

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	西谷 篤
題 目	白麹菌における推定有機酸トランスポーターの機能と発現制御に関する研究 (Studies on the function and regulation of putative organic acid transporters in white koji fungus)
白麹菌 (<i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>) は日本の伝統的な蒸留酒である焼酎の製造に用いられている。白麹菌は、焼酎の原料に含まれるデンプンを分解する糖質加水分解酵素に加えて多量のクエン酸を分泌生産する。クエン酸は、焼酎の醪の pH を下げることで微生物汚染を防ぐ重要な役割を果たしている。 白麹菌は、クエン酸排出トランスポーター CexA によりクエン酸を細胞外へ分泌する。また、白麹菌において <i>cexA</i> 遺伝子は推定メチルトランスフェラーゼ LaeA によりエピジェネティックに制御されることが明らかになっていたが、その詳細な機構は不明であった。そこで、ヘテロクロマチン形成を促進するエピジェネティック因子として知られているヘテロクロマチンタンパク質 1 (HepA) の機能を解析した。白麹菌において <i>hepA</i> 遺伝子の破壊株、相補株、過剰発現株を構築し、これらの菌株を液体培地により培養した。まず、培養上清に含まれる有機酸を HPLC で解析した結果、<i>hepA</i> の破壊と過剰発現によりクエン酸生産が低下しており、HepA の発現レベルがクエン酸分泌量に影響を及ぼすことが示唆された。また、RNA シーケンス解析により、HepA は LaeA と同様に <i>cexA</i> 遺伝子の発現を正に制御することが示唆された。さらに、白麹菌において HepA によって制御される遺伝子は、LaeA によって制御される遺伝子と類似していることが示唆された。一方、各菌株を用いて米麹を製造した結果、液体培養時に観察された <i>hepA</i> 破壊によるクエン酸生産量と <i>cexA</i> 発現量の減少の程度が緩和した。このことから、液体培養と固体培養ではクエン酸分泌生産の制御機構が異なることが示唆された。 次に、白麹菌のゲノムに CexA のホモログ (Chl) が 11 遺伝子コードされていることを見出し、その機能を解析した。白麹菌のトランスクリプトーム解析の結果から、<i>chl</i> 遺伝子の発現レベルは低いことが示唆された。そこで、白麹菌の <i>cexA</i> 破壊株を宿主として、各 <i>chl</i> 遺伝子を <i>tefA</i> プロモーターにより過剰発現する株を構築し、培養上清に含まれる有機酸を HPLC により分析した。その結果、いずれの <i>chl</i> 過剰発現株もクエン酸生産量に大きな変化は認められず、Chl はクエン酸排出トランスポーターではないことが示唆された。また、<i>chl</i> 過剰発現株のうち、<i>chlH</i> 過剰発現株の培養上清には 2-オキシグルタル酸とフマル酸が高濃度に蓄積し、<i>chlK</i> 過剰発現株の培養上清には 2-オキシグルタル酸、コハク酸、およびリンゴ酸が高濃度に蓄積していた。さらに、黄麹菌 (<i>Aspergillus oryzae</i>) において、<i>chlH</i> と <i>chlK</i> を <i>amyB</i> プロモーターにより過剰発現させた結果、有機酸分泌生産性が同様に変化した。これらの結果から、ChlH と ChlK は、2-オキシグルタル酸等のジカルボン酸の排出トランスポーターである可能性が示唆された。	