

令和元年5月16日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07672

研究課題名（和文）白麹菌のクエン酸合成・分泌に関わる遺伝子クラスターの機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of a gene cluster related to citric acid synthesis and excretion in the white koji fungus

研究代表者

二神 泰基（FUTAGAMI, TAIKI）

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：60512027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：焼酎の製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。本研究では、白麹菌において2つのミトコンドリア局在タンパク質 CtpA と YhmA（それぞれ出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Ctp1 と Yhm2 のホモログ）を解析し、これらがミトコンドリアから細胞質にクエン酸を排出する主要な輸送体であり、排出されたクエン酸は細胞質のアセチルCoAの合成に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

焼酎造りに用いられる白麹菌と黒麹菌が高生産するクエン酸は、発酵過程において雑菌の増殖を防ぐ重要な役割がある。また、白麹菌、黒麹菌と近縁の黒カビはクエン酸の工業生産に利用されている。本研究で解析した白麹菌のミトコンドリア局在クエン酸トランスポーター（CtpAとYhmA）に関する知見は、糸状菌によるクエン酸高生産機構の理解を深め、発酵プロセスの最適化に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* (*A. kawachii*) produces a large amount of citric acid during the process of fermenting shochu, a traditional Japanese distilled spirit. In this study, we characterized *A. kawachii* CtpA and YhmA, which are homologous to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial citrate transporters Ctp1 and Yhm2, respectively. Biochemical and gene disruption analyses showed that the CtpA and YhmA are mitochondrial citrate transporters required for normal hyphal growth, conidium formation, cytosolic acetyl-CoA synthesis, and citric acid production in *A. kawachii*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：白麹菌 クエン酸 トランスポーター RNA結合タンパク質 Acetyl-CoA ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、焼酎製造に使用される麹菌である。その性質として、アミラーゼやグルコシダーゼなどに代表される糖質加水分解酵素を高分泌生産し、麹の原料である米や大麦に含まれる多糖類を単糖レベルに分解することが挙げられる。さらに、清酒、味噌、醤油などの製造に使用される黄麹菌 *Aspergillus oryzae* とは異なり、クエン酸を高度に分泌生産する特徴をもつ。クエン酸の生産は、もろみの pH を低く保つことで雑菌の増殖を防ぐという意味があり、安定した焼酎製造を可能にしている。

(2) クエン酸はミトコンドリアの TCA 回路において生産され、細胞質、菌体外へと排出される。白麹菌の類縁菌である *Aspergillus niger* はクエン酸の工業生産に利用されており、その生化学、および数理モデルを用いた研究において、その高生産にはクエン酸の効率的な排出が重要であることが指摘されていた (①)。

(3) ゲノム解析技術の進歩により様々な菌株のゲノム情報が明らかになるなかで、新たな規則性が見出されている。例えば代謝系の遺伝子のクラスターに関しては、これまで原核生物において見出されていたが、真核生物においても明らかにされ、遺伝子間に機能的な関連が報告されている。(②)。子囊菌門に属する 4 糸状菌 (モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans*、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea*、イネいもち病菌 *Magnaporthe grisea*、コムギふ枯病菌 *Stagonospora nodorum*) のゲノムにおいて保存されている遺伝子クラスターの中で代謝系遺伝子に着目したところ、クエン酸合成酵素遺伝子 (*citA*) の上流に推定 RNA 結合タンパク質遺伝子 (*nrdA*)、下流に推定クエン酸-オキソグルタル酸対向輸送体遺伝子 (*yhmA*) を見出した (図 1)

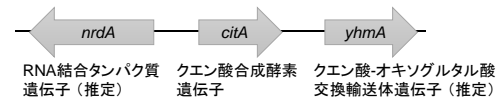


図1 クエン酸合成酵素遺伝子近傍の保存遺伝子

2. 研究の目的

(1) 本研究では、白麹菌の推定クエン酸-リンゴ酸交換輸送体 (CtpA)、およびクエン酸合成酵素遺伝子の近傍にコードされている推定クエン酸-オキソグルタル酸対向輸送体 (YhmA) の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *A. kawachii* S02 株および *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A 株を親株として使用した。コントロール株は、比較対象である各遺伝子破壊株および相補株と同じ栄養要求性を示す株とした。白麹菌の菌株は最少培地 (www.fgsc.net/methods/animed.html) に必要に応じてアルギニン (0.21% [wt/vol])、あるいはメチオニン (0.15% [wt/vol]) を添加して培養した。あるいは、Citric Acid Production (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。出芽酵母の培養には、YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) 培地、グルコース (2% [wt/vol]) あるいは酢酸ナトリウム (1% [wt/vol]) を炭素源とする最少培地を用いた。

(2) 白麹菌 S02 株を宿主として、*ctpA* および *yhmA* 遺伝子破壊株を構築した。これらの遺伝子破壊は、pDC1 に由来する *argB* マーカーの挿入により行った。次に、*ctpA* および *yhmA* の相補株は、白麹菌野生株のゲノム DNA に由来する *sC* マーカーを用いて行った。また、各遺伝子破壊株に *sC* 遺伝子のみを形質転換し、栄養要求性を統一した遺伝子破壊株とした。次に、CtpA-S と YhmA-S を Tet-On システムの制御下で発現する株を構築するために、pVG2.2 ベクターのマーカーを *sC* マーカーに付け替えて使用した。まず、pVG2.2 ベクターを用いて *ctpA* 遺伝子をコンディショナル発現可能な株を構築し、*yhmA* を *bar* マーカーで破壊し、Ptet-*ctpA-S* Δ*yhmA* 株を取得した。さらに、GFP 融合タンパク質である CtpA-GFP と CtpA-GFP の発現株を pGS により構築した。

(3) CtpA-GFP および YhmA-GFP の局在観察を、倒立蛍光顕微鏡 (DMI6000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) により行った。画像のコントラストは、LAS AF Lite software, version 2.3.0, build 5131 (Leica Microsystems) で調整した。

(4) *S. cerevisiae* W303-1A 株を宿主として、*kanMX* 遺伝子を用いて *YHM2* を破壊した。また、YCplac22 を用いて *YHM2* および白麹菌の *yhmA* の相補試験を行った。

(5) CtpA-S および YhmA-S の活性測定を行うために、CtpA-S および YhmA-S を S-tag と S タンパク質との相互作用を利用したアフィニティー精製により粗精製した。CtpA-S と YhmA-S をリポソームと混合し、凍結融解およびソニケーションによりプロテオリポソームを調整した。リポソームの調整には、1- α -phosphatidylcholine from egg yolk (Nacalai Tesque) を用いた。また、リポソーム外部の有機酸 (基質) を除去するために、Bio Spin 6 columns (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた。反応開始時間は、1 mM [1,5-¹⁴C]citrate (18.5 kBq; PerkinElmer,

Waltham, MA) を添加した時間とし、37°Cで30分間反応させた。その後、リポソーム外部の有機酸(基質)をBio Spin 6 columns (Bio-Rad)を用いて除去し、Ultima Gold scintillation cocktail (PerkinElmer)と混合した後、リポソーム内部に取り込まれた[1,5-¹⁴C]citrateを液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb 3180TR/SL liquid scintillation analyzer [PerkinElmer])により測定した。

(6) 菌体内外の有機酸を測定した。菌体内からの有機酸の抽出は、熱水抽出法により行った。有機酸の定量は、液体クロマトグラフィー(Prominence system [Shimadzu, Kyoto, Japan])により行った。検出器は、CDD-10AVP conductivity detector (Shimadzu)を使用した。また、有機酸の分離には、タンデムに2連結したShimadzu Shim-pack SCR-102H columns (300 × 8 mm [inside diameter], Shimadzu)を50°Cで使用した。移動相(4 mM *p*-toluenesulfonic acid monohydrate)は、流速0.8 ml/minで使用し、ポストカラム反応液(4 mM *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, 16 mM bis-Tris, 80 μM EDTA)は流速0.8 ml/minで使用した。

(7) 菌体内外のアミノ酸の測定には、蛍光検出器(RF-10AXL [Shimadzu])を装備した液体クロマトグラフ(Prominence system)を用いた。分離は、Shimadzu Shim-pack Amino-Na column (100 × 6.0 mm [inside diameter]; Shimadzu)を60°Cで用いた。また、移動相(amino acid mobile phase kit, Na type [Shimadzu])は流速0.6 ml/minで使用し、反応液(amino acid reaction kit [Shimadzu])は流速0.2 ml/minで用いた。検出器は、Excitationを350 nm、Emissionを450 nmに設定した。

(8) 菌体内のアセチル-CoAの測定を行った。集菌した後、液体窒素の存在下で乳鉢と乳棒で破碎し、100 mgの菌糸を1 mlの冷却1 M HClO₄溶液と混合した。遠心した後、上清のpHを2 N KOHを用いてpH 7.0に調整し、PicoProbe acetyl-CoA assay kit (Fluorometric) (Abcam, Cambridge, UK)とInfiniteM200 FA (Tecan, Männedorf, Switzerland)を用いてアセチル-CoAを定量した。

4. 研究成果

(1) CtpAおよびYhmAがクエン酸輸送体であるかどうかを明らかにするために、活性を測定した。精製CtpA-Sおよび精製YhmA-Sをリポソームに再構成し、プロテオリポソームへの[¹⁴C]クエン酸の取り込みをオキサロ酢酸、リンゴ酸などの内部基質の有無において測定した。その結果、[¹⁴C]クエン酸の取り込みは、CtpA-SおよびYhmA-S再構成プロテオリポソームの両方において、対向輸送基質の存在下でのみ観察された(図2AおよびB)。この結果から、CtpA-SとYhmA-Sが対向輸送体であることが示唆された。CtpA-Sは、*cis*-アコニット酸とリンゴ酸に対して高い特異性を示し、オキサロ酢酸、コハク酸、およびクエン酸に対しても活性を示した(図2A)。一方、YhmA-Sはより広い特異性を示し、クエン酸、2-オキソグルタル酸、リンゴ酸、*cis*-アコニット酸、およびコハク酸に対する同程度の高い活性を示し、オキサロ酢酸に対しても活性を示した(図2B)。

(2) CtpAおよびYhmAの生理学的役割を調べるために、白麹菌のΔ*ctpA*およびΔ*yhmA*株のコロニー形態を観察した。Δ*ctpA*株はコントロール株と比べて25°Cおよび30°Cで増殖遅延を示し、37°Cおよび42°Cで回復した(図3A)。一方、Δ*yhmA*株は、試験した全ての温度でコントロール株よりも小さいコロニー直径を示した。

Δ*ctpA*株およびΔ*yhmA*株のコロニーの着色はコントロール株よりも弱く、分生子形成が低下したことが示唆されたため分生子形成能を評価した(図3B)。最少培地を用いて各菌株を30°Cで4日間培養し、形成した分生子数を測定した。その結果Δ*ctpA*株およびΔ*yhmA*株の1 cm²あたりの分生子数は、コントロール株と比べて約30%まで減少した(図3B)。この結果から、CtpAおよびYhmAが分生子形成に関与していることが示唆された。なお、各破壊株への*ctpA*(Δ*ctpA*+*ctpA*)および*yhmA*(Δ*yhmA*+*yhmA*)の相補は、上述した表現型を戻すことを確認した。次に、Δ*ctpA*株の*yhmA*を破壊することによって*ctpA yhmA*二重破壊物を構築することを試みた。しかし、

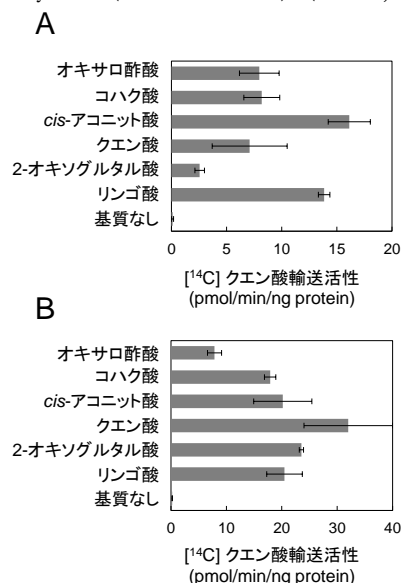


図2 CtpA-S (A)とYhmA-S (B)のクエン酸輸送活性

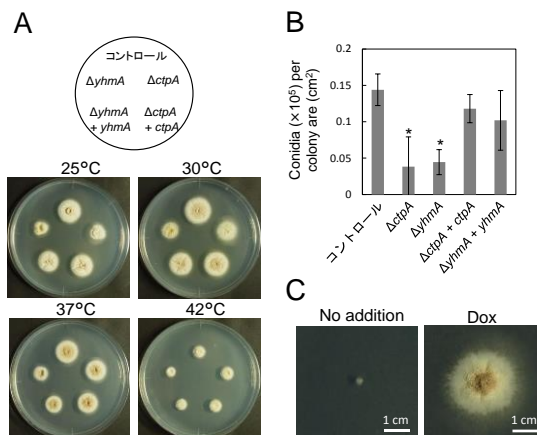


図3. 白麹菌の各菌株のコロニー (A)、分生子数 (B)、Ptet-*ctpA*-S Δ*yhmA* 株のコロニー (C) *コントロールと比較して有意差あり (p < 0.05, Welch's t-test)

得られた形質転換体はすべてヘテロカリオン体であった。そこで、Tet-On システムを用いて S タグ融合 *ctpA* 遺伝子 (*ctpA-S*) をコンディショナル発現可能な株を構築し、次いでドキシサイクリン (Dox) 存在下の *ctpA-S* 発現条件下で *yhmA* を破壊し、Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株を構築した。Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は、Dox 未添加の最少培地 (*ctpA-S* が発現しない条件) で顕著な増殖遅延を示し (図 3C)、*ctpA* および *yhmA* の二重破壊は最少培地で合成致死となることが示唆された。

(3) 有機酸生産における CtpA および YhmA の役割を調べるために、コントロール株、 Δ *ctpA* 株、 Δ *yhmA* 株、および Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株の有機酸生産を比較した (図 4)。最少培地を用いてコントロール株、 Δ *ctpA* 株、および Δ *yhmA* 株を 30°C で 36 時間前培養し、次いで CAP 培地に移し、さらに 30°C で 48 時間培養した。一方、Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は、Dox を含む最少培地で前培養した (Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は Dox の非存在下 [*ctpA-S* が発現しない条件] ではほとんど増殖できないため)。その後、培養上清と菌糸細胞内の有機酸濃度を、それぞれ細胞外画分と細胞内画分として測定した。まず、細胞外画分では、クエン酸が主要な有機酸として高濃度で検出された (図 4A)。 Δ *ctpA* 株はコントロール株よりもオキソグルタル酸の生産量が 3.3 倍となり、 Δ *yhmA* 株はクエン酸およびオキソグルタル酸の生産量がそれぞれ 0.24 倍と 1.6 倍になった。さらに、Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は、細胞外画分において、0.06 倍低いクエン酸生産、2.9 倍高いリンゴ酸生産、および 20 倍高いオキソグルタル酸生産となった。次に、細胞内画分において、クエン酸、リンゴ酸、およびオキソグルタル酸は同程度の濃度で検出された (図 4B)。*ctpA* および *yhmA* 破壊によるクエン酸生産の減少は有意ではなかったが、 Δ *ctpA* 株は 0.58 倍低いリンゴ酸生産を示し、 Δ *yhmA* 株は 0.46 倍低いリンゴ酸生産、0.5 倍低いオキソグルタル酸生産を示した。一方、Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株のクエン酸、リンゴ酸、およびオキソグルタル酸の細胞内濃度は、コントロール株よりも 0.18 倍、0.18 倍、および 0.35 倍といずれも有意に低かった。これらの結果から、CtpA および YhmA が白麹菌の有機酸生産に重要な役割を果たすこと示された。また、細胞外画分のクエン酸の濃度は、リンゴ酸およびオキソグルタル酸の濃度と負の相関が見られた。さらに、Ptet-*ctpA-S* Δ *yhmA* 株は、細胞外画分および細胞内画分の両方においてクエン酸濃度が顕著に低下した。

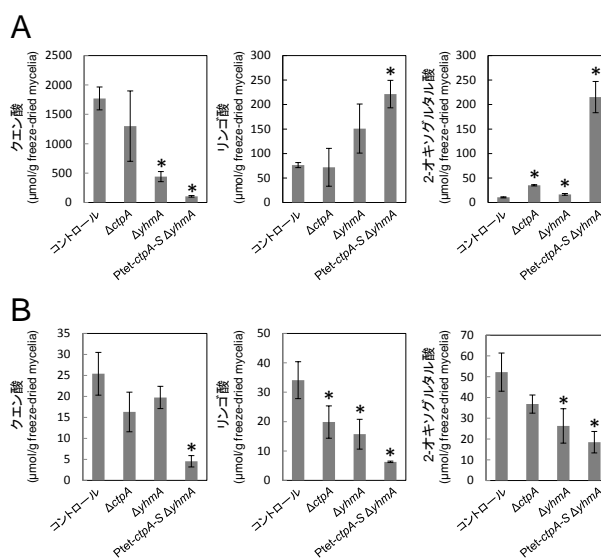


図4 菌体外 (A) と菌体内 (B) の有機酸濃度
*コントロールと比較して有意差あり ($p < 0.05$, Welch's t-test)

(4) CtpA および YhmA の細胞内局在を解析するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を CtpA および YhmA の C 末端に融合させ、それぞれ Δ *ctpA* および Δ *yhmA* 株で発現させた。CtpA-GFP および YhmA-GFP の機能的発現は、 Δ *ctpA* および Δ *yhmA* 株の表現型を相補することで確認した (図 5A)。まず、最少培地で培養した際の CtpA-GFP と YhmA-GFP の局在を観察した。YhmA-GFP の緑色蛍光は、ミトコンドリアを染色する MitoTracker Red CMXRos の赤色蛍光と重なった (図 5B)。しかし、CtpA-GFP の緑色蛍光は検出できなかった (data not shown)。そこで、*ctpA* および *yhmA* は最少培地中よりも CAP 培地中においてより高レベルで転写されることが示唆されていたため (data not shown)、CAP 培地で各菌株を培養した。その結果、YhmA-GFP (図 5C) および CtpA-GFP (図 5D) の緑色蛍光が検出され、いずれも完全ではないが MitoTracker Red CMXRos の赤色蛍光と重なった。この結果から、CtpA-GFP と YhmA-GFP がミトコンドリアに局在していることが示唆された。また、CtpA と YhmA がクエン酸生産条件で高発現することが示唆された。

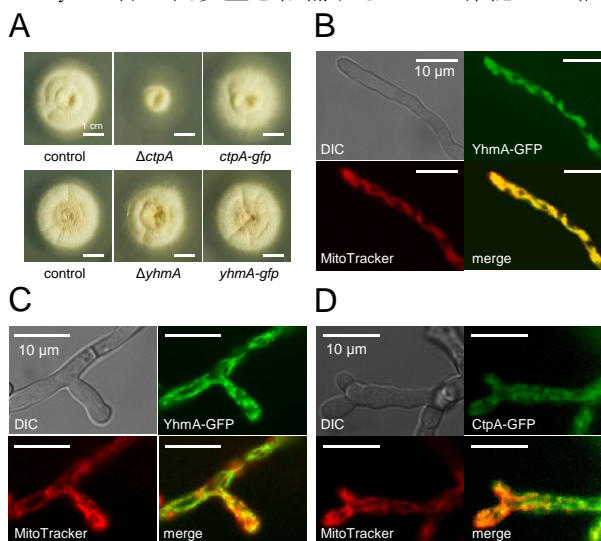


図5 白麹菌の Δ *ctpA*および Δ *yhmA*における*ctpA-gfp*と*yhmA-gfp*の相補試験(A)、最少培地におけるYhmA-GFPの局在(B)、CAP培地におけるYhm-GFPとCtpA-GFPの局在(C、D)

(5) *S. cerevisiae* $\Delta ctp1$ および $\Delta yhm2$ における白麹菌の *ctpA* および *yhmA* の相補性試験を行った。*S. cerevisiae* の各破壊株において、白麹菌の *ctpA* と *yhmA* を、それぞれ *ctp1* と *yhm2* の native promoter で発現させた。*S. cerevisiae* において *ctp1* の破壊による表現型の変化は生じなかったと報告されていたため、まず低温ストレス (15°C)、細胞壁ストレス (コンゴレーレッドおよびカルコフルオルホワイト)、および各種炭素源 (グルコース、アセテート、グリセロール) の培養条件下でスポットアッセイを行った。しかし、同様に *ctp1* の破壊による表現型の変化は観察されなかったため (data not shown)、*ctpA* の相補性試験は出来なかった。一方、*S. cerevisiae* $\Delta yhm2$ 株は、酢酸 (SA) 培地で増殖遅延を示すがグルコース (SD) 培地では示さないと報告されていた (図 6) (③)。SA 培地において、*yhmA* の相補株 ($\Delta yhm2+yhmA$) は、*YHM2* の相補株 ($\Delta yhm2+YHM2$) と同程度まで生育遅延が回復したことから、白麹菌の *yhmA* は、*S. cerevisiae* において *YHM2* の機能を相補することが示唆された。

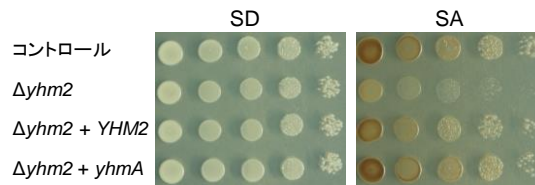


図6 出芽酵母 $\Delta yhm2$ 株における白麹菌の*yhmA*の相補試験

(6) クエン酸回路の代謝物はアミノ酸合成の基質として利用されることが知られている。また、*A. nidulans* および *A. niger* において、細胞質のクエン酸はアセチル-CoA 合成の基質として利用されることが報告されていた。そこで、*ctpA* と *yhmA* の破壊が細胞内アミノ酸とアセチル-CoA レベルに影響を与えるかどうかを調べた (図 7)。アミノ酸の細胞内濃度を比較するために、白麹菌のコントロール株、 $\Delta ctpA$ 株、 $\Delta yhmA$ 株、および *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株を最少培地を用いて 30°C で 36 時間前培養し、次いで CAP 培地に移し、さらに 30°C で培養した。その後、細胞内画分中のアミノ酸レベルを測定した。その結果、リジンの細胞内濃度は、コントロール株よりも $\Delta ctpA$ および $\Delta yhmA$ 株において有意に低いことが分かった (それぞれ 0.29 倍および 0.43 倍) (data not shown)。さらに、*Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株は、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、リシン、およびアラニンなどのアミノ酸の濃度も減少した (それぞれ 0.53 倍、0.53 倍、0.43 倍、0.28 倍、および 0.31 倍) (data not shown)。次に、 $\Delta ctpA$ 、および $\Delta yhmA$ 株はコントロール株と同様の細胞内アセチル CoA レベルが観察された (図 7)。一方、*Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株はコントロール株と比較してアセチル-CoA レベルが 0.42 倍減少した。

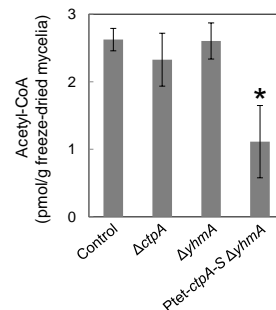


図7 細胞内のアセチル-CoA濃度
*コントロールと比較して有意差あり ($p < 0.05$, Welch's t-test)

(7) *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株において *ctpA-S* の発現低下が細胞内のアミノ酸およびアセチル-CoA の濃度を有意に低下させることを見出した。そこで、Dox を含まない最少培地 (*ctpA-S* が発現しない条件) における *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の増殖遅延 (図 3C) が、アミノ酸およびアセチル-CoA 合成の欠陥によるものであるかどうかを調べるために、各種アミノ酸および酢酸を供給した際に生育が回復するかどうかを試験した。*Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株を、0.5% (wt/vol) の濃度で各種のアミノ酸、酢酸 (細胞内でアセチル-CoA に変換される) を含む寒天培地で培養した (図 8A)。*Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の増殖遅延は、プロリンまたはヒスチジンの添加では改善されなかったが、アスパラギン酸、フェニルアラニン、アルギニン、およびグルタミン酸の添加によってある程度改善され、リジンと酢酸の添加によって大きく改善された。次に、液体培地での *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の増殖に対するアミノ酸および酢酸の影響を調べた (図 8B)。その結果、酢酸の添加が、Dox の添加と同程度に *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の増殖遅延を改善した。また、リジンに加えてアルギニンによっても増殖遅延が改善され、これは寒天培地で得られた結果とは異なっていた。

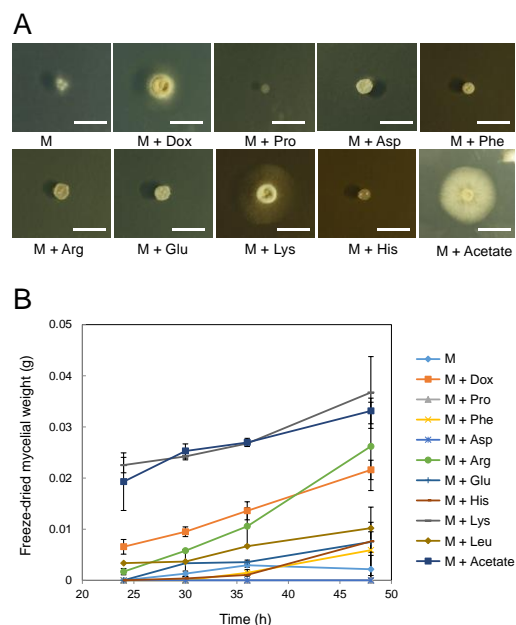


図8 白麹菌*Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の生育に及ぼすアミノ酸、Dox、および酢酸の影響. 寒天培地(A)、液体培地(B)

(8) 酢酸とリジンが最少培地での *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の増殖遅延を改善することが分かったため (図 8)、酢酸あるいはリジンがアセチル CoA レベルを回復させた可能性があると考え、最少培地における *Ptet-ctpA-S* $\Delta yhmA$ 株の細胞内アセチル-CoA レベルに及ぼす Dox、酢酸およ

びリジンの影響を比較した (図9)。Dox を含有する最少培地を用いて Ptet-*ctpA-SΔ yhmA* 株を 30°C で 36 時間培養し、次いで Dox、酢酸、あるいはリジンを含む最少培地に移し、さらに 30°C で 12、24、および 48 時間培養した。前培養が終了した時点として 0 時間として、細胞内画分中のアセチル-CoA レベルを経時的に測定した。Ptet-*ctpA-SΔ yhmA* 株のアセチル-CoA 濃度は、添加なしの最少培地で 12、24、および 48 時間培養する間に徐々に減少した (それぞれ、0.47 倍、0.41 倍、および 0.36 倍の減少) (図9)。一方、Dox とリジンを含む最少培地でも培養 24 時間後に有意な減少が観察されたが (Dox については 0.52 倍の減少およびリジンについては 0.28 倍の減少)、Dox、酢酸、およびリジンの添加は 12 および 24 時間におけるアセチル-CoA 濃度の減少を改善した。この結果から、CtpA および YhmA がアセチル-CoA 合成に関与しており、Ptet-*ctpA-SΔ yhmA* 株の増殖遅延の原因のひとつがアセチル-CoA 合成の不全であることが示唆された。真菌において、リジンは α -アミノアジピン酸経路で生成されることが知られており、本経路の初期反応でオキシグルタル酸とアセチル-CoA が縮合する。この逆反応により、リジンはアセチル-CoA を供給できる可能性があると考えられた。

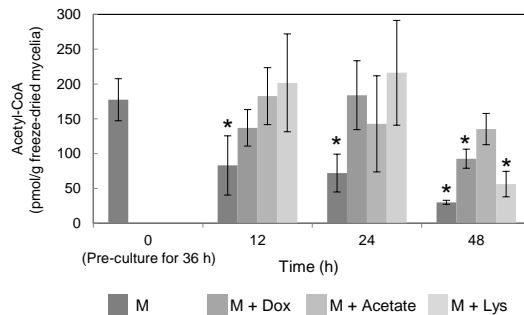


図9 白麹菌Ptet-*ctpA-SΔ yhmA*株の細胞内のアセチル-CoA 濃度に及ぼすDox、酢酸およびリジンの影響
*有意差あり ($p < 0.05$, Welch's *t*-test)

<引用文献>

- ① Karaffa L, Kubicek CP. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. 61, 189-196.
- ② Nützmann HW, Scazzocchio C, Osbourn A. Metabolic gene clusters in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2018. 52, 159-183.
- ③ Castegna A, Scarcia P, Agrimi G, Palmieri L, Rottensteiner H, Spera I, Germinario L, Palmieri F. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2010. 285, 17359-17370.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kadooka C, Izumitsu K, Onoue M, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. 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.* 2019. 85, e03136-18.
DOI: 10.1128/AEM.03136-18.

[学会発表] (計13件)

- ① Kadooka C, Izumitsu K, Onoue M, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. Mitochondrial citrate transporters CtpA and YhmA are involved in cytosolic acetyl-CoA biosynthesis in the white koji fungus, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. 30th Fungal Genetics Conference. March 12-17, 2019, Pacific Grove, CA, U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：玉置 尚徳

ローマ字氏名：TAMAKI Hisanori

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：農水産獣医学域農学系

職名：教授

研究者番号：20212045

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。