

最終試験結果の要旨	
学位申請者氏名	門岡 千尋
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
	副査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 琉球大学 教授 外山 博英
	副査 鹿児島大学 教授 高峯 和則
審査協力者	印
実施年月日	令和 2年 1月 24日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、令和2年1月24日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	門岡 千尋
<p>[質問1] クエン酸輸送体YhmAとCtpAがクエン酸を排出するときに対向基質として必要となるリンゴ酸と2-オキシグルタル酸はどのようにつくられるのか？</p> <p>[回答1] クエン酸回路の酵素群はミトコンドリアだけでなく、そのオルソログが細胞質に存在するものもある。それらの酵素群によって細胞質でつくられると考えられる。</p> <p>[質問2] 麴の製造工程で温度を下げてクエン酸生産が促進される現象に、クエン酸輸送体CexAは関連しているのか？</p> <p>[回答2] クエン酸輸送体CexAは関与していないと考えられる。高温ではストレス応答でグリセロール合成やペントースリン酸経路へカーボンフローが流れるためにクエン酸を高生産できないことが原因だと考えられる。</p> <p>[質問3] 細胞質でクエン酸からアセチル-CoAを作るときに生産されるオキサロ酢酸を、ミトコンドリアから細胞質にクエン酸を排出するための対向基質あるいはその原料として使っている可能性は考えられるか？</p> <p>[回答3] クエン酸を高生産する培養条件では細胞内のアセチル-CoA濃度が（クエン酸を高生産しない条件の）最少培地の1/100に低下することが分かっている。したがって、その可能性は低いと考えられる。</p> <p>[質問4] 推定メチルトランスフェラーゼをコードする<i>laeA</i>遺伝子の破壊により発現変動した遺伝子の中に、クエン酸生産に関係するもの以外はどのようなものが含まれていたのか？</p> <p>[回答4] 発現低下した遺伝子の中には、ポリケチド合成酵素や非リボソーム型ペプチド合成酵素などの二次代謝物の生産に関与するものが含まれていた。</p> <p>[質問5] 麴の製造工程において温度を下げてクエン酸生産を促進するタイミングでミトコンドリア局在クエン酸輸送体をコードする<i>ctpA</i>と<i>yhmA</i>の遺伝子発現は上昇するが、推定メチルトランスフェラーゼをコードする<i>laeA</i>はどうか？</p> <p>[回答5] <i>laeA</i>の遺伝子発現には変化は見られなかった。</p> <p>[質問6] クエン酸はどのような条件で高生産されるのか？</p> <p>[回答6] これまでに鉄などの金属の制限、グルコースの過剰供給などの条件で高生産することが知られている。また、麴などの固体培養でもクエン酸を高生産する。</p>	

[質問7] 白麹菌に黒麹菌のポリケチド合成酵素遺伝子 *pksP* を相補した株は分生子の数が増えたのはなぜか？また、メラニン色素そのものが分生子の成熟を促進する制御因子となっている可能性あるのか？

[回答7] *PksP* によるメラニン合成は分生子の成熟するタイミングで行われる。分生子の形成はフィアロ型であり、分生子はフィアライドから押し出されるように生産される。そのシグナルになっている可能性などが考えられる。分生子形成を制御する転写因子 *brlA* や *wetA* などの遺伝子発現は測定していないが、黒色化したことで発現のタイミングが早くなった可能性はある。

[質問8] 白麹菌および黒麹菌の *pksP* を相補したことによって黒色化した白麹菌の分生子の発芽率に違いはあるのか？

[回答8] 黒色化した白麹菌の方が、親株よりも発芽率が高い傾向が見られた。これは細胞内で発生する活性酸素からの保護にメラニンが関与しているためと考えられる。

[質問9] 白麹菌は黒色化により紫外線への耐性が上昇した理由はなぜか？

[回答9] 紫外線の照射によって生じる活性酸素種をメラニン色素が消去したと考えられる。

[質問10] ミトコンドリアにおいて、クエン酸は *cis*-アコニット酸とイソクエン酸に代謝されるよりも早くクエン酸輸送体 *CtpA* と *YhmA* により排出されると考えてよいのか？

[回答10] クエン酸を高生産する糸状菌において、ミトコンドリアでクエン酸を代謝するアコニターゼとイソクエン酸デヒドロゲナーゼの活性が低いという報告がある。したがって、その可能性がある。

[質問11] ミトコンドリア局在クエン酸輸送体をコードする *ctpA* と *yhmA* を二重破壊すると合成致死になり細胞内のアミノ酸が減少する。この原因の一部に、アミノ酸合成の起点となる2-オキシグルタル酸が関与している可能性はあるか？

[回答11] その可能性はある。しかし、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊条件ではアセチル-CoA合成不全により致死となり全体の代謝が止まったためにアミノ酸が減少した可能性もある。

[質問12] メチル化ヒストン抗体を用いた *cexA* プロモーター領域のクロマチン免疫沈降および定量PCR解析のデータは菌糸塊全体で起きている平均的な現象をとらえたものだと思うが、菌糸の各部分で同じことが起きていると考えてよいのか？

[回答12] 菌糸の部分によってヒストンのメチル化レベルが異なっている可能性

はある。また、それによって発現制御を受けるクエン酸輸送体CexAの局在も菌糸の部分によって異なる可能性もある。

[質問13] そもそも(細胞の)どこからクエン酸が排出されているのか分かっていないと思うが、関連する情報はあるのか？

[回答13] CexAの局在と関係する可能性がある。これまでに緑色蛍光タンパク質と融合したCexAの局在解析を行ったが、明瞭な結果を得られていない。

[質問14] 麴を造る過程で、*laeA*の遺伝子発現は変動しないとのことだが、LaeAの局在が細胞質から核に変化したりすることで制御されたりしないのか？

[回答14] モデル糸状菌の*Aspergillus nidulans*において、LaeAは常に核に局在することが報告されている。光照射がなくなることで核に移行するVelvet複合体の構成因子VeAとVelBがLaeAと複合体を形成してLaeAを活性化すると考えられている。同じような機構が白麴菌でも起きている可能性がある。

[質問15] 白麴菌に黒麴菌の*pksP*を相補したときに用いたプロモーターは何か？

[回答15] 白麴菌の*pksP*のプロモーターを用いた。

[質問16] 麴の製造工程において*laeA*遺伝子と*cexA*遺伝子の発現レベルが変化しないということだが、温度を下げたときにタンパク質としての局在や修飾が変化している可能性はあるのか？

[回答16] モデル糸状菌*Aspergillus nidulans*において、LaeAはProtein kinase Aでリン酸化されることも知られているので、リン酸化修飾により活性が制御される可能性はある。しかし、LaeAは常に核に局在する因子として報告されており、その局在が変化する可能性は低い。CexAについてはデータがなく不明である。

[質問17] 推定メチルトランスフェラーゼLaeAは培養後期で二次代謝が促進される現象に関与していることが報告されているが、白麴菌においてLaeAがクエン酸輸送体CexAを制御するという事は、クエン酸の排出が二次代謝であることを示すのではないか？

[回答17] 糸状菌がクエン酸を排出する理由として、鉄の取り込みの促進や周囲の環境のpHを下げて競合細菌の生育を抑えることなどが報告されている。このことから、指摘されたとおりクエン酸の分泌生産は二次代謝だと思われる。クエン酸高生産性糸状菌が自然界のどのような環境でクエン酸を高分泌生産するのかを解明すればクエン酸排出の意義が明らかになると考えられる。