



鹿児島大学農学部 二 神 泰 基

白麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究

はじめに

焼酎造りに用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、清酒・味噌・醤油などの製造に用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* とは異なり多量のクエン酸を分泌生産する性質を持つ。クエン酸は、もろみの pH を下げることで雑菌汚染を防ぐ重要な役割がある。筆者らは、白麹菌のクエン酸高生産機構の解明を目的として研究を行った。そのために、まず白麹菌のゲノム解析を行い、遺伝子組換え実験系、並びにゲノム編集実験系を構築した。次に、これらの研究基盤を利用して、麹を造る工程におけるクエン酸の生産誘導機構の解析を行い、最終的にミトコンドリアと細胞膜のクエン酸輸送体が決定的な役割を担うことを明らかにした。以下に、その概要について述べる。

1. 麹造りにおいて温度低下が白麹菌のクエン酸生産を促進する機構

焼酎用の麹造りでは、発酵熱により約40℃程度まで上昇した温度を途中で30℃程度まで冷却して維持することで白麹菌のクエン酸生産を促進する(図1A)。この温度低下の工程は、クエン酸生産を促進することが経験的に分かっているために行われているが、その機構は不明であった。そこで、この温度低下が白麹菌の代謝に及ぼす影響をトランスクリプトーム解析とメタボローム解析により調べた。その結果、温度を下げることにより、解糖系から分岐するグリセロール合成系、トレハロース合成系、ペントースリン酸経路の代謝活動が減少し、解糖系からクエン酸回路へのカーボンフローが促進して、白麹菌のクエン酸生産が促進されることが明らかになった(図1B)。

2. 白麹菌のミトコンドリア局在型クエン酸輸送体

2-1. ミトコンドリア局在型クエン酸輸送体の活性

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のクエン酸-リンゴ酸交換輸送体 Ctp1 とリンゴ酸-オキソグルタル酸交換輸送体 Yhm2 のホモログとして、白麹菌のミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 CtpA と YhmA を同定した(図2)。なお、白麹菌などの

*Aspergillus* 属糸状菌を含む子囊菌門のチャワントケ亜門において、*yhmA* 遺伝子はクエン酸シンターゼ遺伝子のすぐ隣に保存されていた。

白麹菌の CtpA と YhmA がクエン酸輸送活性を示すのかを精製タンパク質の酵素活性測定で評価した。まず、白麹菌を宿主として RNase A 由来の S ペプチドをタグとして融合した CtpA と YhmA を発現する株を構築し、アフィニティー精製を行った。この精製タンパク質でプロテオリソソームを調製し、その際に対向基質として各種の有機酸を内包させた。この基質内包型プロテオリソソームに外から <sup>14</sup>C 標識クエン酸を作用させることで、対向基質との交換輸送によってプロテオリソソーム内に取り込まれる <sup>14</sup>C 標識クエン酸の量を測定した。その結果、CtpA と YhmA はそれぞれ出芽酵母の Ctp1 と Yhm2 と同様にクエン酸-リンゴ酸交換輸送活性とクエン酸-オキソグルタル酸輸送活性を示すことが確認された。また、細胞内の有機酸濃度のデータと合わせて、YhmA に関してはクエン酸-リンゴ酸交換輸送も行う可能性が示唆された。

2-2. ミトコンドリアから細胞質へのクエン酸排出の意義

白麹菌において *ctpA* と *yhmA* を破壊すると、各単独遺伝子破壊株のクエン酸生産能が低下し、CtpA と YhmA がクエン酸生産に必要なことが明らかになった。続いて、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊株の構築を試みたが取得できなかったため、*yhmA* 破壊株を背景とする *ctpA* のコンディショナル発現株を構築した。本株は、*ctpA* の発現を抑制すると菌糸伸長が極端に抑制されたことから *ctpA* と *yhmA* の二重破壊は合成致死となることが示唆された。一方、出芽酵母の *ctp1* と *yhm2* の二重破壊は生育にほとんど影響はなく、合成致死にならないという異なる表現型が見られた。これは、白麹菌と出芽酵母の細胞質のアセチル CoA 合成経路の違いが原因であることが明らかになった。細胞質において、出芽酵母では、解糖系の産物のピルビン酸からアセトアルデヒドと酢酸を経てアセチル CoA が作られるのに対して、白麹菌では ATP クエン酸リアーゼによ

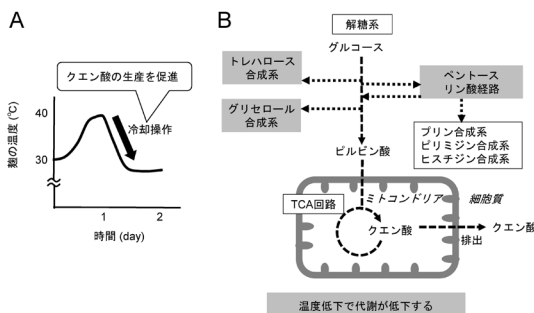


図1. 焼酎用の麹造りの温度管理 (A) と代謝変化 (B)

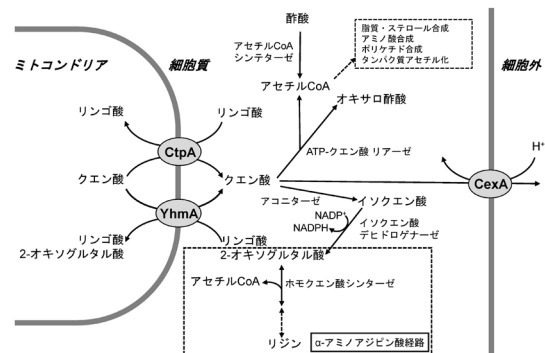


図2. 白麹菌におけるクエン酸の排出プロセス

リクエン酸からアセチル CoA が作られる (図2). アセチル CoA は脂質やアミノ酸などの様々な物質の合成に使われる重要な化合物であり, 白麹菌において *ctpA* と *yhmA* を二重破壊すると, 細胞質のクエン酸濃度が低下することによってアセチル CoA の枯渇を引き起こし, 合成致死になると考えられた. そこで, 白麹菌の *yhmA* 破壊株を背景とする *ctpA* のコンディショナル発現株において *ctpA* の発現を抑制した状態でもアセチル CoA を供給できる酢酸やリジンの存在下では細胞内のアセチル CoA 濃度が回復し, 生育可能になることを確認した.

### 3. 白麹菌の細胞膜局在型クエン酸輸送体

#### 3-1. 菌体外へのクエン酸排出は高生産の鍵である

白麹菌において細胞膜局在型クエン酸輸送体を探索した. しかし, *Aspergillus niger* を研究する Odoni らと Steiger らが細胞膜局在型クエン酸輸送体 CexA を報告し, 筆者らも白麹菌において CexA を解析した (図2). 白麹菌において *cexA* の破壊と過剰発現がクエン酸生産に及ぼす影響を調べた結果, 白麹菌の *cexA* 破壊株はクエン酸生産能が劇的に低下し, 一方, *cexA* 過剰発現株はクエン酸生産量の上昇が見られた. 以上より, 白麹菌において CexA は主要な細胞膜局在型クエン酸輸送体であること, 白麹菌のクエン酸生産において CexA による排出ステップが律速であることが示唆された. また, 黄麹菌において白麹菌の *cexA* を高発現させたところ黄麹菌において白麹菌と同程度のクエン酸生産能力が認められた. さらに, 黄麹菌のゲノムにもクエン酸輸送体遺伝子 *cexA* と *cexB* の2つを確認し, これらの遺伝子を強制発現させることで白麹菌の半分程度のクエン酸分泌生産能力を付与できた.

#### 3-2. 細胞膜局在クエン酸輸送体の発現制御

白麹菌のエピジェネティックな有用物質生産制御機構の理解を目的として, 推定メチルトランスフェラーゼをコードする *LaeA* について解析した. 白麹菌の *laeA* 破壊株は, クエン酸生産が劇的に減少した. そこで, *laeA* の破壊が遺伝子発現に及ぼした影響を Cap Analysis of Gene Expression により解析した結果, 細胞膜局在型クエン酸輸送体をコードする *cexA* 遺伝子の発現レベルが低下していることが分かった. そこで, *laeA* 破壊株と *cexA* 破壊株において *cexA* を *LaeA* の制御下でない *gpdA* プロモーターで過剰発現させたところ, 両株とも同程度のクエン酸生産能まで回復した. このことから *cexA* の発現低下が *laeA* 破壊株におけるクエン酸低生産の主要な原因であることが明らかになった.

*LaeA* の詳細な機能はまだ不明であるが, ヒストンのメチル化修飾を介した遺伝子発現調節に関わると推定されている (図3). そこで抗メチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降および定量PCR解析により *cexA* プロモーター領域に結合するヒストンの状態を調べた. その結果, *laeA* 破壊株の *cexA* プロモーター領域はユークロマチンの指標となるヒストン H3K4me3 の占有率が減少し, ヘテロクロマチンの指標となるヒストン H3K9me3 の占有率が増加していた. 以上の結果より, 直接的か間接的かは不明ではあるが, *LaeA* は白麹菌において *cexA* プロモーター領域のクロマチン構造の開閉に関わっており, クエン酸生産を制御することが明らかになった.

なお, 白麹造りにおいてクエン酸生産を促進する温度低下時のトランスクリプトームでは, *cexA* の発現は温度に依存せず,

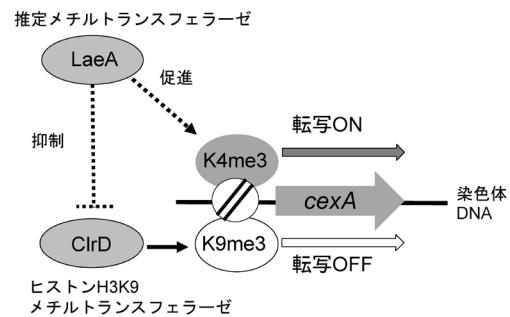


図3. 細胞膜局在型クエン酸輸送体遺伝子 *cexA* のエピジェネティックな制御モデル

常に高いレベルで発現していることが分かった. 一方, 温度低下により発現上昇する遺伝子の中にはミトコンドリア局在型クエン酸輸送体をコードする *ctpA* と *yhmA* が含まれており, これらの2遺伝子の発現上昇は麹造りの温度低下時にクエン酸生産が促進される現象に関与していると考えられた.

#### おわりに

焼酎の製造に用いられる白麹菌において, 麹造りで温度低下によりクエン酸生産が促進される要因, およびクエン酸の分泌生産に必須のクエン酸輸送体を明らかにした. ミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 *CtpA* と *YhmA* に関する知見は, 細胞質のアセチル CoA を必要とする脂質, ポリケチドなどの二次代謝物の生産への利用が期待される. また, 細胞膜局在型クエン酸輸送体 *CexA* に関する知見は, 細胞外への物質排出が極めて重要であることを示しており, 有用物質生産における輸送体をターゲットとした育種戦略への活用が期待される.

謝辞 本研究は, 鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター醸造微生物学研究室, および九州大学大学院農学研究院未来創成微生物学寄附講座において行われたものです. 学生時代から今日に至るまで, 多大なご指導とご支援を賜りました九州大学・別府大学名誉教授・古川謙介先生, ならびに佐賀大学教授・後藤正利先生に心から感謝申し上げます. また, 未来創成微生物学寄附講座において研究のご支援を賜りました九州大学教授・竹川薫先生, 同名誉教授・久原哲先生, 同准教授・田代康介先生, 森一樹博士, 酒類総合研究所・山田修先生, 三和酒類(株)・高下秀春博士, 梶原康博博士, 林圭氏に心から感謝申し上げます. 共同研究者として多大なご助力を頂きました海洋研究開発機構上席研究員・稲垣史生博士, 同主任研究員・諸野祐樹博士, 京都大学研究員・河合幹彦博士, 崇城大学教授・岡拓二先生, 滋賀県立大学講師・泉津弘佑先生, 鹿児島大学客員教授・鮫島吉廣先生, 同教授・高峯和則先生, 同准教授・吉崎由美子先生, 同助教・奥津果優先生, (株)ビオック・白石洋平博士に心から感謝申し上げます. また, 九州大学発酵化学研究室の多くの先輩, 同期生, 後輩, ならびに門岡千尋博士をはじめとする鹿児島大学醸造微生物学研究室の卒業生, 在校生に心より感謝いたします. 全ての方のお名前を挙げることはできませんが, 多くの共同研究者の先生方より貴重なご意見・ご助言を賜りました. 皆様に御礼申し上げます. 最後に本奨励賞にご推薦くださり, 日頃より暖かいご助言を頂きました鹿児島大学教授・玉置尚徳先生に厚く御礼を申し上げます.