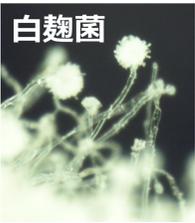


# 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構の鍵となるクエン酸トランスポーターの同定と機能解析

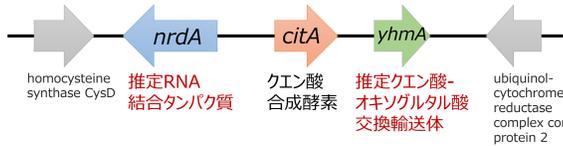
二神 泰基 (鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター)

## 目的



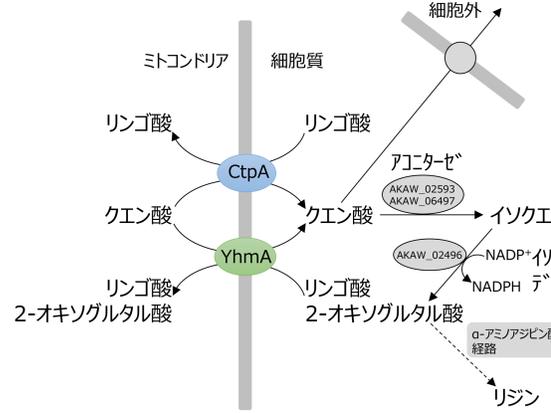
白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) は、主に焼酎の製造に使用されている麹菌である。クエン酸を高度に分泌する性質をもち、醪 (もろみ) のpHを下げることで雑菌の増殖を防ぐ。類縁菌の*Aspergillus niger*は、クエン酸の工業生産に利用され、そのメカニズムは精力的に研究されてきた。しかし、クエン酸の排出機構等の不明な点が残されている。

### クエン酸合成関連遺伝子クラスター



白麹菌のクエン酸高生産機構の解明を目的として、クエン酸トランスポーター (CtpAとYhmA) を解析した。なお、*yhmA*はクエン酸合成酵素遺伝子の下流に高度に保存されている点で、注目した。

## 考察

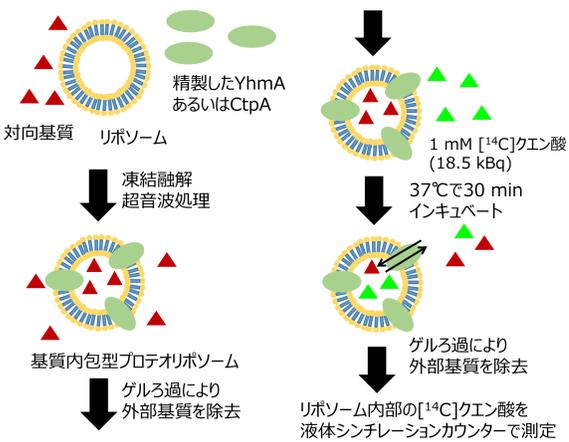


### 白麹菌におけるクエン酸輸送体 (CtpAとYhmA) と NADPHの再生、リジン合成との関係

- ① CtpAとYhmAは、クエン酸高分泌生産に必要なミトコンドリア局在型クエン酸輸送体である。
- ② *yhmA*破壊株は、細胞質のNADPH/NADP+比が減少することから、NADPHの再生に関与している。
- ③ *ctpA*と*yhmA*の二重破壊が最少培地で合成致死となったが、最少培地にリジンを添加すると*ctpA*と*yhmA*の二重破壊条件でも生育できた。したがって、ミトコンドリアから細胞質へのクエン酸輸送はリジン合成にも関与する。細胞質では、クエン酸の一部が2-オキシグルタル酸へと変換され、 $\alpha$ -アミノアジピン酸経路によるリジン合成に使われている可能性がある。

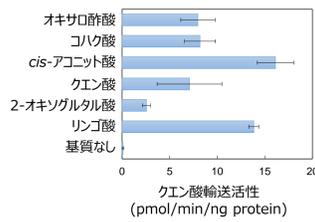
## 方法・結果

### クエン酸輸送活性の測定方法

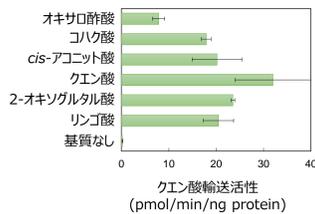


白麹菌からCtpAとYhmAを精製してリポソームに再構成し、 $[^{14}\text{C}]$ クエン酸を用いてクエン酸輸送活性を測定した。いずれも交換輸送体であることが示唆された。CtpAはリンゴ酸と*cis*-アコニット酸を対向基質としてクエン酸輸送活性を示し、一方、YhmAはリンゴ酸、*cis*-アコニット酸、オキシグルタル酸、オキサロ酢酸、コハク酸といった幅広い対向基質でクエン酸輸送活性を示した。

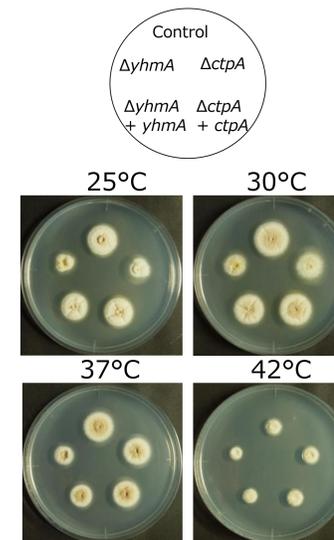
### CtpA-Sのクエン酸輸送活性



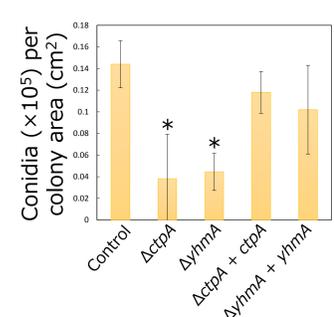
### YhmA-Sのクエン酸輸送活性



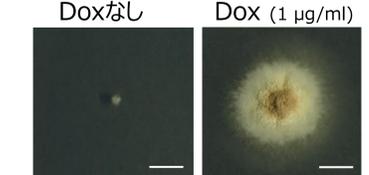
### 単独遺伝子破壊株、相補株のコロニー



### 単独遺伝子破壊株、相補株の分生子形成能

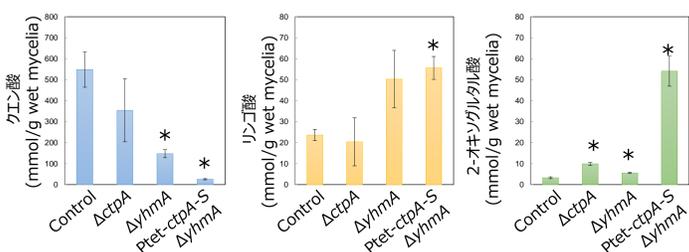


### Ptet-ctpA-S ΔyhmA株のコロニー

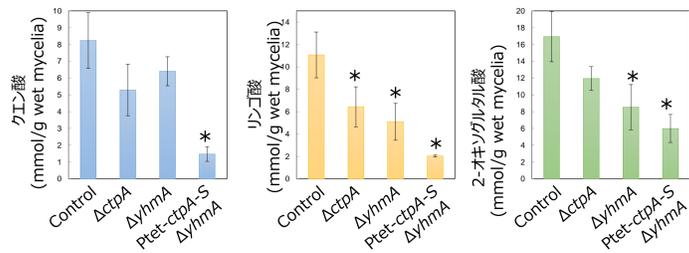


*ctpA*遺伝子破壊株、*yhmA*遺伝子破壊株、*yhmA*遺伝子破壊株における*ctpA*遺伝子のコンディショナル発現株 (Ptet-*ctpA*-S  $\Delta$ *yhmA*) を構築した。Ptet-*ctpA*-S  $\Delta$ *yhmA*株はドキシサイクリン (Dox) 非存在下でコロニー形成が抑制されたため、*ctpA*と*yhmA*の二重破壊が最少培地で合成致死となることが示唆された。

### 細胞外の有機酸濃度



### 細胞内の有機酸濃度



各株を最少培地で前培養 (30°C, 36時間) した後、菌体をクエン酸生産培地に移してさらに培養 (30°C, 48時間) した。*ctpA*と*yhmA*を破壊すると細胞外のクエン酸が減少し、リンゴ酸と2-オキシグルタル酸は上昇する傾向が見られた。一方、細胞内の有機酸は、*ctpA*と*yhmA*の破壊によりいずれも減少した。

### 細胞内のレドックスバランス

Strain	NADH/NAD <sup>+</sup> ratio	NADH + NAD <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol/g wet cell}$ )	NADPH/NADP <sup>+</sup> ratio	NADPH + NADP <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol/g wet cell}$ )
Control	1.07 $\pm$ 0.21	4.49 $\pm$ 0.53	1.04 $\pm$ 0.0047	18.88 $\pm$ 0.96
$\Delta$ <i>ctpA</i>	0.98 $\pm$ 0.20	5.31 $\pm$ 0.14	1.43 $\pm$ 0.31	18.80 $\pm$ 1.62
$\Delta$ <i>yhmA</i>	1.17 $\pm$ 0.22	4.26 $\pm$ 0.23	0.55 $\pm$ 0.17*	22.64 $\pm$ 1.42

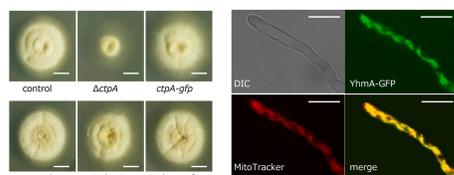
*yhmA*遺伝子破壊株において、NADPH/NADP<sup>+</sup>比が顕著に低下した。YhmAはNADPHの再生に関与している可能性が示唆された。

### 細胞内のアミノ酸濃度

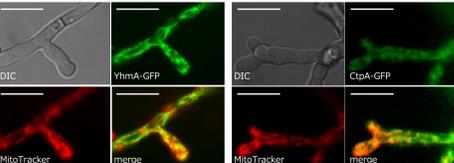
Amino acids ( $\mu\text{mol/g wet mycelia}$ )	Control	$\Delta$ <i>ctpA</i>	$\Delta$ <i>yhmA</i>	Ptet- <i>ctpA</i> -S $\Delta$ <i>yhmA</i>
Asp	2.78 $\pm$ 0.47	1.85 $\pm$ 0.17	1.96 $\pm$ 0.083	1.19 $\pm$ 0.18*
Ser	2.87 $\pm$ 0.70	2.26 $\pm$ 0.14	2.69 $\pm$ 0.37	1.58 $\pm$ 0.18
Glu	7.37 $\pm$ 0.80	6.38 $\pm$ 0.92	7.63 $\pm$ 0.38	3.16 $\pm$ 0.80*
Gly	4.47 $\pm$ 1.06	4.41 $\pm$ 0.24	4.95 $\pm$ 0.74	1.55 $\pm$ 0.19*
Ala	39.49 $\pm$ 8.85	39.74 $\pm$ 2.25	43.26 $\pm$ 4.57	9.77 $\pm$ 0.78*
Ile	1.66 $\pm$ 0.96	1.07 $\pm$ 0.087	1.12 $\pm$ 0.076	0.24 $\pm$ 0.43
Leu	5.20 $\pm$ 0.26	2.82 $\pm$ 0.62	2.90 $\pm$ 0.35	1.67 $\pm$ 0.51
Tyr	3.05 $\pm$ 0.65	2.31 $\pm$ 0.19	2.33 $\pm$ 0.12	0.56 $\pm$ 0.98*
Phe	3.78 $\pm$ 0.73	2.991 $\pm$ 0.32	2.94 $\pm$ 0.18	2.22 $\pm$ 0.20
His	7.08 $\pm$ 0.99	4.71 $\pm$ 0.34	4.80 $\pm$ 0.14	3.58 $\pm$ 0.26*
Lys	11.30 $\pm$ 2.01	3.52 $\pm$ 1.03*	4.48 $\pm$ 0.52*	2.53 $\pm$ 0.82*
Arg	31.86 $\pm$ 9.33	19.06 $\pm$ 0.98	14.69 $\pm$ 0.46	11.55 $\pm$ 1.21
Met	0.70 $\pm$ 0.30	0.44 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.13
Val	2.61 $\pm$ 0.63	1.91 $\pm$ 0.23	1.63 $\pm$ 0.24	0.84 $\pm$ 0.29*

有機酸を起点とするアミノ酸合成に着目し、分析した。各破壊株の細胞内のアミノ酸濃度を分析した結果、共通してリジンが減少していた。

### コロニー形態

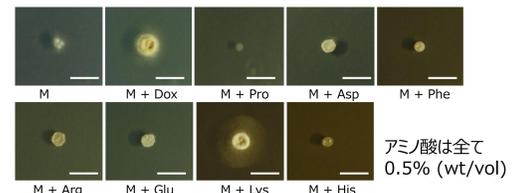


### クエン酸生産培地における局在

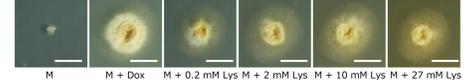


CtpAとYhmAにGFPを付加して蛍光顕微鏡により観察した結果、CtpAとYhmAが少なくともミトコンドリアに局在することが示唆された。

### 各種アミノ酸がPtet-ctpA-S ΔyhmA株の生育に及ぼす影響

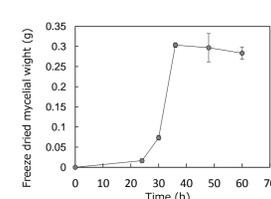


### リジンがPtet-ctpA-S ΔyhmA株の生育に及ぼす影響

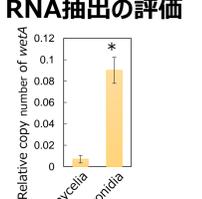


最少培地にリジンを添加すると*ctpA*と*yhmA*の二重破壊条件でも生育できることが明らかになった。

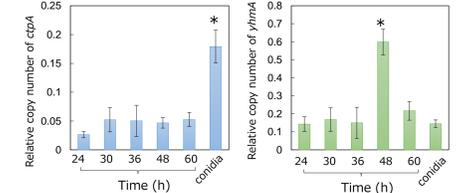
### 最少培地での生育曲線



### 分生子からのRNA抽出の評価



### ctpAとyhmAの遺伝子発現



*ctpA*は分生子、*yhmA*は栄養増殖中の菌糸 (定常期) において高発現した。