protein (MAGG_07203, XP_00715413.1)	hypothetical protein (MAGG_07204, XP_00715414.1)	diene synthase (MAGG_07205, XP_00715415.1)	mitochondrial DNA replication protein YHM2 (MAGG_07206, XP_00715416.1)	hypothetical protein (MAGG_07207, XP_00715417.1)	hypothetical protein (MAGG_07208, XP_00715418.1)	hypothetical protein (MAGG_07209, XP_00715419.1)
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	hypothetical protein (FUSG_11850, XP_01317225.1)	hypothetical protein (FUSG_11851, XP_01317226.1)	diene synthase (FUSG_11852, XP_01317227.1)	DNA replication protein YHM2 (FUSG_11853, XP_01317228.1)	hypothetical protein (FUSG_11854, XP_01317229.1)	hypothetical protein (FUSG_11855, XP_01317230.1)	hypothetical protein (FUSG_11856, XP_01317231.1)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 380_U7-20	hypothetical protein (SSIG_0167, XP_00159432.1)	hypothetical protein (SSIG_0168, XP_00159433.1)	diene synthase (SSIG_0169, XP_00159434.1)	mitochondrial DNA replication protein (SSIG_0170, XP_00159435.1)	hypothetical protein (SSIG_0171, XP_00159436.1)	hypothetical protein (SSIG_0172, XP_00159437.1)	hypothetical protein (SSIG_0173, XP_00159438.1)
<i>Gibbera bosworthii</i> A.TCC 2088	WD40 repeat-like protein (GLAREA_0385, GLAREA_0389)	RNA-binding (RB) (GLAREA_0390, XP_00882282.1)	diene synthase (GLAREA_0391, XP_00882283.1)	mitochondrial carrier (GLAREA_0392, XP_00882284.1)	mitochondrial carrier (GLAREA_0393, XP_00882285.1)	Calcium ATPase (GLAREA_0394, XP_00882286.1)	hypothetical protein (GLAREA_0395, XP_00882287.1)
<i>Alternaria alternata</i>	cell lipase and palmitic acid transmembrane protein 1 (CCT7DRAFT_102413, XP_01832833.1)	hypothetical protein (CCT7DRAFT_102414, XP_01832834.1)	diene synthase (CCT7DRAFT_102415, XP_01832835.1)	mitochondrial carrier (CCT7DRAFT_102416, XP_01832836.1)	mitochondrial carrier (CCT7DRAFT_102417, XP_01832837.1)	hypothetical protein (CCT7DRAFT_102418, XP_01832838.1)	oxalate decarboxylase oxid (CCT7DRAFT_102419, XP_01832839.1)
<i>Arachidonium nematum</i> CBS 14737	putative Pantoic like protein (M46DRAFT_3066, XP_01343666.1)	hypothetical protein (M46DRAFT_3067, XP_01343667.1)	diene synthase (M46DRAFT_3068, XP_01343668.1)	mitochondrial carrier (M46DRAFT_3069, XP_01343669.1)	hypothetical protein (M46DRAFT_3070, XP_01343670.1)	hypothetical protein (M46DRAFT_3071, XP_01343671.1)	enzyme D (M46DRAFT_3072, XP_01343672.1)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	DFOS (YMG328X, XP_013665.1)	RNT1 (YMG329C, XP_013666.1)	Yhm2 (YMG329D, XP_013667.1)	Yhm2 (YMG329E, XP_013668.1)	Zn2+ (YMG329F, XP_013669.1)	Zn2+ (YMG329G, XP_013670.1)	hypothetical protein (YMG329H, XP_013671.1)
<i>Candida albicans</i> SC5314	TFIIIRNSR complex subunit (CAALFM_C000604CA, XP_711246.2)	Yhm2 (CAALFM_C000605MA, XP_711247.2)	Yhm2 (CAALFM_C000606MA, XP_711248.2)	Yhm2 (CAALFM_C000607MA, XP_711249.1)	Yhm2 (CAALFM_C000608MA, XP_711250.2)	Yhm2 (CAALFM_C000609MA, XP_711251.1)	hypothetical protein (CAALFM_C000610MA, XP_711252.2)
<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB 122	YALJ081003p (YALJ081003, XP_300735.1)	YALJ081004p (YALJ081004, XP_300736.1)	YALJ081005p (YALJ081005, XP_300737.1)	YALJ081006p (YALJ081006, XP_300738.1)	YALJ081007p (YALJ081007, XP_300739.1)	YALJ081008p (YALJ081008, XP_300740.1)	YALJ081009p (YALJ081009, XP_300741.1)
<i>Schistosoma mansoni</i> panel 172b	ER membrane protein complex subunit Eam7 (SFOC3.10, CAB38272.1)	uncharacterized (SFOC3.11, CAB38273.1)	uncharacterized (SFOC3.12, CAB38274.1)	uncharacterized (SFOC3.13, CAB38275.1)	uncharacterized (SFOC3.14, CAB38276.1)	uncharacterized (SFOC3.15, CAB38277.1)	ribosome assembly factor (SFOC3.16, CAB38278.1)
<i>Pneumocystis jirovecii</i> RUT	hypothetical protein (TSSI_02100, XP_01822405.1)	hypothetical protein (TSSI_02101, XP_01822406.1)	hypothetical protein (TSSI_02102, XP_01822407.1)	hypothetical protein (TSSI_02103, XP_01822408.1)	hypothetical protein (TSSI_02104, XP_01822409.1)	hypothetical protein (TSSI_02105, XP_01822410.1)	hypothetical protein (TSSI_02106, XP_01822411.1)

Locus tag and accession number are shown in parentheses. Homologous protein-coding sequences are indicated by the same colors.

3.4 考察

本研究では、白麴菌のミトコンドリア局在クエン酸輸送体の同定を試み、出芽酵母 Ctp1 と Yhm2 のホモログとして CtpA と YhmA を同定した^{31,72)}。Ctp1 のホモログは真核生物において広く保存されているが、Yhm2 のホモログは哺乳類などで保存されていない⁷²⁾。また、興味深いことにチャワントケ亜門の糸状菌において、*yhmA* はクエン酸合成酵素をコードする *citA* 遺伝子の下流に保存されていることを見出した (Table 3.4)。さらに *citA* の上流には RNA 結合タンパク質をコードする出芽酵母 *NRD1*⁷⁷⁾ のホモログが保存されていた。本遺伝子クラスターはチャワントケ亜門にのみ保存されており、同じ子囊菌門に属するサッカロマイセス亜門やタフリナ亜門には保存されていないため、チャワントケ亜門の進化の過程で形成された遺伝子クラスターであることが予想された。

先行研究により、*ctpA* は *A. niger* の培養初期におけるクエン酸生産に関与することが報告されていたが³⁵⁾、CtpA のクエン酸輸送活性は不明であった。本研究では、白麴菌の CtpA と YhmA がクエン酸輸送体であることを生化学的に証明した。CtpA と YhmA が対向基質の存在下でのみ輸送活性を示したことは、出芽酵母における Ctp1 および、Yhm2 の知見と一致した^{31,72)}。

CtpA は *cis*-aconitate および、malate を対向基質とした際に高いクエン酸輸送活性を示した (Fig. 3.5A)。この点において、CtpA の基質特異性はクエン酸-リンゴ酸交換輸送体として知られる出芽酵母 Ctp1 とラット CTP と同様の基質特異性を示した^{25,71)}。一方、Ctp1 と CTP とは異なる特徴として、CtpA は citrate/citrate 交換活性が低い可能性が示唆された^{22,25,78)}。YhmA は citrate、2-oxoglutarate、malate、*cis*-aconitate、succinate に対して、幅広い基質特異性を示した (Fig. 3.5B)。この基質特異性についても Yhm2 の知見と同様の結果であったものの⁷²⁾、YhmA は Yhm2 と異なり、malate と *cis*-aconitate に対しても高い基質特異性を示すことが示唆された。

細胞内の有機酸濃度を測定した結果、クエン酸とリンゴ酸、2-オキシグルタル酸が約 40 $\mu\text{mol/g}$ (凍結菌体重量当たり) とほぼ同等であることを示した (コントロール株を例とすると、クエン酸が 25 $\mu\text{mol/g}$ 、リンゴ酸が 34 $\mu\text{mol/g}$ 、2-オキシグルタル酸が 52 $\mu\text{mol/g}$ であった)。CtpA はリンゴ酸に対する基質特異性と比較して、2-オキシグルタル酸に対する基質特異性が低いことを考慮すると、CtpA は細胞内においてクエン酸-リンゴ酸交換輸送体として機能することが推察された (Fig. 3.5A)。また、YhmA は2-オキシグルタル酸だけでなく、リンゴ酸に対しても高いクエン酸輸送活性を示すことから、YhmA は細胞内において、クエン酸-2-オキシグルタル酸またはリンゴ酸交換輸送体として機能すると推察された。

加えて、白麴菌の *yhmA* は出芽酵母 $\Delta yhm2$ 株の表現型を相補した (Fig. 3.12)。この結果から、YhmA が Yhm2 と同様の生理的役割をもつことが示唆された⁷²⁾。出芽酵母⁷²⁾と *A. niger*⁷⁹⁾の知見に基づいて、白麴菌において細胞質のクエン酸はアコニターゼ (AKAW_02593 and AKAW_06497) と NADP⁺依存型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (AKAW_02496) によって、イソクエン酸を介して2-オキシグルタル酸に変換されると予測された (Fig. 3.16)。出芽酵母においては、この反応により NADP⁺が NADPH に変換されるため、Yhm2 は細胞質の NADPH の再生に重要であることが明らかになっており⁷²⁾、白麴菌においても YhmA は同様の生理的役割をもつ可能性が示唆された。

白麴菌において、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊株を構築することができなかった。Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の *ctpA* 発現抑制条件で深刻な生育遅延を示したことから、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊は最少培地上において合成致死となる可能性が考えられた (Fig. 3.6C)。Ptet-*ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株は *ctpA-S* 発現非誘導条件において、細胞内アセチル-CoA 濃度が有意に低下したが (Fig. 3.13)、またアセチル-CoA の供給源となる酢酸ナトリウムの添加により本生育遅延は改善された (Fig. 3.14A)。 *A. nidulans* と *A. niger* において、細胞質のアセチル-CoA の大部分は ATP-クエン酸リアーゼによって、クエン酸から合成されることが報告されている^{75,76)}。例えば、*A. niger* における ATP-クエン酸リアーゼをコードする *acl1* および *acl2* の破壊は、細胞質の

アセチル-CoA 合成不全による深刻な生育遅延をもたらすことが報告されている⁷⁶⁾。これらの結果と先行研究における知見に基づいて、白麴菌においては、CtpA と YhmA が排出したクエン酸が細胞質のアセチル-CoA の主要な供給源となっていることが考えられた。

さらに、 $\Delta ctpA$ および、 $\Delta yhmA$ 、 $Ptet-ctpA-S \Delta yhmA$ 株の二重破壊条件において、細胞内リジン濃度が有意に低下することを見出した (Table 3.3)。また、 $Ptet-ctpA-S \Delta yhmA$ 株においてリジンの添加はアセチル-CoA 濃度の上昇に伴う生育遅延の改善をもたらしたことから (Fig. 3.14, 3.15)、ミトコンドリアのクエン酸輸送とアセチル-CoA 合成、リジン合成の間には何らかの関連があることが示唆された (Fig. 3.16)。真菌において、リジンは細胞質の 2-オキソグルタル酸を基点として、 α -アミノアジピン酸経路によって合成されることが知られている⁸⁰⁻⁸⁵⁾。本反応において、2-オキソグルタル酸とアセチル-CoA によってホモクエン酸が合成される (Fig. 3.16)。さらに、このリジン合成に使用される 2-オキソグルタル酸は、上記の代謝経路を介して CtpA と YhmA が排出したクエン酸から合成されると考えられる (Fig. 3.16)。したがって、 $Ptet-ctpA-S \Delta yhmA$ 株において、アセチル-CoA 濃度の低下に加えて、細胞内 2-オキソグルタル酸の低下によるリジンの合成不全も生育遅延をもたらした可能性が考えられた。加えて、リジンの添加によりアセチル-CoA 濃度の改善がみられたことについて (Fig. 3.15)、 α -アミノアジピン酸経路の逆反応によってリジンが分解され⁸⁶⁾、その過程でアセチル-CoA が合成されている可能性を示している (Fig. 3.16)。

最後に、白麴菌 $Ptet-ctpA-S \Delta yhmA$ 株がリジン要求性を示したのに対して、出芽酵母の $\Delta ctp1 \Delta yhm2$ 株は、 $\Delta yhm2$ 株と同様の表現型を示すことが報告されている⁷²⁾。この実験には *lys2-801* の出芽酵母が親株として使用されていたため、培地にリジンを添加した条件で実験が行われていた。そこで、リジンを要求しない (*LYS2*) 株である W303-1A 株において、新たに $\Delta ctp1 \Delta yhm2$ 株を構築した。しかしながら、*LYS2* をもつ $\Delta ctp1 \Delta yhm2$ 株も *lys2-801* の $\Delta ctp1 \Delta yhm2$ 株と同様の表現型を示したことから (data not shown)、白麴菌と出芽酵母において、ミトコンドリアからのクエン酸排出には異なる生理的意義があることが示唆された。

出芽酵母には ATP-クエン酸リアーゼのホモログは保存されておらず、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) バイパスによってアセチル-CoA が合成されていることが知られており⁸⁷⁻⁹⁰⁾、このアセチル-CoA 合成経路の違いによって、白麹菌と出芽酵母間におけるミトコンドリアからのクエン酸排出の生理的意義に違いが生じていることが推測された。

3.5 小括

CtpA と YhmA は白麹菌において、クエン酸高生産に関与するミトコンドリア局在型のクエン酸輸送体であることが明らかとなった。また、細胞質に排出されたクエン酸はアセチル-CoA の主要な供給源として重要であることが示唆された。

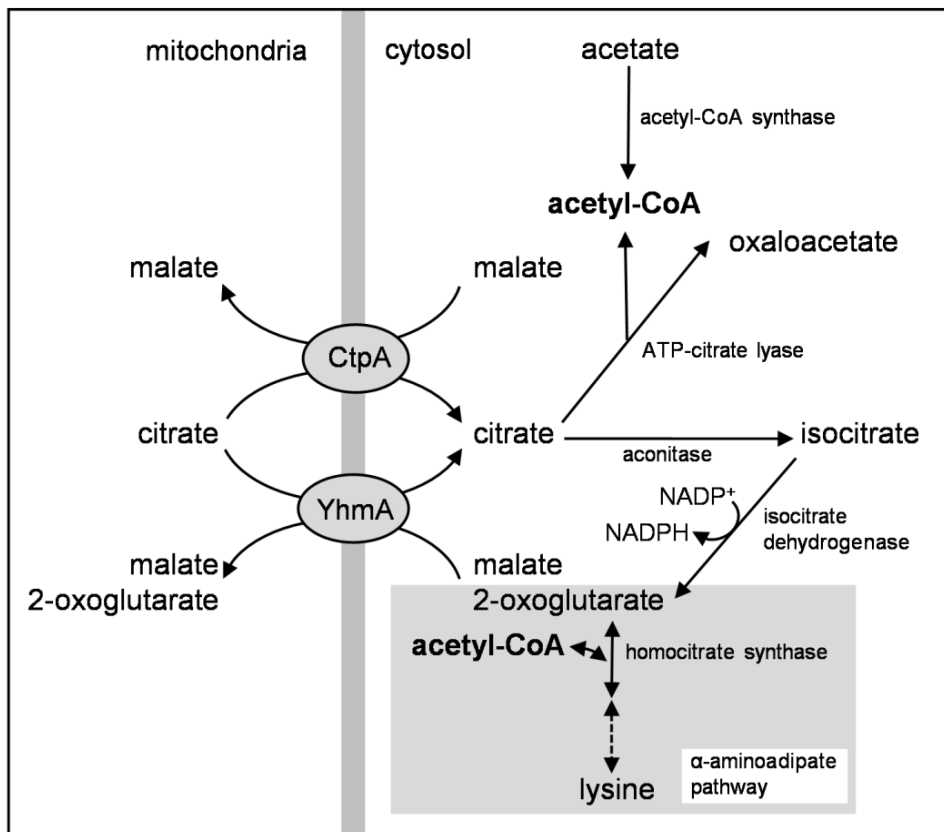


Fig. 3.16 Putative relationships between citrate transport, acetyl-CoA synthesis, generation of NADPH, and lysine biosynthesis in *A. kawachii*.

第4章 白麹菌における推定メチルトランスフェラーゼ *LaeA*

によるクエン酸生産制御機構の解析

4.1 緒言

A. niger において、推定メチルトランスフェラーゼ遺伝子 *laeA* の欠損がクエン酸生産の劇的な低下をもたらすことが報告されたが³⁸⁾、*LaeA* がどのようなメカニズムでクエン酸生産を制御しているかについては明らかとなっていない。本章では、白麹菌における *LaeA* と推定細胞膜局在型クエン酸輸送体 *CexA* の発現の関連性について述べる。

4.2 実験材料および方法

(1) 使用菌株および培養方法

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* SO2 株⁴⁵⁾を形質転換の親株として使用した (Table 4.1)。コントロール株は比較対象の株と同じ栄養要求性を示す株と定義した。

白麹菌の培養は最少培地 (1% [wt/vol] glucose, 0.6% [wt/vol] NaNO₃, 0.052% [wt/vol] KCl, 0.052% [wt/vol] MgSO₄·7H₂O, 0.152% [wt/vol] KH₂PO₄, Hutner's trace elements [pH 6.5])⁴⁶⁾ を使用した。また、各菌株の有機酸生産性を視覚的に評価するため、YPD 培地+2% methyl red を使用した。methyl red は 100 mg を 100 ml のエタノールに溶解した後、0.1% (wt/vol) の NaOH を赤色から黄色に変化するまで添加したものを使用した。クエン酸生産量の測定には、クエン酸生産 (CAP) 培地 (10% [wt/vol] glucose, 0.3% [wt/vol] (NH₄)₂SO₄, 0.001% [wt/vol] KH₂PO₄, 0.05% [wt/vol] MgSO₄·7H₂O, 0.000005% [wt/vol] FeSO₄·7H₂O, 0.00025% [wt/vol] ZnSO₄·5H₂O, 0.00006% [wt/vol] CuSO₄·5H₂O [pH 4.0]) を使用した。最少培地には、必要に

じて 0.8 M NaCl、1.5% (wt/vol) 寒天、0.211% (wt/vol) arginine、あるいは 0.02% (wt/vol) methionine を添加した。

Table 4.1. *Aspergillus kawachii* strains used in this study.

Strain	Genotype	Sources or References
SO2 ($\Delta sC\Delta argB$)	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻</i>	45
ΔsC	<i>ligD⁻ argB::argB sC⁻</i>	This study
$\Delta sC\Delta laeA$	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ laeA::argB</i>	This study
$\Delta sC\Delta laeA2$	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ laeA2::argB</i>	This study
$\Delta sC\Delta laeA3$	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ laeA3::argB</i>	This study
CK2	<i>ligD⁻ argB::argB sC::sC</i>	91
$\Delta laeA$	<i>ligD⁻ argB::hph sC::sC laeA::argB</i>	This study
$\Delta laeA+laeA$	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ laeA::laeA-sC-argB</i>	This study
$\Delta cexA$	<i>ligD⁻ argB::hph sC::sC cexA::argB</i>	This study
$\Delta cexA$ OE <i>cexA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ cexA::argB pGS-PgpdA-cexA</i>	This study
$\Delta laeA$ OE <i>cexA</i>	<i>ligD⁻ argB::hph sC⁻ laeA::argB pGS-PgpdA-laeA</i>	This study

Table 4.2 Primers used in this study.

Primer name	Sequences (5'-3')	Sources or References
AKlacA-FC	TGATGCTCGGAAGGCACCAG	This study
AKlacA-F1	AGCCAGGCGCATTTCCCACC	This study
AKlacA-R1	GCATGCAAGCTTTCGCGAGCCGTCGCCATGGTGATTGG TGGGTGC	This study
AKlacA-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGGGGGCGGCCCGTCC CTTTG	This study
AKlacA-R3	CGGCGCGGATGAGGATATTG	This study
AKlacA-RC	CCCGACGTTCTCACAATCG	This study
AKlacA2-FC	CTGATGAGGATGACTCAGC	This study
AKlacA2-F1	GCAGTTGAAGACGTCAAAGG	This study
AKlacA2-R1	GCATGCAAGCTTTCGCGAGCCGTCGGCTCCTCTTCATC ACACGG	This study
AKlacA2-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGGCACGTATACCAAG CACGG	This study
AKlacA2-R3	CAGCCTGGTCATTGACCATG	This study
AKlacA2-RC	GGACTGGGATACCGACGAG	This study
AKlacA3-FC	CTCAACGTGATTGCGGCAC	This study
AKlacA3-F1	CCACTTGGAGTGTCGACGAG	This study
AKlacA3-R1	GCATGCAAGCTTTCGCGAGCCGTCGCGTCAATCTGCGT CTTGG	This study
AKlacA3-F3	CCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGGCGCGTCGCCCAT GTAG	This study
AKlacA3-R3	TGCAGCCGAAACAGGCAC	This study
AKlacA3-RC	CCAGCCTCAATATAGCGCGC	This study
argB-F2	CGACGGCTCGCGAAAGCTTGCATGC	This study
argB-R2	CCGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGG	This study
sC-comp-F	CAATCACGCAAGCCGAGCTG	91
sC-comp-R	CTCACCGATGTAGGTCATG	91
AKlacAcomp-R1	CTGGGACACCATGACAACGGCAGCATTTTCAAAGGGA CGGGC	This study
AKlacAcomp-F2	GCCCGTCCCTTTGAAAATGCTGCCGTTGTCATGGTGTC CCAG	This study
sC-argB-F2	CCGTTGTCATGGTGTCCAGCAGCA	91
sC-argB-R2	AATTCGAGCTCGGTACCCGG	91
pGS-PgpdA-cexA-inf-F	CCGCCGAACAGTCGAACACATCTACACAATGTCTTCAA CCACATCTTCATC	This study
pGS-PgpdA-cexA-inf-R	CTCCCATATGGTTCGAcctccCTAATTTCCGTTGGC	This study
cexA-ChIP-F	GTCTTCAACCACATCTTCATCAAG	This study
cexA-ChIP-R	GAGACATCATCCAGGGCAGG	This study
cexA-RT-F	GGTCCCTGTACCACAGGTCA	This study
cexA-RT-R	GTGGCTTCTCGGACGACTGA	This study
actA-RT-F	GGTATGGGTGAGAAGGACTC	37
actA-RT-R	CTCCATGTCATCCCAGTTTCG	37

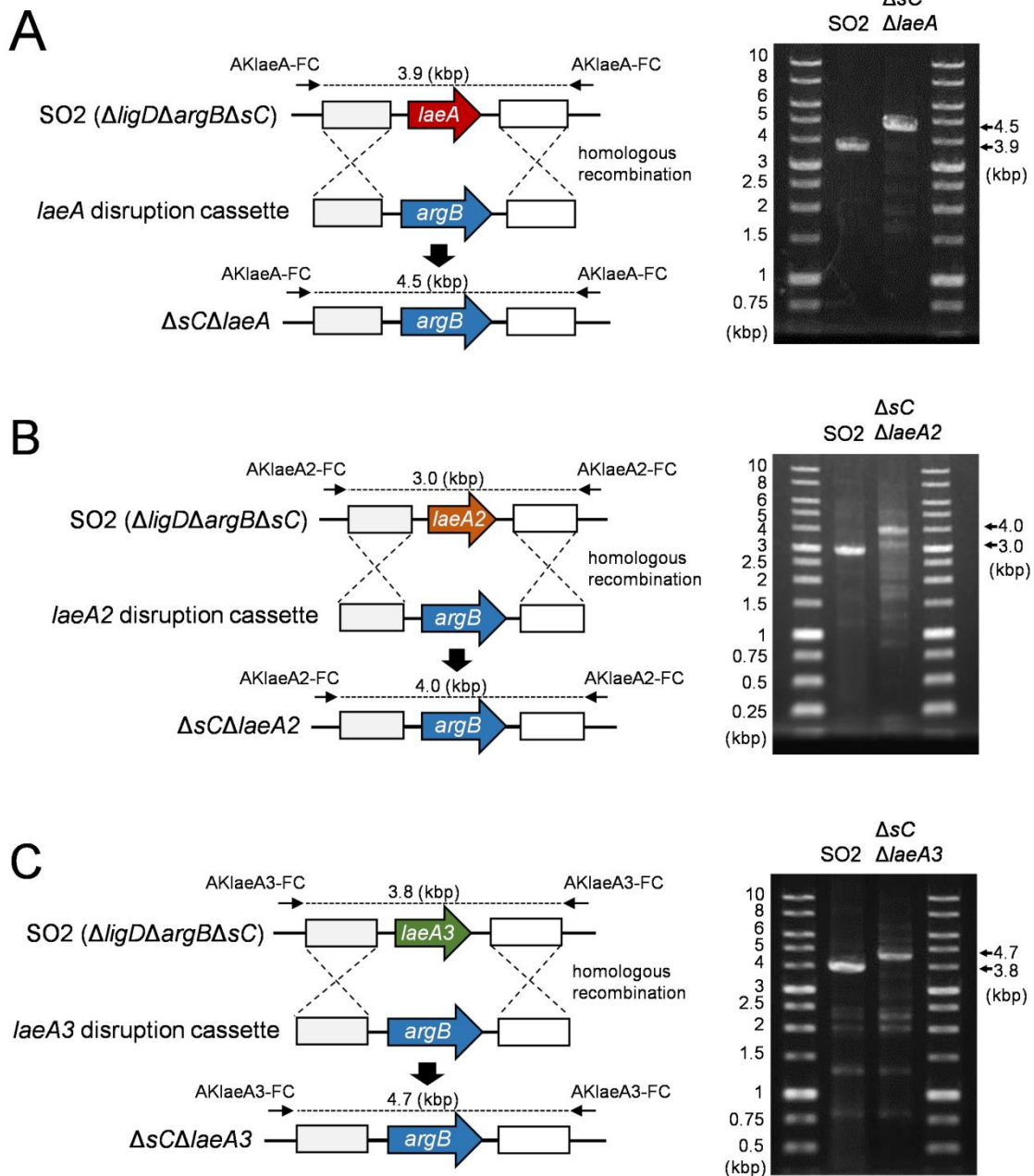


Fig. 4.1. Disruption of *A. kawachii* LaeA-like methyltransferase encoding genes. Schematic representation of the disruption of *laeA* (A), *laeA2* (B), and *laeA3* (C) by the insertion of *argB*. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons to confirm the disruption of *laeA*, *laeA2*, and *laeA3* was shown in the panels on the right.

(2) *laeA* ホモログ遺伝子破壊株の構築

laeA ホモログ (*laeA*、*laeA2*、*laeA3*) の破壊は *argB* の挿入によって行った。相同領域として各遺伝子の 5'-UTR と 3'-UTR、および選択マーカーとして *argB* を PCR によって増幅した。プライマーセットは Ak*laeX*-FC/Ak*laeX*-R1、Ak*laeX*-F2/Ak*laeX*-R2、Ak*laeX*-F3/Ak*laeX*-RC (X は A、A2、A3 に相当) (Table 4.2) を、鋳型として NBRC 4308 のゲノム DNA および、プラスミド pDC1⁴⁷⁾を用いた。Fusion PCR によって各断片を連結後、プライマーセット Ak*laeX*-F1/Ak*laeX*-R3 を用いて増幅した破壊カセットを SO2 株に導入した。形質転換体は arginine を含有しない最少培地で選択した。また、形質転換体の確認を、Ak*laeX*-FC/Ak*laeX*-RC を用いたコロニーPCRによる増幅サイズにより確認した (Fig. 4.1)。

(2) *laeA* 相補株の構築

laeA の 5'-UTR を含む ORF 領域、選択マーカーとして *sC*、破壊株における 3'側の相同領域として *argB* を PCR によって増幅した。プライマーセットは Ak*laeA*-FC/Ak*laeA*-comp-R1、Ak*laeA*-comp-F2/*argB*-R2 を、鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA と *sC* と *argB* をクローニングしたプラスミドを用いた。Fusion PCR により、各断片を連結した後、プライマーセット Ak*laeA*-F1/*argB*-R2 を用いて増幅したカセットを導入した。形質転換体は methionine を含有しない最少培地上で選択した。また、形質転換体の確認を、Ak*laeA*-FC/*argB*-R2 を用いたコロニーPCRによる増幅サイズにより確認した (Fig. 4.2)。

また、 $\Delta sC\Delta laeA$ 株は $\Delta laeA+laeA$ 株と栄養要求性をそろえるため、*sC* の相補を行った。プライマーセット *sC*-comp-F/*sC*-comp-R と鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA を用いて *sC* を増幅し、形質転換し、methionine を含有しない最少培地により選択した。

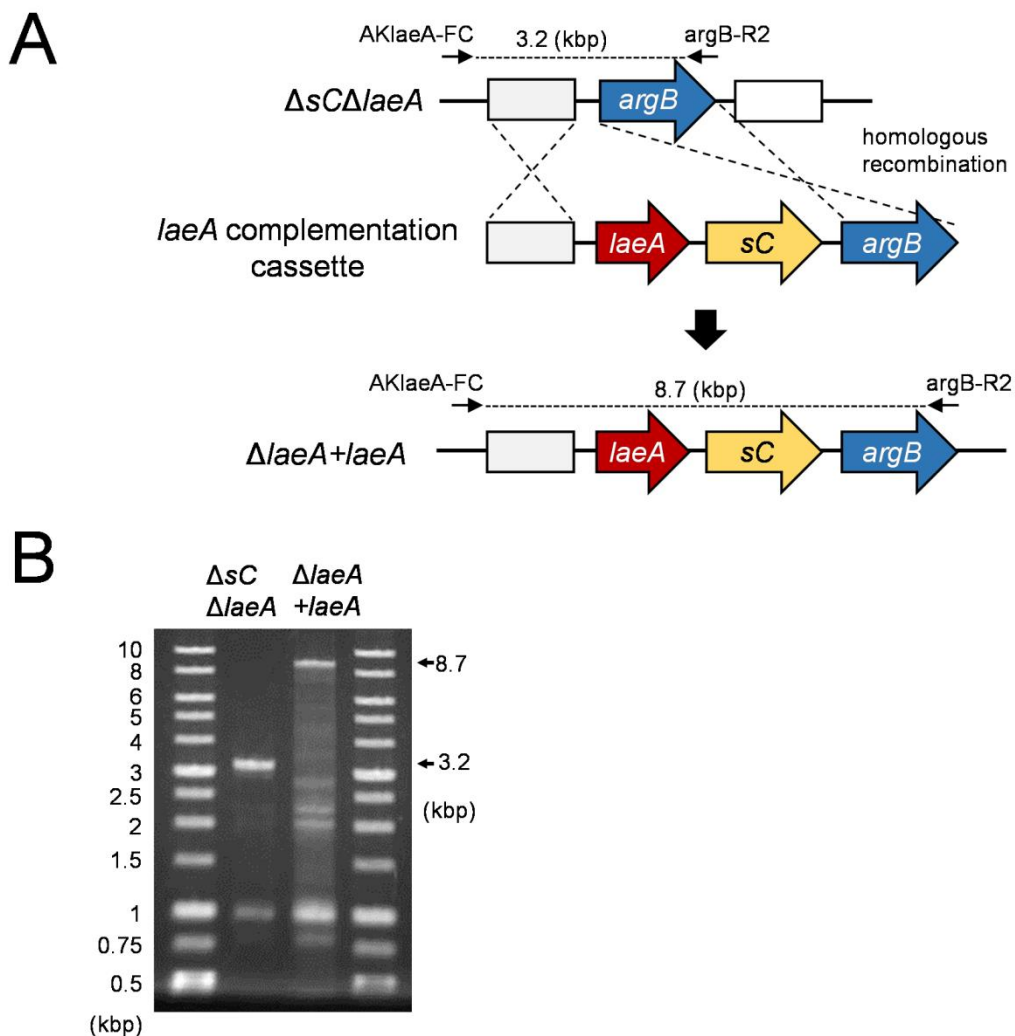


Fig. 4.2 Disruption of *A. kawachii* $\Delta laeA+laeA$ strain. Schematic representation of the complementation of *laeA* (A). Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons to confirm the complementation of *laeA* (B).

(3) *cexA* 破壊株の構築

cexA の破壊は *argB* の挿入によって行った。相同領域として各 5'-UTR と選択マーカーとして *argB* を PCR によって増幅した。プライマーセットは AkcexA-FC/AkcexA-R1、AkcexA-F2/AkcexA-R2、AkcexA-F3/AkcexA-RC を、鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA とプラスミド pDC1 を用いた。Fusion PCR により、各断片を連結した後、プライマーセット AklaeA-F1/*argB*-R2 を用いて増幅したカセットを導入した。形質転換体は arginine を含有し

ない最少培地で選択した。また、形質転換体の確認を、Ak $cexA$ -FC/Ak $cexA$ -RC を用いたコロニーPCRによる増幅サイズと Sal I による切断パターンにより確認した (Fig. 4.3)。 $cexA$ の破壊を確認した後、 sC の相補を行った。プライマーセット sC-comp-F/sC-comp-R と鋳型として NBRC4308 のゲノム DNA を用いて sC 遺伝子を増幅し、形質転換し、methionine を含有しない最少培地により選択した。

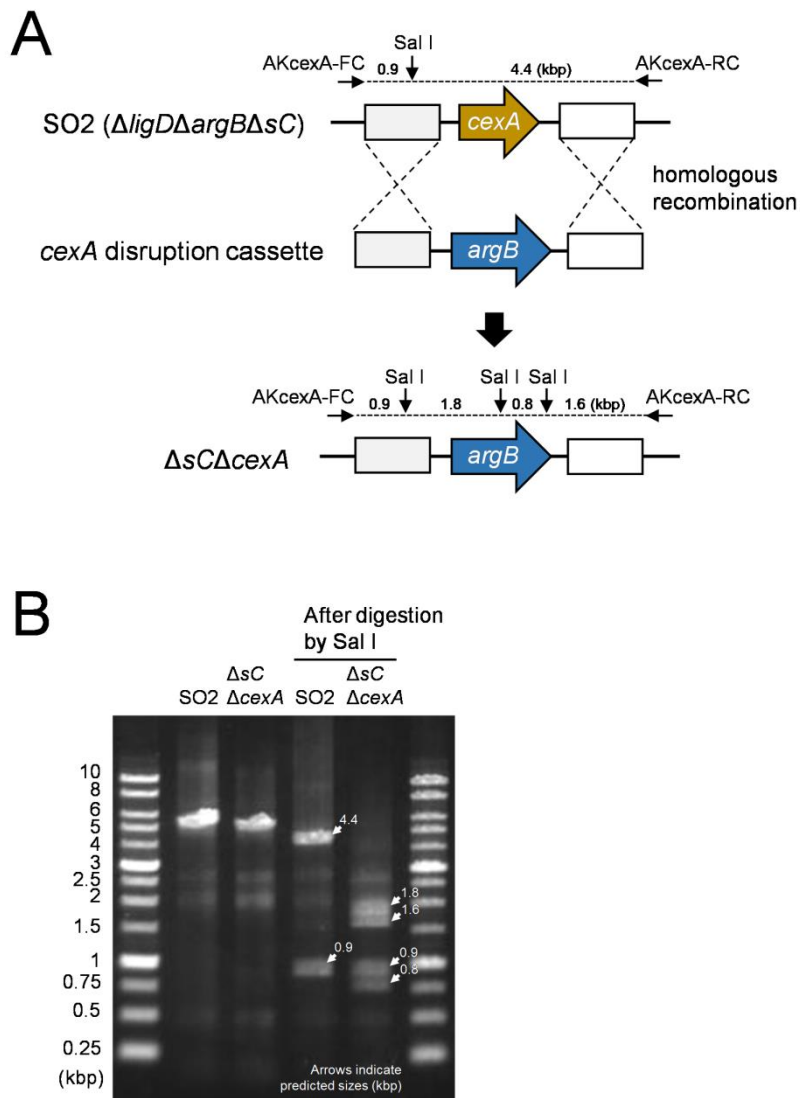


Fig. 4.3. Construction of *A. kawachii* putative citrate exporter encoding gene. Schematic representation of the disruption of $cexA$ by the insertion of $argB$ (A). Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons to confirm the disruption of $cexA$ (B).

(4) *cexA* 過剰発現株の構築

プラスミド pGS-PgpdA を過剰発現用ベクターとして用いた⁴⁸⁾。*cexA* の ORF を NBRC4308 のゲノム DNA を鋳型としてプライマーセット pGSG-*cexA*-inf-F/ pGSG-*cexA*-inf-R により増幅した。増幅した断片を Sal I で処理した pGS-PgpdA に In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いてクローニングし、プラスミド pGS-PgpdA-*cexA* とした。pGS-PgpdA-*cexA* を $\Delta sC\Delta cexA$ と $\Delta sC\Delta laeA$ に導入し、 $\Delta cexA$ OE*cexA* と $\Delta laeA$ OE*cexA* を構築した。

(5) 細胞外・細胞内の有機酸濃度の測定

第 3 章 (12) と同様に行った。

(6) CAGE-Seq 解析

まず、分生子 (2×10^7) を 100 ml の最少培地に接種し、30°C で 36 h 前培養を行った。その後、菌体を 50 ml の CAP 培地に移して、さらに 30°C で 12 h 培養することでクエン酸生産を誘導した。その後、集菌し、液体窒素の存在下で乳鉢と乳棒を用いて菌体を破碎した。破碎した菌体からの RNA の抽出は、RNAiso plus (Takara Bio) と SV total RNA isolation system (Promega) を用いてキット付属のプロトコルにしたがって行った。

ライブラリー調整および、CAGE データの解析⁹²⁾は株式会社ダナフォーム (神奈川県) において行われた。CAGE-Seq 解析は、各菌株を 3 連で行った。5'キャッピングされた RNA から First-strand cDNA を転写し、CAGE バーコードタグを付加した後、NextSeq 500 system (Illumina) を用いてシーケンスし、BWA software (v0.5.9) を用いて白麴菌 NBRC4308 のゲノム DNA 配列⁹³⁾にマッピングした。転写開始地点は開始コドンの上流、下流 600 bp 以内と規定した。また RECLU pipeline を用いて発現変動を \log_2 ratio として計算した。取得された CAGE データは NCBI (National Center for Biotechnology Information) の GEO (Gene Expression Omnibus) に accession number GSE135849 として登録した。

(7) *cexA* の転写解析

まず、 2×10^7 個の分生子を 100 ml の最少培地に接種し、30°C で 36 h 前培養を行った。その後、50 ml の CAP 培地に移し、さらに 30°C で 12 h 培養することでクエン酸生産を誘導した。その後、菌体を集菌し、液体窒素の存在下で乳鉢と乳棒を用いて菌体を破砕した。RNA の抽出は RNAiso plus (Takara Bio) を用いて行い、cDNA の合成は PrimeScript Perfect Real-Time Reagent Kit (Takara Bio) を用いて行った。Real time RT-PCR は Thermal Cycler Dice Real-Time System MRQ (Takara Bio) と SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いて行った。プライマーセットは *cexA* の増幅のために AkcexA-RT-F/ AkcexA-RT-R を、*actA* の増幅のために AkactA-RT-F/ AkactA-RT-R を使用した。

(8) ChIP-qPCR

クロマチン免疫沈降 (ChIP) は、先行研究において報告された方法⁹⁴⁾を参考にして行った。ネガティブコントロールとして normal mouse IgG 抗体 (Cosmo Bio)、ポジティブコントロールとして anti-histone H3 抗体 from mouse (Medical and Biological Laboratories)、ユーロクロマチンマーカーとして anti-histone H3K4 me3 抗体 from mouse (Medical and Biological Laboratories)、ヘテロクロマチンマーカーとして anti-histone H3K9 me3 抗体 from mouse (Medical and Biological Laboratories) を使用した。タンパク質 200 mg あたり 2 μ g の抗体をクロマチン免疫沈降に使用した。DNA の定量は Thermal Cycler Dice Real-Time System MRQ (Takara Bio) と SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いた realtime PCR により行った。プライマーセットは *cexA*-ChIP-F/*cexA*-ChIP-R を用いた。なお、本プライマーがアニーリングする位置は *cexA* の開始コドンから +2~+26 (*cexA*-ChIP-F) と +238~+257 (*cexA*-ChIP-R) である。相対量 (% input DNA) は、免疫沈降により回収した DNA 量を input DNA 量で除することで算出した。

4.3 結果

(1) 白麹菌における LaeA 様推定メチルトランスフェラーゼ

A. nidulans の LaeA (AN0807) および、*A. niger* の LaeA (An01g12690) をクエリとして、NCBI の Protein BLAST 解析により、相同性 > 50%、E-value < 1.00E-100 を指標として、白麹菌に 3 つの LaeA 様推定メチルトランスフェラーゼ (AKAW_04823, AKAW_11001, AKAW_06012) を同定した。AKAW_04823 は *A. niger* の LaeA と 94% の相同性を示した。また、これら全ての 3 つの推定メチルトランスフェラーゼは *A. nidulans* の LaeA と Protein BLAST 解析において双方向ベストヒットを示した。さらに、アラインメント解析により、*S*-アデノシルメチオニン (SAM) 結合モチーフ³⁹⁾が保存されていた (Fig. 4.4A)。そこで、これら AKAW_04823, AKAW_11001, AKAW_06012 を LaeA, LaeA2, LaeA3 として解析した。

LaeA, LaeA2, LaeA3 の関係性を明らかにするため、*Aspergillus* genome database (AspGD; <http://www.aspgd.org/>) に登録されているデータを用いて、*Aspergillus* 属糸状菌の LaeA 様推定メチルトランスフェラーゼの系統樹を作成した (Fig. 4.4B)。その結果、LaeA は推定 LaeA オルソロググループに分類された。一方で、LaeA2 と LaeA3 は LaeA オルソログとは別のクラスターに分類されたが、*A. nidulans* の Llms (LaeA-like methyltransferase)⁹⁵⁾と比較して、より LaeA に近いことが示唆された。

A

```

AnidLaeA 134  P H P T N G R F L D L G C C G T G I W A I E V A N K Y P D A F V A G V D L A P I Q P P N H P K N C E F Y A P F D F E A P W A M G E D S W D L I H L Q M G C G S V M 213
AnigLaeA 132  P H P P N G R F L D L G C C G T G I W A I D V A H K Y P N A F V A G V D L A P I Q P P N H P D N C E F Y A P F D F E A P W T L G E N S W D L I H L Q M G C G S V L 211
AkawLaeA 132  P H P P N G R F L D L G C C G T G I W A I D V A H K Y P N A F V A G V D L A P I Q P P N H P D N C E F Y A P F D F E A P W T L G E N S W D L I H L Q M G S G S V L 211
AkawLaeA2 101 P H P R N G R F L D V G C C G T G I W A I D V A H E Y P N A F V V G V D L A P I Q P P N H P N C Q F Y A P F D F E S P W T L G E D S W D L I H L Q M G C G S V V 180
AkawLaeA3 152  P H P E N G R F L D L G C C G T G I W A I D I A R Q F P G A F V V G I D I A P I Q P S N K P E N G S F R A P F D L E S P W T L G E N E W D V I Y L R M G C G Y I S 131

AnidLaeA 214  G W P N L Y R R I F A H L R P G A W F E Q V E I D F E P R C D D R S L D G T A L R H W Y D C L K Q A T A E T M R P I A H S S R D T I K D I Q D A G E F T E 289
AnigLaeA 212  G W Q N L Y K R I L R H L Q P G A W F E Q V E I D F E P R C D D R S L N G L A L R E W Y Q Y L K Q A T Q D T M R P I A H S S R D T I R H L E E A G F T Q 287
AkawLaeA 212  G W P N L Y K R I L R H L Q P G A W F E Q V E I D F E P R C D D R S L D G L A L R E W Y Q Y L K Q A T Q D T M R P I A H S S R D T I R H L E E A G F T Q 287
AkawLaeA2 181 A W P N L Y R R I L R H L Q P G A W F E Q V E I D F E P R C D D C S L D G L A L D Q W Y Q C L K Q A T Q A T M R P I A H S R D T I R A L E E A G F T Q 256
AkawLaeA3 132  D W Q G L Y R K V Y A H L C D G G W L E Q I E I D F T P R S V R H T K G D C A M Q F W Y Q S L T Q A T E K A V R L A H C P Q W T M Q K L Q G A G E V E 207

```

B

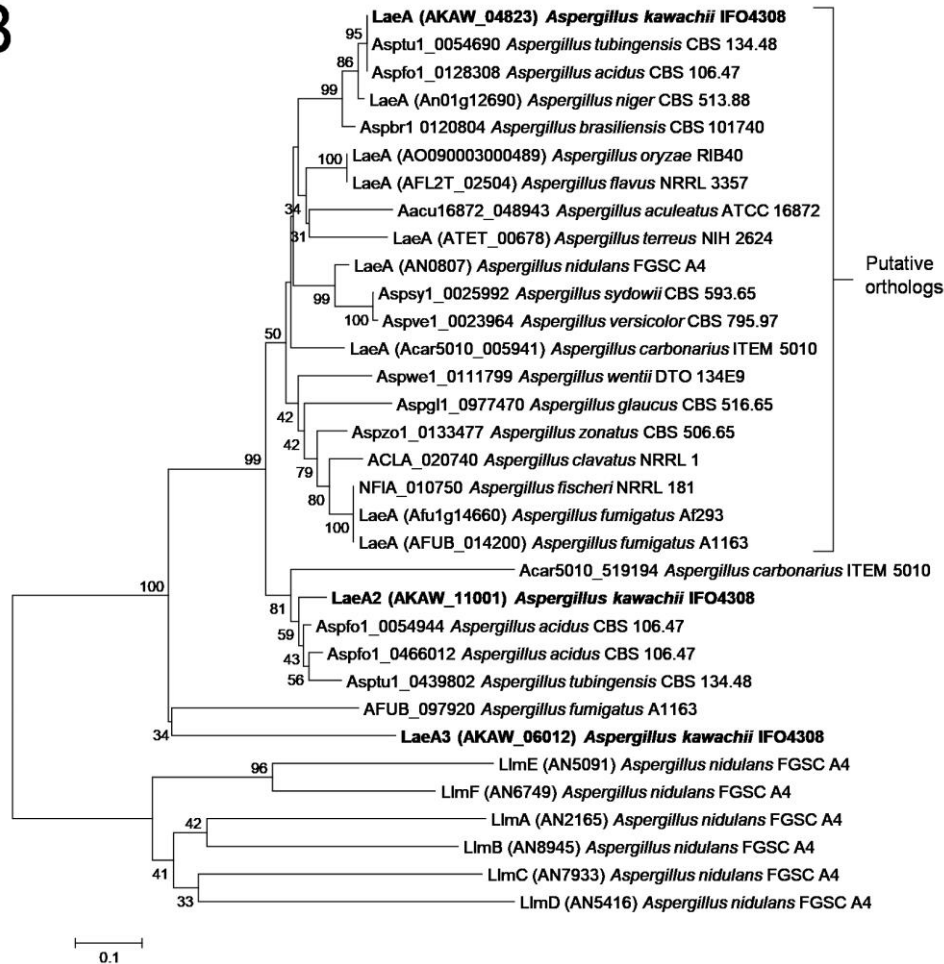


Fig. 4.4 (A) Putative methyltransferase domain sequences of *A. nidulans* (Anid) LaeA, *A. niger* (Anig) LaeA, and predicted *A. kawachii* (Akaw) LaeA-like proteins. The domains were identified by Pfam (<https://pfam.xfam.org/>). Sequence alignment was performed using ClustalW program in the BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Putative intron sequences of *A. kawachii laeA* and *laeA2* genes were confirmed by RNA-seq (data not shown) and translated to the amino acid sequences. Asterisk indicates a putative SAM binding site (11). (B) Phylogenetic tree of amino acid sequences of LaeA-like methyltransferases identified from the *Aspergillus* genome database (<http://www.aspgd.org/>). The tree was constructed via neighbor-joining method with complete gap deletion on MEGA version 6.0 (36). Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the branches. Low bootstrap values (<25) were removed.

(2) 各 *laeA* ホモログ遺伝子の破壊株の表現型

laeA、*laeA2*、*laeA3* の破壊株を構築し、表現型を観察した (Fig. 4.5A)。コントロール株は各破壊株と同じ栄養要求性を示す株とした。すなわち、コントロール株として *sC* 遺伝子の欠損株を使用した。 $\Delta sC\Delta laeA$ 株は最少培地上において、コントロール株や、 $\Delta sC\Delta laeA2$ 、 $\Delta sC\Delta laeA3$ 株と比較して、コロニー形態に違いはみられなかったが、菌糸面の色素が消失していることが示唆された (Fig. 4.5A)。この結果から、LaeA は *A. niger* での二次代謝を正に制御するという知見^{38,96)}と同様に、白麹菌の黄色色素の生産を正に制御することが示唆された。しかし、*A. niger* においては *laeA* の破壊により、最少培地においてコントロール株と比較して黄色色素の生産が増加すると報告されており³⁸⁾、白麹菌の *laeA* 破壊株の表現型と違いがみられた。さらに、pH 指示薬であるメチルレッドを添加した YPD 培地で培養したところ、 $\Delta sC\Delta laeA$ 株において、コントロール株においてみられるクエン酸生産による赤いハローが消失した (Fig. 4.5A)。この結果から、*laeA* が白麹菌のクエン酸生産に関与することが示唆された。

白麹菌のクエン酸生産機構におけるこれらの LaeA ホモログの役割を明らかにするために、各破壊株のクエン酸生産量について、CAP 培地を用いて比較した。最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 48 h 培養し、培養上清のクエン酸濃度、凍結菌体重量、および菌体量当たりのクエン酸生産量を測定した。その結果、 $\Delta sC\Delta laeA$ 株の培養上清中のクエン酸濃度はコントロール株の 0.07 倍に低下した (Fig. 4.5B)。一方、菌体量はコントロール株の 1.82 倍に増加した (Fig. 4.5C)。培養上清のクエン酸濃度および、菌体量に基づいて、 $\Delta sC\Delta laeA$ 株の菌体量当たりのクエン酸生産量はコントロール株の 0.04 倍に低下したことが明らかになった (Fig. 4.5D)。一方で、 $\Delta sC\Delta laeA2$ 、 $\Delta sC\Delta laeA3$ 株のクエン酸生産量はコントロール株と同等の値を示した。以上の結果から、LaeA はクエン酸生産およびクエン酸生産時における菌糸伸長に重要な役割をもつことが示唆された。

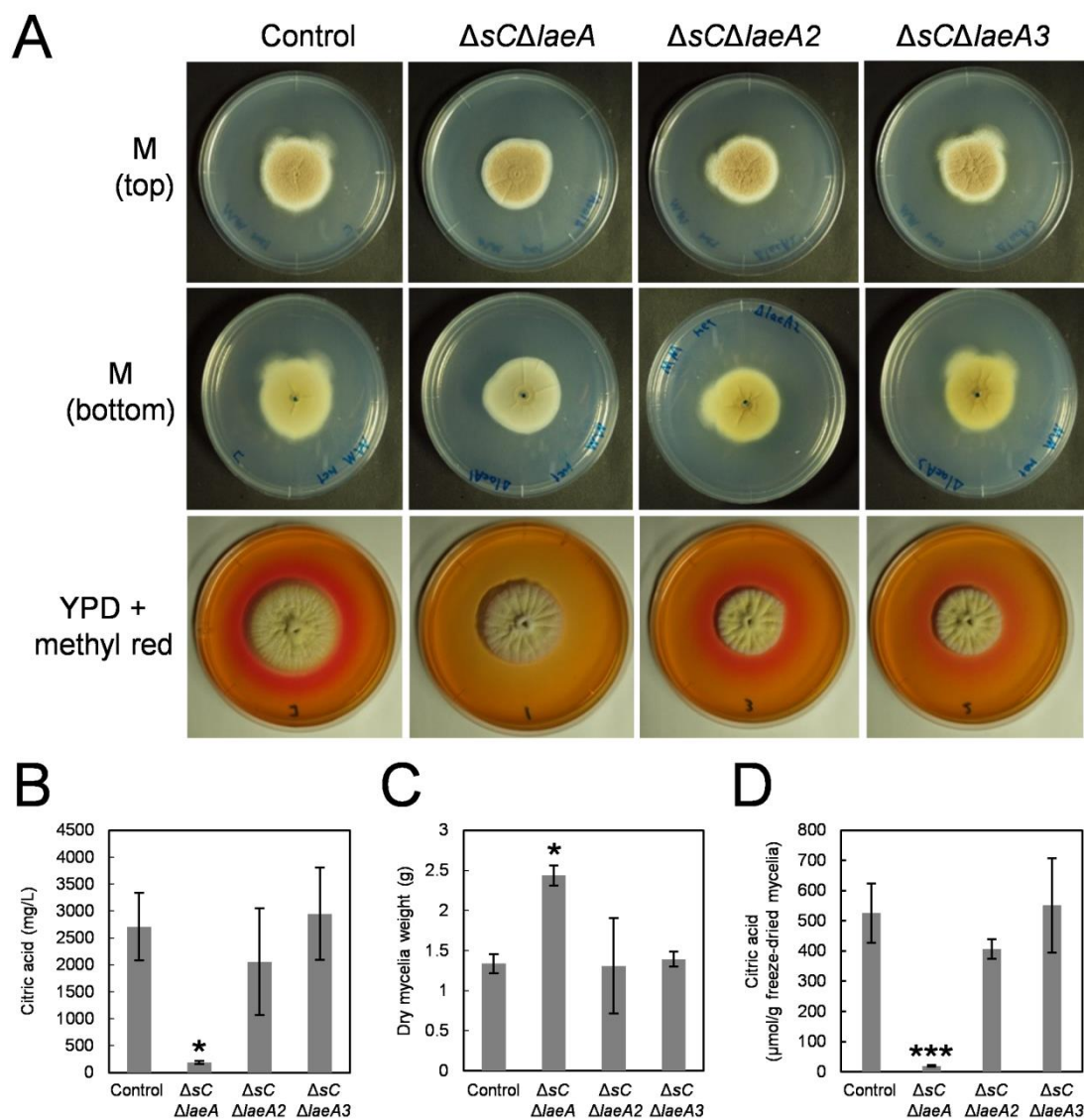


Fig. 4.5 (A) Colony formation of *A. kawachii* control, $\Delta sC\Delta laeA$, $\Delta sC\Delta laeA2$, and $\Delta sC\Delta laeA3$ strains. Strains were cultured at 30°C for 5 days on M medium or YPD medium containing methyl red. Agar medium was inoculated with 1×10^4 conidiospores. Methyl red was added as a pH indicator, which turned red at \leq pH 4.4. Citric acid concentration in culture supernatant (B), mycelial biomass (C), and extracellular citric acid productivity per mycelial weight (D) by *A. kawachii* strains; control, $\Delta sC\Delta laeA$, $\Delta sC\Delta laeA2$, and $\Delta sC\Delta laeA3$ strains were precultured in M medium for 36 h, then transferred to CAP medium for 48 h. Mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. Asterisks indicate a statistically significant difference (*, P value $<$ 0.05; ***, P value $<$ 0.001; Student's t-test) from the results for the control strain.

(3) *laeA* の相補実験

$\Delta sC\Delta laeA$ 株においてクエン酸生産量の低下がみられたため、*sC* マーカーを用いて *laeA* 遺伝子の相補 ($\Delta laeA+laeA$) を行った。また、相補株と栄養要求性を揃えるため、 $\Delta sC\Delta laeA$ 株に *sC* の相補 ($\Delta laeA$) を行った。これらの菌株を最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 48 h 培養し、クエン酸生産を評価した。培養上清を細胞外面分として、また菌体から有機酸を抽出して細胞内画分として各種有機酸の比較を行った。まず、細胞外面分において、 $\Delta laeA$ 株はクエン酸濃度がコントロール株と比較して 0.08 倍に低下した (Fig. 4.6A)。次に、リンゴ酸と 2-オキシグルタル酸濃度もそれぞれ 0.64 倍、0.70 倍と低下傾向にあったものの、統計的に有意な差はみられなかった。また、これら細胞外面分の有機酸濃度の低下は *laeA* 遺伝子の相補により回復した。

一方、細胞内画分において $\Delta laeA$ 株はコントロール株と比較して、クエン酸濃度が 0.46 倍、リンゴ酸濃度が 0.55 倍、2-オキシグルタル酸濃度が 0.46 倍に低下した (Fig. 4.6B)。細胞内のクエン酸濃度とリンゴ酸濃度については *laeA* 遺伝子の相補により回復したものの、2-オキシグルタル酸濃度については $\Delta laeA+laeA$ 株においてもコントロール株の 0.71 倍程度までにしか回復しなかった。

以上の結果より、**LaeA** は細胞内と細胞外の両方における有機酸生産に関与しており、特に細胞外のクエン酸の蓄積において重要な役割をもつことが示唆された。

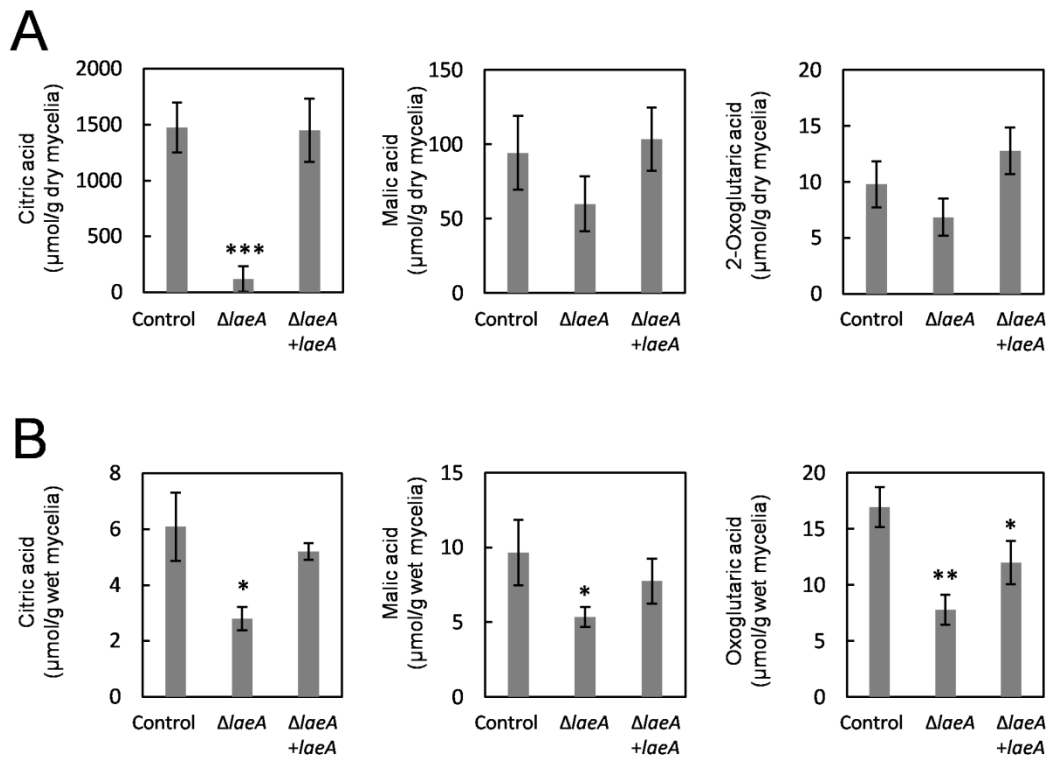


Fig. 4.6 Extracellular (A) and intracellular (B) organic acid production by *A. kawachii* strains. The control, $\Delta laeA$, $\Delta laeA + laeA$ strains were precultured in M medium for 36 h, then transferred to CAP medium for 48 h. Mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. Asterisks indicate statistically significant difference (*, P value < 0.05; **, P value < 0.01; ***, P value < 0.001; Student's t-test) from the results for the control strain.

(4) 各株の生育や分生子形成能

LaeA の生理的役割を明らかにするため、コントロール株と $\Delta laeA$ 株、 $\Delta laeA+laeA$ 株の生育を比較した (Fig. 4.7A)。 $\Delta laeA$ 株はコントロール株、 $\Delta laeA+laeA$ 株と比較して pH6.5 の最少培地上においてコロニーサイズがわずかに小さくなった。さらに、この表現型は pH3 で回復し、逆に pH10 で悪化した。

また、 $\Delta laeA$ 株は 0.8 M NaCl を含有する最少培地において、分生子の着生に異常がみられた。一方、この表現型は 0.6 M KCl 含有最少培地では見られなかった。そこで、各培地で 5 日間培養した後、分生子を回収し、コロニー面積あたりの分生子数について比較した (Fig. 4.7B)。 $\Delta laeA$ 株は 0.8 M NaCl 含有最少培地において、コントロール株と比較して分生子形成能が 0.13 倍に低下し、一方で、最少培地においては 1.32 倍に増加した。この表現型は *laeA* の相補により回復したが、 $\Delta laeA+laeA$ 株は 0.6 M KCl 含有最少培地においてコントロール株と比較して 1.26 倍に分生子形成能が増加した。

以上の結果から、NaCl に特異的な高浸透圧条件において、LaeA は分生子形成に重要であることが示唆された。分生子形成能の低下については、*A. oryzae* や *Penicillium chrysogenum* において *laeA* の破壊により、分生子形成能が低下するという報告と一致した^{43,97)}。なお、*A. nidulans* において LaeA は有性世代にも重要な役割をもつことが報告されているが⁴⁰⁾、白麹菌において有性世代は確認されておらず、*laeA* 破壊による影響は観察できなかった。

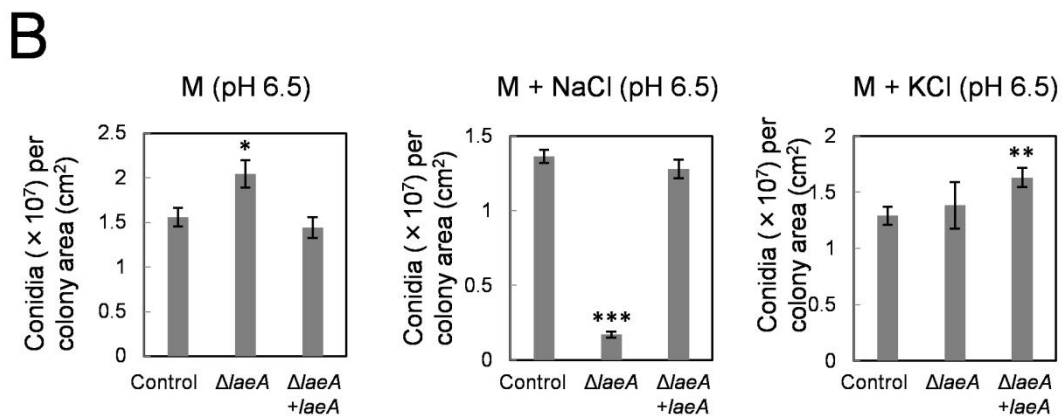
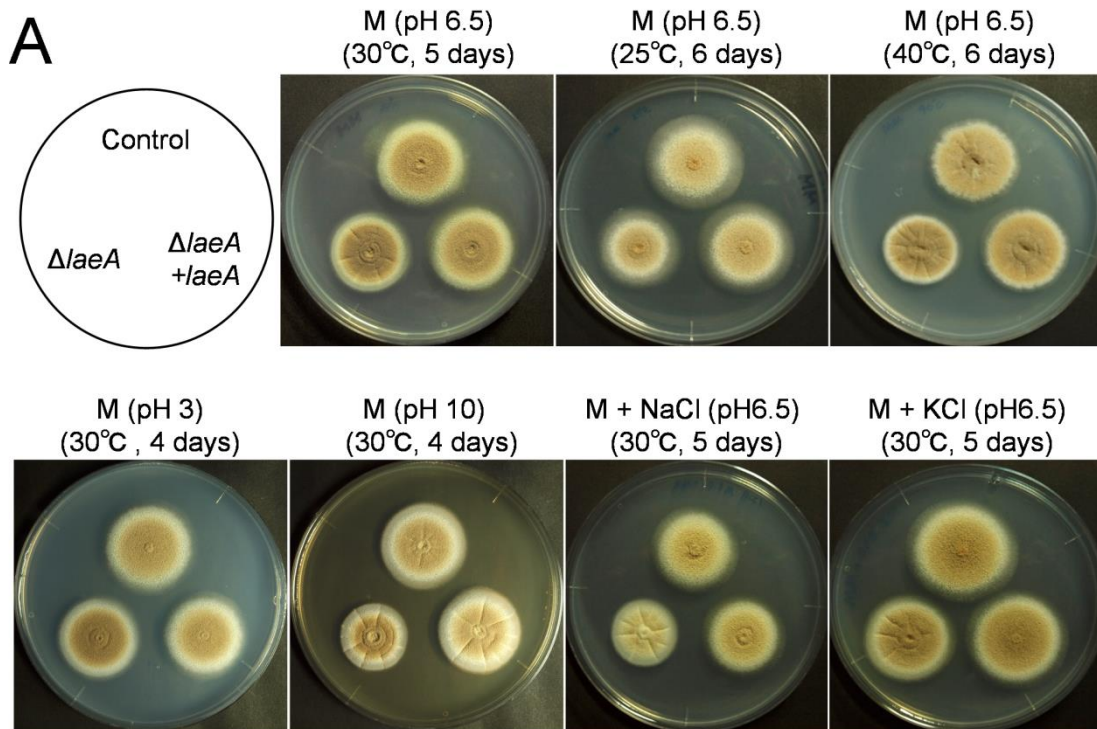


Fig. 4.7 Strains were cultured on M medium with or without stress conditions, and agar medium was inoculated with 1×10^4 conidia. (A) Colony morphology of *A. kawachii* control, $\Delta laeA$, $\Delta laeA + laeA$ strains. (B) Conidiation of *A. kawachii* control, $\Delta laeA$, $\Delta laeA + laeA$ strains. All results are expressed as mean with standard deviations. Asterisks indicate a statistically significant difference (*, P value < 0.05; **, P value < 0.01; ***, P value < 0.001; Student's t-test) from the results for the control strain.

(5) クエン酸生産に関連する遺伝子の発現変動

クエン酸生産時において、LaeA が制御する遺伝子について明らかにするため、コントロール株と $\Delta laeA$ 株の遺伝子発現プロファイルについて比較した。最少培地で 36 h 前培養後、CAP 培地で 12 h 培養することでクエン酸生産を誘導した。得られた菌体から RNA を抽出し、遺伝子発現を CAGE-Seq により解析した。

CAGE により検出できた全 9,647 遺伝子について解析を行った。コントロール株と $\Delta laeA$ 株間の遺伝子発現変動について、false discovery rate (FDR) <0.05 かつ log fold change <-0.5 または >0.5 となる遺伝子を有意差有りとして解析した。その結果、1,248 遺伝子を抽出し、590 遺伝子の発現が上昇し、658 遺伝子の発現が低下していることが示唆された。Gene Ontology enrichment 解析の結果、代謝や輸送に関わる遺伝子群が多く含まれることが明らかとなったが、*laeA* の破壊によりクエン酸生産性を低下させた原因を解明するのは困難であった (data not shown)。

そこで、次にクエン酸生産に関連する代謝系について、遺伝子発現変動があった 15 遺伝子についてマッピングを行った (Fig. 4.8, Table 4.3)。例えば、グリセロール合成系に関与する [#1 (AKAW_07170) と #12 (AKAW_08691)] や、ペントース-リン酸経路に関与する [#11 (AKAW_00489)] は *laeA* の破壊により発現量が上昇していた。一方で、Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway に関与する [#2 (AKAW_04737) と #3 (AKAW_03026)] や、TCA 回路のクエン酸合成酵素である [#4 (AKAW_00170) と #5 (AKAW_06223)] は *laeA* の破壊により発現量が低下していた。特に #5 (AKAW_06223) は log fold change -11.35 と、これら遺伝子の中で最も発現量が低下していた。しかしながら、AKAW_06223 はクエン酸合成酵素のオルソログにおいて発現レベルは低いため、クエン酸高生産に対する寄与は少ないことが考えられた。

次に、*A. niger* においてクエン酸高生産に重要であることが推測されているクエン酸の排出に関与するクエン酸輸送体について注目した¹⁹⁻²¹⁾ (Table 4.4)。我々は第 3 章において、ミトコンドリア局在型クエン酸輸送体をコードする *ctpA* (AKAW_03754) と *yhmA*

(AKAW_06280) がミトコンドリアから細胞質へのクエン酸排出を通して、クエン酸高生産に重要であることを明らかにした⁹¹⁾。しかしながら、これらの遺伝子発現は *laeA* の破壊によっては変動していなかった。一方、最近 *A. niger* において細胞質膜のクエン酸輸送体であると推定された CexA^{98,99)} のホモログをコードする AKAW_07989 の発現が、*laeA* の破壊により log fold change -6.09 と顕著に低下することが明らかとなった。なお、AKAW_07989 と *A. niger* の CexA のアミノ酸相同性は 96% であり、AKAW_07989 が白麹菌における CexA であると推察された。

$\Delta laeA$ 株の細胞外クエン酸濃度はコントロール株と比較して顕著に低下していたため (Fig. 4.5A)、*cexA* の発現の低下が細胞外のクエン酸の蓄積に与える影響について着目した。

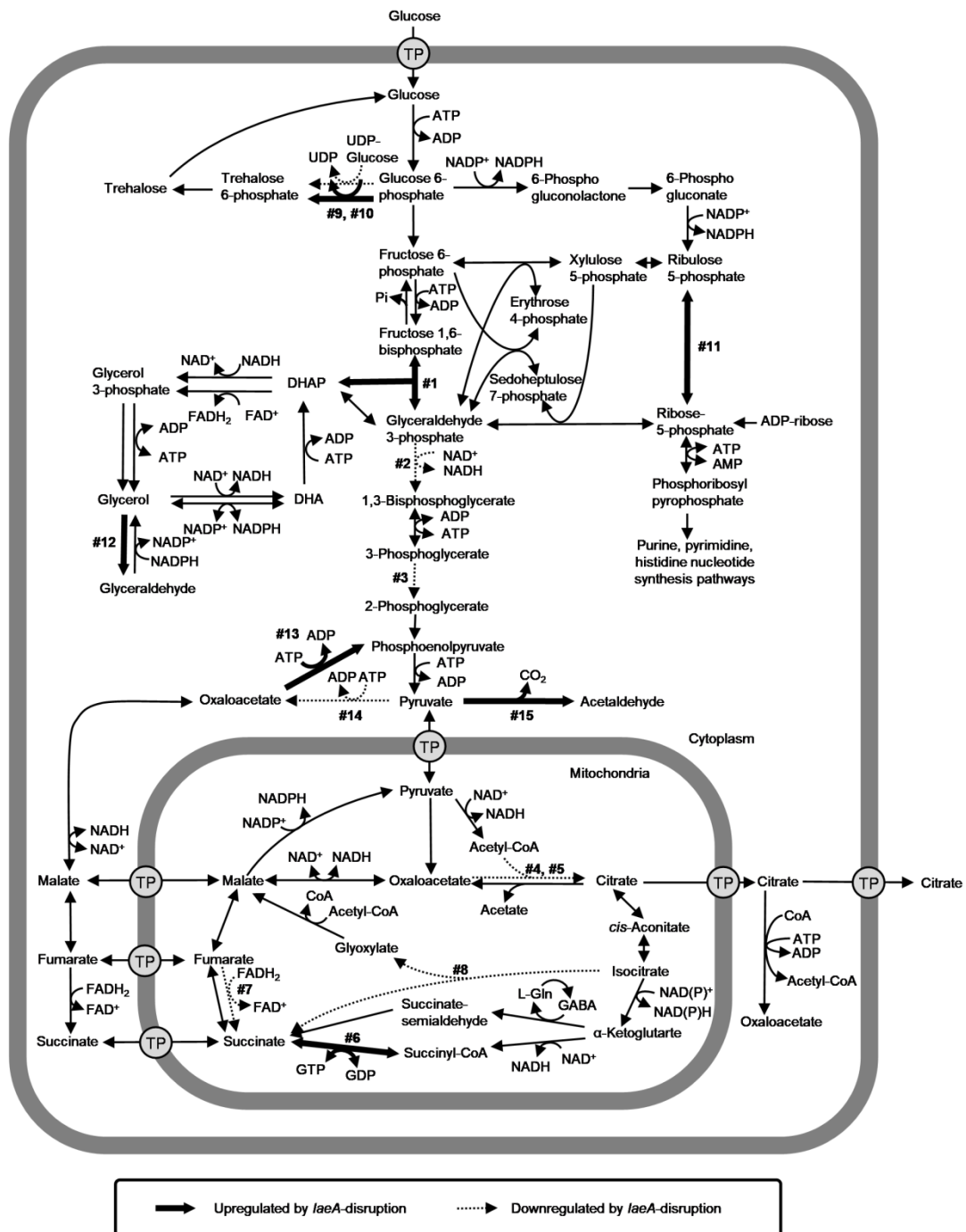


Fig. 4.8 Differentially expressed genes mapped on the proposed metabolic pathways of *A. kawachii*. Pathway was constructed based on the metabolic model of *A. niger* and *A. nidulans* (37-39). The glyoxylate shunt was placed in the mitochondria. Bold and dashed arrows indicate downregulated and upregulated reactions due to *laeA* disruption, respectively. Numbers (1~15) next to the arrows correspond to the numbering of locus tags in Table 2. Abbreviations: CoA, coenzyme A; DHA, dihydroxyacetone; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FAD, flavin adenine dinucleotide; Gln, glutamine; TP, trans porter; UDP, uridine diphosphate.

Table 4.3. Citric acid production-related genes among up- and downregulated genes following *laeA* disruption.

Reaction no. in Fig.5	Locus tag	Putative function	Log2-fold d	FDR
#1	AKAW_07170	Fructose-bisphosphate aldolase	4.01	0.0011
#2	AKAW_04737	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-1.05	0.0005
#3	AKAW_03026	Phosphoglycerate mutase	-0.78	0.0335
#4	AKAW_00170	Citrate synthase	-0.92	0.0014
#5	AKAW_06223	Citrate synthase	-11.35	1.10E-98
#6	AKAW_07594	Succinate-CoA ligase (GDP-forming) alpha chain	1.27	0.0052
#7	AKAW_07352	Succinate dehydrogenase	-0.71	0.0352
#8	AKAW_00119	Isocitrate lyase	-1.40	1.063E-05
#9	AKAW_05189	Alpha,alpha-trehalosephosphate synthase (UDP-forming) 1 (tpsA, tpsB)	-0.76	0.0108
#10	AKAW_03597	Alpha,alpha-trehalosephosphate synthase (UDP-forming) 1 (tpsA, tpsB)	0.87	0.0024
#11	AKAW_00489	Ribose-5-phosphate isomerase (B)	1.03	0.0035
#12	AKAW_08691	Alcohol oxidase	1.65	3.18E-09
#13	AKAW_02095	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	0.80	0.0139
#14	AKAW_00804	Pyruvate carboxylase (cytosol)	-1.15	0.0168
#15	AKAW_06947	Pyruvate decarboxylase	0.83	0.0205

Table 4.4. Gene expression change of citric acid excretion-related genes following *laeA* disruption.

Gene	Locus tag	Putative function	Log2-fold change	FDR
<i>ctpA</i>	AKAW_03754	Mitochondrial citrate transporter	0.08	0.9432
<i>yhmA</i>	AKAW_06280	Mitochondrial citrate transporter	0.09	0.9313
<i>cexA</i>	AKAW_07989	Plasma membrane localized citrate exporter	-6.09	3.72E-35

(6) *laeA* 破壊株における *cexA* の強制発現

laeA の破壊により、*cexA* の発現が低下することがクエン酸低生産変異の原因かどうかを明らかにするため、コントロール株、 $\Delta laeA$ 株、 $\Delta cexA$ 株、 $\Delta laeA OE cexA$ 株、 $\Delta cexA OE cexA$ 株のクエン酸生産性について解析した (Fig. 4.9A)。強制発現にはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *gpdA*^{100,101} のプロモーターを用いた。なお、CAGE-Seq のデータから、*gpdA* はコントロール株と $\Delta laeA$ 株で発現が変動せず、LaeA の制御下でないことを確認した。

各株を最少培地で 36 h 前培養後、CAP 培地で 48 h 培養し、菌体量当たりのクエン酸生産量を比較した (Fig. 4.9A)。 $\Delta cexA$ 株は $\Delta laeA$ 株と同様に、細胞外のクエン酸の蓄積はほとんどみられず、コントロール株と比較して約 0.01 倍に低下した。また、 $\Delta laeA OE cexA$ 株と $\Delta cexA OE cexA$ 株はコントロール株と比較して、それぞれ 2.33 倍、3.35 倍にクエン酸生産量が増加した。 $\Delta laeA OE cexA$ 株は $\Delta cexA OE cexA$ 株とほぼ同様のクエン酸生産量を示したことから、 $\Delta laeA$ 株のクエン酸低生産の主要な原因が *cexA* の発現量の低下であることが示唆された。

(7) *cexA* の転写誘導性

上記の解析から、*cexA* の発現低下が $\Delta laeA$ 株のクエン酸低生産の主要な原因であることが示唆された。そこで、コントロール株と $\Delta laeA$ 株、 $\Delta laeAOEcexA$ 株における *cexA* の転写誘導性を比較した (Fig. 4.9B)。各株を最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 12 h 培養しクエン酸生産を誘導した。この時、前培養した菌体からも RNA を抽出して培養 0 h として解析した。コントロール株では、CAP 培地で 12 h 培養することで、0 h と比較して 24 倍 *cexA* の転写量が上昇した。一方、 $\Delta laeA$ 株においては 0 h と 12 h の *cexA* の転写量に違いがみられなかった。この結果から、LaeA は *cexA* の転写誘導に重要な役割をもつことが示唆された。一方、 $\Delta laeAOEcexA$ 株は培養 12 h においてはコントロール株と同様の *cexA* の転写量を示したが、0 h 目においてはコントロール株と比較して 66 倍高かった。このことから、 $\Delta laeAOEcexA$ 株がコントロール株と比較して高いクエン酸生産性を示すのは、CAP 培地での培養初期から *cexA* の転写が活発であることが原因である可能性が示唆された。

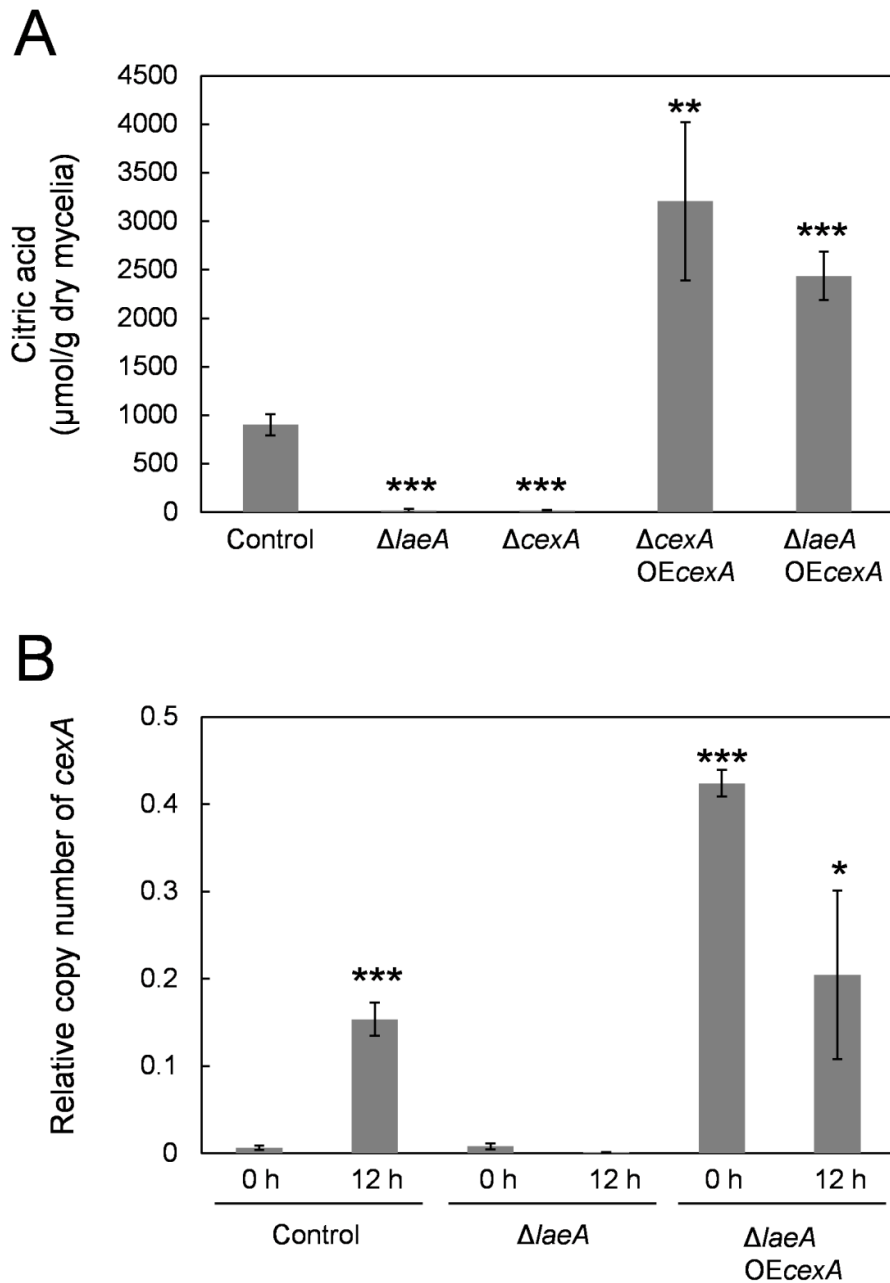


Fig. 4.9 (A) Extracellular citric acid production by *A. kawachii* strains. The control, $\Delta laeA$, $\Delta cexA$, $\Delta cexA$ OEcexA, and $\Delta laeA$ OEcexA strains were cultured as described. Mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. Asterisks indicate a statistically significant difference (**, P value <0.01; ***, P value <0.001; Student's t-test) from the results for the control strain. (B) Transcriptional levels of *cexA*; control, $\Delta laeA$, and $\Delta laeA$ OEcexA strains were precultured in M medium for 36 h, then transferred to CAP medium and further cultured for 0 or 12 h. Mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. Asterisks indicate a statistically significant difference (*, P value < 0.05; ***, P value <0.001; Student's t-test) from the results for the control strain cultured for 0 h.

(8) *cexA* プロモーター周辺のヒストンメチル化レベル

LaeA はヒストンのメチル化修飾に関与することで遺伝子発現を制御すると考えられている^{39,102,103}。そこで、LaeA に依存した *cexA* のヒストン修飾による発現制御機構を明らかにするため、コントロール株と $\Delta laeA$ 株において、anti-histone H3 抗体、anti-histone H3K4 me3 抗体、anti-histone H3K9 me3 抗体を用いた ChIP-qPCR 解析を行った。H3K4 me3 はユークロマチン領域の指標であり、H3K9 me3 はヘテロクロマチン領域の指標である。

ChIP-qPCR 解析の結果、*cexA* 領域のヒストン H3 の占有率はコントロール株と $\Delta laeA$ 株において違いは認められなかった (Fig. 4.10A)。一方、 $\Delta laeA$ 株の H3K4 me3 (ユークロマチンマーカー) 占有率はネガティブコントロールと同等の値まで低下しており (Fig. 4.10B)、H3K9 me3 占有率 (ヘテロクロマチンマーカー) はコントロール株と比較して上昇していた (Fig. 4.10C)。以上の結果より、LaeA はヒストン修飾を介して白麴菌の *cexA* 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で、*cexA* の発現を制御することが示唆された。

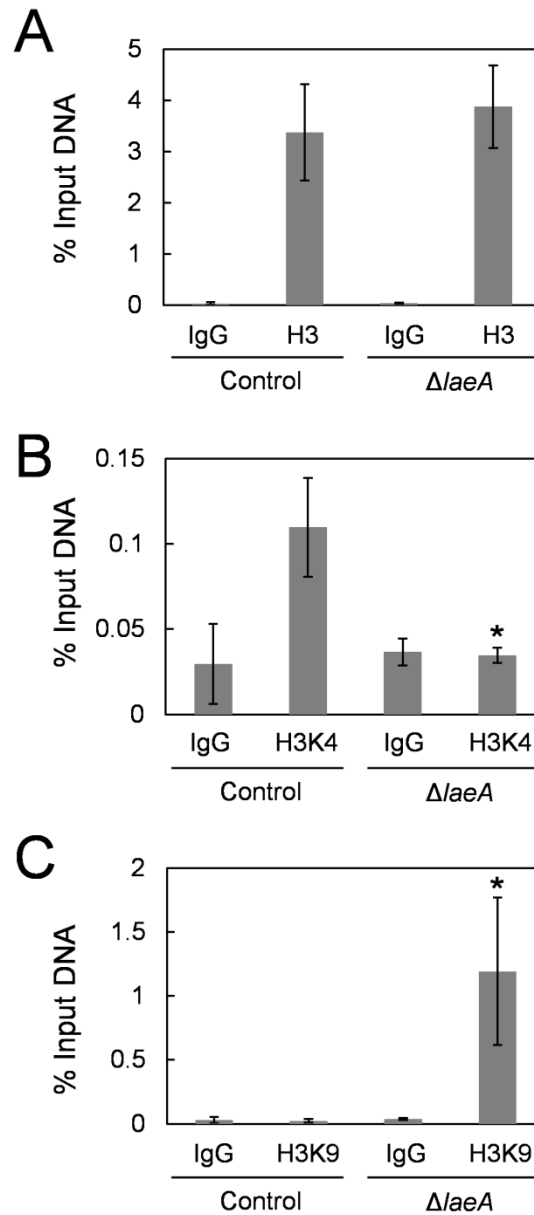


Fig. 4.10 ChIP-qPCR of *cexA* promoter region; control and $\Delta laeA$ were cultured as described. (A) Histone H3, (B) histone H3K4 me3, and (C) histone H3K9 me3 occupancies of the *cexA* promoter region were investigated. The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent cultivations. Asterisks indicate a statistically significant difference (*, P value < 0.05; Student's t-test) from the results for the control strain.

4.4 考察

本研究では *LaeA* 様推定メチルトランスフェラーゼである *LaeA*、*LaeA2*、*LaeA3* の解析を行い、白麴菌において *LaeA* がクエン酸高生産に重要であることを明らかにした。*LaeA* が *Aspergillus* 属系状菌において高度に保存されているのに対して、*LaeA2* と *LaeA3* は全てでは保存されていなかった (Fig. 4.4B)。*LaeA2* は *Aspergillus* section *Nigri* に属する *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010 や、*Aspergillus acidus* CBS 106.47、*Aspergillus tubingensis* CBS 134.48 などに保存されていたが、*A. niger* CBS 513.88 には保存されていなかった。また、*LaeA3* は白麴菌の他に *A. fumigatus* A1163 にのみ保存されていた。このことから、*LaeA2* と *LaeA3* は、*LaeA* のパラログであると考えられた。

白麴菌において、*laeA* の破壊によってのみクエン酸生産能が消失した。この結果は *A. niger* や *A. carbonarius* において *laeA* がクエン酸高生産に必要であるという報告と一致した^{38,104)}。

LaeA は二次代謝や形態形成の制御因子として知られている^{39,102,103)}。白麴菌においても、*laeA* の破壊により、菌糸面の黄色色素が消失し (Fig. 4.4A)、分生子形成に異常がみられた (Fig. 4.6B)。白麴菌の $\Delta laeA$ 株は、KCl による浸透圧ストレス時には異常がみられなかったが、NaCl による浸透圧ストレス時に分生子形成に異常がみられたことから、*LaeA* はナトリウム特異的なストレス環境下における分生子形成に重要である可能性が示唆された。Na⁺ は Na⁺/K⁺比が高い場合に毒性を示すことが知られており、ナトリウム輸送体などによって細胞外へ排出する必要がある¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。しかし、 $\Delta laeA$ 株においてナトリウム輸送体をコードすると推定される Nha1 (AKAW_09133 および AKAW_03679) や Nhx1 (AKAW_07982) の発現レベルの変化はみられなかった。また、同様にナトリウム輸送体をコードすると推定される Ena1 (AKAW_08368 および AKAW_08719) については CAGE 解析により転写開始点と ORF を紐付けることが出来なかった。

CAGE-Seq により、 $\Delta laeA$ 株における 1,248 遺伝子の発現変動を同定した。これらの内訳は発現上昇が 590、発現低下が 658 遺伝子と発現上昇遺伝子と発現低下遺伝子の数がほぼ同

じであった。LaeA はそれらの遺伝子を直接制御しているだけでなく、少なくとも 9 つの転写制御因子（発現上昇した *lreB* [AKAW_00032]¹⁰⁸⁾、*tamA* [AKAW_02564]¹⁰⁹⁾、*dbaA* [AKAW_01762]¹¹⁰⁾ および発現低下した *amyR* [AKAW_09854]¹¹¹⁾、*zipA* [AKAW_05495]¹¹²⁾、*oefC* [AKAW_03045]¹¹³⁾、*farB* [AKAW_07498]¹¹⁴⁾、*cpcA* [AKAW_00007]¹¹⁵⁾、*devR* [AKAW_08419]¹¹⁶⁾）を介して遺伝子発現を間接的に制御している可能性も示唆された。

CAGE-Seq により、 $\Delta laeA$ 株において推定細胞質膜局在型クエン酸輸送体 *cexA* 遺伝子の発現が顕著に低下していることを明らかにした。また、*cexA* の強制発現は、 $\Delta laeA$ 株のクエン酸生産能を回復させることが明らかとなった (Fig. 4.8A)。さらに、コントロール株において、最少培地から CAP 培地に移すことで *cexA* の転写量が上昇したが、 $\Delta laeA$ 株においてはこの誘導が起きなかったことから、LaeA は *cexA* の発現誘導に重要な役割をもつことが示唆された。LaeA の分子機能の詳細は未だ未解明な部分が多く残されているが^{39,102,103,117)}、*A. nidulans* において、LaeA はヘテロクロマチンタンパク質 HepA とヒストン H3K9 メチルトランスフェラーゼである ClrD による二次代謝生産遺伝子クラスターのヘテロクロマチン化に拮抗して働くことが知られている¹¹⁸⁾。ChIP-qPCR の結果から、 $\Delta laeA$ 株において *cexA* プロモーター周辺のユークロマチン領域が消失しており、逆に、HepA (AKAW_02119) や ClrD (AKAW_07568) によるヘテロクロマチン化が促進されていることが示唆された。 $\Delta laeA$ 株において、AKAW_02119 と AKAW_07568 の発現量に変化はみられなかったものの、LaeA の欠損により、ヒストン修飾のバランスや、ユークロマチン/ヘテロクロマチン比が崩壊した可能性が考えられる。LaeA によるヒストン修飾の分子機構は今後の研究により明らかにする必要がある。また、*cexA* の転写制御因子についても未解明であり、さらなる研究の発展が期待される。

4.5 小括

以上の結果より、LaeA は *cexA* のプロモーター周辺のヒストン修飾を介して *cexA* の発現を正に制御することでクエン酸生産を制御することが示唆された。

第5章 総括

白麹菌が黒麹菌のアルビノ変異体であることは認められていたが⁵⁾、その原因は同定されていなかった。本研究により、白麹菌 NBRC4308 株のアルビノ変異の原因が、DHN-melanin 骨格を形成するためのポリケチド合成酵素遺伝子 *pksP* の 1 塩基欠損であることが明らかになった¹¹⁹⁾。加えて、白麹菌の分生子を黒色化することにより、分生子に UV や酸化ストレス、イオンビーム耐性を付与すること、また、分生子数を増加させることが明らかになった。黒色化による分生子数の増加は、白麹菌においては DHN-melanin の合成ができないため、分生子の成熟が遅れていることを意味すると考えている。これらの結果は白麹菌と黒麹菌の性質の違いを理解し、焼酎製造において白麹と黒麹を使い分ける上で重要な知見である。

また、白麹菌のクエン酸高生産に関与するクエン酸輸送体は未同定であったが、ミトコンドリアから細胞質へのクエン酸輸送に 2 つのクエン酸輸送体 CtpA と YhmA が関与することを明らかにした⁹¹⁾。精製酵素の基質特異性と細胞内有機酸濃度から CtpA はリンゴ酸を、YhmA はオキシグルタル酸またはリンゴ酸をミトコンドリアに輸送すると予測された。これは *A. niger* における代謝モデルにおいて、ミトコンドリアのクエン酸輸送体はクエン酸とリンゴ酸を交換輸送するという仮説と一致した²¹⁾。また、CtpA と YhmA が排出するクエン酸は細胞外へのクエン酸生産だけでなく、細胞質におけるアセチル-CoA 合成にも重要であることが示唆された。また、クエン酸高生産条件 (CAP 培地) における細胞内アセチル-CoA 濃度はクエン酸低生産条件 (最少培地) と比較して 1/100 程度であり、クエン酸高生産時においては、細胞内のクエン酸がアセチル-CoA 合成系にほとんど供給されていない可能性が示唆された (data not shown)。白麹菌がなぜアセチル-CoA 合成に重要であるはずのクエン酸を菌体外に排出してしまうのかについては現在でも未解明である。*A. niger* においては、シデロフォアと同様にクエン酸が鉄をキレートすることで、環境中の鉄を効率良く利用す

るためにクエン酸を排出している可能性が指摘されている¹²⁰⁾。また、pHを下げることで環境中の外敵の生育を抑制している可能性も考えられる。今後、クエン酸排出の意義の解明をとおして、白麹菌や *A. niger* の自然環境中における生態を明らかにできることが期待される。

これまでに、*A. niger* において、糸状菌の形態分化や二次代謝のレギュレーターとして知られている推定メチルトランスフェラーゼ *LaeA* がクエン酸高生産においても重要な役割をもつ可能性が報告されていたが³⁸⁾、クエン酸高生産時にどのような遺伝子の発現を制御するのかについては不明であった。本研究により、*LaeA* が推定細胞質膜局在型クエン酸輸送体遺伝子 *cexA* のプロモーター領域のクロマチン構造の開閉に重要である可能性が示唆された。クエン酸は TCA 回路の中間代謝物であるという点では一次代謝物であるが、クエン酸の高分泌生産は培養後期に起きることから典型的な二次代謝生産であると言われている¹²¹⁾。これらの現象を説明する上で、糸状菌において広範な二次代謝合成遺伝子の発現を制御する *LaeA* が、細胞外へのクエン酸排出を行う *CexA* を制御するという知見は納得がいくものであった。

LaeA のヒストンへのメチル基転移活性は証明されていないが^{117, 103)}、*laeA* 破壊株において、*cexA* 遺伝子のプロモーター周辺のヒストン修飾のバランスが崩れることが明らかとなった。特にヒストン H3K9 のメチル化修飾が顕著に増加しており、ヘテロクロマチン化が促進されていることが示唆された。*A. nidulans* においてはこの修飾を担う酵素である *ClrD* やヘテロクロマチンタンパク質 *HepA* を破壊することにより、二次代謝物が増加することが報告されている¹¹⁸⁾。白麹菌においてもこれらのタンパク質が *cexA* 遺伝子領域のヘテロクロマチン化を行っている場合、破壊することによって従来よりもクエン酸を高生産する可能性があり、育種の指標として重要になる可能性も考えられる。その一方で一般的に遺伝子発現を負に制御し、糸状菌において二次代謝を抑制することが知られているサーチュイン^{122,123)} のホモログの1つである *SirD* を破壊した場合、クエン酸生産は低下したことから¹²⁴⁾、

白麴菌のクエン酸生産は、より複雑なエピジェネティックな制御を受けていることが予測される。また、*cexA* の転写を直接制御する転写因子も未同定であり、今後これらを明らかにすることで、クエン酸をはじめとする有機酸等の有用物質生産を制御する技術の発展に貢献できると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻、並びに研究者としての在り方をご教授賜りました鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター准教授 二神泰基博士に深甚なる謝意を表します。

また、本論文の審査並びにご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター教授 玉置尚徳博士、佐賀大学農学部教授 後藤正利博士に厚く感謝いたします。

本論文の審査並びにご校閲の労を賜りました鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター教授 高峯和則博士、琉球大学農学部教授 外山博英博士に厚く感謝いたします。

研究遂行にあたり、ご助言を賜りました鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター准教授 吉崎由美子博士、特任助教 奥津果優博士、滋賀県立大学環境科学部講師 泉津弘佑博士、鹿児島工業高等専門学校特命准教授 森一樹博士、鹿児島大学研究推進機構 研究支援センター技術専門職員 尾上昌平氏、技術職員 久保臣悟氏に厚く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、苦楽をともにした醸造微生物学研究室並びに、焼酎製造学研究室の卒業生、在校生諸氏に厚く感謝いたします。

遠方より陰ながら支えてくれた家族、親族、友人に心からの謝意を表します。

博士課程の研究期間の資金援助を賜りました日本学術振興会に深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Akiyama H. 2010. Sake: the essence of 2000 years of Japanese wisdom gained from brewing alcoholic beverages from rice. *Brewing Society of Japan*, Tokyo, Japan.
2. Kitamura Y, Kusumoto K, Oguma T, Nagai T, Furukawa S, Suzuki C, Satomi M, Magariyama Y, Takamine K, Tamaki H. 2016. Ethnic fermented foods and alcoholic beverages of Japan. p 193–236. *In* Tamang JP (ed), *Ethnic fermented foods and alcoholic beverages of Asia*, Springer India, New Delhi, India.
3. Suganuma T, Fujita K, Kitahara K. 2007. Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of alpha-amylases from acid-producing koji. *J Biosci Bioeng* 104:353–362. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.353>.
4. <https://www.jozo.or.jp/koujikinnituuite2.pdf>
5. 北原覚雄, 吉田満智子. 1949. 醸工, 27, 162–166
6. 北原覚雄. 1974. アルコール工業におけるアミラーゼ, 日本のアルコールの歴史: その事業と技術 (協和醸酵工業, 東京), 244
7. Yamada O, Takara R, Hamada R, Hayashi R, Tsukahara M, Mikami S 2011. Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233–237
8. Hong SB, Lee M, Kim D. H, Varga J, Frisvad J. C, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson R. A. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One*, 8, e63769
9. Hong SB, Yamada O, Samson R. A. 2014. Taxonomic re-evaluation of black koji molds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 555–561
10. Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung K. J. 1998. The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.*, 180, 3031–3038

11. Takahashi T, Mizutani O, Shiraiishi Y, Yamada O. 2011. Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 529–534
12. Jørgensen TR, Park J, Arentshorst M, van Welzen A. M, Lamers G, Vankuyk PA, Damveld RA, van den Hondel CA, Nielsen K. F, Frisvad J. C, Ram A. F. 2011. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.*, 48, 544–553
13. 後藤正利, 二神泰基, 梶原康博, 高下秀春 2014. 焼酎麹菌の Identity を探る. *醸協*, 109, 219–227
14. Karaffa L, Kubicek CP. 2003. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol* 61:189–196. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1201-7>.
15. Magnuson JK, Lasure LL. 2004. Organic acid production by filamentous fungi, p 307–340. In Tkacz JS, Lange L (ed), *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Springer, Boston, MA.
16. Legisa M, Matthey M. 2007. Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 29:181–190. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9235-z>.
17. Jaklitsch WM, Kubicek CP, Scrutton MC. 1991. Intracellular organisation of citrate production in *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol* 37:823– 827.] <https://doi.org/10.1139/m91-142>.
18. Ruijter GJG, Panneman H, Xu D-B, Visser J. 2000. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of *citA* overexpression on citric acid production. *FEMS Microbiol Lett* 184:35– 40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08986.x>.
19. Torres N. 1994. Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. I. Model definition and stability of the steady state. *Biotechnol Bioeng* 44: 104–111. <https://doi.org/10.1002/bit.260440115>.
20. Torres N. 1994. Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. II. Sensitivity analysis. *Biotechnol Bioeng* 44:112–118. <https://doi.org/10.1002/bit.260440116>.

21. Alvarez-Vasquez F, González-Alcón C, Torres NV. 2000. Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. *Biotechnol Bioeng* 70:82–108. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:182::AID-BIT103.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:182::AID-BIT103.0.CO;2-V).
22. Palmieri F, Stipani I, Quagliariello E, Klingenberg M. 1972. Kinetic study of the tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 26:587–594. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01801.x>.
23. Bisaccia F, De Palma A, Palmieri F. 1989. Identification and purification of the tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 977:171–176. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80068-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80068-4).
24. Kaplan RS, Mayor JA, Wood DO. 1993. The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J Biol Chem* 268:13682–13690.
25. Kaplan RS, Mayor JA, Gremse DA, Wood DO. 1995. High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270:4108–4114. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.4108>.
26. Xu Y, Kakhniashvili DA, Gremse DA, Wood DO, Mayor JA, Walters DE, Kaplan RS. 2000. The yeast mitochondrial citrate transport protein. Probing the roles of cysteines, Arg(181), and Arg(189) in transporter function. *J Biol Chem* 275:7117–7124. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7117>.
27. Watson JA, Lowenstein JM. 1970. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. *J Biol Chem* 245:5993–6002.
28. Brunengraber H, Lowenstein JM. 1973. Effect of (-)-hydroxycitrate on ethanol metabolism. *FEBS Lett* 36:130–132. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80353-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80353-9).
29. Endemann G, Goetz PG, Edmond J, Brunengraber H. 1982. Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate. *J Biol Chem* 257:3434–3440.

30. Conover TE. 1987. Does citrate transport supply both acetyl groups and NADPH for cytoplasmic fatty acid synthesis? *Trends Biochem Sci* 12: 88–89. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90042-9](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90042-9).
31. Kaplan RS, Mayor JA, Kakhniashvili D, Gremse DA, Wood DO, Nelson DR. 1996. Deletion of the nuclear gene encoding the mitochondrial citrate transport protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 226:657–662. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1411>.
32. Fernández M, Fernández E, Rodicio R. 1994. ACR1, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242: 727–735.
33. Palmieri L, Lasorsa FM, De Palma A, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE. 1997. Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinatefumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett* 417:114–118. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01269-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01269-6).
34. Palmieri L, Lasorsa FM, Vozza A, Agrimi G, Fiermonte G, Runswick MJ, Walker JE, Palmieri F. 2000. Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1459:363–369. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00173-0).
35. Kirimura K, Kobayashi K, Ueda Y, Hattori T. 2016. Phenotypes of gene disruptants in relation to a putative mitochondrial malate-citrate shuttle protein in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:1737–1746. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1164583>.
36. Omori T, Takeshima N, Shimoda M. 1994. Formation of acid-labile -amylase during barley-koji production. *J Ferment Bioeng* 78:27–30. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90173-2).
37. Futagami T, Mori K, Wada S, Ida H, Kajiwara Y, Takashita H, Tashiro K, Yamada O, Omori T, Kuhara S, Goto M. 2015. Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during barley koji production. *Appl Environ Microbiol* 81:1353–1363. <https://doi.org/10.1128/AEM.03483-14>.

38. Niu J, Arentshorst M, Nair PD, Dai Z, Baker SE, Frisvad JC, Nielsen KF, Punt PJ, Ram AF. 2015. Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: LaeA is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites. *G3 (Bethesda)* 6:193–204.
39. Bok JW, Keller NP. 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryot Cell* 3:527–535.
40. Bayram O, Braus GH. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* 36:1–24.
41. Perrin RM, Fedorova ND, Bok JW, Cramer RA, Wortman JR, Kim HS, Nierman WC, Keller NP. 2007. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* 3:e50.
42. Oda K, Kobayashi A, Ohashi S, Sano M. 2011. *Aspergillus oryzae laeA* regulates kojic acid synthesis genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75:1832-4.
43. Kawauchi M, Nishiura M, Iwashita K. 2013. Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryot Cell* 12:1087–1096.
44. Tashiro S, Futagami T, Wada S, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T, Takahashi T, Yamada O, Takegawa K, Goto M. 2013. Construction of a *ligD* disruptant for efficient gene targeting in white koji mold, *Aspergillus kawachii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 59, 257–260
45. Kadooka C, Onitsuka S, Uzawa M, Tashiro S, Kajiwara Y, Takashita H, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. 2016. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 62,160–163
46. Fungal Genetics Stock Center : <http://www.fgsc.net/methods/anidmed.html>
47. Aramayo R, Adams T. H, Timberlake W. E. 1989. A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 122, 65–71

48. Kimoto D, Kadooka C, Saenrungsot P, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. 2019. Pex16 is involved in peroxisome and Woronin body formation in the white koji fungus, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *J. Biosci. Bioeng.*, 127, 85–92
49. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, Brakhage A. A. 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.*, 65, 5110–5117
50. 坂口謹一郎, 飯塚広 1953. 農化, 27, 524–529
51. Belozerskaya T A, Gessler NN, Aver'yanov, AA. 2017. Melanin pigments of fungi. *Fungal Metabolites* (Springer, Cham) , 263–291
52. Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K. 2017. Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 12, e0177050
53. Esbelin J, Malleam S, Ramm A. F, Carlin F. 2013. Impact of dye-protein interaction and silver nanoparticles on rose bengal photophysical behavior and protein photocrosslinking. *Photochem. Photobiol.*, 89, 758–761
54. 長谷純宏. 2014. イオンビーム育種技術の特長と産業利用. *化学と生物*, 52, 659–664
55. Tanaka H, Wang P-L, Yamada O. 1966. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori*. I. Isolation of aurasperone A and related pigments. *Agric. Biol. Chem.*, 30, 107–113
56. Wang P-L, Tanaka H. 1966. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. II. Chemical structure of aurasperone. *Agric. Biol. Chem.*, 30, 683–687
57. Choque E, Rayess Y. E, Raynal R, Mathieu F. 2015. Fungal naphtho- γ -pyrones-secondary metabolites of industrial interest. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 1081–1096
58. Chiang Y-M, Meyer K. M, Praseuth M, Baker S. E, Bruno K. S, Wang C. C. C. 2011. Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for

both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- γ -pyrone. *Fungal Genet. Biol.*, 48, 430–437

59. Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R. 1989. A hyperrecombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58:409–419. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90855-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90855-6).
60. Sherman F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194:3–21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-V).
61. Meyer V, Wanka F, van Gent J, Arentshorst M, van den Hondel CA, Ram AF. 2011. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 77:2975–2983. <https://doi.org/10.1128/AEM.02740-10>.
62. Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, De Souza CP, Dou X, Perez-Balaguer A, Osmani SA. 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 3:1359 – 1362. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004>.
63. Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24:2519 –2524. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>.
64. Dores MR, Schnell JD, Maldonado-Baez L, Wendland B, Hicke L. 2010. The function of yeast epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization. *Traffic* 11:151–160. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01003.x>.
65. Liu HL, Osmani AH, Ukil L, Son S, Markossian S, Shen KF, Govindaraghavan M, Varadaraj A, Hashmi SB, De Souza CP, Osmani SA. 2010. Singlestep affinity purification for fungal proteomics. *Eukaryot Cell* 9:831– 833. <https://doi.org/10.1128/EC.00032-10>.
66. Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Iacobazzi V. 1995. Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol* 260:349 –369. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)60150-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)60150-3).

67. Saraste M, Walker JE. 1982. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. FEBS Lett 144: 250–254. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80648-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80648-0).
68. Kunji ER. 2004. The role and structure of mitochondrial carriers. FEBS Lett 564:239 –244. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00242-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00242-X).
69. Robinson AJ, Kunji ER. 2006. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2617–2622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509994103>.
70. Ma C, Remani S, Sun J, Kotaria R, Mayor JA, Walters DE, Kaplan RS. 2007. Identification of the substrate binding sites within the yeast mitochondrial citrate transport protein. J Biol Chem 282:17210–17220. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611268200>.
71. Aluvila S, Kotaria R, Sun J, Mayor JA, Walters DE, Harrison DH, Kaplan RS. 2010. The yeast mitochondrial citrate transport protein: molecular determinants of its substrate specificity. J Biol Chem 285:27314–27326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137364>.
72. Castegna A, Scarcia P, Agrimi G, Palmieri L, Rottensteiner H, Spera I, Germinario L, Palmieri F. 2010. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 285:17359–17370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097188>.
73. van Leeuwen MR, Krijgheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, Wösten HA, Dijksterhuis J. 2013. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. Stud Mycol 74:59 –70. <https://doi.org/10.3114/sim0009>.
74. Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 190:885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>.
75. Hynes MJ, Murray SL. 2010. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell 9:1039 –1048. <https://doi.org/10.1128/EC.00080-10>.

76. Chen H, He X, Geng H, Liu H. 2014. Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 721–731. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1418-3>.
77. Darby MM, Serebreni L, Pan X, Boeke JD, Corden JL. 2012. The *Saccharomyces cerevisiae* Nrd1-Nab3 transcription termination pathway acts in opposition to Ras signaling and mediates response to nutrient depletion. *Mol Cell Biol* 32:1762–1775. <https://doi.org/10.1128/MCB.00050-12>.
78. Kaplan RS, Mayor JA, Johnston N, Oliveira DL. 1990. Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 265:13379–13385.
79. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijk PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenber R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25:221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>.
80. Umbarger HE. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 47:532–606. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.002533>.
81. Bhattacharjee JK. 1985. α -Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. *Crit Rev Microbiol* 12:131–151. <https://doi.org/10.3109/10408418509104427>.
82. Garrad RC, Bhattacharjee JK. 1992. Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned LYS1 gene of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 174:7379–7384. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7379-7384.1992>.

83. Zabriskie TM, Jackson MD. 2000. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat Prod Rep* 17:85–97. <https://doi.org/10.1039/a801345d>.
84. Schöbel F, Jacobsen ID, Brock M. 2010. Evaluation of lysine biosynthesis as an antifungal drug target: biochemical characterization of *Aspergillus fumigatus* homocitrate synthase and virulence studies. *Eukaryot Cell* 9:878–893. <https://doi.org/10.1128/EC.00020-10>.
85. Fazius F, Shelest E, Gebhardt P, Brock M. 2012. The fungal α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol Microbiol* 86:1508–1530. <https://doi.org/10.1111/mmi.12076>.
86. Vorapreeeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K. 2012. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology* 158:217–228. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051946-0>.
87. Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT. 1996. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* 12:247–257. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960315\)12:3%3C247::AID-YEA911%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3%3C247::AID-YEA911%3E3.0.CO;2-I).
88. Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1607–1633. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16%3C1607::AID-YEA70%3E3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16%3C1607::AID-YEA70%3E3.0.CO;2-4).
89. van den Berg MA, de Jong-Gubbels P, Kortland CJ, van Dijken JP, Pronk JT, Steensma HY. 1996. The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 271:28953–28959. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28953>.
90. Remize F, Andrieu E, Dequin S. 2000. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 66:3151–3159. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3151-3159.2000>.

91. Kadooka C, Izumitsu K, Onoue M, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. 2019. Mitochondrial citrate transporters CtpA and YhmA are required for extracellular citric acid accumulation and contribute to cytosolic acetyl coenzyme A generation in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *Appl Environ Microbiol* 85:e03136-18.
92. Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, Nakamura M, Fukuda S, Tagami M, Sasaki D, Imamura K, Kai C, Harbers M, Hayashizaki Y, Carninci P. 2006. CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat Methods* 3:211–222.
93. Futagami T, Mori K, Yamashita A, Wada S, Kajiwaru Y, Takashita H, Omori T, Takegawa K, Tashiro K, Kuhara S, Goto M. 2011. Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu. *Eukaryot Cell* 10:1586–1587.
94. Bernreiter A, Ramon A, Fernández-Martínez J, Berger H, Araújo-Bazan L, Espeso EA, Pachlinger R, Gallmetzer A, Anderl I, Scazzocchio C, Strauss J. 2007. Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 27:791–802.
95. Palmer JM, Theisen JM, Duran RM, Grayburn WS, Calvo AM, Keller NP. 2013. Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet.* 9:e1003193.
96. Wang B, Lv Y, Li X, Lin Y, Deng H, Pan L. 2018. Profiling of secondary metabolite gene clusters regulated by LaeA in *Aspergillus niger* FGSC A1279 based on genome sequencing and transcriptome analysis. *Res Microbiol* 169:67–77.
97. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U. 2010. Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* 9:1236–1250.
98. Steiger MG, Rassinger A, Mattanovich D, Sauer M. 2019. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metab Eng* 52:224–231.
99. Odoni DI, Vazquez-Vilar M, van Gaal MP, Schonewille T, Martins Dos Santos VAP, Tamayo-Ramos JA, Suarez-Diez M, Schaap PJ. 2019. *Aspergillus niger* citrate exporter

- revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions. FEMS Microbiol Lett 366:fnz071.
100. Punt PJ, Dingemanse MA, Kuyvenhoven A, Soede RD, Pouwels PH, van den Hondel CA. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene 93:101–109.
 101. Punt PJ, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH, van den Hondel CA. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. J Biotechnol 17:19–34.
 102. Strauss J, Reyes-Dominguez Y. 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. Fungal Genet Biol 48:62–69.
 103. Sarikaya-Bayram Ö, Palmer JM, Keller N, Braus GH, Bayram Ö. 2015. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. Front Microbiol 6:1.
 104. Linde T, Zoglowek M, Lübeck M, Frisvad JC, Lübeck PS. 2016. The global regulator LaeA controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. J Ind Microbiol Biotechnol 43:1139–1147.
 105. Rodríguez-Navarro A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. Biochim Biophys Acta 1469:1–30.
 106. Kinclova-Zimmermannová O, Gaskova D, Sychrova H. 2006. The Na⁺,K⁺/H⁺ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 6:792–800.
 107. Benito B, Garciadeblás B, Pérez-Martín J, Rodríguez-Navarro A. 2009. Growth at high pH and sodium and potassium tolerance in media above the cytoplasmic pH depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. Eukaryot Cell 8:821–829.
 108. Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM, Fischer R. 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. Curr Biol. 18:255–259.

109. Downes DJ, Davis MA, Wong KH, Kreutzberger SD, Hynes MJ, Todd RB. 2014. Dual DNA binding and coactivator functions of *Aspergillus nidulans* TamA, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor. *Mol Microbiol* 92:1198–1211.
110. Gerke J, Bayram O, Feussner K, Landesfeind M, Shelest E, Feussner I, Braus GH. 2012. Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* 78:8234–8244.
111. Gomi K. Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*. 2019. *Biosci Biotechnol Biochem* 83:1385–1401.
112. Yin WB, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang YM, Keating AE, Pócsi I, Wang CC, Keller NP. 2013. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159(Pt 1):77–88.
113. Lee BY, Han SY, Choi HG, Kim JH, Han KH, Han DM. 2005. Screening of growth- or development-related genes by using genomic library with inducible promoter in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* 43:523–528.
114. Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS, Davis MA. 2006. Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5:794–805.
115. Hoffmann B, Valerius O, Andermann M, Braus GH. 2001. Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 12:2846–2857.
116. Tüncher A, Reinke H, Martić G, Caruso ML, Brakhage AA. 2004. A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 52:227–241.
117. Patananan AN, Palmer JM, Garvey GS, Keller NP, Clarke SG. 2013. A novel automethylation reaction in the *Aspergillus nidulans* LaeA protein generates S-methylmethionine. *J Biol Chem* 288:14032–14045.

118. Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, Shwab EK, Basheer A, Gallmetzer A, Scazzocchio C, Keller N, Strauss J. 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 76:1376–1386.
119. 門岡千尋, 合原翔平, 久保臣悟, 尾上昌平、奥津果優, 吉崎由美子, 高峯和則, 後藤正利, 玉置尚徳, 二神泰基. 2019. 白麴菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 のアルビノ表現型の原因遺伝子の解析. In press
120. Odoni DI, van Gaal MP, Schonewille T, Tamayo-Ramos JA, Martins Dos Santos VAP, Suarez-Diez M1, Schaap PJ. 2017. *Aspergillus niger* Secretes Citrate to Increase Iron Bioavailability. *Front Microbiol.* 8:1424.
121. Michael T.Madigan, John M.Martinko, Jack Parker, 室伏 きみ子 監訳, 関 啓子 監訳. 2003. ブロック微生物学. オーム社. 11 章. 工業微生物学/生物触媒反応
122. Shimizu M, Masuo S, Fujita T, Doi Y, Kamimura Y, Takaya N. 2012. Hydrolase controls cellular NAD, sirtuin, and secondary metabolites. *Mol Cell Biol.* 32:3743-3755.
123. Itoh E, Odakura R, Oinuma KI, Shimizu M, Masuo S, Takaya N. 2017. Sirtuin E is a fungal global transcriptional regulator that determines the transition from the primary growth to the stationary phase. *J Biol Chem.* 292:11043-11054.
124. Miyamoto A, Kadooka C, Mori K, Tagawa Y, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. 2019. SirD is involved in α -amylase activity and citric acid production in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* during a solid-state fermentation process. *J Biosci Bioeng.* in press.